

Ricardo Alexandre da Silva Santos Afonso

**SENSIBILIDADE À INSULINA
PÓS-PRANDIAL: MECANISMOS
FISIOLÓGICOS DE ACTIVAÇÃO E
FISIOPATOLOGIA NA OBESIDADE**

Lisboa

2009

Dissertação de Doutoramento em Ciências da Vida, especialidade de
Fisiologia, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Nova de Lisboa



Realizado com o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia
(SFRH/BD/9082/2002), no âmbito do POCI 2010, Formação Avançada
para a Ciência - Medida IV.3 (III Quadro Comunitário de Apoio)

À Lena e aos meus Pais

Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou
construir um castelo...

Fernando Pessoa

PUBLICAÇÕES E DISTINÇÕES

Os trabalhos de doutoramento a que reporta a presente dissertação, deram origem às publicações e distinções abaixo indicadas.

PUBLICAÇÕES:

- **Ricardo A. Afonso**, W. Wayne Lutt, Josh Schafer, Dallas J. Legare, António G. Oliveira, M. Paula Macedo (2009). High-fat diet decreases post-prandial insulin sensitivity primarily by impairing the hepatic parasympathetic pathway. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* (submetido).
- Rogério T. Ribeiro, **Ricardo A. Afonso**, Maria P. Guarino, M. Paula Macedo (2008). Loss of postprandial insulin sensitization during maturation and aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 63: 560-565.
- **Ricardo A. Afonso**, W. Wayne Lutt, Rogério T. Ribeiro, Dallas J. Legare, M. Paula Macedo (2007). Insulin resistance in two animal models of obesity: a comparison of HISS-dependent and HISS-independent insulin action in high-fat diet-fed and Zucker rats. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 50: 110-114.
- **Ricardo A. Afonso**, Rogério T. Ribeiro, Ana B. Fernandes, Rita S. Patarrão, M. Paula Macedo (2007). Hepatic-dependent and -independent insulin action are impaired in the obese Zucker rat model. *Obesity (Obes Res)* 15: 314-321.
- Parissa Sadri, Maria A.G. Reid, **Ricardo A. Afonso**, Joshua Schafer, Dallas J. Legare, M. Paula Macedo, W. Wayne Lutt (2006). Meal-induced insulin sensitization quantified in conscious and anaesthetized rat models comparing liquid mixed meal with glucose and sucrose. *Br. J. Nutr.* 95: 288-295.
- Celina Santos, **Ricardo A. Afonso**, Maria P. Guarino, Rita S. Patarrao, Ana B. Fernandes, M. Paula Macedo, Jorge Caldeira (2006). In vitro Nitrosation of Insulin A and B-chains. *Eur. J. Mass. Spectrom.* 12: 331-338.
- Maria P. Guarino, **Ricardo A. Afonso**, Nuno Raimundo, João F. Raposo, M. Paula Macedo (2003). Hepatic Glutathione and Nitric Oxide are Critical for Hepatic Insulin

Sensitizing Substance (HISS) Action. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284: G588-G594.

- Rogério T. Ribeiro, Ricardo A. Afonso, M. Paula Macedo (2002). The Hepatic Insulin Sensitizing Substance (HISS) action - gender comparison in Wistar rats. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 45: 55-56.

DISTINÇÕES:

- Prémio Sá Marques, atribuído pela Sociedade Portuguesa de Diabetologia (S. P. D.), em **2008**, pelo trabalho intitulado “Hepatic-dependent and -independent insulin action are impaired in the obese Zucker rat model”.
- 1.º Prémio para comunicação científica sob a forma de *poster*, atribuído pela *Western Pharmacology Society* (WPS), na Reunião Anual da WPS em Banff, Canadá, **2007**, pela apresentação do trabalho “High-fat diet induces HISS-dependent insulin resistance”.
- Prémio Hargreaves, atribuído pela Sociedade Portuguesa de Diabetologia (S. P. D.) em colaboração com a Jaba Farmacêutica, em **2007**, pelo trabalho “HISS impairment is responsible for insulin resistance in high-fat diet-induced obesity”.
- Prémio para a melhor apresentação científica sob a forma de *poster*, concedido na Reunião Anual *Western Pharmacology Society* (WPS), em Honolulu, E.U.A., em **2004**, pela apresentação “HISS-dependent insulin resistance in spontaneously hypertensive rats results from impaired nitric oxide action and can be reversed by SIN-1”.
- 1.º Prémio para Investigação em Obesidade, atribuído pela Sociedade Portuguesa de Endocrinologia Diabetes e Metabolismo (SPEDM) e pela ABBOTT, em **2003**, ao projecto de investigação intitulado “Papel terapêutico do óxido nítrico e glutatióno na resistência à insulina associada à obesidade”.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar aqui o meu mais profundo agradecimento e reconhecimento às pessoas que, quer do ponto de vista profissional, quer numa perspectiva pessoal, me apoiaram ao longo destes anos.

Começo por agradecer à Prof. Doutora Maria Paula Macedo, minha orientadora. A ela muito devo daquilo que sou científica e profissionalmente. Ela soube sempre, como uma verdadeira timoneira, levar o barco a bom porto, em tempos de tempestade ou de bonança. A sua forma de estar na Ciência, como na vida, ensinou-me muito.

Ao Prof. Doutor Pedro F. Costa, que me recebeu no Departamento de Fisiologia para este doutoramento e que manteve sempre a porta do seu gabinete aberta para me aconselhar ou guiar. Devo dizer que ele foi incansável na árdua tarefa de rever esta dissertação, a qual enriqueceu com os seus comentários e discussões.

À Prof. Doutora Maria da Graça Morais. Estou-lhe grato, não só pela confiança que depositou em mim ao oferecer-me a oportunidade de ensinar nesta casa, mas também pelo incentivo e apoio demonstrados, a título institucional e pessoal. Por todo o respeito que sempre pautou o seu percurso e relações profissionais, muito obrigado.

Ao Prof. Doutor António Bensabat Rendas, que me deu a guarida na Faculdade de Ciências Médicas e sempre apoiou o meu trabalho.

Ao Prof. Doutor Miguel Mota Carmo, com quem tive o privilégio de colaborar. Agradeço-lhe, porque na fase inicial do meu percurso científico o seu contributo e a sua confiança foram vitais. É, no entanto, difícil de agradecer ao Prof. Doutor Miguel Mota Carmo ignorando a vertente pessoal, uma vez que quando mais precisei ele não me faltou; com efeito, ele e o Dr. Caldeira Fradique devolveram-me algo que cheguei a temer perdido. Não há palavras para lhes agradecer.

Ao Prof. Doutor W. Wayne Lutt, do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Faculdade de Medicina de Manitoba, Canadá, cujo convívio foi uma enorme fonte de riqueza científica, permitindo-me crescer pela sua influência.

Aos Profs. Drs. Jorge Caldeira e Celina Santos, do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, com quem trabalhei no “mundo da Química”. Todos estes anos em que temos trabalhado juntos fizeram-me sentir em casa, como nunca antes o haviam feito e, por isso, obrigado.

Ao Prof. Doutor António Gouveia de Oliveira, pela sua ajuda e tempo dispensado na resposta a algumas questões estatísticas com que me deparei.

À Prof. Doutora Ana Isabel Santos, que, pelo seu trabalho e dedicação, deu ao Biotério da FCM-UNL uma qualidade ímpar que muito contribuiu para o nosso sucesso. A sua disponibilidade para me ajudar e a confiança depositada em mim abriram caminho para aquilo que espero ser uma sólida amizade.

À Prof. Doutora Paula Videira e a todo o seu grupo de investigação com quem temos colaborado, pela compreensão e ajuda sempre voluntariosa.

Uma palavra também para a Prof. Doutora Maria Amália Botelho, sempre interessada e apoiante, e cujos comentários foram uma mais-valia para o meu trabalho.

Gostaria também de agradecer aos meus colegas de laboratório, actuais e passados, companheiros “de luta” com quem passei muitas horas por dia, todos os dias.

À Ana Fernandes, cuja chegada foi uma saudável lufada de ar fresco. A sua capacidade crítica, lapidar e recheada de uma sinceridade absoluta ajudou-me a confiar na sua opinião e a ver nela um apoio imprescindível para um colega de bancada. Os seus comentários sagazes foram também vitais para a elaboração desta dissertação, na leitura da qual a Ana foi incansável.

Ao Rogério Ribeiro. Fiz muitas vezes equipa com ele e partilhei muitos protocolos, pelo que parte do trabalho que deu origem às nossas dissertações foi o reflexo do sucesso da nossa relação profissional. Pautando-nos pelo respeito mútuo, o Rogério mostrou-me uma perspectiva diferente das relações profissionais e até da vida.

Também com a minha colega Rita Patarrão eu aprendi a observar os problemas numa perspectiva diferente. A enorme dedicação, força de vontade e intensidade com que vive a prática laboratorial é uma lição para todos nós. Mesmo discordando muitas vezes, conseguimos cooperar e eu sempre soube que podia contar com ela para dar o passo seguinte no meu (nosso) trabalho.

Porque o início do Doutoramento foi há muito, mas não se esquece, gostaria de agradecer também à Maria Pedro Guarino, com quem treinei a cirurgia inicialmente e que sempre me ajudou no laboratório, onde partilhei com ela muitos e bons momentos.

Finalmente, não posso deixar de agradecer à Nina Correia, amiga e ex-colega de laboratório, que me concedeu abrigo durante um ano, em Winnipeg.

Uma palavra ainda de apreço a todas as pessoas que tornaram o meu percurso mais fácil: Dra. Maria Lurdes Andrade, Dra. Adalgisa Tavares, Helena Almeida, Luísa Barata, Sofia Ramos, Isabel Ribeiro Silva, Firmina Lebre, Augusta Marques, Dra. Mafalda Nascimento, Mariana Lavajo, Gracinda Menezes, Luísa Frade e Dra. Mafalda Rodrigues.

A título pessoal, várias pessoas contribuíram nos bastidores para este momento.

Começo por agradecer à Lena, minha mulher e companheira. No presente, como no passado, ela tem sido uma fonte de inspiração e é, desde há muito, a Estrela Polar que me indica o Norte. Todo o incentivo que se pode desejar, todo o apoio que se pode esperar, eu tenho recebido dela. E é principalmente nas adversidades que a sua grandeza e força interior mais se têm revelado: ajuda-me quando estou, segura o forte quando não estou. Sem ela, o meu castelo seria apenas um monte de pedras soltas. Por isso, este trabalho também é seu.

Ao meu Pai, pela sua infindável paciência e profunda amizade, que fazem dele o meu melhor amigo.

À minha Mãe, pela sua perseverança e força de vontade, qualidades que sempre fizeram dela uma pedra basilar na minha vida.

Ao Miguel e à Raquel, os meus pseudo-filhos. Na verdade, os melhores filhos que alguém poderia escolher. Também eles contribuíram para esta dissertação com uma boa dose da sua paciência.

À Diana, ao Tio Fernando e à Tia São. Por serem quem são, um oásis. Estarão sempre no meu coração.

A todos os meus amigos, que mereciam mais do meu tempo, mas que sempre foram de uma compreensão excepcional e sempre disseram “presente” quando precisei. Uma palavra especial para o Vasco, Vanda O., Alexandre, Joana, os gémeos Nuno e Paulo, o Paulo C., Pedro, Sílvia, Bé, Catarina, Nuno V., Vanda G., e Luís F. Uma última palavra à Nati, muito importante na minha vida e na escolha da área em que fiz este trabalho.

ÍNDICE

Índice de figuras e tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	xvii
<i>Summary</i>	xix
PREFÁCIO	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1. Aspectos fundamentais do metabolismo fisiológico da glucose	6
1.1.1. Digestão e absorção de glucose	7
1.1.2. Aporte celular de glucose - transportadores de glucose	8
1.1.2.1. Transportadores de glucose dependentes do sódio (SGLT)	8
1.1.2.2. Transportadores de glucose facilitativos (GLUT)	9
1.1.3. Metabolismo fisiológico da glucose	12
1.1.3.1. Metabolismo da glucose no estado de jejum	13
1.1.3.2. Metabolismo da glucose no estado pós-prandial	15
1.1.4. Regulação do metabolismo fisiológico da glucose	17
1.2. Papel da insulina na homeostase da glucose	23
1.2.1. Estrutura da insulina	23
1.2.2. Biossíntese e armazenamento da insulina	24
1.2.3. Secreção da insulina	25
1.2.4. Mecanismo de acção da insulina na captação periférica de glucose - transdução de sinal	30
1.2.4.1. Estrutura e função do receptor de insulina	30
1.2.4.2. Vias de sinalização da insulina envolvidas no aporte de glucose	32
1.2.4.3. Translocação e exocitose dos GLUT4	35
1.2.4.4. Inibição da transdução de sinal da insulina	36
1.2.5. Acção hipoglicemiante da insulina - da célula para o organismo	37
1.2.6. Importância do estado prandial para a acção hipoglicemiante da insulina	38
1.3. Papel do sistema nervoso autónomo na homeostase da glucose	40

1.4. Importância do mecanismo hepático da HISS para a acção da insulina e homeostase da glucose no estado pós-prandial	43
1.4.1. A importância do fígado para a acção da insulina e a descoberta da via da HISS	43
1.4.2. A síntese da HISS	45
1.4.3. Acção da HISS no músculo esquelético - o órgão-alvo	49
1.4.4. O estado prandial e a regulação fisiológica da via da HISS	51
1.4.5. Manipulação da via da HISS	53
1.5. Alterações fisiopatológicas da sensibilidade à insulina	54
1.5.1. Insulinorresistência e factores associados ao seu desenvolvimento ...	54
1.5.2. Insulinorresistência associada à disfunção da via da HISS - modelos e alterações fisiopatológicas conhecidos	64
1.5.2.1. Alimentação com dieta rica em sacarose	64
1.5.2.2. Envelhecimento	65
1.5.2.3. Hipertensão	66
1.5.3. Insulinorresistência e obesidade	68
1.5.4. Insulinorresistência e diabetes tipo 2	80
1.6. Avaliação da sensibilidade à insulina <i>in vivo</i>	86
1.6.1. Métodos baseados em valores basais de glicémia e insulinémia	86
1.6.2. O clamp euglicémico hiperinsulinémico (HIEC)	88
1.6.3. O teste de tolerância à insulina (ITT)	89
1.6.4. Testes de tolerância à glucose oral (OGTT) e intravenosa (ivGTT)	90
1.6.5. Teste de tolerância a uma refeição (<i>Meal tolerance test</i> , MTT)	92
1.6.6. O teste rápido de sensibilidade à insulina (RIST)	93
2. HIPÓTESES E OBJECTIVOS	95
3. MATERIAIS E MÉTODOS	103
3.1. Reagentes	105
3.2. Animais	107
3.3. Procedimentos pré-cirúrgicos e anestesia	109
3.3.1. Procedimentos pré-cirúrgicos e anestesia no modelo agudo	109
3.3.1.1. Procedimentos pré-cirúrgicos no modelo agudo	109
3.3.1.2. Anestesia no modelo agudo - indução e manutenção	109

3.3.2. Procedimentos pré-cirúrgicos e anestesia no modelo crónico	110
3.3.2.1. Procedimentos pré-cirúrgicos no modelo crónico	110
3.3.2.2. Anestesia no modelo crónico	111
3.4. Procedimentos cirúrgicos	112
3.4.1. O circuito arterio-venoso extracorporal	112
3.4.2. Procedimentos cirúrgicos no modelo agudo	114
3.4.2.1. Traqueotomia	114
3.4.2.2. Cateterização vascular para inserção do circuito arterio-venoso no modelo agudo	115
3.4.2.3. Cateterização da veia porta	117
3.4.2.4. Cateterização gástrica e entérica no modelo agudo	118
3.4.2.5. Desnervação do plexo anterior hepático	119
3.4.3. Procedimentos cirúrgicos no modelo crónico	120
3.4.3.1. Cateterização vascular para inserção do circuito arterio-venoso no modelo crónico	120
3.4.3.2. Cateterização gástrica no modelo crónico	121
3.5. Procedimentos pós-cirúrgicos	122
3.5.1. Procedimentos pós-cirúrgicos no modelo agudo	122
3.5.2. Procedimentos pós-cirúrgicos no modelo crónico	122
3.6. Determinação da pressão sanguínea	124
3.7. Administração de fármacos e soluções	125
3.8. Quantificação da glicémia	127
3.9. Quantificação da sensibilidade à insulina - o RIST	131
3.10. Determinação da insulinémia	134
3.10.1. Determinação da insulinémia por rádio-imunoensaio (RIA)	134
3.10.2. Determinação da insulinémia por ensaio imunoenzimático por absorção em fase sólida (ELISA)	135
3.11. Quantificação do glutatióno hepático	137
3.11.1. Quantificação de glutatióno pelo método colorimétrico	137
3.11.2. Quantificação de glutatióno por cromatografia líquida de elevada pressão (HPLC)	138
3.12. Quantificação da massa adiposa	141
3.12.1. Estimativa da massa adiposa corporal total	141
3.12.2. Quantificação da massa adiposa abdominal	142
3.13. Manipulação da via da HISS	143

3.13.1. Inibição da acção da insulina dependente da via da HISS	143
3.13.1.1. Jejum	143
3.13.1.2. Desnervação do plexo anterior hepático	143
3.13.1.3. Administração de atropina	144
3.13.1.4. Administração de N-monometil-L-arginina (L-NMMA)	145
3.13.2. Activação ou potenciação da via da HISS	145
3.13.2.1. Ingestão de uma refeição (estado pós-prandial)	146
3.13.2.2. Administração de 3-hidrocloro de morfolinosidnonimina (SIN-1)	146
3.13.3. Quantificação da acção da insulina dependente da via da HISS	147
3.14. Protocolos experimentais	148
3.14.1. A administração intragástrica ou intra-entérica de uma refeição mista potencia a sensibilidade à insulina	148
3.14.1.1. Efeito da administração intragástrica de diferentes soluções na sensibilidade à insulina em animais anestesiados	148
3.14.1.2. Efeito da desnervação hepática na potenciação da acção da insulina induzida pela refeição mista em animais anestesiados	149
3.14.1.3. Efeito da administração intragástrica de diferentes soluções-refeições na sensibilidade à insulina dependente da HISS em animais conscientes	150
3.14.1.4. Estudo da importância do intestino na potenciação da acção da insulina induzida pela refeição líquida mista	150
3.14.2. A insulinoresistência pós-prandial associada à obesidade induzida por uma dieta rica em lípidos é provocada pelo decréscimo de acção da HISS	151
3.14.2.1. Dietas e regime alimentar	151
3.14.2.2. Efeito da dieta rica em lípidos na sensibilidade à insulina	153
3.14.2.3. Efeito da dieta rica em lípidos na massa gorda e na concentração de glutatióno hepático	154
3.14.3. A insulinoresistência pós-prandial em ratos Zucker obesos está associada à diminuição de ambas as componentes de acção da insulina	154
3.14.3.1. Concentração de glutatióno hepático	155

3.14.3.2. Estudo da sensibilidade à insulina dependente e independente da HISS em ratos Zucker de 9 e 52 semanas: efeito da administração de atropina	155
3.14.3.3. Efeito da administração de SIN-1 na resistência à insulina pós-prandial induzida por L-NMMA em ratos Zucker	155
3.14.4. O contributo do compromisso da acção da HISS para a insulinoresistência pós-prandial num modelo animal de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	156
3.14.4.1. Rações	156
3.14.4.2. Estudo da sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos ZDF.	156
3.15. Métodos estatísticos	158
4. EFEITO DA COMPOSIÇÃO DA REFEIÇÃO NA POTENCIAÇÃO DA ACÇÃO DA INSULINA: MECANISMO DEPENDENTE DA HISS	159
4.1. Introdução e objectivos	161
4.2. Protocolos	163
4.3. Resultados	164
4.3.1. Efeito da administração intragástrica de água na sensibilidade à insulina no modelo agudo	164
4.3.2. Efeito da administração intragástrica de soluções glicídicas na sensibilidade à insulina no modelo agudo	165
4.3.2.1. Efeito da sacarose intragástrica na sensibilidade à insulina em animais anestesiados	165
4.3.2.2. Efeito da glucose intragástrica na sensibilidade à insulina em animais anestesiados	167
4.3.3. Efeito da administração intragástrica da refeição líquida mista na sensibilidade à insulina no modelo agudo	168
4.3.4. Efeito da desnervação hepática na potenciação da acção da insulina induzida pela refeição líquida mista no modelo agudo	171
4.3.5. Efeito da glucose intragástrica na sensibilidade à insulina dependente da HISS no modelo crónico	172
4.3.6. Efeito da administração intragástrica da refeição líquida mista na sensibilidade à insulina dependente da HISS no modelo crónico	174
4.3.7. Importância do intestino na potenciação da acção da insulina induzida pela refeição líquida mista	178
4.4. Discussão	181

5. A INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL ASSOCIADA À OBESIDADE INDUZIDA POR UMA DIETA RICA EM LÍPIDOS É PROVOCADA PELO DECRÉSCIMO DE ACÇÃO DA HISS	193
5.1. Introdução e objectivos	195
5.2. Protocolos	197
5.3. Resultados	198
5.3.1. Massa corporal (peso) e pressão arterial média	198
5.3.2. Glicémia e insulinémia	198
5.3.3. Concentração de glutatono hepático	199
5.3.4. Efeito da dieta rica em lípidos na sensibilidade à insulina	200
5.3.5. Efeito da dieta rica em lípidos na massa gorda	206
5.3.6. Correlação entre a adiposidade e a sensibilidade à insulina	210
5.3.6.1. Massa gorda corporal e sensibilidade à insulina	210
5.3.6.2. Massa gorda abdominal e sensibilidade à insulina	212
5.4. Discussão	215
6. A INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL EM RATOS ZUCKER OBESOS ESTÁ ASSOCIADA À DIMINUIÇÃO DE AMBAS AS COMPONENTES DE ACÇÃO DA INSULINA	227
6.1. Introdução e objectivos	229
6.2. Protocolos	231
6.3. Resultados	232
6.3.1. Massa corporal (peso) e pressão arterial média	232
6.3.2. Glicémia e insulinémia	233
6.3.3. Concentração de glutatono hepático	233
6.3.4. Estudo da sensibilidade à insulina dependente e independente da HISS em ratos Zucker de 9 e 52 semanas	235
6.3.4.1. Efeito da administração de atropina na sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos Zucker com 9 semanas de idade	235
6.3.4.2. Efeito da administração de atropina na sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos Zucker com 52 semanas de idade	240
6.3.4.3. Efeito da idade na sensibilidade à insulina nos ratos Zucker: comparação entre as 9 e as 52 semanas de idade	245
6.3.5. Efeito da administração de SIN-1 na resistência à insulina pós-prandial induzida por L-NMMA em ratos Zucker	247
6.4. Discussão	250

7. O CONTRIBUTO DO COMPROMISSO DA ACÇÃO DA HISS PARA A INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL NUM MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2	263
7.1. Introdução e objectivos	265
7.2. Protocolos	267
7.3. Resultados	268
7.3.1. Massa corporal (peso) e pressão arterial média	268
7.3.2. Glicémia	268
7.3.3. Concentração de glutatono hepático nos ratos ZDF	270
7.3.4. Efeito da ração na sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos ZDF	272
7.3.5. Comparação da sensibilidade à insulina dependente e independente da HISS entre ratos Zucker diabéticos (ZDF) e não diabéticos (LZR)	276
7.4. Discussão	278
8. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS	287
8.1. Efeito da composição da refeição na potenciação da acção da insulina: mecanismo dependente da HISS, iniciado no intestino	289
8.2. Diferentes modelos de obesidade apresentam mecanismos distintos de insulinoresistência pós-prandial	296
8.3. O envelhecimento afecta principalmente a acção da HISS, mas não agrava a insulinoresistência em ratos Zucker obesos	300
8.4. A acção da insulina dependente da HISS está comprometida em ratos Zucker diabéticos e é agravada por determinadas dietas	301
8.5. Perspectivas de trabalho futuro	304
BIBLIOGRAFIA	307

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1.1: Destinos metabólicos da glucose	12
Figura 1.2: Efeitos da insulina, glucagon, catecolaminas e glucose no metabolismo glicídico, em função do estado prandial	18
Figura 1.3: Representação da estrutura da molécula de insulina e de proinsulina	23
Figura 1.4: Esquema representativo do padrão de secreção da insulina	26
Figura 1.5: Representação do receptor da insulina	31
Figura 1.6: Principais vias de transdução de sinal da insulina para o aporte de glucose através de transportadores de glucose 4 (GLUT4)	33
Figura 1.7: Via de síntese da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS)	49
Figura 1.8: Síntese e acção da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS)	50
Figura 1.9: Principais factores associados ao desenvolvimento de insulinoresistência	63
Figura 1.10: Principais mecanismos de associação entre a obesidade e insulinoresistência ..	72
Figura 1.11: Representação das 5 fases do desenvolvimento da diabetes tipo 2	81
Figura 3.1: Representação do circuito arterio-venoso	113
Figura 3.2: Traqueia e alguns dos principais vasos sanguíneos do pescoço	115
Figura 3.3: Localização da artéria e veia femoral esquerdas	116
Figura 3.4: Esquema de localização relativa da veia porta, fígado e estruturas adjacentes ..	117
Figura 3.5: Estômago, duodeno, fígado, pâncreas e órgãos adjacentes do rato	118
Figura 3.6: Esquema do sistema de quantificação de glucose pelo analisador de glucose	127
Figura 3.7: Perfil típico de um teste rápido de sensibilidade à insulina (RIST)	132
Figura 3.8: Esquema representativo do ciclo de eluição utilizado para quantificação do glutatono por cromatografia líquida de elevada pressão (HPLC)	140
Figura 3.9: Esquema ilustrativo do protocolo de administração de atropina para inibição da acção da insulina dependente da via da HISS	144
Figura 3.10: Esquema do regime alimentar a que os animais que receberam dieta <i>standard</i> (STD) ou dieta rica em lípidos foram submetidos	153
Figura 4.1: Efeito da água destilada na sensibilidade à insulina	164

Figura 4.2: Efeito da administração intragástrica (ig) de sacarose na potenciação da sensibilidade à insulina	166
Figura 4.3: Efeito da administração intragástrica (ig) de glucose na potenciação da sensibilidade à insulina	168
Figura 4.4: Efeito da refeição mista na acção da insulina	170
Figura 4.5: Efeito da desnervação hepática na potenciação da acção da insulina induzida pela refeição mista	171
Figura 4.6: Efeito da atropina na acção da insulina após administração intragástrica (ig) de glucose em animais conscientes	173
Figura 4.7: Efeito da atropina na potenciação da acção da insulina induzida pela refeição mista em animais conscientes	175
Figura 4.8: Acção da insulina dependente da HISS em animais conscientes, após administração de glucose ou refeição mista	176
Figura 4.9: Percentagens de potenciação da acção da insulina induzida pelos vários tipos de refeição, em animais conscientes e anestesiados	177
Figura 4.10: Efeito da inserção da banda intestinal na potenciação da acção da insulina induzida por uma refeição mista, administrada por via intragástrica (IG) ou por via intra-entérica (IE)	179
Figura 4.11: Efeito da administração da refeição líquida mista por via intragástrica (IG) ou intra-entérica (IE), em animais com banda intestinal	180
Figura 5.1: Concentração de glutatono hepático de ratos alimentados com dieta controlo (STD) ou dieta rica em lípidos durante 1 (HFD-1) ou 4 (HFD-4) semanas	200
Figura 5.2: Perfis dinâmicos médios dos RISTs controlo, pós-atropina e da acção da HISS, em ratos alimentados com dieta controlo (STD), ou com dieta lipídica	201
Figura 5.3: Sensibilidade à insulina total, dependente e independente da HISS em ratos Sprague-Dawley, alimentados com dieta <i>standard</i> ou dieta rica em lípidos	204
Figura 5.4: Percentagem da acção total da insulina que é dependente da HISS	205
Figura 5.5: Massa corporal gorda e não gorda em ratos alimentados com dieta <i>standard</i> ou dieta rica em lípidos	207
Figura 5.6: Massas dos depósitos de gordura abdominal colhidos de ratos Sprague-Dawley, alimentados com dieta normal (STD) e dieta rica em lípidos	208
Figura 5.7: Regressão linear da massa gorda abdominal em função da massa gorda corporal	209
Figura 5.8: A massa gorda corporal correlaciona-se negativamente com a sensibilidade à insulina dependente da HISS	211

Figura 5.9: Acção da insulina (total, dependente e independente da HISS) em função da massa gorda abdominal	214
Figura 6.1: Concentração de glutatono hepático em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR) de 9 e 52 semanas de idade	236
Figura 6.2: Perfis dinâmicos dos RISTs controlo (acção total da insulina), pós-atropina (insulina <i>per se</i>) e da acção da HISS, em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR) com 9 semanas	238
Figura 6.3: Sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR), com 9 semanas de idade	240
Figura 6.4: Percentagem de contribuição da acção da HISS para a acção total da insulina em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR) de 9 semanas de idade	241
Figura 6.5: Perfis de acção da insulina total (RIST controlo), dependente da HISS e independente da HISS (RIST pós-atropina), em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR), de 52 semanas	243
Figura 6.6: Sensibilidade à insulina (RIST índice) pós-prandial, dependente e independente da HISS, em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR) com 52 semanas	245
Figura 6.7: Percentagem de contribuição das duas componentes (dependente e independente da HISS) para a acção da insulina pós-prandial em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR) com 52 semanas de idade	246
Figura 6.8: O envelhecimento afecta ambas as componentes de acção da insulina nos ratos Zucker não obesos (LZR), mas não nos ratos obesos (OZR)	248
Figura 6.9: Efeito da manipulação da síntese de *NO hepático na sensibilidade à insulina (RIST Índice) de ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR), com 9 semanas ..	250
Figura 6.10: Percentagem de recuperação da sensibilidade à insulina induzida pelo dador de *NO SIN-1, após inibição da síntese de *NO hepático pela L-NMMA	251
Figura 6.11: Deficiências na via de sinalização da insulina que conduz à translocação de GLUT4, em ratos Zucker obesos (OZR)	259
Figura 7.1: Glicémia pós-prandial em ratos Zucker diabéticos (ZDF) e não diabéticos (LZR) .	269
Figura 7.2: Glutatio hepático em ratos Zucker diabéticos (ZDF) e não diabéticos (LZR)	271
Figura 7.3: Perfis dinâmicos médios dos RISTs controlo, pós-atropina e da acção da HISS, em ratos ZDF de 9 semanas, alimentados com Panlab ou Purina	272
Figura 7.4: Acção hipoglicemiante da insulina (RIST índice) em ratos ZDF com 9 semanas de idade, alimentados com ração Panlab ou com ração Purina	275

Figura 7.5: Percentagem da acção da insulina que é dependente da HISS em ratos ZDF alimentados com Panlab ou Purina	276
Figura 7.6: Sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos Zucker diabéticos (ZDF) e não diabéticos (LZR)	277
Figura 8.1: A hipótese de activação da via da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS) em resposta à ingestão de uma refeição mista	293
Figura 8.2: Mecanismos de insulinoresistência dependente e independente da HISS em dois modelos animais de obesidade: o rato alimentado com dieta rica em lípidos (HFD) e o rato Zucker obeso (OZR)	299
Figura 8.3: A insulinoresistência parece resultar da exposição a factores ambientais, mediante uma predisposição genética	303

TABELAS

Tabela I - Isoformas dos transportadores de glucose facilitativos (GLUT)	11
Tabela II - Factores inflamatórios e humorais envolvidos na regulação da sensibilidade à insulina	59
Tabela III - Modelos animais (roedores) de obesidade	77
Tabela IV - Exemplos de modelos animais (roedores) de diabetes tipo 2	84
Tabela V - Estirpe, idade e proveniência (fornecedor) dos ratos utilizados	107
Tabela VI - Composição da refeição líquida mista comercial (Boost®)	149
Tabela VII - Composição reportada pelos fabricantes das dietas controlo e rica em lípidos ..	152
Tabela VIII - Composição das rações Panlab A04 e Purina 5008	157
Tabela IX - Parâmetros dos perfis médios do RIST controlo, RIST pós-atropina e acção da HISS, em ratos alimentados com dieta <i>standard</i> ou com dieta rica em lípidos	203
Tabela X - Correlação entre a massa gorda peri-renal, peri-entérica e epididimal e ambas as componentes de acção da insulina	213
Tabela XI - Parâmetros médios dos perfis dos RISTs controlo, pós-atropina e de acção da HISS, em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR) de 9 semanas de idade	237
Tabela XII - Parâmetros médios dos perfis de acção da insulina total, dependente da HISS e independente da HISS, em OZR e LZR de 52 semanas	242
Tabela XIII - Parâmetros dos perfis de acção da insulina total, dependente da HISS e independente da HISS, em Zucker diabéticos alimentados com Panlab ou Purina	274

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACh:** acetilcolina
- ADP:** difosfato de adenosina
- Akt:** proteína cinase B (Akt/PKB)
- ANCOVA:** análise de covariância
- ANOVA:** análise de variância
- AS160:** *Akt Substrate of 160 kDa*
- ATP:** trifosfato de adenosina
- BMP-9:** *bone morphogenetic protein 9*
- BSA:** albumina do soro bovino
- bw:** massa ou peso corporal
- cAMP:** monofosfato de adenosina cíclico
- CAP:** *Cbl-associated protein*
- Cbl:** protooncogene *Casitas b-lineage lymphoma* (c-Cbl)
- Ciclo TCA:** ciclo dos ácidos tricarbóxicos (ciclo de Krebs)
- CMTFQ:** 4-cloro-1-metil-7-trifluorometilquinolina
- DAG:** diacilglicerol
- DNFB:** 2,4-dinitrofluorobenzeno
- DTPA:** ácido dietilenotriaminapenta acético
- et al.:** e outros (do latim, *et aliae*)
- EDTA:** ácido etilenodiamina tetra-acético
- ELISA:** ensaio imunoenzimático por absorção em fase sólida (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- γ -GCS:** sintetase da γ -glutamilo-cisteína
- GLP-1:** *glucagon-like peptide 1*
- IGF:** *insulin-like growth factor*
- IRS:** substrato do receptor da insulina
- GIP:** péptido insulínico dependente da glucose
- GLUT:** proteína transportadora de glucose
- GSH:** L- γ -glutamilo-L-cisteínico-glicina; glutationo (forma reduzida)
- GSH-E:** éster mono-etilo de glutationo
- GSK:** cinase do sintase do glicogénio

GSNO: s-nitrosoglutationo
GSSG: glutationo (forma oxidada)
H₂O₂: hidroperóxido de hidrogénio
H₂SO₄: ácido sulfúrico
HCl: ácido clorídrico
HFD: dieta rica em lípidos (*high-fat diet*)
HIEC: clamp euglicémico hiperinsulinémico
HISS: substância hepática sensibilizadora da insulina
HMIT: transportador de mio-inositol associado ao H⁺
HOMA: *homeostasis model assessment*
HPLC: cromatografia líquida de elevada pressão
ig: intragástrico
IL: interleucina
IKK: inibidor do cinase do NFκB
IMC: índice de massa corporal
IP₃: 1,4,5-trifosfato de inositol
ipv: intraportal
IRS: substrato do receptor da insulina
ITT: teste de tolerância à insulina
iv: intravenoso
ivGTT: teste de tolerância à glucose intravenosa
JNK: cinases N-terminal do c-Jun
L-NMMA: N-monometil-L-arginina
LZR: ratos Zucker não obesos (fa/+)
MAPK: proteína cinases activadas pelo mitogénio
NADP: fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida
NEM: N-etilmaleimida
NO: monóxido de azoto (óxido nítrico)
NOS: sintase do monóxido de azoto
OGTT: teste de tolerância à glucose oral.
OZR: ratos Zucker obesos (fa/fa)
PBEF: *pre-B cell colony-enhancing factor (visfatin)*
PDK: cinase dependente do fosfoinositídeo
PH: domínio de homologia para a plecstrina
PI3K: 3-fosfatidilinositol cinase

PIP₃: 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol
PKA: proteína cinase A ou dependente do cAMP
PKB: proteína cinase B (Akt/PKB)
PKC: proteína cinase C
PLC: fosfolipase C
PtdInsP₃: 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol
PTPase: proteína tirosina fosfatase
QUICKI: *quantitative insulin sensitivity check index*
RBP-4: *retinol-binding protein 4*
RIA: radioimunoensaio
RIST: teste rápido de sensibilidade à insulina (*rapid insulin sensitivity test*)
ROS: espécies reactivas de oxigénio (radicais livres)
RSNO: s-nitrosotiol
SAPK: proteína cinase activada pelo *stress*
SGLT: transportador de glucose dependente do sódio
SH: grupo tiol
SH2: homologia-Src-2
SHR: rato espontaneamente hipertenso
SIN-1: 3-hidroclorato de morfolinosidnonimina
SNP: nitroprussiato de sódio
TCA: ácido tricloroacético
TCEP: tris-(2-carboxietil)-fosfano
TNF: *tumor necrosis factor*
TRIS: 2-amina-2-hidroximetilpropano-1,3-diol; tri-hidroximetilaminometano
UDP: difosfato de uridina
UDPGlc: complexo difosfato de uridina-glucose
UTP: trifosfato de uridina
ZDF: ratos Zucker diabéticos obesos

RESUMO

A acção hipoglicemiante da insulina é máxima no estado pós-prandial e depende da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS). Esta dissertação visa o estudo do mecanismo de acção da insulina no estado pós-prandial e em particular da via dependente da HISS, em modelos animais fisiológicos e patológicos (obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2).

Avaliaram-se diferentes tipos de refeição quanto ao seu efeito potenciador da acção da insulina, em ratos Sprague-Dawley (modelo fisiológico). A administração intragástrica de glúcidos não afecta a acção da insulina, mas a refeição mista (lípidos, glúcidos e proteínas), promove a sensibilização para a acção da insulina, através de um processo que parece ser iniciado no intestino e envolve a activação da via da HISS.

Nos estudos de obesidade, o primeiro modelo utilizado foi o rato alimentado com dieta hiperlipídica (HFD), no qual se observou uma insulinoresistência pós-prandial devida quase exclusivamente à perda de acção da HISS, que se correlaciona com a adiposidade (corporal e abdominal) e parece ser devida à diminuição da sua síntese.

O segundo modelo de obesidade usado foi o rato Zucker obeso (OZR), modelo genético que apresenta uma diminuição idêntica de ambas as componentes de acção da insulina (dependente e independente da HISS). A alteração na via da HISS parece localizar-se a jusante da sua síntese, sugerindo que um ou vários pontos comuns entre as vias de sinalização intracelular da HISS e da insulina *per se* estão alterados, resultando num diminuto aporte de glucose. No OZR, a acção da HISS não se altera com a idade, apresentando-se baixa também às 52 semanas de idade. Em ratos não obesos (LZR), a acção da HISS diminui entre as 9 e 52 semanas, sendo acompanhada por um decréscimo menos acentuado, embora significativo, da acção da insulina *per se*. A diminuição da acção da HISS com a idade parece ser a principal causa de insulinoresistência pós-prandial em LZR velhos, não se agravando no OZR.

No modelo de diabetes tipo 2 estudado, o rato Zucker diabético (ZDF), também ambas as componentes de acção da insulina estavam diminuídas. No entanto, a alimentação com ração Purina, ligeiramente mais energética e lipídica do que a ração *standard*, agrava a disfunção da via da HISS nestes animais, sugerindo que a sensibilidade à insulina em ratos ZDF é muito susceptível a factores nutricionais.

A via da HISS é essencial para potenciar a acção da insulina do estado de jejum para o pós-prandial e a sua disfunção é em grande medida responsável pela insulinoresistência observada nos modelos animais de obesidade e diabetes estudados.

SUMMARY

Hypoglycemic insulin action is maximal in the postprandial state and depends on the hepatic insulin sensitizing substance (HISS). The present thesis focus on the postprandial insulin action and, in particular, on the HISS-dependent pathway, both in physiological and pathological (obesity and type 2 diabetes *mellitus*) animal models.

Different meals were tested in Sprague-Dawley rats (physiological model) for their capacity to potentiate insulin action. It was observed that intragastric administration of either glucose or sucrose does not affect insulin sensitivity, unlike the mixed meal, composed of lipids carbohydrates and proteins, which significantly potentiated insulin action through a process that seems to be initiated at the intestine and involves activation of the HISS pathway.

For the obesity studies, the first of the two obesity models used was the high fat-fed rat (HFD), in which the postprandial insulin resistance was almost exclusively caused by the decrease of HISS action, probably due to the impairment of HISS synthesis. This impairment correlates with both corporal and abdominal adiposity.

The second obesity model used was the obese Zucker rat (OZR), a genetic model, which presented a similar impairment of both components of insulin action (HISS-dependent and -independent). The modification in HISS pathway in OZR seems to be located downstream from HISS synthesis, that is, at its site of action - the skeletal muscle -, suggesting that one or several points common to both HISS and insulin *per se* signaling cascades are defective, resulting in a decreased glucose uptake.

In OZR, HISS action does not decrease with age and is also low at 52 weeks of age. In non-obese rats (LZR), HISS action decreases from 9 to 52 weeks and it is accompanied by a lower, although significant, impairment of insulin action *per se*. HISS action impairment with aging seems to be the major cause of insulin resistance in old LZR, whereas insulin resistance is not aggravated in aging OZR.

In the type 2 diabetes model, the diabetic Zucker rat (ZDF), both components of insulin action were also equally impaired. However, feeding the animals with Purina rat chow, which is slightly more caloric and more lipidic, induces additional HISS deterioration when compared with the standard lab diet, suggesting that insulin sensitivity in ZDF is very susceptible to nutritional factors.

In conclusion, HISS pathway is essential to potentiate insulin action from the fasted to the fed state and its dysfunction is highly responsible for the insulin resistance observed in the obesity and diabetes animal models studied.

PREFÁCIO

O número de casos de diabetes *mellitus* tem aumentado consideravelmente em todo o mundo e Portugal não é excepção. Estimativas recentes publicadas pela *International Diabetes Federation* (IDF) apontam para uma prevalência da diabetes de 6-8 % da população portuguesa e sugerem que atinja os 9.5 % até 2025 (Cardoso *et al.*, 2008), tornando-se um problema de saúde alarmante, com sérias repercussões do ponto de vista social e económico. A grande contribuição para este aumento é dada pela crescente incidência da diabetes tipo 2 na sociedade actual, resultado do sedentarismo e estilo de vida na sociedade actual.

A diabetes tipo 2 é uma doença multifactorial, reconhecidamente associada a um conjunto de patologias, das quais a mais preponderante é a obesidade. Com efeito, embora nem todas as pessoas obesas sejam diabéticas, a obesidade acompanha a diabetes tipo 2 em cerca de 80 % dos casos no mundo ocidental (Ferrannini, 1998), sendo que se estimou que no ano 2000 o número mundial de diabéticos-obesos era cerca de 171 milhões, o qual se projecta duplicar até 2030 (Martyn *et al.*, 2008).

Apesar do mecanismo pelo qual a obesidade e a diabetes se relacionam permaneça por elucidar, estas duas condições surgem comumente associadas a um estado de insulinoresistência, o qual é caracterizado por uma deficiente acção da insulina, inicialmente no estado pós-prandial e posteriormente também no jejum (Lautt, 2007). A insulinoresistência é uma alteração fisiopatológica que parece preceder a deficiente produção de insulina pelo pâncreas, a qual resulta numa elevação constante da concentração plasmática de glucose e conseqüente diabetes (Kashyap e Defronzo, 2007).

Se por um lado o pâncreas é essencial para a secreção de insulina, por outro lado, na última década tem sido descrita uma via hepática que contribui para a acção

da insulina após a refeição e que, quando alterada, induz ou agrava a condição de insulinoresistência (Lautt, 2007; Ceriello *et al.*, 2008). E de facto, de acordo com o recente relatório da IDF, as anomalias metabólicas que ocorrem numa fase de pré-diabetes são primeiramente evidentes no estado pós-prandial (Ceriello *et al.*, 2007). Assim, nos últimos anos tem sido dado um maior ênfase à homeostase da glucose no estado pós-prandial, uma vez que é neste período que as alterações à acção da insulina têm maior impacto (Ceriello *et al.*, 2007; Ceriello *et al.*, 2008). Na presente dissertação apresenta-se um estudo do mecanismo hepático envolvido na acção pós-prandial da insulina, bem como das alterações fisiopatológicas que afectam esse mecanismo no contexto de patologias habitualmente associadas à insulinoresistência, como a obesidade e a diabetes.

Até hoje, as abordagens no tratamento da insulinoresistência têm-se centrado única e exclusivamente na insulina, tendo por base estudos realizados numa situação de estado estacionário (jejum). Espera-se que a presente dissertação permita servir de ponto de partida para novas abordagens e terapêuticas para a reversão da condição de insulinoresistência.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

A presente dissertação aborda o tema geral da acção hipoglicemiante da insulina. Em concreto, visa o estudo dos mecanismos de sensibilidade à insulina no estado pós-prandial, em condições fisiológicas e em condições fisiopatológicas, nomeadamente em modelos de obesidade e diabetes.

É nossa hipótese geral que, após uma refeição, a máxima sensibilidade à insulina depende da acção da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS), pelo que a incapacidade de activar a via da HISS ou deficiências na sua acção diminuirão consideravelmente a sensibilidade à insulina.

Deste modo, investigaram-se os processos fisiológicos envolvidos no aumento da acção hipoglicemiante da insulina no estado pós-prandial, no contexto da via da HISS e procurou avaliar-se o impacto de diferentes modelos de obesidade, com e sem diabetes, na acção da insulina no estado pós-prandial e, em particular, na acção da via da HISS.

Espera-se que este trabalho traga alguma luz sobre a questão da sensibilidade à insulina pós-prandial e sobre as alterações observadas em patologias normalmente associadas à insulinoresistência, como a obesidade, podendo ter implicações nutricionais e metodológicas na abordagem da questão da insulinoresistência.

1.1. ASPECTOS FUNDAMENTAIS DO METABOLISMO FISIOLÓGICO DA GLUCOSE

Os glúcidos ¹ são nutrientes muito importantes em mamíferos, principalmente pelo seu papel na produção de uma grande parte da energia necessária à sobrevivência do organismo ². Com efeito, alguns glúcidos representam uma fonte de energia imediatamente utilizável, como a glucose, enquanto outros têm um papel de reserva energética, como o glicogénio ³.

A glucose é um monossacárido ou açúcar simples e é o glícido mais importante do ponto de vista biológico. Outros exemplos de monossacáridos são a frutose e a galactose, ambos isómeros da glucose. A maioria dos glúcidos são absorvidos para a corrente sanguínea sob a forma de glucose, cuja acção biológica é indispensável para o metabolismo celular.

Em situações fisiológicas, os níveis plasmáticos de glucose modulam o metabolismo energético celular, pelo que a manutenção da glicémia é o primeiro e talvez o principal meio de regulação da homeostase da glucose. A manutenção dos níveis plasmáticos de glucose é um processo complexo que envolve várias vias metabólicas e é finamente regulado por mecanismos neuronais e hormonais, os quais promovem o equilíbrio entre a taxa de entrada de glucose na circulação sanguínea e a taxa de captação pelos tecidos. Deficiências nalguns destes mecanismos regulatórios induzem graves alterações fisiopatológicas que afectam a glicémia e,

¹ Os glúcidos são também denominados de glúcidos, oses, açúcares ou hidratos de carbono. O facto de a maioria dos glúcidos apresentarem a fórmula química $C_x(H_2O)_y$, levou a que estes compostos fossem designados por hidratos de carbono. No entanto, alguns glúcidos, como a fucose ($C_6H_{14}O_5$) ou a desoxirribose ($C_5H_{10}O_4$), não apresentam aquela fórmula geral; por conseguinte, a designação hidrato de carbono não é tão abrangente, tendo vindo a cair em desuso (Coimbra e Delgadillo, 1997; Weill, 2000).

² Adicionalmente, os glúcidos podem ter um papel estrutural, caso da celulose ou da quitina, ou desempenhar funções de sinalização, como é o caso das glicoproteínas e dos glicolípidos.

³ O glicogénio é o polissacárido de armazenamento por excelência. É um polímero de glucose que está presente principalmente no fígado e no músculo esquelético, onde, em condições de escassez (por exemplo, jejum) é degradado para formar glucose, a qual pode ser libertada para o sangue (do fígado) para colmatar as necessidades energéticas dos tecidos periféricos (Bollen *et al.*, 1998).

consequentemente, o aporte de glucose para as células, modificando todo metabolismo celular.

A diabetes *mellitus* é a doença mais conhecida associada a alterações da homeostase da glucose e da glicémia. Nesta patologia, os mecanismos que regulam a entrada e saída de glucose da circulação sanguínea sofrem profundas alterações, resultando numa hiperglicémia marcada, a imagem de marca da diabetes *mellitus*.

Nesta secção, abordar-se-ão as principais vias metabólicas envolvidas na homeostase da glucose e sua regulação, bem como os mecanismos de captação celular de glucose.

1.1.1. DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE GLUCOSE

A glucose em circulação provém da produção endógena (pelo fígado ou pelo rim) ou da absorção gastrointestinal, após a digestão de uma refeição.

Através do processo de digestão, que ocorre predominantemente no intestino, os glícidos mais complexos são hidrolisados a dissacáridos e/ou monossacáridos, como a glucose, galactose e frutose, de modo a permitir a sua absorção.

A absorção destes monossacáridos do lúmen intestinal não é um processo de difusão simples. A frutose é transportada através da membrana apical do enterócito por difusão facilitada (via transportador de glucose GLUT5), ao passo que a glucose e a galactose são co-transportadas com sódio pelo transportador de glucose dependente do sódio 1 (SGLT1) - ver secção 1.1.2. Posteriormente, a passagem da glucose e restantes monossacáridos para os capilares através da membrana basolateral faz-se por difusão facilitada através dos transportadores GLUT2.

1.1.2. APORTE CELULAR DE GLUCOSE - TRANSPORTADORES DE GLUCOSE

A glucose é um composto hidrofílico, pelo que não difunde passivamente através das membranas celulares. Portanto, os processos de aporte celular de glucose dependem de proteínas transportadoras, específicas para determinados tecidos.

As proteínas transportadoras de glucose e outros açúcares podem dividir-se estrutural e funcionalmente em dois grupos: transportadores de glucose dependentes do sódio (SGLT) e transportadores de glucose facilitativos, independentes de sódio (GLUT, vulgarmente denominados apenas como transportadores de glucose) (Wood e Trayhurn, 2003).

1.1.2.1. Transportadores de glucose dependentes do sódio (SGLT)

Estas proteínas transportam glucose ¹ contra gradiente, através de um processo em que a glucose é co-transportada com sódio na proporção 2:1. Este é um transporte activo secundário, acoplado a uma bomba sódio-potássio ATPase intracelular. Existem diversos tipos de SGLT, que diferem entre si fundamentalmente quanto à sua localização, afinidade e capacidade de transporte.

O SGLT1 desempenha uma função importante na absorção da glucose; é um transportador de elevada afinidade, presente na membrana apical do enterócito e no túbulo renal proximal (células S3) (Wood e Trayhurn, 2003).

O SGLT2 tem baixa afinidade, elevada capacidade e elevada selectividade e parece desempenhar um principal central na reabsorção renal de glucose; está presente no túbulo renal proximal, onde cerca de 90 % da glucose é reabsorvida (Wood e

¹ Os SGLT também transportam galactose, porém com uma afinidade diferente da glucose; a glucose e a galactose competem entre si, o que se pode observar na absorção intestinal, por exemplo.

Trayhurn, 2003). A glucose não reabsorvida pelo SGLT2 é-o pelo SGLT1 (Wood e Trayhurn, 2003).

Um terceiro tipo de SGLT, o SGLT3 (originalmente denominado SAAT1), é um transportador de glucose de baixa afinidade, presente no intestino delgado, túbulo renal proximal e junção neuromuscular do músculo esquelético (Schmidt *et al.*, 2007).

O SGLT4, também identificado no intestino delgado e no rim, é um transportador de baixa afinidade com a particularidade única de transportar manose com maior eficiência do que a glucose, frutose ou a galactose (Tazawa *et al.*, 2005).

Recentemente, alguns autores sugeriram a existência de outros dois isotipos de SGLT (SGLT5 e 6), mas a sua estrutura e função não foram ainda devidamente caracterizadas (Zhao e Keating, 2007).

1.1.2.2. Transportadores de glucose facilitativos (GLUT)

Os transportadores de glucose facilitativos (GLUT) utilizam o gradiente de glucose (e de outros monossacáridos) para promover a sua difusão (transporte por difusão facilitada).

Desde que o primeiro GLUT (GLUT1) foi descrito por Mueckler e colaboradores em 1985 (Mueckler *et al.*, 1985), outras 12 isoformas de GLUTs foram já identificadas (GLUT1-12 e HMIT, transportador de mio-inositol associado a H⁺).

O GLUT1 parece ser ubíquo, tendo maior expressão no cérebro, incluindo barreira hemato-encefálica, mas também no músculo esquelético, tecido adiposo e fígado em quantidades moderadas. É independente da insulina e é específico para a glucose (Wood e Trayhurn, 2003).

O GLUT2 também funciona de forma independente da insulina. Transporta glucose e frutose, no entanto tem baixa afinidade para a glucose. O GLUT2 é expresso principalmente no pâncreas, onde desempenha a função de sensor de glucose (células

β -pancreáticas), que vai despoletar a secreção de insulina (ver descrição na secção 1.2.3). É também expresso nos hepatócitos (membrana sinusoidal), permitindo o transporte bidireccional de glucose (ver figura 1.1), e, finalmente, no rim e no enterócito, onde permite o transporte de glucose e de frutose (Wood e Trayhurn, 2003).

O GLUT3 tem uma elevada afinidade para a glucose; actua de forma independente da insulina, o que é particularmente útil em tecidos com elevada necessidade de glucose, como é o caso do cérebro (Wood e Trayhurn, 2003).

A acção do GLUT4 é insulino-dependente. Está presente maioritariamente no músculo esquelético e tecido adiposo, mas também no cérebro e no coração (Wood e Trayhurn, 2003). A sua acção no músculo esquelético e no tecido adiposo parece ser responsável pela atenuação dos níveis plasmáticos de glucose no estado pós-prandial, uma vez que aqueles tecidos são os maiores responsáveis pela captação da glucose em circulação (Kemmer *et al.*, 1979; DeFronzo *et al.*, 1981; Scheen *et al.*, 1994). A insulina libertada no estado pós-prandial vai estimular as células-alvo, induzindo a translocação de vesículas de GLUT4 para a membrana plasmática e facilitando o aporte de glucose (uma descrição mais detalhada deste processo é apresentada na secção 1.2.4). Deficiências nos GLUT4 do músculo esquelético em condições de obesidade têm sido associadas a insulino-resistência. Este aspecto será discutido no capítulo 6.

Como já se referiu, os transportadores GLUT5 são expressos nas membranas basolaterais dos enterócitos, onde facilitam a passagem de glucose (baixa afinidade) e de frutose para a corrente sanguínea; também estão presentes no testículo, rim e em menores quantidades no músculo esquelético e tecido adiposo. Estes transportadores não são dependentes da insulina (Wood e Trayhurn, 2003).

Os conhecimentos acerca dos restantes GLUTs são ainda escassos. As principais características descritas dos GLUTs são apresentadas na tabela I.

Tabela I - Isoformas dos transportadores de glucose facilitativos (GLUT). HMIT, transportador de mio-inositol associado ao H⁺. *nd*, *não determinado*. Adaptada de Wood e Trayhurn, 2003 e de Zhao e Keating, 2007.

ISOFORMA	LOCALIZAÇÃO	DEPENDENTE DA INSULINA ?	MOLÉCULA(S) TRANSPORTADA(S)
GLUT1	Cérebro, eritrócitos	Não	Glucose
GLUT2	Pâncreas, fígado, intestino, rim	Não	Glucose (baixa afinidade) e frutose
GLUT3	Cérebro	Não	Glucose (elevada afinidade)
GLUT4	Músculo esquelético, tecido adiposo, coração, cérebro	Sim	Glucose (elevada afinidade)
GLUT5	Intestino, testículo, rim	Não	Glucose (baixa afinidade) e frutose
GLUT6	Cérebro, baço, leucócitos	Não	Glucose
GLUT7	Intestino, testículo e próstata (?)	nd	Glucose e frutose (Cheeseman, 2008)
GLUT8	Testículo, cérebro, adipócitos, outros tecidos	Não (Sim, em blastócitos)	Glucose e outras hexoses (Schmidt <i>et al.</i> , 2009)
GLUT9	Fígado, rim	Não	nd
GLUT10	Fígado, pâncreas	Não	Glucose
GLUT11	Coração, músculo esquelético	Não	Glucose (baixa afinidade) e frutose
GLUT12	Coração, próstata, músculo esquelético, intestino delgado, tecido adiposo	Sim	nd
HMIT	Cérebro	nd	H ⁺ -mio-inositol

1.1.3. METABOLISMO FISIOLÓGICO DA GLUCOSE

Nesta secção, pretende-se rever sumariamente o metabolismo glicídico, em particular da glucose, isto é, as vias envolvidas na produção ou catabolismo da glucose, em situações fisiológicas. A figura 1.1 apresenta alguns destinos metabólicos da glucose.

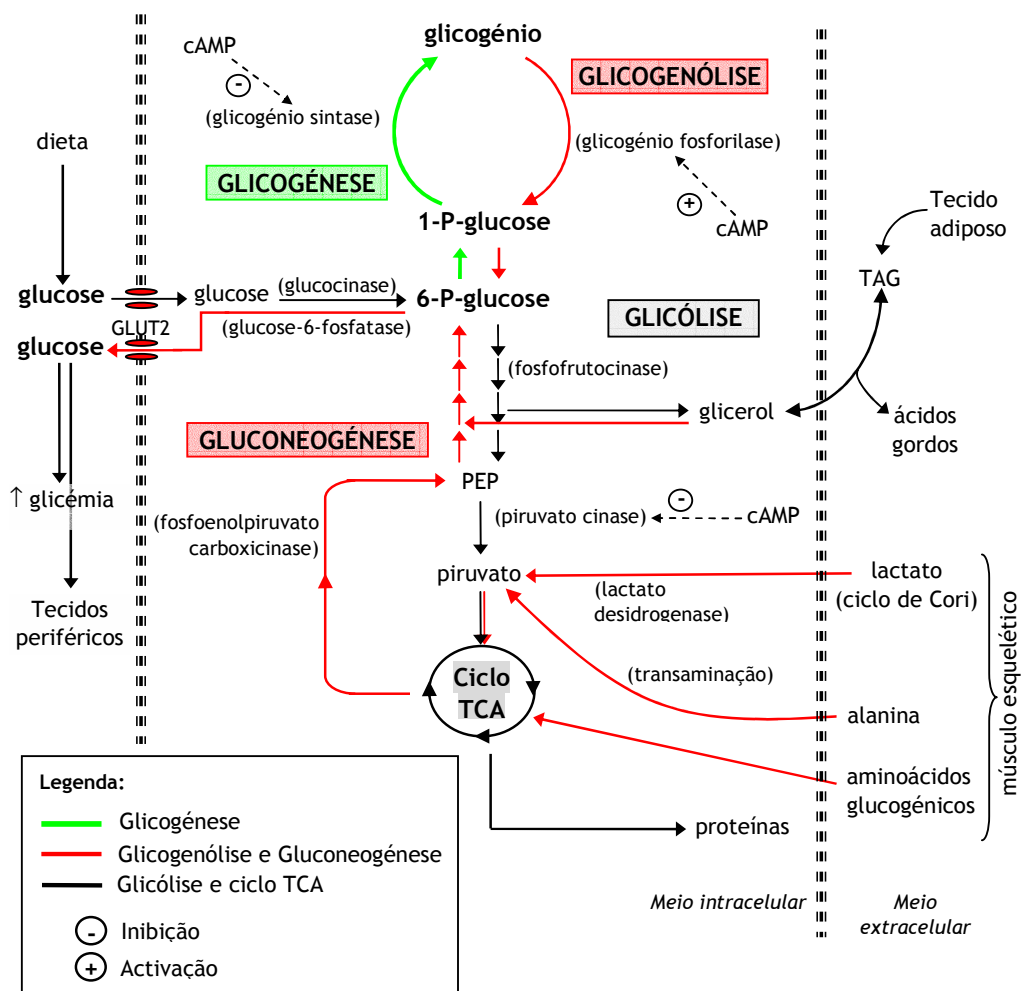


Figura 1.1: Destinos metabólicos da glucose (no hepatócito). Destacam-se a glicólise (a preto) e a glicogénese (a verde), estimuladas pela insulina no estado pós-prandial; a glicogénólise e a gluconeogénese (a vermelho), estimuladas pela glucagona (entre outras) no período pós-absortivo/jejum. Entre parêntesis indicam-se alguns enzimas chave dessas vias. cAMP, 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico; P, grupo fosfato; ciclo TCA, ciclo dos ácidos tricarboxílicos, também conhecido como ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico.

Após a sua captação pelas células, a glucose é imediatamente fosforilada a 6-fosfato de glucose pelo glucocinase ¹, podendo ter vários destinos ou vias metabólicas, as quais são reguladas, isto é, activadas ou inibidas, em função de diversos factores, por exemplo o estado prandial.

Como referido anteriormente, as taxas de fluxo de glucose de e para a circulação sanguínea devem ser idênticas. Uma das alterações fisiológicas que afectam este equilíbrio é o estado prandial.

1.1.3.1. Metabolismo da glucose no estado de jejum

No estado pós-absortivo, o organismo consome glucose ao ritmo a que esta é produzida, sendo que 70 % dessa glucose é captada pelos tecidos de forma independente da insulina, dos quais o cérebro é o maior consumidor (50-60 %) (Ferrannini e Groop, 1989). Após um jejum nocturno (aproximadamente 8 h), a glucose é produzida e libertada para a circulação principalmente pelo fígado (cerca de 95 % da glucose) e pelo rim (cerca de 5 %) (Ekberg *et al.*, 1999) ². Ambos os órgãos sintetizam glucose a partir de precursores não glicídicos (gluconeogénese), mas apenas o fígado é capaz de degradar glicogénio (glicogenólise). ³

Assim, na transição do estado pós-prandial para o estado de jejum (período pós-absortivo) a euglicémia é mantida quase exclusivamente pela produção hepática de glucose (Ekberg *et al.*, 1999), sendo que, no estado de jejum, a glucose produzida e libertada pelo fígado provém maioritariamente (~80 %) da degradação de glicogénio

¹ Ambos os enzimas glucocinase e hexocinase catalisam a fosforilação da glucose; contudo, o glucocinase tem menor afinidade, pelo que a sua actividade vai aumentando com o aumento da concentração de glucose (Bollen *et al.*, 1998).

² De acordo com estes estudos (Ekberg *et al.*, 1999), a contribuição renal no estado de jejum é virtualmente nula (-5 % do efluxo total de glucose), pelo que o fígado assegura a quase totalidade da glucose produzida e libertada para a circulação

³ Via metabólica também designada por neoglucogénese ou neoglicogénese.

(Wahren *et al.*, 1972) - glicogenólise hepática (figura 1.1). Com efeito, numa situação de jejum, o 6-fosfato de glucose resultante da glicogenólise hepática é hidrolisado pelo enzima glucose-6-fosfatase ¹, formando-se glucose livre, a qual pode ser exportada para a circulação sanguínea (efluxo ou *output* hepático de glucose) (figura 1.1).

A glicogenólise hepática apenas assegura as necessidades de glucose periférica (glicémia) durante um intervalo de tempo limitado, ou seja, enquanto a quantidade de glicogénio armazenado assim o permitir. No ser humano, as reservas de glicogénio hepático ficam praticamente esgotadas ao fim de 12 a 18 h de jejum (Coimbra e Delgadillo, 1997), sendo que em ratos esse glicogénio diminui significativamente após 24 h de jejum (Ercan *et al.*, 1994; Sumida *et al.*, 2002). Após esse período, a produção de glucose faz-se essencialmente a partir de precursores não glicídicos - gluconeogénese (Sumida *et al.*, 2002).

A gluconeogénese, realizada pelo fígado e pelo rim ² com o intuito de manter a euglicémia, utiliza substratos que se podem dividir em dois grupos: (i) precursores da síntese *de novo* de glucose, como é o caso do propionato e de certos aminoácidos, nomeadamente a alanina (fígado) e glutamina (rim) ³; e (ii) substratos gluconeogénicos que foram formados a partir de glucose, como o lactato, o piruvato e o glicerol.

O lactato proveniente do músculo é o principal precursor não glicídico da glucose; pode ser transportado até ao fígado, onde é convertido em piruvato (lactato desidrogenase) para síntese de glucose - ciclo de Cori (figura 1.1). O ciclo de Cori é particularmente importante em situações de esforço físico prolongado e/ou em

¹ O enzima glucose-6-fosfatase não está presente no músculo, pelo que não ocorre efluxo de glucose muscular. Desta forma, a glicogenólise muscular não afecta a glicémia de forma directa. O glicogénio muscular é utilizado para obtenção de energia para o próprio miócito, pelo que normalmente o 6-fosfato de glucose obtido através da glicogenólise segue a via glicolítica, originando piruvato, o qual é depois oxidado em condições de aerobiose, ou lactato, em condições de anaerobiose.

² Recorde-se que no estado pós-absortivo, a contribuição renal para a entrada de glucose em circulação é apenas cerca de 5 % do total; no entanto, em situação de jejum prolongado (>60 h), essa contribuição renal pode chegar aos 20-25 % (Ekberg *et al.*, 1999).

³ A obtenção de glucose a partir de aminoácidos apenas ocorre em situações extremas, pelo que será menos relevante no contexto desta dissertação.

condições de anaerobiose no músculo. O próprio lactato deriva da glucose (~80 %), não sendo por isso um precursor da síntese *de novo* de glucose.

O glicerol e os triacilgliceróis são sintetizados no tecido adiposo, também a partir da glucose sanguínea, pelo que também não são precursores da síntese *de novo*. Os triacilgliceróis podem sofrer hidrólise, libertando glicerol, o qual não é utilizado pelo adipócito, mas é transportado até ao fígado ou rim, onde é convertido em 3-fosfato de glicerol (glicerol cinase) para seguir a via gluconeogénica (figura 1.1).

A energia necessária para a gluconeogénese provém da oxidação de ácidos gordos.

1.1.3.2. Metabolismo da glucose no estado pós-prandial

A glucose obtida a partir da digestão de uma refeição destina-se principalmente à produção de energia através da via glicolítica, principalmente no músculo, e à síntese/armazenamento de glicogénio, tanto no músculo como no fígado - glicogénese. Assim, no estado pós-prandial, ocorre inibição do efluxo hepático de glucose e um aumento da captação de glucose, particularmente pelo músculo esquelético.

A glicogénese ocorre rapidamente no fígado e músculo, após uma refeição. Com efeito, em ratos saudáveis submetidos a 24 h de jejum, está descrito que a reposição dos níveis de glicogénio hepático está completa ao fim de menos de 4 h e, apenas 20 min após a administração de glucose, a actividade do enzima glicogénio sintase (regulador da síntese de glicogénio) é máxima (Ercan *et al.*, 1994; Niewoehner e Nuttall, 1995).

A glicólise é a principal e mais abundante via do metabolismo da glucose, ocorrendo no citoplasma de todas as células. Leva à formação de piruvato, que penetra no mitocôndrio e entra no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, gerando equivalentes redutores necessários para a cadeia respiratória e fosforilação oxidativa (figura 1.1). A

glicólise está mais activa quando o seu principal substrato, a glucose, está em maior concentração, isto é, no estado pós-prandial.

Adicionalmente, o aumento dos níveis de glucose que ocorre após ingestão de uma refeição e leva a uma maior actividade da glicólise, activa também a via dos fosfatos de pentose, também conhecida como via das fosfopentoses ou *shunt* dos monofosfatos de hexose, particularmente relevante no fígado. Com efeito, no estado pós-prandial há activação dos enzimas 6-fosfato de glucose desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, enzimas-chave na regulação desta via e que catalisam a redução do fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida (de NADP^+ a NADPH); assim, no estado pós-prandial os níveis de NADPH aumentam. O NADPH é essencial na regulação do estado *redox* intracelular, em particular através da redução de glutatióno (GSSG , glutatióno oxidado; GSH , glutatióno reduzido)¹, numa reacção catalisada pelo glutatióno redutase e da qual o NADPH é coenzima. É importante referir este aspecto, porque o GSH , cuja concentração hepática também se observou estar aumentada após uma refeição (Tateishi *et al.*, 1977; Guarino *et al.*, 2003), parece também ser essencial para a acção da insulina no estado pós-prandial.

Assim, o metabolismo fisiológico da glucose pode, de uma forma geral, ser dividido em duas fases, de acordo com o estado prandial: após uma refeição (pós-prandial), para além da activação da glicólise, ocorre a reposição dos níveis de glicogénio hepático (principalmente) através do aumento da sua síntese; por outro lado, no período pós-absortivo e de jejum, a obtenção de glucose para fazer face às necessidades dos tecidos periféricos provém da glicogenólise hepática e, mais tarde, da gluconeogénese.

¹ O glutatióno, tripéptido L- γ -glutamilo-L-cisteínico-glicina, designa-se por GSH ou por GSSG , consoante se encontra na forma reduzida ou oxidada, respectivamente.

A regulação destas vias é um processo algo complexo no qual intervêm vários agentes, principalmente de origem hormonal ou neuronal, os quais serão discutidos na secção seguinte.

1.1.4. REGULAÇÃO DO METABOLISMO FISIOLÓGICO DA GLUCOSE

A regulação do metabolismo da glucose é feita basicamente a dois níveis: produção e libertação de glucose pelo fígado; e captação de glucose pelos tecidos periféricos. Para este processo de regulação contribuem diversos factores, nomeadamente de origem hormonal (insulina, glucagina e somatostatina, por exemplo) ou neuronal (sistema nervoso autónomo).

No estado de jejum, em que é necessário um maior efluxo de glucose hepática, a glicogenólise e a gluconeogénese são activadas, principalmente através da acção da glucagina e catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). Por outro lado, após uma refeição é necessário atenuar a hiperglicémia pós-prandial, pelo que há redução do efluxo de glucose hepática e aumento do aporte periférico de glucose, em particular pelo músculo esquelético, o que é conseguido pela própria concentração de glucose, mas principalmente por acção da insulina.

O esquema da figura 1.2 da página seguinte resume alguns efeitos dos principais intervenientes neuro-hormonais na regulação do metabolismo fisiológico da glucose.

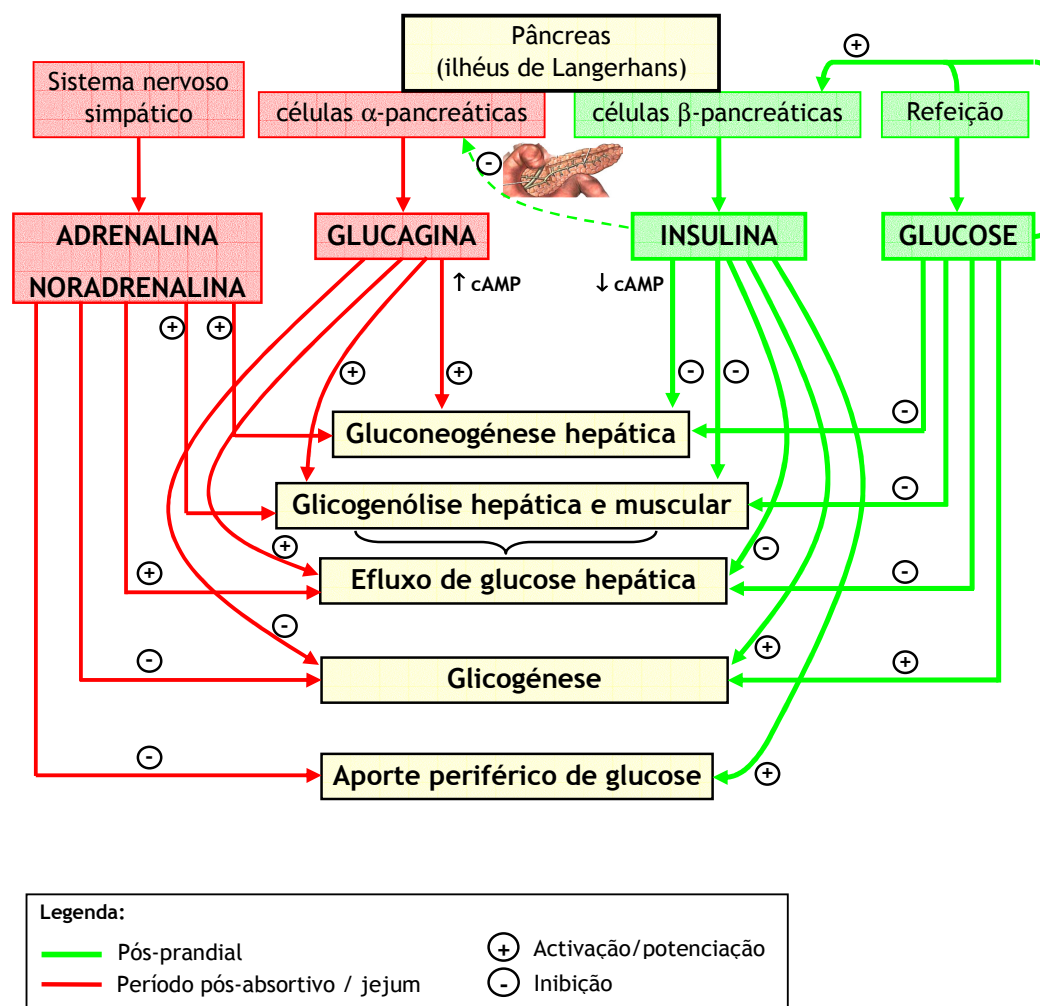


Figura 1.2: Efeitos da insulina, glucagina, catecolaminas e glicose no metabolismo glicídico, em função do estado prandial. A verde e a vermelho indicam-se os efeitos mais relevantes no estado pós-prandial e em jejum, respectivamente. Para além da dieta, a glicose plasmática provém principalmente do fígado, pelo que apenas se considerou o efluxo de glicose hepática. Por outro lado, considerou-se apenas o aporte de glicose pelos tecidos periféricos insulino-dependentes, embora o aumento da concentração plasmática de glicose aumente o afluxo celular da própria glicose. cAMP, 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico.

Insulina

A insulina, sendo a *hormona da abundância*, promove o armazenamento de nutrientes e inibe a mobilização de substratos endógenos (Genuth, 1998). Com efeito, a insulina estimula a oxidação (glicólise) e armazenamento da glucose (glicogénese), tanto no músculo como no fígado, ao mesmo tempo que inibe a produção hepática de glucose (glicogenólise e gluconeogénese) (figura 1.2).

No fígado, a insulina activa o enzima glucocinase, que catalisa a conversão da glucose em 6-fosfato de glucose, o qual é armazenado sob a forma de glicogénio, por acção do glicogénio sintase, que também é activado pela insulina. A insulina também estimula a oxidação da glucose por activação dos enzimas fosfofrutocinase e piruvato cinase (glicólise). A inibição da glicogenólise pela insulina ocorre por inibição dos enzimas glicogénio fosforilase e glucose-6-fosfatase (figura 1.1). Para além disso, a insulina também inibe a gluconeogénese, o que parece ser conseguido por diminuição do cAMP (3',5'-monofosfato de adenosina cíclico), efector positivo do proteína cinase A (cAMP-dependente, PKA) e activador da gluconeogénese (figuras 1.1 e 1.2).

Adicionalmente, a insulina libertada pelas células β -pancreáticas vai impedir a secreção de glucagina pelas células α -pancreáticas, o que também inibe a gluconeogénese, já que a actividade desta via é ditada em grande medida pela razão glucagina/insulina.

No tecido adiposo, a insulina estimula a captação de glucose, induzindo a translocação de GLUT4. Para além disso, a insulina ainda inibe a oxidação de ácidos gordos e estimula o seu armazenamento sob a forma de triacilgliceróis, o que também parece ser mediado por uma diminuição dos níveis de cAMP. Esta acção sobre o metabolismo dos ácidos gordos permite a utilização da glucose como substrato energético primário e impede de forma indirecta a gluconeogénese hepática (Bergman, 2000) (figura 1.1).

Finalmente, no músculo esquelético, a insulina induz a síntese e inibe a degradação proteica, o que, tal como no caso do tecido adiposo, também reduz a quantidade de aminoácidos glucogénicos disponíveis para a gluconeogénese. No entanto, ao nível do músculo esquelético, a principal acção da insulina é promover a captação de glucose através da translocação dos GLUT4 (secção 1.2.4) e estimular a glicogénese, bem como a glicólise. Estas acções da insulina são extremamente importantes, uma vez que o músculo esquelético é o tecido responsável pela captação de maior quantidade de glucose (Kemmer *et al.*, 1979; DeFronzo *et al.*, 1981; Scheen *et al.*, 1994), o que significa que o efeito hipoglicemiante da insulina se deve principalmente à captação de glucose pelas células do músculo.

A acção periférica hipoglicemiante da insulina é um aspecto central da presente dissertação e será por isso abordada com mais detalhe nas secções seguintes.

Glucagina

Em quase todos os aspectos, as acções da glucagina, libertada pelas células α dos ilhéus de Langerhans do pâncreas, opõem-se às da insulina (figura 1.2). É, talvez por isso, a principal hormona contra-reguladora.

Os efeitos dominantes desta hormona são exercidos no fígado. A glucagina actua sobre o sistema proteínas G-adenilato ciclase, o que eleva os níveis de cAMP e activa o enzima glicogénio fosforilase, estimulando a glicogenólise (figuras 1.1 e 1.2). Adicionalmente, a fosforilação do fosfofrutocinase e do piruvato cinase diminui a taxa de oxidação da glucose e favorece a gluconeogénese (figura 1.1).

Apesar de a glucagina ser o principal estimulador da gluconeogénese, tem sido observado que o destino e fluxo de substratos são determinados em grande medida pela razão insulina/glucagina (Genuth, 1998). No estado de jejum observa-se uma redução desta razão, devido ao aumento da secreção de glucagina e diminuição da secreção de

insulina; após uma refeição mista, quando o armazenamento é vantajoso, a razão insulina/glucagina aumenta consideravelmente (Genuth, 1998).

Somatostatina

A somatostatina é secretada pelas células δ -pancreáticas (ilhéus de Langerhans), em resposta à glucose, aminoácidos e ácidos gordos livres. Esta hormona inibe a secreção de insulina e de glucagina ¹. A somatostatina também inibe a taxa de absorção de diversos nutrientes do tracto gastrointestinal, como a glucose, xilose e triacilgliceróis, através da inibição da motilidade gástrica e duodenal.

Outras hormonas (contra-reguladoras)

Outras hormonas contra-reguladoras, como o cortisol ou a hormona de crescimento, activam a gluconeogénese essencialmente através do aumento da expressão dos enzimas gluconeogénicos e do aporte hepático de substratos gluconeogénicos. A secreção destas hormonas está aumentada em condições de *stress* fisiológico, nomeadamente hipoglicémia, situação que requer uma rápida mobilização de glucose para repor a euglicémia, contrabalançando assim as acções da insulina.

¹ A insulina, glucagina e somatostatina exercem acções autócrinas e parácrinas importantes na regulação da sua secreção, para o que a anatomia dos ilhéus de Langerhans também contribui. A perfusão vascular celular faz-se do centro (células β) para a periferia do ilhéu, na ordem células $\beta \rightarrow \alpha \rightarrow \delta$, facilitando a regulação que aquelas hormonas exercem umas sobre as outras: a insulina (células β) inibe a secreção de glucagina (células α), a qual estimula a secreção de somatostatina (células δ) e de insulina; a insulina e a somatostatina inibem-se mutuamente (Samols *et al.*, 1988). Para além da insulina, glucagina e somatostatina, o pâncreas secreta também o polipéptido pancreático das células PP. A sua função não é ainda muito clara, embora pareça inibir as secreções exócrinas do pâncreas. Este polipéptido é secretado em resposta à ingestão de uma refeição ou durante hipoglicémia (Genuth, 1998).

Catecolaminas e sistema nervoso autónomo

As catecolaminas, provenientes da medula supra-renal ou dos terminais das fibras nervosas simpáticas, que inervam directamente o pâncreas e o fígado, têm um papel contra-regulador relativamente à acção da insulina. No fígado, as catecolaminas vão induzir aumento da concentração de cAMP e assim activar a gluconeogénese e a glicogenólise, aumentando a glicémia (Yamaguchi, 1992). Para além disso, as catecolaminas (noradrenalina, principalmente) inibem a secreção de insulina e estimulam a secreção de glucagina, por activação dos receptores adrenérgicos α_2 (Havel *et al.*, 1994). O mecanismo de resposta do sistema nervoso simpático é normalmente activado em condições de *stress*, em que é requerida uma resposta hiperglicemiante.

O papel do sistema nervoso parassimpático na homeostase da glucose tem sido menos estudado. Apesar disso, está descrito que a estimulação vagal leva a uma activação do glicogénio sintase (glicogénese) (Shimazu, 1971). Adicionalmente, observou-se que a estimulação eléctrica selectiva das fibras parassimpáticas hepáticas reduz significativamente o efluxo de glucose hepática (Lautt e Wong, 1978a), efeito esse que é bloqueado por antagonismo colinérgico muscarínico (Gardemann e Jungermann, 1986). Assim, os nervos parassimpáticos hepáticos parecem desempenhar um papel hepático semelhante ao da insulina na inibição do efluxo de glucose hepática.

O envolvimento do sistema nervoso autónomo na homeostase da glucose e em particular na acção periférica da insulina será abordado em maior detalhe na secção 1.3.

1.2. PAPEL DA INSULINA NA HOMEOSTASE DA GLUCOSE

Várias hormonas contribuem para a homeostase da glicémia, mas no estado pós-prandial a insulina tem sido vista como o principal actor, pelo que é relevante abordar a estrutura e os mecanismos de síntese, secreção e acção desta hormona.

1.2.1. ESTRUTURA DA INSULINA

A insulina (5.5 kDa) é constituída por duas cadeias polipeptídicas, a cadeia A (21 resíduos de aminoácidos) e a cadeia B (30 resíduos de aminoácidos), ligadas entre si por duas ligações persulfureto (S-S), entre os resíduos de cisteína A7-B7 e A20-B19. Possui ainda uma ligação persulfureto intracadeia A (entre os resíduos de cisteína A6-A11).

Na figura 1.3 representa-se a estrutura da insulina.

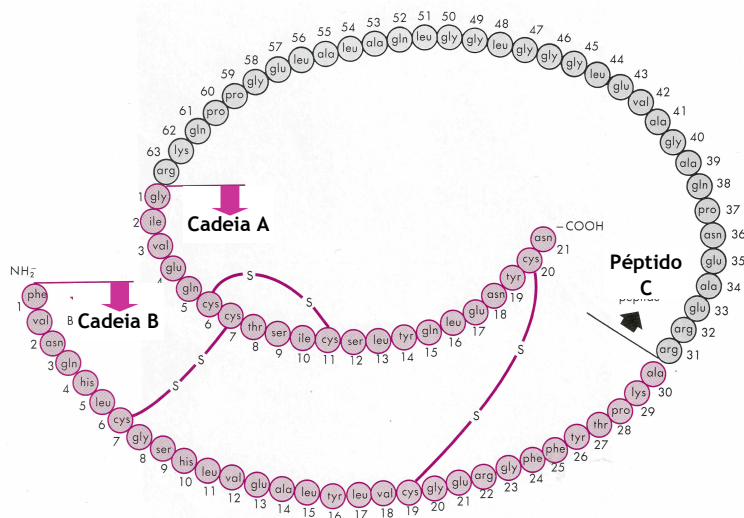


Figura 1.3: Representação da estrutura da molécula de insulina e de proinsulina. As setas indicam os pontos de clivagem para conversão da molécula de proinsulina (rosa+cinzento) em insulina (a rosa), libertando o péptido C (de conexão). Neste exemplo, a molécula apresentada refere-se à insulina de porco. Figura adaptada de Genuth, 1998.

1.2.2. BIOSÍNTESE E ARMAZENAMENTO DA INSULINA

A insulina é sintetizada nas células β dos ilhéus de Langerhans do pâncreas, inicialmente sob a forma de preproinsulina, um polipéptido de 11.5 kDa. A preproinsulina é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso e por acção de enzimas proteolíticos é rapidamente clivada a proinsulina, um polipéptido de 9 kDa que contém as cadeias A, B e C (figura 1.3). A cadeia C (31-35 resíduos de aminoácidos) confere à molécula a conformação adequada para a formação das três ligações persulfureto, que ocorre nesta fase (Granner, 2003). A proinsulina é, então, transportada para o aparelho de Golgi, onde é empacotada. A conversão de proinsulina em insulina é iniciada ainda no aparelho de Golgi e termina cerca de 2 h depois nos grânulos secretores, por acção de um enzima carboxipeptidase e de dois endopeptidases (pro-hormona convertases 2 e 3), libertando-se dois dipéptidos (lisina⁶⁴-arginina⁶⁵ e arginina³¹-arginina³²) e o péptido C (31 resíduos de aminoácidos) (Granner, 2003).

A insulina encontra-se em circulação principalmente sob a forma de monómero, no entanto é armazenada durante horas ou dias na célula β (grânulos secretores), maioritariamente como complexo hexamérico de zinco, formado por 3 dímeros de insulina que se conjugam com 2 átomos de zinco (Dunn, 2005). Os grânulos secretores maduros contêm ainda péptido C, magnésio e cálcio em elevadas concentrações. A insulina é libertada por excitose, acompanhada pelo péptido C em quantidades equimolares.

A biossíntese da (pró)insulina é regulada essencialmente por variações agudas das concentrações extracelulares de glucose ou outros glícidos, sendo que o limiar para a síntese é inferior ao limiar de secreção da insulina, o que permite a manutenção das reservas de insulina (Ashcroft *et al.*, 1978).

1.2.3. SECREÇÃO DA INSULINA

A secreção da insulina envolve a translocação dos grânulos secretores para a membrana da célula β , seguida da sua libertação, por exocitose.

A translocação dos grânulos secretores para a membrana da célula β parece ser propulsionada por interacção dos filamentos de actina e miosina, através de uma rede microtubular (polímeros de tubulina). Este processo, de certa forma semelhante ao da contracção muscular, é dependente de ATP e da concentração de cálcio citoplasmático, o qual pode ser obtido a partir das reservas no retículo endoplasmático ou do meio extracelular (Lang, 1999).

Após a translocação, os grânulos secretores fundem-se com a membrana plasmática e libertam o seu conteúdo para o espaço intersticial (exocitose), processo que também requer elevadas concentrações de cálcio citoplasmático.

A secreção fisiológica da insulina é bifásica, como se pode ver na figura 1.4. Com efeito, imediatamente após a elevação da concentração de glucose, ocorre uma secreção de curta duração (8 a 10 min) e independente de ATP (primeira fase da secreção); a segunda fase da secreção de insulina decorre a uma taxa cerca de 10-200 vezes inferior à da primeira fase, é de maior duração (figura 1.4) e depende de ATP (Rorsman *et al.*, 2000). A diferença entre as duas fases da secreção parece dever-se à localização dos grânulos de insulina, mais perto (primeira fase) ou mais afastados (segunda fase) do local de exocitose. Aquando da sua libertação na circulação sanguínea, a insulina passa de hexâmero a monómero, por dissociação do complexo com o zinco (Dunn, 2005).

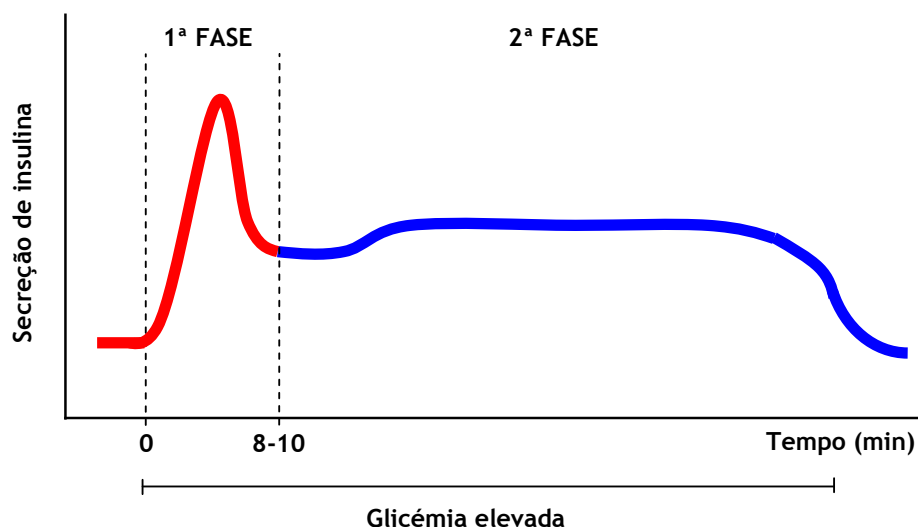


Figura 1.4: Esquema representativo do padrão de secreção da insulina. A insulina é secretada em duas fases: numa primeira fase (8-10 min, a vermelho), a insulina é libertada em grandes quantidades; na segunda fase (a azul), a libertação de insulina é mais lenta e requer ATP. Adaptada de Rorsman *et al.*, 2000.

Em suma, tanto a translocação como a exocitose dos grânulos secretores requerem uma elevação dos níveis citoplasmáticos de cálcio, o qual pode provir do meio extracelular ou da mobilização do cálcio intracelular, armazenado no retículo endoplasmático, para o citoplasma.

O cálcio extracelular entra na célula β através de canais dependentes da voltagem, abertos por despolarização da membrana, o que ocorre por dois mecanismos: (i) aumento da razão ATP/ADP, que vai levar ao encerramento dos canais de potássio sensíveis ao ATP (canais K_{ATP}), impedindo a saída de iões potássio da célula e, conseqüentemente, promovendo a despolarização da membrana (Newgard e McGarry, 1995; Lang, 1999; Wollheim, 2000); ou (ii) entrada de iões de carga positiva, como é o caso dos aminoácidos arginina, lisina, histidina e alanina (co-transportada com iões

sódio), alterando o potencial da membrana e induzindo a sua despolarização (Newsholme *et al.*, 2005).

A mobilização do cálcio intracelular é normalmente estimulada por ligação de hormonas, péptidos e neurotransmissores a receptores acoplados a proteínas G, que estimulam a síntese de cAMP, via adenilato ciclase, bem como de diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃), via fosfolipase C (PLC). O cAMP e o DAG aumentam a sensibilidade do sistema de translocação-exocitose para o cálcio. O cAMP e o IP₃ activam os enzimas proteína cinase A (PKA) e C (PKC), respectivamente, o que inibe o armazenamento do cálcio e induz a sua deslocação para o citoplasma (Lang, 1999). A activação do sistema de proteínas G pode ainda afectar o potencial de membrana através do fecho ou abertura dos canais de cálcio dependentes da voltagem, regulando assim o afluxo de cálcio (Lang, 1999).

Carácter pulsátil da secreção de insulina

O aumento da concentração de glucose estimula a secreção de insulina através de um processo que envolve a despolarização da membrana da célula β -pancreática. Esta actividade eléctrica é um aspecto central da libertação de insulina e parece conferir um carácter pulsátil à secreção de insulina (Rorsman *et al.*, 2000). A pulsatilidade da libertação endógena de insulina foi demonstrada tanto em humanos (Lang *et al.*, 1979) como em animais (Chou *et al.*, 1991). Adicionalmente, estudos em que se comparou a administração pulsátil com a administração contínua de insulina, revelaram que a insulina exógena era mais eficaz quando administrada de forma pulsátil, nomeadamente no que diz respeito à inibição da secreção de glucagina (Ward *et al.*, 1989), ao bloqueio da produção de glucose hepática (Paolisso *et al.*, 1991) e à sua acção hipoglicémica, tanto no estado de jejum como no estado pós-prandial (Matthews *et al.*, 1983; Reid e Lutt, 2004; Grubert *et al.*, 2005).

Regulação da secreção de insulina

A regulação da secreção de insulina é efectuada por vários factores ou agentes metabólicos, hormonais ou neuronais, que actuam sobre a célula β , estimulando-a (secretagogos) ou inibindo-a (inibidores). Os secretagogos podem ser divididos em iniciadores, se induzem a secreção de insulina na ausência de glucose, como é o caso da leucina e da arginina; e em potenciadores, se requerem a presença de glucose ou outro iniciador. A glucose é o principal iniciador da secreção de insulina e a concentração plasmática de glucose o seu principal modulador.

A glucose entra na célula β através dos GLUT2, é fosforilada pelo enzima glucocinase e a sua metabolização gera ATP, aumentando a razão ATP/ADP, o que vai fechar os canais K_{ATP} , impedindo o efluxo de iões potássio, o que induz a despolarização da membrana e a abertura dos canais de cálcio dependentes da voltagem, permitindo o afluxo de cálcio (Newgard e McGarry, 1995; Lang, 1999; Wollheim, 2000). O aumento do cálcio citoplasmático e do ATP disponível estimulam a translocação e subsequente exocitose dos grânulos secretores (Wollheim, 2000), libertando a insulina, o péptido C e os restantes iões armazenados nos grânulos.

A insulina libertada exerce uma retroacção negativa sobre a célula β (acção autócrina), através da abertura dos canais K_{ATP} . A noradrenalina inibe a secreção de insulina por um mecanismo semelhante a este (Lang, 1999).

A glucagina e o GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*) activam o adenilato ciclase, enquanto a colecistocinina, vasopressina, acetilcolina e arginina estimulam a PLC, potenciando em ambos os casos a secreção de insulina (Lang, 1999). A somatostatina inibe a secreção da insulina, através da inibição da síntese de cAMP via proteínas G, o que impede a mobilização do cálcio intracelular, induz a hiperpolarização da membrana e bloqueia o afluxo de cálcio extracelular (Nilsson *et al.*, 1989).

A entrada de aminoácidos carregados positivamente (por exemplo, a arginina promove directamente a despolarização da membrana; a leucina induz o encerramento dos canais K_{ATP} , estimulando assim a secreção de insulina (Ashcroft *et al.*, 1978).

Incretinas

A ingestão de glúcidos (glucose) origina a libertação de substâncias (hormonas) da mucosa intestinal, que vão aumentar a secreção de insulina, para além da causada pela absorção de glucose *per se* (McIntyre *et al.*, 1965). Estas hormonas são designadas globalmente por *incretinas*. Estão descritas duas incretinas: o GIP (péptido insulínico dependente da glucose) e o GLP-1.

O GIP é sintetizado no duodeno (células K) e a sua secreção é inibida pela própria insulina. Tem um baixo efeito hipoglicémico directo, mas após uma refeição estimula a secreção de insulina; no entanto, em jejum não tem qualquer efeito insulínico (Meier e Nauck, 2004). O GIP não parece afectar o metabolismo lipídico de forma significativa, embora alguns autores sugiram que estimula a lipogénese (Oben *et al.*, 1991; Yip e Goodman, 1999) e pareça estar aumentado em condições de obesidade (Oben *et al.*, 1991; Yip e Goodman, 1999).

O GLP-1 é sintetizado na porção distal do intestino (células L), nas células α -pancreáticas e no cérebro (Holst, 1999). O GLP-1 estimula a secreção de insulina dependente da glucose (Nathan *et al.*, 1992), e administrado após uma refeição previne o aumento da glicémia (Nathan *et al.*, 1992), potenciando a acção da insulina em vários tecidos, incluindo o músculo esquelético (O'Harte *et al.*, 1997).

1.2.4. MECANISMO DE ACÇÃO DA INSULINA NA CAPTAÇÃO PERIFÉRICA DE GLUCOSE

- TRANSDUÇÃO DE SINAL

A insulina é considerada a mais potente hormona anabólica (Saltiel e Pessin, 2002) e a sua acção a nível celular é caracterizada por diversos efeitos, o que sugere o envolvimento de múltiplas vias de sinalização a partir da ligação ao seu receptor. Nesta secção, serão abordadas as principais vias de transdução de sinal da insulina envolvidas na translocação de GLUT4 para aporte de glucose, em particular no músculo esquelético, que é responsável por cerca de 75 % do aporte de glucose insulino-dependente (Saltiel e Kahn, 2001).

1.2.4.1. Estrutura e função do receptor de insulina

O receptor de insulina está virtualmente presente em todos os tecidos de vertebrados, embora expresso em diferentes concentrações (White e Kahn, 1994)¹. Na figura 1.5 representa-se o receptor da insulina e os seus principais domínios. É um heterotetrâmero composto por duas subunidades α e duas subunidades β ($\alpha_2\beta_2$), com radicais hidrocarbonados complexos N-terminais com ácidos siálicos (White, 1997).

A estrutura do receptor de insulina é estabilizada por 3 ligações persulfureto que ligam as subunidades α entre si e a cada uma das subunidades β (White, 1997). As subunidades α estão localizadas inteiramente no exterior da célula, enquanto as subunidades β possuem uma região transmembranar e outra intracelular (White, 1997).

¹ Existem duas isoformas de receptores de insulina, tipo A e tipo B, que diferem entre si pela presença de uma sequência de 12 resíduos de aminoácidos entre as posições 716 e 717 das cadeias α da isoforma A (Lawrence *et al.*, 2007). O tipo B é altamente específico para a insulina e predomina nos principais tecidos-alvo da acção da insulina, tais como fígado, músculo e adipócitos (Mosthaf *et al.*, 1990). O tipo A promove a ligação do IGF-2 (*insulin-like growth factor 2*) em detrimento da ligação da insulina e existe em muitos tecidos fetais, sistema nervoso central e células hematopoiéticas (Mosthaf *et al.*, 1990); doentes com acumulação de receptores tipo A no músculo esquelético parecem desenvolver insulino-resistência (Savkur *et al.*, 2001).

A activação do receptor dá-se por ligação da insulina à subunidade α , o que induz a disrupção do dímero α (White, 1997). Embora existam duas regiões de ligação ao receptor (no dímero α - figura 1.5), apenas uma molécula de insulina se liga com elevada afinidade, apresentando uma cooperatividade negativa para concentrações de insulina abaixo de $0.1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (De Meyts, 1994). Esta forma de activação pouco comum parece permitir que moléculas de pequenas dimensões possam interagir com o receptor de insulina em locais distintos dos domínios de activação pela insulina (Zhang *et al.*, 1999).

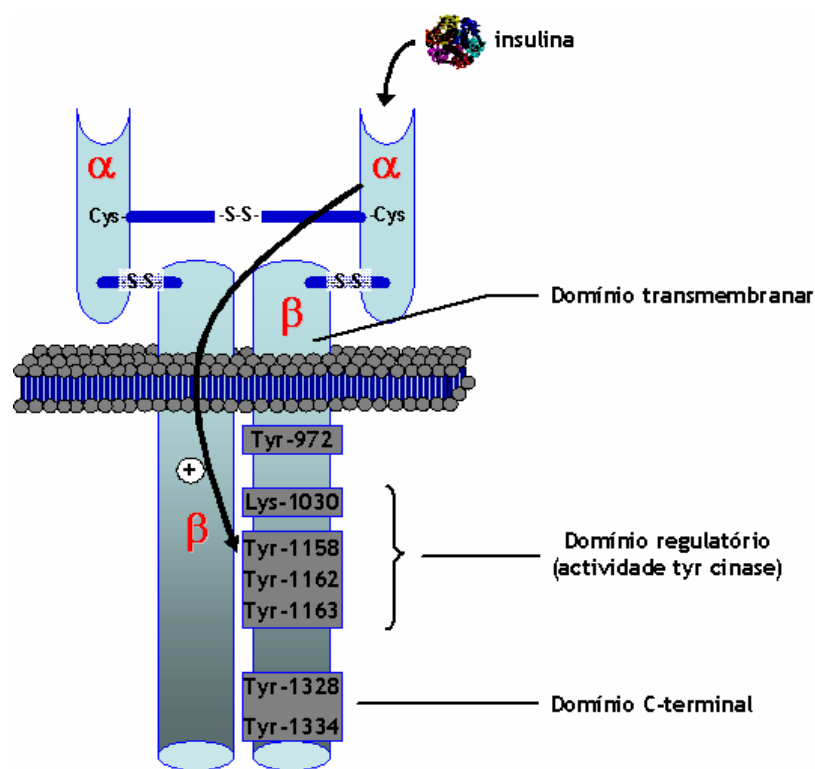


Figura 1.5: Representação do receptor da insulina. Destacam-se os domínios de ligação à insulina, nas subunidades α , e as regiões intracelulares das subunidades β onde ocorre a ligação de trifosfato de adenosina (ATP) e a fosforilação dos resíduos de tirosina (domínio regulatório). α , subunidade α ; β , subunidade β ; Cys, resíduo de cisteína; -S-S-, ligação persulfureto; Tyr, resíduo de tirosina; Lys, resíduo de lisina. \oplus , activação.

A ligação da insulina induz a actividade de tirosina cinase num domínio intracelular da subunidade β , promovendo a fosforilação dos resíduos de tirosina do próprio receptor (autofosforilação) ¹. Aquando da ligação da insulina, a região de activação sofre alterações conformacionais que permitem a ligação de ATP, favorecendo a fosforilação inicial do resíduo de tirosina¹¹⁶² e subsequentemente dos restantes resíduos de tirosina da região de activação do receptor (White, 1997). Quando a insulina não está ligada, a subunidade α livre inibe a actividade de tirosina cinase da subunidade β (White e Kahn, 1994; Saltiel e Kahn, 2001). A actividade de tirosina cinase do receptor da insulina vai permitir a fosforilação de múltiplos resíduos de tirosina de proteínas envolvidas na cascata de sinalização (White *et al.*, 2002).

Após a ligação da insulina e activação do receptor, o complexo receptor-insulina é internalizado e incorporado em endossomas ainda na forma activa, o que facilita a ligação dos substratos citoplasmáticos (Carpentier *et al.*, 1993).

1.2.4.2. Vias de sinalização da insulina envolvidas no aporte de glucose

Existem vários substratos intracelulares que são fosforilados pela actividade cinase do receptor da insulina ², sendo que está descrito que o APS, Cbl e as proteínas IRS (substratos do receptor de insulina) estão envolvidos no aporte de glucose através da translocação de GLUT4. A figura 1.6 resume as vias de sinalização da insulina que envolvem estes substratos e conduzem à translocação dos GLUT4 e aporte de glucose.

¹ A autofosforilação pode ocorrer em 7 resíduos de tirosina, localizados em 3 regiões distintas da subunidade β com actividade de tirosina cinase (justamembranar, regulatória ou de activação e terminal carboxilo) (White e Kahn, 1994), mas parece iniciar-se com a fosforilação do resíduo de tirosina¹¹⁶² da região de activação (White, 1997) (ver figura 1.5).

² Substratos conhecidos do receptor de insulina: Gab1, p60^{dok}, APS, isoformas da Shc, Cbl e as proteínas da família IRS (substratos do receptor de insulina). Muitos destes substratos são comuns aos receptores da insulina e do IGF-1, mas a especificidade de recrutamento e fosforilação dos substratos asseguram que a sinalização dos receptores da insulina e do IGF-1 seja devidamente controlada (Chang *et al.*, 2004).

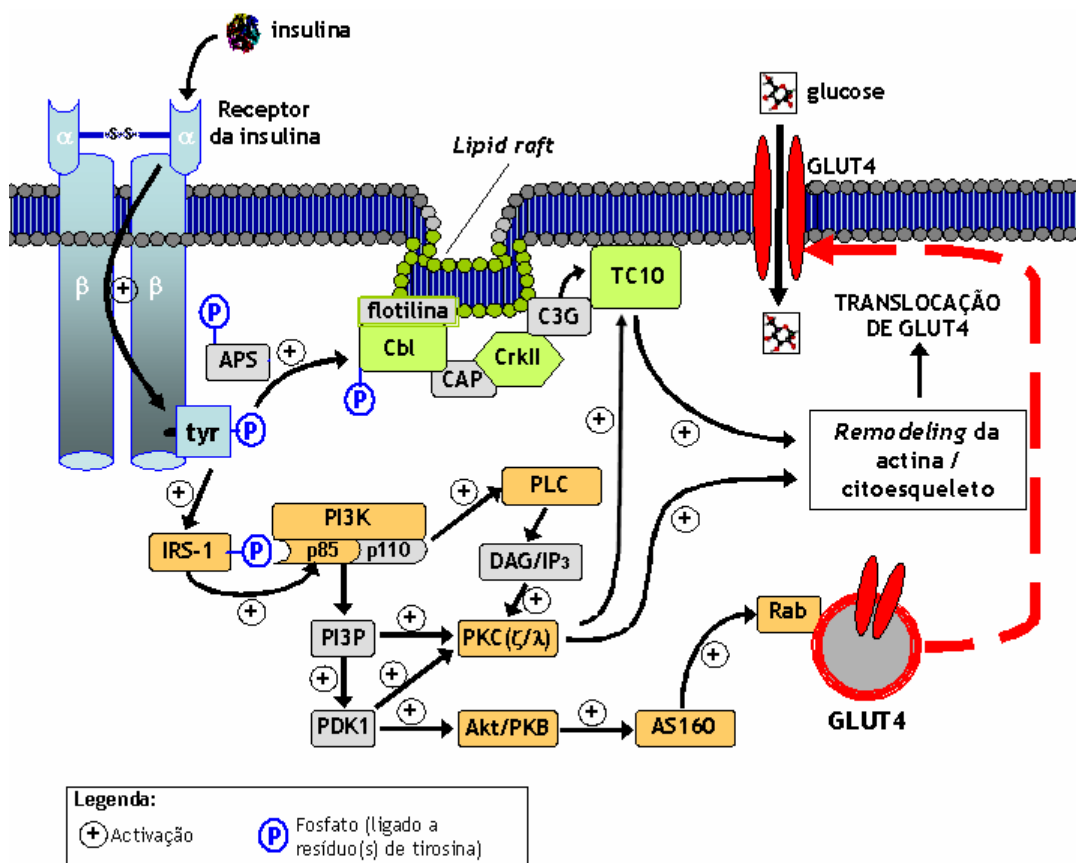


Figura 1.6: Principais vias de transdução de sinal da insulina para o aporte de glucose através de transportadores de glucose 4 (GLUT4). Foi utilizado como exemplo o substrato do receptor da insulina-1 (IRS-1) por ser a proteína mais comum da família IRS. Tyr, resíduo de tirosina; PI3K, 3-fosfatidilinositol cinase; PI3P, 3-fosfato de fosfatidilinositol; PDK1, cinase dependente do fosfoinositídeo 1; Akt/PKB, proteína cinase B; PKC ζ/λ , proteína cinases C atípicas; AS160, *Akt Substrate of 160 kDa*; PLC, fosfolipase C; DAG, diacilglicerol; IP₃, 1,4,5-trifosfato de inositol; APS, proteína adaptadora com domínios PH e SH2; Cbl, protooncogene *Casitas b-lineage lymphoma* (c-Cbl); CAP, *Cbl-associated protein*.

Os principais mediadores das acções metabólicas da insulina são as proteínas IRS, em particular a IRS-1 e a IRS-2. Em mamíferos, estão descritas quatro proteínas da família IRS: IRS-1, expressa no músculo e tecido adiposo; IRS-2, no cérebro, ovário, fígado e tecido adiposo; IRS-3, no tecido adiposo, possivelmente apenas em roedores; e IRS-4, expressa no timo e rim (White *et al.*, 2002). As proteínas IRS apresentam um terminal amina com domínios de ligação ao receptor de insulina e um terminal carboxilo, com locais de fosforilação de tirosina. Os resíduos de tirosina fosforilados

permitem o recrutamento, acoplamento e activação de proteínas efectoras ¹ da cascata de sinalização (Whitehead *et al.*, 2000; Saltiel e Kahn, 2001; White *et al.*, 2002).

Conforme se pode observar na figura 1.6, após a sua fosforilação, as proteínas IRS vão activar o enzima 3-fosfatidilinositol cinase (PI3K) por ligação à subunidade reguladora p85 ². O PI3K desempenha um papel central na translocação de GLUT4. Com efeito, após a sua activação pelo IRS, o PI3K catalisa a fosforilação de fosfoinosítídeos na posição 3, produzindo compostos fosfolipídicos da família 3-fosfato de fosfatidilinositol (PI3P), nomeadamente o 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PtdInsP₃) (Saltiel e Kahn, 2001). Os PI3P (e o PtdInsP₃ em particular) activam o enzima cinase dependente do fosfoinosítídeo 1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*, PDK1), que por sua vez vai activar o proteína cinase B (Akt/PKB) e os proteína cinases C atípicos (PKC ζ e PKC λ) (Saltiel e Kahn, 2001) ³. O Akt/PKB activo vai fosforilar a proteína AS160 (*Akt Substract of 160 kDa*) (Kane *et al.*, 2002), a qual se encontra constitutivamente associada às vesículas de GLUT4 (Brozinick *et al.*, 2007) e em particular às proteínas Rab (pequenas proteínas G envolvidas nos processos de transporte e fusão das vesículas) (Jordens *et al.*, 2005). A fosforilação da AS160 pelo Akt/PKB promove a activação das proteínas Rab (Sano *et al.*, 2003; Brozinick *et al.*, 2007), o que se traduz num aumento da taxa de translocação dos GLUT4 (Jordens *et al.*, 2005). Por outro lado, o PI3K pode activar o enzima PLC, originando os segundos mensageiros DAG e trifosfato de inositol (IP₃), que activam o PKC ζ , estimulando o aporte de glucose (Brozinick *et al.*, 2007) (figura 1.6).

¹ As proteínas efectoras na transdução de sinal da insulina mediada pelas proteínas IRS caracterizam-se por possuir domínios SH2 (homologia-Src-2); muitas destas proteínas SH2 são moléculas adaptadoras, como é o caso da p85, a subunidade reguladora do enzima 3-fosfatidilinositol cinase (PI3K), e da CrkII, molécula activadora de pequenas proteínas G (Saltiel e Kahn, 2001).

² O PI3K é composto por uma subunidade catalítica p110 e uma subunidade reguladora p85 que possui dois domínios SH2, aos quais se ligam os resíduos de tirosina fosforilada dos IRS (Saltiel e Kahn, 2001).

³ Está também descrito que o PtdInsP₃ pode ligar-se directamente aos PKC (PKC ζ e PKC λ) (White *et al.*, 2002) e ao Akt/PKB, activando ambos (Saltiel e Kahn, 2001), não necessitando do PDK1 como mediador.

Adicionalmente, está descrita uma outra via de transdução de sinal da insulina que também parece contribuir para a translocação dos GLUT4 e é de certa forma independente da fosforilação dos IRS e da activação do PI3K (Saltiel e Pessin, 2002) (figura 1.6). Esta via envolve a fosforilação de tirosinas da APS (proteína adaptadora com domínios PH¹ e SH2) e do protooncogene Cbl (*Casitas b-lineage lymphoma*, c-Cbl) (Ribon e Saltiel, 1997; Saltiel e Kahn, 2001) directamente pelo receptor da insulina (Saltiel e Pessin, 2002), sendo que a APS está envolvida no recrutamento do Cbl para o receptor (Saito *et al.*, 2008). Na maioria das células sensíveis à insulina, o Cbl está associado à proteína adaptadora CAP (*Cbl-associated protein*) (Saltiel e Kahn, 2001). Após fosforilação, o complexo Cbl-CAP é translocado para *lipid rafts* na membrana plasmática onde se liga à proteína flotilina e recruta a proteína CrkII (Saltiel e Kahn, 2001). Em seguida, a CrkII forma um complexo com a proteína C3G, uma proteína de permuta nucleotídica, activando a TC10. Esta TC10 é uma proteína G que promove a translocação e acoplamento dos GLUT4 na membrana (Watson *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2008), possivelmente através da regulação dos microfilamentos de actina (Brozinick *et al.*, 2007). Embora esta via da proteína TC10 possa ser vista como independente da via do PI3K, alguns estudos têm sugerido que os PKC atípicos (PKC ζ e PKC λ) também promovem a activação da TC10 (Kanzaki *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2008) (figura 1.6).

1.2.4.3. Translocação e exocitose dos GLUT4

Os GLUT4, presentes no músculo esquelético e adipócitos, encontram-se em vesículas que se deslocam ciclicamente entre os locais de armazenamento intracelular e a membrana plasmática. A insulina aumenta o aporte de glucose incrementando a taxa

¹ O domínio PH é um domínio de homologia para a plecstrina; o Akt/PKB também possui um domínio PH, que lhe permite ligar-se ao PtdInsP₃ (Saltiel e Kahn, 2001).

de exocitose das vesículas de GLUT4 e reduzindo a taxa de internalização das mesmas (Saltiel e Kahn, 2001; Eguez *et al.*, 2005).

À semelhança dos grânulos secretores de insulina na célula β -pancreática (secção 1.2.3), as vesículas de GLUT4 também parecem ser translocadas por um sistema que envolve redes de microtubulos e a polimerização da actina (Saltiel e Kahn, 2001; Brozinick *et al.*, 2007). O *remodeling* ou reorganização dos filamentos de actina parece ser modulado pelas vias da proteína TC10 e IRS/PI3K, através das proteínas Rab (Brozinick *et al.*, 2007), conforme representado na figura 1.6. O *remodeling* da actina é essencial não só para a translocação das vesículas de GLUT4, mas também para a sua fusão com a membrana (Saltiel e Kahn, 2001). No processo de fusão das vesículas de GLUT4 à membrana, em particular no músculo esquelético, parecem também estar envolvidas proteínas SNAP (*soluble NSF attachment proteins*), que se ligam a receptores SNARE (*SNAP receptors*) (Brozinick *et al.*, 2007).

1.2.4.4. Inibição da transdução de sinal da insulina

Para além da fosforilação dos resíduos de tirosina (figura 1.6), tanto o receptor da insulina como as proteínas IRS podem ser fosforiladas nos resíduos de serina, o que bloqueia ou atenua o sinal devido à diminuição da fosforilação dos resíduos de tirosina e à indução da interacção dos IRS com outras proteínas (Craparo *et al.*, 1997; Saltiel e Kahn, 2001). Estas fosforilações inibitórias permitem regular por retroacção negativa a transdução de sinal da insulina e proporcionam um mecanismo de cross-talk com outras vias que produzem insulinoresistência (Saltiel e Kahn, 2001). Vários enzimas cinases estão implicados neste processo de regulação, tais como o PI3K, Akt/PKB ou o cinase do sintase do glicogénio 3 (GSK3) (Saltiel e Kahn, 2001).

A acção da insulina é também atenuada por proteína tirosina fosfatases (PTPases), que catalisam a desfosforilação do receptor e dos seus substratos, sendo que

se observou estarem sobre-expressos nalguns estados de insulinoresistência (Saltiel e Kahn, 2001). Com efeito, em estudos com modelos transgénicos *knockout* do PTP1B (PTPase citoplasmático) observou-se um aumento do número de resíduos de tirosina fosforilados, tanto no receptor como nas proteínas IRS, bem como um aumento da sensibilidade à insulina no músculo (Saltiel e Kahn, 2001).

1.2.5. ACÇÃO HIPOGLICEMIANTE DA INSULINA - DA CÉLULA PARA O ORGANISMO

Na secção 1.2.4 abordou-se a acção da insulina na captação de glucose de um ponto de vista molecular e celular, com informação obtida essencialmente por estudos *in vitro*. No entanto, a acção da insulina, em particular a sua acção hipoglicemiante, pode ser estudada ao nível do tecido, órgão ou de todo o organismo (*in vivo*). O papel da insulina no aporte celular de glucose tem sido estudado nos mais diversos sistemas, tais como tecidos (McGrowder *et al.*, 2006) ou órgãos isolados e mantidos em perfusão (Petersen e Tygstrup, 1994). Mas é inquestionável que, apesar de mais complexa, a forma mais objectiva de efectuar estes estudos é *in vivo*. Os métodos mais utilizados para avaliar a sensibilidade à insulina *in vivo* são discutidos na secção 1.6.

O papel vital que a insulina desempenha na homeostase da glucose é particularmente relevante no estado pós-prandial, não só porque actua de forma inibitória sobre a produção hepática de glucose, mas principalmente porque estimula a captação de glucose pelos tecidos periféricos, nomeadamente pelo músculo esquelético. A acção hipoglicemiante da insulina envolve a canalização da glucose da circulação sanguínea para os tecidos, o que só faz sentido que ocorra quando essa glicémia está aumentada, o que pode ocorrer em condições fisiológicas, como após uma refeição.

1.2.6. IMPORTÂNCIA DO ESTADO PRANDIAL PARA A ACÇÃO HIPOGLICEMIANTE DA INSULINA

A diabetes tipo 2 é caracterizada por um declínio da secreção de insulina fundamentalmente em resposta à ingestão de nutrientes (Leiter *et al.*, 2005). Entre 54 e 67 % das pessoas com redução da tolerância à glucose apresentam uma glicémia em jejum normal; e uma meta-análise de 20 estudos europeus revelou que 31 % das pessoas diagnosticadas com diabetes através do recurso à glicémia pós-prandial também apresentam níveis normais de glucose em jejum (Lautt, 2007), sugerindo uma diferença clara na regulação da glicémia antes e após uma refeição. Com efeito, as maiores complicações relacionadas com a insulinoresistência são primeira e principalmente observadas no estado pós-prandial, hiperglicémico (Hanefeld e Temelkova-Kurktschiev, 2002), o que reflecte uma maior necessidade de acção da insulina após uma refeição.

Em condições fisiológicas, a acção da insulina no estado pós-prandial é significativamente superior à sua acção no estado de jejum (Lautt *et al.*, 2001; Leiter *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2008). Embora seja discutível quais os nutrientes ou tipos de refeições mais eficazes no incremento da acção da insulina, a maioria dos estudos em que se compara a sensibilidade à insulina antes e depois da ingestão de uma refeição sugerem que a acção da insulina é maior no estado pós-prandial (Leiter *et al.*, 2005). Experiências em animais demonstraram que a acção da insulina aumentava no pós-prandial, quer quando a ingestão da comida era *ad libitum* (Lautt *et al.*, 2001; Peitl e Szilvassy, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008), quer quando a comida era administrada por via endogástrica (*gavage*) (Lautt *et al.*, 2001). Recentemente, o nosso grupo obteve resultados semelhantes em humanos (Patarrao *et al.*, 2008). Com efeito, em indivíduos saudáveis com um índice de massa corporal (IMC) de $23.3 \pm 0.8 \text{ kg/m}^2$, a sensibilidade à insulina foi avaliada antes (24 h de jejum) e após a ingestão de uma refeição-teste *standard*, observando-se que a sensibilidade à insulina pós-prandial era cerca de 3 vezes

a observada em jejum (Patarrao *et al.*, 2008). Quando o mesmo protocolo foi aplicado a indivíduos com excesso de peso (IMC de 27.7 ± 0.4 kg/m²), condição normalmente associada a diminuição da sensibilidade à insulina, a acção da insulina no estado de jejum foi semelhante à observada para os indivíduos saudáveis; porém, no estado pós-prandial foi consideravelmente inferior (Patarrão e Macedo, observações não publicadas). Estes resultados sugerem que fases precoces de insulinoresistência podem já existir, mas são detectadas apenas no estado pós-prandial. Assim, torna-se pertinente avaliar a acção hipoglicemiante da insulina no estado pós-prandial, uma vez que é quando as primeiras manifestações de insulinoresistência ocorrem, ainda num estado pré-diabético.

Nas experiências descritas no parágrafo anterior foram usadas refeições mistas, isto é, compostas por proteínas, lípidos e glícidos, embora em proporções variáveis; tal facto sugere que uma refeição mista é capaz de potenciar a acção da insulina, no entanto permanece por esclarecer se a glucose (glícidos) por si só não será capaz de o fazer. Embora alguns autores sugiram que a utilização de refeições mistas, comparativamente às refeições glicídicas, torna mais fácil a detecção de diferenças nos perfis de glucose e insulina, em particular em modelos de insulinoresistência (Berthiaume e Zinker, 2002), o efeito da composição da refeição (mista *versus* glicídica) no incremento da acção da insulina permanecia por esclarecer.

1.3. PAPEL DO SISTEMA NERVOSO AUTÓNOMO NA HOMEOSTASE DA GLUCOSE

O sistema nervoso autónomo é o principal mediador das respostas fisiológicas a estímulos internos e externos. Nesta secção abordam-se sucintamente as principais contribuições do sistema nervoso autónomo, em particular do parassimpático, para a homeostase da glucose, resultantes da sua actividade sobre o tracto gastrointestinal.

O sistema nervoso autónomo divide-se em sistema nervoso simpático e parassimpático, os quais actuam normalmente de forma recíproca, isto é, o aumento de actividade de um coincide com o decréscimo de actividade do outro ¹ (Teff, 2008). A acção do simpático é mediada por activação de receptores (nor)adrenérgicos nos tecidos-alvo, enquanto que a actividade parassimpática envolve principalmente a libertação de acetilcolina ². O tracto gastrointestinal, tal como a grande maioria dos órgãos, é inervado por ambos os tipos de fibras, sendo que as fibras simpáticas são maioritariamente inibitórias e as fibras parassimpáticas maioritariamente excitatórias (Konturek *et al.*, 2004). A inervação simpática do tracto gastrointestinal tem origem na porção torácica da espinal-medula (T5-T12) e é feita essencialmente através dos gânglios celíaco (fígado, pâncreas e estômago) e mesentérico superior (intestino, excepto cólon descendente e sigmoidal). As principais ramificações do sistema nervoso parassimpático a nível hepático, pancreático, gástrico e intestinal (excepto o recto e cólon sigmoidal) derivam do nervo vago (X par craniano) (Esperança-Pina, 2000).

No que respeita à regulação da glicémia e homeostase da glucose, os sistemas nervosos simpático e parassimpático também têm efeitos antagónicos: o parassimpático actua de forma a facilitar a captação periférica de glucose, enquanto que o simpático

¹ Apesar da regra geral ser de reciprocidade entre sistema nervoso simpático e parassimpático, há algumas excepções, em determinadas condições fisiológicas; por exemplo, em condições de hipoglicémia, a activação de ambos induz a libertação de glucagina pelas células α -pancreáticas (Teff, 2008).

² A acetilcolina é rapidamente degradada pelo enzima acetilcolinesterase, de modo que na maioria das vezes a actividade vagal (parassimpático) apenas pode ser medida indirectamente, através da resposta do(s) tecido(s)-alvo(s); recorre-se muitas vezes a agonistas (ex: betanecol) e antagonistas (ex: atropina) colinérgicos para determinar a contribuição do parassimpático para uma dada resposta (Teff, 2008).

tende a aumentar a glicémia, através da redução do aporte e aumento da produção hepática de glucose.

A regulação da glicémia e a distribuição periférica de glucose pelo sistema nervoso simpático faz-se, por exemplo, pelo controlo do tónus vascular, que regula o fluxo sanguíneo a um determinado sistema, mas principalmente através dos seus efeitos a nível hepático. Em condições de *stress* e/ou de hipoglicémia a activação do simpático estimula a glicogenólise e a gluconeogénese, aumentando o efluxo de glucose do fígado. Gardemann e Jungermann (1986) determinaram que a indução neuronal do aumento do efluxo de glucose hepática deve-se à actividade do simpático e não do parassimpático, uma vez que, após bloqueio α - e β -adrenérgico, a estimulação neuronal hepática não potencia o efluxo de glucose hepática. No entanto, de acordo com outros autores, a estimulação da glicogenólise e gluconeogénese hepáticas por activação do simpático contribui pouco para o aumento do efluxo de glucose do fígado em resposta à hipoglicémia, desde que os sistemas de regulação hormonal estejam intactos (Puschel, 2004). Assim, a regulação da produção de glucose parece ser feita principalmente por modulação da secreção de insulina (redução), de glucagina (aumento) e pelo sistema nervoso simpático (Gardemann e Jungermann, 1986).

A activação do sistema nervoso parassimpático (vagal) ocorre durante a ingestão de uma refeição (Uijtdehaage *et al.*, 1992; Teff, 2008). O nervo vago inerva praticamente todos os tecidos envolvidos na digestão, absorção e metabolismo de nutrientes, pelo que influencia profundamente o processamento metabólico da comida (Teff, 2008). Diversos autores têm observado que o parassimpático desempenha um papel chave na regulação da glicémia através das inervações do pâncreas e do fígado (Gardemann e Jungermann, 1986; Xie *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 2002; Lutt, 2007; Teff, 2008). De facto, a estimulação eléctrica do vago parece aumentar (Kaneto *et al.*, 1967) e o antagonismo muscarínico parece atenuar a secreção de insulina estimulada pela glucose ou por uma refeição (Teff e Townsend, 1999), embora tais observações não

sejam consensuais (Schneeberger *et al.*, 1991; Teff *et al.*, 1999). Curiosamente, uma hiperinsulinémia prolongada pode levar à atenuação do sinal parassimpático (Van De Borne *et al.*, 1999), o que poderá explicar eventuais disfunções do sistema nervoso autónomo em condições fisiopatológicas associadas a hiperinsulinémia, como a obesidade. A nível hepático, Gardemann e Jungermann (1986) observaram ainda que a estimulação dos nervos parassimpáticos tem efeitos directos no metabolismo da glucose, os quais são sinérgicos com a acção da insulina e antagónicos à da glucagina, como a activação dos enzimas glicogénicos e inibição dos enzimas gluconeogénicos e glicogenolíticos (Mondon e Burton, 1971; Teff, 2008). Xie e colaboradores observaram ainda que a ablação cirúrgica dos nervos parassimpáticos hepáticos diminui a sensibilidade periférica à insulina no estado pós-prandial (Xie *et al.*, 1993), a qual é revertida por administração intraportal de acetilcolina (Xie e Lutt, 1996a).

Adicionalmente, o tracto gastrointestinal, sistema nervoso central e sistema nervoso entérico¹ parecem estar envolvidos numa comunicação de duas vias (eferente e aferente), constituída por fibras simpáticas, parassimpáticas e sensoriais aferentes, necessárias para a sinalização do chamado eixo entero-cerebral (*gut-brain axis*) (Konturek *et al.*, 2004). Os efeitos deste eixo parecem ser mediados por hormonas entéricas que estimulam nervos sensoriais e activam os reflexos autonómicos no estado pós-prandial (Konturek *et al.*, 2003). Embora não seja ainda claro como é que este mecanismo contribui para a homeostase da glucose, parece ocorrer uma interacção entre o tracto gastrointestinal, sistema nervoso central e órgãos efectores na regulação da glicémia (pâncreas e fígado). Esta interacção parece ser mediada pelo sistema nervoso autónomo e pelo parassimpático em particular, que é estimulado pela ingestão de uma refeição e está envolvido no aporte de glucose pelos tecidos periféricos.

¹ A designação de sistema nervoso entérico foi proposta por Wingate em 1981 para caracterizar uma terceira divisão do sistema nervoso autónomo, constituída por uma rede de neurónios intrínseca ao tracto gastrointestinal (Wingate e Ewart, 1981).

1.4. IMPORTÂNCIA DO MECANISMO HEPÁTICO DA HISS PARA A ACÇÃO DA INSULINA E HOMEOSTASE DA GLUCOSE NO ESTADO PÓS-PRANDIAL

A sensibilidade à insulina no estado pós-prandial aumenta relativamente ao observado no estado de jejum, conforme discutido na secção 1.2.5, o que contribui para uma reposição mais eficaz da euglicémia após uma refeição. Para esse aumento de sensibilidade à insulina (jejum vs pós-prandial) muito contribui a acção da HISS (substância hepática sensibilizadora da insulina). O estudo da via da HISS constitui o principal foco do nosso grupo de investigação e é um aspecto central nos trabalhos que deram origem à presente dissertação.

1.4.1. A IMPORTÂNCIA DO FÍGADO PARA A ACÇÃO DA INSULINA E A DESCOBERTA DA VIA DA HISS

O papel central do fígado na captação de glucose pelos tecidos periféricos (extra-hepáticos) tem sido sugerido desde há muito por vários autores (Lang *et al.*, 1954; Mertz e Schwarz, 1962; Lutt, 1980; Gardemann e Jungermann, 1986; Petersen e Tygstrup, 1994; Moore *et al.*, 2002; Puschel, 2004).

Na década de 50, Lang e colaboradores observaram que a realização de uma hepatectomia em animais saudáveis diminui o aporte periférico de glucose em aproximadamente 60 %, o que não pode ser revertido por administração supramáxima de insulina, sugerindo que o fígado liberta um agente humoral que aumenta a capacidade de captação de glucose por parte dos tecidos extra-hepáticos (Lang *et al.*, 1954). Na década seguinte, Mertz e Schwartz (Mertz e Schwarz, 1962; Petersen e Tygstrup, 1994) confirmaram o papel essencial do fígado na captação periférica de glucose, através da observação de que a redução do aporte de glucose em ratos

eviscerados era revertida por administração de um extracto de fígado de rato fresco. Mais tarde, Petersen e Tygstrup observaram que a inclusão de fígado de rato isolado numa preparação de músculo esquelético com um sistema recirculatório aumentava significativamente o aporte de glucose no músculo e que a taxa de captação de glucose pelo músculo decrescia quando o fígado era removido do sistema, apresentando um período de semi-vida de cerca de 30 min (Petersen e Tygstrup, 1994). Esta hipótese, segundo a qual o processo de captação de glucose depende não só da acção da insulina *per se*, mas também de um mecanismo hepático capaz de potenciar a acção hipoglicemiante da própria insulina, sofreu um enorme avanço na década de 90, com os trabalhos desenvolvidos por Lutt e colaboradores. Em 1993, estes investigadores constataram pela primeira vez a importância dos nervos parassimpáticos hepáticos para a captação periférica e homeostase da glucose (Xie *et al.*, 1993), o que foi confirmado mais tarde por Moore e colaboradores (Moore *et al.*, 2002). Posteriormente, observou-se que esta actividade parassimpática faz parte de uma via que apenas está activa no estado pós-prandial e é responsável por 50 a 60 % da acção hipoglicemiante da insulina após uma refeição (Lutt *et al.*, 2001).

Lutt e colaboradores sugerem então que os nervos parassimpáticos estão envolvidos na activação de um mecanismo hepático pós-prandial que leva à libertação de um factor humoral que potencia a acção periférica da insulina e que denominam de *hepatic insulin sensitizing substance* (substância hepática sensibilizadora da insulina, HISS) (Xie e Lutt, 1996b; Sadri *et al.*, 1997; Lutt *et al.*, 2001).

Assim, a acção hipoglicemiante da insulina no estado pós-prandial pode ser dividida em duas componentes, que actuam sinergisticamente para aumentar o aporte de glucose. A primeira componente é a da insulina *per se*, isto é, correspondente à acção directa da insulina sobre as células-alvo, activando o seu receptor e despoletando a via de transdução de sinal atrás descrita (secção 1.2). A segunda componente de acção da insulina é dependente da via da HISS, a qual potencia a acção da insulina.

A via de acção da insulina dependente da HISS está descrita em diversos modelos animais, tais como o gato (Xie *et al.*, 1993; Xie e Lutt, 1995a), rato (Xie e Lutt, 1996b; Sadri *et al.*, 1997; Lutt *et al.*, 2001), cão (Moore *et al.*, 2002) e murganho (Latour e Chan, 2002), não se observando diferenças na sua acção quanto ao sexo (Ribeiro *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2008). Recentemente, experiências realizadas pelo nosso grupo sugerem a existência da via de acção da insulina dependente da HISS também em humanos (Patarrao *et al.*, 2007; Patarrao *et al.*, 2008).

1.4.2. A SÍNTESE DA HISS

A ingestão de uma refeição promove a secreção de insulina pelo pâncreas e a activação do sistema nervoso parassimpático (Teff, 2008). Esta activação do sistema parassimpático é extremamente importante para a homeostase da glucose (Xie *et al.*, 1993; Xie e Lutt, 1996b; Teff, 2008), na medida em que desencadeia o mecanismo de síntese da HISS, cuja acção é essencial para a sensibilidade à insulina no estado pós-prandial (Lutt, 2004).

Com efeito, o grupo de Lutt observou que a ablação cirúrgica do plexo anterior hepático induz uma insulinoresistência periférica pronunciada, sugerindo que os nervos parassimpáticos hepáticos desempenham uma função essencial na regulação da glicémia (Xie *et al.*, 1993). Embora o plexo anterior hepático englobe fibras simpáticas e parassimpáticas (Lutt, 1983), os efeitos glicémicos da ablação deste plexo parecem dever-se exclusivamente à perda da função parassimpática (Lutt e Wong, 1978b; Xie *et al.*, 1993). Tal conclusão foi tirada a partir das observações de que os efeitos hepáticos da estimulação deste plexo não eram afectados pela destruição selectiva dos nervos simpáticos hepáticos com 6-hidroxiopamina (Lutt e Wong, 1978b) e que a

insulinorresistência produzida pela desnervação do plexo anterior hepático não era agravada pela vagotomia bilateral (Xie *et al.*, 1993).

Este reflexo parassimpático hepático parece ser mediado por receptores colinérgicos muscarínicos, presentes no fígado, sendo que a administração intraportal de atropina, um antagonista muscarínico não selectivo, induz uma inibição significativa da sensibilidade à insulina periférica (Xie e Lutt, 1994). A insulinorresistência induzida pela administração de atropina é dose-dependente (Xie e Lutt, 1995a; Takayama *et al.*, 2000) e não agrava a insulinorresistência provocada pela desnervação do plexo anterior hepático (Xie e Lutt, 1995a; Xie e Lutt, 1996b). Numa tentativa de caracterizar o subtipo de receptor muscarínico envolvido, testou-se o efeito da administração intraportal de pirenzepina e metoctramina, dois antagonistas muscarínicos selectivos respectivamente para receptores M_1 e M_2 , observando-se que o bloqueio dos primeiros induziu uma inibição da sensibilidade à insulina semelhante à produzida por administração de atropina (Xie e Lutt, 1995b). Estes resultados sugerem que os receptores muscarínicos activados pelo reflexo parassimpático hepático são principalmente do subtipo M_1 .

Adicionalmente, Xie e Lutt observaram que a administração de acetilcolina por via intraportal, mas não por via intravenosa, reverte completamente a insulinorresistência provocada quer pela desnervação do plexo anterior hepático, quer pela administração de atropina (Xie e Lutt, 1996a). Por outro lado, a administração de acetilcolina a animais com inervação parassimpática hepática intacta não tem qualquer efeito adicional sobre a sensibilidade à insulina, sugerindo que a acção dos nervos parassimpáticos hepáticos na sensibilidade à insulina é mediada pela acetilcolina (Xie e Lutt, 1996a). Assim, a síntese da HISS envolve a activação dos nervos parassimpáticos hepáticos, que parece levar à libertação de acetilcolina no fígado, a qual actua ao nível dos receptores muscarínicos do tipo M_1 .

Muitos dos efeitos biológicos da acetilcolina são mediados pelo *NO (Ignarro, 1992), pelo que foi considerada a hipótese de que também a acção parassimpática envolvida na via de síntese da HISS seria mediada pelo *NO . E de facto, tanto a L-NMMA como o L-NAME, dois inibidores competitivos do sintase do *NO (NOS), diminuíram a sensibilidade à insulina, mas apenas quando administrados directamente na veia porta (via ipv) (Sadri e Lutt, 1999), sugerindo que a síntese de *NO no fígado é essencial para o mecanismo de sensibilidade à insulina pós-prandial.

Observou-se também que a inibição do NOS hepático em animais previamente submetidos a desnervação do plexo anterior hepático não produzia qualquer inibição adicional da sensibilidade à insulina e que a administração de SIN-1, um dador de *NO , por via intraportal, mas não por via intravenosa, reverteu completamente a insulinoresistência causada quer por inibição do NOS hepático, quer por desnervação hepática (Sadri e Lutt, 1999). Estes resultados demonstram que a actividade colinérgica e a síntese do *NO hepáticos são essenciais para a sensibilidade à insulina pós-prandial e que ambos fazem parte da via hepática conducente à síntese da HISS.

Os resultados descritos nos parágrafos anteriores não esclareciam se a estimulação colinérgica leva à síntese de *NO no fígado, ou vice-versa. Sabe-se que a ligação da acetilcolina a receptores muscarínicos M_1 leva à activação do NOS e à síntese de *NO (Lopez-Jaramillo *et al.*, 1990; Hogan e Markos, 2007), contudo o inverso está também descrito, isto é, nalguns sistemas fisiológicos o *NO pode estimular a libertação de acetilcolina (Leonard e Lydic, 1997; Smith e McCarron, 1998). Neste contexto, experiências realizadas pelo nosso grupo revelaram que a administração intraportal de acetilcolina não é capaz de reverter a insulinoresistência induzida por inibição do NOS hepático, ao passo que a administração intraportal do dador de *NO SIN-1 reverte a insulinoresistência induzida tanto por inibição do NOS como por antagonismo muscarínico (Guarino *et al.*, 2004). O *NO hepático, mas não sistémico, é necessário para a acção da insulina dependente da HISS. Estas observações sugerem que a síntese

da HISS envolve a ligação da acetilcolina aos receptores muscarínicos M_1 no fígado, o que leva à activação do NOS e consequentemente à síntese de *NO hepático.

Adicionalmente, alguns autores observaram que a depleção dos níveis de glutathione (GSH, forma reduzida) no fígado conduz directamente à diminuição da tolerância à glucose (Khamaisi *et al.*, 2000). E, de facto, os nossos estudos revelaram que a depleção dos níveis de GSH hepático por inibição da sua síntese induz um estado de insulinoresistência semelhante ao provocado por inibição do NOS hepático, o qual não é revertido apenas pela administração de SIN-1 (Guarino *et al.*, 2003). Esta observação sugere que a síntese da HISS depende não só da via parassimpático- *NO , mas também do GSH hepático (Guarino *et al.*, 2003). Esta conclusão foi confirmada posteriormente através da observação de que a co-administração de dadores de GSH e de *NO directamente na circulação portal (fígado) aumenta a sensibilidade à insulina, contrariamente ao que acontece quando os mesmos fármacos são administrados individualmente e/ou por via intravenosa (Guarino e Macedo, 2006). Experiências recentes, efectuadas por Punithavathi e colaboradores, suportam estes resultados, uma vez que estes investigadores observaram que a reversão da insulinoresistência nalguns modelos animais implica o aumento dos níveis de GSH (Punithavathi *et al.*, 2008).

Em suma, e do que se conhece até ao momento, a síntese da HISS é iniciada após ingestão de uma refeição, através de um reflexo parassimpático hepático que envolve a libertação de acetilcolina no fígado. A acetilcolina liga-se a receptores muscarínicos M_1 no fígado, activando o NOS e aumentando a síntese de *NO hepático, o qual, na presença de GSH, conduz à síntese da HISS. A HISS é libertada pelo fígado e potencia a acção hipoglicémica da insulina.

Na figura 1.7 apresenta-se um esquema que resume os passos conhecidos da via hepática que leva à libertação da HISS.

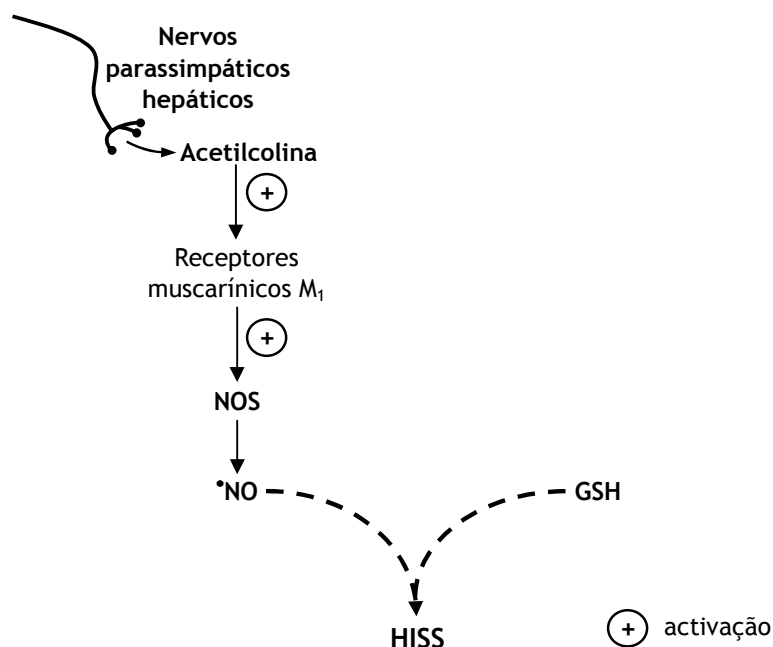


Figura 1.7: Via de síntese da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS). No estado pós-prandial, os nervos parassimpáticos hepáticos são estimulados. A acetilcolina libertada liga-se aos receptores muscarínicos do tipo M₁, activando o enzima sintase do monóxido de azoto (NOS) hepático, o que resulta na síntese de monóxido de azoto (óxido nítrico, •NO), o qual, através de um processo dependente de glutathione (reduzido, GSH), leva à síntese e/ou libertação da HISS.

1.4.3. ACÇÃO DA HISS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO - O ORGÃO-ALVO

A HISS, libertada pelo fígado após uma refeição, é essencial para a captação de glucose insulino-dependente, sendo que exerce a sua acção especificamente no músculo esquelético (Xie e Lutt, 1996b).

Os trabalhos realizados por Petersen e Tygstrup em 1994 já sugeriam que um factor humoral libertado pelo fígado aumentava o aporte de glucose no músculo (Petersen e Tygstrup, 1994). Posteriormente, recorrendo a gradientes de glucose arterio-venosos aplicados a vários órgãos *in vivo*, Xie e Lutt (1996b) demonstraram que o principal local da insulino-resistência provocada pela inibição da via da HISS era o músculo esquelético. Estes investigadores observaram que as diferenças entre os testes

de sensibilidade à insulina antes e depois da inibição da HISS tinham paralelo no aporte de glucose apenas no músculo esquelético, não se registrando variações no fígado ou órgãos esplâncnicos, sugerindo que a HISS actua principalmente no músculo esquelético (Xie e Lutt, 1996b). Os resultados obtidos por estes autores são consistentes com as observações de que o músculo esquelético é o maior captador de glucose por um mecanismo insulín-dependente (Kemmer *et al.*, 1979; DeFronzo *et al.*, 1981; Scheen *et al.*, 1994) e é o principal responsável pela hiperglicémia pós-prandial em estados de insulín-resistência (Kemmer *et al.*, 1979; Brozinick *et al.*, 1994).

Na figura 1.8, apresenta-se um diagrama ilustrativo da acção da insulina dependente da HISS.

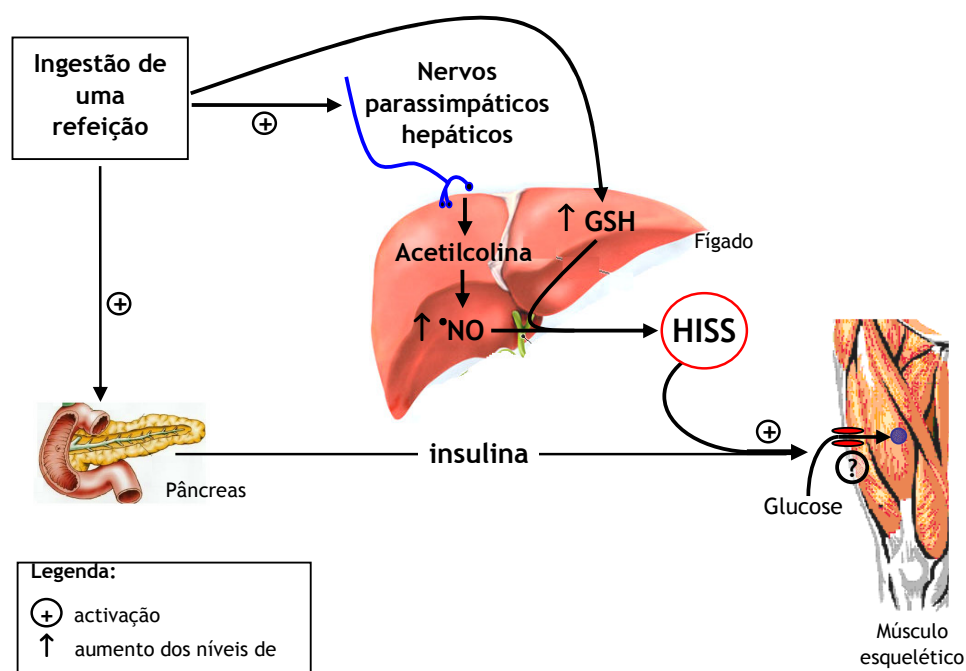


Figura 1.8: Síntese e acção da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS). No estado pós-prandial, ocorre a secreção de insulina pelo pâncreas, concomitantemente, há um aumento da síntese de monóxido de azoto (óxido nítrico, *NO) hepático, estimulado pela acção colinérgica hepática, o que, conjuntamente com a elevação dos níveis de glutathione hepático (GSH), resulta na libertação da HISS pelo fígado. A HISS actua no músculo esquelético, potenciando em 50-60 % o aporte de glucose insulín-dependente.

1.4.4. O ESTADO PRANDIAL E A REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DA VIA DA HISS

A via de acção da insulina dependente da HISS é regulada fisiologicamente pelo estado prandial, sendo máxima após ingestão de uma refeição e inibida/ausente no estado de jejum (Lautt *et al.*, 1998; Lautt *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2008). A acção da HISS no estado pós-prandial é essencial, pois, como referido anteriormente, é responsável por cerca de 50-60 % do efeito hipoglicemiante da insulina (Lautt, 1999).

Experiências em ratos demonstraram que a sensibilidade à insulina no estado de jejum (18 h de jejum) é significativamente inferior à sensibilidade à insulina no estado pós-prandial (Lautt *et al.*, 1998) e que a acção da HISS se encontra significativamente aumentada cerca de 1-2 hrs após a ingestão de alimentos, tanto quando o acesso aos alimentos é *ad libitum*, como quando a sua administração é feita por via endogástrica (*gavage*) (Lautt *et al.*, 2001). Adicionalmente, em ratos testados após diferentes períodos de jejum (0 h, 6 h, 18 h e 24 h), observou-se que a sensibilidade à insulina diminuía progressivamente com a duração do jejum e que tal se devia ao decréscimo da acção da HISS (Lautt *et al.*, 2001). Por seu turno, a acção da insulina *per se*, isto é, a componente da acção da insulina independente da via da HISS, não parece ser afectada pelo estado prandial, mantendo-se constante com a duração do jejum (Lautt *et al.*, 2001).

Quando a anestesia é induzida após a ingestão da refeição, a sensibilidade à insulina mantém-se elevada durante mais de 6 h (Xie e Lautt, 1995a; Lautt *et al.*, 1998; Lautt *et al.*, 2001). Embora o sinal prandial que leva à activação da HISS não seja conhecido, a razão pela qual a sensibilidade à insulina pós-prandial num rato anestesiado se mantém elevada durante tanto tempo pode dever-se à paragem do esvaziamento gástrico provocada pela anestesia, uma vez que não se observaram variações significativas do conteúdo gástrico após as 6-8 h de experiência (Lautt *et al.*, 2001). No entanto, já que o animal inicia o processo digestivo no estado consciente, não

se pode afirmar que a indução da anestesia impede a passagem do quimo para o lúmen intestinal, deixando em aberto o papel do intestino na activação da via da HISS. O estômago é o principal órgão no processo digestivo, mas é no intestino delgado que ocorre a maior absorção de nutrientes. Por outro lado, diferentes porções do intestino são responsáveis pela absorção de diferentes nutrientes e pela secreção de diferentes substâncias, as quais variam de acordo com o estado prandial (Genuth, 1998; Holst e Gromada, 2004), sugerindo que o intestino possa ter um papel relevante no mecanismo de activação pós-prandial da via da HISS.

Embora ainda não se conheça a natureza do sinal prandial, diversos estudos parecem consistentes com o envolvimento da via da HISS no aumento da sensibilidade à insulina que ocorre após uma refeição. Por exemplo, está descrito que o sistema nervoso parassimpático, o qual é essencial para a via da HISS, é modulado pelo estado prandial, sendo activado pela ingestão de alimentos (Teff, 2008). A própria presença de aminoácidos na circulação portal parece activar o parassimpático hepático (Tanaka *et al.*, 1990), sendo que alguns investigadores observaram ainda que a presença de diferentes nutrientes e hormonas na circulação portal, tais como a glucose, aminoácidos ou somatostatina, afectam os nervos parassimpáticos hepáticos (Nijima, 1998). Estudos adicionais sugerem que os níveis de glutathione hepático, também essencial para a via da HISS, estão diminuídos no estado de jejum e aumentam após uma refeição (Tateishi *et al.*, 1977; Guarino *et al.*, 2003).

Desta forma, a via da HISS parece estar inactiva no estado de jejum e é activada após ingestão de uma refeição. Este parece ser um mecanismo fisiológico importante para aumentar selectivamente o aporte de glucose no músculo quando a absorção de glucose é elevada, isto é, no estado pós-prandial, e para diminuir a captação de glucose pelo músculo em situações de escassez, como no estado de jejum (figura 1.8).

1.4.5. MANIPULAÇÃO DA VIA DA HISS

A inibição da via da HISS, representada nas figuras 1.7 e 1.8, pode ser conseguida não só através do jejum, mas também por interrupção cirúrgica ou farmacológica dos nervos parassimpáticos hepáticos (Xie *et al.*, 1993; Xie e Lutt, 1996a; Xie e Lutt, 1996b; Ribeiro *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2008), ou ainda por inibição dos enzimas NOS hepático (Sadri e Lutt, 1999; Guarino *et al.*, 2003; Afonso *et al.*, 2004), guanilato ciclase ¹ (Correia *et al.*, 2002; Guarino *et al.*, 2004) ou ciclo-oxigenase (Sadri e Lutt, 2000). A acção da insulina dependente da HISS pode ainda ser inibida por diminuição da concentração de glutathione hepático (Guarino *et al.*, 2003), o que também acontece com o jejum (Tateishi *et al.*, 1977; Guarino e Macedo, 2006). Qualquer destes procedimentos aqui referidos resulta num estado de insulinoresistência dependente da perda de acção da HISS, sendo que todos eles podem ser revertidos farmacologicamente, restaurando a acção da HISS.

¹ Uma via clássica de transdução de sinal do *NO no fígado é a da activação do enzima guanilato ciclase hepático (Craven e DeRubertis, 1978). A inibição deste enzima conduz a uma insulinoresistência de magnitude semelhante à obtida por interrupção parassimpática hepática (cirúrgica ou farmacológica) ou por inibição do NOS hepático (Correia *et al.*, 2002; Guarino *et al.*, 2004). Embora estes resultados não sejam concludentes, sugerem que a síntese da HISS passa pela activação do guanilato ciclase hepático pelo *NO, em resposta à estimulação colinérgica.

1.5. ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA SENSIBILIDADE À INSULINA

A perda de sensibilidade à insulina - insulinoresistência - é por si só uma alteração fisiopatológica, mas que pode acompanhar diversas condições patológicas, tais como obesidade ou diabetes e até o próprio envelhecimento. Na presente secção, procurar-se-á abordar, em primeiro lugar, os factores normalmente associados ao desenvolvimento da insulinoresistência, e, em segundo lugar, as situações patológicas em que esta alteração ocorre mais frequentemente, isto é, envelhecimento, hipertensão, obesidade e diabetes *mellitus*.

1.5.1. INSULINORESISTÊNCIA E FACTORES ASSOCIADOS AO SEU DESENVOLVIMENTO

A insulinoresistência é uma condição fisiopatológica em que a insulina, em concentrações fisiológicas, se torna incapaz de exercer as suas acções biológicas. A perda de função da insulina resulta, normalmente, num aumento compensatório da secreção de insulina pelo pâncreas. Enquanto essa hiperinsulinémia compensatória se mantiver, isto é, a secreção de insulina for suficiente para colmatar a deficiente acção desta hormona, a tolerância à glucose mantém-se normal¹ (Kashyap e Defronzo, 2007). Aparentemente, é a exaustão das células β -pancreáticas que mais tarde conduz à intolerância à glucose - hiperglicémia (Kashyap e Defronzo, 2007).

A resistência à acção biológica da insulina numa condição de insulinoresistência estende-se a todos os aspectos da acção desta hormona. Relativamente ao metabolismo lipídico, a perda do efeito antilipolítico gera um aumento do fluxo de ácidos gordos

¹ Note-se que, como será abordado na secção 1.6, intolerância à glucose e insulinoresistência são conceitos distintos. Um indivíduo com baixa tolerância à glucose e insulinémia normal é insulinoresistente; no entanto, um indivíduo insulinoresistente pode não apresentar intolerância à glucose, desde que o seu pâncreas produza uma hiperinsulinémia compensatória, capaz de manter a euglicémia.

livres para o fígado e para o músculo esquelético, contribuindo para a diminuição da acção da insulina no metabolismo glicídico destes tecidos. No âmbito do metabolismo glicídico, a insulinoresistência provoca uma atenuação da inibição da produção de glucose hepática e uma redução do aporte periférico de glucose, em particular após as refeições. É essencialmente neste último aspecto que a acção da HISS tem mais relevância e em que esta secção e as seguintes incidirão.

Mesmo em condições fisiológicas, há uma enorme variabilidade na sensibilidade à insulina inter-indivíduo, pelo que se compreende que o desenvolvimento da insulinoresistência pode ter uma origem multi-factorial. Por vezes, muitos dos factores apresentados como causais podem inclusive ser uma consequência da própria insulinoresistência. Os principais factores normalmente associados a variações da sensibilidade à insulina ¹ e discutidos nesta secção são os seguintes: (i) distribuição da gordura corporal e acumulação ectópica de triacilgliceróis; (ii) sexo (género); (iii) mediadores inflamatórios e factores humorais; (iv) glucotoxicidade; (v) *stress* oxidativo; e (vi) diminuição da acção da HISS. Apresenta-se uma visão global desses factores na figura 1.9, no final da presente secção.

(i) Distribuição da gordura corporal e acumulação ectópica de triacilgliceróis

A distribuição da gordura corporal e acumulação ectópica de triacilgliceróis, isto é, a deposição de triacilgliceróis em células de tecido não adiposo que normalmente contêm baixos níveis destes lípidos (Lettner e Roden, 2008), estão intimamente relacionadas com a obesidade. Embora a associação entre obesidade e insulinoresistência seja discutida mais à frente no presente capítulo, é importante desde já discutir a influência da distribuição corporal dessa adiposidade no fenómeno de insulinoresistência.

Alguns autores sugerem que a acumulação de gordura visceral está fortemente associada à insulinoresistência e de facto a remoção cirúrgica da massa gorda visceral reverte parcialmente a insulinoresistência, não só a nível hepático (Barzilai *et al.*, 1999), mas também a nível do músculo esquelético, onde a via de sinalização da insulina parece ser restaurada (Pitombo *et al.*, 2006).

De acordo com a *teoria portal*, a relação entre a insulinoresistência e a adiposidade visceral deve-se ao efeito deletério da libertação dos ácidos gordos livres, provenientes dos adipócitos viscerais, na circulação portal ² (Large e Arner, 1998; Griffin *et al.*, 1999; Bergman *et al.*, 2007). No entanto, a teoria portal não é consensual, visto que carece de comprovação *in vivo* (Yki-Jarvinen, 2003).

Um outro aspecto interessante da adiposidade visceral é a sua associação com alterações do sistema nervoso autónomo, nomeadamente através do aumento do *ratio* de actividade simpática/actividade parassimpática (Lindmark *et al.*, 2005). Esta diminuição do parassimpático poderá estar relacionada com a insulinoresistência pós-prandial periférica através de uma diminuta acção da HISS, a qual depende da integridade do sistema nervoso parassimpático.

Por outro lado, outros autores consideram que a gordura visceral é apenas um reflexo do aumento da adiposidade corporal total e consideram que a acumulação intramiocelular de lípidos é um factor preponderante na génese da insulinoresistência³ (Koyama *et al.*, 1997; Korach-Andre *et al.*, 2005). Também no fígado o excesso de ácidos gordos (esteatose) interfere com a via de sinalização da insulina, por exemplo,

¹ A discussão do estado de insulinoresistência no contexto de alterações fisiopatológicas concretas terá lugar nas secções 1.5.2 a 1.5.5.

² Segundo a *teoria portal*, os ácidos gordos livres da circulação portal interferem com a via de sinalização da insulina ao nível do enzima PI3K (Griffin *et al.*, 1999; Bergman *et al.*, 2007).

³ Os lípidos intramiocitários parecem inibir directamente a via de transdução de sinal da insulina, uma vez que diacil- e triacilgliceróis inibem a acção da insulina a nível celular, induzindo a activação do PKC e a formação de ceramida, ou inibindo a acção dos GLUT4 (Schmitz-Peiffer *et al.*, 1997; Schmitz-Peiffer, 2000). Por outro lado, o próprio aumento das concentrações intramiocitárias de ácidos gordos irá privilegiar a oxidação destes relativamente à oxidação de glucose, resultando num menor aporte celular deste glícido.

inibindo a ligação/autofosforilação do receptor de insulina, contribuindo para a falta de inibição do efluxo hepático de glucose (Hennes *et al.*, 1990; Nagy *et al.*, 1990), mas não é claro se contribui para o desenvolvimento da insulinoresistência (Marchesini *et al.*, 1999). Embora relevante, tem sido sugerido que a acumulação ectópica de gordura não é o único factor explicativo da insulinoresistência (Lettner e Roden, 2008).

(ii) Sexo (género)

Apesar de estarem descritas diferenças de sensibilidade à insulina entre homens e mulheres (Yki-Jarvinen, 1984), tal não parece dever-se ao género sexual, mas sim a eventuais diferenças na proporção de gordura corporal e sua localização, não ignorando as variações hormonais registadas ao longo da vida, as quais também afectam a sensibilidade à insulina. De acordo com aqueles autores, se se expressar a sensibilidade à insulina em termos da massa corporal as diferenças relativamente ao género sexual dissipam-se (Yki-Jarvinen, 2003). Com efeito, estudos efectuados pelo nosso grupo em ratos Wistar (modelo fisiológico) de ambos os sexos e em que se mediu sensibilidade à insulina pós-prandial total por kg de massa corporal, não revelaram diferenças significativas entre machos e fêmeas (Ribeiro *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2008).

(iii) Mediadores inflamatórios e factores humorais

Na última década, a insulinoresistência tem sido associada a um estado de inflamação de baixa intensidade, de tal modo que muitos investigadores consideram que essa inflamação contribui substancialmente para o seu desenvolvimento (Tilg e Moschen, 2008). A relação entre a inflamação e a insulinoresistência é particularmente relevante num estado de obesidade, em que há uma proliferação de factores

inflamatórios ¹. Para além desses mediadores com papel inflamatório, o tecido adiposo liberta outros factores (humorais) que contribuem para a homeostase da glucose, a maioria dos quais provenientes do sistema imunitário e/ou tecido adiposo e que parecem estar envolvidos na regulação da acção da insulina. Os exemplos mais relevantes são o TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), interleucinas (IL), nomeadamente IL-1 e IL-6, leptina, adiponectina e resistina (adipocitocinas), os quais serão abordados novamente na secção 1.5.4.

O principal mecanismo envolvido no processo de insulinoresistência associada a mediadores inflamatórios é a interferência com a via de sinalização da insulina (Tilg e Moschen, 2008). Estes mediadores activam vias intracelulares que promovem a fosforilação dos resíduos de serina das proteínas IRS, o que impede a fosforilação dos resíduos de tirosina dessas proteínas e bloqueia a transdução do sinal a partir do receptor de insulina (ver secção 1.2.4.4). Duas das principais vias inflamatórias associadas à insulinoresistência são a via dos JNK (cinases N-terminal do c-Jun) e do IKK (inibidor do cinase do NF κ B) ² (Wellen e Hotamisligil, 2005). Numa condição de obesidade, a actividade da via dos JNK está aumentada no fígado, músculo e tecido adiposo, sendo que a perda do JNK-1 previne o desenvolvimento da insulinoresistência em modelos animais de obesidade genética e induzida pela dieta (Hirosumi *et al.*, 2002; Wellen e Hotamisligil, 2005). O mecanismo exacto pelo qual os JNK exercem a sua acção promotora da insulinoresistência permanece por esclarecer.

Indicam-se na tabela II alguns aspectos da acção dos principais agentes inflamatórios e humorais associados ao processo de insulinoresistência.

¹ Na obesidade, o aumento da adiposidade pode levar a uma maior produção de mediadores inflamatórios e, consequentemente induzir ou agravar o estado de insulinoresistência; a relação obesidade-insulinoresistência será discutida em maior detalhe na secção 1.5.4.

² Os JNK (JNK-1, -2 e -3) pertencem à família dos MAPK (proteína cinases activados pelo mitogénio); outros cinases membros desta família são os ERK (cinases regulados extracelularmente) e os p38 MAPK (Bloch-Damti e Bashan, 2005). A via do IKK pode fosforilar directamente os IRS nos resíduos de serina ou promover a produção de múltiplos mediadores inflamatórios, tais como o TNF α e a IL-6 (Wellen e Hotamisligil, 2005). Estas vias também podem ser activadas por espécies reactivas de oxigénio (ROS), o que é abordado em baixo.

Tabela II - Factores inflamatórios e humorais (citocinas e adipocitocinas) envolvidos na regulação da sensibilidade à insulina (insulinorresistência). TNF- α , *tumor necrosis factor- α* ; IL, interleucina; TGF β , *transforming growth factor*; BMP-9, *bone morphogenetic protein 9*; *NO, monóxido de azoto (óxido nítrico); iNOS, sintase do *NO (indutível); RBP-4, *retinol-binding protein 4*; IRS, substrato do receptor da insulina; IKK, inibidor do cinase do NF κ B; JNK, cinases N-terminal do c-Jun; Akt/PKB, proteína cinase B; HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. \uparrow , aumento; \downarrow , diminuição ou reversão. Tabela adaptada de Wellen e Hotamisligil, 2005. Esta tabela continua nas páginas seguintes.

FACTOR	Acção metabólica	MECANISMO DE ACÇÃO
TNF- α	\uparrow insulinorresistência	Fosforilação dos resíduos de serina da proteína IRS-1 (Wellen e Hotamisligil, 2005), através da activação da via do IKK (Yuan <i>et al.</i> , 2001).
IL-1	\uparrow insulinorresistência	Fosforilação dos resíduos de serina do IRS-1 (Tilg e Moschen, 2008).
IL-6	\uparrow insulinorresistência	Inibição da fosforilação dos resíduos de tirosina do IRS-1 e do IRS-2 e/ou indução da degradação proteossomal dos IRS (Wellen e Hotamisligil, 2005; Tilg e Moschen, 2008).
Resistina	\uparrow insulinorresistência	Acção oposta à da adiponectina; promove o aumento da produção de TNF- α , IL-6 e degradação proteossomal dos IRS, a qual está associada com insulinorresistência hepática (Tilg e Moschen, 2008).
<i>Chemerin</i>	\uparrow insulinorresistência	Secretada por adipócitos; tem acção autócrina e/ou parácrina; parece aumentar o aporte de glucose insulinodependente potenciando a sinalização da insulina (Takahashi <i>et al.</i> , 2008).
*NO indutível (iNOS)	\uparrow insulinorresistência	Activado como resposta inflamatória aguda; inibição da fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor da insulina e/ou IRS (Tsuchiya <i>et al.</i> , 2007).
<i>RBP-4</i>	\uparrow insulinorresistência	Produzida nos adipócitos, inibe a fosforilação dos IRS nos adipócitos; estimula a gluconeogénese hepática, promovendo a expressão do fosfoenolpiruvato carboxicinase; e inibe a sinalização da insulina no músculo (Yang <i>et al.</i> , 2005).

Tabela II (cont.)

FACTOR	Acção metabólica	MECANISMO DE ACÇÃO
TGFβ/BMP-9 ¹	↓ insulinoresistência (?)	Inibe a diferenciação de adipócitos e o desenvolvimento de tecido adiposo (Wellen e Hotamisligil, 2005); activa ou potencia a via da HISS (Chen <i>et al.</i> , 2003; Caperuto <i>et al.</i> , 2008).
Leptina	↓ insulinoresistência ↑ insulinoresistência (?)	Diminui o apetite (Wellen e Hotamisligil, 2005), a gluconeogénese e os triacilgliceróis ectópicos (Tilg e Moschen, 2008), mas parece activar o sistema nervoso simpático (Wilding, 2003).
Adiponectina	↓ insulinoresistência	Inibe algumas acções do TNF-α; decresce a glicémia e os níveis plasmáticos de ácidos gordos, aumentando a oxidação de ácidos gordos; aumenta a sensibilidade à insulina no tecido adiposo e fígado (Wellen e Hotamisligil, 2005; Tilg e Moschen, 2008).
Visfatin ²	↓ insulinoresistência	Parece ser insulinomimética (Wellen e Hotamisligil, 2005); liga-se ao receptor de insulina num local distinto desta e aumenta o aporte de glucose em adipócitos e miócitos (Adeghate, 2008).
Vaspin	↓ insulinoresistência	É um inibidor de serina protease, derivado do tecido adiposo visceral; aumenta a sensibilidade à insulina por um mecanismo ainda desconhecido (Li <i>et al.</i> , 2008) e modula a expressão do TNF-α, leptina, adiponectina e resistina (Hida <i>et al.</i> , 2005).

¹ O BMP-9 (*bone morphogenetic protein 9*), da família dos TGFβ (*transforming growth factor*), parece aumentar a sensibilidade à insulina por estimulação da via da HISS (Caperuto *et al.*, 2008); embora Caperuto e colaboradores sugiram que o BMP-9 é a HISS, tal não é de todo consensual (Groop, 2003).

² *Visfatin*, também conhecida como PBEF (*pre-B cell colony-enhancing factor*), é sintetizada principalmente pelos adipócitos viscerais; paradoxalmente, está aumentada em modelos animais de obesidade e insulinoresistência (Tilg e Moschen, 2008).

Tabela II (cont.)

FACTOR	Acção metabólica	MECANISMO DE ACÇÃO
<i>Apelin</i>	↓ insulinoresistência (?)	Embora os mecanismos sejam ainda desconhecidos, sabe-se que a administração de <i>apelin</i> (exógena) diminui a glicémia, a insulinémia e a adiposidade, sem alterar o apetite (Higuchi <i>et al.</i> , 2007).
IL-10	↓ insulinoresistência	Inibição da produção de TNF- α e IL-6 (van Exel <i>et al.</i> , 2002); bloqueio da acção deletéria da IL-6 no fígado e músculo esquelético (Kim <i>et al.</i> , 2004).
IL-18	↓ insulinoresistência	Aumento do aporte de glucose insulino-dependente em adipócitos, activando a via do Akt/PKB (Yang <i>et al.</i> , 2007); controlo do apetite (Netea <i>et al.</i> , 2006).

(iv) Glucotoxicidade

A hiperglicémia crónica diminui ela própria a acção da insulina, pelo que é uma causa de insulinoresistência especificamente associada à diabetes (Yki-Jarvinen *et al.*, 1987). De acordo com alguns autores, um dos mecanismos celulares pelos quais a hiperglicémia crónica induz insulinoresistência é o aumento de actividade da via das hexosaminas, que resulta numa elevada glicosilação proteica e consequente perda de função proteica ¹ (Patti *et al.*, 1999; Yki-Jarvinen, 2003). Para além disso, este processo parece estar envolvido na baixa fosforilação ds tirosina das proteínas IRS-1 e na baixa actividade do Akt/PKB no músculo esquelético (Hebert *et al.*, 1996; Patti *et al.*, 1999). Por outro lado, a glucotoxicidade pode passar por uma elevação dos níveis de espécies reactivas de oxigénio (ROS), os quais também têm efeitos deletérios sobre a via de sinalização da insulina (Kaneto *et al.*, 2004; Wellen e Hotamisligil, 2005).

¹ A via das hexosaminas envolve a formação de difosfato de uridina-N-acetilglucosamina, que se liga (glicosilação) a resíduos de serina e treonina de diversas proteínas (Yki-Jarvinen, 2003).

(v) *Stress oxidativo*

Actualmente, é reconhecido que a diabetes franca está associada a um estado de *stress* oxidativo acentuado, o qual pode estar envolvido no desenvolvimento ou agravamento da insulinoresistência periférica (Rudich *et al.*, 1999).

Os metabolismos glicídico e lipídico conduzem a um aumento da produção mitocondrial de ROS, elevadas em situações de obesidade e que activam vias inflamatórias, algumas delas discutidas anteriormente nesta secção, contribuindo ou agravando o estado de insulinoresistência (Wellen e Hotamisligil, 2005). Uma das vias metabólicas normalmente associadas ao *stress* oxidativo é a via dos JNK, da família dos MAPK (proteína cinases activados pelo mitogénio) (Wellen e Hotamisligil, 2005); a via dos JNK é também denominada via do proteína cinase activada pelo *stress* (SAPK) (Kaneto *et al.*, 2004). Com efeito, a activação da via das MAPK por ROS tem sido associada à resistência à insulina em células do músculo esquelético, sendo que a prevenção contra a activação desta via (MAPK) induzida por ROS implica a manutenção dos níveis de glutatióno intracelular na forma reduzida (GSH) (Maddux *et al.*, 2001).

Um aspecto importante no contexto do *stress* oxidativo e da presente dissertação é a observação de que os níveis de glutatióno estão diminuídos em indivíduos insulinoresistentes e/ou com diabetes tipo 2 (Ceriello *et al.*, 1997; Ceriello e Motz, 2004; Opara, 2004). Para além de a manutenção do glutatióno na forma reduzida (GSH) parecer ser um mecanismo intracelular central na defesa antioxidante (Rudich *et al.*, 1999), o GSH é também essencial para a síntese da HISS e, conseqüentemente, para a sensibilidade à insulina pós-prandial (Guarino *et al.*, 2003) ¹.

¹ O grupo de Lautt observou também que a indução de *stress* oxidativo no fígado conduz à perda de acção da HISS e conseqüentemente a uma condição de insulinoresistência pós-prandial (Ming *et al.*, 2006).

(vi) Diminuição da acção da HISS

A perda de acção da HISS parece também ser um factor de grande importância no desenvolvimento da insulinoresistência pós-prandial. Em vários modelos animais, observou-se que alterações da via da HISS contribuem sobremaneira para a condição de insulinoresistência, não se podendo excluir que a baixa acção da HISS possa originar os outros factores anteriormente referidos. Os modelos conhecidos de insulinoresistência dependente da inibição da via da HISS são discutidos na secção seguinte.

Na figura 1.9, apresenta-se um esquema-resumo dos principais factores e aspectos relacionados com o desenvolvimento de insulinoresistência discutidos nesta secção.

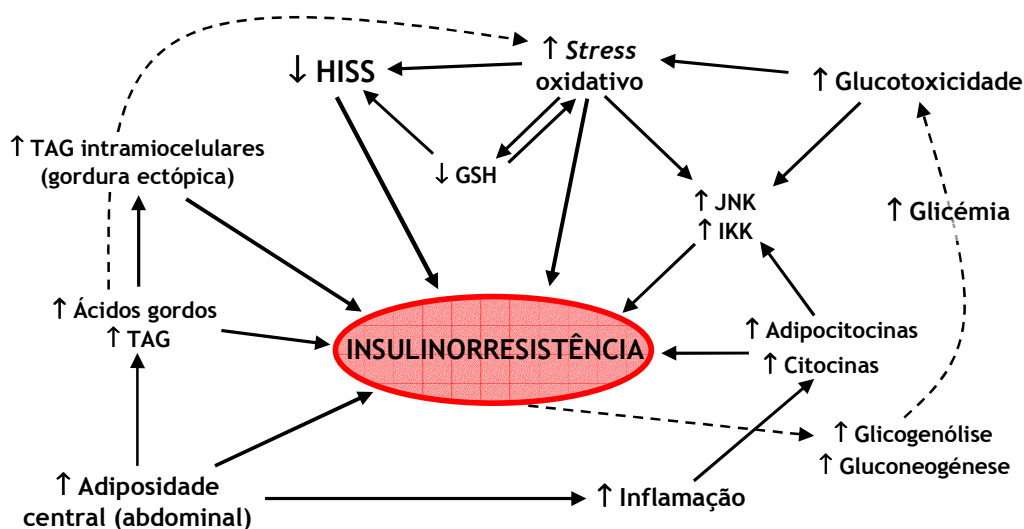


Figura 1.9: Principais factores associados ao desenvolvimento de insulinoresistência. Embora a glucotoxicidade seja mais relevante num estado de diabetes franca (hiperglicémia), foi também incluída. A redução da via da HISS é importante, pois implica uma perda de acção da insulina no músculo esquelético, principal tecido captador de glucose. O aumento da adiposidade é também relevante, uma vez que a insulinoresistência acompanha frequentemente a condição de obesidade. TAG, triacilgliceróis; HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina; GSH, glutatióno reduzido; JNK, via dos cinases N-terminal do c-Jun; IKK, via do inibidor do cinase do NFκB. ↑, aumento; ↓, diminuição.

1.5.2. INSULINORRESISTÊNCIA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO DA VIA DA HISS - MODELOS E ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS CONHECIDOS

Como referido anteriormente, existem vários modelos fisiopatológicos nos quais a perda de acção da HISS é o único ou, pelo menos, o principal factor responsável pela insulinoresistência pós-prandial.

1.5.2.1. Alimentação com dieta rica em sacarose

O rato alimentado com uma dieta rica em sacarose desenvolve insulinoresistência na ausência de obesidade e hipertensão (Pagliassotti *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 2005). Está descrito que uma alimentação com elevado teor de sacarose leva ao desenvolvimento de insulinoresistência no músculo esquelético (Kim *et al.*, 1999; D'Alessandro *et al.*, 2000), sem indução de obesidade visceral ou generalizada (Pagliassotti *et al.*, 1994). Adicionalmente, observou-se que a actividade dos nervos parassimpáticos hepáticos, e concomitantemente da via da HISS, estão também alterados nesses animais, o que parece estar na origem da insulinoresistência pós-prandial observada (Ribeiro *et al.*, 2005). De facto, ratos alimentados com sacarose durante duas semanas apresentam uma sensibilidade à insulina pós-prandial total baixa e semelhante à sensibilidade à insulina obtida após bloqueio da via da HISS, sugerindo que a insulinoresistência nestes animais é inteiramente devida à perda de acção desta via (Ribeiro *et al.*, 2005). Esta afirmação é consubstanciada pelas observações de que o *stress* oxidativo está aumentado e os níveis hepáticos de GSH estão diminuídos em ratos alimentados com dieta rica em frutose ou sacarose (Chaudhary *et al.*, 2007; Oudot *et al.*, 2008), uma vez que, como referido na secção anterior, o *stress* oxidativo parece estar envolvido no processo de insulinoresistência e o GSH hepático é necessário para a síntese da HISS.

1.5.2.2. Envelhecimento

O aparecimento da diabetes tipo 2 em humanos ocorre predominantemente após a idade dos 50 anos (Hales, 1997). Para além disso, a esmagadora maioria dos doentes diabéticos tipo 2 é insulinoresistente (Ferrannini, 1998) e essa insulinoresistência antecede em vários anos o estabelecimento da diabetes franca, sugerindo que o envelhecimento induz alterações na acção da insulina (Basu *et al.*, 2003).

Recentemente, o grupo de Lutt e o nosso observaram que as alterações de sensibilidade à insulina com a idade são mais evidentes no estado pós-prandial e que a perda de acção da via da HISS é o principal factor conducente à insulinoresistência no envelhecimento (Lutt *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008). No estado de jejum, a sensibilidade à insulina não difere entre o rato jovem-adulto e o rato velho, sendo que a elevação da acção da insulina que ocorre normalmente após uma refeição é substancialmente reduzida com a idade (Ribeiro *et al.*, 2008). Apesar de alguns autores sugerirem a existência de diferenças de sensibilidade à insulina entre os dois sexos (Franssila-Kallunki *et al.*, 1992), nestas experiências observou-se que o envelhecimento afecta a sensibilidade à insulina de modo independente do sexo (Ribeiro *et al.*, 2008).

Várias observações convergem para a hipótese de que é a reduzida acção da HISS o principal contribuinte para a insulinoresistência pós-prandial no envelhecimento. Tem sido sugerido que o envelhecimento e muitas patologias a ele associadas resultam da perda gradual de função parassimpática (Lee *et al.*, 2004), tanto no que respeita ao sistema cardiovascular (O'Brien *et al.*, 1986), como gastrointestinal (Phillips e Powley, 2007), entre outros. Estas observações estão de acordo com os resultados do nosso grupo, segundo os quais o efeito da administração de atropina diminuiu significativamente entre a idade jovem-adulta, que no rato corresponde às 8-9 semanas, e a idade avançada (52 semanas no rato) (Ribeiro *et al.*, 2008). A disfunção parassimpática pode estar na origem da inibição da via da HISS.

Por outro lado, o metabolismo do NO , que também é importante para a síntese da HISS, sofre algumas modificações com a idade, sendo que a actividade dos NOS constitutivos (eNOS e nNOS) parece diminuir em relação à actividade do iNOS, o qual é induzido em processos inflamatórios, contribuindo para o aumento do *stress* oxidativo observado no envelhecimento (Patrino *et al.*, 2007). Mais ainda, a capacidade antioxidante decresce com a idade (Rebrin e Sohal, 2004; Lutt *et al.*, 2008), num processo que parece envolver a diminuição dos níveis intracelulares de GSH (Wu *et al.*, 2004 [J Nutr 134:489]), incluindo no fígado (Rebrin *et al.*, 2003; Hyogo e Yamagishi, 2008). De facto, o excesso de radicais livres pode conduzir a insulinoresistência, embora o inverso tenha também sido sugerido (Lutt *et al.*, 2008). De qualquer modo, o aumento de *stress* oxidativo com a idade parece estar associado à diminuição da sensibilidade à insulina, a qual é devida essencialmente ao decréscimo de acção HISS. A diminuta acção da HISS pode, como anteriormente, resultar do próprio *stress* oxidativo, de forma directa ou através da redução dos níveis de GSH hepático (figura 1.9).

1.5.2.3. Hipertensão

Vários estudos têm sugerido que a insulinoresistência está fortemente associada à hipertensão (Modan *et al.*, 1985; Ferrannini *et al.*, 1987). E, de facto, dados epidemiológicos suportam a hipótese de que a hipertensão arterial é muitas vezes acompanhada de alterações no metabolismo glicídico e lipídico (Modan *et al.*, 1985).

Para tentar clarificar a questão da sensibilidade à insulina numa condição de hipertensão essencial, têm-se estudado os mecanismos de acção da insulina dependente e independente da HISS em condições de hipertensão, recorrendo a ratos espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats*, SHR)¹. Observou-se que

¹ Os SHR são frequentemente usados como modelos animais de hipertensão, sem obesidade e partilhando várias características com a hipertensão primária humana (Trippodo e Frohlich, 1981).

a insulinoresistência em SHR é unicamente devida à disfunção da componente de acção da insulina dependente da HISS (Afonso *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2007); surpreendentemente, estes animais apresentam uma componente independente da HISS aumentada relativamente aos controlos normotensos, o que poderá constituir um mecanismo compensatório pela falta de acção da HISS (Ribeiro *et al.*, 2007). As disfunções do eixo parassimpático-^{*}NO presentes neste modelo de hipertensão (Wu e Bohr, 1990; Young *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 1998; Dowell *et al.*, 1999) podem ser responsáveis pela diminuta acção da HISS ¹ (Ribeiro *et al.*, 2007).

Adicionalmente, embora de forma algo especulativa, Lutt tem vindo a sugerir que o principal efeito da acção da HISS no músculo esquelético é o aumento da glucose armazenada sob a forma de glicogénio (Lutt, 2004). Se assim for, a falta de acção da HISS pode explicar a observação efectuada por Swislocki e colaboradores (1997), segundo os quais não ocorre reposição dos níveis de glicogénio do músculo esquelético de SHR após uma refeição (Swislocki *et al.*, 1997). Ou seja, em SHR a concentração de glicogénio muscular é semelhante em jejum e no estado pós-prandial (Swislocki *et al.*, 1997), o que, segundo Lutt, pode dever-se à diminuição da acção da HISS. Os mesmos estudos revelaram ainda que o glicogénio hepático varia com o estado prandial de forma semelhante em SHR e ratos normotensos (Swislocki *et al.*, 1997; Gouveia *et al.*, 2000), indicando que a diferença na sensibilidade à insulina no pós-prandial reside na sua acção no músculo esquelético, órgão-alvo da acção da HISS (Ribeiro *et al.*, 2007).

Uma vez que na vasta maioria dos estudos efectuados por outros investigadores a sensibilidade à insulina foi avaliada em jejum ou o estado prandial não foi controlado (Tsutsu *et al.*, 1989; Buchanan *et al.*, 1992; Frontoni *et al.*, 1992), esses estudos não

¹ A vasoconstrição *per se* não parece estar na origem da insulinoresistência, ao contrário do sugerido por Baron e colaboradores no início da década de 90 (Laakso *et al.*, 1990). Segundo estes, a insulina tem uma função vasodilatadora; a perda desta função implica um menor afluxo sanguíneo e, conseqüentemente, menor aporte de glucose no músculo esquelético (Laakso *et al.*, 1990). No entanto, a administração intravenosa de dadores de ^{*}NO não aumenta a sensibilidade à insulina, apesar do aumento do fluxo sanguíneo (Natali *et al.*, 1998; Pitkanen *et al.*, 1999; Guarino *et al.*, 2003), o que contraria a hipótese proposta por aqueles autores.

contemplam a componente da HISS, que está ausente no estado de jejum. Este dado é importante, pois permite explicar alguma da controvérsia na questão da existência de insulinoresistência em SHR (Mondon e Reaven, 1988; Tsutsu *et al.*, 1989; Hulman *et al.*, 1991; Buchanan *et al.*, 1992; Frontoni *et al.*, 1992), já que apenas a acção da HISS parece estar diminuída nesse modelo de hipertensão (Ribeiro *et al.*, 2007).

Para além da hipertensão ou do envelhecimento, há outras alterações fisiopatológicas reconhecidamente associadas ao desenvolvimento de resistência à insulina, sem que os mecanismos inerentes a essas associações sejam completamente conhecidos. Duas dessas condições são a obesidade e a diabetes *mellitus* tipo 2, patologias fortemente associadas à insulinoresistência e das quais não se conhecia, até à data, qual o estado da acção da insulina dependente da HISS. Nas secções 1.5.3 e 1.5.4 aborda-se a relação da obesidade e da diabetes *mellitus* tipo 2 com a insulinoresistência pós-prandial, à luz dos elementos já descritos.

1.5.3. INSULINORRESISTÊNCIA E OBESIDADE

A obesidade é um excesso de massa gorda corporal (Garruti *et al.*, 2008) e é o factor mais claramente relacionado com a insulinoresistência e diabetes tipo 2. A obesidade parece predispor para a diabetes por induzir a resistência à acção hipoglicemiante da insulina. (Wilding, 2003).

Nesta secção, serão revistos os principais mecanismos e factores responsáveis pela insulinoresistência associada à obesidade, em particular os que possam interferir com a via de acção da HISS.

Métodos de avaliação da obesidade

- quantificação e localização da adiposidade

A obesidade é habitualmente definida em termos de índice de massa corporal (IMC), isto é, a massa (ou peso corporal) dividida pelo quadrado da altura (kg/m^2):

$$\text{IMC } (\text{kg}/\text{m}^2) = \frac{(\text{massa corporal total})}{(\text{altura})^2} \quad (\text{Equação 1.3})$$

Com um IMC acima de $25 \text{ kg}/\text{m}^2$, considera-se que o indivíduo tem excesso de peso, sendo que acima de $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ já é considerado obeso. No entanto, o IMC não reflecte de forma correcta se um eventual excesso de peso se deve à presença de adiposidade excessiva e muito menos a sua localização, pelo que não é o método mais preciso para avaliar a obesidade¹.

A massa gorda corporal (total) também pode ser estimada recorrendo à determinação da densidade corporal (massa/volume), assumindo que a densidade da gordura é $0.9 \text{ kg}/\text{l}$ e a da massa não gorda é $1.1 \text{ kg}/\text{l}$ (Jebb, 1999). A determinação da densidade pode ser efectuada por pesagem do indivíduo dentro de água ou por uma tecnologia de deslocamento de ar (*bod-pod*), descrita por Dempster e Aitkens (Dempster e Aitkens, 1995).

A análise de raios X de energia dual (*energy-dual X-ray absorptiometry*, DEXA) analisa os tecidos moles, distinguindo a massa gorda da massa não gorda em humanos. Este método radiológico é extremamente rigoroso, permitindo detectar pequenas variações de massa gorda, e possibilita já alguma diferenciação na localização da adiposidade. Contudo, o equipamento utilizado para o efeito é específico e bastante dispendioso (Jebb, 1999), o que explica a sua pouca utilização.

¹ Por exemplo, um atleta cuja razão massa gorda/massa muscular seja inferior ao de uma pessoa normal, poderá apresentar um IMC acima do considerado normal; obviamente não é obeso. O IMC é muito utilizado na prática clínica e em estudos epidemiológicos por ser fácil de medir, devendo ser encarado como indicador de possível excesso de peso, que não deve excluir o recurso a outro(s) meio(s) de avaliação complementar.

A massa gorda corporal (total) pode ainda ser medida por bioimpedância ou impedância eléctrica. Esta técnica baseia-se no princípio de que a gordura funciona como um circuito RC (resistência-capacitância), quando submetida a uma corrente de frequência adequada (baixa intensidade), permitindo inferir a impedância corporal, a qual é proporcional ao conteúdo de água corporal - impedância bioeléctrica tetrapolar ¹ (Hoffer *et al.*, 1984). Este método pode ser facilmente utilizado na clínica, pois é de execução relativamente fácil, apresentando uma elevada reprodutibilidade. A impedância bioeléctrica tetrapolar está descrita não só para aplicação em humanos (Hoffer *et al.*, 1984; Lukaski *et al.*, 1986), mas também em animais, nomeadamente ratos (Hall *et al.*, 1989). Este foi o método utilizado para medir a massa gorda corporal no âmbito da presente dissertação; uma descrição mais detalhada desta técnica pode ser consultada na secção 3.12.

As técnicas apresentadas até ao momento não permitem estudar a distribuição da massa gorda corporal; por exemplo, não é possível diferenciar a adiposidade subcutânea da adiposidade visceral e/ou abdominal, o que tem sido descrito como um factor determinante para o desenvolvimento da insulinoresistência. ²

As medições do perímetro da cintura ou da razão dos perímetros cintura/anca permitem obter uma indicação aproximada da distribuição da gordura corporal, em particular na avaliação da adiposidade central (abdominal). Este método é relativamente eficaz quando comparado com técnicas mais avançadas, com as quais a

¹ A bioimpedância mede essencialmente o volume de água corporal, pelo que o estado de hidratação do indivíduo ou animal é importante.

² Embora diversos estudos sugiram que a gordura visceral é mais relevante do que a gordura subcutânea para o estabelecimento dos distúrbios metabólicos observados na insulinoresistência e na diabetes, tal não é consensual, havendo autores que não atribuem uma importância maior a uma dada componente adiposa relativamente a outra (Barzilai *et al.*, 1999; Korach-Andre *et al.*, 2005; Lindmark *et al.*, 2005; Milagro *et al.*, 2006; Pitombo *et al.*, 2006; Bergman *et al.*, 2007).

razão cintura/anca se correlaciona (Lemieux *et al.*, 1996) e, por ser de execução simples, é bastante utilizado na prática clínica, mas é também pouco rigoroso.

Actualmente, as técnicas não invasivas mais precisas para avaliação da distribuição da adiposidade baseiam-se na imagiologia. Com efeito, tanto a tomografia axial computadorizada (TAC), como a ressonância magnética nuclear (RMN), permitem a análise da composição corporal órgão a órgão, tecido a tecido (Jebb, 1999). Porém, os custos destas técnicas são elevados e, tal como a DEXA, os equipamentos podem apresentar sérias limitações para pessoas obesas.

No presente trabalho, realizado em ratos, quantificou-se a massa gorda abdominal de forma directa, isto é, colheram-se e pesaram-se as adiposidades perirenal, peri-entérica e epididimal, no período *post mortem*. Esta técnica é a mais precisa e rigorosa, embora não seja frequente nem facilmente utilizada em humanos *in vivo*. Os procedimentos efectuados são apresentados em detalhe na secção 3.12.

Mecanismos e mediadores de insulinoresistência em condições de obesidade

O agravamento da condição de obesidade é, regra geral, acompanhado por um declínio da sensibilidade à insulina. Inúmeros defeitos na acção da insulina e em particular na sinalização intracelular da insulina têm sido descritos em doentes obesos. Há várias explicações possíveis para esta associação. Algumas destas explicações ou factores foram mencionados na secção 1.5.1, mas os mecanismos que envolvem os factores especificamente relacionados com a obesidade são descritos nesta secção e sumarizados na figura 1.10, da página seguinte.

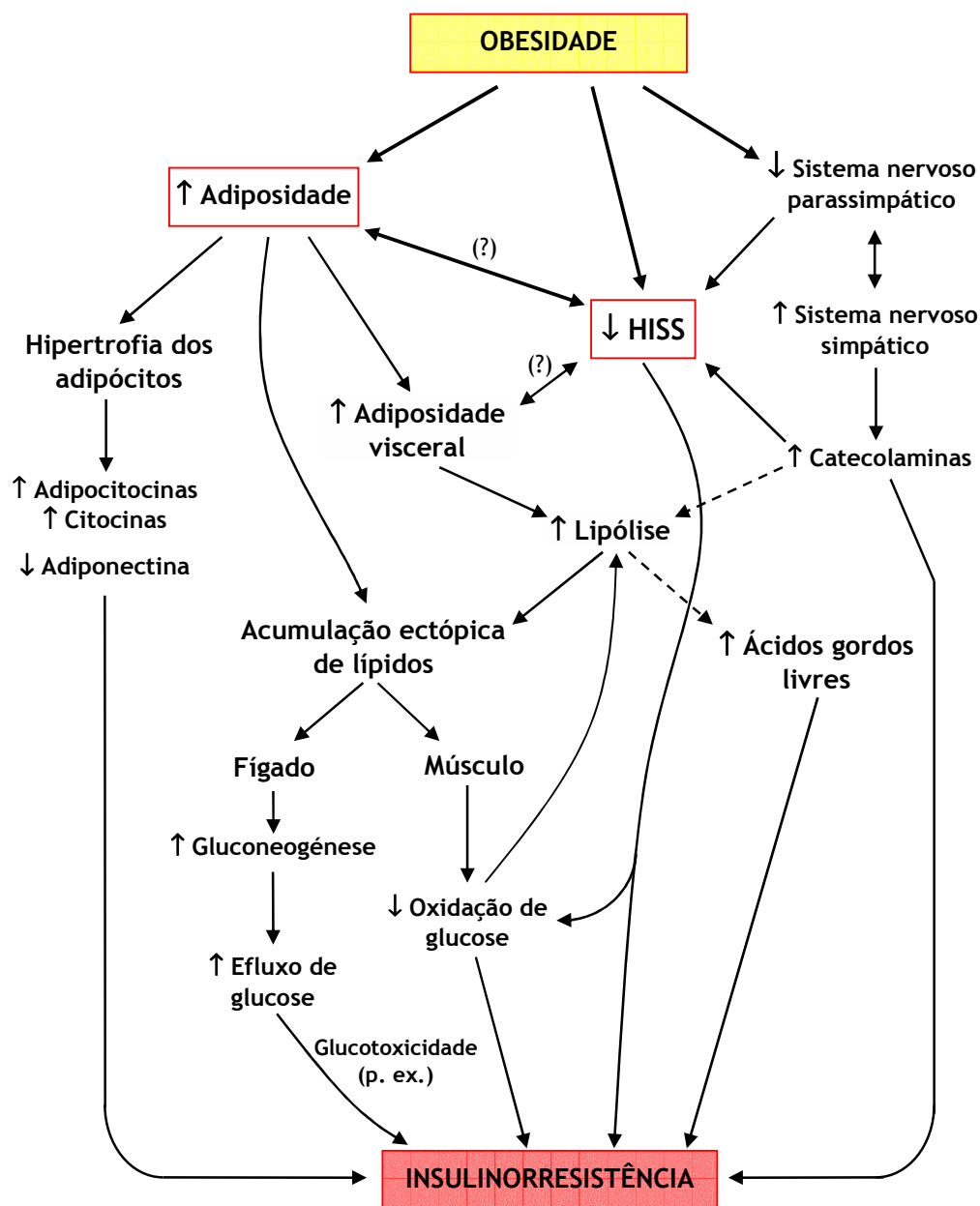


Figura 1.10: Principais mecanismos de associação entre a obesidade e insulinoresistência. Note-se que, apesar das setas apresentadas serem unidireccionais, não se pode excluir que a insulinoresistência também conduza ou agrave a condição de obesidade. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina.

Aumento da lipólise e dos ácidos gordos livres - adiposidade visceral. De acordo com o que está descrito na literatura, um dos principais mecanismos pelos quais o aumento

da massa gorda, em particular da visceral, parece agravar a insulinoresistência é o aumento da lipólise, que resulta numa elevação dos ácidos gordos livres em circulação (figura 1.10). Este aumento de ácidos gordos parece afectar a competição entre a oxidação glicídica e a oxidação de ácidos gordos - ciclo de Randle ou dos ácidos gordos (Wilding, 2003). Assim, na presença de elevados níveis de ácidos gordos livres, o músculo procede principalmente à oxidação daqueles compostos em detrimento da glucose, através da inibição do enzima hexocinase. No entanto, este mecanismo não é consensual, uma vez que a inibição da oxidação da glucose não ocorre ao mesmo tempo que a inibição do aporte de glucose; e a síntese de glicogénio é também reduzida (Kelley *et al.*, 1993; Roden *et al.*, 1996; Boden, 1997). Segundo a teoria portal esses ácidos gordos de origem visceral, drenados para a circulação portal, vão ainda promover a gluconeogénese hepática, o que também reduz a utilização da glucose. O aumento da adiposidade visceral também parece afectar o sistema nervoso autónomo, diminuindo a actividade do parassimpático e podendo inibir desta forma a acção da HISS (secção 1.5.1).

Acumulação ectópica de lípidos. A acumulação ectópica de lípidos, nomeadamente ácidos gordos e triacilgliceróis, em particular no músculo esquelético, parece estar também relacionada com a ocorrência simultânea de insulinoresistência e obesidade. A deposição de gordura no fígado (esteatose) é outra forma de acumulação ectópica de lípidos, também habitualmente observada em indivíduos obesos e que pode levar à insulinoresistência. Estes mecanismos foram abordados na secção 1.5.1 e representados na figura 1.10.

Hipertrofia adipocitária e secreção de factores humorais ou inflamatórios. O aumento de tamanho das células do tecido adiposo parece promover a insulinoresistência, independentemente da massa gorda corporal total ou da sua

distribuição. O mecanismo envolvido parece passar por uma maior secreção de alguns factores inflamatórios e/ou humorais que afectam a sensibilidade à insulina, quer pela sua acção endócrina, parácrina ou autócrina. Neste contexto, os principais produtos da secreção adipocitária são, para além dos ácidos gordos livres, a leptina e a adiponectina, que aumentam a sensibilidade à insulina; e o TNF- α , IL-1, IL-6 e a resistina, os quais induzem ou agravam a condição de insulinoresistência (tabela II, secção 1.5.1).

O TNF- α é expresso em adipócitos, tendo sido o primeiro mediador inflamatório a estabelecer uma ligação molecular entre obesidade, inflamação e insulinoresistência (Wellen e Hotamisligil, 2005) (tabela II), observando-se que murganhos obesos *knock-out* para o TNF- α ou para os seus receptores apresentavam um aumento da sensibilidade à insulina (Uysal *et al.*, 1997). Conclusões semelhantes foram obtidas a partir de experiências em humanos (Tilg e Moschen, 2008).

A IL-1 é também pró-inflamatória e promove insulinoresistência (tabela II). Com efeito, murganhos *knock-out* para a IL-1 α apresentavam glicémias e insulinémias em jejum mais baixas, bem como uma melhoria da sensibilidade à insulina, e a concentração de IL-1 β parece correlacionar-se com o risco de diabetes tipo 2 em humanos (Tilg e Moschen, 2008).

A adiposidade visceral parece ser um dos principais responsáveis pela secreção de IL-6 em humanos, sendo que as concentrações desta decrescem paralelamente à perda de peso e melhoria da sensibilidade à insulina em doentes submetidos a cirurgia bariátrica (Tilg e Moschen, 2008), sugerindo um papel indutor de insulinoresistência para este mediador inflamatório (os mecanismos de acção conhecidos podem ser consultados na tabela II). Em murganhos obesos, a administração de anticorpos anti-IL-6 aumentou a sensibilidade hepática à insulina; embora nesse estudo os autores não tivessem observado alterações no aporte de glucose no músculo esquelético, tais

experiências não são concludentes, pois foram realizadas no estado de jejum, em que a acção da insulina não é máxima, mesmo em condições fisiológicas (Klover *et al.*, 2005).

A leptina foi a primeira hormona descoberta (Ingalls *et al.*, 1950) de um grupo de compostos de origem adipocitária, denominados de adipocitocinas, ao qual também pertencem a adiponectina, resistina, *chemerin* e *apelin*, entre outras ¹. A principal função da leptina parece ser actuar no cérebro e noutros tecidos num processo de retroacção negativa da regulação da homeostase energética. A leptina parece controlar a saciedade via sistema nervoso central, regulando assim o apetite/ingestão de alimentos (Wellen e Hotamisligil, 2005). Paradoxalmente, a obesidade, condição normalmente associada a elevados níveis de leptina circulante, resulta numa resistência do sistema nervoso central à leptina, o que impede a acção da leptina endógena e leva a hiperleptinémia (Tilg e Moschen, 2008). A leptina é uma adipocitocina importante no contexto da homeostase da glucose, uma vez que parece ser capaz de reverter a hiperglicémia em modelos animais de obesidade genética, antes do restabelecimento do seu peso (Tilg e Moschen, 2008). No entanto, o papel da leptina na acção da insulina não é consensual. Por um lado, parece contribuir para o aumento da sensibilidade à insulina no músculo esquelético e no fígado, através da diminuição da acumulação ectópica de lípidos (Kamohara *et al.*, 1997; Minokoshi *et al.*, 2002), sendo que alguns estudos sugerem que a leptina inibe a gluconeogénese hepática, reflexo do aumento da acção da insulina, contribuindo o abaixamento da glicémia (Tilg e Moschen, 2008). Por outro lado, outros autores referem que a leptina interfere com a acção da insulina no fígado e no tecido adiposo (Muller *et al.*, 1997; Wilding, 2003), sendo que também parece activar o sistema nervoso simpático (Haynes *et al.*, 1997), o que também pode

¹ Até à descoberta da leptina, o tecido adiposo era visto como um tecido de armazenamento passivo de excesso energético. Actualmente, é reconhecido como um órgão activo, capaz de comunicar com outros através da libertação de hormonas adipocitárias, como é o caso da leptina.

conduzir a insulinoresistência periférica, nomeadamente por inibição da via da HISS, conforme discutido anteriormente, nas secções 1.3 e 1.4.

A adiponectina, também conhecida por Acrp30 ou AdipoQ, é também sintetizada pelos adipócitos e aumenta a sensibilidade hepática e periférica à insulina (Wilding, 2003; Wellen e Hotamisligil, 2005; Tilg e Moschen, 2008) (tabela II). A sua secreção diminui com o aumento da adiposidade, em particular visceral acentuada, e em estados de insulinoresistência (Tilg e Moschen, 2008).

A resistina é também uma adipocitocina. O seu nome deriva da acção que exerce na sensibilidade à insulina, inibindo-a. Os seus níveis aumentam em condições de obesidade, embora os seus efeitos em humanos estejam ainda em discussão (Tilg e Moschen, 2008).

O envolvimento de alguns destes mediadores no desenvolvimento de insulinoresistência encontra-se representado na figura 1.10.

Modelos animais de obesidade

Uma vez que nas experiências que conduziram a esta dissertação o animal de laboratório utilizado foi o rato, os modelos animais de obesidade utilizados são roedores¹. Não se fará uma descrição exaustiva acerca de todos os modelos existentes, mas apenas uma breve referência aos mais comuns, com particular destaque para os dois modelos utilizados: o rato Zucker obeso (OZR) e o rato alimentado com dieta de elevado teor lipídico (HFD).

Os modelos de obesidade podem ser divididos quanto ao método através do qual essa obesidade é induzida. A tabela III apresenta um sumário desses modelos.

¹ Na tabela V, capítulo 3, apresenta-se uma relação das estirpes e modelos de ratos utilizados nas experiências conducentes à presente dissertação.

Tabela III - Modelos animais (roedores) de obesidade. VMH, hipotálamo ventromediano; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; LH, hipotálamo lateral; NPY, neuropéptido Y. Adaptada de Stock, 1999.

TIPO DE OBESIDADE / CAUSA		DESCRIÇÃO
	Dietas ricas em lípidos	Elevado teor em lípidos; elevada palatibilidade; aumento do consumo (?)
Dietética ou nutricional	Dietas ricas em glícidos (sacarose)	Elevado teor em sacarose (glucose e frutose); elevada palatibilidade; aumento do consumo
	Dieta de cafetaria	Embora seja usada com o mesmo objectivo da dieta lipídica, tem um maior número e diversidade de nutrientes; apresenta uma elevada palatibilidade
Manipulação hipotalâmica	Lesão cirúrgica (VMH, PVN)	Inibição da saciedade por lesões bilaterais do VMH, centro da saciedade
	Lesão química	Administração de glutamato monosódico ou de tiogluose de ouro (por exemplo)
	Estimulação eléctrica (LH)	Estimulação do apetite (LH é o centro da fome)
	Administração de NPY no PVN hipotalâmico	Estimulação do apetite (NPY aumenta o apetite)
Metabólica	Hipoglicémia insulínica	Induz sensação de fome - hiperfagia
Genética	gene <i>ob</i>	Codifica para a leptina
	gene <i>db</i>	Codifica para o receptor da leptina
	gene <i>fa</i>	Codifica para o receptor da leptina
	gene <i>fat</i>	Codifica para o enzima carboxipeptidase E
	gene <i>tub</i>	Codifica para a proteína tubby
	gene <i>agouti</i>	Codifica para a proteína agouti

Um método clássico e muito utilizado desde há décadas na experimentação animal em obesidade (Steinbaum e Miller, 1965), mas também ainda hoje (Caperuto *et al.*, 2008), é o de manipular o hipotálamo, de forma a estimular o apetite e tornar o animal hiperfágico; essa manipulação pode envolver bloqueio do hipotálamo

ventromediano (VMH), responsável pela saciedade, e/ou estimulação do hipotálamo lateral (LH), responsável pelo apetite (tabela III).

A hiperfagia também pode ser conseguida pela indução de hipoglicémia através da administração de insulina (Stock, 1999). Este método é pouco utilizado hoje em dia, não só por ser pouco fisiológico, mas também porque interfere com muitos dos parâmetros dos estudos a desenvolver.

Os métodos mais fisiológicos e mais próximos do que ocorre no desenvolvimento da obesidade humana, são as manipulações dietéticas, sendo que as mais usuais são as “dietas de cafeteria”, soluções de sacarose e dietas ricas em lípidos (tabela III). Algumas destas dietas são muito paláteis, o que pode levar os animais a ingerir maior quantidade, como é o caso da solução de sacarose (Stock, 1999). No entanto, isto não é generalizável, uma vez que o principal efeito da dieta hiperlipídica, por exemplo, parece resultar da composição da dieta em si e não da quantidade ingerida (Pagliassotti *et al.*, 2000). De facto, a administração da dieta rica em lípidos produz os mesmos efeitos, mesmo que o total de conteúdo energético (calórico) ingerido seja mantido (Bailey e Flatt, 2003).

O rato alimentado com uma dieta rica em lípidos (HFD) foi um dos modelos animais de obesidade utilizados neste trabalho. Está descrito que a dieta rica em lípidos aumenta o peso (massa) corporal do animal (Pagliassotti *et al.*, 2000; Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2005), acompanhado por um aumento da deposição de tecido adiposo (Pagliassotti *et al.*, 2000) e uma diminuição da tolerância à glucose (Strackowski *et al.*, 2001), bem como da sensibilidade à insulina (Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2005). Apesar de alguns autores observarem também um ligeiro aumento da glicémia nestes animais, variações da glicémia não são consensuais, pelo que este não é um modelo de diabetes franca (Srinivasan *et al.*, 2005). No capítulo 3 apresenta-se uma descrição detalhada da composição desta dieta

(HFD) e no capítulo 5 discutem-se as suas implicações, tanto em termos de adiposidade, como em termos de insulinoresistência pós-prandial.

Finalmente, um outro tipo de modelo animal de obesidade é o rato geneticamente obeso. Estes animais apresentam uma mutação num dos genes da obesidade: *ob*, *db*, *fa*, *fat*, *tub*, *agouti* (tabela III). O segundo modelo animal de obesidade utilizado no trabalho apresentado nesta dissertação (capítulo 6) foi um modelo de obesidade genética: o rato Zucker (Fatty, *fa/fa*).

O rato Zucker obeso (Fatty, OZR), descrito pela primeira vez por Theodore e Lois Zucker (Zucker, 1965), é portador de uma mutação no gene *fa* (autossómica recessiva), que codifica para o receptor da leptina (Kemmer *et al.*, 1979). A mutação pontual no domínio extracelular do receptor da leptina que o OZR apresenta (Kemmer *et al.*, 1979; Fruhbeck, 1999; Ceddia *et al.*, 2002), leva a uma redução de 90 % na ligação da leptina, o que tem efeitos a nível central, nomeadamente no controlo do balanço energético (Phillips *et al.*, 1996). Conforme discutido anteriormente, a leptina é actua directamente no centro hipotalâmico que controla a sensação de saciedade. Deste modo, a disfunção no receptor da leptina que o OZR apresenta, traduz-se num comportamento hiperfágico, com conseqüente aumento de massa adiposa - obesidade (Pagano *et al.*, 1997). Para além da hiperleptinémia resultante dos defeitos no receptor da leptina, o OZR apresenta uma acumulação ectópica de triacilgliceróis (Unger e Orci, 2000) e alterações do metabolismo glicídico (Terrettaz *et al.*, 1986; Sanderson *et al.*, 1996), resultando em insulinoresistência, acompanhada de hiperinsulinémia (10-20 vezes superior à dos ratos não obesos) (Kemmer *et al.*, 1979), embora a glicémia permaneça normal ou apenas ligeiramente aumentada (Crettaz e Jeanrenaud, 1980; Berthiaume e Zinker, 2002; Wright *et al.*, 2003). O controlo não obeso do OZR é o rato Zucker não obeso (*fa/+*, *lean*, LZR).

1.5.4. INSULINORRESISTÊNCIA E DIABETES TIPO 2

A diabetes tipo 2 resulta de uma combinação de factores genéticos e ambientais (adquiridos), que afectam a sensibilidade à insulina nos vários tecidos, bem como o funcionamento das células β -pancreáticas.

Etiologia da diabetes tipo 2

Diversos estudos têm sugerido que o desenvolvimento da diabetes decorre em cinco fases (Borch-Johnsen *et al.*, 1987; Kahn, 2001; Pratley e Weyer, 2001; Gerich e Smith, 2003), nas quais intervêm factores genéticos e factores ambientais. As cinco fases do desenvolvimento da diabetes tipo 2 estão representadas na figura 1.11. A primeira fase inicia-se no nascimento, quando a homeostase da glucose está normal, mas o indivíduo apresenta já factores, essencialmente genéticos, que o predispõem para o desenvolvimento da diabetes. Durante a segunda fase, a sensibilidade à insulina decresce, resultado da soma dos factores genéticos e dos factores ambientais, como o estilo de vida; nesta fase, a homeostase da glucose é mantida graças à compensação das células β -pancreáticas, que aumentam a sua actividade, produzindo uma hiperinsulinémia compensatória. Na terceira fase, a insulinoresistência agrava-se e as células β entram em declínio, pelo que já não é possível assegurar uma normal tolerância à glucose no estado pós-prandial; nesta fase, apesar da actividade das células β estar já diminuída relativamente às necessidades metabólicas, ainda é suficiente para controlar a glicémia em jejum. É na quarta fase, em que se agravam tanto a disfunção β -pancreática, como a insulinoresistência, que a glicémia em jejum aumenta, devido ao aumento da produção endógena (hepática) de glucose, o que é o resultado directo da perda de acção da insulina no fígado (ver secção 1.5.1). Na quinta e última fase, a glicémia em qualquer dos estados prandiais (jejum ou pós-prandial) atinge níveis

diabéticos - hiperglicémia; note-se que a insulinémia pode ainda estar elevada relativamente aos controlos, mas já não é suficiente para compensar a insulinoresistência (Kashyap e DeFronzo, 2007).

Na figura 1.11 apresenta-se um esquema temporal representativo da evolução da insulinoresistência e disfunção β -pancreática até ao estado de diabetes franca.

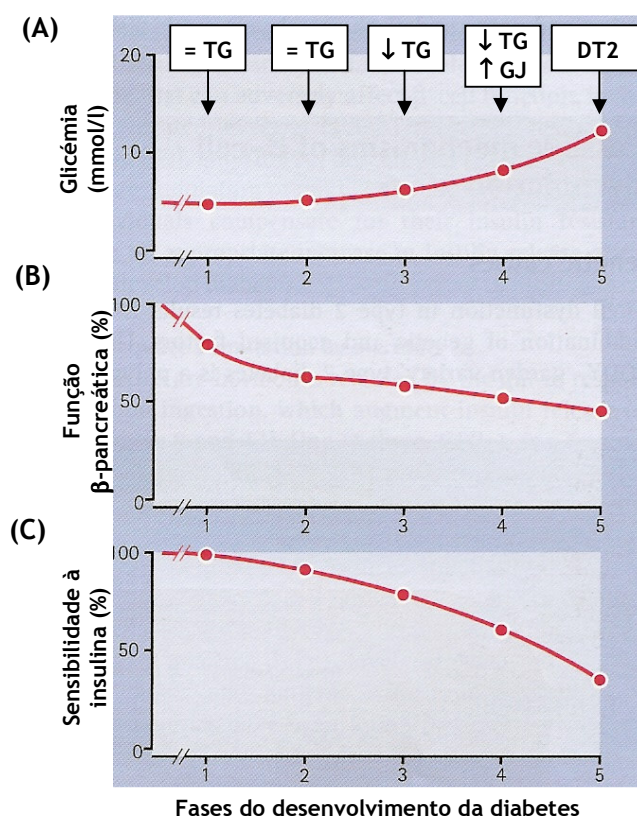


Figura 1.11: Representação das 5 fases do desenvolvimento da diabetes tipo 2. Pode observar-se a evolução de: (A) glicémia; (B) função das células β -pancreáticas; e (C) sensibilidade à insulina. Note-se que o aumento da glicémia em jejum (GJ) é mais acentuado apenas numa fase tardia. TG, tolerância à glucose; GJ, glicémia em jejum; DT2, diabetes (franca) tipo 2. =, níveis normais; \uparrow , aumento; \downarrow , decréscimo. Adaptada de Gerich e Smith, 2003.

Sabe-se agora que o estado inicial de insulinoresistência em que se mantém a normoglicémia (fases 2-3, na figura 1.11) não é facilmente detectável no estado de

jejum, mas apenas no estado pós-prandial, em que é necessária uma maior acção da insulina para manter a homeostase da glucose, para o que contribui a via da HISS (Teff e Townsend, 1999; Lutt, 2007; Caperuto *et al.*, 2008). Assim, no desenvolvimento da diabetes associada a obesidade pré-existente, é consensual que numa fase precoce do desenvolvimento da diabetes, a insulinoresistência induz uma adaptação das células β , que resulta na hipersecreção de insulina, de modo a manter a homeostase da glucose (Karam *et al.*, 1974; DeFronzo, 1988; Reaven, 1995), a qual se mantém em situação de jejum, mas está alterada no estado pós-prandial (Kahn, 2001). Posteriormente, parece haver falência ou exaustão das células β , que deixam de secretar a quantidade de insulina suficiente para a manutenção eficaz da glicémia, resultando então no estado diabético, caracterizado por uma hiperglicémia permanente, independentemente do estado prandial (DeFronzo, 1988; Reaven, 1995).

Anomalias funcionais da célula β -pancreática associadas à diabetes tipo 2

São várias as alterações da célula β -pancreática que parecem ser responsáveis pela diminuição da secreção de insulina e concomitantemente pela hiperglicémia diabética. Uma dessas anomalias é a redução ou completa ausência da primeira fase de secreção de insulina (ver secção 1.2.3) em resposta a glucose intravenosa, bem como uma resposta da célula β mais lenta ou inexistente após a ingestão de uma refeição mista. A segunda fase da libertação de insulina também é afectada. Por outro lado, também estão descritas alterações nos pulsos de secreção de insulina e oscilações nessa secreção.

A diminuição da função de célula β não parece resultar de insensibilidade à glucose, mas sim de uma reduzida capacidade de resposta da célula (Ward *et al.*, 1984). Apesar de haver alguma redução da massa de células β no desenvolvimento da diabetes,

esta não parece ser a principal ou pelo menos única explicação para a incapacidade secretora da célula β (Gerich e Smith, 2003).

Modelos animais de diabetes tipo 2

Há inúmeros modelos animais que apresentam síndromes semelhantes ou associados à diabetes tipo 2. Esses síndromes podem ocorrer de forma espontânea ou induzida.¹

A diabetes pode ser induzida experimentalmente por manipulação química, cirúrgica, dietética e hormonal. Um exemplo destes modelos é o rato tratado com baixas doses das β -toxinas estreptozotocina ou aloxano. Estes fármacos, em doses baixas, induzem perda parcial de células β -pancreáticas, que causam uma insulinodeficiência e hiperglicémia moderadas, características de diabetes tipo 2 (Okamoto *et al.*, 2008). O decréscimo da insulina pancreática pode também ser conseguido por pancreatectomia parcial. Em qualquer dos casos, a perda massa pancreática deve ser cerca de 90 % para induzir hipoinsulinémia, o que se torna experimentalmente difícil de atingir sem causar uma insulinopénia total ou fatal (diabetes tipo 1) (Bailey e Flatt, 2003). Outro procedimento hormonal/farmacológico capaz de induzir diabetes é o da administração de elevadas doses de hormonas contra-reguladoras, como a glucagina ou glucocorticóides; por exemplo, a administração de dexametasona permite induzir insulinorresistência e hiperglicémia (Stojanovska *et al.*, 1990).

Na tabela IV apresentam-se estes e outros modelos animais de diabetes induzida.

¹ Apesar da enorme diversidade, nenhum síndrome animal mimetiza com exactidão a diabetes tipo 2 humana.

Tabela IV - Exemplos de modelos animais (roedores) de diabetes tipo 2. ZDF, Zucker *Fatty* diabético; OLETF, *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty*; peso, massa corporal; =, inalterada; ↑, aumento; ↓, diminuição. Adaptada de Bailey e Flatt, 2003.

Tipo	Modelo	DESCRIÇÃO		
		Peso	Glicémia	Insulinémia
Indução experimental	Baixas doses de streptozotocina ou aloxano	=, ↓ moderada	↑ moderado ou acentuado	↓ moderada
	Pancreatectomia parcial	=, ↓ moderada	↑ moderado ou acentuado	↓ moderada
Espontânea	Rato ZDF	↑ moderado	↑ moderado ou acentuado	↑ moderado
	Murganho obeso (<i>ob</i>)	↑ acentuado ^a	↑ moderado ^a	↑ acentuado ^a ,
	Rato Goto-Kakizaki (GK)	=	↑ moderado	=, ↓ moderada
	Rato OLETF	↑ moderado	↑ moderado ou acentuado	↑ moderado ^b , =, ↓ moderado ^c
	Rato do deserto (<i>Psammomys obesus</i>)	↑ moderado	↑ moderado ou acentuado	↑ moderado, =, ↓ moderado
Murganho diabético (<i>db</i>)	↑ acentuado	↑ acentuado	↑ acentuado ^b , =, ↓ moderado	

^a condição regride com a idade; ^b ocorre durante o início do desenvolvimento do síndrome;

^c alguns animais tornam-se insulino-dependentes no envelhecimento.

Há também diversos modelos animais (roedores) de diabetes tipo 2 espontânea. Alguns deles são apresentados na tabela IV.

Nos trabalhos em que se efectuaram estudos de diabetes e cujos resultados são apresentados no capítulo 7, utilizaram-se ratos Zucker diabéticos obesos (*fatty*, ZDF ou ZDF/Drt fa). O rato ZDF é um modelo espontâneo de síndrome obesidade-diabetes

(Clark *et al.*, 1983), que pode ser criado a partir do cruzamento de ratos portadores da mutação *fa* do receptor da leptina. Este modelo pode apresentar dois perfis de glicémia-insulinémia. Por um lado, o ZDF pode desenvolver uma hiperglicémia moderada, acompanhada de hiperinsulinémia, a qual já não é suficiente para manter a homeostase da glucose; ou, por outro lado, pode apresentar uma hiperglicémia acentuada acompanhada pela queda dos níveis plasmáticos de insulina, sendo que neste caso pode apresentar também uma perda moderada de peso (Friedman *et al.*, 1991; Sliker *et al.*, 1992).

À semelhança do que acontece com a diabetes humana, os mecanismos concretos pelos quais a insulinoresistência conduz a diabetes franca no rato ZDF não são completamente conhecidos. Para isto contribui o desconhecimento de qual o impacto de factores ambientais, nomeadamente nutricionais, no grau de insulinoresistência neste modelo. Estes e outros aspectos relativos à insulinoresistência no rato ZDF serão abordados no capítulo 7 da presente dissertação.

1.6. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA *IN VIVO*

A perda de acção hipoglicemiante da insulina traduz-se numa condição de insulinoresistência cuja persistência poderá conduzir a diabetes. Torna-se assim essencial a utilização de métodos de avaliação da sensibilidade à insulina rigorosos, que permitam detectar tão precocemente quanto possível a perda de acção da insulina e compreender os mecanismos fisiopatológicos associados à insulinoresistência. Nesta secção irão abordar-se algumas das metodologias actualmente disponíveis e mais utilizadas na avaliação da sensibilidade à insulina *in vivo*.

1.6.1. MÉTODOS BASEADOS EM VALORES BASAIS DE GLICÉMIA E INSULINÉMIA

A glicémia no estado de jejum (8-12 h) é o meio de diagnóstico mais comum para a diabetes. Contudo, não permite avaliar a capacidade secretora das células β -pancreáticas nem a sensibilidade à insulina.

A insulinémia em jejum, por seu lado, é muitas vezes utilizada como marcador clínico de insulinoresistência: o Grupo Europeu para o Estudo da Resistência à Insulina considera que valores de insulinémia dentro do último quartil da população são indicativos de insulinoresistência (Grundy *et al.*, 2005).

As determinações de glicémia e a insulinémia podem ainda ser utilizadas para o cálculo de parâmetros de sensibilidade à insulina, que têm por base o estado estacionário (jejum) e que são obtidos por formulações matemáticas, como é o caso do HOMA (*homeostasis model assessment*) e do QUICKI (*quantitative insulin sensitivity check index*), os modelos mais comuns.

HOMA

Este modelo foi originalmente proposto por Mathews e colaboradores em 1985 e a sua formulação é a seguinte:

$$\frac{(G_0 \times I_0)}{22.5} \quad (\text{Equação 1.1}),$$

em que G_0 , é a glicémia em jejum (mmol/l); I_0 , a insulinémia em jejum (mU/l); e 22.5, é uma constante empírica (Matthews *et al.*, 1985). Valores mais elevados de índice HOMA correspondem a uma insulinoresistência mais marcada (Trout *et al.*, 2007).

QUICKI

A fórmula QUICKI foi introduzida por Katz e colaboradores em 2000:

$$\frac{1}{(\log I_0 + \log G_0)} \quad (\text{Equação 1.2}),$$

em que G_0 , é a glicémia em jejum (mg/dl); e I_0 , é a insulinémia em jejum (mU/l) (Katz *et al.*, 2000). Quanto maior for o parâmetro QUICKI, maior é a sensibilidade à insulina (Katz *et al.*, 2000).

As grandes vantagens destes métodos (HOMA e QUICKI) são o baixo custo, fácil aplicação e elevada reprodutibilidade. A maior desvantagem é que apresentam apenas informação dos mecanismos homeostáticos no estado de jejum, o que reflecte maioritariamente os efeitos da insulina na produção de glucose hepática; nenhum dos métodos aborda convenientemente a acção periférica da insulina (Trout *et al.*, 2007), tanto mais que em jejum não ocorre activação da via da HISS (Lautt *et al.*, 2001). Para além disso, como se viu anteriormente, no estado de jejum não é possível detectar variações pequenas na sensibilidade total à insulina, não sendo por isso detectadas através do HOMA nem do QUICKI.

1.6.2. O CLAMP EUGLICÉMICO HIPERINSULINÉMICO (HIEC)

O HIEC foi introduzido por Andres e colaboradores, em 1966 (Andres *et al.*, 1966) e tem sido considerado o teste *gold standard* para avaliação da sensibilidade à insulina em investigação clínica, desde há mais de 2 décadas (Sherwin *et al.*, 1974; DeFronzo *et al.*, 1979).

O HIEC é realizado no estado de jejum (12 h de jejum) (Trout *et al.*, 2007). Trata-se de um teste dinâmico, em que uma perfusão contínua de insulina é acompanhada por uma perfusão de glucose a uma taxa variável, de modo a manter a glicémia próxima do valor considerado normal para a glicémia em jejum, ou de outro valor basal de glicémia, determinado arbitrariamente (DeFronzo *et al.*, 1979; Patarrao *et al.*, 2007). A perfusão de insulina deve ser a uma taxa suficientemente elevada de modo a suprimir a produção hepática de glucose (Trout *et al.*, 2007). Por vezes, administra-se também somatostatina a fim de inibir a secreção de insulina e glucagina (Moore *et al.*, 2002). Uma vez que o HIEC se baseia numa condição de estado estacionário, a perfusão contínua de insulina é mantida durante 2 a 4 h até que a taxa de perfusão de glucose estabilize (Trout *et al.*, 2007).

O parâmetro de avaliação da sensibilidade à insulina determinado pelo HIEC é a razão M/I, isto é, a quantidade de glucose metabolizada por minuto (M) por unidade de concentração de insulina (I); quanto maior for a razão M/I, mais sensível à insulina será o indivíduo (DeFronzo *et al.*, 1979).

O HIEC possui algumas limitações que dificultam a interpretação de resultados. Por exemplo, durante o *clamp* a insulina é administrada de forma contínua, o que não reflecte as variações inerentes à pulsatilidade observada na secreção fisiológica de insulina endógena (Radziuk, 2000; Reid e Lutt, 2004; Grubert *et al.*, 2005) (ver secção 1.2.3). A própria duração da perfusão de insulina é muito prolongada (2-4 h), o que,

para além de ser pouco fisiológico (Radziuk, 2000), induz alterações marcadas no sistema nervoso parassimpático (Van De Borne *et al.*, 1999), o que impede a quantificação da acção da insulina dependente da HISS (Reid *et al.*, 2002) e não permite a realização de múltiplos testes no mesmo indivíduo, no mesmo dia (Paolisso *et al.*, 1988). Esta é uma limitação particularmente relevante para estudos mecanísticos ou farmacológicos, pois impossibilita a realização de experiências emparelhadas ou mais elaboradas.

Outra limitação do HIEC é que é realizado em condições de estado estacionário, o que não reflecte verdadeiramente as condições dinâmicas que se observam após uma refeição (Trout *et al.*, 2007). Com efeito, a acção da insulina é máxima no estado pós-prandial, após activação da via da HISS, mas o HIEC realiza-se no estado de jejum, o que não permite a quantificação da acção máxima da insulina e dificulta o diagnóstico de insulinoresistência se esta se observar apenas no estado pós-prandial, como parece acontecer em primeiro lugar e de forma mais acentuada (ver secção 1.2.5).

1.6.3. O TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)

No ITT, administra-se um bólus intravenoso de insulina (100 mU/kg) e a sensibilidade à insulina é determinada pela taxa de decréscimo da concentração plasmática de glucose (declive, K_{ITT}); declives mais pronunciados indicam maior sensibilidade à insulina (Hirst *et al.*, 1993; Scheen *et al.*, 1994). A dose de insulina normalmente administrada causa a supressão do efluxo hepático de glucose, pelo que a diminuição da glicémia é essencialmente devida à captação de glucose pelos tecidos periféricos (Scheen *et al.*, 1994).

O ITT é simples, rápido, requer pequenas amostras de sangue e é razoavelmente preciso, permitindo separar grupos de indivíduos com sensibilidades à insulina diferentes (Scheen *et al.*, 1994; Reid *et al.*, 2002). Para além disso, pode ser realizado tanto no estado de jejum, como no estado pós-prandial, pelo que pode ser utilizado na avaliação da acção das componentes de acção da insulina dependente e independente da HISS (Reid *et al.*, 2002).

No entanto, a hipoglicémia induzida pela insulina é desagradável e potencialmente perigosa (Scheen *et al.*, 1994), não podendo o teste ser repetido no mesmo indivíduo no mesmo dia (Reid *et al.*, 2002). Por outro lado, a hipoglicémia pode levar à libertação de hormonas contra-reguladoras, atenuando o decréscimo da glicémia e falseando assim o resultado (Scheen *et al.*, 1994).

1.6.4. TESTES DE TOLERÂNCIA À GLUCOSE ORAL (OGTT) E INTRAVENOSA (IVGTT)

A seguir à simples quantificação da glicémia em jejum, o OGTT é o método mais utilizado na clínica para o diagnóstico de diabetes (Trout *et al.*, 2007). A base teórica e prática do ivGTT é muito semelhante à do OGTT.

Ambos os testes são realizados após 8-14 h de jejum (Scheen *et al.*, 1994; Trout *et al.*, 2007).

No OGTT, administra-se uma dose de 75 g de glucose por via oral, seguindo-se a medição dos valores de glicémia durante 3 h (Scheen *et al.*, 1994; Trout *et al.*, 2007). O diagnóstico de diabetes é efectuado quando 2 h após a ingestão da glucose a glicémia permanece acima de 200 mg/dl; se a glicémia está no intervalo [140; 199] mg/dl, o indivíduo considera-se intolerante à glucose (Trout *et al.*, 2007).

O ivGTT convencional consiste na administração de um bólus intravenoso (iv) de glucose (0.3 g/kg), seguido da determinação da glicémia, também durante 3 h (Scheen *et al.*, 1994). Os dados e conclusões obtidas pelo ivGTT são também os mesmos que para o OGTT. Ambos os métodos avaliam a tolerância à glucose.

É importante referir que a tolerância à glucose e a sensibilidade à insulina são conceitos distintos: a tolerância à glucose é determinada apenas pela taxa de diminuição da glicémia, enquanto a sensibilidade à insulina envolve a medição da cinética da glicémia e da insulinémia, neste caso em resposta à ingestão de glucose. Assim, nem o OGTT nem o ivGTT medem, pelo menos de forma directa, a sensibilidade à insulina, uma vez que as medições de glicémia não permitem inferir da dinâmica da acção da insulina (Trout *et al.*, 2007). Com efeito, a glucose administrada em ambos os testes (OGTT e ivGTT) promove a secreção de insulina pelo pâncreas, que, caso esteja diminuída, vai produzir um resultado de intolerância à glucose, não se podendo contudo inferir acerca da acção da insulina. Por outro lado, a existência de hiperinsulinémia acompanhada de tolerância à glucose normal ou diminuída em resposta à ingestão de glucose, indica uma condição de insulinoresistência (Bergman *et al.*, 1985), que não é normalmente detectada por este método.¹

Outras desvantagens do OGTT e do ivGTT é que apresentam uma fraca reprodutibilidade e apenas se podem realizar uma vez por dia, uma vez que requerem um jejum de 8-14 h (Trout *et al.*, 2007). Para além disso, o OGTT depende do esvaziamento do conteúdo gástrico, o que pode ser um problema em indivíduos diabéticos (Trout *et al.*, 2007).

¹ Numa tentativa de adaptar o OGTT para obter parâmetros de avaliação da sensibilidade à insulina, Matsuda e DeFronzo conceberam uma formulação matemática que recorre aos valores de glicémia e insulinémia, em jejum e durante o teste (média) (Matsuda e DeFronzo, 1999). Analogamente, Bergman e colaboradores criaram um método em que se realiza um ivGTT, medindo a glicémia e a insulinémia em vários tempos pós-glucose e aplicando um modelo matemático (modelo minimal) que permite simular a taxa de desaparecimento da glucose e obter um índice de sensibilidade à insulina (Bergman *et al.*, 1979).

1.6.5. TESTE DE TOLERÂNCIA A UMA REFEIÇÃO (*MEAL TOLERANCE TEST*, MTT)

Numa tentativa de estudar a capacidade de regulação da glicémia numa situação mais fisiológica do que o OGTT, alguns autores medem o perfil glicémico em resposta à ingestão de uma refeição mista, composta por glícidos, lípidos e proteínas - MTT.

O procedimento efectuado na realização de um MTT é semelhante ao do OGTT, na medida em que, após um jejum nocturno de 10-12 h, se administra uma refeição mista ¹ (por via oral ou endogástrica) e se mede o perfil glicémico nas 3 h seguintes (Caumo *et al.*, 2000; Berthiaume e Zinker, 2002; Steil *et al.*, 2004); normalmente determina-se também o perfil de insulinémia nesse período (Steil *et al.*, 2004).

Uma vez que é composto por uma mistura equilibrada das várias classes de nutrientes, este método (MTT) constitui um estímulo mais fisiológico para a regulação da homeostase da glucose do que o OGTT, sem perda de sensibilidade (Berthiaume e Zinker, 2002). Para além disso, o MTT parece induzir uma resposta β -pancreática significativamente superior, já que a insulinémia pós-refeição mista (MTT) parece ser superior à insulinémia pós-glucose (OGTT), sendo que o aumento da glicémia no MTT é inferior (Berthiaume e Zinker, 2002; Steil *et al.*, 2004).

O MTT parece ser mais eficaz do que o OGTT na detecção de pequenas diferenças nas respostas glicémicas e insulinémicas ao estímulo alimentar, em particular em condições de insulinoresistência (Berthiaume e Zinker, 2002). Os índices de avaliação da secreção β -pancreática e da sensibilidade à insulina obtidos a partir da análise de modelo minimal aplicada ao MTT parecem ser também melhores do que os obtidos pelo ivGTT (Steil *et al.*, 2004). No entanto, tal como qualquer método que meça a tolerância à glucose, o MTT não avalia a sensibilidade à insulina de forma directa, nem pode ser repetido no mesmo voluntário ou animal no mesmo dia.

¹ A dose e as concentrações dos componentes da refeição mista utilizadas no MTT não se encontram standardizadas.

1.6.6. O TESTE RÁPIDO DE SENSIBILIDADE À INSULINA (RIST)

O RIST foi introduzido por Lutt e colaboradores, em 1996 (Xie *et al.*, 1996) e actualizado em 1998 (Lutt *et al.*, 1998). A criação do RIST surgiu da necessidade de efectuar uma avaliação da sensibilidade à insulina *in vivo* repetidas vezes no mesmo animal ou indivíduo, por exemplo antes e depois de cada manipulação (farmacológica e/ou cirúrgica), o que não era possível com os métodos anteriormente disponíveis (Lutt *et al.*, 1998; Patarrao *et al.*, 2007; Patarrao *et al.*, 2008).

Esta foi a metodologia escolhida para avaliar a sensibilidade à insulina nos trabalhos conducentes à presente dissertação. Uma descrição mais detalhada dos procedimentos do RIST é apresentada no capítulo 3.

Tal como o HIEC, o RIST também é um *clamp* euglicémico, em que a taxa de perfusão de glucose é ajustada de forma a manter a euglicémia, após a administração intravenosa de insulina (50 mU/kg). No entanto, no RIST, a insulina é administrada apenas durante 5 min, o que tem a vantagem de se aproximar mais da libertação dinâmica de insulina pelas células β -pancreáticas (Lutt *et al.*, 1998). Para além disso, esta administração de insulina de curta duração não parece afectar o sistema nervoso parassimpático (Reid *et al.*, 2002), o qual é importante para a acção periférica da insulina, em particular no estado pós-prandial.

O parâmetro de sensibilidade à insulina obtido pelo RIST é a quantidade total de glucose necessária para manter a euglicémia, designado por RIST index. Os resultados obtidos com o RIST são comparáveis aos do ITT (Reid *et al.*, 2002), mas com a vantagem de se poderem realizar vários testes no mesmo animal, em jejum ou no estado pós-prandial, antes e após intervenção farmacológica/cirúrgica. O RIST tem uma curta duração e um impacto mínimo nas condições fisiológicas, uma vez que não induz alterações significativas dos níveis arteriais de glucose, insulina, glucagina ou catecolaminas (Xie e Lutt, 1995a; Xie e Lutt, 1996b), podendo ser repetido com

elevada reprodutibilidade até quatro RISTs consecutivos num mesmo animal (Xie e Lutt, 1995a; Lutt *et al.*, 1998). Recentemente, demonstrou-se que também em humanos é possível executar múltiplos RISTs no mesmo dia e no mesmo indivíduo (Patarrao *et al.*, 2007; Patarrao *et al.*, 2008).

O RIST apresenta ainda uma elevada sensibilidade, permitindo realizar curvas dose-resposta para a insulina (Lutt *et al.*, 1998), o que faz do RIST o método mais vantajoso na determinação de pequenas diferenças na sensibilidade à insulina. Para além disso, a aplicabilidade do RIST não se limita ao estado de jejum, podendo também ser realizado no estado pós-prandial (Lutt *et al.*, 1998; Lutt *et al.*, 2001), quando a acção da insulina é máxima.

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

2. HIPÓTESES E OBJECTIVOS

Os resultados apresentados nesta dissertação centraram-se essencialmente no estudo da via de acção da insulina dependente da HISS. De uma forma geral, procurou-se, por um lado, caracterizar o mecanismo fisiológico de activação da via da HISS que se observa após ingestão de uma refeição; por outro lado, pretendeu-se avaliar como é que a contribuição da via da HISS para a sensibilidade à insulina pós-prandial é afectada em condições fisiopatológicas, como a obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2, normalmente associadas à insulinoresistência.

Deste modo, a hipótese geral testada é a de que a activação da via da HISS ocorre no intestino em resposta à ingestão de certas refeições, sendo esta via responsável pelo incremento de sensibilidade à insulina que ocorre do estado de jejum para o pós-prandial. Adicionalmente, foi nossa hipótese que modificações na síntese ou acção da HISS, respectivamente a nível hepático ou muscular, estão relacionadas com a perda de sensibilidade à insulina pós-prandial, em modelos animais de obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2.

No entanto, as experiências desenvolvidas no âmbito desta dissertação, cujos resultados são apresentados e discutidos nos capítulos 4 a 7, pretendiam esclarecer alguns aspectos específicos do estudo atrás mencionado, os quais a seguir se enunciam.

Especificamente, o primeiro objectivo deste trabalho foi compreender a fisiologia do aumento de sensibilidade à insulina que se observa após uma refeição. Procurou-se comparar a eficácia de diferentes tipos de refeições na potenciação da acção da insulina. Pretendeu-se também avaliar o grau de envolvimento dos nervos parassimpáticos hepáticos e da via da HISS neste mecanismo, uma vez que se sabe que a via da HISS apenas está activa no estado pós-prandial, fase em que é responsável por

50-60 % da acção hipoglicemiante da insulina após uma refeição (Lautt *et al.*, 2001). Por outro lado, alguns autores têm sugerido que os sistemas nervosos central e parassimpático parecem estar envolvidos num reflexo prandial que controla algumas funções do tracto gastrointestinal (Konturek *et al.*, 2004), pelo que se pretendeu também estudar o papel diferencial do estômago e do intestino na activação do mecanismo de incremento da sensibilidade à insulina pós-prandial e a sua dependência da actividade parassimpática.

Deste modo, neste objectivo específico, desenvolvido no capítulo 4, testaram-se as hipóteses de que: (i) a administração intra-gástrica de água ou refeições glicídicas não afectam a acção da insulina, ao contrário de uma refeição líquida mista; (ii) a potenciação da acção da insulina, induzida pela refeição mista, depende da activação dos nervos parassimpáticos hepáticos e da via da HISS; (iii) o mecanismo pós-prandial de incremento da acção da insulina dependente da via da HISS é despoletado no intestino.

O segundo objectivo específico, já em modelos patológicos, foi estudar a forma como a via da HISS é afectada por uma condição de obesidade induzida por factores ambientais, neste caso dietéticos. Uma vez que se sabe que a obesidade está intimamente associada à insulinoresistência e que dietas ricas em lípidos conduzem a um estado de obesidade (Pagliassotti *et al.*, 2000; Korach-Andre *et al.*, 2005), procurou avaliar-se a evolução da sensibilidade à insulina pós-prandial, e em particular da componente de acção da insulina dependente da HISS, em animais alimentados com uma dieta hiperlipídica durante diferentes períodos. Pretendeu-se também estudar a correlação entre a variação da acção da via da HISS e a adiposidade corporal, total e abdominal.

Assim, a realização das experiências cujos resultados são apresentados e discutidos no capítulo 5, teve como objectivo testar as seguintes hipóteses: (i) a obesidade induzida pela dieta rica em lípidos está associada a insulinoresistência pós-

prandial, causada principalmente por um decréscimo da acção da insulina dependente da HISS; e (ii) há uma correlação negativa entre a acumulação de massa adiposa e a acção da via da HISS.

Em terceiro lugar, a realização desta dissertação também teve como objectivo específico a avaliação da sensibilidade à insulina no estado pós-prandial e a caracterização da componente da HISS num modelo de obesidade causada por factores genéticos - o rato Zucker obeso (OZR). As deficiências congénitas do receptor da leptina nestes animais têm sido associadas ao desenvolvimento de obesidade marcada, acompanhada de insulinoresistência (Zucker, 1965; Kemmer *et al.*, 1979), bem como a disfunções do sistema nervoso parassimpático (Teff e Townsend, 1999; Lindmark *et al.*, 2005) e do $^{*}NO$ (Squadrito *et al.*, 1993; Morley e Mattammal, 1996). Uma vez que o eixo parassimpático- $^{*}NO$ é essencial para a acção da insulina dependente da HISS, nestes estudos procurou-se quantificar a via da HISS e avaliar a contribuição dos nervos parassimpáticos e do $^{*}NO$ para a acção da HISS, em ratos jovens-adultos geneticamente obesos (OZR).

Testaram-se as hipóteses de que: (i) a acção da insulina dependente da HISS está diminuída em OZR, o que contribui para a insulinoresistência nestes animais; e (ii) a inibição do parassimpático e do $^{*}NO$ vão afectar a acção da insulina de forma semelhante, sugerindo que as alterações na via da HISS não se devem à disfunção do eixo parassimpático- $^{*}NO$ propriamente dito, mas estão localizadas a jusante da síntese da HISS. Os resultados destas experiências apresentam-se e discutem-se no capítulo 6.

O quarto objectivo específico foi estudar as alterações da acção da insulina dependente da HISS com o envelhecimento, em particular em modelos animais já insulinoresistentes na idade jovem, como o rato Zucker (OZR). Em experiências anteriores, efectuadas em modelos não patológicos, observou-se que a perda de

sensibilidade à insulina pós-prandial com a idade é causada essencialmente pela diminuição da acção da HISS (Lautt *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008). Neste estudo pretendeu-se estudar o impacto do envelhecimento na acção da insulina total e dependente da da HISS num modelo patológico com uma condição de obesidade pré-existente - o OZR, das 9 para as 52 semanas de idade.

Assim, no âmbito destes estudos testaram-se as seguintes hipóteses: (i) em animais não obesos (*lean Zucker rats*, LZR), a acção da insulina pós-prandial diminui com o envelhecimento, principalmente devido à perda de acção da via da HISS; (ii) em animais geneticamente obesos (OZR), a hipótese testada foi a de que a sensibilidade à insulina, já baixa na idade jovem-adulta, não sofre agravamento significativo com o envelhecimento; (iii) a sensibilidade à insulina é sempre menor em animais obesos, independentemente da idade.

Estas hipóteses foram testadas através das experiências cujos resultados também constam do capítulo 6 desta dissertação.

O quinto objectivo específico do trabalho apresentado nesta dissertação foi desenvolvido num modelo animal de obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 - o rato Zucker diabético (ZDF). Na esmagadora maioria dos casos, a diabetes tipo 2 é acompanhada de insulinoresistência, a qual parece preceder a diabetes propriamente dita (Ferrannini, 1998). Sabe-se também que a acção da insulina é mais relevante no estado pós-prandial e que as primeiras alterações à homeostase da glucose são observadas após ingestão de uma refeição (Lautt *et al.*, 2001; Lautt, 2004). Adicionalmente, está descrito que os factores nutricionais podem condicionar a acção da insulina e que, na presença de uma pré-disposição genética, algumas dietas induzem uma condição de insulinoresistência (Unger e Orci, 2000; Kahn, 2003). Assim, por um lado, pretendeu-se avaliar a acção da insulina pós-prandial total e em particular a acção da insulina dependente da HISS em ratos ZDF; por outro lado, procurou-se estudar

como é que a pré-disposição genética para desenvolver insulinoresistência que os ZDF apresentam é afectada por factores nutricionais, isto é, por diferentes dietas.

As hipóteses testadas neste âmbito foram as de que: *(i)* os ratos ZDF apresentam uma insulinoresistência pós-prandial marcada desde muito cedo (9 semanas de idade), independentemente da dieta; *(ii)* a componente dependente da HISS encontra-se inibida de forma significativa nos animais diabéticos (ZDF); e *(iii)* dietas diferentes conduzem a perdas de acção da HISS de diferentes magnitudes, ou seja, a componente genética responsável pela insulinoresistência pós-prandial em ZDF é agravada por factores nutricionais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, descrevem-se os materiais, métodos e procedimentos utilizados na realização das experiências e tratamento dos resultados conducentes a esta dissertação.

3.1. REAGENTES

Parte das experiências apresentadas nesta dissertação foi realizada na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (FCM-UNL), em Lisboa, Portugal; a outra parte das experiências desenvolveu-se na Faculdade de Medicina da Universidade de Manitoba (FM-UM), em Winnipeg, Manitoba, Canadá, pelo que alguns reagentes tiveram proveniências diferentes, consoante a instituição onde se realizaram as experiências.

Nesta secção apresentam-se os reagentes e respectivos fornecedores utilizados nas experiências realizadas na FM-UM, Canadá. A solução de pentobarbital sódico foi fornecido pela Biomeda-MTC Animal Health Inc. (Somnotol[®]), Canadá e o isofluorano inalável (Aerrane), para a cirurgia no modelo crónico, pela Midwest Veterinary Distribution Cooperative Ltd, Canadá. A insulina (*Humulin*[®]) proveio da Eli Lilly & Co, Canadá. A heparina foi obtida através da *Health Sciences Centre Pharmacy*; e o soro fisiológico (NaCl 0.9 %) através do *Health Science Centre Warehouse*, da Universidade de Manitoba, Canadá. A D-glucose, a sacarose e o sulfato de atropina foram fornecidos

pela Sigma Chemical Co., Estados Unidos da América (EUA). A refeição líquida mista (Boost[®]) proveio da Mead Johnson Nutritionals, Canadá; o *Hibitane* (gluconato de clorohexidina 4 % (m/v)) da Ayerst Laboratories, Canadá; o Germex da MTC Pharmaceuticals, Canadá; o etanol a 70 % (v/v) da Fisher Scientific, Canadá; a Betadine (iodopovidona 10 %) da Midwest Veterinary Distribution Cooperative Ltd, Canadá; e o Ketoprofeno da Merial Canada Inc., Canadá. A cola biológica foi adquirida na GluStich Inc., Canadá.

Seguidamente, indicam-se os reagentes e respectivos fornecedores utilizados na FCM-UNL, Portugal. O pentobarbital sódico (Eutasil[®]) foi fornecido pela Sanofi Veterinária. A insulina (*Humulin*[®]) foi obtida a partir da Lilly, Portugal. A heparina e o soro fisiológico (NaCl 0.9 %) provieram da B-Braun, Portugal. A cola biológica (Histoacryl[®]) foi adquirida na B-Braun, Portugal. A D-glucose, sacarose, sulfato de atropina, N-monometil-L-arginina (L-NMMA), 3-hidrocloreto de morfolinosidnonimina (SIN-1), ácido tricloroacético (TCA), N-etilmaleimida (NEM), 2-amina-2-hidroximetilpropano-1,3-diol (TRIS)-HCl, ácido acético, acetato de sódio, metanol, diclorometano, 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB), ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido clorídrico concentrado (HCl), glutathione reduzido (GSH), e glutathione oxidado (GSSG) foram fornecidos pela SIGMA-Aldrich Chemical Co, Portugal.

Todos os reagentes eram do maior grau de pureza existente no mercado. Todas as soluções para administração *in vivo* foram preparadas em solução de NaCl 0.9 %.

3.2. ANIMAIS

Foram utilizadas 4 estirpes de ratos, de diferentes idades e proveniências: Sprague-Dawley, Zucker Fatty obesos (OZR), Zucker diabéticos obesos (ZDF) e Zucker não obesos (lean, LZR), conforme se apresenta na tabela V. Os ratos Sprague-Dawley utilizados nos estudos que requeriam dieta diferenciada chegaram às instalações da FM-UM com 4 semanas de idade (ver secção 3.14.2). Os restantes animais chegaram pelo menos 1 semana antes da sua utilização para aclimação, à excepção dos ratos de 52 semanas de idade, que chegaram às instalações da FCM-UNL com cerca de 8-9 semanas.

Tabela V - Estirpe, idade e proveniência (fornecedor) dos ratos utilizados. A instituição de acolhimento diz respeito ao local onde as experiências foram realizadas.

Estirpe	Idade	Proveniência	Instituição de acolhimento
<i>Sprague-Dawley</i>	9 semanas	Charles River Laboratories, Canadá	Faculdade de Medicina da Universidade de Manitoba, Canadá
Zucker <i>Fatty</i> obesos (fa/fa, OZR)	9 semanas 52 semanas		
Zucker diabéticos obesos (ZDF)	9 semanas	Charles River Laboratories, Espanha	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Zucker não obesos (fa/+, <i>lean</i> , LZR)	9 semanas 52 semanas		

Os animais foram alimentados *ad libitum* com dietas *standard* comerciais: os animais utilizados na FM-UM foram alimentados com ração Prolab RMH 3000 5P00, da Labdiet, EUA, enquanto que os animais testados na FCM-UNL consumiram ração Panlab A04, da Panlab S.L., Espanha; um dos grupos de ratos ZDF, testados na FCM-UNL, foi

alimentado com Purina 5008, Labdiet, EUA. Todos os animais tiveram livre acesso a água e foram acondicionados sob condições controladas de temperatura e humidade ambiente controladas (Sharp e LaRegina, 1998).

Às 9 semanas de idade, a massa corporal (peso) dos ratos Sprague-Dawley era 273 ± 4.7 g (n=105, distribuídos por 15 grupos); os OZR pesavam 342 ± 10.0 g (n=24), os ZDF pesavam 283 ± 3.5 g (n=16) e os controlos LZR pesavam 272 ± 6.4 g (n=22). Os OZR e os LZR de 52 semanas pesavam 606 ± 19.8 g (n=15) e 507 ± 5.1 g (n=19), respectivamente.

Aspectos éticos

Os estudos desenvolvidos na Universidade de Manitoba (FM-UM), Canadá, envolvendo experimentação animal foram efectuados em conformidade com as normas do *Canadian Council on Animal Care (CCAC)*, tendo todos os protocolos experimentais sido aprovados pela Comissão de Ética para o Bem-Estar e Experimentação Animal da FM-UM. Os procedimentos realizados na Universidade Nova de Lisboa (FCM-UNL), Portugal, seguiram as directrizes comunitárias para a manipulação e experimentação animal (Directiva 86/609/EEC), bem como a legislação produzida pelo Estado Português para o efeito (Dec. Lei n.º 1005/92, de 23 de Outubro).

Foram utilizadas duas abordagens ou modelos experimentais: o modelo agudo e o modelo crónico. No modelo agudo, os testes de sensibilidade à insulina foram realizados em animais anestesiados. No modelo crónico esses testes foram realizados em animais conscientes; neste modelo a cirurgia foi realizada 4-7 dias antes dos testes de sensibilidade à insulina e assegurou-se a minimização das condições de *stress* ou dor nos animais, conforme descrito na secção 3.5.2. Todos os procedimentos cirúrgicos ou invasivos foram efectuados em animais anestesiados. No final das experiências, procedeu-se à eutanásia dos animais por administração de uma dose letal de anestésico (pentobarbital sódico).

3.3. PROCEDIMENTOS PRÉ-CIRÚRGICOS E ANESTESIA

Nesta secção, descrevem-se separadamente os procedimentos pré-cirúrgicos e a anestesia utilizados para os dois modelos experimentais usados, agudo e crónico.

3.3.1. PROCEDIMENTOS PRÉ-CIRÚRGICOS E ANESTESIA NO MODELO AGUDO

3.3.1.1. Procedimentos pré-cirúrgicos no modelo agudo

Neste modelo, os protocolos experimentais foram desenvolvidos sob o efeito de anestésico, pelo que a cirurgia foi realizada no dia da experiência.

Desde a sua chegada ao biotério, os ratos foram alimentados *ad libitum* até à véspera da experiência. Nos protocolos em que se pretendia testar a sensibilidade à insulina na ausência total de HISS, os animais foram testados após 24 h de jejum¹. Por outro lado, nos protocolos em que se pretendia uma máxima acção da via da HISS, os animais foram submetidos a 18 h de jejum, seguido de 1 h de livre acesso à comida (das 8 h às 9 h do dia da experiência), para assegurar que se encontravam no estado pós-prandial. Todas as experiências tiveram início entre as 8 h e as 9 h.

3.3.1.2. Anestesia no modelo agudo - indução e manutenção

Após pesagem do animal, procedeu-se à administração do anestésico, com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico na dose de 65 mg/kg.

A manutenção da anestesia durante a experiência foi levada a cabo por perfusão intravenosa (iv) contínua de solução de pentobarbital sódico (2 mg/ml, à taxa de

¹ A acção da insulina dependente da via da HISS está activa apenas no estado pós-prandial: ao fim de 24 h de jejum a acção da HISS é praticamente inexistente (Lautt *et al.*, 2001; Latour e Lautt, 2002b).

perfusão máxima de $5 \text{ ml.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$), utilizando uma bomba de perfusão automática (BBraun, Portugal; ou Kent Scientific Corporation, EUA) e por intermédio de um cateter de polietileno (PE 50 Intramedic[®], Becton Dickinson, EUA), ligado ao circuito arterio-venoso (secção 3.4.1; figura 3.1). A verificação da anestesia no decurso da experiência fez-se por estímulo doloroso na cauda e/ou do teste dos reflexos da pálpebra. Quando necessário, administraram-se suplementos iv de anestésico (pentobarbital sódico, 65 mg/kg) por injeção no lado venoso da manga de silicone do circuito arterio-venoso.

O pentobarbital foi o anestésico escolhido para as experiências no modelo agudo, já que na dose utilizada este anestésico não influencia significativamente a pressão sanguínea, nem a acção de insulina (Latour e Lutt, 2002b). Parecem também não existir diferenças entre animais conscientes e animais anestesiados com pentobarbital, no que diz respeito ao metabolismo glicídico ou às concentrações plasmáticas de glucose, insulina, glucagina e noradrenalina, bem como relativamente às suas acções metabólicas, desde que a temperatura do animal anestesiado seja mantida aproximadamente a 37 °C (Lang *et al.*, 1987; Latour e Lutt, 2002b; Saha *et al.*, 2005). O pentobarbital não afecta significativamente a absorção de nutrientes quando comparado com outros anestésicos (Yuasa *et al.*, 1993), não se observando diferenças nos seus efeitos do estado de jejum para o pós-prandial (Saha *et al.*, 2005).

3.3.2. PROCEDIMENTOS PRÉ-CIRÚRGICOS E ANESTESIA NO MODELO CRÓNICO

3.3.2.1. Procedimentos pré-cirúrgicos no modelo crónico

Os animais foram alimentados *ad libitum* até à véspera da cirurgia, altura em que foram submetidos a um jejum de 18 h, mantendo-se o livre acesso à água. Após a pesagem do animal e indução da anestesia (descrição na secção seguinte), o pêlo do

rato foi cortado na zona das omoplatas (lado dorsal), bem como no pescoço e abdómen (lado ventral). A pele foi lavada com uma solução 4 % (m/v) de gluconato de clorohexidina (*Hibitane*), seguida de etanol a 70 % (v/v) e finalmente Betadine (iodopovidona 10 %), aplicando estas soluções embebidas em gaze esterilizada e em movimentos circulares centrípetos. Para a cirurgia crónica foi necessário esterilizar previamente todos os instrumentos e cânulas, o que foi feito utilizando Germex. Vinte e quatro horas antes da cirurgia, as cânulas foram embebidas na solução de heparina (1000 UI/ml) e aí permaneceram, conservadas no frigorífico, até à altura da cirurgia.

3.3.2.2. Anestesia no modelo crónico

Estes animais foram anestesiados apenas durante a cirurgia, a qual antecedeu em cerca de 4-7 dias os testes de sensibilidade à insulina. O anestésico utilizado foi o isofluorano (1-5 % inspirado). Após a anestesia, foi administrada uma injeção subcutânea de Ketoprofeno (2.5 mg/kg), um analgésico não-esteróide. Durante o recobro da anestesia (após a cirurgia), a temperatura foi mantida e os sinais fisiológicos e comportamentais destes animais foram monitorizados (ver secção 3.5.2).

Em comparação com outros anestésicos inaláveis, o isofluorano tem a vantagem de não ser irritante e da sua eliminação ser feita principalmente (98 %) pelo ar exalado (Lumb e Jones, 1996). Saha e colaboradores observaram que o isofluorano induz um rápido e pronunciado aumento da glicémia, embora tal só se observe quando os ratos estão no estado pós-prandial e enquanto estão sob o efeito da anestesia, não se observando qualquer alteração da glicémia quando a anestesia é induzida em animais jejuados (Saha *et al.*, 2005). De qualquer forma, os protocolos testados foram realizados somente 4-7 dias após a cirurgia, tornando irrelevantes os hipotéticos efeitos do anestésico. A recuperação do animal foi monitorizada diariamente.

3.4. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os procedimentos cirúrgicos foram adaptados dos descritos por Lutt e colaboradores (Lutt *et al.*, 1998; Latour e Lutt, 2002b) e tiveram como objectivo a cateterização vascular para implantação do circuito arterio-venoso extracorporeal, bem como a cateterização gástrica, entérica, intraportal e/ou desnervação do plexo anterior hepático, consoante os grupos de estudo.

Para a realização de todos os procedimentos cirúrgicos, tanto no modelo agudo como no modelo crónico, recorreu-se a óculos de ampliação/cirurgia (Optivisor DA-7, Donegan Optical Company, EUA) ou a microscópios de dissecação (Nikon SMZ-2B), bem como a um sistema de iluminação fria (KL750 SCHOTT), para além do material habitual de micro-cirurgia.

A temperatura corporal foi monitorizada e mantida a $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante todos os procedimentos abaixo descritos por meio de uma sonda rectal ligada a uma unidade homeotérmica de aquecimento (Harvard Apparatus Inc., EUA).

3.4.1. O CIRCUITO ARTERIO-VENOSO EXTRACORPORAL

A figura 3.1 apresenta um esboço do circuito arterio-venoso extracorporeal, que consiste numa anastomose ou *shunt* extra-corporeal através do qual se efectua a circulação sanguínea entre a artéria e a veia cateterizadas. Este circuito, desenvolvido por Lutt e colaboradores (Lutt *et al.*, 1998), permite a rápida recolha de múltiplas amostras de sangue arterial e facilita a administração iv, quer em bólus, quer em perfusão contínua de qualquer fármaco ou solução. O circuito arterio-venoso permite ainda uma monitorização simples e eficaz das pressões arterial e venosa médias (ver

descrição na secção 3.6), podendo detectar-se oclusões mecânicas ou devidas à formação de coágulos, por se reflectirem na pressão arterial ou venosa.

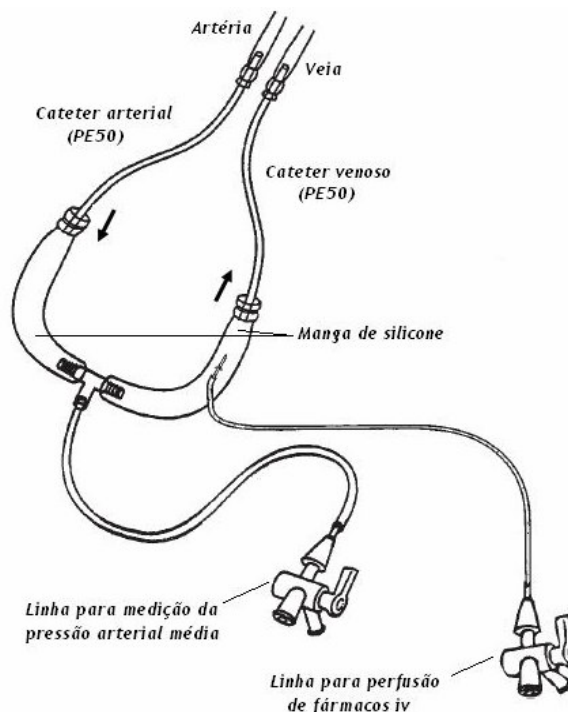


Figura 3.1: Representação do circuito arterio-venoso. Este circuito é uma anastomose ou shunt extracorporeal que liga a artéria à veia cateterizadas, possibilitando a circulação sanguínea por diferença de pressão. Este circuito permite a recolha de amostras de sangue arterial e a administração de fármacos por via intravenosa, bem como a monitorização da pressão sanguínea média, tanto arterial como venosa. Figura adaptada de Lutt *et al.*, 1998.

O circuito arterio-venoso é constituído por um cateter vascular arterial e por um cateter venoso com 6 cm de comprimento cada um, ligados entre si por intermédio de uma manga de silicone (*Master Flex Platinum*[®]) com cerca de 10 cm, permitindo o fluxo de sangue do lado arterial para o lado venoso, o que ocorre por diferença de pressão (figura 3.1). No caso dos animais testados sob anestesia foram utilizadas cânulas de polietileno (PE 50 Intramedic[®], Becton Dickinson, EUA) como cateteres vasculares, enquanto que no modelo crónico a cateterização foi efectuada com recurso a cânulas *Micro-Renathane*[®] (MRE-040 Braintree Scientific, EUA), as quais são mais flexíveis e adequadas para canulação crónica.

A manga de silicone é dividida em duas partes iguais, uma correspondendo ao lado arterial e a outra ao lado venoso. A punção na manga de silicone do lado arterial

permite a colheita rápida e eficaz de amostras de sangue arterial. As duas partes da manga de silicone estão ligadas a um conector de polietileno em forma de T (Raccordo T 4 mm, Kartell Labware Division, Itália), sendo que da terceira abertura desse conector sai um tubo de polietileno (PE 90 Intramedic® Becton Dickinson, EUA) com cerca de 20 cm de comprimento ao qual é posteriormente ligado um transdutor de pressão para registo da pressão arterial média (secção 3.6).

No caso dos animais testados sob anestesia (modelo agudo) e que portanto foram submetidos à cirurgia no dia da experiência, o circuito artério-venoso foi preparado e montado antes do início da experiência, tendo sido previamente lavado e preenchido na totalidade com uma solução de heparina (200 UI/ml em soro fisiológico). Relativamente aos animais testados no estado consciente, a cirurgia (4-7 dias antes) envolveu apenas a cateterização da artéria e da veia, sendo que a montagem do circuito arterio-venoso foi completada no dia da experiência, por ligação dos cateteres vasculares à manga de silicone. As cânulas MRE-040 utilizadas para a cateterização crónica foram embebidas de véspera em heparina 1000 UI/ml.

3.4.2. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS NO MODELO AGUDO

3.4.2.1. Traqueotomia

Realizou-se uma traqueotomia baixa de forma a permitir a respiração espontânea do animal anestesiado durante o decurso da experiência. Assim, efectuou-se uma incisão na parede anterior da traqueia, abaixo do istmo da glândula tiroideia (figura 3.2) e introduziu-se uma cânula de polietileno (PE 240 Intramedic®, Becton Dickinson, EUA) com 2-2.5 cm de comprimento.

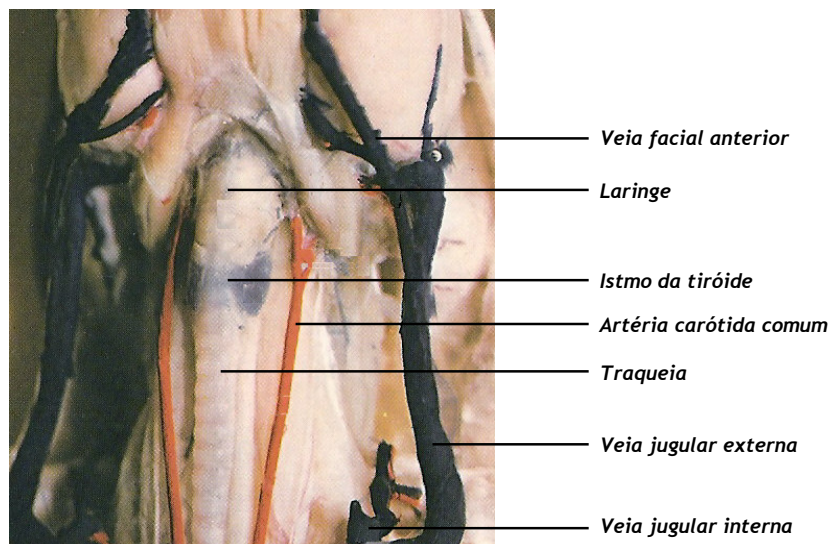


Figura 3.2: Traqueia e alguns dos principais vasos sanguíneos do pescoço. Pode observar-se abaixo do istmo da tiróide, o local da traqueotomia. A artéria carótida comum e a veia jugular interna (ao lado da traqueia) foram cateterizadas para implantação do circuito arterio-venoso nalguns modelos (adaptado de (Olds e Olds, 1991).

3.4.2.2. Cateterização vascular para inserção do circuito arterio-venoso no modelo agudo

O circuito arterio-venoso serve, como já foi referido, de ligação extra-corporal entre a artéria e a veia cateterizadas.

Anteriormente, haviam já sido testadas cateterizações de diferentes pares de artérias e veias, não se tendo observado respostas qualitativamente diferentes, deixando assim ao experimentador a liberdade de escolha dos vasos a cateterizar para implantação do circuito arterio-venoso (Lautt *et al.*, 1998). Nas experiências desenvolvidas no modelo agudo recorreu-se a duas combinações de artérias e veias para inserção do circuito arterio-venoso, de acordo com o previamente descrito e com o protocolo ou modelo experimental em causa.

Artéria femoral e veia femoral

Após uma pequena incisão vertical ao nível da virilha esquerda do rato, isolaram-se a artéria femoral e a veia femoral esquerdas (figura 3.3). Depois de isoladas, primeiro a artéria e depois a veia foram cateterizadas por inserção das cânulas de polietileno PE 50, ligadas ao circuito arterio-venoso, previamente montado como acima descrito. Os cateteres foram mantidos na posição adequada relativamente aos vasos utilizando fio de algodão, o qual serviu também para encerrar a artéria a jusante e a veia a montante do local da canulação. Esta cirurgia foi realizada no modelo agudo, cujos resultados são descritos nos capítulos 4 e 5.

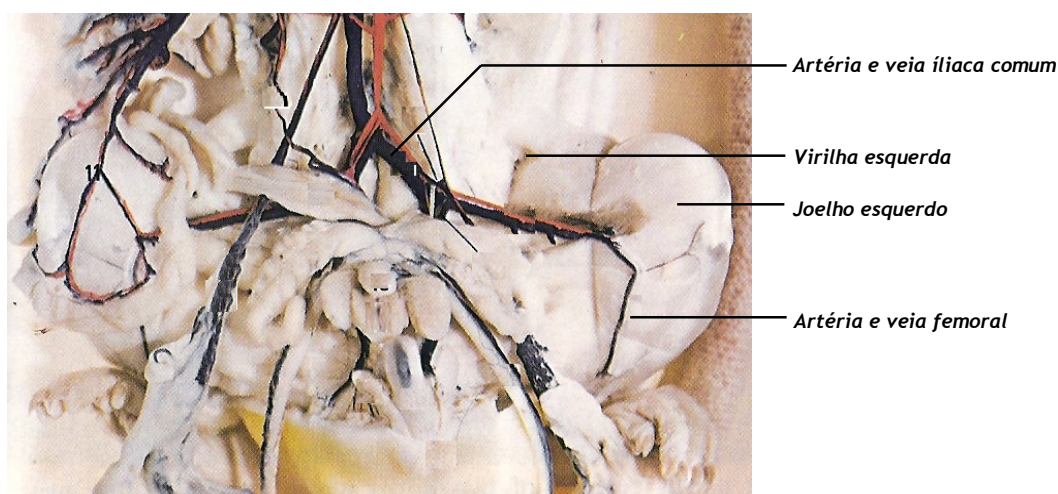


Figura 3.3: Localização da artéria e veia femoral esquerdas. A artéria e a veia femoral irrigam o tecido muscular da coxa e são cateterizadas abaixo da virilha do animal (adaptado de Olds e Olds, 1991).

Artéria femoral e veia jugular interna (modelo agudo)

Para as experiências cujos resultados são apresentados nos capítulos 6 e 7, implantou-se o circuito entre a artéria femoral (figura 3.3) e a veia jugular interna (figura 3.2) esquerdas. Primeiramente, cateterizou-se a artéria femoral conforme descrito no parágrafo anterior. Para cateterização da veia jugular interna, fez-se uma

incisão no pescoço do rato (lado ventral) e isolou-se a veia. Em seguida, cateterizou-se a veia recorrendo também a uma cânula de polietileno PE 50, a qual foi fixa e ligada ao circuito arterio-venoso, como descrito anteriormente. Embora o tamanho do circuito arteriovenoso fosse idêntico ao do circuito aplicado entre a artéria e veia femorais, neste caso o circuito foi posicionado paralelamente ao corpo do animal.

3.4.2.3. Cateterização da veia porta

A veia porta, representada na figura 3.4, foi cateterizada apenas no modelo agudo, com o objectivo de administrar fármacos directamente na circulação portal e eficazmente atingir o fígado.

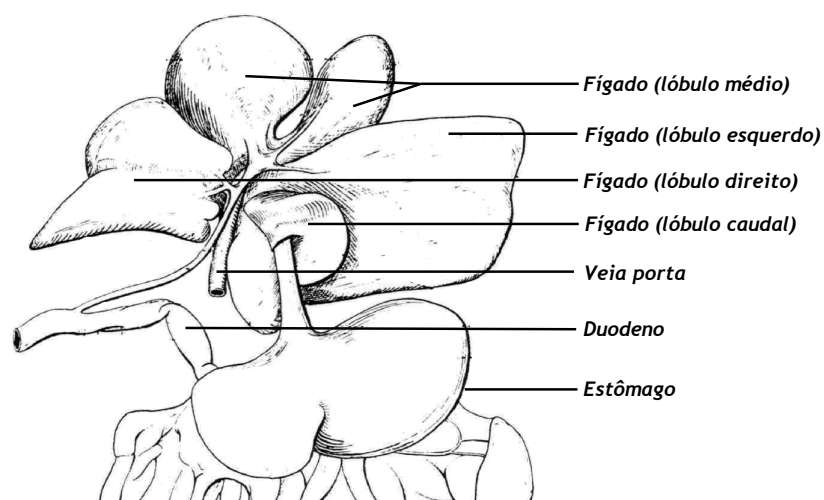


Figura 3.4: Esquema de localização relativa da veia porta, fígado e estruturas adjacentes. A cateterização da veia porta permite a administração de fármacos directamente no fígado. Figura adaptada de (Greene, 1963).

Após realização de uma laparotomia mediana, isolou-se e expôs-se a veia porta, representada na figura 3.4. Em seguida, efectuou-se a punção da veia porta, entre as veias esplénica e cecal, para inserção de um cateter intravenoso de poliuretano (24G

Abbocath Optiva iv, 19 mm, Johnson & Johnson, Itália). O cateter foi fixo com cola biológica e ligado a um tubo de polietileno (PE 50 Intramedic[®], Becton Dickinson, EUA), através do qual se procedeu à infusão intraportal (ipv) de fármacos. A incisão abdominal foi coberta com gaze e parafilm (Pechiney Plastic Packaging, EUA).

3.4.2.4. Cateterização gástrica e entérica no modelo agudo

A cateterização do estômago ou do duodeno (figura 3.5) foi realizada nos animais em que era necessário administrar uma refeição líquida por via intragástrica (ig) ou intra-entérica, respectivamente. A cateterização entérica foi realizada apenas no modelo agudo. Nos animais em que se realizou cateterização gástrica não se realizou cateterização entérica e vice-versa.

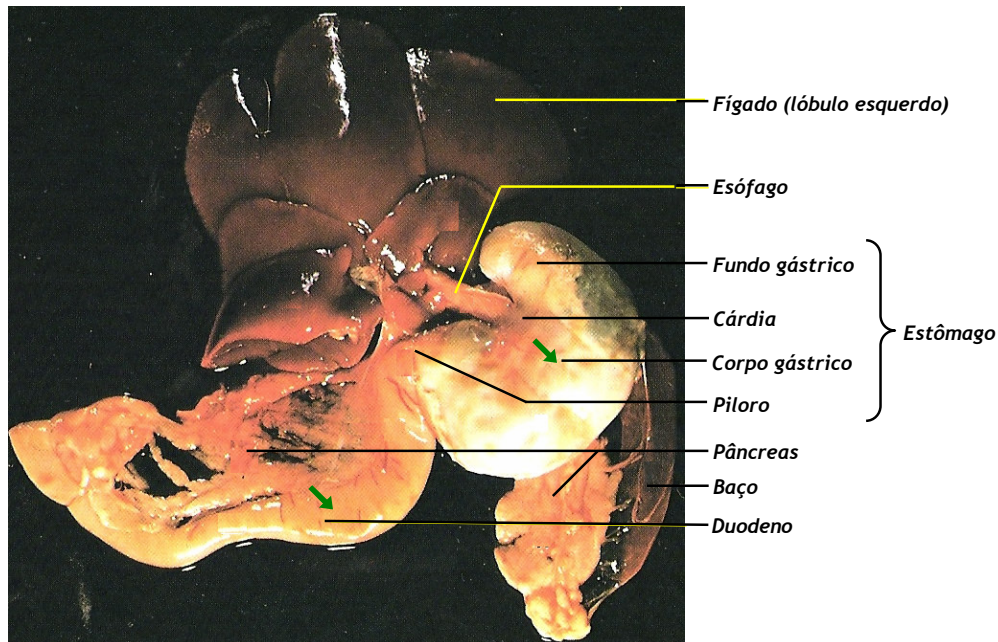


Figura 3.5: Estômago, duodeno, fígado, pâncreas e órgãos adjacentes do rato. Destacam-se o corpo gástrico e o duodeno, onde se procede à inserção dos cateteres gástrico e entérico, respectivamente, como indicado pelas setas a verde. Figura adaptada de Olds e Olds, 1991.

Para a cateterização gástrica realizou-se uma laparotomia e isolou-se e expôs-se o estômago para punção e inserção de um cateter. O cateter (cateter iv 22G BD Angiocath, Canadá) foi introduzido no centro do corpo gástrico, abaixo da linha determinada pelo fundo e pela cárdia (figura 3.5). O posicionamento do cateter foi efectuado de forma a evitar o refluxo aquando da administração da refeição líquida e a obstrução do cateter, causada por eventual posicionamento contra as paredes do estômago. O cateter foi fixo com cola biológica e recolocou-se o estômago de volta à sua posição anatómica original.

A cateterização entérica (do duodeno) efectuou-se de forma semelhante à cateterização gástrica. Assim, após a laparotomia, isolou-se o estômago e a porção inicial do duodeno (figura 3.5). Em seguida, efectuou-se a punção e inserção do cateter (22G BD Angiocath iv, Canadá) no duodeno, a cerca de 2-3 cm do piloro. O cateter foi posicionado e fixo (cola biológica) de modo a que o fluxo de refeição líquida administrada se fizesse para o intestino. Após a cateterização, o estômago e intestino foram colocados na sua posição original.

Para verificação de que a cateterização do estômago ou duodeno havia sido eficiente, administrou-se um pequeno volume de água por esta via. Adicionalmente, quando o protocolo experimental assim o requeria, foi colocada uma banda duodenal, posicionada aproximadamente 1 cm a jusante do piloro, a fim de impedir a passagem do conteúdo gástrico para o duodeno e vice-versa.

3.4.2.5. Desnervação do plexo anterior hepático

Este procedimento foi efectuado apenas num grupo de animais do modelo agudo, após a implantação do circuito arterio-venoso extracorporeal, de acordo com o descrito anteriormente por Xie e Lutt (Xie e Lutt, 1996a) e teve como objectivo a inibição da síntese e/ou libertação da HISS, uma vez que está descrito que a interrupção cirúrgica

dos nervos parassimpáticos hepáticos do plexo anterior induz insulinoresistência por inibição da via da HISS (Xie e Lutt, 1996a).

Assim, após a laparotomia, isolou-se o feixe de nervos e o tecido conjuntivo que se encontravam em torno da artéria hepática comum. Em seguida, fazendo passar dois fios em torno das estruturas isoladas, deram-se dois nós separados por alguns milímetros e entre os quais se procedeu à secção do feixe de nervos e tecido conjuntivo. Finalmente, pincelou-se a artéria hepática comum com uma solução de fenol 95 %, com o intuito de destruir quaisquer fibras nervosas remanescentes.

3.4.3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS NO MODELO CRÓNICO

3.4.3.1. Cateterização vascular para inserção do circuito arterio-venoso no modelo crónico

Nos protocolos em que se recorreu a animais do modelo crónico, isto é, a serem testados no estado consciente (capítulo 4), o procedimento cirúrgico (efectuado sob anestesia) envolveu a cateterização da artéria carótida comum e da veia jugular interna esquerdas (figura 3.2), para posterior implantação do circuito arterio-venoso extracorporal (figura 3.1), no dia da experiência.

Fez-se uma incisão no pescoço do rato (lado ventral) e isolaram-se a artéria carótida comum e a veia jugular interna esquerdas. Em seguida, cateterizaram-se ambos os vasos, utilizando cânulas *Micro-Renathane*[®] (MRE-040 Braintree Scientific, EUA), adequadas para cateterização crónica. Os cateteres foram depois fixos por aplicação de uma gota de cola biológica e sutura, utilizando fio de seda cirúrgico (3-0 Dexon II, Tyco Healthcare Group LP, EUA). Para que os animais não removessessem ou danificassem os cateteres durante a sua recuperação pós-cirúrgica, efectuou-se uma

tunelização subcutânea dos mesmos para a zona dorsal, entre as omoplatas, onde os cateteres foram exteriorizados. Os cateteres foram preenchidos com uma solução 200 UI/ml de heparina e selados. No final, todas as incisões foram suturadas e a área suturada foi limpa com uma gaze esterilizada embebida em etanol 70 %.

3.4.3.2. Cateterização gástrica no modelo crónico

Após a laparotomia, procedeu-se à tunelização subcutânea do cateter gástrico (cânula de polietileno PE 100, Becton Dickinson, EUA), o qual foi exteriorizado no dorso do animal (entre as omoplatas). Posteriormente, isolou-se o estômago e fez-se uma punção no corpo gástrico para inserção do cateter (figura 3.5). A cateterização foi terminada com uma técnica de sutura oclusiva em bolsa, realizando uma sutura contínua circular em torno do cateter para o fixar à parede externa do estômago. Em seguida, adicionou-se uma gota de cola biológica para assegurar que o local de inserção do cateter ficava selado. A cânula gástrica foi então preenchida com água esterilizada. No final, todas as incisões, ventrais e dorsais, foram suturadas e a área suturada foi limpa com gaze esterilizada embebida em etanol 70 %.

3.5. PROCEDIMENTOS PÓS-CIRÚRGICOS

3.5.1. PROCEDIMENTOS PÓS-CIRÚRGICOS NO MODELO AGUDO

Imediatamente após inserção do circuito arterio-venoso, por punção na manga de silicone do circuito, iniciou-se a perfusão intravenosa contínua de anestésico, conforme descrito anteriormente. Nesta fase, a administração de um volume residual de soro fisiológico (0.02-0.03 ml) pode ser útil para confirmar que o sangue flui sem problemas através do circuito. Seguidamente, ligou-se o transdutor e registador de pressão sanguínea para iniciar a monitorização da pressão sanguínea (secção 3.6).

Depois da cirurgia e antes da realização de qualquer outro procedimento, foi permitido ao animal um período de estabilização não inferior a 30 min.

A temperatura corporal foi mantida a $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante a cirurgia e toda a experiência, por meio de uma sonda rectal ligada a uma unidade homeotérmica de aquecimento (Harvard Apparatus Inc., EUA).

3.5.2. PROCEDIMENTOS PÓS-CIRÚRGICOS NO MODELO CRÓNICO

No final da cirurgia, o animal foi envolvido numa toalha, colocado sobre uma manta de aquecimento e mantido sob vigilância durante o período de recobro. Após o recobro, o animal teve livre acesso a água (sem comida) e, durante 6 h, o seu estado foi monitorizado a cada 1.5 h. Durante a primeira noite após a cirurgia, manteve-se a manta de aquecimento sob a gaiola do animal e concedeu-se acesso à comida.

No dia seguinte, administrou-se Ketoprofeno (2.5 mg/kg, injeção subcutânea) e verificou-se o estado geral do animal. A monitorização do estado geral do animal consistiu na observação do animal relativamente aos seguintes parâmetros: (i) cor do

pêlo, orelhas, patas e cauda, a qual deve ser rosada; (ii) tipo de respiração; (iii) aspecto e quantidade de fezes e urina; (iv) actividade motora e qualidade da mesma; (v) observação dos locais de incisão, para verificar se houve ruptura da sutura, ou a existência de abscessos ou hemorragias. Esta monitorização visa ainda detectar sinais de dor e/ou desconforto no animal, tais como agressividade, vocalização anormal, morder ou arranhar a área dolorosa, acumulação de porfirina em torno dos olhos, desidratação e perda de apetite, originando perda de peso. Nos casos em que ocorreu alteração dos parâmetros supramencionados, os animais foram excluídos do estudo.

Até ao dia da realização dos testes de sensibilidade à insulina decorreram 4-7 dias. Durante este período de recuperação e a partir do segundo dia pós-cirúrgico, a monitorização do animal consistiu na sua pesagem e lavagem dos cateteres (vasculares e gástrico) uma vez por dia, bem como na verificação do estado geral 2-3 vezes por dia. A lavagem dos cateteres foi realizada diariamente para assegurar que as linhas se mantinham viáveis até ao dia da experiência e que não ocluía pela formação de coágulos e/ou abscessos. Assim, após imobilização do animal, removeu-se a rolha metálica que selava os cateteres vasculares para verificar que havia passagem de sangue pelos mesmos e administrou-se o volume de heparina 200 UI/ml necessário para preencher os cateteres. O cateter gástrico foi lavado com água. No final, os cateteres foram selados novamente e o procedimento repetido nos dias seguintes.

Antes de realizar qualquer protocolo experimental nestes animais, assegurou-se que a sua alimentação e peso haviam recuperado.

Na véspera do dia da experiência, os animais foram submetidos a 24 h de jejum. No dia da experiência, após pesagem do animal, completou-se a montagem do circuito arterio-venoso extracorporal, o qual foi ligado ao transdutor/registador de pressões. O animal permaneceu na gaiola, consciente e com liberdade de movimentos, mantendo-se o livre acesso a água durante toda a experiência, a qual se realizou numa sala específica para o efeito, minimizando as perturbações.

3.6. DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO SANGUÍNEA

A medição da pressão sanguínea fez-se da mesma forma para o modelo agudo e para o modelo crónico.

Após a montagem do circuito arterio-venoso extracorporal, ligou-se o tubo de polietileno (PE 90) derivado do T que une as mangas de silicone e que é destinado à monitorização de pressões, a um transdutor de pressões (ML750, ADInstruments, EUA), previamente calibrado com um esfingomanómetro de mercúrio. O registo das pressões foi efectuado a intervalos de tempo de 2 s, através de uma unidade PowerLab/8s (ADInstruments, EUA), acoplada a um computador por intermédio de um programa de *software* Chart (ADInstruments, EUA) ou Lab View Software (National Instruments, EUA).

A pressão medida pelo transdutor e registada pela unidade PowerLab é a pressão sistólica média. A medição da pressão arterial média foi feita através da leitura da pressão indicada durante uma breve oclusão da manga de silicone do lado venoso do circuito. A medição da pressão venosa média foi feita por oclusão do lado arterial do circuito. Em caso de obstrução do circuito, por exemplo por formação de um coágulo, observar-se-ia uma variação acentuada da pressão sistólica média: a subida da pressão média poderá indicar obstrução à saída do circuito (lado venoso), enquanto que a diminuição da pressão média poderá indicar obstrução no lado contrário (lado arterial).

3.7. ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS E SOLUÇÕES

Nas experiências descritas ao longo desta dissertação, administraram-se diferentes soluções, por diferentes vias e de diversas formas.

A utilização de diferentes vias de administração de uma dada solução, bem como a sua forma de administração, prende-se com o objectivo do estudo e com o(s) órgão(s)-alvo para essa solução, mas também com as características da solução em si, nomeadamente no que diz respeito à sua solubilidade e/ou período de semi-vida.

Assim, as vias de administração utilizadas foram: via intraperitoneal; via subcutânea; intravenosa (iv), para a circulação sistémica; intraportal (ipv), para a circulação hepática portal; intragástrica (ig); e via intra-entérica (duodeno).

Por via intraperitoneal, efectuou-se apenas a administração da solução de pentobarbital sódico para indução da anestesia, em bólus.

A via subcutânea (região dorsal, entre as omoplatas) foi utilizada para administração de analgésico (Ketoprofeno, em bólus) nos animais submetidos à cirurgia crónica.

Por via iv realizou-se a administração de insulina, glucose, atropina e pentobarbital, por perfusão através do circuito arterio-venoso (lado venoso). A insulina, e atropina foram administradas a um débito de 6 ml/h; a perfusão de glucose efectuou-se a uma taxa variável e a de anestésico foi ajustada ao peso do animal, sendo a taxa de perfusão nunca superior a $5 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$.

As administrações ipv tiveram como objectivo a administração de fármacos para actuação directa no fígado e foi sempre feita a um débito não superior a 1 ml/h. Foram administrados por via ipv o L-NMMA e SIN-1.

Administraram-se por via ig os vários tipos de soluções-refeições líquidas. Este tipo de administração foi efectuado por perfusão contínua com um débito de 60 ml/h, nas doses de 10 ml/kg e/ou 20 ml/kg, esta última apenas em animais anestesiados.

A via intra-entérica foi utilizada para administrar uma solução-refeição líquida directamente no duodeno, efectuando-se também por perfusão contínua, a um débito de 60 ml/h, numa dose máxima de 10 ml/kg.

Em todas as administrações efectuadas por perfusão contínua recorreu-se a bombas de perfusão automática (BBraun, Portugal, na FCM-UNL; ou Kent Scientific Corporation, EUA, na FM-UM). Os débitos ou taxas de perfusão utilizados em cada caso foram escolhidos com base em trabalhos anteriores, bem como em testes preliminares efectuados com soro fisiológico, não tendo sido observadas alterações metabólicas ou hemodinâmicas resultantes dos débitos de perfusão utilizados. A duração da perfusão iv de fármacos nos animais anestesiados foi de cerca de 3-4.5 h, desde o início da perfusão de anestésico até ao fim da experiência. Schafer e colaboradores (observações não publicadas) compararam o hematócrito no início e no final de experiências de ~5 h, durante as quais se realizaram pelo menos 2 testes de sensibilidade à insulina (RISTs) e se efectuou a perfusão contínua de fluídos conforme descrito anteriormente, tendo sido observado que o hematócrito permanece dentro dos limites fisiológicos normais, decrescendo apenas cerca 2.3 % relativamente ao registado no início da experiência (47.4 ± 0.4 %).

3.8. QUANTIFICAÇÃO DA GLICÉMIA

A quantificação da glicémia arterial foi realizada com base no método enzimático do glucose oxidase, recorrendo a um analisador de glucose (YSI Glucose Analyzer 1500 Sidekick, Yellow Springs Instrument Inc, EUA). Este método proporciona uma quantificação rápida e eficaz da glicémia arterial.

Colheita de amostras de sangue arterial

As amostras de sangue arterial foram obtidas por punção no lado arterial da manga de silicone do circuito arterio-venoso extracorporal.

Para evitar a hemólise das amostras, as colheitas foram efectuadas lentamente.

Especificamente para medição da glicémia arterial, utilizou-se uma micro-seringa automática de 25 μ l (YSI 1501 Syringepet, Yellow Springs Instrument Inc, EUA), concebida para permitir colheitas de sangue com elevada precisão e a uma velocidade de fluxo considerável, apresentando um volume morto mínimo. Para obter uma medição de glicémia correcta, a amostra de sangue arterial colhida era imediatamente injectada no analisador de glucose.

O funcionamento do analisador de glucose

O mecanismo de quantificação da glicémia pelo analisador de glucose assenta num sistema de duas reacções em cadeia, nas quais se produz uma corrente eléctrica proporcional à concentração de glucose em solução (figura 3.6).

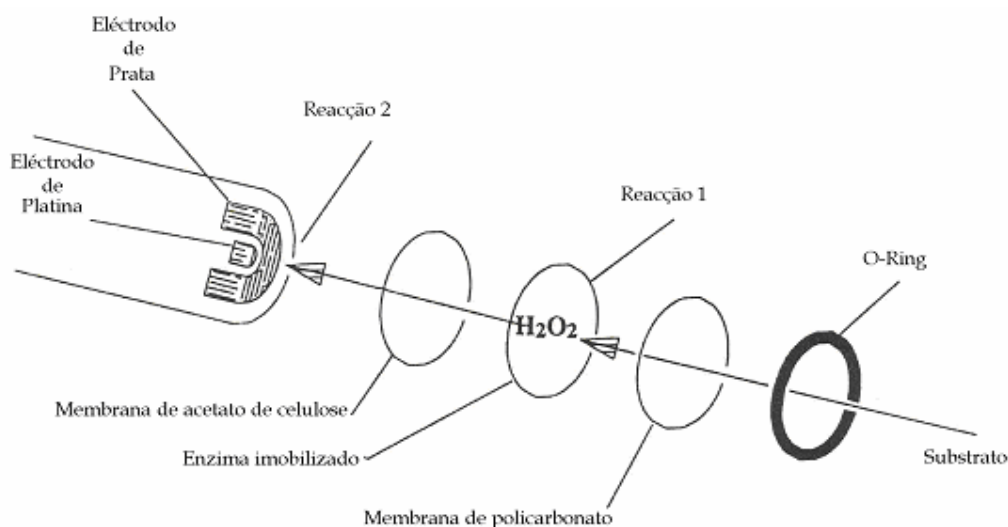
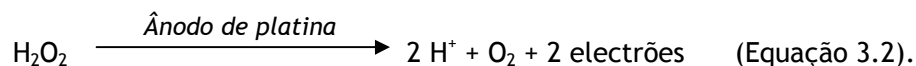


Figura 3.6: Esquema do sistema de quantificação de glicose pelo analisador de glicose (YSI 1500 Sidekick, Yellow Springs Instrument Inc, EUA). O método baseia-se na oxidação enzimática da glicose (glucose oxidase, reacção 1) e detecção da corrente de electrões gerada pela oxidação do H₂O₂ (reacção 2). Adaptado do manual do analisador de glicose YSI 1500 Sidekick (YSI, 2001).

A primeira reacção é catalisada pelo enzima glucose oxidase, que se encontra impregnado numa membrana intermédia, coberta por duas outras, uma interna de acetato de celulose e uma membrana externa de policarbonato, que limita a difusão do substrato para a membrana intermédia (enzima), evitando que a reacção se torne limitante por saturação de enzima. O sistema tri-membranar encontra-se encerrado, juntamente com a sonda, numa câmara reaccional. Quando se injecta a amostra na câmara reaccional, o substrato (glucose) difunde-se através da membrana externa, reagindo com o glucose oxidase presente na membrana intermédia, sendo rapidamente oxidado a glucono-lactona e peróxido de hidrogénio (H₂O₂), de acordo com a seguinte equação:



O H₂O₂ formado nesta reacção (3.1) passa através da membrana de acetato de celulose e é posteriormente oxidado no ânodo de platina, originando uma corrente de electrões, segundo a equação:



A corrente eléctrica gerada é proporcional à concentração de H₂O₂. Com efeito, quando o rendimento da produção de H₂O₂ e a velocidade a que este abandona a membrana impregnada com o enzima se tornam constantes, atinge-se um equilíbrio dinâmico. O equilíbrio é indicado por uma resposta de estado estacionário, em que a corrente eléctrica é linearmente proporcional à concentração de H₂O₂ e, portanto, à concentração de glucose consumida através da reacção (3.1). Esta corrente eléctrica é detectada pela sonda do analisador de glucose e o sinal é convertido na concentração de glucose na amostra (mg/dl).

O eléctrodo de platina encontra-se num potencial anódico e pode oxidar diversas substâncias, para além do H₂O₂, pelo que a presença da membrana interna de acetato de celulose evita a interferência de outros agentes redutores, já que permite a passagem de H₂O₂, mas exclui compostos químicos de pesos moleculares superiores a 200 Da (aproximadamente), protegendo assim a superfície de platina de compostos proteicos, detergentes e outras substâncias que a poderiam lesar. Contudo, a membrana de acetato de celulose pode ser penetrada por compostos como sulfureto de hidrogénio, mercaptanos de baixo peso molecular, hidroxilaminas, hidrazinas, fenóis e anilinas, que poderão interferir com a detecção da corrente eléctrica induzida pela amostra. Para evitar a interferência provocada por compostos como os atrás referidos, a câmara reaccional é lavada automaticamente entre leituras com tampão de lavagem

especificamente indicado para o analisador de glucose (tampão de lavagem YSI, Yellow Springs Instrument Inc, EUA).

Com o tempo, a membrana que contém o enzima vai perdendo linearidade e, conseqüentemente, tornando-se menos sensível, em particular para elevadas concentrações de substrato, o que se traduz, por exemplo, numa maior dificuldade em obter uma boa calibração do analisador de glucose. Para prevenir esta situação, a membrana foi substituída regularmente, em períodos nunca superiores a 30 dias. A calibração do aparelho foi efectuada recorrendo a uma solução-padrão de glucose de concentração 180 mg/dl. Durante a experiência, testou-se a calibração recorrendo a esta solução-padrão de glucose. Foram ainda efectuados com regularidade testes com soluções-padrão de glucose para verificar a linearidade da membrana.

3.9. QUANTIFICAÇÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA - O RIST

O teste rápido de sensibilidade à insulina (RIST, *Rapid Insulin Sensitivity Test*) é um *clamp* euglicémico, em que se mede a resposta hipoglicemiante à administração de insulina, de acordo com o previamente descrito por Loutt e colaboradores (Loutt *et al.*, 1998). Assim, no início da experiência (controlo) e depois de uma intervenção (por exemplo, farmacológica), determinou-se a glicémia arterial basal e realizou-se um RIST.

Glicémia basal (baseline)

Após o período de estabilização, efectuou-se a colheita de amostras de sangue arterial em intervalos de 5 minutos para determinação da glicémia. A glicémia basal, também designada por *baseline*, é a média de pelo menos 3 valores de glicémia estáveis e constitui o nível euglicémico-alvo a ser mantido durante o RIST.

O RIST

Como referido anteriormente, o RIST mede a resposta hipoglicemiante do animal à administração de insulina exógena, sendo a glicémia mantida constante por perfusão iv de glucose.

Assim, após a determinação da glicémia basal, iniciou-se a perfusão de insulina (50 mU/kg, 6 ml/h, iv), durante 5 min. O início da perfusão de insulina foi considerado o tempo zero ($t = 0$ min) do RIST. Ao fim do primeiro minuto ($t = 1$ min), iniciou-se a perfusão de glucose (100 mg/ml, iv) à taxa inicial $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ e determinou-se a glicémia arterial. A partir deste momento, as amostras de sangue arterial foram colhidas em intervalos de 2 min para determinação da glicémia e, em função do valor

de glicémia medido, ajustou-se a taxa de perfusão da glucose de modo a manter a glicémia do animal próxima do valor basal determinado antes do início do RIST. O RIST foi considerado terminado quando os níveis de glucose arterial se mantiveram próximos da *baseline* sem ser necessária perfusão de glucose. Um perfil típico de um RIST em ratos é apresentado na figura 3.7 e como se pode observar, o aumento da taxa de perfusão iv de glucose impede a diminuição da glicémia induzida por acção da insulina, mantendo os valores de glucose arterial próximos da *baseline*.

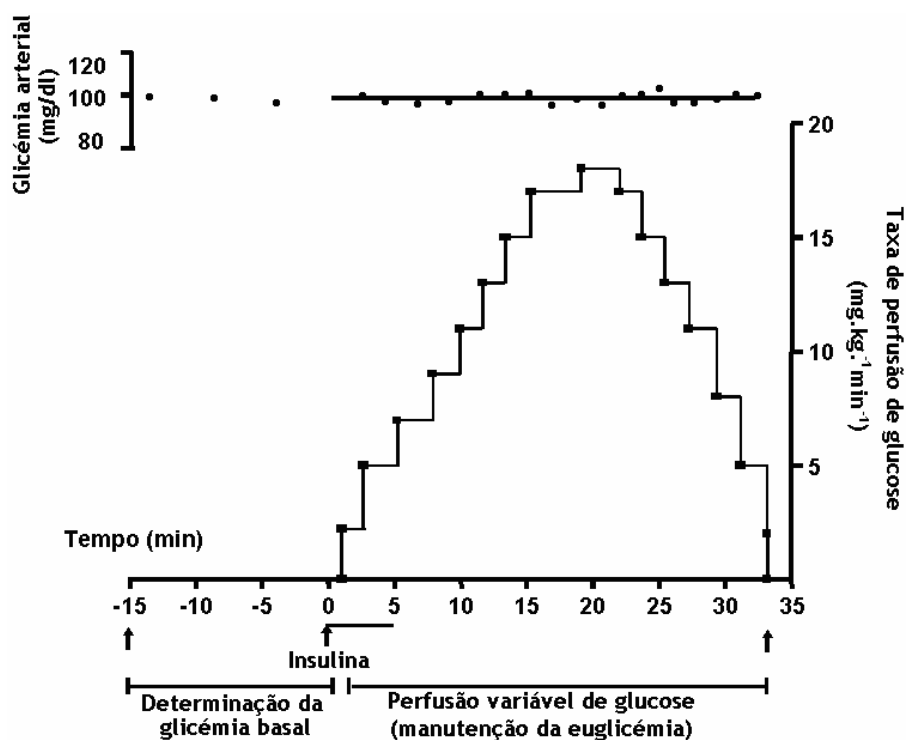


Figura 3.7: Perfil típico de um teste rápido de sensibilidade à insulina (RIST). Após determinação da glicémia basal, administra-se insulina (50 mU/kg, iv, 5 min). A taxa de perfusão de glucose é ajustada em função da glicémia medida a cada 2 min, de modo a manter a euglicémia. A quantidade de glucose perfundida ao longo do teste (área sob a curva) designa-se por RIST índice (mg glucose/kg bw) e é o parâmetro de avaliação da sensibilidade à insulina. Figura adaptada de Lutt *et al.*, 1998.

A área sob a curva do RIST corresponde à massa total de glucose (mg glucose) por quilograma de peso corporal (kg bw), que foi necessário perfundir durante o teste para manter a euglicémia, e é designada por RIST índice (mg glucose/kg bw). O RIST índice foi o parâmetro utilizado para avaliar a sensibilidade à insulina em todas as experiências.

No decorrer do RIST monitorizou-se continuamente a pressão sanguínea e confirmou-se que o sangue fluía livremente através do circuito arterio-venoso.

As perfusões iv de glucose e insulina foram efectuadas com o auxílio de bombas de perfusão automáticas de débito ajustável (BBraun, Portugal; ou Kent Scientific Corporation, EUA), através de cânulas de polietileno (PE 50) ligadas ao lado venoso do circuito arterio-venoso.

Após cada RIST, para assegurar a estabilização do animal, esperou-se aproximadamente 30 min antes de qualquer outro procedimento experimental. Após cada intervenção ou manipulação farmacológica, e a fim de determinar os seus efeitos na sensibilidade à insulina, foi realizado um novo RIST, logo que um novo nível de glicémia arterial basal foi atingido.

3.10. DETERMINAÇÃO DA INSULINÉMIA

A colheita de amostras de sangue para quantificação da insulinémia foi efectuada por punção no lado arterial da manga de silicone do circuito arterio-venoso. Também aqui, as amostras de sangue foram colhidas lentamente a fim de evitar a hemólise.

A quantificação da insulinémia foi realizada por dois métodos: rádio-imunoensaio (RIA), nos protocolos realizados em Portugal (capítulos 6 e 7); e ensaio imunoenzimológico (ELISA), nas experiências desenvolvidas no Canadá (capítulo 5).

3.10.1. DETERMINAÇÃO DA INSULINÉMIA POR RÁDIO-IMUNOENSAIO (RIA)

Os procedimentos para determinação da insulinémia por RIA efectuaram-se de acordo com o indicado pelo kit da Linco Research (RI-13K, Linco Research, EUA), utilizado para este efeito.

Este kit baseia-se na técnica anticorpo/PEG, em que se recorre a uma concentração fixa de insulina marcada com iodo-125 (insulina- I^{125}), incubada com um anti-soro contendo o anticorpo anti-insulina de rato, de modo que, com a adição da amostra de sangue contendo insulina não marcada, diminui a ligação do anticorpo à insulina marcada. A quantidade de insulina na amostra é inversamente proporcional à quantidade de insulina- I^{125} ligada ao anticorpo e pode ser determinada através de uma curva-padrão, com uma sensibilidade próxima de 0.1 ng/ml. As soluções-padrão de insulina de rato usadas para realizar a curva-padrão foram disponibilizadas com o kit.

Assim, as amostras de sangue (300 μ l) foram centrifugadas (3 min, 12500 g; minicentrífuga Sigma 1-13, Alemanha) e o sobrenadante colhido - soro - foi conservado a -80 °C até ao dia da determinação da insulinémia. Para realização do ensaio, à nossa

amostra de soro (100 µl) adicionaram-se 100 µl da solução de insulina- I^{125} hidratada em tampão de ensaio (fosfato de sódio 0.05 mol.dm⁻³, pH 7.4, EDTA 0.025 mol.dm⁻³, azeto de sódio 0.08 % e BSA 1 %), contendo IgG transportador (*carrier*). Juntou-se o anticorpo anti-insulina de rato (anti-soro comercial, 100 µl) e, após um período de incubação de 2 h a 20-25 °C, adicionou-se 1 ml de reagente precipitante (soro anti-IgG, com PEG 3 % e Triton X-100 0.05 %, em tampão de ensaio). Em seguida, a mistura foi incubada durante 20 min a 4 °C e o complexo anticorpo-insulina- I^{125} separado por centrifugação (30000 g, 4 °C, 20 min, ultracentrífuga Beckman L8-70, rotor 70.1 Ti). Finalmente, procedeu-se à contagem de radioactividade do sobrenadante (1 min), utilizando um contador gama (DPC Gamma Counter, EUA) e calculou-se a concentração de insulina na amostra de soro (ng/ml), recorrendo à recta-padrão elaborada em paralelo.

3.10.2. DETERMINAÇÃO DA INSULINÉMIA POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO POR ABSORÇÃO EM FASE SÓLIDA (ELISA ¹)

Outra técnica utilizada para determinação da insulinémia foi o ELISA, recorrendo também a um kit comercial (Rat Ultrasensitive Insulin ELISA, Merckodia Inc., Suécia).

Este método baseia-se no uso de dois anticorpos monoclonais direccionados contra dois determinantes antigénicos distintos na molécula de insulina. Assim, a insulina da amostra liga-se simultaneamente ao anticorpo presente no poço de microtitulação e ao anticorpo em solução (conjugado com o enzima peroxidase). Os anticorpos e as outras moléculas não ligados são removidos por lavagem, sendo que os anticorpos conjugados ligados à insulina da amostra são detectados por reacção do enzima peroxidase com 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. O produto é medido

¹ ELISA, *enzyme-linked immuno-sorbent assay*.

espectrofotometricamente. A determinação da concentração de insulina na amostra foi efectuada por recurso a uma curva de calibração, utilizando soluções-padrão de insulina fornecidas com o kit. Este método apresenta uma sensibilidade de 0.13 µg/l.

Após a colheita, as amostras de sangue arterial (40 µl) foram centrifugadas (3 min, 16755 g; minicentrífuga Corning Costar Corporation, EUA) para obtenção de soro. Todas as soluções foram adicionadas nos poços da placa do ensaio fornecida com o kit. À nossa amostra de soro (5 µl) adicionou-se a solução de anticorpo conjugado com o peroxidase (50 µl). Esta mistura foi incubada durante 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se à lavagem com o tampão de lavagem fornecido com o kit e adicionou-se a solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (200 µl). Incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente e parou-se a reacção por adição de H₂SO₄ 0.05 mol.dm⁻³. Finalmente, leu-se a absorvência da solução a 450 nm (espectrofotómetro Ultraspec 4000 UV/Visible, Pharmacia Biotech, EUA).

3.11. QUANTIFICAÇÃO DO GLUTATIONO HEPÁTICO

3.11.1. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONO PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO

Este método foi utilizado para determinar a concentração de glutatióno hepático em ratos Sprague-Dawley, no âmbito das experiências cujos resultados são apresentados no capítulo 5. Recorreu-se a um método espectrofotométrico-colorimétrico, utilizando um kit comercial (Bioxytech GSH-420, OxisResearch, EUA).

A amostra é totalmente reduzida por adição de um agente redutor (tris-(2-carboxietil)-fosfano, TCEP), convertendo todo o glutatióno oxidado (GSSG) da amostra à forma reduzida (GSH). Em seguida, é adicionado um cromogénio (o metilsulfato de 4-cloro-1-metil-7-trifluorometilquinolina, CMTFQ), o qual reage com os tióis (-SH) presentes na solução, formando-se tioéteres. Finalmente, com adição de base forte ocorre uma reacção de β -eliminação específica para o tioéter-GSH, resultando na formação de uma tiona, o cromóforo da reacção, cuja absorvência a 420 nm é directamente proporcional à concentração de glutatióno.

No final da experiência, antes de sacrificar o animal, as amostras de fígado foram colhidas, congeladas e armazenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior quantificação do glutatióno. No dia da quantificação, a amostra de fígado (aproximadamente 0.1 g de massa) foi lavada com NaCl 0.9 %, pesada e homogeneizada em reagente precipitante (ácido tricloroacético, TCA), na proporção 1/20 (m/v). O homogeneizado resultante foi centrifugado durante 10 min a 3000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (centrífuga Beckman GS-15R, rotor S4180, Beckman Coulter Inc., EUA) e o sobrenadante foi colhido. Ao sobrenadante (200 μl) adicionou-se 200 μl de tampão pH 7.8 (solução de fosfato de potássio, ácido dietilenotriaminapenta acético-DTPA- e lubrol) e o agente redutor (TCEP, 200 μl). Em seguida, adicionou-se o cromogénio (CMTFQ, 200 μl) e elevou-se o pH da solução (pH>13) com adição de hidróxido de sódio (200 μl). A incubação da mistura durante 30

min, no escuro e à temperatura ambiente, permitiu a formação do cromóforo (a tiona 7-trifluorometil-4-tioquinolina). Finalmente, mediu-se a absorvência desta solução a 420 nm (espectrofotómetro Ultraspec 4000 UV/Visible, Pharmacia Biotech, EUA).

A absorvência do cromóforo é linearmente proporcional à concentração de GSH. Assim, utilizando soluções-padrão de GSH (fornecidas com o kit Bioxytech GSH-420 da OxisResearch), efectuou-se uma recta de calibração (regressão linear) para determinação da concentração de GSH na amostra de fígado.

3.11.2. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ELEVADA PRESSÃO (HPLC)

Desenvolveu-se também uma técnica de cromatografia líquida de elevada pressão (HPLC) acoplada a um sistema de detecção espectrofotométrica para quantificação da concentração de glutatono hepático. Este método foi utilizado na determinação da concentração de glutatono no fígado de ratos Zucker, obesos e diabéticos, de 9 e 52 semanas (capítulos 6 e 7).

A técnica de HPLC implementada permite quantificar com grande precisão o glutatono na forma reduzida (GSH) e na forma oxidada (GSSG), baseando-se na rápida derivatização dos grupos tiol (-SH) livres com N-etilmaleimida (NEM), antes da desproteinização ácida e da adição do cromogénio 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB), para posterior separação cromatográfica (HPLC) e detecção espectrofotométrica do complexo glutatono-DNB.

O método para determinação do glutatono hepático por HPLC foi adaptado dos métodos descritos por Asensi, Giustarini e colaboradores (Asensi *et al.*, 1994; Giustarini *et al.*, 2003), implementados para determinação da concentração de glutatono sanguíneo.

Assim, após laparotomia (animal anestesiado), colheu-se a amostra de fígado (0.2-0.3 g), que foi conservada em azoto líquido. No dia da quantificação, a amostra foi homogeneizada em NEM 24 mol.dm⁻³ (1 ml) e deixada em repouso durante 1 min. Depois adicionou-se TCA 50 % (m/v), de modo a obter uma concentração final de 20 % (m/v) e aguardaram-se 10 min, a 0 °C. Em seguida, realizou-se uma centrifugação de a 30000 g e a 4 °C, durante 20 min, numa centrífuga Avanti J-25 (rotor JA 25-50, Beckman Coulter Inc., EUA). Recolheu-se o sobrenadante (1 ml), que foi lavado por adição de diclorometano (10 ml) para remover o excesso de NEM e aguardou-se até à formação de duas fases distintas. À fase aquosa (100 µl) adicionou-se TRIS-HCl (1 mol.dm⁻³, pH 10, 50 µl) e o corante DNFB (1.5 % (v/v), 150 µl). Incubou-se a mistura reaccional durante 3 h, à temperatura ambiente e em local escuro. Finalmente, adicionou-se HCl 37 % (10 µl) e procedeu-se à eluição das amostras para separação por HPLC de permuta iónica.

O sistema de HPLC utilizado foi constituído por duas bombas de injeção de solvente (LaChrom L-7100, Hitachi, EUA), um detector espectrofotométrico (LaChrom L-7400 UV-Detector, Hitachi, EUA) programado para 355 nm, um interface (LaChrom D-7000 HPLC System, Hitachi, EUA), um *loop* de injeção de 20 µl (Rheodyne 7725 Sample Loop, Rheodyne, Alemanha) e um injetor automático (*multi-sampler* Marathon-XT v3.1, Pharmacia, Holanda). Para determinação e análise dos cromatogramas, usou-se o *software* LaChrom D-2500/D7500 Data File Conversion Utility (Hitachi, EUA). Adicionalmente, as áreas sob as curvas correspondentes aos picos de GSH e GSSG foram determinadas recorrendo ao programa TableCurve 2D v5.01 (Systat Software Inc., EUA).

Foi utilizada uma coluna de permuta iónica (LiChroCART 250-4 HPLC-Cartridge, Purospher Star NH₂, 5 µm, Merck, Alemanha), protegida por duas pré-colunas (LiChroCART 1514960001, Merck KGaA, Alemanha). A fase móvel utilizada na eluição foi uma mistura de 4 solventes: A, água desionizada; B, ácido acético 3 mol.dm⁻³; C, acetato de sódio 3 mol.dm⁻³; e D, metanol (pureza > 99.9 %). Aplicou-se um gradiente de concentração (% v/v) aos solventes A, B e C ao longo do ciclo de eluição, o qual teve

a duração de 45 min, conforme se apresenta na figura 3.8. A eluição foi efectuada à temperatura ambiente, com um fluxo constante de 1.2 ml/min. A pressão na coluna manteve-se a 170 - 180 bar durante o processo.

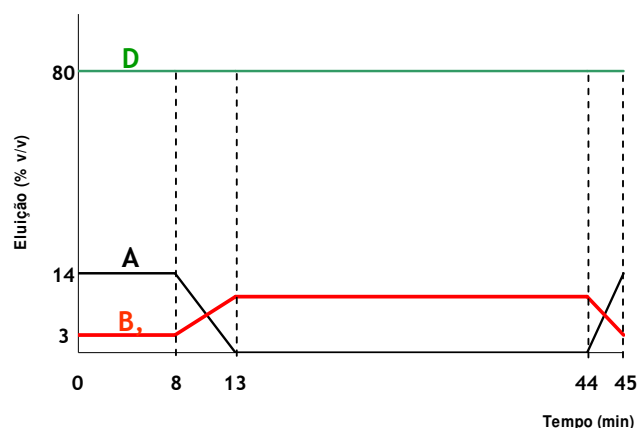


Figura 3.8: Esquema representativo do ciclo de eluição utilizado para quantificação do glutationato por cromatografia líquida de elevada pressão (HPLC). Eluentes: A, água desionizada (preto); B, ácido acético $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ e C, acetato de sódio $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (vermelho); D, metanol (verde). Condições iniciais (0 - 8 min): 14 % de A, 3 % de B, 3 % de C e 80 % de D; 8 - 13 min: gradiente linear; 13 - 44 min: 0 % de A, 10 % de B, 10 % de C, 80 % de D; 44 - 45 min: gradiente linear; 45 min: condições iniciais.

A eluição do GSH e do GSSG ocorreu aproximadamente aos 15 min e 23 min, respectivamente. A detecção dos picos foi efectuada por leitura da absorvência a 355 nm, sendo a área sob a curva linearmente proporcional à concentração de glutationato na amostra. Para determinação da concentração de GSH e GSSG na amostra realizou-se uma recta de calibração diária, utilizando soluções-padrão de GSH e GSSG. Estas soluções-padrão foram preparadas nas mesmas condições que as amostras biológicas.

3.12. QUANTIFICAÇÃO DA MASSA ADIPOSITIVA

3.12.1. ESTIMATIVA DA MASSA ADIPOSITIVA CORPORAL TOTAL

A massa adiposa corporal foi estimada recorrendo à análise de impedância bioelétrica tetrapolar, de acordo com o previamente descrito por Hall e colaboradores (Hall *et al.*, 1989). Este método permite estimar a massa gorda corporal total, não diferenciando a região ou regiões em que a adiposidade é mais acentuada.

Após indução da anestesia, cortou-se o pêlo da região dorsal do rato. Este foi colocado em posição de decúbito ventral sobre uma superfície não condutora, com a cabeça e a cauda alinhadas ao longo do eixo longitudinal do corpo e os membros dispostos para fora, formando um ângulo recto com a linha do corpo. Em seguida, foram colocados 4 eléctrodos (agulhas 20 G, dobradas num ângulo de 90°), subcutaneamente, ao longo da linha média do dorso do animal em 4 locais: entre os olhos (eléctrodo-fonte 1, S1); na base do crânio (eléctrodo de detecção 1, D1); pelvis média (eléctrodo de detecção 2, D2); e na cauda, a 4 cm da base (eléctrodo-fonte 2, S2). Após medir a distância entre os eléctrodos S1 e S2 (S_{1-2}), usou-se um analisador bioelétrico de composição corporal (Quantum II, RJL Systems, EUA) para determinar a resistência eléctrica corporal (R), com uma corrente de baixa intensidade (800 μ A a 50kHz). A determinação da massa corporal não-gorda foi obtida a partir da seguinte equação:

$$FFM (g) = 126.66 * (S_{1-2})^2 / R - 28.84 \quad (\text{Equação 3.3}),$$

em que FFM, representa a massa corporal não gorda (g); S_{1-2} , a distância entre os eléctrodos fonte 1 (S1) e 2 (S2) (cm); e R representa a resistência eléctrica corporal.

Posteriormente, o cálculo da diferença entre a massa corporal (peso) total e a massa corporal não-gorda, permite a quantificação da massa gorda corporal do animal:

$$FM = bw - (126.66*d^2 / R - 28.84) \quad (\text{Equação 3.4}),$$

em que FM, representa a massa gorda corporal; e bw, o peso corporal do animal.

Uma vez que impedância varia com o volume de água corporal, o estado de hidratação do animal é relevante. Assim, no início da cirurgia, o animal foi observado de modo a identificar possíveis sinais de desidratação, o que não ocorreu.

3.12.2. QUANTIFICAÇÃO DA MASSA ADIPOSITIVA ABDOMINAL

A medição da massa adiposa abdominal da região peri-renal, epididimal e peri-entérica foi efectuada no final da experiência.

Após laparotomia extensa, até à zona do pénis, colocou-se gaze na cavidade abdominal, para absorver os fluídos que para aí drenaram. Removeram-se os rins e, após romper a membrana circundante, colheu-se a adiposidade peri-renal, tendo tido o cuidado de a separar do tecido muscular adjacente e limpar o sangue dos tecidos colhidos. Posteriormente, separou-se a gordura epididimal, localizada acima dos testículos, dos próprios testículos e restantes estruturas do tracto reprodutivo. Colheu-se ainda a adiposidade peri-entérica, que envolve o intestino, desde o cólon até ao estômago, tendo particular cuidado na separação do pâncreas, por ser, no rato, uma estrutura bastante difusa. Todos os depósitos de gordura colhidos foram imediatamente pesados e a sua massa anotada. A massa adiposa abdominal total foi aqui considerada como a soma das massas individuais das adiposidades regionais (peri-renal, epididimal e peri-entérica).

3.13. MANIPULAÇÃO DA VIA DA HISS

3.13.1. INIBIÇÃO DA ACÇÃO DA INSULINA DEPENDENTE DA VIA DA HISS

A inibição da via da HISS secções (3.13.1.1 a 3.13.1.4) permitiu avaliar a acção da insulina independente da HISS, assim como calcular a componente dependente da HISS (secção 3.13.3).

3.13.1.1. Jejum

Conforme discutido na secção 3.3.1.1, a via de acção da insulina dependente da HISS está activa apenas no estado pós-prandial. A submissão de animais a períodos de jejum crescentes provoca uma diminuição progressiva da componente da HISS sem afectar a componente independente (Lautt *et al.*, 2001). Assim, ao efectuar um RIST após 24 h de jejum, determina-se a acção da insulina totalmente independente da HISS.

3.13.1.2. Desnervação do plexo anterior hepático

A desnervação do plexo anterior hepático (procedimento cirúrgico descrito na secção 3.4.2.5) bloqueia a acção da insulina dependente da HISS, mesmo que este procedimento seja efectuado no estado pós-prandial. Com efeito, segundo Lautt e colaboradores (Xie e Lautt, 1996b; Lautt *et al.*, 2001), a sensibilidade à insulina 30 min após a desnervação é semelhante à sensibilidade à insulina após 24 h de jejum.

O RIST índice pós-desnervação foi usado para medir a acção da insulina independente da HISS, isto é, a acção da insulina *per se*. A diferença entre o RIST índice controlo (pós-prandial) e o RIST índice pós-desnervação permitiu quantificar a acção da insulina dependente da HISS (secção 3.13.3).

3.13.1.3. Administração de atropina

Conforme representado no esquema da figura 3.9, após realização do RIST controlo no estado pós-prandial, efectuou-se a administração da atropina. A atropina foi administrada por perfusão contínua (6 ml/h, 5 min, iv), nas doses de 1 mg/kg (capítulos 4 e 5) ou 3 mg/kg (capítulos 6, 7 e 8). Após a administração de atropina aguardou-se 30 min para estabilização do animal (Xie e Lutt, 1995a), determinou-se a glicémia basal e realizou-se um segundo RIST (pós-atropina).

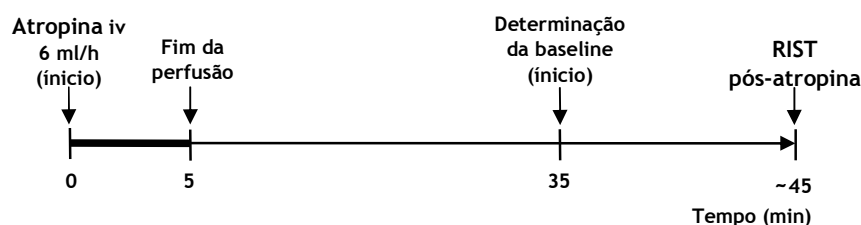


Figura 3.9: Esquema ilustrativo do protocolo de administração de atropina para inibição da acção da insulina dependente da via da HISS. A administração de atropina foi efectuada por perfusão contínua (6 ml/h, 5 min, iv), nas doses de 1 mg/kg ou 3 mg/kg. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina; RIST, teste rápido de sensibilidade à insulina.

Está descrito que a administração de atropina, um antagonista muscarínico, produz uma resistência à insulina dependente da HISS, cuja magnitude é semelhante à observada pelo jejum ou deservação cirúrgica do plexo anterior hepático (Xie e Lutt, 1996b; Lutt *et al.*, 2001). Os efeitos produzidos pela administração de atropina na dose de 1 mg/kg e de 3 mg/kg são semelhantes, tanto hemodinamicamente como na sensibilidade à insulina (Takayama *et al.*, 2000). Comparando a via de administração iv com a via ipv (intraportal), também não há diferenças na inibição da sensibilidade à insulina (Takayama *et al.*, 2000).

Desta forma, o RIST pós-atropina representa a acção da insulina independente da HISS, pelo que a diferença entre o RIST controlo pós-prandial e o RIST pós-atropina foi usada para medir a acção da insulina dependente da componente da HISS (ver secção 3.13.3).

3.13.1.4. Administração de N-monometil-L-arginina (L-NMMA)

A N-monometil-L-arginina (L-NMMA) foi administrada por via ipv na dose de 0.73 mg/kg. Após a administração de L-NMMA, aguardou-se 60 min e em seguida realizou-se o RIST pós-L-NMMA.

A dose de L-NMMA (0.73 mg/kg) e o tempo de espera (60 min) antes da realização do RIST pós-L-NMMA, foram os descritos por Sadri e colaboradores para obter uma acção máxima deste fármaco, que se mantém durante pelo menos 2 h (Sadri e Lautt, 1999). Uma vez que a L-NMMA é um inibidor competitivo do sintase do monóxido de azoto (NOS), a sua administração por via ipv inibe a síntese do monóxido de azoto (óxido nítrico, *NO) hepático e, desta forma, inibe a acção da HISS, pelo que o RIST pós-L-NMMA representa a acção da insulina independente da HISS.

3.13.2. ACTIVAÇÃO OU POTENCIAÇÃO DA VIA DA HISS

Nesta secção abordam-se as técnicas utilizadas para mimetizar ou potenciar a acção da HISS, em modelos patológicos ou fisiológicos em que a componente de acção da insulina dependente da HISS se encontrava diminuída ou foi inibida por um dos processos descritos anteriormente.

3.13.2.1. Ingestão de uma refeição (estado pós-prandial)

Como referido, a acção da HISS é máxima no após a ingestão de uma refeição e praticamente inexistente ao fim de 24 h de jejum (Lautt *et al.*, 2001). Nos protocolos em que se pretendia assegurar que a acção da HISS era máxima, os animais foram submetidos a um jejum de 18 h, seguido de acesso a comida durante 1 h. A determinação da glicémia basal foi efectuada cerca de 90 min depois, para posterior realização do teste de sensibilidade à insulina pós-prandial (RIST controlo). Desta forma, assegurou-se que no início da experiência os animais estavam no estado pós-prandial e que, por isso, a via da HISS estava activa.

Nos animais em que se efectuou a cateterização gástrica ou entérica e em que a administração da refeição-teste líquida foi feita directamente no estômago ou duodeno, aguardou-se também cerca de 90 min após a administração da refeição líquida, para em seguida se determinar a baseline e realizar o RIST pós-prandial.

3.13.2.2. Administração de 3-hidroclorato de morfolinosidnonimina (SIN-1)

Nas experiências em que se procurou aumentar a concentração de *NO no fígado e testar o seu efeito na sensibilidade à insulina, procedeu-se à administração ipv de 3-hidroclorato de morfolinosidnonimina (SIN-1), conforme descrito por Sadri e colaboradores (Sadri e Lautt, 1999). O SIN-1 foi administrado por via ipv (5 mg/kg, em bólus de 0.5 ml) e, após estabelecer novo nível basal de glicémia arterial, realizou-se o RIST pós-SIN-1. O SIN-1 é um dador de *NO cuja administração por via ipv reverte a resistência à insulina dependente da HISS quando provocada por inibição do NOS hepático, ao contrário do observado com outros dadores de *NO , como o nitroprussiato de sódio (SNP) (Guarino *et al.*, 2003).

3.13.3. QUANTIFICAÇÃO DA ACÇÃO DA INSULINA DEPENDENTE DA VIA DA HISS

O RIST índice controlo no estado pós-prandial consiste na soma das componentes de acção da insulina dependente e independente da HISS. O bloqueio da HISS por um dos métodos descritos na secção 3.13.1 resulta na acção da insulina independente da HISS (RIST índice obtido após bloqueio da HISS). A avaliação da componente de acção da insulina dependente da HISS foi feita de duas formas: *(i)* cálculo da diferença entre o RIST índice controlo pós-prandial e o RIST índice pós-bloqueio da acção da HISS; *(ii)* análise das curvas dinâmicas do RIST, nas quais se subtraiu a componente de acção da insulina independente da HISS à resposta controlo, obtendo-se o perfil da componente de acção da insulina dependente da HISS.

3.14. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.14.1. A ADMINISTRAÇÃO INTRAGÁSTRICA OU INTRA-ENTÉRICA DE UMA REFEIÇÃO MISTA POTENCIA A SENSIBILIDADE À INSULINA

Em todos os protocolos experimentais desenvolvidos nesta secção foram utilizados ratos Sprague-Dawley machos, de 9 semanas de idade, em jejum (24 h) na altura de início da experiência. Os animais foram testados sob anestesia (modelo agudo) ou no estado consciente (modelo crónico). As cirurgias realizadas no modelo agudo e no modelo crónico foram as descritas na secção 3.4 e incluíram a cateterização gástrica ou entérica. Os resultados obtidos pela realização destas experiências são apresentados no capítulo 4.

3.14.1.1. Efeito da administração intragástrica de diferentes soluções na sensibilidade à insulina em animais anestesiados

Os animais foram divididos aleatoriamente em vários grupos, consoante as soluções-refeição testadas.

Após determinação da glicémia basal, realizou-se o RIST controlo (jejum). Em seguida, utilizando o catéter gástrico, administraram-se (via ig) as diferentes refeições líquidas, nas doses de 10 ml/kg ou 20 ml/kg, a um débito de 1 ml/min. Noventa minutos depois, determinou-se a glicémia basal pós-prandial e realizou-se um segundo RIST (RIST pós-prandial).

As soluções testadas como refeições líquidas foram água destilada, solução aquosa de D-glucose (173.0 mg/ml), solução aquosa de sacarose (329.0 mg/ml) e uma refeição líquida mista comercial (Boost, Mead Johnson Nutritionals), constituída por

173.0 mg/ml de glicídios, 42.2 mg/ml de proteínas e 16.9.mg/ml de lípidos (tabela VI).

A água foi administrada apenas na dose de 20 ml/kg.

Tabela VI - Composição da refeição líquida mista comercial (Boost[®]) de acordo com a informação do fabricante (Mead Johnson Nutritional, Canadá).

Nutriente (mg/ml)	Refeição líquida mista (Boost)
Lípidos	16.9
Ácidos gordos saturados	2.1
Ácidos gordos monoinsaturados	10.6
Ácidos gordos polinsaturados	4.2
Colesterol	0.03
Glícídios	173.0
Proteínas	42.2
Minerais	6.5
Sódio	1.1
Potássio	1.6
Cloro	1.3
Cálcio	1.1 ^a
Fósforo	0.7 ^a
Vitaminas	0.14
Vitamina C	0.1 ^a
Vitamina E ((l/ml)	16.0 ^a

^a Valor correspondente a 25 % da dose diária recomendada para adultos do sexo masculino com idade compreendida entre os 19 e 50 anos, de acordo com o descrito pelo Departamento Agrícola dos EUA (USDA).

3.14.1.2. Efeito da desnervação hepática na potenciação da acção da insulina induzida pela refeição mista em animais anestesiados

Nesta série de experiências, realizadas em animais anestesiados, a cirurgia incluiu a desnervação do plexo anterior hepático (secção 3.4.2.5). Após a realização do RIST controlo (jejum), administrou-se a refeição líquida mista (Boost, Mead Johnson

Nutritionals, 10 ml/kg, ig), conforme descrito na secção anterior. Noventa minutos depois estabeleceu-se nova baseline e realizou-se o RIST pós-prandial.

3.14.1.3. Efeito da administração intragástrica de diferentes soluções-refeições na sensibilidade à insulina dependente da HISS em animais conscientes

Durante todo o protocolo experimental (pós-cirúrgico), os animais permaneceram conscientes e livres de movimentos.

Realizou-se o RIST controlo (jejum) e em seguida administraram-se (10 ml/kg, ig) as soluções-refeições líquidas (D-glucose, 173.0 mg/ml; e refeição líquida mista comercial Boost). Após um período de estabilização de 90 min, determinou-se a glicémia basal e realizou-se o RIST pós-prandial. Em seguida, procedeu-se à administração da atropina (1 mg/kg, iv), como descrito na secção 3.13.1.3. Aguardou-se 30 min, determinou-se a nova glicémia basal e efectuou-se um terceiro RIST (RIST pós-atropina).

3.14.1.4. Estudo da importância do intestino na potenciação da acção da insulina induzida pela refeição líquida mista

Estas experiências foram desenvolvidas no modelo agudo (animais sob anestesia) e a cirurgia envolveu a cateterização gástrica ou duodenal, com colocação de uma banda duodenal para impedir a passagem de comida do estômago para o duodeno e vice-versa (secção 3.4.2.4). Os animais foram divididos em dois grupos, de acordo com a via de administração da solução-refeição (ig ou intra-entérica).

Este protocolo experimental consistiu na realização de dois RISTs, o primeiro no estado de jejum (RIST controlo) e o segundo após a administração da solução-refeição

líquida mista (Boost, 10 ml/kg, 1 ml/min). A administração da refeição mista foi testada por via ig e por via intra-entérica. Nos protocolos em que se efectuou a administração da refeição mista por via intra-entérica, foi ainda administrada atropina (1 mg/kg, iv) e realizado um RIST pós-atropina.

3.14.2. A INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL ASSOCIADA À OBESIDADE INDUZIDA POR UMA DIETA RICA EM LÍPIDOS É PROVOCADA PELO DECRÉSCIMO DE ACÇÃO DA HISS

Os protocolos experimentais a seguir descritos foram realizados em ratos Sprague-Dawley anestesiados e os resultados obtidos são apresentados no capítulo 5.

3.14.2.1. Dietas e regime alimentar

Nesta série de experiências foram utilizadas duas dietas: uma dieta controlo (STD, Prolab RMH 3000 5P00, Labdiet, EUA) e uma dieta rica em lípidos (HFD, DIO Series Diets D12492, Research Diets Inc., EUA). Na tabela VII apresenta-se uma comparação da composição das duas dietas utilizadas nestas experiências.

A dieta controlo é uma ração *standard* (STD), normalmente utilizada em laboratório para a manutenção de ratos, cujo conteúdo energético é fornecido por 26 % de proteínas, 60 % de glícidos e 14 % de lípidos e com uma energia bruta de 4.1 kcal/g. A dieta rica em lípidos é constituída (percentagem de conteúdo calórico) por 20 % de proteínas, 20 % de glícidos e 60 % de lípidos, apresentando uma energia bruta de cerca de 5.2 kcal/g.

Tabela VII - Composição reportada pelos fabricantes das dietas controlo (STD, Prolab RMH 3000 5P00, Labdiet, EUA) e rica em lípidos (HFD, DIO Series Diets D12492, Research Diets Inc., EUA).

Nutriente (por 100 g de dieta)	Dieta controlo (STD, Prolab)	Dieta rica em lípidos (HFD, DIO series)
Lípidos (g)	10.9	34.9
Ácidos gordos saturados (g)	1.8	10.0 ^a
Ácidos gordos monoinsaturados (g)	1.6	20.2 ^a
Ácidos gordos polinsaturados (g)	2.2	3.9 ^a
Colesterol (mg)	19.5	30.1
Glícidos (g)	52.0	26.3
Amido (g)	30.4	0.0
Maltodextrina (g)	0.0	16.1
Sacarose (g)	1.0	8.9
Proteínas (g)	22.5	26.2
Arginina (g)	1.4	1.0
Cistina (g)	0.3	0.3
Aspartato(g)	2.4	1.7
Isoleucina (g)	1.1	1.4
Leucina (g)	1.7	2.1
Lisina (g)	1.3	1.9
Prolina (g)	1.7	2.6
Valina (g)	1.1	1.7
Fenilalanina (g)	1.0	1.2
Tirosina (g)	0.6	1.5
Outros aminoácidos (g)	10.9	10.7
Fibras (g)	4.0 ^b	6.5 ^c
Minerais	6.1	4.5
Vitaminas	1.0	1.2
Colina (mg)	0.2	0.2

^a Valores aproximados, calculados de acordo com a composição do óleo de soja descrita pelo Departamento Agrícola dos EUA (USDA Nutrient Database, SR20-Reports by Single Nutrients).

^b Maioritariamente celulose, hemicelulose e lenhina.

^c Celulose.

Após 1 semana de acondicionamento, os animais (com 5 semanas de idade) foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, de acordo com a sua dieta nas 4 semanas seguintes (figura 3.10): (i) o primeiro, o grupo controlo (STD), foi alimentado apenas

com dieta controlo até ao dia da experiência; (ii) o segundo grupo (HFD-1) foi alimentado com a dieta controlo durante 3 semanas, passando depois a receber a dieta rica em lípidos durante a última semana (1 semana de dieta rica em lípidos); (iii) o terceiro grupo (HFD-4) foi alimentado com a dieta lipídica durante as 4 semanas seguintes até ao dia da experiência (4 semanas de dieta rica em lípidos).

Todos os animais foram testados com 9 semanas de idade. Foi-lhes dado livre acesso a água e comida até à véspera da experiência (figura 3.10).

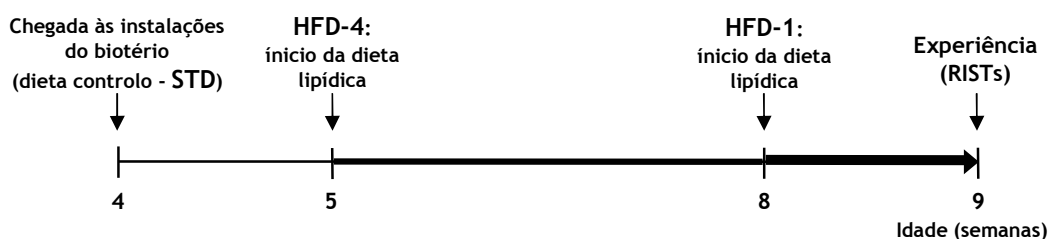


Figura 3.10: Esquema do regime alimentar a que os animais que receberam dieta *standard* (STD) ou dieta rica em lípidos foram submetidos. Os animais controlo (STD) receberam apenas ração *standard* (Prolab RMH 3000 5P00, Labdiet). Os ratos HFD-1 receberam ração rica em lípidos (DIO Series Diets D12492, Research Diets) durante 1 semana, a partir da 8.^a semana de idade. O grupo HFD-4 foi alimentado com a ração lipídica durante 4 semanas, a partir da 5.^a semana de idade. Todos os animais foram testados com 9 semanas de idade.

3.14.2.2. Efeito da dieta rica em lípidos na sensibilidade à insulina

Os animais foram submetidos a um jejum de 18 h, iniciado na véspera, seguido de livre acesso à comida durante 1 h (ração correspondente à dieta de cada grupo), de forma a assegurar que os animais estavam no estado pós-prandial no início da experiência. Determinou-se a glicémia arterial basal (pós-prandial) e colheu-se sangue para quantificação da insulinémia, por ELISA (secção 3.10.2). Em seguida, avaliou-se a sensibilidade à insulina total pós-prandial, através da realização de um RIST (RIST controlo). Inibiu-se a via da HISS por antagonismo colinérgico, através da administração

de atropina (1 mg/kg, iv). Trinta minutos depois determinou-se novamente a glicémia arterial basal e realizou-se um segundo RIST (RIST pós-atropina), como descrito na secção 3.13.1.3 e figura 3.9.

Imediatamente antes e depois de cada RIST colheram-se amostras de sangue arterial para determinação da insulinémia, como previamente descrito (secção 3.10).

3.14.2.3. Efeito da dieta rica em lípidos na massa gorda e na concentração de glutatióno hepático

A medição da adiposidade corporal (total) foi efectuada no início da experiência, após indução da anestesia e antes do início da cirurgia, análise de impedância bioeléctrica tetrapolar, como descrito na secção 3.12.1.

No final da experiência, realizou-se uma laparotomia mediana e colheu-se uma amostra de fígado, a qual foi congelada com gelo seco e conservada a -70 °C, para posterior quantificação do glutatióno pelo método colorimétrico (secção 3.11.1). Esta laparotomia foi também utilizada para colher os depósitos de gordura epididimal, peri-renal e peri-entérica, como descrito na secção 3.12.2.

3.14.3. A INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL EM RATOS ZUCKER OBESOS (OZR) ESTÁ ASSOCIADA À DIMINUIÇÃO DE AMBAS AS COMPONENTES DE ACÇÃO DA INSULINA

Nestes protocolos foram utilizados ratos Zucker, obesos (OZR) e não obesos (LZR), com 9 e 52 semanas de idade. Os animais foram submetidos a 18 h de jejum, seguido de 1 h com livre acesso à comida. Todos os ratos foram testados sob anestesia. Os resultados correspondentes a estas experiências apresentam-se no capítulo 6.

3.14.3.1. Concentração de glutatióno hepático

Especificamente para quantificação do glutatióno (reduzido e oxidado) hepático, usou-se um grupo de cada estirpe e de cada idade, isto é OZR e LZR de 9 e 52 semanas. Assim, após uma laparotomia mediana, recolheram-se as amostras de fígado, que foram conservadas em azoto líquido (-180 °C) para posterior quantificação do glutatióno (por HPLC; secção 3.11.2).

3.14.3.2. Estudo da sensibilidade à insulina dependente e independente da HISS em ratos Zucker de 9 e 52 semanas: efeito da administração de atropina

Após a determinação da glicémia basal (pós-prandial), colheu-se uma amostra de sangue para determinação da insulinémia (por RIA, secção 3.10.1) e realizou-se o primeiro RIST (RIST controlo). Em seguida, administrou-se atropina (3 mg/kg, iv) e realizou-se um segundo RIST (RIST pós-atropina) (secção 3.13.1.3; figura 3.9).

3.14.3.3. Efeito da administração de SIN-1 na resistência à insulina pós-prandial induzida por L-NMMA em ratos Zucker

A cirurgia nestes animais incluiu a cateterização da veia porta, para administração de fármacos por via ipv (secção 3.4.2.3).

Depois de determinada a glicémia pós-prandial basal, realizou-se o RIST controlo. Em seguida, administrou-se a L-NMMA (0.73 mg/kg, ipv), para bloqueio da via da HISS por inibição do NOS hepático e 60 min depois realizou-se o RIST pós-L-NMMA, conforme descrito na secção 3.13.1.4. Em seguida, administrou-se SIN-1 (5 mg/kg, ipv), um dador de *NO, e, após estabilização da glicémia, realizou-se o terceiro RIST (pós-SIN-1, secção 3.13.2.2).

3.14.4. O CONTRIBUTO DO COMPROMISSO DA ACÇÃO DA HISS PARA A INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL NUM MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Nestas experiências, cujos resultados são apresentados no capítulo 7, foram utilizados ratos Zucker diabéticos obesos (ZDF), com 9 semanas de idade. Os LZR foram utilizados como controlos não obesos e não diabéticos.

3.14.4.1. Rações

Após a chegada às instalações da FCM-UNL, os ratos ZDF foram divididos aleatoriamente em dois grupos, alimentados *ad libitum* com duas rações diferentes até à véspera da experiência. Um dos grupos recebeu ração Panlab A04 (Panlab S.L., Espanha), enquanto o outro foi alimentado com Purina 5008 (Labdiet, EUA). A ração Purina 5008 é a ração recomendada pelo fornecedor dos ratos ZDF (Charles River) para o desenvolvimento da diabetes tipo 2 nesses animais. A ração Panlab A04 é a ração standard normalmente utilizada no Biotério da FCM-UNL. Na tabela VIII da página seguinte apresenta-se uma comparação nutricional entre as duas rações.

3.14.4.2. Estudo da sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos ZDF

Os animais foram testados no estado pós-prandial: na véspera da experiência foram submetidos a 18 h de jejum, seguido de 1 h com livre acesso à comida, já no dia da experiência. Todos foram testados sob anestesia. Determinou-se a glicémia basal e colheu-se sangue para determinação da insulinémia, por RIA (secção 3.10.1). Realizou-se o RIST controlo (pós-prandial). Após bloqueio da via da HISS por administração de atropina (3 mg/kg, iv), realizou-se um RIST pós-atropina (secções 3.13.1.3 e 3.14.2.2).

No final da experiência, realizou-se uma laparotomia e colheu-se o fígado para quantificação do glutatono por HPLC (secção 3.11.2).

Adicionalmente, utilizou-se um grupo de ratos controlo (LZR) e um grupo de ratos ZDF com ração Purina 5008, ambos no estado pós-prandial e sem realização de outros procedimentos cirúrgicos nem testes de sensibilidade à insulina, para quantificação do glutatono hepático, também por HPLC.

Tabela VIII - Composição das rações Panlab A04 (Panlab S.L., Espanha) e Purina 5008 (Labdiet, EUA), quanto ao conteúdo calórico e principais nutrientes.

		Ração Panlab A04	Ração Purina 5008
Conteúdo calórico	Energia bruta aproximada (kcal/g)	3.7	4.2
	Lípidos (%)	12.0	16.7
	Glicídios (%)	62.8	56.4
	Proteínas (%)	25.2	26.8
Nutrientes (por 100 g de dieta)	Glicídios (g)	60.5	49.4
	Amido (g)	41	34.9
	Lípidos (g)	2.9	6.5
	Ácidos gordos saturados (g)	0.6	2.5
	Ácidos gordos monoinsaturados (g)	0.7	2.3
	Ácidos gordos polinsaturados (g)	1.5	1.8
	Proteínas (g)	15.4	23.5
	Arginina (g)	0.9	1.4
	Metionina (g)	0.3	0.4
	Cistina (g)	0.3	0.4
	Treonina (g)	0.5	0.9
	Triptofano (g)	0.2	0.3
	Lisina (g)	0.8	1.4
Minerais	5.3	6.8	
Vitaminas	1.7	2.2	
Colina (mg)	0.1	0.2	

3.15. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os valores apresentados ao longo deste trabalho correspondem a médias \pm erro padrão da média (SEM). Conforme aplicável, a significância da diferença entre os valores médios foi calculada através de testes *t-student* (testes t), *paired* ou *unpaired* (*two-tailed*), consoante o desenho experimental fosse, respectivamente, emparelhado ou não emparelhado; e análise de variância (ANOVA), *one-way* ANOVA ou *repeated measures* ANOVA, seguidos do teste de Tukey-Kramer. Nos casos em que se efectuaram regressões lineares, recorreu-se ao valor de R-quadrado (R^2) para avaliar a qualidade da regressão (*goodness of fit*) e a testes *t-student* (testes t) para testar se o declive é diferente de zero; a diferença entre declives de regressão foi testada por análise de covariância (ANCOVA).

Para valores de $p < 0.05$, considerou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas.

As curvas de dinâmica dos RISTs ao longo do tempo foram obtidas a partir da média das taxas de perfusão de glucose ($\text{mg glucose} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) durante os RISTs, traçadas a intervalos de 0.1 min, recorrendo ao programa Microsoft Excel (Microsoft, EUA).

Utilizaram-se os programas Prism v4.0 (GraphPad Software Inc., EUA) e Stata v9.2 (StataCorp LP, EUA) para o tratamento estatístico dos dados, bem como para elaboração dos gráficos de barras e de regressão linear.

**4. EFEITO DA COMPOSIÇÃO DA REFEIÇÃO NA
POTENCIAÇÃO DA ACÇÃO DA INSULINA:
MECANISMO DEPENDENTE DA HISS**

4. EFEITO DA COMPOSIÇÃO DA REFEIÇÃO NA POTENCIAÇÃO DA ACÇÃO DA INSULINA: MECANISMO DEPENDENTE DA HISS

4.1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A libertação da HISS é regulada fisiologicamente pelo estado prandial. A activação da via da HISS que ocorre após uma refeição e que permite o rápido aporte de glucose pelas células do músculo esquelético constitui uma importante protecção contra os efeitos nocivos do aumento de glicémia no estado pós-prandial. Com efeito, trabalhos anteriores realizados em animais anestesiados mostraram que a sensibilidade à insulina no estado pós-prandial é superior à sensibilidade à insulina após 24 h de jejum (Lautt *et al.*, 2001). Adicionalmente, Latour e Lautt observaram que o consumo de uma refeição sólida é capaz de potenciar a sensibilidade à insulina dependente da HISS em animais conscientes e jejuados durante 24 h (Latour e Lautt, 2002b). No entanto, nesses estudos, não se controlou a composição, quantidade da comida ingerida, nem o tempo durante o qual ocorreu essa ingestão. Esta questão foi contornada através do recurso à administração endogástrica com agulha de *gavage*, que resultou num aumento da sensibilidade à insulina (do jejum para o pós-prandial), apesar desta técnica acarretar algum *stress* para o animal (Lautt *et al.*, 2001, observações não publicadas).

Com o intuito de estudar a variação da sensibilidade à insulina dependente da HISS com a ingestão de diferentes refeições, foi desenvolvida uma nova metodologia. No presente modelo, administrou-se uma solução líquida contendo um ou mais nutrientes directamente no estômago ou no duodeno, através de um catéter (gástrico para administração *ig*; entérico para administração *intra-enterica*), num determinado volume e a uma velocidade pré-definida. Este modelo foi aplicado com sucesso a animais

anestesiados e conscientes, sendo que no caso destes últimos (modelo crónico), a cirurgia de implantação dos catéteres (gástrico e vasculares) foi realizada aproximadamente uma semana antes de se efectuarem os testes de sensibilidade à insulina.

O objectivo do estudo descrito neste capítulo foi testar qual a capacidade de refeições líquidas com diferentes composições para potenciar a acção da insulina e avaliar o envolvimento da HISS neste processo.

Assim, estudou-se o efeito da administração ig de duas soluções glicídicas (D-glucose e sacarose) e de uma solução mista comercial, aqui designada por “refeição líquida mista”, constituída por glícidos, lípidos e proteínas, na sensibilidade à insulina. Estes estudos foram efectuados em animais anestesiados e conscientes, a fim de testar também se a anestesia interfere com a potenciação da acção da insulina. O envolvimento da via da HISS na potenciação da sensibilidade à insulina foi testado através da deservação do plexo anterior hepático e da administração de atropina. Adicionalmente, efectuou-se a administração da refeição líquida mista por via intra-entérica, a fim de testar a importância do estômago e/ou do intestino na activação da via da HISS e na potenciação da sensibilidade à insulina no estado pós-prandial.

4.2. PROTOCOLOS

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados conforme descrito na secção 3.4.

O RIST foi o método utilizado para avaliar a sensibilidade à insulina (secção 3.9).

Em todos os protocolos experimentais apresentados neste capítulo foram utilizados ratos Sprague-Dawley (n=79), anestesiados (modelo agudo) ou no estado consciente (modelo crónico). Todos os animais foram sujeitos a um jejum de 24 hrs, iniciado na véspera da experiência.

Após a realização de um RIST controlo, no estado de jejum, administraram-se os diferentes tipos de refeição líquida por via intragástrica (ig), na dose de 10 ml/kg ou 20 ml/kg e passados 90 min, testou-se o seu efeito na sensibilidade à insulina, através da realização de um segundo RIST (RIST pós-refeição). No caso dos animais testados no estado consciente, realizou-se ainda um terceiro RIST, após atropina (1 mg/kg, iv).

A administração de atropina (modelo crónico) e a ablação dos nervos parassimpáticos hepáticos (modelo agudo, testados sob anestesia) foram utilizados para bloqueio da via da HISS (Xie *et al.*, 1993; Xie e Lutt, 1996b; Ribeiro *et al.*, 2002).

Para avaliar se a activação da via da HISS ocorria no estômago ou no intestino, recorreu-se ao modelo agudo. Assim, durante a cirurgia colocou-se uma banda intestinal, próxima do piloro de forma a impedir a passagem dos alimentos entre o estômago e o intestino (capítulo 3.4); a refeição líquida mista foi administrada por via ig ou por via intra-entérica. Em ambos os casos realizou-se um RIST antes (RIST controlo) e outro depois (RIST pós-refeição) da administração da refeição líquida mista. No grupo que recebeu a refeição por via intra-entérica, administrou-se ainda atropina, após o que se realizou um terceiro RIST.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAGÁSTRICA DE ÁGUA NA SENSIBILIDADE À INSULINA NO MODELO AGUDO

A administração ig de água destilada (20 ml/kg) serviu o propósito de testar o efeito do estiramento mecânico do estômago, sem a presença de nutrientes orgânicos, na sensibilidade à insulina.

Na figura 4.1 apresentam-se os resultados destas experiências.

Os ratos, anestesiados e em jejum (266.7 ± 6.3 g de peso; $n=8$), apresentavam uma glicémia arterial basal de 86.6 ± 4.7 mg/dl e uma pressão arterial média de 92.9 ± 3.8 mmHg. Após a administração ig de água, imediatamente antes da realização do RIST pós-água, a glicémia apresentava o valor de 87.2 ± 5.2 mg/dl, sendo a pressão arterial média 85.1 ± 1.9 mmHg.

A sensibilidade à insulina no estado de jejum, determinada pelo RIST índice controlo, foi de 95.2 ± 4.5 mg glucose/kg bw (figura 4.1). Após a administração ig de água, a sensibilidade à insulina não variou significativamente (RIST índice pós-água, 88.8 ± 3.1 mg glucose/kg bw, figura 4.1).

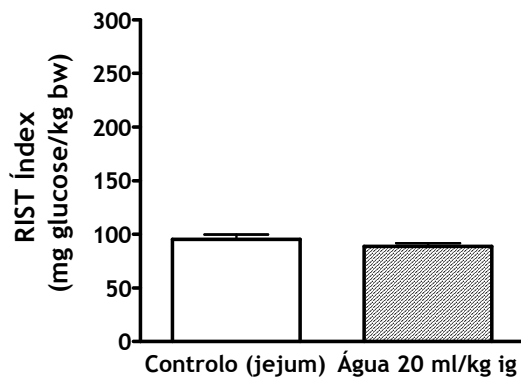


Figura 4.1: Efeito da água destilada na sensibilidade à insulina. Em ratos Sprague-Dawley anestesiados e no estado de jejum ($n=8$), a administração intragástrica (ig) de água destilada (20 ml/kg) não potencia a sensibilidade à insulina (RIST índice). Os resultados são média \pm SEM. Teste *t-student*.

A variação da sensibilidade à insulina após administração de água correspondeu a uma inibição de 6.1 ± 3.0 % da sensibilidade à insulina (figura 4.9). O estiramento mecânico do estômago por si só não parece afectar a sensibilidade à insulina.

4.3.2. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAGÁSTRICA DE SOLUÇÕES GLICÍDICAS NA SENSIBILIDADE À INSULINA NO MODELO AGUDO

Nestas experiências testou-se o efeito de potenciação da acção da insulina induzido pela administração ig de soluções aquosas de sacarose (329.0 mg/ml) e glucose (173.0 mg/ml), nas doses de 10 ml/kg e 20 ml/kg, a dois grupos de ratos anestesiados.

4.3.2.1. Efeito da sacarose intragástrica na sensibilidade à insulina em animais anestesiados

Na figura 4.2 apresentam-se os efeitos da administração ig de uma solução de sacarose, nas doses de 10 ml/kg e 20 ml/kg, na sensibilidade à insulina.

Sacarose 10 ml/kg, ig, modelo agudo

No primeiro grupo de animais ($n=6$), com 273.6 ± 13.1 g de peso, a glicémia arterial basal em jejum era 84.0 ± 2.7 mg/dl, sendo de 104.9 ± 2.3 mg/dl ($p < 0.001$) aquando da realização do RIST pós-sacarose (10 ml/kg, ig). A pressão arterial média era 92.0 ± 5.2 mmHg no estado de jejum e 91.5 ± 4.0 mmHg no início do RIST pós-sacarose.

Estes animais apresentavam um RIST índice controlo (jejum) de 97.5 ± 4.3 mg glucose/kg bw. A administração ig da solução de sacarose na dose de 10 ml/kg (ig) não resultou num aumento significativo da sensibilidade à insulina, sendo o RIST índice pós-sacarose ig de 107.1 ± 4.9 mg glucose/kg bw, semelhante ao observado para o estado de

jejum (figura 4.2). Esta variação no RIST índice, induzida pela sacarose 10 ml/kg, traduziu-se numa potenciação da sensibilidade à insulina de apenas 10.8 ± 6.2 % relativamente ao jejum (figura 4.9).

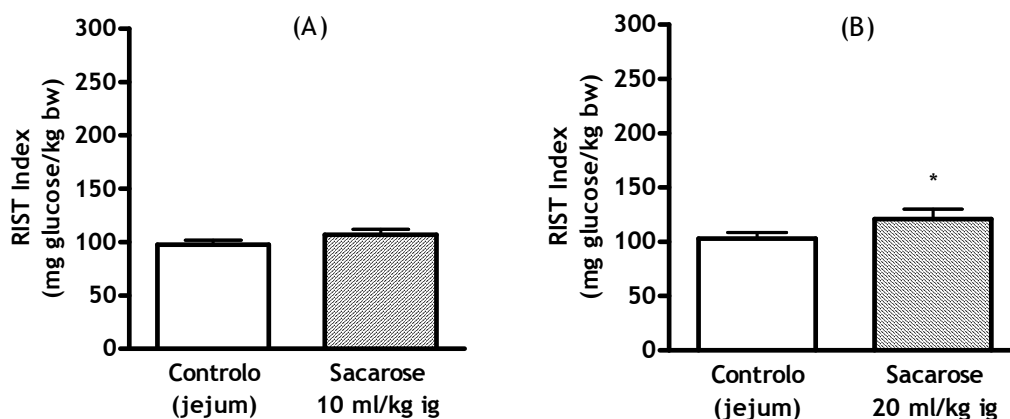


Figura 4.2: Efeito da administração intragástrica (ig) de sacarose na potenciação da sensibilidade à insulina. A administração ig de sacarose não parece ser eficaz na potenciação da acção da insulina (RIST índice) que ocorre entre o jejum e o pós-prandial, em ratos Sprague-Dawley anestesiados: (A) na dose de 10 ml/kg (n=6), a sacarose não afecta a sensibilidade à insulina; (B) quando a dose de sacarose administrada é duplicada (20 ml/kg; n=7) há apenas um ligeiro, mas significativo aumento da sensibilidade à insulina. Os resultados são a média \pm SEM. * $p < 0.05$ vs controlo (jejum) do grupo de sacarose 20 ml/kg (teste *t-student*).

Sacarose 20 ml/kg, ig, modelo agudo

Ao segundo grupo de animais anestesiados (250.1 ± 5.5 g de peso; n=7) foi administrada a solução de sacarose na dose de 20 ml/kg (ig). Em jejum, estes ratos apresentavam uma glicémia basal de 88.2 ± 2.6 mg/dl e pressão arterial média de 94.3 ± 3.0 mmHg. Após a administração de sacarose (início do RIST), a glicémia e a pressão arterial média eram 115.9 ± 4.7 mg/dl ($p < 0.01$) e 90.7 ± 4.8 mmHg, respectivamente.

O RIST índice controlo (jejum) foi 103.2 ± 5.4 mg glucose/kg bw. Após a administração ig da sacarose 20 ml/kg, a sensibilidade à insulina aumentou ligeiramente (RIST índice pós-sacarose 20 ml/kg: 120.9 ± 9.5 mg glucose/kg bw; $p < 0.05$) (figura 4.2), o

que se traduz numa potenciação de 17.0 ± 6.9 %, estatisticamente semelhante à potenciação induzida pela dose de 10 ml/kg de sacarose (figura 4.9).

4.3.2.2. Efeito da glucose intragástrica na sensibilidade à insulina em animais anestesiados

Nesta série de experiências a solução de glucose foi administrada por via ig, nas doses de 10 ml/kg ou de 20 ml/kg. Os resultados obtidos encontram-se na figura 4.3.

Glucose 10 ml/kg, ig, modelo agudo

Os ratos utilizados no protocolo de 10 ml/kg (n=6) pesavam 262.1 ± 7.4 g. No estado basal (jejum), estes animais apresentavam uma glicémia arterial de 88.4 ± 4.8 mg/dl e pressão arterial média de 101.0 ± 4.1 mmHg. A glicémia após administração de glucose, no início do RIST pós-glucose, era 107.9 ± 4.3 mg/dl ($p < 0.001$) e a pressão arterial média era 93.0 ± 6.4 mmHg.

O RIST índice controlo (jejum) foi 108.5 ± 6.6 mg glucose/kg bw. Após a administração de glucose (10ml/kg, ig), o RIST índice foi 119.9 ± 7.1 mg glucose/kg bw, semelhante ao RIST índice controlo (figura 4.3). O aumento de sensibilidade à insulina observado corresponde a uma potenciação de apenas 12.9 ± 10.2 % (figura 4.9).

Glucose 20 ml/kg, ig, modelo agudo

No protocolo de administração ig de glucose na dose de 20 ml/kg, os animais (n=6) pesavam 241.6 ± 3.6 g, apresentavam uma glicémia em jejum de 86.6 ± 2.9 mg/dl, e uma pressão arterial média de 97.4 ± 5.7 mmHg. No início do RIST pós-glucose (20 ml/kg, ig), a glicémia era 121.0 ± 6.4 mg/dl ($p < 0.01$) e a pressão arterial média 94.3 ± 3.9 mmHg.

O RIST índice controlo foi 99.2 ± 6.0 mg glucose/kg bw, diminuindo para 83.0 ± 7.6 mg glucose/kg bw após a administração ig de glucose, embora a diferença não seja

estatisticamente significativa (figura 4.3). Esta diminuição correspondeu a uma inibição de $15.2 \pm 9.7\%$ relativamente ao estado de jejum (figura 4.9).

Assim, nem a administração ig de glucose, nem de sacarose, em qualquer das doses testadas (10 ml/kg e 20 ml/kg), parecem ter a capacidade de potenciar significativamente a acção da insulina.

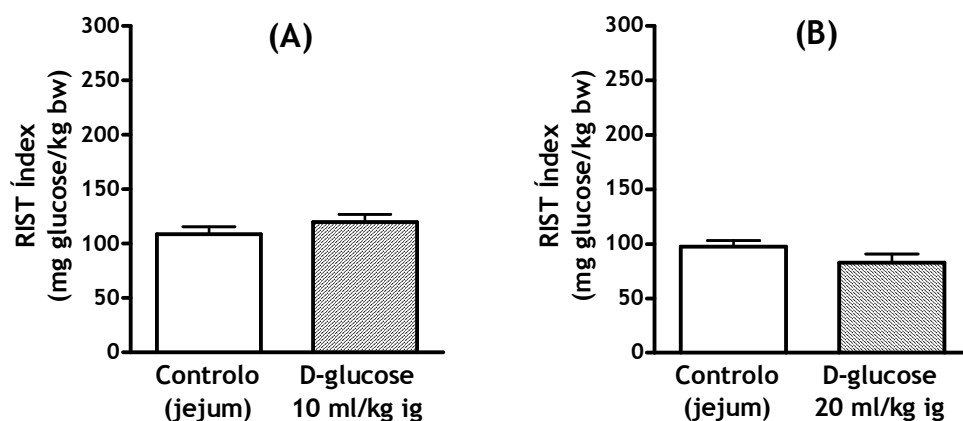


Figura 4.3: Efeito da administração intragástrica (ig) de glucose na potenciação da sensibilidade à insulina. A D-glucose não potencia a sensibilidade à insulina (RIST index) do jejum para o pós-prandial em ratos Sprague-Dawley, em nenhuma das doses testadas: (A) dose de 10 ml/kg (n=6); (B) dose de 20 ml/kg (n=6). Os resultados são a média \pm SEM. Teste *t-student*.

4.3.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAGÁSTRICA DA REFEIÇÃO LÍQUIDA MISTA NA SENSIBILIDADE À INSULINA NO MODELO AGUDO

A solução mista testada neste protocolo é uma refeição líquida comercial (Boost, Mead Johnson Nutritional, Canadá), composta por derivados glicídicos (173.0 mg/ml), proteicos (42.2 mg/ml) e lipídicos (16.9 mg/ml) e, por isso, aqui designada por refeição líquida mista (tabela VI, do capítulo 3). Nos animais anestesiados, a refeição líquida mista foi administrada por via ig nas doses de 10 ml/kg e 20 ml/kg.

Refeição líquida mista 10 ml/kg, ig, modelo agudo

Num primeiro grupo de ratos (255.7±3.2 g de peso; n=9) foi testada a dose de 10 ml/kg de refeição líquida mista (Boost) por via ig.

A glicémia basal nestes animais, no estado de jejum, era 86.3±1.7 mg/dl. Imediatamente antes da realização do RIST pós-refeição mista, a glicémia arterial era 103.4±2.2 mg/dl ($p<0.001$). A pressão arterial média basal era 96.2±3.6 mmHg no estado de jejum e 89.2±4.2 mmHg pós-refeição mista.

Observou-se que o RIST índice controlo (jejum) foi de 99.6±5.8 mg glucose/kg bw. Após a administração da refeição líquida mista, a sensibilidade à insulina aumentou significativamente ($p<0.001$), sendo o RIST índice pós-refeição mista 156.3±6.6 mg glucose/kg bw (figura 4.4). A diferença de RIST índice pós-refeição mista e jejum foi de 56.7±8.0 mg glucose/kg bw, o que corresponde a uma potenciação da acção da insulina de 60.7±11.0 % relativamente ao observado no estado de jejum (figura 4.9).

Refeição líquida mista 20 ml/kg, ig, modelo agudo

Ao segundo grupo de animais anestesiados (264.2±6.6 g, n=11), a refeição líquida mista (Boost) foi administrada na dose de 20 ml/kg (ig).

No estado de jejum, os animais apresentavam uma glicémia basal de 87.5±2.6 mg/dl e pressão arterial média de 96.7±3.2 mmHg, passando para 106.8±2.2 mg/dl ($p<0.001$) e 89.2±3.0 mmHg ($p<0.05$), respectivamente, imediatamente antes da realização do RIST pós-refeição mista, isto é, cerca de 90 min após a administração ig da refeição.

O RIST índice controlo foi de 96.8±4.1 mg glucose/kg bw, o qual aumentou significativamente após a ingestão da refeição líquida mista (161.5±10.2 mg glucose/kg bw; $p<0.001$), como se pode observar na figura 4.4. A sensibilidade à insulina obtida após a administração ig da refeição líquida mista na dose de 20 ml/kg foi semelhante à

obtida após administração da refeição na dose de 10 ml/kg (figura 4.4). A diferença de RIST index observada entre o estado de jejum e após a administração ig da refeição (64.7 ± 8.8 mg glucose/kg bw) corresponde a uma potenciação de 67.0 ± 9.0 % da sensibilidade à insulina, que também não difere significativamente da percentagem de potenciação observada após administração da refeição mista na dose de 10 ml/kg (figura 4.9).

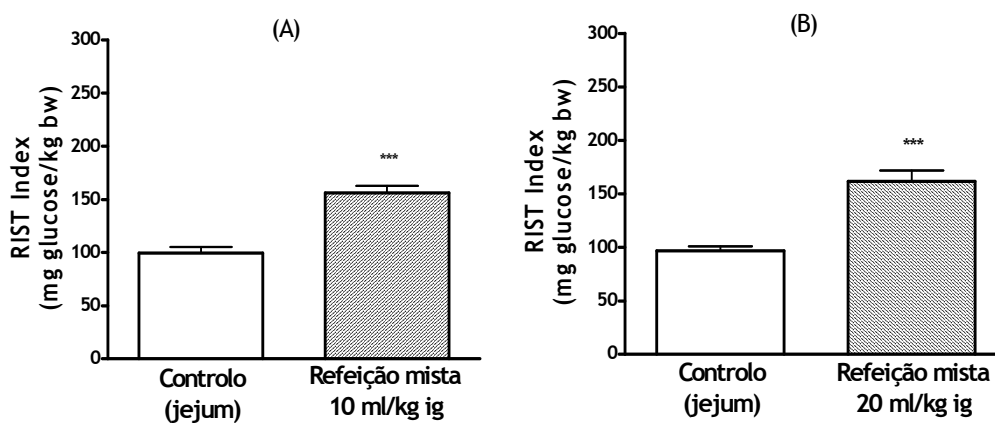


Figura 4.4: Efeito da refeição mista na acção da insulina. A administração intragástrica (ig) da refeição líquida mista (proteínas, 42.2 mg/ml; lípidos, 16.9 mg/ml; glúcidos, 173.0 mg/ml) a ratos Sprague-Dawley anestesiados e em jejum potenciou a sensibilidade à insulina (RIST index), tanto (A) na dose de 10 ml/kg ($n=9$); como (B) na dose de 20 ml/kg ($n=11$), sendo o RIST index pós-refeição mista semelhante para as duas doses. Os resultados são a média \pm SEM. *** $p < 0.001$, relativamente ao controlo (jejum), para ambas as doses (teste *t-student*).

A potenciação da acção da insulina induzida por uma refeição parece depender da composição dessa refeição. Com efeito, estes resultados sugerem que uma refeição constituída por glúcidos, lípidos e proteínas é capaz de potenciar a acção da insulina, ao contrário de uma refeição puramente glicídica.

4.3.4. EFEITO DA DESNERVAÇÃO HEPÁTICA NA POTENCIAÇÃO DA ACÇÃO DA INSULINA INDUZIDA PELA REFEIÇÃO LÍQUIDA MISTA NO MODELO AGUDO

Estes animais (249.3 ± 4.4 g de peso, $n=7$) foram testados sob anestesia. Durante a preparação cirúrgica foi realizada a desnervação do plexo anterior hepático, conforme descrito no capítulo 3.4. Testou-se o efeito potenciador da acção da insulina provocado pela administração ig da refeição líquida mista comercial (Boost, Mead Johnson Nutritional, 10 ml/kg) nos animais desnervados. Estes resultados são apresentados na figura 4.5.

A glicémia arterial basal em jejum era 89.3 ± 2.7 mg/dl e a pressão arterial média era 87.4 ± 6.8 mmHg. Após a refeição líquida mista, a glicémia basal era 103.2 ± 1.7 mg/dl ($p < 0.001$) e a pressão arterial média era 80.4 ± 6.1 mmHg.

Nos animais desnervados, o RIST índice controlo (jejum) foi 107.9 ± 6.7 mg glucose/kg bw (figura 4.5). Após a administração da refeição mista, a sensibilidade à insulina não variou significativamente, apresentando um RIST índice de 102.5 ± 8.5 mg glucose/kg bw (figura 4.5), o que sugere que a activação dos nervos parassimpáticos hepáticos é necessária para potenciar a sensibilidade à insulina em resposta à ingestão de uma refeição mista.

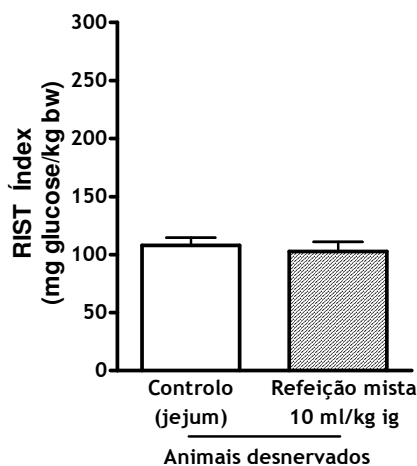


Figura 4.5: Efeito da desnervação hepática na potenciação da acção da insulina induzida pela refeição mista. A desnervação do plexo anterior hepático, efectuada antes da administração intragástrica (ig) da refeição líquida mista, impediu a potenciação da sensibilidade à insulina ($n=7$), sugerindo que a activação da sensibilidade à insulina após a refeição depende dos nervos parassimpáticos hepáticos. Os resultados são a média \pm SEM. Teste *t-student*.

Desta forma, a via da HISS parece estar envolvida na potenciação da acção da insulina após uma refeição mista.

4.3.5. EFEITO DA GLUCOSE INTRAGÁSTRICA NA SENSIBILIDADE À INSULINA DEPENDENTE DA HISS NO MODELO CRÓNICO

Nestas experiências, os ratos foram testados no estado consciente (n=7). No dia da realização dos testes de sensibilidade à insulina, o seu peso corporal (260.9 ± 5.0 g) era semelhante ao observado no dia da cirurgia (252.5 ± 8.8 g). Aos animais em jejum, administrou-se D-glucose (10 ml/kg) por via ig, após o que se administrou atropina (1 mg/kg, iv) para bloquear a via da HISS.

No estado de jejum, a glicémia arterial basal era 89.2 ± 5.3 mg/dl e a pressão arterial média era 90.0 ± 3.2 mmHg. Noventa minutos após a administração da glucose, a glicémia e a pressão arterial média eram 124.7 ± 9.9 mg/dl ($p < 0.01$) e 78.5 ± 4.0 mmHg, respectivamente, não variando significativamente após a administração de atropina (glicémia, 125.1 ± 16.7 mg/dl; pressão arterial, 78.3 ± 4.4 mmHg).

A sensibilidade à insulina no estado de jejum, determinada pelo RIST índice controlo, foi de 119.9 ± 7.5 mg glucose/kg bw, aumentando ligeiramente (não significativo) para 152.8 ± 18.6 mg glucose/kg bw, após a ingestão da D-glucose (figura 4.6), o que correspondeu a uma potenciação de 27.6 ± 14.3 % da sensibilidade à insulina (figura 4.9). A administração de atropina, efectuada após a realização do RIST pós-glucose, também não afectou significativamente a sensibilidade à insulina, embora o RIST pós-atropina (115.0 ± 12.6 mg glucose/kg bw) se tenha aproximado mais do valor de RIST índice no estado de jejum (figura 4.6).

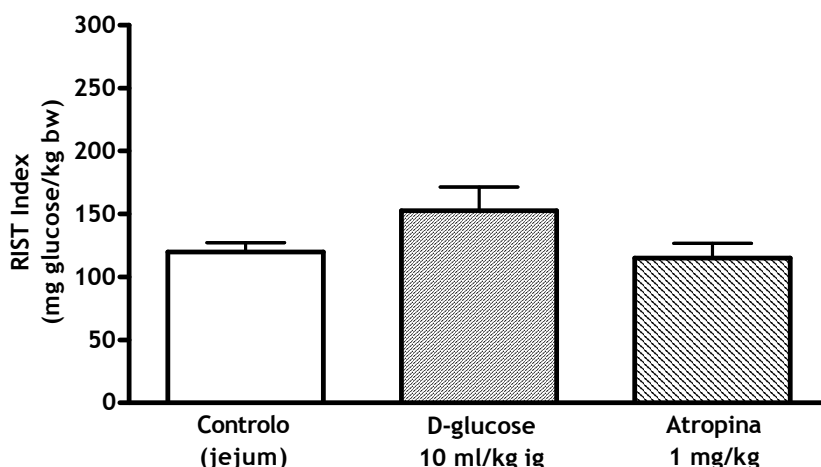


Figura 4.6: Efeito da atropina na acção da insulina após administração intragástrica (ig) de glucose em animais conscientes. A administração ig da solução aquosa de D-glucose (10 ml/kg) a ratos Sprague-Dawley conscientes no estado de jejum (n=7) não potencia a sensibilidade à insulina (RIST índice). A subsequente administração de atropina (1 mg/kg, iv) também não afecta a sensibilidade à insulina, o que sugere que a glucose por si só é ineficaz na estimulação do parassimpático, necessário para a activação da via da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS) após uma refeição. Os resultados são a média \pm SEM. Teste ANOVA (*repeated measures*), seguido do teste de Tukey-Kramer.

O RIST-pós atropina traduz a acção da insulina *per se*, isto é, independente da via da HISS. Uma vez que se considera que o RIST pós-prandial corresponde à sensibilidade total à insulina, ou seja, a acção da insulina *per se* mais a acção da insulina dependente da via da HISS, o cálculo da diferença entre o RIST índice pós-prandial e o RIST índice pós-atropina permite quantificar a sensibilidade à insulina dependente da HISS. No caso dos animais conscientes nos quais o estado pós-prandial foi ensaiado pela administração da refeição de glucose, a sensibilidade à insulina dependente da HISS foi 37.8 ± 12.3 mg glucose/kg bw, o que corresponde a 21.9 ± 5.7 % da sensibilidade total à insulina pós-glucose, conforme se pode observar na figura 4.8.

A administração ig de D-glucose não parece ser capaz de potenciar a acção da insulina em animais conscientes, à semelhança do que se observou nos animais anestesiados, o que parece ficar a dever-se à ineficácia na estimulação da via da HISS.

4.3.6. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAGÁSTRICA DA REFEIÇÃO LÍQUIDA MISTA NA SENSIBILIDADE À INSULINA DEPENDENTE DA HISS NO MODELO CRÓNICO

Nestas experiências, também realizadas em animais conscientes (n=6), a refeição líquida mista (Boost, Mead Johnson Nutritionals) foi administrada por via ig na dose de 10 ml/kg. O peso corporal dos animais no dia da experiência (258.2±5.7 g) era semelhante ao do dia da cirurgia (265.1±10.8 g).

Em jejum, a glicémia era 85.1±1.0 mg/dl e a pressão arterial média 94.0±4.3 mmHg. Após a administração ig da refeição líquida mista (no início do RIST pós-refeição mista) a glicémia era 115.9±3.3 mg/dl ($p<0.001$) e a pressão sanguínea 88.0±4.9 mmHg. Nem a glicémia (104.7±5.2 mg/dl) nem a pressão arterial (88.0±4.7 mmHg) foram afectadas pela subsequente administração de atropina.

O RIST índice controlo foi 138.8±8.2 mg glucose/kg bw e aumentou para 258.9±12.6 mg glucose/kg bw ($p<0.001$) após a ingestão da refeição líquida mista (figura 4.7). Este RIST índice pós-refeição mista é significativamente superior ($p<0.001$) ao observado após administração de glucose, também no estado consciente.

O aumento de sensibilidade à insulina em resposta à refeição líquida mista corresponde a uma potenciação da acção da insulina de 90.4±15.5 % relativamente ao jejum e significativamente superior à potenciação da acção da insulina induzida pela administração ig de glucose (27.6±14.3 %; $p<0.05$) (figura 4.9). O incremento de sensibilidade à insulina em resposta à ingestão da refeição mista parece ainda ser ligeiramente superior nos animais conscientes em comparação com o observado nos animais anestesiados, independentemente da dose, embora a diferença não seja estatisticamente significativa. Esta observação não parece dever-se a diferenças de volume ou conteúdo calórico das refeições administradas, uma vez que a duplicação do volume de refeição (de 10 ml/kg para 20 ml/kg) não produziu qualquer variação na

sensibilidade à insulina. A comparação da potenciação da acção da insulina em resposta aos diferentes tipos de refeições e doses estudados é apresentada na figura 4.9.

A administração de atropina induziu uma diminuição significativa ($p < 0.001$) da sensibilidade à insulina pós-refeição mista, observando-se um valor de RIST índice pós-atropina de 139.2 ± 6.3 mg glucose/kg bw, semelhante ao observado no estado de jejum (figura 4.7).

Na figura 4.7 apresentam-se os RISTs índice no estado jejum, pós-refeição mista e pós-atropina.

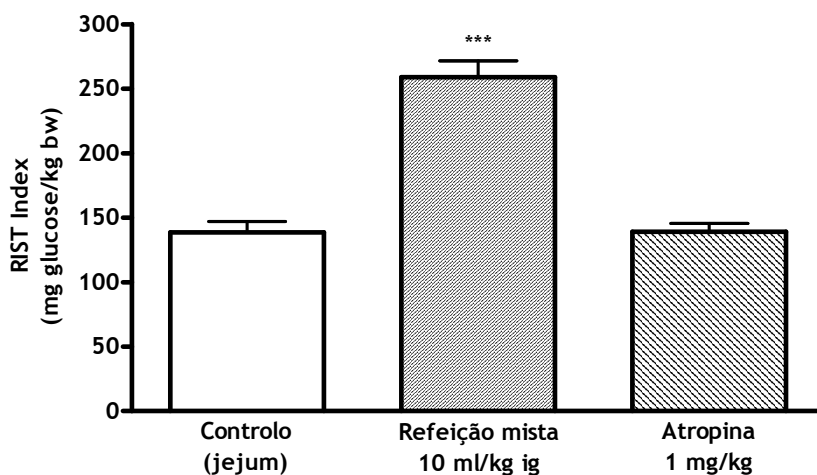


Figura 4.7: Efeito da atropina na potenciação da acção da insulina induzida pela refeição mista em animais conscientes. A administração intragástrica (ig) da refeição líquida mista (10 ml/kg) a ratos conscientes e em jejum ($n=6$) induziu um aumento significativo da sensibilidade à insulina (RIST índice), o qual foi posteriormente inibido pela administração de atropina (1 mg/kg, iv). A sensibilidade à insulina pós-atropina é semelhante à sensibilidade à insulina em jejum. Os resultados são média \pm SEM. *** $p < 0.001$, em relação aos grupos controlo (jejum) e pós-atropina (teste *repeated measures* ANOVA, seguido de Tukey-Kramer).

Subtraindo o RIST índice pós-atropina ao RIST índice pós-refeição, determinou-se a sensibilidade à insulina dependente da via da HISS: 119.7 ± 10.5 mg glucose/kg bw (figura 4.8). Assim, a contribuição da HISS para a sensibilidade à insulina após

administração ig da refeição mista é significativamente superior ($p < 0.001$) à observada após administração ig de glucose, nos animais conscientes.

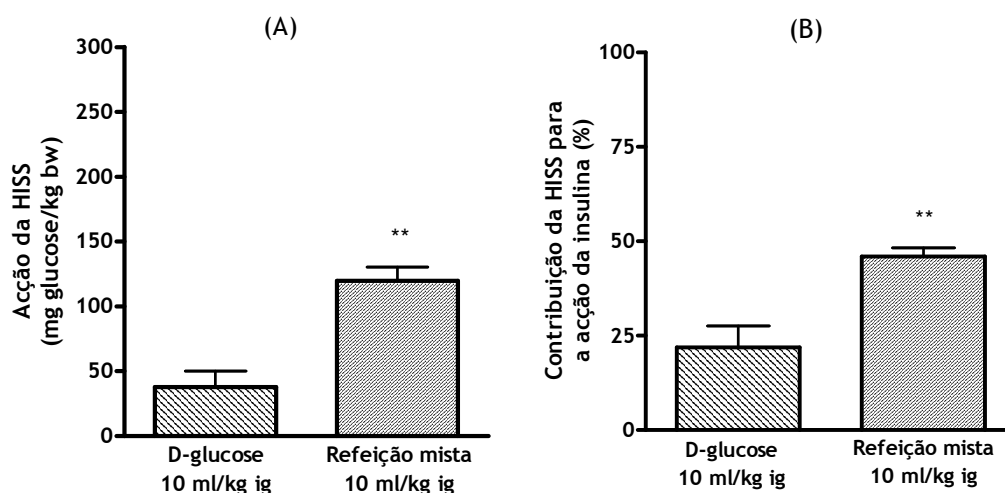


Figura 4.8: Acção da insulina dependente da HISS em animais conscientes, após administração de glucose ou refeição mista. A acção da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS) em animais conscientes é maior após administração intragástrica (ig) da refeição líquida mista (42.2 mg/ml de proteínas, 16.9 mg/ml de lípidos e 173.0 mg/ml de glicídios; 10 ml/kg; n=6) do que após a refeição de D-glucose (173.0 mg/ml; n=7). (A) A acção da insulina dependente da HISS é maior nos animais que receberam a refeição mista (119.7 ± 10.5 mg glucose/kg bw) do que naqueles que receberam a glucose (37.8 ± 12.3 mg glucose/kg bw). (B) A percentagem de acção da insulina dependente da HISS também é maior após a refeição mista ($45.9 \pm 2.4\%$) do que após a glucose ($21.9 \pm 5.7\%$). Os resultados são a média \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs D-glucose, em ambos os grupos (teste *repeated measures* ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer).

Em termos percentuais, a componente de acção da insulina dependente da HISS representou $45.9 \pm 2.4\%$ (figura 4.8) da sensibilidade total à insulina após a administração ig da refeição mista, também superior ao observado após a administração ig de glucose ($p < 0.01$). Na figura 4.8 comparam-se os diferentes efeitos da administração ig da refeição líquida mista com os da administração ig de D-glucose na sensibilidade à insulina dependente da via da HISS, nos animais conscientes e aos quais foi administrada atropina.

De acordo com os resultados aqui apresentados, o incremento da sensibilidade à insulina que ocorre após a ingestão de uma refeição parece ser dependente da estimulação da via da HISS, a qual ocorre quando essa refeição é mista, isto é, composta por glúcidos, lípidos e proteínas, não se observando o mesmo efeito por ingestão de glúcidos. Com efeito, como se pode observar na figura 4.9, quer em animais anestesiados, quer em animais conscientes, a refeição mista é consideravelmente mais eficaz do que a glucose e do que a sacarose na potenciação da sensibilidade à insulina que ocorre do estado de jejum para o pós-prandial, em qualquer uma das doses testadas (10 ml/kg e 20 ml/kg, ig).

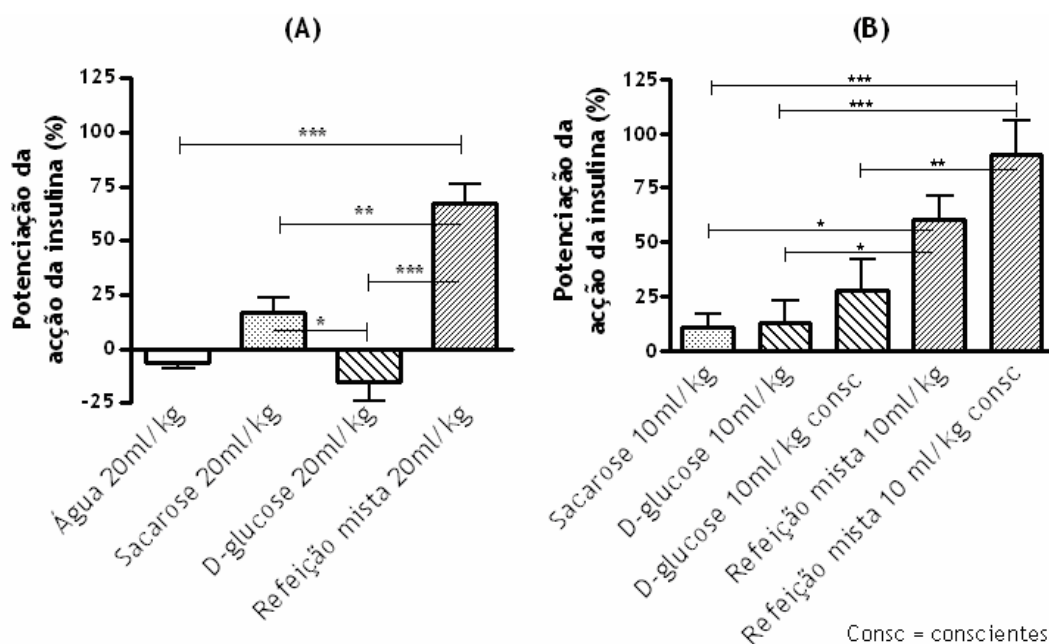


Figura 4.9: Percentagens de potenciação da acção da insulina induzida pelos vários tipos de refeição, em animais conscientes e anestesiados. A administração intragástrica (ig) da refeição líquida mista induz uma potenciação da sensibilidade à insulina significativamente superior à potenciação induzida por qualquer outra das refeições testadas (água, sacarose e D-glucose), em qualquer das doses utilizadas (10 ml/kg e 20 ml/kg) e tanto em animais conscientes (consc), como em animais anestesiados. (A) Comparação entre os grupos que receberam as refeições na dose de 20 ml/kg. (B) Comparação entre os grupos que receberam a dose de 10 ml/kg. Os resultados são a média \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (teste *repeated measures* ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer).

Os resultados obtidos sugerem que a administração ig da refeição líquida composta por proteínas, glícidos e lípidos (mista) é mais eficaz do que os outros tipos de refeição estudados na potenciação da acção da insulina. Este efeito é inibido pelo bloqueio ou ablação dos nervos parassimpáticos hepáticos, essenciais para a via da HISS. O aumento de sensibilidade à insulina observado após a ingestão da refeição mista parece dever-se à activação da via da HISS.

4.3.7. IMPORTÂNCIA DO INTESTINO NA POTENCIAÇÃO DA ACÇÃO DA INSULINA INDUZIDA PELA REFEIÇÃO LÍQUIDA MISTA

Com esta série de experiências, procurou determinar-se a importância do estômago e do intestino (duodeno) na potenciação da sensibilidade à insulina que ocorre após administração ig ou intra-entérica da refeição líquida mista (Boost, Mead Johnson Nutritional, 10 ml/kg). Os procedimentos cirúrgicos efectuados foram os descritos no capítulo 3.4 e incluíram o implante da banda intestinal de modo a impedir a passagem da refeição líquida mista do estômago para o duodeno e vice-versa. Todos os animais foram testados sob anestesia.

Os animais foram divididos em dois grupos: no primeiro grupo (n=3), administrou-se a refeição líquida mista por via ig; no segundo grupo (n=3), a administração foi efectuada por via intra-entérica, isto é, directamente no duodeno. Em ambos foi colocada uma banda gástrica.

Os animais do grupo de administração ig pesavam 310.0 ± 4.0 g e os animais do grupo de administração intra-entérica pesavam 323.7 ± 3.3 g. A glicémia arterial basal em jejum era 109.0 ± 18.5 mg/dl, nos animais de injeção ig da refeição e 95.8 ± 8.8 mg/dl, para os animais de administração intra-entérica. No início do RIST pós-refeição mista, as glicémias basais eram 135.4 ± 24.8 mg/dl (grupo ig) e 152.2 ± 19.3 mg/dl (grupo

intra-entérico). No grupo de administração intra-entérica, a glicémia não variou após a atropina (133.5 ± 14.6 mg/dl). A pressão arterial média em jejum era semelhante nos dois grupos (ratos ig, 92.5 ± 7.5 mmHg; ratos com administração intra-entérica, 95.0 ± 5.0 mmHg), não variando significativamente ao longo da experiência.

Conforme se pode observar na figura 4.10, nos animais em que a refeição foi administrada por via ig, a sensibilidade à insulina no estado de jejum (RIST índice controlo) foi 82.8 ± 6.4 mg glucose/kg bw e não variou significativamente após a administração ig da refeição mista (95.1 ± 19.0 mg glucose/kg bw). Nos animais em que a refeição foi administrada por via intra-entérica, o RIST índice controlo foi 88.4 ± 1.9 mg glucose/kg bw, tendo aumentado significativamente ($p < 0.001$) após a administração da refeição líquida mista (181.4 ± 1.9 mg glucose/kg bw) (figura 4.10).

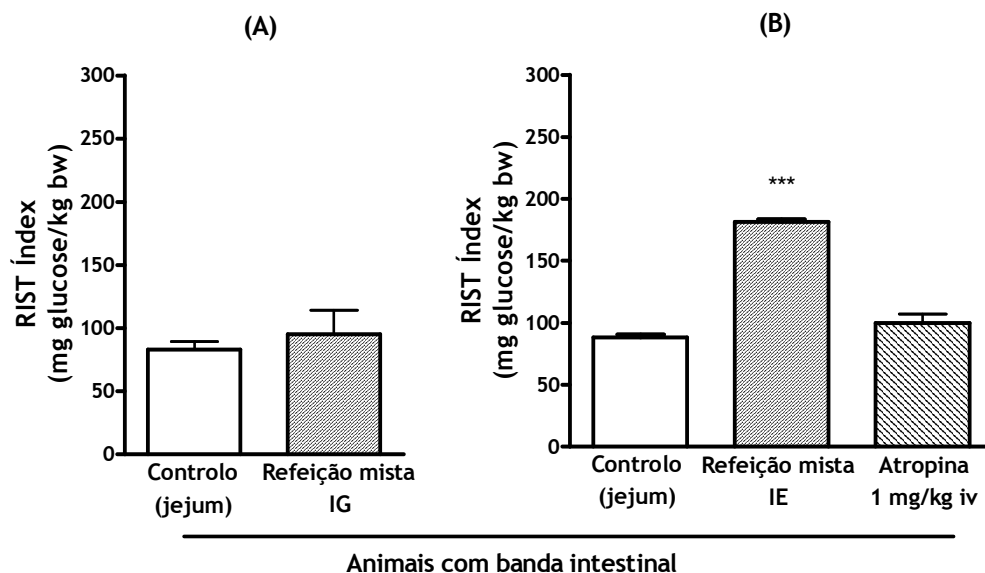
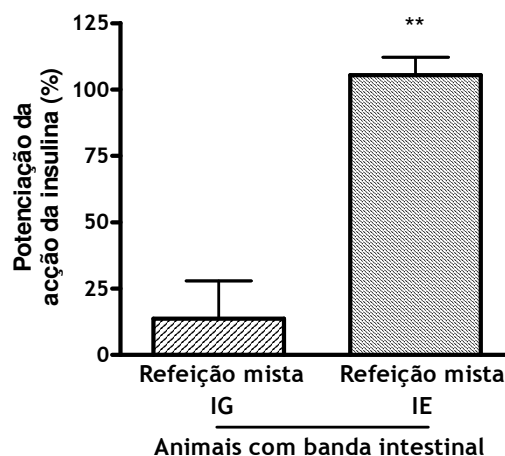


Figura 4.10: Efeito da inserção da banda intestinal na potenciação da acção da insulina induzida por uma refeição mista, administrada por via intragástrica (IG) ou por via intra-entérica (IE). O aumento da sensibilidade à insulina após administração da refeição líquida mista (10 ml/kg) a ratos Sprague-Dawley anestesiados requer a passagem para o duodeno. Em animais com banda intestinal, a refeição líquida mista: (A) não afecta a sensibilidade à insulina, quando a administração é por via intragástrica (IG, n=3); (B) aumenta significativamente a acção da insulina, quando a administração é efectuada por via intra-entérica (IE, n=3), num processo que é inibido pela atropina (1 mg/kg, iv). Os resultados são a média \pm SEM. *** $p < 0.001$, em relação aos grupos controlo (jejum) e atropina, em (B). Teste *t-student*, em (A); teste ANOVA (*repeated measures*), seguido de Tukey-Kramer, em (B).

O RIST index pós-refeição mista foi significativamente superior ($p < 0.001$) quando a refeição mista foi administrada por via intra-entérica. A subsequente administração de atropina nestes animais resultou numa diminuição significativa da sensibilidade à insulina ($p < 0.001$), sendo que o RIST index pós-atropina (99.9 ± 7.1 mg glucose/kg bw) foi semelhante ao observado no estado de jejum (figura 4.10).

Na figura 4.11 apresenta-se o cálculo da percentagem de potenciação da acção da insulina após a refeição mista (por via ig ou intra-entérica). A administração da refeição mista por via intra-entérica induz uma potenciação da sensibilidade à insulina substancialmente superior (105.4 ± 6.8 %) à administração ig (13.7 ± 14.1 %; $p < 0.01$).

Figura 4.11: Efeito da administração da refeição líquida mista por via intragástrica (IG) ou intra-entérica (IE), em animais com banda intestinal. A percentagem de potenciação da sensibilidade à insulina é significativamente maior após administração da refeição líquida mista por via intra-entérica (IE, $n=3$) do que por via intragástrica (IG, $n=3$). Resultados são média \pm SEM. $**p < 0.01$ (teste *t-student*).



Estes resultados sugerem que a potenciação da sensibilidade à insulina induzida pela ingestão de uma refeição mista requer a passagem para o intestino delgado e depende da actividade dos nervos parassimpáticos, a qual é essencial para a activação da via da HISS.

4.4. DISCUSSÃO

A realização destes estudos teve como objectivo comparar os efeitos da administração ig de refeições líquidas com diferentes composições na sensibilidade à insulina, bem como determinar qual o envolvimento dos nervos parassimpáticos hepáticos, e portanto da via da HISS, no aumento da acção da insulina que se observa do jejum para o pós-prandial. Pretendeu-se ainda estudar qual o principal órgão do tracto gastrointestinal inferior envolvido na sinalização alimentar que leva à potenciação da sensibilidade à insulina após administração de uma refeição.

Nem a solução de D-glucose nem a solução de sacarose foram capazes de potenciar eficazmente a sensibilidade à insulina em jejum, comparativamente ao observado após administração da refeição mista. A água, administrada como controlo de volume, também não afectou a sensibilidade à insulina.

Por outro lado, a refeição líquida mista, composta por glúcidos, lípidos e proteínas, induziu um aumento significativo da sensibilidade à insulina, tanto no modelo crónico (ratos conscientes) como no modelo agudo (ratos anestesiados). A desnervação cirúrgica dos nervos parassimpáticos hepáticos impediu que a posterior ingestão da refeição mista induzisse a potenciação da acção da insulina e a administração de atropina após ingestão da refeição mista induziu um decréscimo significativo da sensibilidade à insulina, a qual baixou para valores semelhantes aos do jejum e aos dos ratos desnervados. Observou-se ainda que o mecanismo de activação da via da HISS parece ser iniciado no intestino.

A activação da via da HISS parece ser a responsável pelo aumento da sensibilidade à insulina após a ingestão de uma refeição mista.

Considerações metodológicas

O método mais directo para quantificar o aumento da sensibilidade à insulina induzido por uma refeição é comparar a sensibilidade à insulina no estado de jejum com a sensibilidade à insulina após a ingestão da refeição. No entanto, a ingestão de alimentos em ratos alimentados *ad libitum* não é rigorosamente controlada, uma vez que os ratos não consomem voluntariamente um volume *standard* de refeição sólida e não o fazem num intervalo de tempo pré-definido.

Visto que nos presentes estudos se pretendia avaliar com o máximo de rigor o efeito da ingestão de diferentes refeições na sensibilidade à insulina, desenvolveu-se o modelo de cateterização gástrica, o qual permite administrar de forma rápida e rigorosa volumes variáveis de soluções líquidas directamente no estômago, tanto em animais anestesiados como em animais conscientes. A inserção cirúrgica deste catéter gástrico não revelou quaisquer complicações pós-cirúrgicas, não se tendo observado alterações da sensibilidade à insulina induzidas por este procedimento, quando se comparam os dados obtidos com dados anteriormente publicados.

As refeições foram administradas por via ig nos volumes de 10 ml/kg e 20 ml/kg. Ambos os volumes utilizados são adequados para a administração de soluções por via ig, sendo que 20 ml/kg é o volume máximo recomendado para administração endogástrica (*gavage*) a ratos conscientes (Sharp e LaRegina, 1998). Apesar disso, nos protocolos envolvendo animais conscientes, optou-se pela administração de uma dose adequada. Com efeito, observou-se que a dose de 10 ml/kg é capaz de causar um aumento considerável do volume do estômago, sem que no entanto cause desconforto aparente no animal consciente, não se tendo observado quaisquer alterações comportamentais durante ou após a administração da refeição líquida, independentemente da composição da refeição administrada. Para além disso, não se observaram grandes diferenças entre as doses de 10 ml/kg e 20 ml/kg.

Embora a literatura seja um pouco omissa no que respeita aos volumes recomendados para administrações intra-entéricas, optou-se por efectuar esse estudo recorrendo apenas à dose de 10 ml/kg e só em animais do modelo agudo (anestesiados). Também aqui não se observaram alterações significativas do estado do animal com a administração da refeição líquida.

Modelo crónico vs modelo agudo

O modelo crónico (animais no estado consciente) utilizado para testar a sensibilidade à insulina antes e depois da administração de refeições líquidas, embora mais complexo e necessitado de maior acompanhamento do que o modelo agudo, foi bem tolerado. Como referido anteriormente, a administração ig de 10 ml/kg dessas refeições também não produziu alterações significativas no comportamento dos animais, para além das normais alterações de glicémia e pressão arterial, normalmente observadas após a ingestão de uma refeição. Também não houve qualquer impacto comportamental durante a realização dos RISTs, quer no estado de jejum, quer no pós-refeição.

A administração da refeição líquida mista comercial por via ig no rato consciente potenciou a sensibilidade à insulina de forma semelhante ao previamente descrito por Latour e Lutt (2002), em que se usou a *gavage* para administrar uma refeição sólida a animais conscientes, os quais foram posteriormente anestesiados e testados (Latour e Lutt, 2002b). De facto, o RIST pós-gavage naqueles animais foi muito semelhante ao RIST pós-refeição mista ig obtido no presente estudo. Assim, o uso do catéter intragástrico para administração de refeições líquidas a animais conscientes é adequado para estudos em que se pretende potenciar a sensibilidade à insulina por ingestão de uma refeição, com a vantagem de que com este modelo não se coloca o problema do

consumo voluntário de uma quantidade definida de refeição sólida, durante um dado espaço de tempo, para além de evitar o *stress* causado pela *gavage*.

Uma vez que os ratos no estado consciente são mais difíceis de manusear e requerem mais cuidados, foi também avaliada em animais anestesiados a capacidade de potenciar a sensibilidade à insulina por administração ig de refeições líquidas.

O rato com catéter gástrico e testado sob anestesia parece ser também um modelo útil para estudos de potenciação da acção da insulina em resposta à ingestão de uma refeição e de sensibilidade à insulina pós-prandial, apesar da percentagem de potenciação (60-70 %) ter sido ligeiramente inferior (não significativo) ao observado nos animais conscientes (cerca de 90 %). No entanto, quando a refeição líquida mista foi administrada por via intra-entérica a animais anestesiados a potenciação foi de cerca de 105 %, sugerindo que o anestésico poderá interferir com a passagem dos alimentos para o duodeno, a qual parece ser essencial para que ocorra activação da HISS e concomitante potenciação da sensibilidade à insulina. Estes resultados estão de acordo com observações anteriores efectuadas por Latour e Lutt (Latour e Lutt, 2002b) que sugerem que o impacto do anestésico não ocorre ao nível do RIST, uma vez que os animais alimentados e depois testados no estado consciente ou no estado anestesiado apresentavam RISTs index semelhantes.

Efeito da composição da refeição líquida na sensibilidade à insulina

A refeição líquida mista testada, composta por glícidos, lípidos e proteínas, induziu uma potenciação significativa da acção hipoglicemiante da insulina, tanto em animais anestesiados como em animais conscientes. Estes resultados estão em concordância com os resultados obtidos anteriormente por Latour e Lutt (Latour e Lutt, 2002b), que observaram que a administração endogástrica (*gavage*) de uma

refeição-teste sólida a ratos conscientes resulta num RIST índice de cerca de 239 mg glucose/kg bw, correspondente a uma potenciação de cerca de 120 % (Latour e Lutt, 2002b). No presente estudo e recorrendo também a ratos conscientes, a administração intragástrica (ig) da refeição líquida mista por intermédio do cateter gástrico (10 ml/kg) resultou num RIST índice pós-refeição mista de 259 mg glucose/kg bw e uma potenciação da sensibilidade à insulina de aproximadamente 90 % (figura 4.7).

Por outro lado, observou-se ainda que nem a D-glucose nem a sacarose foram capazes de potenciar eficazmente a sensibilidade à insulina do estado de jejum e, embora a sacarose na dose de 20 ml/kg tivesse induzido um ligeiro aumento na sensibilidade à insulina (~17 %), tal foi manifestamente inferior ao obtido após administração ig da refeição líquida mista em qualquer das doses testadas (60-70 %) (figura 4.9).

A administração de água, utilizada como controlo de volume, também não afectou a sensibilidade à insulina, donde se poderá excluir a existência de um sinal mecânico, desencadeado pelo estiramento das paredes gástricas e que seja responsável pela potenciação da sensibilidade à insulina.

Estes dados sugerem que os glúcidos ou a dilatação do estômago, por si só, não são iniciadores eficazes do processo de sensibilização à insulina. No entanto, não pode ser excluída a hipótese dos glúcidos interagirem com outros nutrientes, nomeadamente de natureza proteica, e que tal leve à activação do processo de sensibilização para a acção da insulina pós-prandial, até porque os glúcidos são um constituinte importante da refeição mista usada. Por outro lado, a existência de diferentes sensores para diferentes nutrientes, originando diferentes sinais também não pode ser excluída e o seu estudo é de enorme interesse, devendo ser objecto de estudos futuros.

A HISS está envolvida na sensibilização para a acção da insulina induzida pela refeição líquida mista

De acordo com o descrito, no estado pós-prandial há activação dos nervos parassimpáticos hepáticos (Teff, 2008) e consequente estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos (Xie e Lutt, 1996a; Xie e Lutt, 1996b), resultando na síntese de *NO no fígado (Sadri e Lutt, 1999; Guarino *et al.*, 2004). Esta sequência de eventos conduz à libertação da HISS, a qual actua no músculo esquelético potenciando a acção da insulina, no estado pós-prandial. A acção da insulina dependente da HISS é máxima após ingestão de uma refeição e diminui progressivamente com o tempo de jejum (Lutt *et al.*, 2001), sendo praticamente ausente após 24 hrs de jejum (Lutt *et al.*, 2001; Sadri *et al.*, 2006).

De acordo com os resultados aqui descritos, no espaço de 90 min após a ingestão da refeição mista ocorre potenciação da sensibilidade à insulina, a qual parece ser mediada pela via da HISS.

A conclusão de que a potenciação e manutenção da sensibilidade à insulina após uma refeição depende do parassimpático e é mediada pela acção da HISS foi tirada a partir dos resultados obtidos por desnervação do plexo anterior hepático¹ e administração de atropina no estado pós-prandial, protocolos previamente descritos para o bloqueio ou inibição da via da HISS (Xie e Lutt, 1996b; Sadri e Lutt, 1999; Takayama *et al.*, 2000; Latour e Lutt, 2002b; Latour e Lutt, 2002a). De facto, quer a desnervação do plexo anterior hepático (Latour e Lutt, 2002a), quer a administração do antagonista colinérgico muscarínico atropina (Xie e Lutt, 1996b; Sadri e Lutt, 1999; Takayama *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2007) a animais no estado pós-prandial

¹ Recorde-se que os efeitos da ablação do plexo anterior hepático na sensibilidade à insulina parecem dever-se exclusivamente à perda da função parassimpática (Lutt e Wong, 1978a; Lutt, 1983; Xie *et al.*, 1993).

resultam numa completa inibição da via da HISS e, conseqüentemente, na diminuição da sensibilidade à insulina para valores próximos dos observados no jejum, em que a HISS não está presente (Lautt *et al.*, 2001).

No presente trabalho, a realização destes dois protocolos teve objectivos diferentes e, conseqüentemente, permitiu também retirar conclusões distintas, mas complementares.

Com a deservação do plexo anterior hepático antes da administração ig da refeição mista, preveniu-se o aumento da sensibilidade à insulina induzido pela subsequente administração da refeição mista, obtendo-se um RIST índice pós-refeição semelhante ao RIST índice controlo (figura 4.5). Assim, o sinal parassimpático hepático parece ser essencial para o processo de potenciação da acção da insulina induzido por uma refeição.

Por outro lado, no protocolo de administração de atropina após a administração ig da refeição mista, observou-se que o aumento da sensibilidade à insulina previamente obtido pela administração da refeição líquida mista foi completamente inibido pela subsequente administração de atropina, sendo o RIST índice pós-atropina semelhante ao RIST índice controlo (jejum) (figura 4.7). A diferença entre o RIST índice pós-refeição mista e o RIST índice pós-atropina é explicada pela inibição dos nervos parassimpáticos hepáticos e, concomitantemente, inibição da via da HISS.

Os resultados decorrentes da realização dos protocolos de manipulação dos nervos parassimpáticos permitem concluir que a via da HISS é essencial na potenciação da sensibilidade à insulina induzida por uma refeição mista. Para além disso, facto de uma refeição líquida mista, mas não a água, glucose ou a sacarose, promover a activação da via da HISS sugere que o sinal activador não é puramente mecânico (estiramento) e varia consoante a natureza química da refeição.

O papel do intestino no aumento da sensibilidade à insulina pós-prandial

De acordo com observações efectuadas por Lutt e colaboradores (Lutt *et al.*, 1998; Lutt *et al.*, 2001), a alimentação *ad libitum* de um animal durante 2 hrs, posteriormente testado sob o efeito de anestésico, resultou numa sensibilidade à insulina que, não só era significativamente superior à observada em animais jejuados, como era mantida inalterada por um período de cerca de 5-6 hrs. Assim, uma refeição sólida, que fica parcialmente retida no estômago como resultado de parálise parcial induzida pela anestesia, é capaz de manter o sinal prandial de sensibilização para a acção da insulina durante horas (Lutt *et al.*, 1998).

Nos presentes estudos observou-se que a refeição líquida mista, administrada directamente no estômago do rato e na ausência de banda intestinal, progredia para o duodeno, sendo que os exames *postmortem* revelaram que a refeição líquida avançava até ao íleo. Adicionalmente, a sensibilidade à insulina em animais conscientes alimentados *ad libitum* foi semelhante à de animais em cuja alimentação foi mimetizada por administração ig da refeição líquida mista.

Assim, o sinal prandial que leva à activação da via da HISS e consequente aumento da sensibilidade à insulina parece depender da passagem da comida para o intestino (duodeno). A diferença de sensibilidade à insulina observada entre animais anestesiados (administração ig) e conscientes, apesar de não significativa, coloca a hipótese de que os alimentos têm que progredir para o intestino delgado para que ocorra a máxima potenciação da sensibilidade à insulina, isto é, para que a via da HISS actue em toda a sua plenitude. Em animais anestesiados, a parálise resultante da anestesia poderá levar a uma diminuição do esvaziamento gástrico e, consequentemente, a uma menor passagem de alimentos para o lúmen intestinal e tal

ser responsável pela resposta ligeiramente menor à refeição mista nos animais anestesiados.¹

As experiências de implantação de uma banda intestinal, a 1 cm do esfíncter pilórico, para impedir a passagem de alimentos do estômago para o duodeno, resultaram num bloqueio da potenciação da acção da insulina após a administração da refeição líquida mista. No entanto, quando a administração dessa refeição foi efectuada por via intra-entérica, através de um catéter colocado no duodeno, a jusante da banda intestinal, observou-se um aumento significativo da sensibilidade à insulina, a qual foi posteriormente inibida pela administração de atropina. Uma vez que a amostragem deste protocolo é reduzida, estas observações devem ser encaradas como resultados preliminares, mas cuja relevância justifica a sua referência nesta dissertação. Com efeito, estas experiências apontam para o envolvimento do intestino na activação prandial dos nervos parassimpáticos, o que conduz à libertação da HISS e, conseqüentemente, ao incremento da sensibilidade à insulina após a administração ou ingestão da refeição líquida mista.

Sensibilidade à insulina pós-prandial e implicações nutricionais

A ingestão e processamento alimentar após uma refeição, induzem um sinal prandial que activa a via da HISS, potenciando a acção hipoglicemiante da insulina no músculo esquelético. Com o progressivo aumento do período de jejum, a inactivação da via da HISS leva a uma diminuição da sensibilidade à insulina, o que constitui um processo regulatório normal, já que com o jejum há uma diminuição da glicémia. Por

¹ As diferenças observadas entre a refeição líquida mista e a de glucose para a potenciação da acção da insulina não podem ser explicadas com base em variações no esvaziamento gástrico, uma vez que, para além do volume do estômago ser semelhante no final da experiência, está descrito que a velocidade de esvaziamento gástrico é menor após uma refeição líquida mista por comparação com uma solução de glucose (Marciani *et al.*, 2000).

outro lado, a incapacidade de estimular a libertação da HISS no estado pós-prandial, pode resultar numa condição de pré-diabetes. Com efeito, na ausência de libertação da HISS após uma refeição, a resposta à insulina fica comprometida em cerca de 50 %, podendo levar ao aumento da secreção pancreática de insulina, necessária para compensar a hiperglicémia pós-prandial. Neste estado pré-diabético, a hiperinsulinémia compensatória estimula o aporte em tecidos sensíveis à insulina, principalmente tecido adiposo e fígado.

Desta forma, as refeições que activem a via da HISS, e portanto sejam capazes de potenciar a sensibilidade à insulina, são vantajosas do ponto de vista nutricional, enquanto que dietas baseadas em refeições ineficazes na sinalização prandial que conduz à libertação da HISS poderão resultar em insulinoresistência pós-prandial, com todas as consequências que daí advêm.

A glucose e a sacarose são claramente incapazes de produzir tal sinal prandial, não potenciando a acção da insulina que ocorre normalmente após a ingestão de uma refeição. Não parecem, por isso adequados para mimetizar uma situação pós-prandial.

Estas observações são importantes do ponto de vista clínico, uma vez que sugerem que os estudos de acção da insulina por recurso à administração de refeições-teste de glucose, como é o caso do teste de tolerância oral à glucose (OGTT), não serão os mais adequados para avaliar a acção da insulina no estado pós-prandial, ao contrário do que acontece com testes de tolerância a refeições mistas. Esta afirmação é corroborada por outros autores (Berthiaume e Zinker, 2002), segundo os quais a utilização de refeições mistas permite uma maior capacidade de detectar diferenças nos perfis de glucose e insulina em simultâneo e em particular em modelos de insulinoresistência. Com efeito, uma vez que a glucose não é eficaz na activação da via da HISS, o OGTT irá negligenciar a componente de acção da insulina dependente da HISS, a qual representa cerca de 50-60% da acção total da insulina no estado pós-prandial. Desta forma, eventuais alterações na síntese e/ou acção da HISS não poderão

ser detectadas pelo OGTT, não permitindo a identificação precoce de um estado de pré-diabetes, o qual seria detectado através da utilização de uma refeição mista.

Para além disso, estudos crónicos com dietas ricas em sacarose revelaram que a alimentação com sacarose induz um rápido decréscimo da via da HISS, conforme observado em ratos sujeitos a uma dieta composta por 35 % de sacarose durante duas semanas (Ribeiro *et al.*, 2005). Estas observações podem estar directamente relacionadas com a causa do aumento epidémico da insulinoresistência, diabetes *mellitus* tipo 2 e obesidade, em países desenvolvidos, onde os açúcares refinados são um constituinte importante na dieta habitual.

Em conclusão, a administração ig da refeição líquida mista comercial, contendo glícidos, lípidos e proteínas, resulta numa significativa sensibilização para a acção da insulina, mimetizando um estado pós-prandial normal. Embora a potenciação da acção da insulina induzida pela refeição líquida mista seja ligeiramente inferior nos animais anestesiados, ambos os modelos estudados (agudo e crónico, ambos com inserção de catéter gástrico) mostraram-se adequados para estudos de composição nutricional na sensibilidade à insulina.

A desnervação parassimpática hepática, realizada antes da administração da refeição líquida mista, impediu o aumento da sensibilidade à insulina e a atropina, administrada após a refeição mista para bloquear a via da HISS, inibiu completamente a sensibilidade à insulina pós-prandial, baixando-a para valores próximos do jejum. A actividade parassimpática é, assim, essencial neste processo, sendo consistente com os estudos anteriores relacionados com o papel da HISS na sensibilidade à insulina pós-prandial.

Ao contrário da refeição mista, nem a sacarose nem a glucose são capazes de produzir um sinal prandial eficaz na potenciação da acção da insulina, sugerindo que o OGTT não será o método mais adequado para avaliar a sensibilidade à insulina pós-

prandial. De facto, o OGTT avalia somente a componente de acção da insulina independente da HISS, pelo que não permite detectar as situações em que a via da HISS está comprometida e, portanto, em que há disfunção da sensibilidade à insulina pós-prandial.

**5. A INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL
ASSOCIADA À OBESIDADE INDUZIDA POR UMA
DIETA RICA EM LÍPIDOS É PROVOCADA POR
DECRÉSCIMO DE ACÇÃO DA HISS**

5. A INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL ASSOCIADA À OBESIDADE INDUZIDA POR UMA DIETA RICA EM LÍPIDOS É PROVOCADA POR DECRÉSCIMO DE ACÇÃO DA HISS

5.1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

O estado nutricional e a composição de uma refeição afectam significativamente a acção da insulina dependente da via da HISS. O mecanismo de acção da insulina dependente da via da HISS ocorre especificamente no estado pós-prandial. Para além da activação parassimpática hepática (Xie e Lutt, 1996b; Sadri e Lutt, 1999; Guarino *et al.*, 2004; Puschel, 2004), a síntese da HISS requer também a elevação dos níveis de glutathione hepático (Guarino *et al.*, 2003; Guarino e Macedo, 2006), os quais ocorrem após a ingestão de uma refeição.

Desta forma, uma dieta cuja composição nutricional condicione a actividade parassimpática e/ou a concentração de glutathione no fígado poderá ter efeitos deletérios na acção da HISS e, conseqüentemente, na sensibilidade à insulina pós-prandial.

Neste contexto, está descrito que uma dieta rica em lípidos induz um estado de obesidade em modelos animais (Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2005; Korach-Andre *et al.*, 2005), o qual parece ser acompanhado de insulinoresistência (Commerford *et al.*, 2000; Pagliassotti *et al.*, 2000; Commerford *et al.*, 2001). A associação entre obesidade e insulinoresistência está bem documentada (Kemmer *et al.*, 1979; DeFronzo e Ferrannini, 1991; Lutt, 2004). Outros autores também relacionam a obesidade com disfunções do sistema nervoso autónomo (Peterson *et al.*, 1988; DeFronzo e Ferrannini, 1991; Lindmark *et al.*, 2005) correlacionando o decréscimo da actividade

parassimpática com o aumento da adiposidade corporal (Peterson *et al.*, 1988; Teff e Townsend, 1999; Lindmark *et al.*, 2005). Por outro lado, o aumento de adiposidade induzido por uma alimentação com elevado teor lipídico pode envolver um aumento do *stress* oxidativo (Milagro *et al.*, 2006), que poderá estar relacionado com o decréscimo de glutatióno (Carmiel-Haggai *et al.*, 2005; Lin e Yin, 2008) resultando em insulinoresistência (Khamaisi *et al.*, 2000; Guarino *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, tem sido sugerido que a localização da gordura resultante de uma alimentação rica em lípidos influencia a sensibilidade periférica à insulina. Com efeito, segundo diversos autores o aumento da adiposidade especificamente na região abdominal visceral está associada a uma diminuição da sensibilidade à insulina (Banerji *et al.*, 1997; Barzilai *et al.*, 1999; Bosello e Zamboni, 2000; Lindmark *et al.*, 2005), embora outros observem que a um aumento da adiposidade corporal total inespecífica também está associada uma condição de insulinoresistência (Korach-Andre *et al.*, 2005).

Assim, a realização deste estudo teve como objectivo testar a hipótese de que a obesidade induzida por uma dieta rica em lípidos está associada a insulinoresistência pós-prandial, causada por um decréscimo da acção da insulina dependente da via da HISS. Nestas experiências testou-se também a existência de uma correlação entre a redução da acção da HISS e o grau de obesidade, estimado a partir da medição da massa gorda, corporal total e de depósitos abdominais, em animais alimentados com a dieta rica em lípidos durante 0, 1 e 4 semanas.

5.2. PROTOCOLOS

Nestas experiências, comparou-se o efeito de duas dietas, administradas durante diferentes períodos, na sensibilidade à insulina. A composição das duas dietas é apresentada na tabela VII (secção 3.14.2.1).

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley machos (n=26), divididos em três grupos, de acordo com a dieta fornecida a partir das 5 semanas de idade: um primeiro grupo foi alimentado apenas com a dieta controlo (STD, n=10); o segundo grupo (HFD-1, n=9) foi alimentado com a dieta STD durante 3 semanas e com a dieta rica em lípidos durante a última semana (entre as 8 e 9 semanas de idade); o terceiro grupo (HFD-4, n=7) recebeu a dieta rica em lípidos desde as 5 semanas de idade, isto é, durante 4 semanas. Todos os animais foram testados às 9 semanas de idade, no estado pós-prandial, sob anestesia (modelo agudo).

Foram efectuados 2 RISTs, um controlo e um segundo RIST após administração de atropina (1 mg/kg, iv).

Após a anestesia e antes da cirurgia, estimou-se a massa gorda corporal, recorrendo à análise por bioimpedância, de acordo com o descrito por Hall e colaboradores (Hall *et al.*, 1989). No final da experiência, determinou-se a massa adiposa abdominal peri-renal, peri-entérica e epididimal, por colheita e pesagem destes depósitos de gordura. Colheram-se ainda amostras de fígado para quantificação da concentração de glutatióno hepático.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. MASSA CORPORAL (PESO) E PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Neste estudo não se observaram diferenças na pressão arterial média basal entre os grupos controlo (STD, 112.1 ± 4.7 mmHg, $n=10$), com 1 semana de dieta lipídica (HFD-1, 113.1 ± 4.5 mmHg, $n=9$) e com 4 semanas de dieta lipídica (HFD-4, 117.5 ± 7.7 mmHg, $n=7$). A pressão arterial não variou significativamente ao longo da experiência: após a realização do RIST controlo a pressão arterial era 111.3 ± 6.6 mmHg no grupo STD, 105.7 ± 8.1 mmHg no grupo HFD-1 e 109.4 ± 8.9 mmHg no grupo HFD-4, mantendo-se após a administração de atropina (STD, 109.3 ± 5.9 mmHg; HFD-1, 109.7 ± 4.1 mmHg; HFD-4, 110.2 ± 9.5 mmHg).

Quanto à massa corporal (peso dos animais), esta parece aumentar com a duração da dieta rica em lípidos, sendo significativamente inferior nos animais STD (371.6 ± 7.3 g, $n=10$) relativamente aos animais HFD-1 (401.4 ± 5.2 g, $n=9$; $p < 0.01$) e aos animais HFD-4 (420.5 ± 4.7 g, $n=7$; $p < 0.001$). Entre os dois grupos que receberam a dieta rica em lípidos não se observou diferença significativa da massa corporal total.

5.3.2. GLICÉMIA E INSULINÉMIA

Nos protocolos realizados, as dietas não afectaram de forma estatisticamente significativa a glicémia arterial basal pós-prandial, embora se possa observar uma tendência para o desenvolvimento de hiperglicémia com a dieta rica em lípidos. Com efeito, a glicémia pós-prandial basal nos animais controlo (STD) era 116.1 ± 2.4 mg/dl

(n=10), sendo 127.6 ± 6.6 mg/dl no grupo HFD-1 (n=9) e 136.6 ± 14.4 mg/dl no grupo HFD-4 (n=7). Os valores de glicémia não variaram significativamente após a realização do RIST controlo (STD, 116.5 ± 2.7 mg/dl; HFD-1, 126.9 ± 6.5 mg/dl; HFD-4, 139.4 ± 14.7 mg/dl), nem após administração de atropina (STD, 116.2 ± 2.5 mg/dl; HFD-1, 127.3 ± 6.0 mg/dl; HFD-4, 140.1 ± 17.6 mg/dl).

No entanto, a glicémia no estado de jejum, quantificada nalguns animais dos grupos STD (n=5) e HFD-4 (n=6) aproximadamente 4 dias antes da realização da experiência, veio confirmar a tendência para o aumento da glicémia com a dieta rica em lípidos: STD, 86.4 ± 3.6 mg/dl e HFD-4, 95.1 ± 2.2 mg/dl ($p < 0.05$).

A insulinémia basal, obtida no estado pós-prandial, era semelhante entre os grupos STD (2.3 ± 0.4 µg/l, n=10) e HFD-1 (4.2 ± 0.5 µg/l, n=9), mas significativamente superior no grupo HFD-4 (4.6 ± 0.7 µg/l, n=7; $p < 0.05$ vs STD). Não se observou uma diferença estatisticamente significativa da insulinémia basal entre os grupos HFD-1 e HFD-4. Após o RIST controlo, os níveis de insulina regressaram aos valores basais (STD, 2.4 ± 0.4 µg/l; HFD-1, 4.6 ± 0.3 µg/l; HFD-4, 6.1 ± 1.2 µg/l). A administração de atropina também não afectou a insulinémia (STD, 1.9 ± 0.4 µg/l; HFD-1, 6.0 ± 0.9 µg/l; HFD-4, 4.9 ± 0.7 µg/l), assim como o RIST pós-atropina, findo o qual os valores de insulina eram semelhantes aos basais (STD, 2.3 ± 0.4 µg/l; HFD-1, 5.4 ± 1.2 µg/l; HFD-4, 4.9 ± 0.8 µg/l).

5.3.3. CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONO HEPÁTICO

A figura 5.1 mostra os resultados da quantificação da concentração de glutatióno hepático, essencial para a acção da HISS, obtidos para os três grupos de animais. A concentração de glutatióno hepático foi significativamente superior nos animais alimentados com dieta controlo (STD, 6.2 ± 0.1 mmol/g fígado, n=10) relativamente a ambos os grupos de alimentados com dieta rica em lípidos (HFD-1, 5.1 ± 0.2 mmol/g

fígado, $n=9$; $p<0.01$ vs STD; HFD-4 5.4 ± 0.3 mmol/g, $n=7$; $p<0.05$ vs STD). Não se observaram diferenças na concentração de glutatono hepático entre HFD-1 e HFD-4.

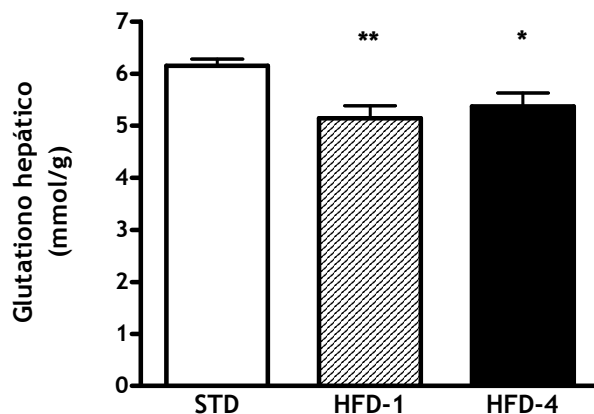


Figura 5.1: Concentração de glutatono hepático de ratos alimentados com dieta controle (STD) ou dieta rica em lipídios, durante 1 semana (HFD-1) ou 4 semanas (HFD-4). A concentração de glutatono no fígado de ratos Sprague-Dawley de 9 semanas de idade é maior nos ratos alimentados com dieta normal (STD, $n=10$) do que nos ratos alimentados com dieta rica em lipídios, quer durante 1 semana (HFD-1, $n=9$), quer durante 4 semanas (HFD-4, $n=7$). Assim, os níveis de glutatono hepático decrescem com a dieta rica em lipídios, mas não parecem ser afectados pela duração dessa dieta. Os resultados são média \pm SEM. * $p<0.05$ e ** $p<0.01$, em relação ao grupo STD (teste *one-way* ANOVA, seguido de Tukey-Kramer).

5.3.4. EFEITO DA DIETA RICA EM LÍPIDOS NA SENSIBILIDADE À INSULINA

O perfil de aporte de glucose durante um teste de sensibilidade à insulina (RIST) pode ser estimado a partir da taxa de perfusão de glucose necessária para manter a euglicémia durante o RIST, sendo que a curva resultante da diferença entre o perfil do RIST controlo (pós-prandial) e do RIST pós-atropina permite descrever a curva de acção da componente da insulina dependente da via da HISS. Estes resultados são apresentados na figura 5.2. Na tabela IX, apresentam-se alguns parâmetros dinâmicos, determinados a partir dos perfis dos RISTs controlo, RISTs pós-atropina e acção da via da HISS, nos ratos alimentados com ração normal (STD) ou com ração lipídica (HFD-1 e HFD-4).

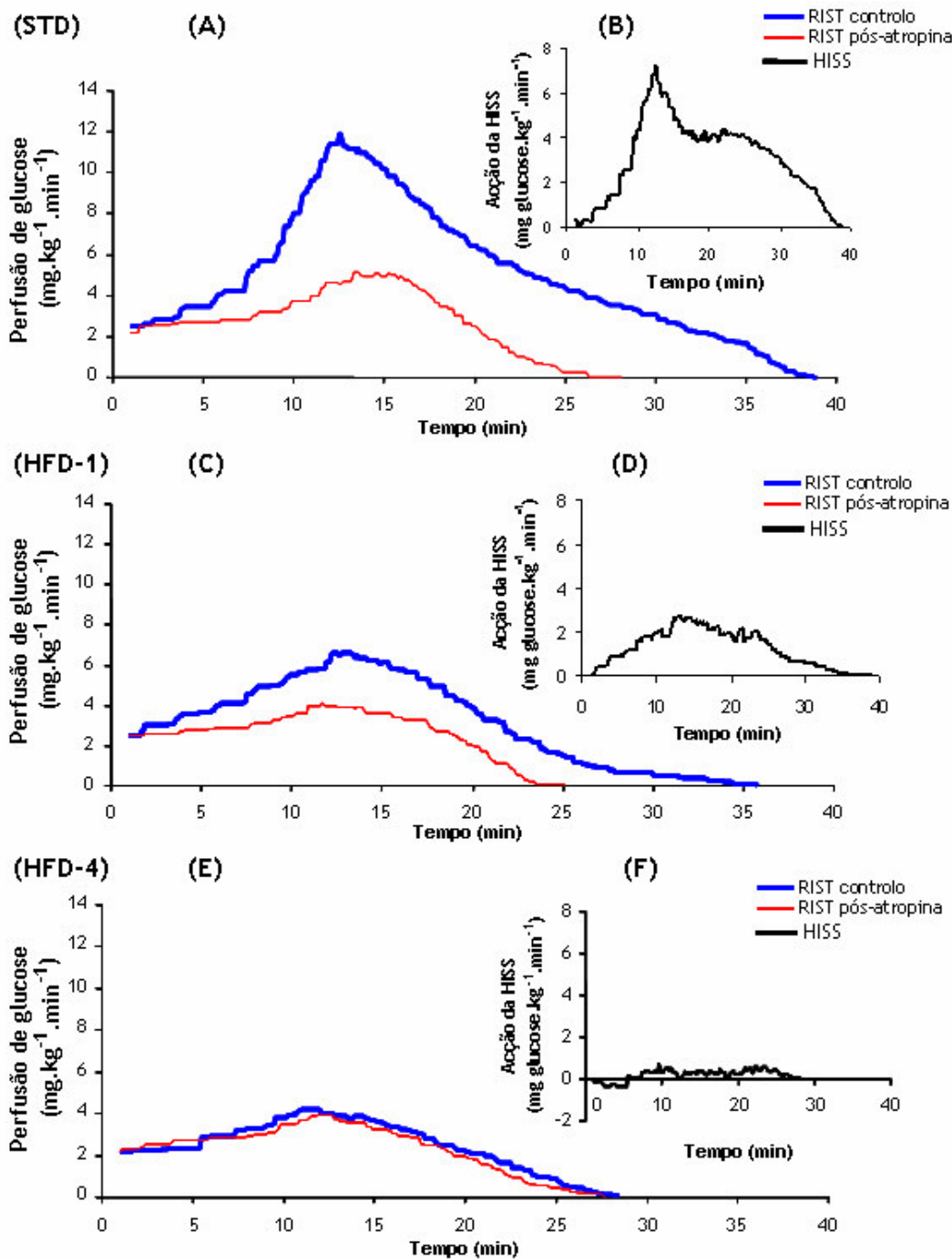


Figura 5.2: Perfis dinâmicos médios dos RISTs controlo, pós-atropina e da acção da HISS, em ratos alimentados com dieta controlo (STD), ou com dieta lipídica durante 1 semana (HFD-1) e 4 semanas (HFD-4). A acção da HISS (a preto) para os grupos STD (B), HFD-1 (D) e HFD-4 (F) foi obtida por subtracção dos perfis do RIST controlo (a azul) pelos do RIST pós-atropina (a vermelho) nos gráficos (A), (C) e (E), respectivamente. A ração lipídica afecta os perfis do RIST controlo e da HISS, mas não do RIST pós-atropina.

O perfil dinâmico da acção da insulina pós-prandial total (RIST controlo) é significativamente afectado pela duração da dieta lipídica (figura 5.2). Com efeito, a magnitude do pico de aporte de glucose no RIST controlo diminuiu significativamente com a duração da dieta rica em lípidos: STD, 12.0 ± 0.8 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹, n=10; HFD-1, 6.9 ± 0.5 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹, n=9 ($p < 0.001$ vs STD); HFD-4, 4.4 ± 0.5 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹, n=7 ($p < 0.001$ vs STD; $p < 0.05$ vs HFD-1) (tabela IX). A duração do RIST controlo também diminuiu nos animais com dieta lipídica (HFD-1, 29.8 ± 1.6 min; HFD-4, 27.1 ± 0.6 min) em comparação com os animais STD (37.4 ± 0.4 min; $p < 0.001$ vs HFD-1 e HFD-4), como se apresenta na tabela IX.

O perfil de acção da insulina dependente da via da HISS é também afectado pela dieta lipídica (figura 5.2), já que a duração da acção da HISS está diminuída nos animais HFD-1 (25.8 ± 2.2 min) e ainda mais nos HFD-4 (13.7 ± 1.1 min, $p < 0.001$ vs HFD-1), relativamente aos STD (34.0 ± 0.9 min, $p < 0.01$ vs HFD-1 e $p < 0.001$ vs HFD-4) (tabela IX). Também a magnitude do pico da curva de acção da HISS decresce com a dieta lipídica: STD, 7.9 ± 0.7 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹; HFD-1, 3.9 ± 0.4 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹ ($p < 0.001$); HFD-4, 1.5 ± 0.2 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹ ($p < 0.001$ vs STD e $p < 0.05$ vs HFD-1) (tabela IX). Na curva de acção da HISS nos animais HFD-4 (figura 5.2 (F)) não se observou um pico de acção propriamente dito, mas apenas uma pequena elevação da acção da HISS. Desta forma, para fins comparativos, apesar de não se poder determinar um momento para o pico de acção da HISS nos animais HFD-4, considerou-se que a elevação dos níveis de HISS correspondia à magnitude do pico.

A curva de acção da insulina *per se*, isto é, da componente independente da HISS (figura 5.2, a vermelho), não parece ser afectada pela dieta, uma vez que nem o pico nem a duração do RIST pós-atropina são afectados pelo tipo de dieta (tabela IX).

Tabela IX - Parâmetros dos perfis médios do RIST controlo, RIST pós-atropina e acção da HISS, em ratos alimentados com dieta *standard* (STD, n=10) ou com dieta rica em lípidos, durante 1 (HFD-1, n=9) ou 4 semanas (HFD-4, n=7). A dieta lipídica induz um decréscimo na magnitude e duração da acção da insulina total (RIST controlo) e da componente dependente da HISS, sem afectar a componente independente da HISS (RIST pós-atropina). Os resultados são média \pm SEM.

		STD	HFD-1	HFD-4
RIST controlo	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	12.0 \pm 0.8	6.9 \pm 0.5 ^b	4.4 \pm 0.5 ^{b, c}
	Tempo do pico (min)	12.4 \pm 0.4	13.4 \pm 0.7	12.6 \pm 0.8
	Duração (min)	37.4 \pm 0.4	29.8 \pm 1.6 ^b	27.1 \pm 0.6 ^b
RIST pós-atropina	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	5.6 \pm 0.8	4.2 \pm 0.3	4.1 \pm 0.3
	Tempo do pico (min)	13.9 \pm 0.7	12.1 \pm 0.4	12.8 \pm 0.7
	Duração (min)	25.1 \pm 0.7	23.1 \pm 0.5	25.5 \pm 1.2
Acção da HISS	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	7.9 \pm 0.7	3.9 \pm 0.4 ^b	1.5 \pm 0.2 ^{b, c}
	Tempo do pico (min)	13.2 \pm 1.3	17.5 \pm 2.1	N/A
	Duração (min)	34.0 \pm 0.9	25.8 \pm 2.2 ^a	13.7 \pm 1.1 ^{b, e}
	Início de acção (<i>onset</i> , min)	3.9 \pm 0.7	3.9 \pm 1.7	11.8 \pm 2.1 ^{a, d}
	Fim da acção (<i>offset</i> , min)	37.4 \pm 0.4	29.6 \pm 1.7 ^b	25.6 \pm 1.3 ^b

N/A, não quantificável. ^ap<0.01 e ^bp<0.001, vs STD; ^cp<0.05, ^dp<0.01 e ^ep<0.001, vs HFD-1. Teste *one-way* ANOVA, seguido de teste de Tukey-Kramer.

Na figura 5.3 apresentam-se os valores de RIST índice para os três grupos em estudo. A subtracção do RIST índice pós-atropina ao RIST índice controlo permite-nos obter a acção da insulina dependente da via da HISS, também apresentada na figura 5.3.

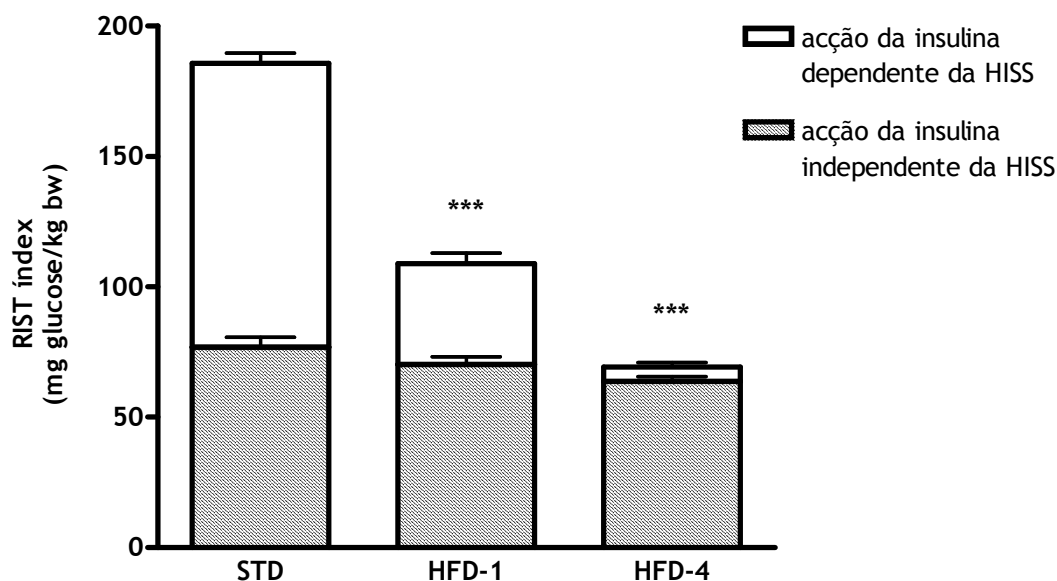


Figura 5.3: Sensibilidade à insulina total, dependente e independente da HISS em ratos Sprague-Dawley, alimentados com dieta *standard* (STD) ou dieta rica em lipídios, durante 1 semana (HFD-1) e 4 semanas (HFD-4). Os ratos HFD-1 (n=9) têm uma sensibilidade à insulina (RIST índice) pós-prandial total (branco + tracejado) diminuída relativamente ao grupo controlo (STD, n=10), o que é agravado com 4 semanas de dieta lipídica (HFD-4, n=7). A componente de acção da insulina dependente da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS, a branco) também diminui do grupo STD para o HFD-1 e é quase inexistente no grupo HFD-4. Por outro lado, a sensibilidade à insulina independente da via da HISS (a tracejado) é semelhante entre STD e HFD-1, apresentando-se diminuída no grupo HFD-4 relativamente ao grupo STD ($p < 0.05$). Os resultados são a média \pm SEM. *** $p < 0.001$ em relação ao grupo STD, e entre HFD-1 e HFD-4 (componente da HISS e total). Teste *one-way ANOVA*, seguido de Tukey-Kramer.

A sensibilidade à insulina pós-prandial total (RIST índice controlo), encontrava-se francamente diminuída nos ratos HFD-4 (69.3 ± 2.6 mg glucose/kg bw, n=7), em comparação com os animais HFD-1 (108.8 ± 2.9 mg glucose/kg bw, n=9; $p < 0.001$) e STD (185.8 ± 5.6 mg glucose/kg bw, n=10; $p < 0.001$), sugerindo que a insulinoresistência induzida pela dieta lipídica aumenta com a duração dessa dieta (figura 5.3). A diferença no RIST índice controlo entre os ratos HFD-1 e STD foi também estatisticamente significativa ($p < 0.001$).

O aporte de glucose induzido pela acção da insulina após o bloqueio da via da HISS (RIST índice pós-atropina) corresponde à sensibilidade à insulina independente da

HISS, tendo sido semelhante entre os ratos controlo (STD, 76.9 ± 3.8 mg glucose/kg bw, $n=10$) e os ratos HFD-1 (70.2 ± 2.9 mg glucose/kg bw, $n=9$). O RIST índice pós-atropina foi ligeiramente inferior nos ratos HFD-4 (63.8 ± 1.8 mg glucose/kg bw, $n=7$), em comparação com os STD ($p < 0.05$ vs STD), mas não se diferenciando do grupo HFD-1 (figura 5.3). Em contraste, a acção da insulina dependente da via da HISS (figura 5.3) decresceu significativamente com a duração da dieta lipídica: STD, 108.9 ± 3.9 mg glucose/kg bw; HFD-1, 38.6 ± 4.2 mg glucose/kg bw ($p < 0.001$ vs STD); HFD-4, 5.4 ± 1.7 mg glucose/kg bw ($p < 0.001$ vs STD e HFD-1).

Na figura 5.4 apresenta-se a percentagem de contribuição da via da HISS para a acção total da insulina no estado pós-prandial, a qual se encontra significativamente reduzida nos animais HFD-1 (37.1 ± 3.4 %), tornando-se relativamente desprezável nos HFD-4 (7.5 ± 2.2 %; $p < 0.001$ vs HFD-1), em comparação com os animais alimentados com a dieta controlo (STD, 58.7 ± 1.5 %; $p < 0.001$ vs HFD-1 e HFD-4).

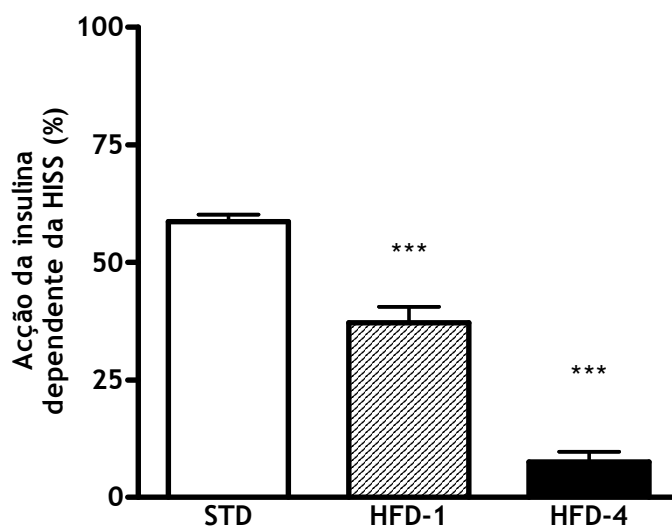


Figura 5.4: Percentagem da acção total da insulina que é dependente da HISS. A contribuição da HISS (substância hepática sensibilizadora da insulina) para a acção da insulina (%) é inferior nos animais alimentados com dieta lipídica em comparação com a dieta controlo (STD, $n=10$), sendo que esta diferença é agravada com a duração da dieta. HFD-1 ($n=9$), ratos alimentados com dieta rica em lípidos durante 1 semana; HFD-4 ($n=7$), ratos alimentados com dieta lipídica durante 4 semanas. Os resultados são a média \pm SEM. *** $p < 0.001$, vs grupo STD e vs grupo HFD-1 (teste *one-way ANOVA*, seguido de Tukey-Kramer).

Relativamente ao grupo STD, a acção da insulina dependente da via da HISS estava diminuída em 64.6% no grupo HFD-1, sendo que esta diminuição se agravou para 95% no grupo HFD-4. Por outro lado, a componente de acção da insulina independente da HISS foi consideravelmente menos afectada, uma vez que o decréscimo desta componente foi significativo apenas nos animais HFD-4, em que a acção da insulina independente da HISS estava diminuída apenas 17% relativamente ao grupo controlo.

Estes resultados sugerem que a dieta lipídica diminui a acção da insulina pós-prandial, afectando em primeiro lugar e de forma mais profunda a acção da insulina dependente via da HISS do que a componente independente da HISS. A quantificação da sensibilidade à insulina (RISTs índice), bem como os perfis de acção da insulina nos três grupos estudados (STD, HFD-1 e HFD-4), permitiram concluir que a acção da insulina pós-prandial é significativamente afectada ao fim de 1 semana de dieta rica em lípidos, sendo que esta condição é agravada com a duração da dieta. Estas alterações parecem dever-se essencialmente à diminuição da acção da via da HISS, a qual se encontra fortemente inibida após 1 semana de dieta lipídica e praticamente inexistente ao fim de 4 semanas, ao contrário da acção da insulina *per se* (componente independente da HISS), cuja de acção é afectada apenas ao fim de 4 semanas de dieta rica em lípidos, embora de forma substancialmente menos pronunciada do que a componente da HISS.

5.3.5. EFEITO DA DIETA RICA EM LÍPIDOS NA MASSA GORDA

A análise de impedância bioeléctrica tetrapolar (Hall *et al.*, 1989), realizada antes dos testes de sensibilidade à insulina, permitiu estimar a massa gorda corporal a partir da determinação da massa corporal não gorda. Estes resultados são apresentados na figura 5.5.

A massa corporal não gorda (figura 5.5) foi semelhante entre os animais HFD-4 (314.1±8.0 g, n=7) e HFD-1 (323.0±6.9 g, n=9). Também não foi significativamente diferente entre os animais HFD-1 e os animais controlo (STD, 347.4±7.5 g, n=10), embora fosse superior no grupo STD relativamente ao grupo HFD-4 ($p<0.05$).

A massa gorda corporal (figura 5.5) foi significativamente superior nos ratos HFD-4 (106.5±6.1 g) do que nos ratos HFD-1 (79.8±7.9 g; $p<0.05$) e mais ainda do que nos ratos STD (32.5±3.7 g; $p<0.001$ vs HFD-1 e HFD-4). Em termos de percentagem da massa corporal total (figura 5.5), a massa gorda foi 25.5±1.5 % nos ratos HFD-4, estatisticamente superior ao observado nos ratos HFD-1 (19.7±1.8 %, $p<0.05$) e STD (8.5±0.9 %, $p<0.001$ vs HFD-1, $p<0.001$ vs HFD-4).

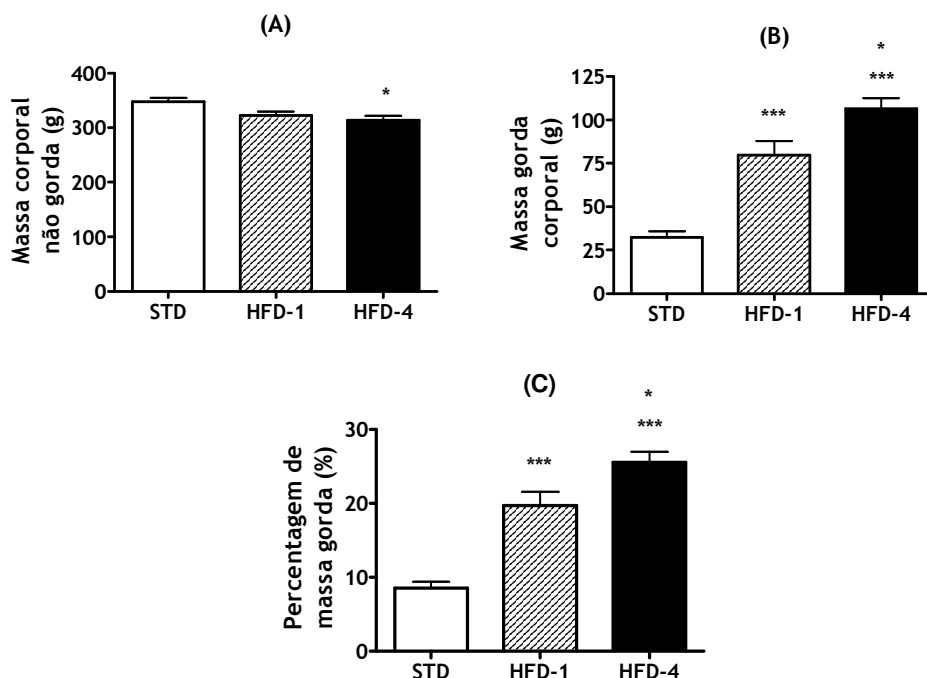


Figura 5.5: Massa corporal gorda e não gorda em ratos alimentados com dieta *standard* ou dieta rica em lípidos durante 1 ou 4 semanas. (A) A massa corporal não gorda não varia entre os ratos alimentados com dieta controlo (STD, n=10) e os ratos alimentados com a dieta rica em lípidos durante 1 semana (HFD-1, n=9), mas parece diminuir após 4 semanas de dieta lipídica (HFD-4, n=7). (B) A massa gorda corporal e (C) a percentagem de massa gorda corporal (% do peso total), aumentam com a duração da dieta rica em lípidos. A duração da dieta lipídica está associada a um aumento significativo da massa gorda corporal. Os resultados são a média ± SEM. * $p<0.05$, em relação ao grupo STD, em (A) e em relação ao grupo HFD-1, em (B) e (C). *** $p<0.001$ vs grupo STD. Teste *one-way ANOVA*, seguido do teste de Tukey-Kramer.

O impacto da dieta na adiposidade foi também avaliado por determinação da massa de cada um dos depósitos de gordura abdominal colhidos e pesados no final da experiência (adiposidade peri-renal, peri-entérica e epididimal). A medição das massas individuais destas adiposidades, bem como a soma dessas massas, constituem uma estimativa da adiposidade abdominal.

A massa de cada uma das adiposidades aumentou significativamente com a duração da dieta rica em lípidos, como se pode observar na figura 5.6.

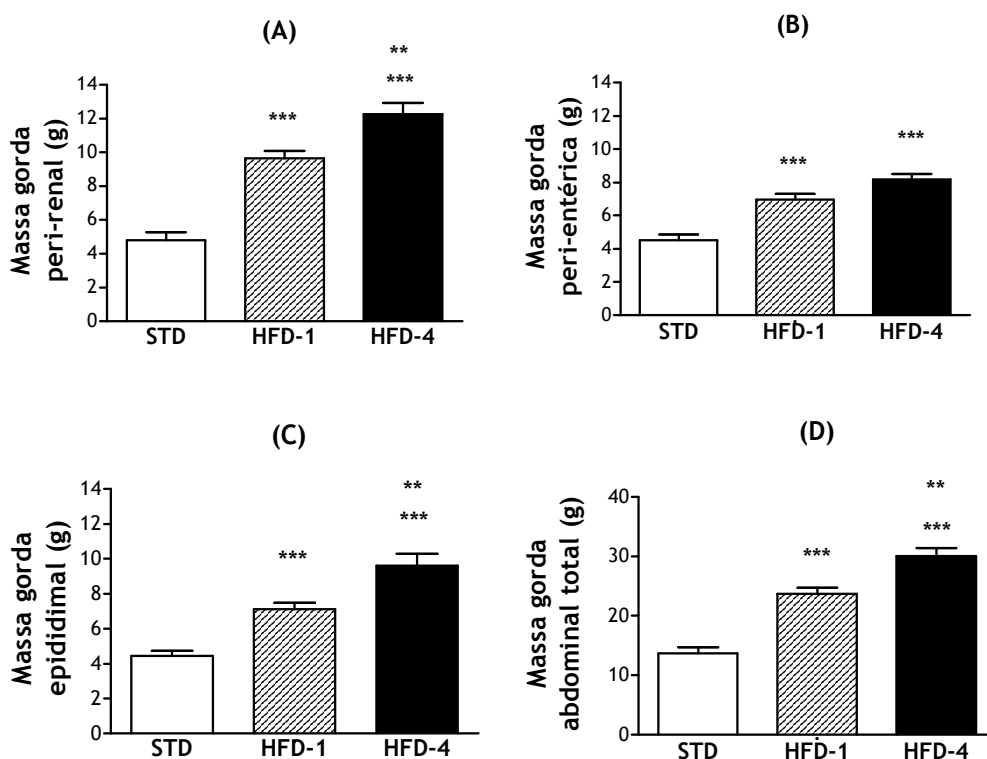


Figura 5.6: Massas dos depósitos de gordura abdominal colhidos de ratos Sprague-Dawley, alimentados com dieta normal (STD, n=8, a branco) e dieta rica em lípidos, durante 1 semana (HFD-1, n=9, a tracejado) ou durante 4 semanas (HFD-4, n=7, a cheio). (A) Massa gorda peri-renal. (B) Massa gorda peri-entérica. (C) Massa gorda epididimal. (D) Soma das massas individuais dos depósitos de gordura colhidos. Os resultados são a média \pm SEM. ** $p < 0.01$, relativamente ao grupo HFD-1. *** $p < 0.001$, relativamente ao grupo STD. Teste *one-way ANOVA*, seguido do teste de Tukey-Kramer.

A adiposidade peri-renal era significativamente mais pesada nos ratos HFD-4 (12.3 ± 0.7 g, $n=7$) do que nos ratos HFD-1 (9.6 ± 0.4 g, $n=9$; $p < 0.01$) e do que nos ratos STD (4.8 ± 0.5 g, $n=8$; $p < 0.001$ vs HFD-1 e HFD-4). O depósito de gordura peri-entérica também era mais pesado nos ratos com dieta lipídica (HFD-4, 8.2 ± 0.3 g, $n=7$; HFD-1, 6.9 ± 0.3 g, $n=9$) do que nos ratos controlo (STD, 4.5 ± 0.4 g, $n=8$; $p < 0.001$ vs HFD-1 e HFD-4), assim como a adiposidade epididimal: HFD-4, 9.6 ± 0.7 g ($n=7$); HFD-1, 7.1 ± 0.4 g ($n=9$; $p < 0.01$ vs HFD-4); STD, 4.4 ± 0.3 g ($n=8$; $p < 0.001$ vs HFD-1 e HFD-4) (figura 5.6).

A adiposidade abdominal regional, dada pela soma das massas individuais dos depósitos colhidos, também foi superior nos ratos HFD-4 (30.1 ± 1.4 g) do que nos ratos HFD-1 (23.7 ± 1.0 g; $p < 0.01$) e nestes maior do que nos ratos sem dieta lipídica (STD, 13.7 ± 1.0 g; $p < 0.001$ vs HFD-1 e HFD-4) (figura 5.6).

A fim de testar se a dieta rica em lípidos induzia a acumulação de matéria gorda especificamente na região abdominal, traçou-se um gráfico de regressão linear do total das massas gordas abdominais colhidas (soma dos depósitos peri-renal, peri-entérico e epididimal) em função da massa gorda corporal, medida por bioimpedância, o qual é apresentado na figura 5.7, em baixo. Observou-se que a adiposidade corporal se correlaciona com a adiposidade abdominal ($R^2=0.84$, $n=24$; $p < 0.0001$).

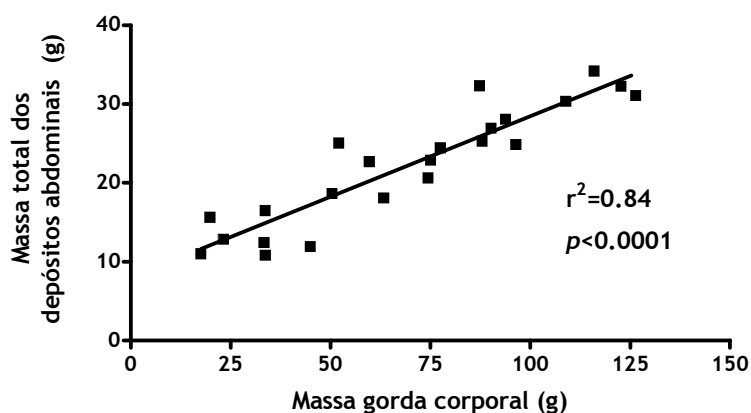


Figura 5.7: Regressão linear da massa gorda abdominal em função da massa gorda corporal (total). A dieta rica em lípidos, administrada durante 0, 1 ou 4 semanas, resulta num aumento generalizado da massa gorda em ratos Sprague-Dawley, sendo que a massa gorda corporal se correlaciona com a soma das massas gordas abdominais medidas.

Estes resultados sugerem que a dieta rica em lípidos induz um aumento da adiposidade, o qual é agravado com a duração da dieta. Esse aumento de adiposidade parece ser generalizado, não havendo deposição de gordura num local específico.

5.3.6. CORRELAÇÃO ENTRE A ADIPOSIDADE E A SENSIBILIDADE À INSULINA

Para tentar compreender se o aumento de massa gorda corporal (total) e abdominal, induzido pela dieta lipídica, está associado ao desenvolvimento da resistência à insulina e qual o envolvimento da HISS neste processo, estudou-se a existência de uma correlação entre a massa gorda (corporal e abdominal) e a sensibilidade à insulina (total, dependente da HISS e independente da HISS).

5.3.6.1. Massa gorda corporal e sensibilidade à insulina

A figura 5.8 diz respeito à correlação entre a massa gorda corporal e a acção da insulina. Como se pode observar, existe uma correlação polinomial (quadrática) negativa entre a massa gorda corporal, medida por bioimpedância, e a acção da insulina pós-prandial total, dada pelo RIST índice controlo ($R^2=0.81$, $n=16$; $p<0.05$). De igual forma, entre a massa gorda corporal e a acção da insulina dependente da via da HISS também há uma forte correlação polinomial (quadrática) negativa ($R^2=0.87$; $p<0.01$) (figura 5.8) ¹. Em contraste, a acção da insulina independente da HISS (RIST pós-atropina) não se correlaciona com a massa gorda corporal, nem polinomialmente ($R^2=0.20$; $p=0.73$), nem linearmente ($R^2=0.19$; $p=0.09$) (figura 5.8).

¹ Foi também testada a existência de uma correlação exponencial para descrever a relação entre estes parâmetros, mas, embora essa correlação exponencial fosse estatisticamente significativa ($p<0.01$), apresentava valores de R^2 bastante inferiores aos observados para a correlação polinomial quadrática ($R^2=0.72$, para a acção total da insulina; e $R^2=0.52$, para a acção da insulina dependente da HISS).

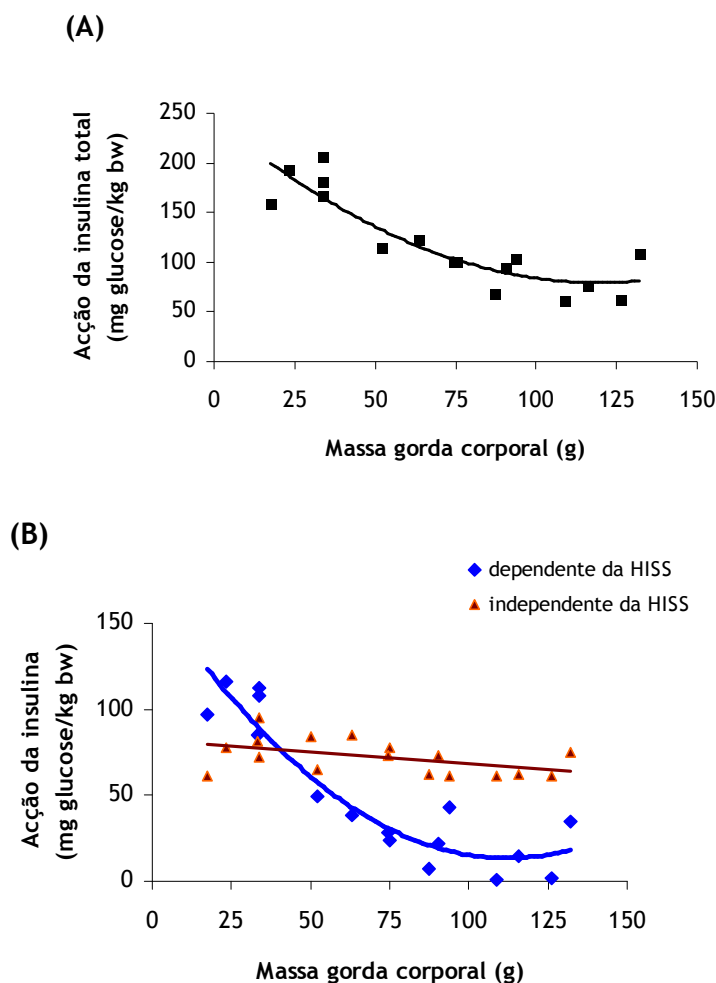


Figura 5.8: A massa gorda corporal correlaciona-se negativamente com a sensibilidade à insulina dependente da HISS. (A) Correlação polinomial (quadrática) negativa entre a sensibilidade à insulina total e a massa gorda corporal ($R^2=0.81$; $p<0.05$). (B) A sensibilidade à insulina dependente da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS, a azul) também se correlaciona negativamente (correlação polinomial) com a massa gorda corporal ($R^2=0.87$; $p<0.01$); no entanto, não há correlação estatisticamente significativa entre a massa gorda corporal e a componente de acção da insulina independente da HISS ($p=0.73$).

A massa corporal não gorda, por seu lado, não se correlaciona com a sensibilidade total à insulina, dada pelo RIST índice controlo ($R^2=0.18$; $p=0.07$), nem com a componente da sensibilidade à insulina independente da HISS ($R^2=0.12$; $p=0.17$). Curiosamente, entre a massa corporal não gorda e a sensibilidade à insulina dependente da via da HISS há uma correlação que, embora significativa ($p<0.05$), apresenta um

coeficiente de correlação consideravelmente mais baixo ($R^2=0.25$) do que o observado entre a acção da HISS e a massa gorda corporal.

Estes resultados parecem indicar que o aumento da adiposidade corporal está associado à redução da acção da insulina dependente da via da HISS, a qual ocorre de forma rápida e pronunciada para pequenos aumentos da massa gorda. A acção da insulina independente da HISS não parece estar associada à variação da massa gorda corporal (total).

5.3.6.2. Massa gorda abdominal e sensibilidade à insulina

A massa de cada um dos depósitos de gordura abdominal colhidos (peri-renal, peri-entérico e epididimal) também se correlaciona com a sensibilidade à insulina. Essa correlação é negativa e linear, observando-se para a sensibilidade à insulina total (RIST index controlo), dependente e independente da HISS (RIST index pós-atropina). Os coeficientes de correlação, declives e significância estatística das regressões lineares da sensibilidade à insulina em função das adiposidades abdominais individuais são apresentados na tabela X.

De igual forma, entre a soma das massas dos depósitos de gordura colhidos - massa gorda abdominal total - e a acção da insulina também existe uma correlação linear negativa (figura 5.9), relativamente quer à sensibilidade à insulina pós-prandial total ($R^2=0.85$; $p<0.001$), quer à componente dependente da HISS ($R^2=0.79$; $p<0.001$), quer ainda relativamente à componente independente da HISS ($R^2=0.45$; $p<0.01$). No entanto, e à semelhança do que acontece com as massas gordas individuais, esta correlação é mais forte para a componente de acção da insulina dependente da HISS (R^2 -ajustado, 0.78) do que para a componente independente da HISS (R^2 -ajustado, 0.41), como se pode observar na figura 5.9.

Tabela X - Ambas as componentes de acção da insulina (dependente e independente da substância hepática sensibilizadora à insulina - HISS) e a sensibilidade à insulina total apresentam uma correlação linear negativa com a massa gorda peri-renal, peri-entérica e epididimal. A acção da insulina dependente da HISS parece ser a componente que melhor se correlaciona com o aumento das massas gordas abdominais, sendo os seus declives de regressão significativamente maiores do que os declives da componente independente da HISS, para qualquer dos depósitos de gordura.

		Acção da insulina total (mg glucose/kg bw)	Acção da insulina dependente da HISS (mg glucose/kg bw)	Acção da insulina independente da HISS (mg glucose/kg bw)
Massa gorda	R ²	0.88	0.85	0.37
Peri-renal (g)	R ² -ajustado Declive	0.87 -11.7 ± 1.2 ^c	0.84 -10.1 ± 1.1 ^{c, d}	0.33 -1.6 ± 0.6 ^a
Massa gorda	R ²	0.73	0.67	0.43
Peri-entérica (g)	R ² -ajustado Declive	0.71 -20.7 ± 3.4 ^c	0.64 -17.2 ± 3.3 ^{c, d}	0.39 -3.4 ± 1.1 ^b
Massa gorda epididimal (g)	R ² R ² -ajustado Declive	0.73 0.71 -16.8 ± 2.6 ^c	0.69 0.67 -13.9 ± 2.5 ^{c, d}	0.51 0.48 -3.0 ± 0.8 ^b

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$ (declive diferente de zero; teste *t-student*).

^d $p < 0.001$, em relação à acção da insulina independente da HISS (diferença entre declives; teste ANCOVA).

Na figura 5.9 pode ainda observar-se que os declives das rectas de regressão linear para a acção total da insulina (-5.4±0.6) e para a acção da insulina dependente da HISS (-4.6±0.6) são mais acentuados do que para a componente de acção da insulina independente da HISS (-0.9±0.3; $p < 0.001$), tal como acontece com os depósitos individuais de gordura abdominal apresentados na tabela X, sugerindo que também a variação na adiposidade abdominal tem um impacto mais acentuado na componente da HISS do que na componente independente da HISS, ou vice-versa.

Os resultados apresentados neste capítulo sugerem que a duração da alimentação com uma dieta rica em lípidos está associada a uma redução acentuada

da sensibilidade à insulina pós-prandial e que a adiposidade aumenta em resposta à ingestão dessa dieta lipídica, não se acumulando num local específico. Essa adiposidade, quer seja corporal (total), quer seja abdominal, está associada à resistência à insulina pós-prandial. Das duas componentes que constituem a acção total da insulina pós-prandial, a componente de acção da insulina dependente da HISS parece ser aquela que é afectada de forma mais rápida e mais extensa.

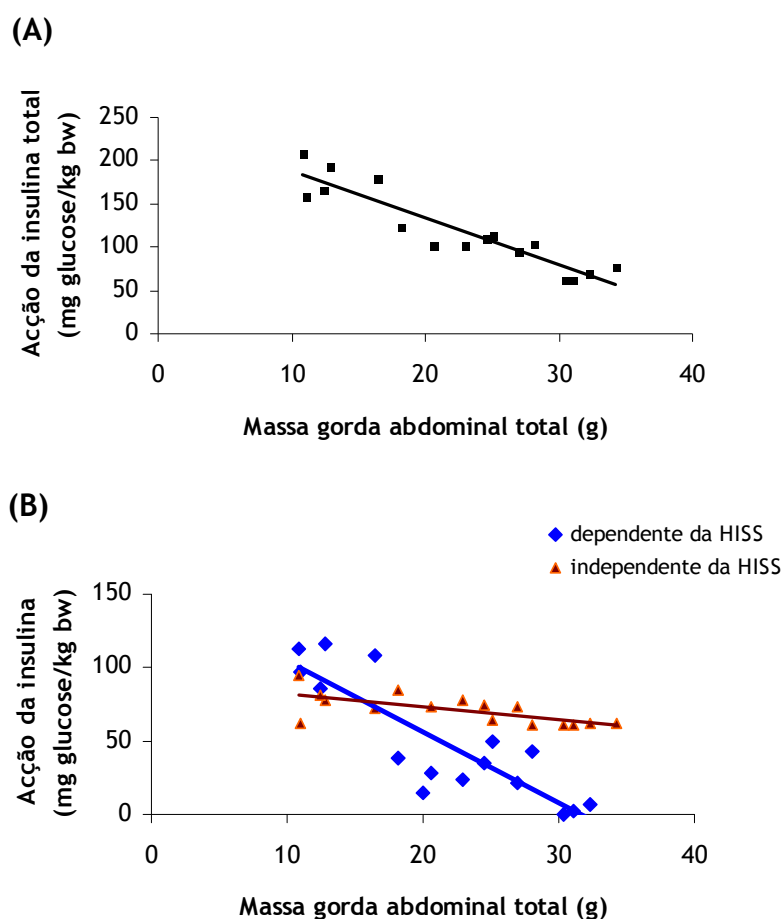


Figura 5.9: Acção da insulina (total, dependente e independente da HISS) em função da massa gorda abdominal. (A) Massa gorda abdominal total vs acção total da insulina ($R^2=0.85$; $p<0.001$). (B) Massa gorda abdominal total vs acção da insulina dependente (a azul, $R^2=0.79$; $p<0.001$) e independente (a vermelho, $R^2=0.45$; $p<0.01$) da via da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS). A adiposidade abdominal correlaciona-se linear e negativamente com a acção da insulina no estado pós-prandial. No entanto, a correlação é mais acentuada para a componente dependente da HISS do que para a componente independente da HISS, cujas rectas de regressão apresentam declives significativamente diferentes ($p<0.001$). A massa gorda abdominal total é a soma das massas gordas peri-renal, peri-entérica e epididimal. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. Testes *t-student* e ANCOVA.

5.4. DISCUSSÃO

Neste estudo, observou-se que a alimentação com uma dieta hiperlipídica leva a um aumento progressivo da adiposidade, o qual se correlaciona com o desenvolvimento da insulinoresistência pós-prandial. O primeiro e principal responsável por esta insulinoresistência induzida pela dieta lipídica é o decréscimo da ação da via da HISS, cuja contribuição para a sensibilidade à insulina pós-prandial é fortemente reduzida pela duração da dieta.

Considerações metodológicas

A escolha das rações utilizadas nas experiências descritas neste capítulo prendeu-se com a necessidade de comparar os efeitos de uma dieta controlo (STD), normalmente utilizada para ratos de laboratório em fase de manutenção e por isso com maior concentração de glúcidos, com os de uma dieta rica em lípidos, cuja razão lípidos/glúcidos fosse praticamente inversa da apresentada pela ração controlo. A elevada percentagem de lípidos (60 %) naquela ração permitiu estudar eficazmente os seus efeitos na sensibilidade à insulina após uma curta duração da dieta (1 e 4 semanas), minimizando os efeitos da maturação ou envelhecimento dos animais. Uma vez que está descrito um aumento de palatabilidade da ração com o aumento da percentagem de lípidos na mesma (NRC, 1995), tal poderia influenciar a quantidade de comida consumida por cada animal. No entanto, Pagliassotti e colaboradores, compararam uma ração hiperlipídica semelhante à ração utilizada no presente trabalho com a ração controlo, em termos de massa e calorias ingeridas, não tendo observado quaisquer diferenças (Pagliassotti *et al.*, 2000). Desta forma, os efeitos da dieta lipídica parecem dever-se à sua composição e não à quantidade diária de ração ingerida.

O efeito da dieta rica em lípidos na sensibilidade à insulina

A insulinoresistência pós-prandial instalou-se logo após a primeira semana de alimentação com a ração lipídica (HFD-1), sendo apenas cerca de 59 % da sensibilidade à insulina pós-prandial observada nos animais alimentados com a dieta *standard* (STD). Esta condição foi agravada às 4 semanas de dieta lipídica (HFD-4), quando a acção da insulina pós-prandial foi apenas 37 % (aproximadamente) da observada nos animais STD. Estas observações estão em concordância com as de outros autores, relativas aos efeitos das dietas lipídicas na sensibilidade à insulina (Pagliassotti *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2005).

A observação de que a insulinemia basal estava aumentada nos ratos alimentados durante 4 semanas com a dieta lipídica, ainda que ligeiramente, sugere um mecanismo compensatório das células β pancreáticas, o que atesta que a capacidade de produção de insulina não é afectada pela dieta rica em lípidos, pelo menos nos períodos estudados. Com efeito, está descrito que ácidos gordos livres estimulam as células β para a secreção de insulina (Newgard e McGarry, 1995), possivelmente por esterificação a DAG (Vara e Tamarit-Rodriguez, 1986) e dados publicados por outros autores revelam também um aumento (Ste Marie *et al.*, 2005; Terauchi *et al.*, 2007) ou pelo menos manutenção (Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2005) da insulinemia em animais alimentados com dieta lipídica por períodos de duração da dieta até 8 semanas. Assim, o menor aporte periférico de glucose causado pela alimentação com a dieta rica em lípidos aqui demonstrado não parece dever-se a deficiências na secreção β -pancreática de insulina, mas sim à diminuição da sua acção periférica.

Uma vez que em condições fisiológicas a sensibilidade à insulina pós-prandial é mediada não só pela acção da insulina *per se*, mas também pela via da HISS, estudou-se o efeito da dieta hiperlipídica sobre cada uma das componentes de acção da insulina.

A acção da insulina independente da via da HISS (insulina *per se*) não foi tão afectada pela dieta rica em lípidos como a componente dependente da HISS: a diminuição da sensibilidade à insulina independente da HISS permaneceu inalterada no grupo HFD-1 (dieta lipídica durante 1 semana) e decresceu apenas cerca de 17 % no grupo HFD-4 (4 semanas de dieta lipídica), relativamente ao grupo controlo (STD). Este decréscimo pode estar associado ao ligeiro aumento da glicémia em jejum observado nos animais HFD-4, uma vez que no estado de jejum apenas a componente de acção da insulina independente da HISS está activa. A observação de que a acção da insulina independente da via da HISS é apenas ligeiramente afectada pela dieta lipídica permite explicar o facto de nem todos os autores observarem diferenças entre animais alimentados com a dieta rica em lípidos e dieta controlo, no que respeita ao aporte de glucose estimulado pela insulina (Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2005), apesar da maioria dos autores constatar essas diferenças (Pagliassotti *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2005). Tais discrepâncias de resultados entre diferentes grupos podem derivar de diferenças ao nível da composição e duração da dieta testada, ou da metodologia utilizada para estimar a sensibilidade à insulina. Com efeito, estes estudos são efectuados após períodos mais longos de dietas lipídicas (Pagliassotti *et al.*, 2000; Ste Marie *et al.*, 2005), após o que provavelmente já é possível observar um decréscimo da componente de acção da insulina independente da HISS, mas que não é visível nas primeiras semanas de dieta, conforme sugerem os nossos resultados. A própria composição dietética da ração utilizada pode variar de estudo para estudo, o que claramente influenciará o resultado final. No que diz respeito à metodologia utilizada para determinar a sensibilidade à insulina, a maioria dos estudos baseiam-se num estado estacionário para a concentração de glucose e insulina, alcançado através de um jejum nocturno (Radziuk, 2000; Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2005), o qual, como discutido anteriormente, não contempla a acção da insulina dependente da via da HISS,

componente cuja activação ocorre no estado pós-prandial e que é fortemente inibida pela dieta lipídica, resultando na diminuição da sensibilidade à insulina pós-prandial.

A componente de acção da insulina dependente da via da HISS diminuiu com a duração da dieta rica em lípidos de forma paralela à sensibilidade à insulina pós-prandial total: observou-se um decréscimo da HISS de cerca de 65 % no grupo HFD-1 e de 95 % no grupo HFD-4, em comparação com o grupo controlo (STD). Tanto nos animais HFD-1 como HFD-4, a redução da acção da HISS foi significativamente mais pronunciada do que a redução da componente independente da HISS, conforme ilustra a figura 5.3.

Assim, a resistência à insulina dependente da via da HISS e associada à dieta rica em lípidos parece ser o principal factor responsável pelo efeito de insulinoresistência precoce, que precede o desenvolvimento da diabetes (Lautt, 2005) conforme é indicado pela observação de que 1 semana de dieta rica em lípidos não é suficiente para afectar a acção da insulina *per se*, mas é-o para reduzir drasticamente o efeito da via da HISS na acção da insulina.

Adiposidade e insulinoresistência induzidas pela dieta lipídica

O decréscimo de sensibilidade à insulina observado nos animais alimentados com a dieta lipídica correlacionou-se com o aumento da adiposidade, estimada a partir da determinação da massa gorda, o que está em concordância com resultados publicados por outros grupos (Barzilai *et al.*, 1999; Milagro *et al.*, 2006; Pitombo *et al.*, 2006). Contudo, os dados aqui reportados sugerem ainda que o efeito da acumulação de adiposidade é significativamente mais pronunciado na componente de acção da insulina dependente da HISS do que na componente independente da HISS. Com efeito, existiu uma correlação polinomial (quadrática) significativa entre a massa gorda corporal e a acção da insulina dependente da HISS, a qual era semelhante à observada para a acção total da insulina, ao passo que a componente de acção da insulina independente da HISS

não se correlacionou com a massa gorda corporal (figura 5.8). Por outro lado, a massa gorda abdominal apresenta uma correlação linear com ambas as componentes de acção da insulina, no entanto observou-se que essa correlação é mais pronunciada para a acção da insulina total e dependente da HISS, do que para a componente independente da HISS, como é demonstrado pelos declives das rectas de regressão linear, substancialmente diferentes de zero e entre si (tabela X e figura 5.8). O que estes dados sugerem é que a componente de acção da insulina independente da HISS também tende a diminuir com a obesidade, só que a um ritmo mais lento.

Note-se que apesar da correlação (e por conseguinte, associação) entre a diminuição de acção da HISS e o aumento da adiposidade ser significativa, não se pode ainda estabelecer uma relação casuística entre ambas, isto é, não se pode afirmar com toda a certeza que seja o aumento da massa gorda a provocar o decréscimo da acção da HISS e não o contrário. No entanto, com base em vários estudos prospectivos longitudinais disponíveis, segundo os quais a obesidade frequentemente precede e predispõe para a intolerância à glucose (Wilding e Williams, 1998), pode especular-se que a deposição de gordura corporal leva a alterações metabólicas significativas que induzem uma diminuição da acção da HISS e da sensibilidade à insulina pós-prandial.

Tanto a adiposidade corporal (total), como a dos depósitos abdominais (perirenal, peri-entérico e epididimal), aumentaram com a duração da dieta lipídica, sendo que em todos os casos estudados a massa gorda estava associada a uma acentuada insulinoresistência, a qual é essencialmente devida ao decréscimo de acção da via da HISS, conforme anteriormente discutido e evidenciado pelas figuras 5.8 e 5.9. Estes resultados estão na linha de observações anteriores, efectuadas por outros grupos e que referem uma associação da adiposidade e conteúdo lipídico intramiocelular com a insulinoresistência, tanto em humanos (Lindmark *et al.*, 2005), como em modelos animais (Korach-Andre *et al.*, 2005).

Diversos outros estudos suportam também o envolvimento da gordura visceral e/ou abdominal no processo de insulinoresistência relacionado com a obesidade (Lindmark *et al.*, 2005; Pitombo *et al.*, 2006), tendo sido ainda observado que a remoção de depósitos de gordura visceral melhora a condição de insulinoresistência em modelos animais de obesidade (Barzilai *et al.*, 1999; Pitombo *et al.*, 2006). Nestas experiências, os autores observaram que a remoção cirúrgica de massa gorda visceral (epididimal e peri-renal) melhora os níveis circulantes de adipocitocinas, diminuindo as pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e aumentando a adiponectina, ao mesmo tempo que melhora a condição de insulinoresistência em ratos alimentados com dieta lipídica (Pitombo *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem um papel específico da adiposidade visceral, tendo em conta que diferentes adiposidades podem ter diferentes funções endócrinas e metabólicas, porém, uma vez que não foi feita a redução da adiposidade não visceral, não é possível assegurar que as melhorias com a diminuição da visceral não são o reflexo da redução da adiposidade corporal total.

Com efeito, os nossos estudos revelaram que o aumento da adiposidade abdominal no total se correlaciona com o aumento da massa gorda corporal (figura 5.7), sugerindo que a dieta rica em lípidos utilizada não induz o aumento de adiposidade num local ou órgão específico no rato, mas sim um aumento generalizado. Esta observação é semelhante às publicadas por outros autores (Korach-Andre *et al.*, 2005). Adicionalmente, os nossos resultados mostram que a forte correlação entre a adiposidade e a insulinoresistência pós-prandial está associada essencialmente ao decréscimo da acção da via da HISS. Deste modo, o desenvolvimento da insulinoresistência dependente da HISS e, conseqüentemente, da insulinoresistência pós-prandial total, não parece estar associado com a deposição de lípidos (gordura) num local específico, visceral ou abdominal, mas antes com o aumento generalizado da massa adiposa.

A técnica de impedância bioelétrica utilizada para medir a massa gorda corporal total não permite distinguir a acumulação lipídica em células de músculo da acumulação em adipócitos. No entanto, nestas experiências mediu-se também a massa acumulada em depósitos de tecido adiposo abdominal. Embora alguns autores refiram a importância da acumulação lipídica intramiocelular no desenvolvimento da insulinoresistência associada à obesidade (Kuhlmann *et al.*, 2003), observou-se no presente estudo que a adiposidade corporal total e abdominal estão correlacionadas, sugerindo que o efeito nocivo da dieta rica em lípidos não se deve primordialmente à sua acumulação, nem intramiocelular, nem intra-abdominal, para esta duração de dieta. Com efeito, segundo Korach-André e colaboradores, os níveis de lípidos intramiocelulares e a adiposidade visceral induzidos por uma dieta rica em lípidos estão correlacionados (Korach-Andre *et al.*, 2005), excluindo o papel central da adiposidade visceral no processo de insulinoresistência. Estas observações permitem de certa forma explicar a inexistência de alterações na expressão genética para adipocitocinas no tecido adiposo visceral, em animais com insulinoresistência induzida por uma dieta rica em lípidos (Bergman *et al.*, 2007). De facto, recorrendo a uma dieta hiperlipídica com 6-12 semanas de duração, Bergman e colaboradores não observaram quaisquer alterações no metabolismo das adipocitocinas, apesar do aumento da adiposidade e do decréscimo da sensibilidade à insulina (Bergman *et al.*, 2007), sugerindo que o papel da adiposidade visceral e das adipocitocinas no mecanismo de insulinoresistência apenas será visível numa condição de obesidade a longo prazo, quando a inflamação se tornar preponderante. Assim, uma vez que no presente trabalho se recorreu a uma dieta lipídica de apenas 4 semanas, não seria de esperar alterações significativas no metabolismo das adipocitocinas provenientes do tecido adiposo visceral, sugerindo que estas não estão envolvidas nas alterações da acção da insulina dependente da HISS a curto prazo, embora possam ser relevantes na progressão para a diabetes, associada à condição de obesidade induzida por dietas de duração mais longa.

Uma vez que a adiposidade corporal está correlacionada com a abdominal visceral e esta com a concentração intramiocelular de lípidos, parece poder concluir-se uma vez mais que os efeitos nocivos da dieta rica em lípidos, nomeadamente na insulinoresistência pós-prandial, resulta do aumento da adiposidade em geral e não da acumulação lipídica num local específico.

A dieta lipídica, a insulinoresistência e o glutatióno hepático

A acção da insulina dependente da HISS está associada à activação dos nervos parassimpáticos hepáticos e consequente síntese de *NO no fígado (Xie e Lutt, 1996b; Sadri e Lutt, 1999), mas requer também a elevação dos níveis de glutatióno hepático, como acontece a seguir a uma refeição (Guarino *et al.*, 2003; Guarino e Macedo, 2006).

Embora não se conheça exactamente o papel do glutatióno hepático na via da HISS, sabe-se que é um intermediário essencial para a libertação da HISS e que a sua depleção origina uma condição de insulinoresistência, a qual é devida à inibição da via da HISS (Guarino *et al.*, 2003). Mais ainda, estudos também desenvolvidos pelo nosso grupo, sugerem que com a administração de glutatióno juntamente com um dador de *NO a ratos em jejum, estado em que a via da HISS está inactiva, é possível potenciar a sensibilidade à insulina, a qual aumenta para valores próximos do observado no estado pós-prandial (Guarino e Macedo, 2006). A relevância do glutatióno na diminuição da sensibilidade à insulina causada por dietas ricas em lípidos é ainda demonstrada por publicações de outros grupos, as quais sugerem que uma dieta rica em lípidos induz um aumento considerável do *stress* oxidativo (Carmiel-Haggai *et al.*, 2005; Milagro *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2006), o qual poderá ocorrer por um processo que envolve a depleção de glutatióno (Carmiel-Haggai *et al.*, 2005), devido à sua conhecida acção

antioxidante ¹. Contudo, ficou ainda por esclarecer se este estado de *stress* oxidativo induzido pela depleção de glutathione está directamente associado ao decréscimo da sensibilidade à insulina.

Assim, foi avaliada a concentração de glutathione no seu principal “reservatório”, o fígado, já que uma diminuição dos níveis de glutathione hepático poderia levar não só a um estado de *stress* oxidativo exacerbado, mas também explicar a diminuição de acção da via da HISS e, por conseguinte, explicar a insulinoresistência pós-prandial observada nos animais alimentados com dieta lipídica. Porém, os resultados aqui descritos indicam que o decréscimo de glutathione hepático não acompanha a acentuada resistência à insulina observada após 1 semana de dieta lipídica (HFD-1) e agravada às 4 semanas (HFD-4), uma vez que a diferença de concentração de glutathione observada entre animais controlo (STD) e animais alimentados com dieta lipídica é mínima (~15 %, $p < 0.05$), não havendo diferenças entre o grupo HFD-1 e o grupo HFD-4. Estes resultados sugerem que a diminuição da concentração de glutathione hepático não está directamente envolvida na progressão da insulinoresistência com o aumento da duração da dieta lipídica. Com efeito, em estudos anteriormente efectuados pelo nosso grupo, observou-se que uma diminuição da sensibilidade à insulina de 39.1 % era conseguida com uma depleção de 49.2 % dos níveis de glutathione no fígado (Guarino *et al.*, 2003), enquanto que no presente estudo a sensibilidade à insulina decresceu cerca de 41 %, com a concentração de glutathione hepático a diminuir apenas 15 %, sugerindo uma fraca associação entre a insulinoresistência à insulina causada pela dieta rica em lípidos e a diminuição do glutathione hepático. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de este decréscimo estar associado a uma redução da acção da insulina dependente da via da HSS na primeira semana de dieta lipídica.

¹ Adicionalmente, trabalhos realizados por Paolisso e colaboradores em indivíduos diabéticos revelaram que a administração iv de GSH induziu um aumento significativo da captação de glucose insulino-dependente (Paolisso *et al.*, 1992a; Paolisso *et al.*, 1992b).

Embora estes dados não permitam descartar a possibilidade da duração da dieta lipídica originar um estado de *stress* oxidativo crescente, pode concluir-se que, caso haja aumento do *stress* oxidativo, este ocorre por um mecanismo que não parece envolver a depleção de glutatióno e que não afecta directamente a sensibilidade à insulina pós-prandial, mas para o qual poderá contribuir. Assim, a deficiência ao nível da acção da HISS, observada nos animais alimentados com a dieta lipídica, parece dever-se maioritariamente a problemas no eixo parassimpático-^{*}NO, cuja activação é também essencial para a potenciação da acção da insulina.

Obesidade induzida pela dieta lipídica e disfunção parassimpática

Sendo a função parassimpática hepática essencial para a acção da insulina no estado pós-prandial, alterações na via parassimpático-^{*}NO podem originar uma condição de insulinoresistência pós-prandial (Xie e Lutt, 1996a; Xie e Lutt, 1996b; Sadri e Lutt, 1999; Moore *et al.*, 2002; Afonso *et al.*, 2007b; Ribeiro *et al.*, 2007). Estudos publicados por outros grupos têm sugerido a existência de uma associação entre a obesidade e disfunções do sistema nervoso parassimpático (Peterson *et al.*, 1988; Teff e Townsend, 1999; Lindmark *et al.*, 2005; Tentolouris *et al.*, 2006). Apesar de não ter sido referida especificidade tecidual para essas disfunções parassimpáticas, o fígado parece ser um dos órgãos afectados (Teff e Townsend, 1999), o que poderá explicar o decréscimo da acção da HISS, já que esta depende dos nervos parassimpáticos hepáticos. A obesidade tem sido relacionada com desequilíbrios entre os sistemas nervosos simpático e parassimpático, causados por um aumento do tónus simpático (Landsberg, 2001; Lindmark *et al.*, 2005; Tentolouris *et al.*, 2006) e consequente decréscimo da actividade parassimpática (Van Vliet *et al.*, 1995; Lindmark *et al.*, 2005).

Alguns autores têm sugerido que o aumento da actividade simpática observado na obesidade ocorre por um processo que parece envolver o aumento dos níveis de

ácidos gordos não esterificados libertados dos adipócitos viscerais directamente sobre o fígado, pela circulação portal (Large e Arner, 1998; Benthem *et al.*, 2000; Landsberg, 2001). Por outro lado, o sistema nervoso simpático pode induzir um acréscimo do fluxo de ácidos gordos livres para o fígado e outros tecidos sensíveis à insulina, o que parece ocorrer por potenciação da lipólise via activação β -adrenérgica em depósitos de tecido adiposo, nomeadamente visceral (Bergman *et al.*, 2007), perpetuando os efeitos deletérios da activação simpática e ácidos gordos livres na acção da insulina. Embora no presente trabalho não se tenha medido e alguns autores não observem diferenças nos ácidos gordos livres plasmáticos com a dieta lipídica (Pagliassotti *et al.*, 2000; Korach-Andre *et al.*, 2005), outros têm observado um aumento dos níveis de ácidos livres plasmáticos induzido pela dieta rica em lípidos (Large e Arner, 1998; Bergman *et al.*, 2007; Dhalla *et al.*, 2007). O eventual aumento na concentração plasmática de ácidos gordos não esterificados provenientes principalmente do tecido adiposo visceral e a sua relação com a exacerbada actividade do sistema nervoso simpático (Tentolouris *et al.*, 2006), podem estar associados à redução da actividade parassimpática. Este défice de actividade parassimpática leva ao decréscimo de acção da via da HISS, constituindo assim uma explicação para a insulinoresistência pós-prandial observada nos animais alimentados com a dieta rica em lípidos. Apesar desta afirmação parecer algo especulativa, ela é suportada pela existência de uma associação entre o sistema nervoso parassimpático, a massa adiposa visceral e o fígado, conforme sugerido por Fliers e colaboradores (Fliers *et al.*, 2003), bem como por observações de que a atenuação da actividade parassimpática induzem insulinoresistência (Xie e Lutt, 1996a; Takayama *et al.*, 2001; Bartness, 2002; Kreier *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2007).

Adicionalmente, a acetilcolina e o *NO são intermediários essenciais da via da HISS, resultando directamente da actividade parassimpática (Guarino *et al.*, 2004), pelo que a diminuição funcional de um dos dois resulta em insulinoresistência dependente

da HISS (Xie e Lutt, 1996a; Sadri e Lutt, 1999; Guarino *et al.*, 2003; Guarino *et al.*, 2004). Assim, as recentes publicações referindo uma reduzida activação do enzima sintase do $^{*}\text{NO}$ pela acetilcolina em modelos animais de obesidade induzida por dietas lipídicas (Zecchin *et al.*, 2007), bem como diversas anormalidades relacionadas com o $^{*}\text{NO}$ nestes animais (Du *et al.*, 2006; Erdei *et al.*, 2006), são também consistentes com os resultados aqui apresentados.

Em conclusão, a alimentação de animais com dieta rica em lípidos induz insulinoresistência pós-prandial, a qual é significativa logo após 1 semana de dieta e progride com a duração desta. Esta insulinoresistência não pode ser explicada pela diminuição da acção da insulina *per se* (independente da HISS), uma vez que esta componente estava inalterada após 1 semana de dieta e decresce apenas ligeiramente ao fim de 4 semanas. A componente de acção da insulina dependente da HISS, por outro lado, foi severamente afectada pela dieta rica em lípidos, decrescendo cerca de 65 % após 1 semana e passando a ser praticamente inexistente após 4 semanas de dieta. Os efeitos da dieta lipídica na sensibilidade à insulina pós-prandial são muito mais pronunciados na componente de acção da insulina dependente da HISS, sendo que precedem o decréscimo de acção da insulina *per se*. O grau de obesidade apresentou uma significativa correlação com a acção da HISS, assim como com a acção da insulina pós-prandial total. Os dados aqui apresentados não sugerem um efeito específico de nenhuma adiposidade regional, uma vez que a adiposidade abdominal estava correlacionada com a adiposidade corporal e as correlações de ambas com a sensibilidade à insulina foram igualmente fortes para a adiposidade corporal e para a adiposidade da região abdominal, ao longo de 4 semanas de dieta.

A obesidade induzida por uma dieta rica em lípidos leva a um declínio progressivo da sensibilidade à insulina dependente da HISS, o que resulta na insulinoresistência pós-prandial, que parece preceder a diabetes franca.

**6. A INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL EM
RATOS ZUCKER OBESOS ESTÁ ASSOCIADA À
DIMINUIÇÃO DE AMBAS AS COMPONENTES
DE ACÇÃO DA INSULINA**

6. A INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL EM RATOS ZUCKER OBESOS ESTÁ ASSOCIADA À DIMINUIÇÃO DE AMBAS AS COMPONENTES DE ACÇÃO DA INSULINA

6.1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A obesidade como resultado de factores genéticos está presente em várias estirpes de roedores (Bray *et al.*, 1970), sendo o rato Zucker obeso (*Fatty*, OZR) um dos modelos mais estudados. Este é um modelo genético autossómico recessivo (genótipo *fa/fa*) de obesidade, que apresenta uma mutação no receptor da leptina, a qual parece ser responsável pela hiperfagia e adiposidade nestes animais (Kemmer *et al.*, 1979; Fruhbeck, 1999; Ceddia *et al.*, 2002). O aumento de adiposidade, evidenciado por hipertrofia dos adipócitos, inicia-se na primeira semana de vida (Boulangue *et al.*, 1979) e progride para obesidade marcada após o desmame, um processo que precede a hiperfagia (Boulangue *et al.*, 1979). A partir das 3 semanas de idade, os OZR apresentam também hiperinsulinémia e insulinoresistência (Kemmer *et al.*, 1979; Ceddia *et al.*, 2002; Durham e Truett, 2006).

Uma vez que este modelo de obesidade está ainda associado a disfunções do sistema nervoso parassimpático (Peterson *et al.*, 1988; Teff e Townsend, 1999; Lindmark *et al.*, 2005) e também do $^{*}NO$ (Squadrito *et al.*, 1993; Morley e Mattammal, 1996), tais alterações poderão afectar a acção da insulina dependente da HISS, a qual é activada no pós-prandial, via nervos parassimpáticos hepáticos (Xie e Lutt, 1996a; Xie e Lutt, 1996b) e cuja síntese depende do $^{*}NO$ no fígado (Sadri e Lutt, 1999).

O processo de envelhecimento é também acompanhado por uma deterioração da da sensibilidade à insulina, tanto em animais (Goodman e Ruderman, 1979; Goodman *et*

al., 1983; Narimiya *et al.*, 1984; Escriba *et al.*, 2007; Gupte *et al.*, 2008), como em humanos (Fink *et al.*, 1983; Solomon *et al.*, 2008). Estudos realizados pelo nosso grupo em modelos animais sugerem que a insulinoresistência envolve um compromisso acentuado da componente de acção da insulina dependente da HISS (Lautt *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008). Adicionalmente, têm sido publicados estudos que relacionam a disfunção autonómica com o envelhecimento (Phillips e Powley, 2007; Lee *et al.*, 2008), o que pode estar relacionado com uma reduzida acção da insulina dependente da HISS (Ribeiro *et al.*, 2008). Uma vez que os ratos Zucker geneticamente obesos (OZR) apresentam uma insulinoresistência que varia com a idade (Apweiler e Freund, 1993; Korach-Andre *et al.*, 2005; Durham e Truett, 2006), será interessante comparar o contributo da HISS para a sensibilidade à insulina em OZR jovens e velhos.

O presente estudo teve como principal objectivo a caracterização da via da HISS nos ratos Zucker de 9 e 52 semanas, em particular nos ratos obesos (OZR), nomeadamente através da manipulação dos nervos parassimpáticos e da síntese de ^{14}C -NO hepático. A hipótese testada foi a de que a componente de acção da insulina dependente da HISS está comprometida neste modelo genético de obesidade (OZR), o que contribui para o estado de insulinoresistência pós-prandial nestes animais. Testou-se também a hipótese de que nos ratos não obesos (LZR) a acção da insulina dependente da HISS diminui com a idade (9 vs 52 semanas), sendo que nos OZR essa diminuição é menor, uma vez que a HISS estaria já afectada às 9 semanas de idade.

6.2. PROTOCOLOS

Nestas experiências estudou-se a sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos Zucker obesos (OZR, n=20), por comparação com os seus controlos não-obesos (LZR, n=24), às 9 e 52 semanas de idade. Para o efeito, desenvolveram-se dois protocolos experimentais, ambos no estado pós-prandial (18 h de jejum, seguido de 1 h de acesso à comida). Todos os animais foram testados sob anestesia e os procedimentos cirúrgicos foram os previamente descritos para o modelo agudo (capítulo 3.4).

No primeiro protocolo, após efectuar um RIST controlo, inibiu-se a via de acção da insulina dependente da HISS por administração de atropina (3 mg/kg, iv) e, em seguida, realizou-se um segundo RIST (RIST pós-atropina).

No segundo protocolo, apenas foram utilizados ratos OZR e LZR com 9 semanas de idade e a cirurgia incluiu a cateterização da veia porta (secção 3.4.2.3). Após a realização do RIST controlo, inibiu-se a via da HISS por administração de L-NMMA (0.73 mg/kg, ipv) e efectuou-se o RIST pós-L-NMMA. Em seguida, para testar se o defeito na via da HISS se devia à diminuição da síntese de NO , administrou-se o dador de NO SIN-1 (5 mg/kg, ipv) e realizou-se o RIST pós-SIN-1.

Colheram-se ainda amostras de fígado de LZR e OZR de 9 (LZR, n=8; OZR, n=12) e 52 (LZR, n=9; OZR, n=7) semanas de idade, no estado pós-prandial, especificamente para quantificação do glutatióno por HPLC, como descrito na secção 3.11.2.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. MASSA CORPORAL (PESO) E PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Os ratos obesos (OZR) eram significativamente mais pesados do que os seus controlos não obesos (LZR), tanto às 9 semanas (OZR, 341.7 ± 10.0 g, $n=24$; LZR, 272.1 ± 6.4 g de peso; $n=22$; $p < 0.001$), como às 52 semanas (OZR, 606.4 ± 19.8 g, $n=15$; LZR, 507.1 ± 5.1 g, $n=19$; $p < 0.001$) de idade. Observou-se também um aumento significativo de peso em ambas as estirpes entre as 9 e as 52 semanas de idade ($p < 0.001$).

A pressão arterial média basal era semelhante entre LZR (103.6 ± 2.9 mmHg, $n=14$) e OZR (110.2 ± 3.9 mmHg) com 9 semanas de idade, não se observando alterações significativas da pressão no início dos RISTs pós-atropina (LZR, 100.8 ± 5.1 mmHg, $n=6$; OZR, 108.3 ± 6.0 mmHg, $n=6$) e pós-L-NMMA (LZR, 99.4 ± 3.3 mmHg, $n=8$; OZR, 107.8 ± 4.4 mmHg, $n=6$), relativamente aos valores basais. No entanto, aquando do início do RIST pós-SIN-1, a pressão arterial média era significativamente mais baixa do que no basal e no pós-L-NMMA, tanto nos LZR (79.8 ± 7.8 mmHg; $p < 0.01$ vs basal; $p < 0.05$ vs pós-L-NMMA), como nos OZR (72.6 ± 4.2 mmHg; $p < 0.001$ vs basal e pós-L-NMMA), não havendo diferenças entre as duas estirpes.

Às 52 semanas de idade, a pressão arterial média era também semelhante entre LZR (87.8 ± 2.6 mmHg, $n=10$) e OZR (89.2 ± 6.4 mmHg, $n=8$), mas significativamente mais baixa do que nos ratos jovens-adultos (9 vs 52 semanas de idade: LZR, $p < 0.01$; OZR, $p < 0.05$). A administração de atropina não induziu alterações significativas na pressão arterial média (LZR, 84.2 ± 4.6 mmHg; OZR, 91.6 ± 5.1 mmHg).

6.3.2. GLICÉMIA E INSULINÉMIA

Nos ratos com 9 semanas de idade, submetidos ao protocolo da atropina, não havia diferenças significativas em termos de glicémia pós-prandial basal (LZR, 107.7 ± 4.3 mg/dl, n=6; OZR, 113.3 ± 3.5 mg/dl, n=6), sendo que estes valores não eram diferentes no início do RIST pós-atropina (LZR, 100.0 ± 2.1 mg/dl; OZR, 110.7 ± 9.0 mg/dl). Nos animais com 52 semanas de idade não se observaram alterações significativas da glicémia basal relativamente aos animais com 9 semanas (LZR, 103.8 ± 3.5 mg/dl, n=10; OZR, 100.4 ± 4.9 mg/dl, n=8). De igual forma, a atropina também não afectou a glicémia nestes animais (LZR, 100.4 ± 2.1 mg/dl; OZR, 103.5 ± 3.8 mg/dl).

No protocolo de inibição do NOS hepático, realizado nos ratos com 9 semanas de idade, a glicémia basal também não foi significativamente diferente entre as duas estirpes (LZR, 110.6 ± 2.8 , n=8; OZR, 118.4 ± 2.4 mg/dl, n=6). A glicémia não variou após a L-NMMA (LZR, 114.4 ± 3.9 mg/dl; OZR, 114.2 ± 1.9 mg/dl). Embora pareça haver uma tendência para aumento da glicémia após a administração do SIN-1, o valor de glicémia no início do RIST pós-SIN-1 não é diferente do controlo ou do pós-L-NMMA (LZR, 119.1 ± 7.6 mg/dl; OZR, 116.3 ± 12.7 mg/dl).

A insulinémia pós-prandial basal, medida por RIA nos ratos com 9 semanas de idade, encontrava-se elevada nos ratos obesos (OZR, 18.6 ± 2.0 ng/ml, n=5) comparativamente aos seus controlos não-obesos (LZR, 1.1 ± 0.1 ng/ml, n=4; $p < 0.001$).

6.3.3. CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONO HEPÁTICO

Os níveis de glutatono hepático na forma reduzida (GSH), essenciais para a acção da via da HISS e conseqüentemente para a acção total da insulina no pós-prandial, estavam significativamente diminuídos nos ratos obesos (OZR) de 9 semanas

(4.8 ± 0.1 mmol/g de fígado, $n=12$) em comparação com os animais não obesos (LZR) com a mesma idade (5.9 ± 0.2 mmol/g de fígado, $n=8$; $p < 0.001$). Às 52 semanas de idade os OZR também apresentavam uma concentração de GSH hepático (3.7 ± 0.2 mmol/g de fígado, $n=7$) inferior à observada nos LZR (5.6 ± 0.2 mmol/g de fígado, $n=9$; $p < 0.001$). A concentração de GSH hepático decresceu nos OZR das 9 para as 52 semanas ($p < 0.001$), mas nos LZR a diferença não foi estatisticamente significativa, como se pode ver na figura 6.1.

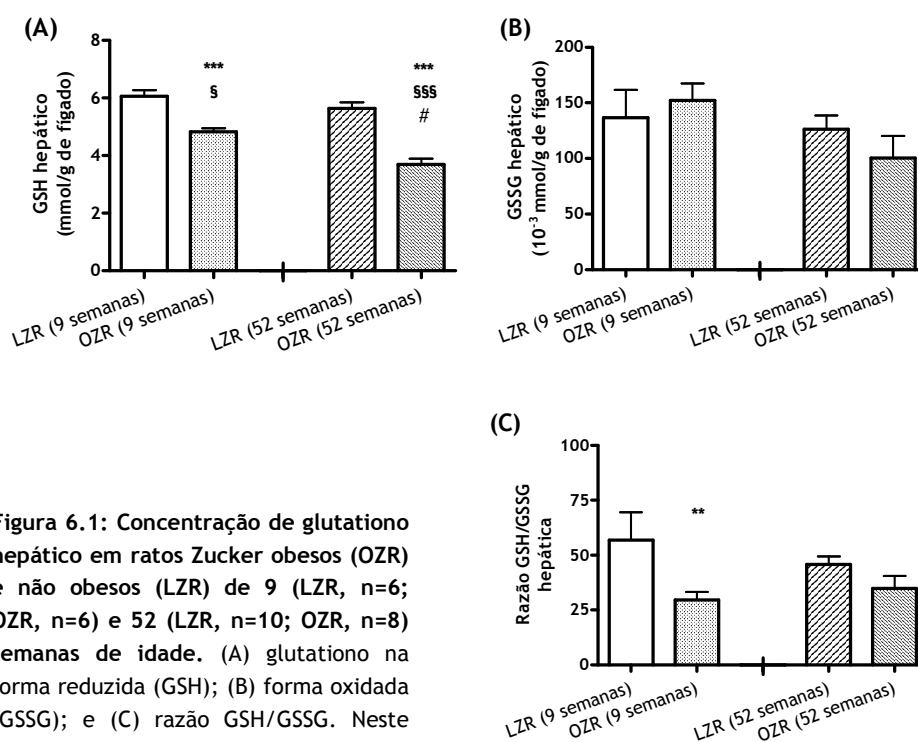


Figura 6.1: Concentração de glutatíon hepático em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR) de 9 (LZR, $n=6$; OZR, $n=6$) e 52 (LZR, $n=10$; OZR, $n=8$) semanas de idade. (A) glutatíon na forma reduzida (GSH); (B) forma oxidada (GSSG); e (C) razão GSH/GSSG. Neste modelo de obesidade (OZR), o GSH hepático está baixo e diminui com a idade. Os resultados são média \pm SEM.

** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, vs grupo LZR 9 semanas; $^{\S}p < 0.05$ e $^{\S\S\S}p < 0.001$, vs grupo LZR 52 semanas; $^{\#\#\#}p < 0.001$, vs grupo OZR 9 semanas (teste *one-way* ANOVA, seguido de teste de Tukey-Kramer).

Por seu lado, os níveis de glutatióno na forma oxidada (GSSG), quantificados nas mesmas amostras, não variaram entre OZR e LZR, nem às 9 (OZR, 152.2 ± 15.0 $\mu\text{mol/g}$ de fígado; LZR, 134.4 ± 23.1 $\mu\text{mol/g}$ de fígado) nem às 52 (OZR, 100.4 ± 19.7 $\mu\text{mol/g}$ de fígado; LZR, 126.2 ± 12.3 $\mu\text{mol/g}$ de fígado) semanas de idade (figura 6.1).

Finalmente, a razão GSH/GSSG, calculada a partir das concentrações hepáticas de GSH e GSSG (figura 6.1), diferiu apenas nos animais com 9 semanas de idade (OZR, 29.7 ± 3.5 ; LZR, 50.3 ± 11.3 ; $p < 0.05$), não variando relativamente aos restantes grupos (OZR e LZR de 52 semanas, 34.8 ± 5.7 e 45.8 ± 3.6 , respectivamente).

6.3.4. ESTUDO DA SENSIBILIDADE À INSULINA DEPENDENTE E INDEPENDENTE DA HISS EM RATOS ZUCKER DE 9 E 52 SEMANAS

6.3.4.1. Efeito da administração de atropina na sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos Zucker com 9 semanas de idade

Na figura 6.2 apresentam-se os perfis dinâmicos da acção da insulina pós-prandial total (RIST controlo), bem como os perfis de acção da insulina obtidos após administração de atropina (independente da HISS) e dependente da via da HISS.

O perfil de acção da insulina pós-prandial total, dado pelo RIST controlo, encontrava-se fortemente alterado nos ratos obesos de 9 semanas (OZR) relativamente aos controlos não obesos (LZR, figura 6.2). A magnitude do pico de acção da insulina durante o RIST controlo nos OZR (5.4 ± 0.5 $\text{mg glucose} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $n=6$) foi cerca de 1/3 da observada para os LZR (14.8 ± 1.4 $\text{mg glucose} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $n=6$; $p < 0.001$), sendo que a duração do RIST controlo também foi significativamente menor nos OZR (21.7 ± 2.5 min) do que nos LZR (38.1 ± 2.1 min; $p < 0.001$) (tabela XI).

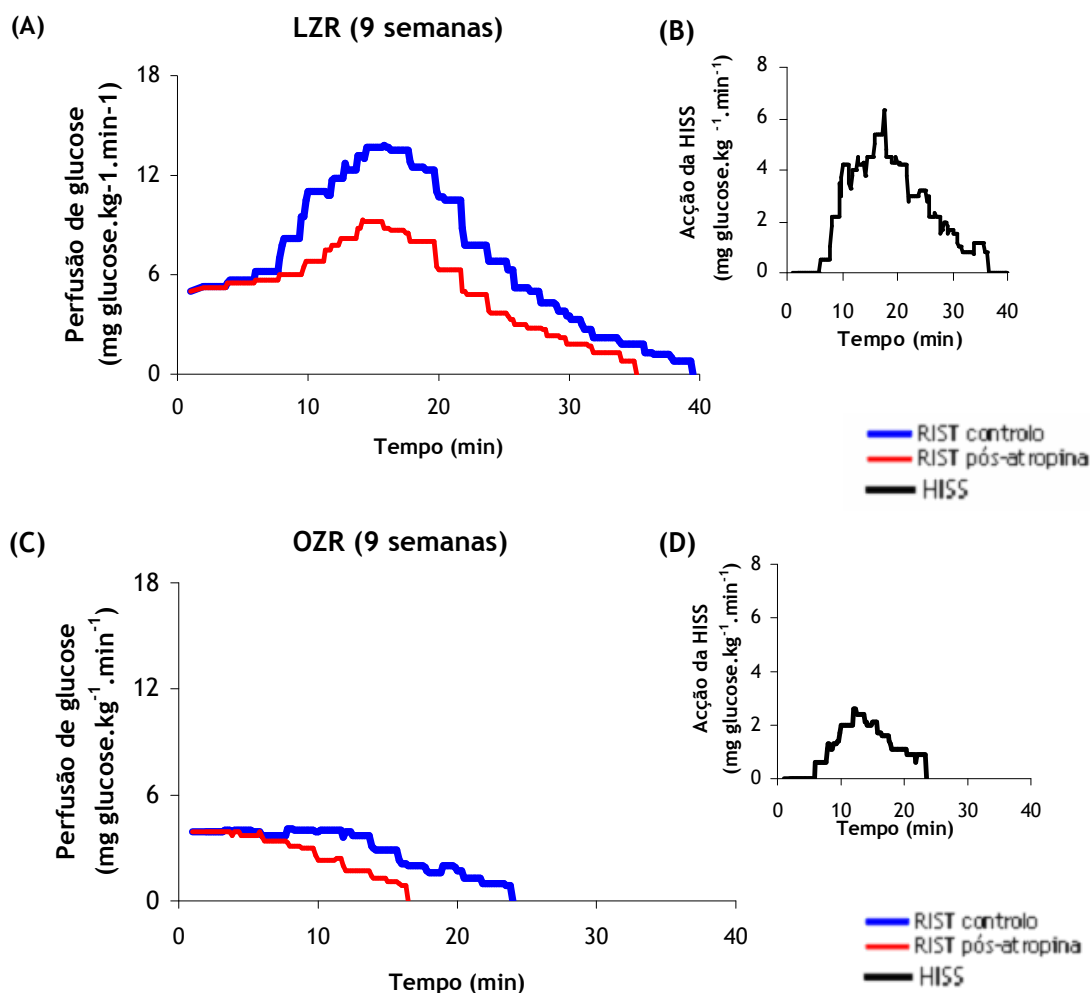


Figura 6.2: Perfis dinâmicos dos RISTs controlo (acção total da insulina), pós-atropina (insulina *per se*) e da acção da HISS, em ratos Zucker obesos (OZR, n=6) e não obesos (LZR, n=6) com 9 semanas de idade. A acção da HISS (a preto) para os LZR (B) e OZR (D) foi obtida por subtracção dos perfis do RIST controlo (a azul) pelos do RIST pós-atropina (a vermelho) nos gráficos (A) e (C), respectivamente. Como se pode ver, tanto a acção da insulina *per se* (pós-atropina) como a via da HISS estão afectadas nos OZR. RIST, teste rápido de sensibilidade à insulina; HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina.

A curva de acção da insulina independente da HISS (RIST pós-atropina, figura 6.2) também se encontrava afectada nos ratos obesos, tanto no que respeita à magnitude (OZR, 4.1 ± 0.3 mg glucose.kg⁻¹.min⁻¹; LZR, 10.0 ± 1.1 mg glucose.kg⁻¹.min⁻¹; $p < 0.001$), como à duração do pico (OZR, 16.2 ± 1.7 min; LZR, 34.2 ± 2.6 min; $p < 0.001$) do RIST pós-atropina (tabela XI).

Finalmente, as alterações no perfil de acção da insulina dependente da via da HISS observadas neste modelo de obesidade (figura 6.2) são semelhantes às descritas para a componente independente da HISS. Com efeito, apesar do início de acção da insulina (“onset”) não ser diferente entre OZR (7.7±2.0 min) e LZR (6.9±1.2 min), a duração da acção da HISS nos OZR (13.1±1.8 min) é cerca de metade da observada nos LZR (26.4±3.4 min; $p < 0.001$), o mesmo sucedendo com a magnitude do pico de acção da insulina dependente da HISS (OZR, 3.4±0.9 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹; LZR, 7.0±1.3 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹; $p < 0.001$). Estes dados são apresentados na tabela XI.

Tabela XI - Parâmetros médios dos perfis dos RISTs controlo, pós-atropina (independente da HISS) e de acção da HISS, em ratos Zucker obesos (OZR, n=6) e não obesos (LZR, n=6) de 9 semanas de idade. Os OZR apresentam alterações pronunciadas nas curvas de acção da insulina total, dependente e independente da HISS. RIST, teste rápido de sensibilidade à insulina. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. Resultados são média ± SEM.

		LZR	OZR
		(9 semanas)	(9 semanas)
RIST controlo	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	14.8±1.4	5.4±0.5 ^a
	Momento do pico (min)	15.1±1.1	8.5±1.6 ^b
	Duração (min)	38.1±2.1	21.7±2.5 ^a
RIST pós-atropina	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	10.0±1.1	4.1±0.3 ^a
	Momento do pico (min)	13.5±1.8	6.6±1.4 ^c
	Duração (min)	34.2±2.6	16.2±1.7 ^a
Acção da HISS	Início de acção (“onset”, min)	6.9±1.2	7.7±2.0
	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	7.0±1.3	3.4±0.9 ^c
	Momento do pico (min)	15.6±1.7	12.4±0.7
	Fim da acção (“offset”, min)	33.4±2.7	21.4±2.6 ^b
	Duração (min)	26.4±3.4	13.1±1.8 ^a

^a $p < 0.001$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.05$ (OZR vs LZR). Teste *t-student*.

A partir das áreas sob as curvas representadas na figura 6.2, quantificaram-se os respectivos RIST index, os quais são apresentados na figura 6.3. Como se pode observar, às 9 semanas de idade os ratos obesos (OZR) apresentavam uma sensibilidade à insulina pós-prandial total (RIST index controlo, 73.7 ± 14.2 mg glucose/kg bw, $n=6$) significativamente inferior à dos animais controlo (LZR, 289.2 ± 24.7 mg glucose/kg bw, $n=6$; $p < 0.001$). A acção da insulina independente da HISS, obtida por bloqueio dos nervos parassimpáticos (RIST index pós-atropina), foi também menor nos OZR (39.3 ± 3.5 mg glucose/kg bw) do que nos LZR (173.3 ± 20.5 mg glucose/kg bw, $n=6$; $p < 0.001$).

De igual modo, os OZR apresentavam também um pronunciado decréscimo na componente de acção da insulina dependente da via da HISS (34.4 ± 12.8 mg glucose/kg bw, $n=6$) em comparação com os LZR (115.9 ± 19.4 mg glucose/kg bw, $n=6$; $p < 0.01$), como se pode observar na figura 6.3.

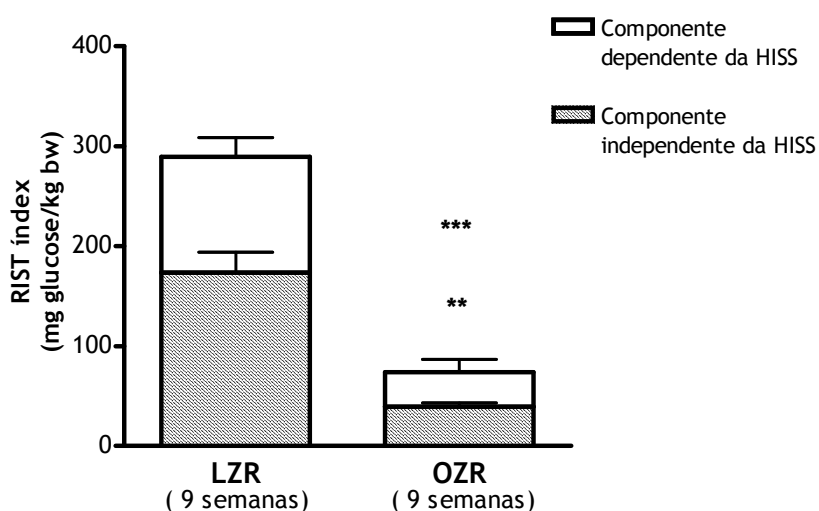


Figura 6.3: Sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR), com 9 semanas de idade. Os ratos obesos (OZR, $n=6$) são insulinoresistentes relativamente aos controlos (LZR, $n=6$). Ambas as componentes de acção da insulina, a dependente (a branco) e a independente (RIST pós-atropina, a tracejado) da via da HISS, encontram-se diminuídas nos OZR. A acção total da insulina (RIST controlo) é dada pela soma das duas componentes (soma das porções a tracejado e a branco). HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. RIST, teste rápido de sensibilidade à insulina. Os resultados são média \pm SEM. *** $p < 0.001$ relativamente ao total e à componente da HISS; ** $p < 0.01$ relativamente à componente independente da HISS. Teste *t-student*.

Uma observação interessante é que, nos ratos obesos de 9 semanas, ambas as componentes de acção da insulina (dependente e independente da HISS) estão diminuídas na mesma proporção (figura 6.4). De facto, a contribuição da via da HISS para a acção total da insulina, dada pela percentagem de inibição obtida por administração de atropina (figura 6.4), foi semelhante para os OZR (41.3 ± 8.0 %) e LZR (40.1 ± 6.5 %). A contribuição da componente independente da HISS foi também idêntica nos dois grupos (OZR, 58.8 ± 8.0 %; LZR, 59.9 ± 6.5 %).

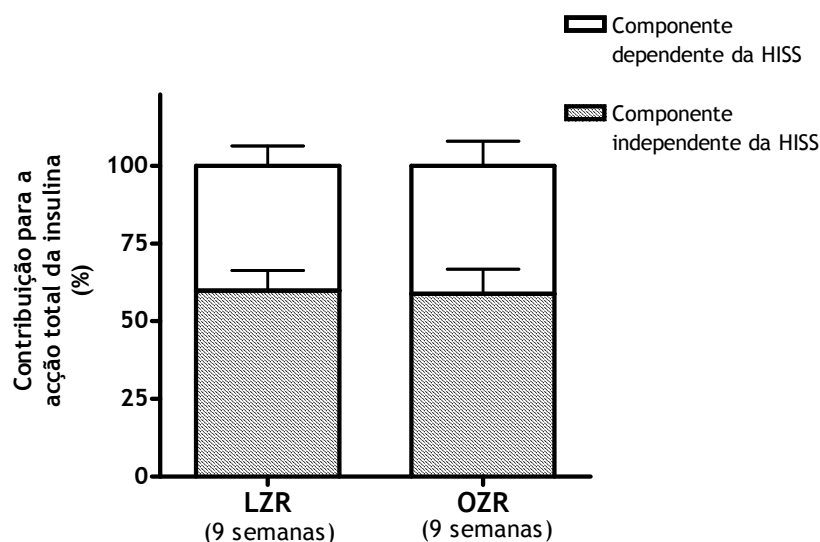


Figura 6.4: Percentagem de contribuição da acção da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS) para a acção total da insulina em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR) de 9 semanas de idade. A HISS contribui para a acção da insulina pós-prandial (total) na mesma proporção em OZR (n=6) e LZR (n=6), sugerindo que nos OZR ambas as componentes de acção da insulina (dependente e independente da HISS) estão diminuídas. Os resultados são a média \pm SEM. Teste *t-student*.

Assim, às 9 semanas de idade, a insulinoresistência pós-prandial observada nos ratos Zucker obesos (OZR) parece dever-se ao decréscimo de ambas as componentes de acção da insulina, as quais são afectadas na mesma proporção.

6.3.4.2. Efeito da administração de atropina na sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos Zucker com 52 semanas de idade

Tal como nos ratos jovens, também nos Zucker de 52 semanas se observou que os obesos (OZR) apresentavam perfis de acção da insulina (total, dependente ou independente da HISS) diminuídos em relação aos não obesos (LZR) com a mesma idade. Estes resultados apresentam-se na figura 6.5.

Analisando os perfis dos RISTs controlo (figura 6.5), observa-se que os OZR apresentam uma magnitude do pico do RIST (5.1 ± 0.5 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹, n=8) reduzida relativamente aos LZR (9.5 ± 0.5 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹, n=10; $p < 0.001$), o mesmo acontecendo com a duração do RIST controlo (OZR, 25.8 ± 1.3 min; LZR, 34.1 ± 0.8 min; $p < 0.001$) (tabela XII).

O RIST pós-atropina (figura 6.5), que representa a sensibilidade à insulina independente da HISS, também apresentou um pico e uma duração diminuídos nos OZR (3.7 ± 0.4 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹ e 21.6 ± 1.4 min) em relação aos LZR (7.0 ± 0.4 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹ e 29.6 ± 2.6 min; $p < 0.001$), como se pode ver na tabela XII.

Finalmente, a curva de acção da insulina dependente da via da HISS (figura 6.5) seguia a mesma tendência do controlo e do pós-atropina: os OZR de 52 semanas apresentavam uma curva de acção da via da HISS com menor magnitude (2.7 ± 0.4 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹) e menor duração (18.4 ± 1.8 min) do que os LZR (4.8 ± 0.4 mg glucose.kg⁻¹.min.⁻¹, $p < 0.01$; 24.6 ± 1.8 min, $p < 0.05$). A tabela XII apresenta os dados das curvas dinâmicas dos perfis de acção da insulina.

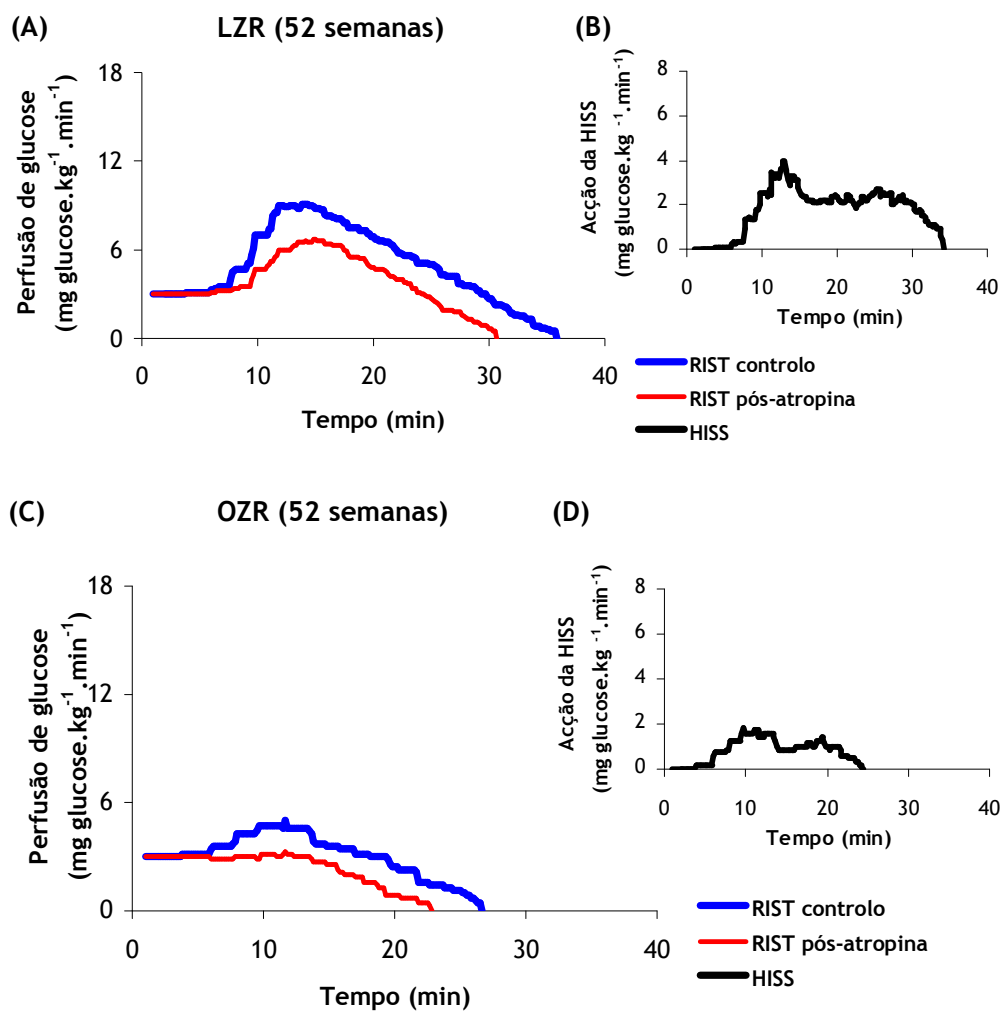


Figura 6.5: Perfis de acção da insulina total (RIST controlo), dependente da HISS e independente da HISS (RIST pós-atropina), em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR), de 52 semanas de idade. Também com esta idade as curvas de acção da insulina nos OZR parecem comprometidas relativamente aos LZR, embora nestes animais a sensibilidade à insulina tenha sido afectada pelo envelhecimento. A acção da HISS nos gráficos (B) e (D) foi obtida por subtracção do perfil do RIST controlo (a azul) pelo RIST pós-atropina (a vermelho) nos gráficos (A) e (C), respectivamente. RIST, teste rápido de sensibilidade à insulina; HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina.

Tabela XII - Parâmetros médios dos perfis de acção da insulina total (RIST controlo), dependente da HISS e independente da HISS (RIST pós-atropina), em ratos Zucker obesos (OZR, n=8) e não obesos (LZR, n=10) de 52 semanas de idade. A diminuição dos parâmetros das curvas de acção da insulina nos OZR relativamente aos LZR mantém-se às 52 semanas de idade, sendo que nos LZR a acção da insulina é afectada com o envelhecimento. RIST, teste rápido de sensibilidade à insulina. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. Os resultados são média \pm SEM.

		LZR	OZR
		(52 semanas)	(52 semanas)
RIST controlo	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	9.5 \pm 0.5	5.1 \pm 0.5 ^a
	Momento do pico (min)	13.2 \pm 0.5	10.3 \pm 0.8 ^b
	Duração (min)	34.1 \pm 0.8	25.8 \pm 1.3 ^a
RIST pós-atropina	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	7.0 \pm 0.4	3.7 \pm 0.4 ^a
	Momento do pico (min)	14.4 \pm 0.5	9.0 \pm 1.0 ^a
	Duração (min)	29.6 \pm 2.6	21.6 \pm 1.4 ^a
Acção da HISS	Início de acção (“onset”, min)	8.2 \pm 0.9	7.5 \pm 0.9
	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	4.8 \pm 0.4	2.7 \pm 0.4 ^b
	Momento do pico (min)	13.1 \pm 1.1	12.6 \pm 1.5
	Fim da acção (“offset”, min)	32.7 \pm 0.9	26.1 \pm 1.3 ^a
	Duração (min)	24.6 \pm 1.8	18.4 \pm 1.8 ^c

^a $p < 0.001$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.05$ (OZR vs LZR). Teste *t-student*.

A quantificação dos RISTs índice controlo e pós-atropina nos ratos Zucker de 52 semanas levou a conclusões semelhantes. Também às 52 semanas, os OZR apresentavam um RIST índice controlo (80.1 \pm 6.9 mg glucose/kg bw, n=8) significativamente inferior ($p < 0.001$) ao dos LZR (173.0 \pm 10.9 mg glucose/kg bw, n=10), confirmando a insulinoresistência pós-prandial marcada neste modelo genético de obesidade (figura 6.6).

O RIST índice pós-atropina também era inferior nos OZR (51.0 ± 5.8 mg glucose/kg bw) do que nos LZR (116.8 ± 7.7 mg glucose/kg bw; $p < 0.001$) de 52 semanas (figura 6.6).

No entanto, e ao contrário de acontecia às 9 semanas de idade, a acção da insulina dependente da HISS não era estatisticamente diferente entre os OZR (29.1 ± 5.1 mg glucose/kg bw) e os LZR (57.3 ± 11.4 mg glucose/kg bw) de 52 semanas de idade, apesar da tendência para que tal ocorra, como se pode ver na figura 6.6.

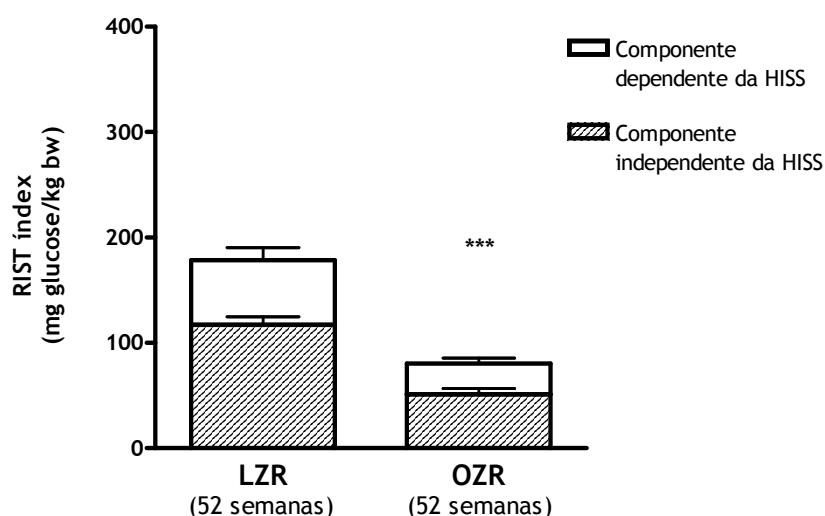


Figura 6.6: Sensibilidade à insulina (RIST index) pós-prandial, dependente e independente da HISS, em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR) com 52 semanas de idade. Às 52 semanas de idade, a componente de acção da insulina independente da HISS (insulina *per se*, a tracejado) é menor nos ratos obesos (OZR, $n=8$) do que nos ratos não obesos (LZR, $n=10$). Embora não haja diferenças significativas na componente dependente da HISS (a branco), esta também parece diminuir. A sensibilidade à insulina pós-prandial total (soma das porções dos gráficos a branco e a tracejado) também está diminuída nos OZR. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. Os resultados são a média \pm SEM. *** $p < 0.001$, em relação à acção da insulina total e independente da HISS (OZR vs LZR). Teste *t-student*.

À semelhança do que acontecia às 9 semanas de idade, às 52 semanas também não se observa diferença entre a percentagem de inibição induzida pela atropina em OZR (36.0 ± 6.1 %) e LZR (31.5 ± 4.7 %) (figura 6.7). A componente independente da HISS representava 64.0 ± 6.1 % (OZR) e 68.5 ± 4.7 % (LZR) da acção total da insulina, não

havendo diferença entre as duas estirpes. No entanto, como se pode observar na figura 6.7, nos LZR de 52 semanas a componente independente da HISS tem uma maior preponderância para a acção total da insulina do que a componente da HISS, aparentemente por um decréscimo desta.

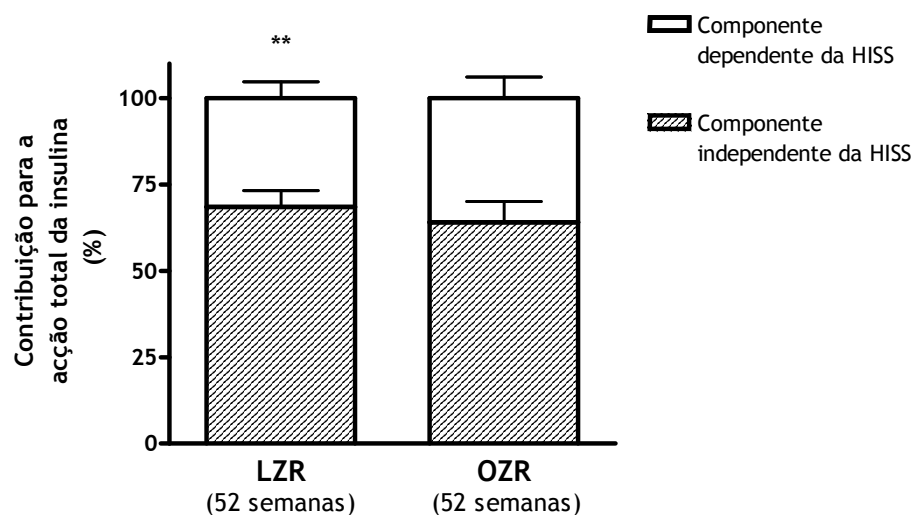


Figura 6.7: Percentagem de contribuição das duas componentes (dependente e independente da HISS) para a acção da insulina pós-prandial em ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR) com 52 semanas de idade. A contribuição de ambas as componentes para a acção pós-prandial (total) da insulina é semelhante entre OZR (n=8) e LZR (n=10) de 52 semanas. No entanto, em ambos os grupos de animais a componente independente da HISS tem um peso maior na acção total da insulina. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. Os resultados são a média \pm SEM. $**p < 0.01$, componente dependente vs componente independente da HISS nos OZR. Testes t-student.

Às 52 semanas de idade os ratos obesos (OZR) são insulinoresistentes em comparação com os animais não obesos (LZR). Esta diferença na sensibilidade à insulina entre OZR e LZR parece dever-se ao compromisso de ambas as componentes de acção da insulina, parecendo contudo haver uma maior contribuição da insulina *per se*.

6.3.4.3. Efeito da idade na sensibilidade à insulina nos ratos Zucker: comparação entre as 9 e as 52 semanas de idade

A figura 6.8 estabelece a comparação entre ratos jovens-adultos (9 semanas de idade) e ratos velhos (52 semanas de idade), relativamente a cada uma das componentes de acção da insulina (dependente e independente da HISS).

No caso dos animais obesos (OZR), nenhuma das componentes de acção da insulina se altera entre as 9 e as 52 semanas, o mesmo acontecendo com a sensibilidade total à insulina pós-prandial (RIST índice controlo) (figura 6.8).

Em contraste, nos ratos não obesos (LZR) o RIST índice controlo (figuras 6.3 e 6.6) decresceu de 289.2 ± 24.7 mg glucose/kg bw para 173.0 ± 10.9 mg glucose/kg bw ($p < 0.001$) entre as 9 e as 52 semanas de idade, o que representa uma redução no RIST índice controlo de cerca de 40 %. A acção da insulina independente da HISS também diminuiu significativamente (cerca de 33 %; $p < 0.01$) das 9 para as 52 semanas, o mesmo acontecendo com a acção da insulina dependente da via da HISS, a qual foi também significativamente ($p < 0.05$) menor nos LZR de 52 semanas do que nos LZR de 9 semanas de idade, traduzindo-se a diferença numa redução de cerca de 50 % (figura 6.8).

Outra observação interessante é que às 52 semanas de idade, a componente de acção da insulina dependente da HISS nos LZR é semelhante ($p > 0.05$) à componente da HISS nos ratos OZR de 9 semanas (figura 6.8).

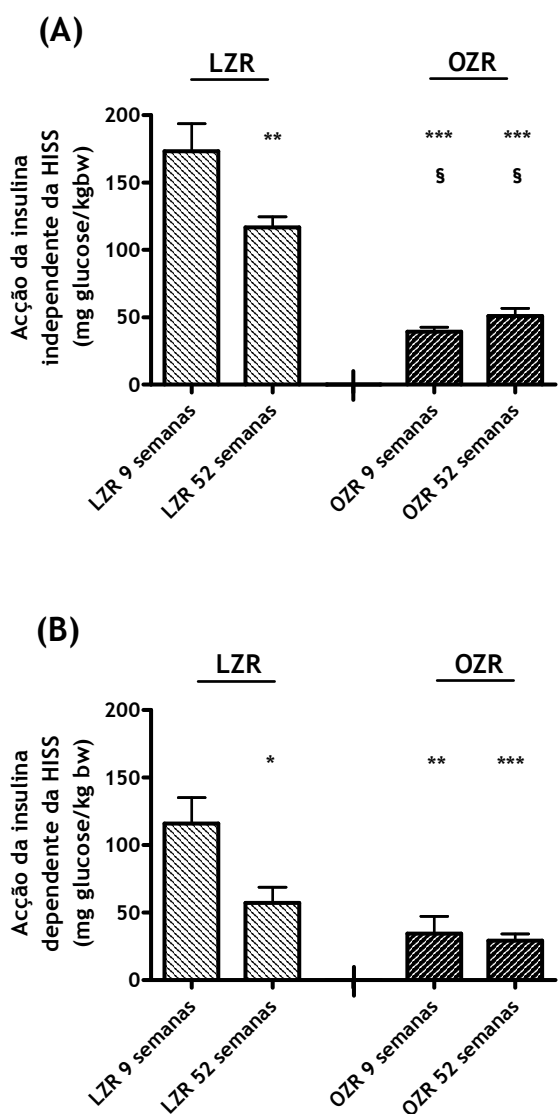


Figura 6.8: O envelhecimento afecta ambas as componentes de acção da insulina nos ratos Zucker não obesos (LZR), mas não nos ratos obesos (OZR). (A) Acção da insulina *per se* (independente da HISS) e (B) acção da insulina dependente da HISS, em ratos Zucker de 9 (n=12) e 52 semanas (n=18). HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. Resultados são média \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01 e *** p <0.001 vs LZR 9 semanas; § p <0.001 vs LZR 52 semanas. Teste *one-way* ANOVA, seguido de teste de Tukey-Kramer.

O envelhecimento reduz consideravelmente a sensibilidade à insulina pós-prandial nos LZR devido à diminuição de ambas as componentes de acção da insulina e agrava a insulinoresistência nos OZR, embora nestes últimos não altere significativamente a componente da HISS, a qual já se encontrava inibida às 9 semanas.

6.3.5. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE SIN-1 NA RESISTÊNCIA À INSULINA PÓS-PRANDIAL INDUZIDA POR L-NMMA EM RATOS ZUCKER

Os resultados obtidos por inibição do NOS hepático, conseguido pela administração *ipv* de L-NMMA aos ratos Zucker (LZR e OZR) de 9 semanas, são semelhantes aos do protocolo de administração de atropina. O RIST índice controlo nos OZR foi de 79.3 ± 1.6 mg glucose/kg bw (n=6), significativamente inferior ao observado nos LZR (277.7 ± 9.4 mg glucose/kg bw, n=8; $p < 0.001$), como se pode ver na figura 6.9.

Após administração *ipv* de L-NMMA, isto é, após inibição da síntese de *NO hepático, a sensibilidade à insulina (RIST índice pós-L-NMMA) diminuiu significativamente, tanto nos LZR (148.6 ± 11.8 mg glucose/kg bw, n=8; $p < 0.001$), como nos OZR (41.3 ± 5.6 mg glucose/kg bw, n=6; $p < 0.001$), sendo no entanto superior nos LZR ($p < 0.001$) (figura 6.9). Uma vez que o RIST índice pós-L-NMMA (figura 6.9) e o RIST índice pós atropina (figura 6.3) nos ratos de 9 semanas são semelhantes, confirma-se uma vez mais que ambos os procedimentos bloqueiam a via da HISS, sugerindo que a componente independente da HISS está diminuída neste modelo de obesidade.

Analogamente, a via de acção da insulina dependente da HISS, aqui calculada por subtracção do RIST índice pós-L-NMMA ao controlo, estava também comprometida nos ratos obesos (OZR, 38.0 ± 5.0 mg glucose/kg bw) relativamente aos não obesos (LZR (129.1 ± 10.5 mg glucose/kg bw; $p < 0.001$). A percentagem de inibição da sensibilidade à insulina induzida pela L-NMMA e correspondente à contribuição da via da HISS para a acção total da insulina, foi idêntica nas duas estirpes (OZR, 48.3 ± 6.6 %; LZR, 46.6 ± 3.9 %), assim como a contribuição da insulina *per se* (OZR, 51.7 ± 6.6 %; LZR, 53.4 ± 3.9 %), à semelhança do obtido no protocolo da atropina.

A subsequente administração *ipv* de SIN-1, um dador de *NO , reverteu a resistência à insulina induzida pela L-NMMA (RIST índice pós SIN-1) para valores idênticos aos controlo, mas apenas nos ratos não obesos (LZR, 247.2 ± 21.1 mg glucose/kg bw;

$p < 0.001$ vs L-NMMA). Com efeito, como se pode observar nas figuras 6.9 e 6.10, o SIN-1 não só não recuperou como ainda agravou a resistência à insulina nos OZR (RIST índice pós-SIN-1, 23.0 ± 2.3 mg glucose/kg bw; $p < 0.05$ vs pós-L-NMMA; $p < 0.001$ vs controlo).

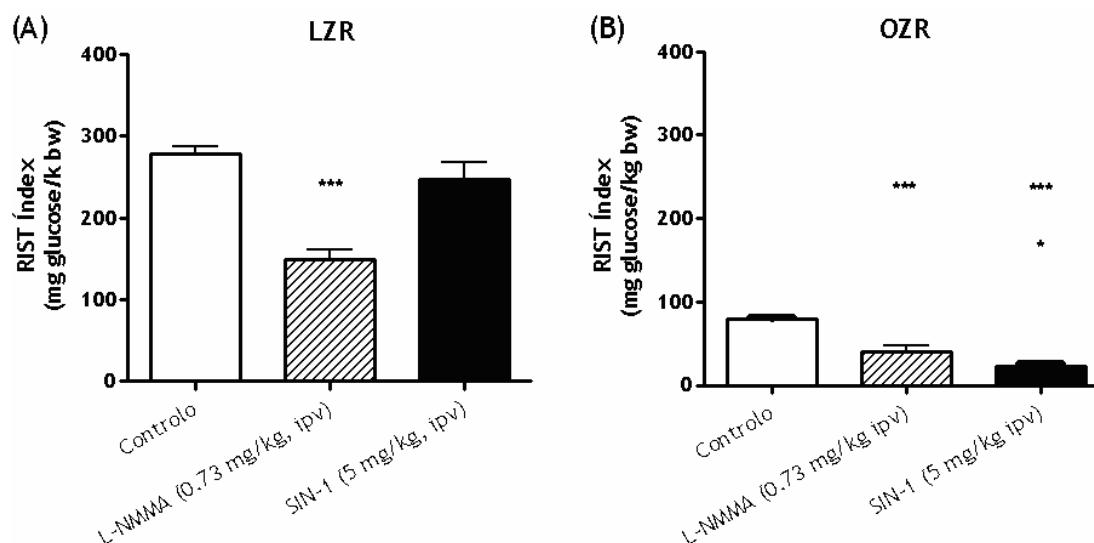


Figura 6.9: Efeito da manipulação da síntese de monóxido de azoto (óxido nítrico, *NO) hepático na sensibilidade à insulina (RIST Índice) de ratos Zucker obesos (OZR) e não obesos (LZR), com 9 semanas de idade. A sensibilidade à insulina pós-prandial (controlo, a branco) é inibida pela L-NMMA (0.73 mg/kg, ipv; a tracejado); o SIN-1 (5 mg/kg, ipv; a preto) aumenta a sensibilidade à insulina para valores próximos do controlo nos LZR (A), mas agrava a insulinoresistência nos OZR (B). Os RISTs índice controlo, pós-L-NMMA e pós-SIN-1 foram significativamente ($p < 0.001$) maiores nos LZR (A) do que nos OZR (B). O dador de *NO SIN-1 reverte a insulinoresistência induzida pela inibição da síntese de *NO hepático (L-NMMA) em LZR (A), mas é ineficaz nos ratos obesos (OZR, B) de 9 semanas. Os resultados são média \pm SEM. $*p < 0.05$ em relação ao grupo L-NMMA (em B). $***p < 0.001$ em relação ao grupo controlo (em A e B) e ao grupo SIN-1 (em A). Teste *repeated measures* ANOVA, seguido de teste Tukey-Kramer.

O SIN-1 reduziu a sensibilidade à insulina pós-L-NMMA em 16.0 ± 8.4 mg glucose/kg bw nos OZR, o que se traduz numa inibição (recuperação negativa) de 29.8 ± 18.0 % do RIST índice pós-L-NMMA. Por outro lado, nos LZR, o SIN-1 induziu um aumento de

103.2±27.4 mg glucose/kg bw na sensibilidade à insulina, o que representa uma percentagem de recuperação de 89.3±6.5 % do RIST índice controlo (figura 6.10).

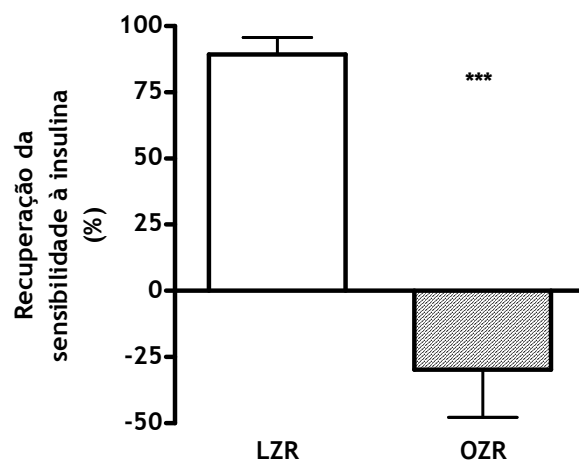


Figura 6.10: Percentagem de recuperação da sensibilidade à insulina induzida pelo dador de *NO SIN-1, após inibição da síntese de *NO hepático pela L-NMMA. O SIN-1 (5 mg/kg, ipv) reverte a resistência à insulina induzida pela L-NMMA (0.73 mg/kg, ipv) em ratos Zucker não obesos (LZR, a branco), mas é ineficaz nos ratos obesos (OZR, a tracejado) com 9 semanas de idade. *NO , monóxido de azoto (óxido nítrico). *** $p < 0.001$ em relação ao grupo LZR (teste *t-student*).

Estes resultados sugerem que o problema da insulinoresistência dependente da HISS nos OZR não se deve a baixos níveis de *NO no fígado, mas sim noutra ponto da via da HISS.

6.4. DISCUSSÃO

O objectivo destas experiências foi caracterizar as duas componentes de acção da insulina (dependente e independente da HISS) num modelo genético de obesidade - o rato Zucker (OZR). Estes resultados sugerem que os OZR apresentam uma insulinoresistência pós-prandial causada por igual decréscimo na acção de ambas as componentes. A deficiência metabólica na via da HISS parece estar localizada a jusante da estimulação parassimpática hepática e da síntese de NO , parecendo ser comum às duas componentes de acção da insulina.

Considerações metodológicas

A inibição da acção da insulina dependente da HISS em ratos Zucker foi feita por dois procedimentos experimentais distintos: administração de atropina e administração de L-NMMA. No entanto, o uso de L-NMMA teve ainda o propósito de testar se a deficiente acção da HISS se devia a uma insuficiente produção de NO hepático. Também com este objectivo, administrou-se SIN-1, um dador de NO previamente descrito como o que melhor mimetiza a síntese de NO endógeno (Schrammel *et al.*, 1998) e que é capaz de potenciar a acção da HISS em animais com inibição do parassimpático ou do NOS hepático (Sadri e Lutt, 1999). A administração de L-NMMA e SIN-1 foi efectuada como previamente descrito (Sadri e Lutt, 1999; Guarino *et al.*, 2003). A administração ipv de SIN-1 provocou um decréscimo na pressão arterial média, que se manteve abaixo do basal durante o RIST pós-SIN-1. No entanto, o efeito vasodilatador do SIN-1 não parece afectar a sensibilidade à insulina, uma vez que experiências realizadas pelo nosso grupo e o de Lutt demonstraram que a administração deste fármaco por via iv não alterava a sensibilidade à insulina, apesar do decréscimo da pressão arterial (Sadri e Lutt, 1999; Guarino *et al.*, 2003).

A insulinoresistência nos ratos Zucker obesos (OZR)

De acordo com os resultados aqui apresentados a acção periférica da insulina está significativamente diminuída nos OZR em comparação com os seus controlos não obesos, LZR. Com efeito, os OZR apresentam um défice de sensibilidade à insulina de cerca de 75 % relativamente aos LZR, o que está em concordância com estudos anteriores, tanto em ratos como em humanos (Kemmer *et al.*, 1979; Penicaud *et al.*, 1987; Brozinick *et al.*, 1994; Young e Leighton, 1998; Zhou *et al.*, 1999; Ceddia *et al.*, 2002). Adicionalmente, estudos efectuados por Patarrão e Macedo (observações não publicadas) mostraram que em voluntários humanos com excesso de peso (IMC de $27.7 \pm 0.4 \text{ kg/m}^2$) há também uma diminuição da sensibilidade à insulina pós-prandial de aproximadamente 57 % relativamente a indivíduos não obesos (IMC de $22.7 \pm 1.1 \text{ kg/m}^2$).

No estado de jejum a contribuição da HISS para a acção da insulina é praticamente nula, pelo que a distribuição de glucose insulino dependente é feita apenas por acção da componente da insulina *per se*, isto é, independente da HISS (Lautt *et al.*, 2001). Desta forma, uma vez que a maioria dos estudos relacionados com a determinação da sensibilidade à insulina *in vivo* no modelo OZR foram realizados no estado de jejum (Penicaud *et al.*, 1987), apenas se referem à componente de acção da insulina independente da HISS, a qual o nosso estudo revelou estar também afectada.

Noutros modelos animais de insulinoresistência testados pelo nosso grupo, tais como o rato espontaneamente hipertenso (SHR) (Afonso *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2007), ratos com dieta rica em sacarose (Ribeiro *et al.*, 2005) ou ratos com dieta rica em lípidos (capítulo 5), observou-se que o decréscimo da sensibilidade à insulina é devido maioritariamente a uma acção deficiente da componente dependente da HISS. Porém, no modelo genético de obesidade aqui estudado (OZR), observou-se que o

compromisso da acção da insulina dependente da via da HISS é acompanhado por um decréscimo proporcional da componente independente da HISS.

Papel do glutatióno hepático e do stress oxidativo na insulinoresistência em OZR

Vários autores têm sugerido que a condição de obesidade, em particular neste modelo genético (OZR), é acompanhada por um aumento do *stress* oxidativo (Laight *et al.*, 1999; Soltys *et al.*, 2001; Bloch-Damti e Bashan, 2005; Houstis *et al.*, 2006), o que parece influenciar a sensibilidade à insulina (Laight *et al.*, 1999; Bloch-Damti e Bashan, 2005; Houstis *et al.*, 2006).

Está também descrita a associação entre o estado de *stress* oxidativo e a diminuição da concentração intracelular de antioxidantes como o glutatióno reduzido (GSH) (Murrant e Reid, 2001; Soltys *et al.*, 2001), sendo inclusive a quantificação de GSH e/ou da sua oxidação (GSSG) uma das abordagens possíveis para avaliar o estado oxidativo da célula (Murrant e Reid, 2001; Katz, 2007).

Soltys e colaboradores observaram que os níveis de glutatióno hepático diminuía cerca de 24 % nos OZR em relação aos LZR, o que, de acordo com estes autores, é indicativo de *stress* oxidativo (Koneru *et al.*, 1995; Soltys *et al.*, 2001). Por outro lado, os níveis de GSH hepático são também importantes para a acção da insulina no estado pós-prandial, uma vez que o GSH hepático é essencial para a acção da insulina dependente da HISS (Guarino *et al.*, 2003). De acordo com os resultados aqui apresentados, a concentração de GSH hepático era cerca de 20 % mais baixa nos OZR, sendo que a razão GSH/GSSG também estava diminuída (-48 %). O decréscimo dos níveis de GSH hepático pode explicar parcialmente a redução da acção da insulina dependente da HISS nos OZR, apesar do compromisso da acção da HISS nos OZR ser muito mais

pronunciado (~75 %) do que a diminuição do GSH hepático (~20 %). No entanto, o decréscimo dos níveis de GSH hepático não explica o porquê da diminuição da acção da insulina independente da HISS nos OZR nem o porquê dessa diminuição ser idêntica à diminuição da HISS. Contudo, não se pode descartar a possibilidade do estado oxidativo nestes animais ser generalizado e do *stress* oxidativo, por exemplo ao nível do músculo esquelético, estar na génese da insulinoresistência nos OZR.

Papel do eixo parassimpático-NO hepático na insulinoresistência dos OZR

A disfunção parassimpática está normalmente associada à condição de obesidade (Peterson *et al.*, 1988), podendo explicar em certos casos a resistência à insulina dependente da HISS, conforme discutido no capítulo transacto. Contudo, apesar dessa disfunção parassimpática poder contribuir para o decréscimo da via da HISS, não permite explicar o motivo pelo qual a componente de acção da insulina independente da HISS é também afectada nos OZR. Tem sido sugerido que a diminuição do tónus parassimpático pode levar à diminuição da secreção de insulina (Teff e Townsend, 1999). Tal é bastante controverso, uma vez que o decréscimo da secreção de insulina induzido pela atropina parece estar atenuado em sujeitos obesos (Teff e Townsend, 1999), o que é consistente com deficiências do parassimpático nesses indivíduos. Por outro lado, nos estudos descritos no capítulo 5 desta dissertação, observou-se que a administração de atropina, efectuada cerca de 2 h após a refeição, não altera a insulinémia pós-prandial basal, isto é, a insulinémia aumenta em resposta à ingestão de comida e não diminui com a posterior administração de atropina. Para além disso, apesar das disfunções do parassimpático, o modelo genético de obesidade discutido neste capítulo (OZR) tem sido descrito como hiperinsulinémico (Kemmer *et al.*, 1979), tendo-se observado no presente trabalho que a insulinémia pós-prandial nos OZR é

cerca de 17 vezes superior à dos ratos não obesos (LZR), o que é consistente com a literatura (Friedman *et al.*, 1991). Finalmente, neste caso avaliou-se a acção da insulina exógena (administrada) e observou-se uma diminuição do aporte periférico de glucose, sugerindo que o principal defeito nos OZR não diz respeito à produção de insulina, mas sim à sua acção periférica.

A síntese hepática de *NO é também importante para a via da HISS e de facto, estudos efectuados pelo nosso grupo (Fernandes, 2007) sugerem que a actividade do NOS no fígado de OZR está diminuída em cerca de 56 % relativamente aos LZR, à semelhança do que tem sido observado noutros tecidos, como o fundo gástrico, sistema nervoso central ou músculo esquelético (Morley e Mattammal, 1996; Young e Leighton, 1998). No entanto, os resultados aqui apresentados sugerem que o defeito metabólico que afecta a acção da insulina dependente da via da HISS não reside na síntese de *NO hepático, uma vez que a administração *ipv* do dador de *NO SIN-1 foi incapaz de reverter a resistência à insulina nos OZR, ao contrário do que aconteceu com os LZR. Mesmo estando a síntese de *NO diminuída nos OZR, a administração de *NO no fígado não potenciou a sensibilidade à insulina nestes animais, excluindo a baixa produção de *NO hepático como causa primária da insulinoresistência observada. Adicionalmente, o decréscimo de actividade do enzima NOS e da concentração de *NO no fígado afectaria apenas ou maioritariamente a componente de acção da insulina dependente da HISS e não a componente independente, a qual também se observou estar comprometida e exactamente na mesma proporção.

Assim, a observação de que o decréscimo das duas componentes de acção da insulina é semelhante (70-75 %) sugere que a deficiência na acção da insulina se situa a jusante quer da secreção de insulina, quer da activação dos nervos parassimpáticos hepáticos e síntese de *NO , localizando-se provavelmente num ponto metabólico comum às componentes dependente e independente da HISS.

Decréscimo de ambas as componentes de acção da insulina em OZR

- uma deficiência metabólica comum

O OZR é um modelo animal caracterizado por deficiências no receptor da leptina (Kemmer *et al.*, 1979; Fruhbeck, 1999; Ceddia *et al.*, 2002). Em condições fisiológicas, a leptina inibe a secreção de insulina (Zhao *et al.*, 1998) e estimula a libertação endotelial de *NO (Fruhbeck, 1999; Vecchione *et al.*, 2002), no que parece ser um mecanismo compensatório do efeito simpato-excitatório induzido pela leptina (Fruhbeck, 1999). Neste modelo de obesidade, a deficiência na acção da leptina pode resultar numa reduzida produção de *NO , o que permite explicar o decréscimo da sensibilidade à insulina dependente da HISS, mas não da independente. Estas deficiências no metabolismo da leptina não parecem ser responsáveis pela reduzida acção da componente independente da HISS que ocorre nos OZR, já que uma das principais consequências da deficiente acção da leptina é a sobreprodução de insulina, resultando em hiperinsulinémia, também observada no presente estudo. Para além disso, outros autores mostraram que a leptina pode não ter um efeito directo no aporte de glucose no músculo esquelético do rato (Zierath *et al.*, 1998). Desta forma, apesar do papel da leptina na obesidade e insulinoresistência associada seja merecedor de um estudo mais aprofundado, deficiências ao nível do metabolismo desta hormona não explicam, por si só, a insulinoresistência nos OZR (dependente + independente da HISS).

O músculo esquelético parece ser o tecido primariamente afectado pela insulinoresistência nos OZR (Kemmer *et al.*, 1979; Brozinick *et al.*, 1994; Shulman, 2000) e, apesar da razão gordura/músculo esquelético estar aumentada nos OZR, o músculo esquelético continua a ser o principal órgão captador de glucose (Kemmer *et al.*, 1979; Kuhlmann *et al.*, 2003). Deste modo, anomalias ao nível do músculo

esquelético irão necessariamente reflectir-se no aporte total de glucose estimulado pela insulina.

A existência de deficiências na acção da insulina no músculo esquelético de ratos Zucker obesos (OZR) é suportada por diversos estudos *in vitro*, nos quais se observaram falhas no aporte de glucose estimulado pela insulina e que podem explicar a insulinoresistência dependente e independente da HISS. Alguns dos defeitos sugeridos por outros autores incluem uma baixa taxa de ligação da insulina ao seu receptor membranar (Crettaz e Jeanrenaud, 1980; Karakash e Jeanrenaud, 1983) ou anomalias na sua via de transdução de sinal, após a ligação ao receptor (Crettaz e Jeanrenaud, 1980; Sherman *et al.*, 1988; King *et al.*, 1992; Brozinick *et al.*, 1994; Anai *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1999; Ivy, 2004), nomeadamente ao nível das proteínas transportadoras de glucose dependentes da insulina (GLUT4) (King *et al.*, 1992; Brozinick *et al.*, 1994; Ivy, 2004).

Em situação normal, a ligação da insulina ao seu receptor induz a fosforilação deste nos resíduos de tirosina, o que permite a subsequente fosforilação (também em resíduos de tirosina) dos substratos do receptor de insulina (IRS) para prossecução da cascata de sinalização (figuras 1.6 e 6.11). A fosforilação da tirosina no receptor da insulina e no IRS-1 parece estar diminuída no músculo esquelético de OZR (Zhou *et al.*, 1999), o que poderá ter duas explicações. Com efeito, tal pode ocorrer por existir uma actividade exacerbada do enzima proteína-tirosina fosfatase transmembranar, o qual desfosforila os resíduos de tirosina do receptor da insulina e do IRS-1, impedindo a transdução do sinal (Ahmad e Goldstein, 1995; Kulas *et al.*, 1995); por outro lado, no músculo esquelético de OZR parece haver uma excessiva fosforilação de resíduos de serina/treonina, quer do receptor, quer do IRS-1 (Zhou *et al.*, 1999), o que inibe a função fosforilativa do próprio receptor da insulina e impede a fosforilação adequada (de resíduos de tirosina) dos IRS-1 e IRS-2, os quais não se ligam ao 3-fosfatidilinositol cinase (PI3K) (Tanti *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1999; Shulman, 2000). Em ambos os casos,

a ligação dos IRS ao PI3K é afectada, sendo que alguns autores observaram uma diminuição na própria expressão e actividade deste enzima em OZR (Anai *et al.*, 1998) (figura 6.11).

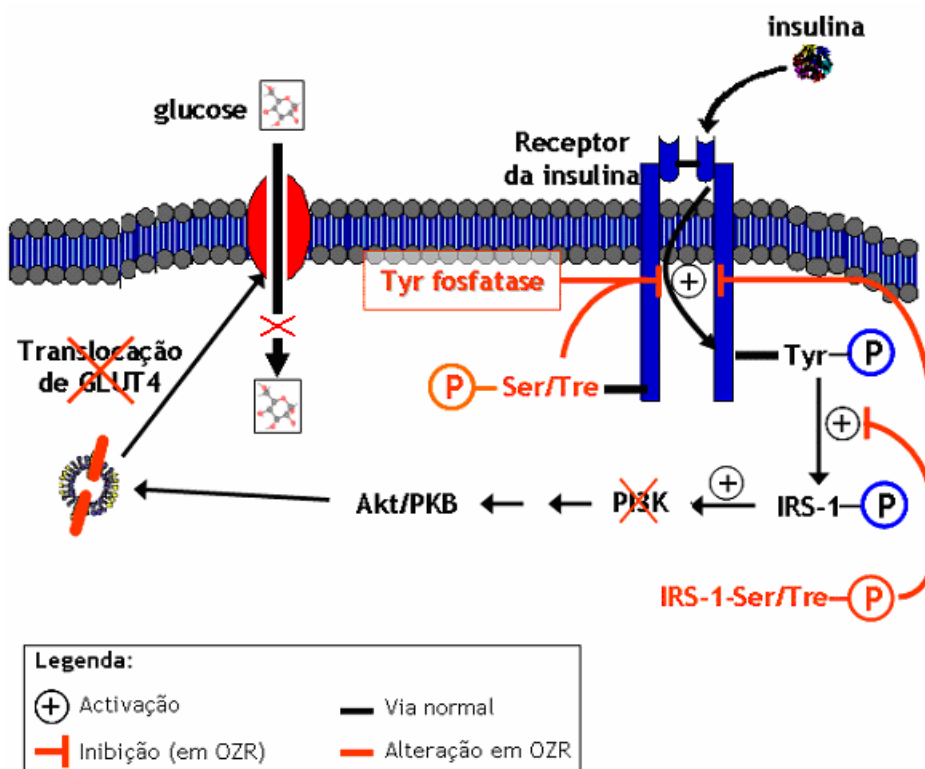


Figura 6.11: Deficiências na via de sinalização da insulina que conduz à translocação de GLUT4, em ratos Zucker obesos (OZR). A preto, representação da cascata de sinalização da insulina, iniciada pela ligação ao seu receptor e subsequente cascata de fosforilação de resíduos de tirosina (Tyr), conducente à translocação dos transportadores de glucose tipo 4 (GLUT4) e aumento do aporte de glucose, numa célula do músculo esquelético. A vermelho estão representadas algumas das alterações descritas em ratos Zucker obesos (OZR) e que interferem com a via de transdução de sinal da insulina, nomeadamente a fosforilação dos resíduos de serina/treonina (Ser/Tre) do substrato do receptor da insulina-1 (IRS-1) e do próprio receptor de insulina; a desfosforilação dos resíduos de Tyr pelo enzima tyr fosfatase está também descrita nestes animais. P, grupo fosfato; PI3K, 3-fosfatidilinositol cinase.

Estas ou outras alterações na via de transdução de sinal da insulina resultam necessariamente numa interrupção ou diminuição de actividade da mesma (Thirone *et al.*, 2006), originando uma menor translocação dos GLUT4 no músculo esquelético, o que parece ocorrer nos OZR (Crettaz e Jeanrenaud, 1980; Sherman *et al.*, 1988; King *et al.*, 1992; Brozinick *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1999; Ivy, 2004). De facto, apesar de alguns autores referirem um decréscimo da quantidade de GLUT4 no *pool* intracelular (Brozinick *et al.*, 1994), o foco tem sido dado à deficiente translocação destes transportadores (King *et al.*, 1992; Ivy, 2004), originando um decréscimo da sua concentração na membrana plasmática (Brozinick *et al.*, 1994) e consequente diminuição do aporte de glucose, como representado na figura 6.11.

As alterações existentes na translocação dos GLUT4 no músculo esquelético de OZR podem afectar não apenas a acção da insulina *per se* (independente da HISS), mas também a componente de acção da insulina dependente da HISS, uma vez que esta potencia o aporte de glucose especificamente no músculo esquelético (Xie e Lutt, 1996b). Apesar do mecanismo pelo qual a via da HISS promove a captação de glucose não ser ainda conhecido, este hipoteticamente deverá envolver a translocação de GLUT4 para a membrana, já que são estes os únicos transportadores de glucose insulino-dependentes presentes no músculo esquelético e cuja translocação aumenta do jejum para o pós-prandial, com a ligação da insulina (Watson e Pessin, 2001; Brozinick *et al.*, 2007; Katz, 2007). Assim, quer a HISS exerça a sua acção por interacção directa com o receptor da insulina, iniciando desta forma a cascata de sinalização da insulina, quer se ligue ao seu próprio receptor, a indução do aporte de glucose induzida por acção da HISS deve envolver a translocação dos GLUT4 para a membrana. Apesar de especulativo, este parece ser um passo essencial da via de transdução de sinal da insulina no qual pode ocorrer a confluência com a via da HISS e que, caso seja inibido, irá afectar igualmente a acção da HISS e da insulina *per se*. Deste modo, uma vez que a ligação da insulina e a translocação dos GLUT4 estão diminuídos nos OZR, nem a insulina

per se nem a HISS são capazes de induzir um aporte de glucose apropriado no estado pós-prandial. Com base nos nossos resultados, nos OZR ambas as componentes estão afectadas e exactamente na mesma proporção, o que parece ser explicado por a sua alteração resultar de um defeito comum às duas vias, o que aparentemente acontece no músculo esquelético. A elucidação destas questões requer a realização de estudos adicionais, como por exemplo estudos de captação de glucose e de medição da via de sinalização da insulina no músculo esquelético de OZR.

Envelhecimento e insulinoresistência nos ratos Zucker

As experiências realizadas em ratos Zucker com 1 ano (52 semanas) de idade, por comparação com as 9 semanas de idade, tiveram dois objectivos: o primeiro era estudar a evolução da insulinoresistência numa condição de obesidade a longo prazo; o segundo objectivo era estudar como é que o envelhecimento em condições fisiológicas (ratos não obesos, LZR) afecta a sensibilidade à insulina, em particular da componente dependente da HISS.

Relativamente à sensibilidade à insulina pós-prandial total em animais não obesos (LZR), os resultados obtidos ao fim de 1 ano são consistentes com os descritos na literatura relativamente ao envelhecimento (Goodman *et al.*, 1983; Escriva *et al.*, 1997; Escriva *et al.*, 2007; Lutt *et al.*, 2008). Em certos modelos animais não patológicos, a diminuição marcada da sensibilidade à insulina ocorre durante a adolescência, até às 16 semanas, mantendo-se inalterada a partir das 24 semanas pelo menos até às 96 semanas de idade (Goodman *et al.*, 1983), pelo que a escolha das idades, 9 semanas (jovens) e 52 semanas (velhos), parece adequada.

Os nossos resultados mostram que a sensibilidade total à insulina no estado pós-prandial (RIST índice controlo) em ratos velhos é cerca de 40 % inferior à dos ratos

jovens, sendo que ambas as componentes de acção da insulina diminuem com a idade. Com efeito a acção da insulina *per se* (componente independente da HISS) diminuiu cerca de 33 %, enquanto que a componente de acção da insulina dependente da HISS, a qual actua especificamente no músculo esquelético, está diminuída em 50 % (figura 6.8). Curiosamente, segundo Narimiya e colaboradores, a acção da insulina em ratos de 52 semanas é cerca de 50 % da observada às 6 semanas de idade, sendo que este declínio parece estar associado à redução da acção da insulina especificamente no músculo esquelético solear (Narimiya *et al.*, 1984). Observações semelhantes foram também recentemente obtidas por Lutt e colaboradores (Lutt *et al.*, 2008) em ratos Sprague-Dawley (modelo não patológico), nos quais o envelhecimento até às 52 semanas induziu uma insulinoresistência pós-prandial marcada (~55 % de decréscimo) e em que ambas as componentes de acção da insulina são afectadas, embora a da via da HISS em maior extensão (redução de aproximadamente 35 %). Estudos realizados pelo nosso grupo em ratos Wistar (não patológicos), revelaram uma diminuição da acção total da insulina com o envelhecimento muito semelhante ao observado nos LZR e nos Sprague-Dawley (~55 %) (Ribeiro *et al.*, 2008). No entanto, nos ratos Wistar a insulinoresistência associada à idade deve-se inteiramente ao decréscimo da via da HISS (de cerca de 84 %), sem afectar significativamente a componente independente da HISS (Ribeiro *et al.*, 2008), enquanto que em LZR e Sprague-Dawley, ambas as componentes são afectadas, apesar da HISS o ser mais acentuadamente.

A insulinoresistência dependente da HISS parece evoluir com a idade nos LZR para níveis semelhantes aos observados nos ratos obesos (OZR) logo às 9 semanas.

Nos OZR, o envelhecimento não induziu alterações significativas na sensibilidade à insulina. Diversos autores têm sugerido a existência de uma insulinoresistência marcada no músculo esquelético destes animais desde muito cedo (Crettaz e Jeanrenaud, 1980; Grundler *et al.*, 1980; Penicaud *et al.*, 1987; Korach-Andre *et al.*, 2005; Durham e Truett, 2006), a qual progride até às 9-13 semanas de idade e parece

manter-se daí em diante (Apweiler e Freund, 1993; Korach-Andre *et al.*, 2005). O facto de às 9 semanas de idade os OZR apresentarem já uma sensibilidade à insulina muito diminuta explica a inexistência de diferenças significativas na sensibilidade à insulina entre os OZR jovens (9 semanas) e velhos (52 semanas).

Em síntese, o modelo genético de obesidade estudado (OZR) apresenta uma sensibilidade à insulina pós-prandial francamente comprometida, o que se deve a um igual decréscimo de ambas as componentes de acção da insulina (dependente e independente da HISS), sugerindo que os OZR apresentam um defeito metabólico comum às duas vias, o qual parece ser ao nível do músculo esquelético. Nos ratos não obesos (LZR), há uma diminuição da sensibilidade à insulina associada à idade, provocada pelo decréscimo de ambas as componentes de acção da insulina, embora a via da HISS seja a mais afectada. Nos OZR a insulinoresistência não se agrava das 9 para as 52 semanas.

**7. CONTRIBUTO DO COMPROMISSO DA ACÇÃO
DA HISS PARA A INSULINORRESISTÊNCIA
PÓS-PRANDIAL NUM MODELO ANIMAL
DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

7. CONTRIBUTO DO COMPROMISSO DA ACÇÃO DA HISS PARA A INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL NUM MODELO ANIMAL DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 2

7.1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A obesidade e a insulinoresistência estão intimamente relacionadas, conforme descrito por outros autores (Natali e Ferrannini, 2004; Martyn *et al.*, 2008). Adicionalmente, nos capítulos anteriores da presente dissertação demonstrou-se que em animais obesos a inibição da via de acção da insulina dependente da HISS contribui, pelo menos parcialmente, para a insulinoresistência pós-prandial (capítulos 5 e 6). Com efeito, observou-se que a acção da insulina dependente da HISS estava comprometida, tanto no modelo animal alimentado com uma dieta hiperlipídica (HFD, capítulo 5), como no modelo de obesidade causada por mutação do receptor da leptina obesos (OZR, modelo patológico); note-se que no último caso a componente de acção da insulina independente da HISS também está diminuída (capítulo 6). No entanto, permanecia por esclarecer se e como é que a componente de acção da insulina dependente da HISS é afectada em animais geneticamente predispostos para o desenvolvimento não só de obesidade, mas também de diabetes *mellitus* tipo 2.

Deste modo, o principal objectivo do estudo apresentado neste capítulo foi testar a hipótese de que a via da HISS está comprometida num modelo animal de obesidade e diabetes numa idade precoce. Estudou-se também o efeito de duas dietas no desenvolvimento da insulinoresistência nesse modelo animal. Para isso recorreu-se ao rato Zucker obeso e diabético (ZDF ou ZDF/Drt fa), um modelo animal de obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2, que surgiu no último quarto do século XX, a partir de um

grupo de ratos Zucker obesos que desenvolveu espontaneamente características diabéticas (Clark *et al.*, 1983). Estes ratos apresentam desde muito cedo uma condição de pré-diabetes, caracterizada por uma insulinoresistência marcada que precede a hiperglicémia, a qual parece ser causada por uma descompensação das células β -pancreáticas (Orci *et al.*, 1990). No entanto, o desenvolvimento da insulinoresistência no estado pós-prandial, ao qual estão associadas as primeiras e maiores complicações pré-diabéticas (Hanefeld e Temelkova-Kurktschiev, 2002; Lutt, 2005), não está caracterizado em ratos ZDF.

Assim, avaliou-se a componente de acção da insulina dependente da HISS, que só está presente no estado pós-prandial, em ratos ZDF alimentados com dois tipos de ração.

7.2. PROTOCOLOS

Este estudo foi efectuado em ratos Zucker diabéticos (ZDF, n=16). Os ratos ZDF foram divididos em 2 grupos, de acordo com a ração usada na sua alimentação: grupo ZDF Panlab (n=5), alimentado com a ração *standard* (Panlab A04, Panlab S.L., Espanha); e grupo Purina (ZDF Purina, n=11), alimentado com a ração recomendada pelo fornecedor dos ratos ZDF (Purina 5008, Laddiet, EUA). Como controlos, recorreu-se aos ratos Zucker não diabéticos e não obesos, alimentados com ração Panlab (LZR, n=6).

Todos os animais foram testados sob anestesia e os procedimentos cirúrgicos foram os previamente descritos para o modelo agudo (secção 3.4).

Os testes de sensibilidade à insulina foram efectuados no estado pós-prandial, conseguido através de um jejum de 18 h, seguido de 1 h de livre acesso a comida. Após o RIST controlo, administrou-se atropina (3 mg/kg, iv) para inibição da via da HISS e realizou-se um RIST pós-atropina (secções 3.13.1.3 e 3.14.2.2).

No final da experiência, realizou-se uma laparotomia e colheu-se o fígado para quantificação do glutatióno por HPLC (descrição na secção 3.11.2). O glutatióno hepático foi também quantificado (por HPLC) num grupo adicional de LZR e ZDF Purina no estado pós-prandial, sem a realização de quaisquer procedimentos ou intervenções.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. MASSA CORPORAL (PESO) E PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Às 9 semanas de idade, a massa corporal dos ratos ZDF alimentados com ração Purina (291.3 ± 2.7 g, $n=11$) era significativamente superior à dos ratos ZDF Panlab (270.8 ± 4.4 g, $n=5$; $p < 0.01$) e à massa corporal dos controlos não obesos e não diabéticos (LZR, 258.5 ± 5.3 g, $n=14$; $p < 0.001$). A massa corporal de ZDF Panlab e LZR, ambos alimentados com ração Panlab, não foi estatisticamente diferente, sugerindo que a alimentação com Purina induz a condição de obesidade a um ritmo mais acelerado do que a ração Panlab.

A pressão arterial média no estado basal, imediatamente antes da realização do RIST controlo, era significativamente superior nos ratos ZDF, independentemente da ração (ZDF Purina, 142.8 ± 8.9 mmHg, $n=6$; ZDF Panlab, 143.0 ± 4.0 mmHg, $n=5$), em relação aos LZR (105.5 ± 6.9 mmHg, $n=6$; $p < 0.01$). A pressão arterial média não se alterou após a atropina, mantendo-se mais alta nos ZDF Purina (134.3 ± 10.1 mmHg) e nos ZDF Panlab (132.2 ± 5.7 mmHg) do que nos LZR (100.8 ± 5.1 mmHg; $p < 0.05$). Não houve diferenças de pressão arterial média entre ZDF Purina e ZDF Panlab.

7.3.2. GLICÉMIA

Como se pode ver na figura 7.1, ambos os grupos de ratos ZDF apresentavam uma hiperglicémia marcada em relação aos LZR. Contudo, foi também notória a diferença entre ZDF Purina e ZDF Panlab.

A glicémia basal pós-prandial estava elevada nos ratos ZDF Purina (201.4 ± 12.9 mg/dl, $n=6$), em comparação quer com os ZDF Panlab (156.5 ± 10.0 mg/dl, $n=5$; $p < 0.05$), quer com os LZR (107.7 ± 4.3 mg/dl, $n=6$; $p < 0.001$ vs ZDF Purina, $p < 0.01$ vs ZDF Panlab) (figura 7.1).

Após a atropina, a glicémia não se alterou, mantendo-se superior nos ZDF Purina (199.2 ± 18.6 mg/dl), relativamente a ZDF Panlab (149.0 ± 8.9 mg/dl; $p < 0.05$) e a LZR (100.0 ± 2.1 mg/dl; $p < 0.001$ vs ZDF Purina; $p < 0.01$ vs ZDF Panlab) (figura 7.1).

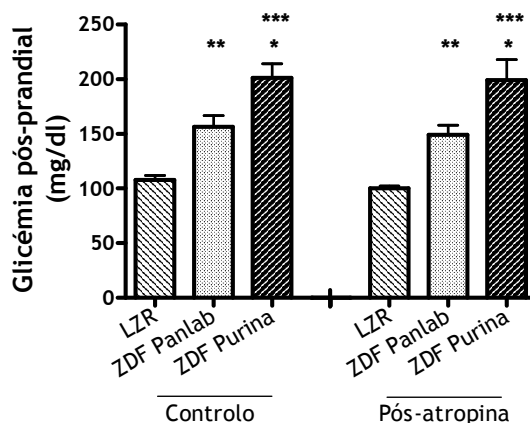


Figura 7.1: Glicémia pós-prandial em ratos Zucker diabéticos (ZDF) e não diabéticos (LZR). Os ratos Zucker diabéticos (ZDF) apresentam-se hiperglicémicos relativamente aos controlos não diabéticos não obesos (LZR, $n=6$). A ração Purina 5008 (Labdiet, EUA; ZDF Purina, $n=6$) agrava a condição de hiperglicémia nos ZDF em comparação com a ração Panlab A04 (Panlab S.L., Espanha; ZDF Panlab, $n=5$). Os resultados são média \pm SEM. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação aos grupos LZR (controlo e pós-atropina). * $p < 0.05$ entre ZDF Panlab e ZDF purina (controlo e pós-atropina). Teste *t-student* (controlo vs pós-atropina no mesmo grupo de animais) e teste *one-way* ANOVA, seguido de teste de Tukey-Kramer, entre grupos de animais.

Os ratos diabéticos (ZDF) com 9 semanas de idade apresentam já uma glicémia elevada, agravada quando submetidos a uma alimentação com ração Purina.

7.3.3. CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONO HEPÁTICO NOS RATOS ZDF

Comparou-se a concentração de GSH e GSSG, bem como a razão destas concentrações (GSH/GSSG) entre os grupos ZDF (Purina e Panlab) e LZR, resultados apresentados na figura 7.2.

A concentração de glutatióno pós-prandial não foi diferente entre os grupos que receberam atropina (GSH: ZDF Purina, 5.4 ± 0.2 mmol/g de fígado, n=6; LZR, 5.7 ± 0.6 mmol/g de fígado, n=6; GSSG: ZDF Purina, 233.3 ± 51.5 μ mol/g de fígado; LZR, 128.1 ± 63.1 μ mol/g de fígado) e os que foram testados no estado pós-prandial sem receberem atropina (GSH: ZDF Purina, 5.2 ± 0.2 mmol/g de fígado, n=5; LZR, 5.9 ± 0.2 mmol/g de fígado, n=8; GSSG: ZDF Purina, 301.2 ± 52.8 μ mol/g de fígado; LZR, 134.4 ± 23.1 μ mol/g de fígado). A atropina não parece afectar os níveis de glutatióno hepático no estado pós-prandial.

Na figura 7.2 apresenta-se uma comparação dos níveis de glutatióno hepático pós-prandial entre ratos ZDF Purina e LZR. A concentração de GSH hepático não foi estatisticamente diferente entre ratos ZDF Purina (5.2 ± 0.2 mmol/g de fígado, n=5) e LZR (5.9 ± 0.2 mmol/g de fígado, n=8) (figura 7.2). Por outro lado, o GSSG hepático estava elevado nos ratos diabéticos (ZDF Purina, 301.2 ± 52.8 μ mol/g de fígado) relativamente aos animais controlo (LZR, 134.4 ± 23.1 μ mol/g de fígado; $p < 0.05$). Quanto à razão GSH/GSSG, esta não foi estatisticamente diferente entre ZDF Purina (27.1 ± 5.4) e LZR (50.3 ± 11.3), apesar da tendência para diminuir nos ZDF Purina (figura 7.2).

Uma vez que a atropina não afecta os níveis de glutatióno, nos ratos ZDF alimentados com Panlab determinou-se a concentração de glutatióno hepático apenas no final da experiência, após a realização do RIST pós-atropina (GSH, 5.1 ± 0.3 mmol/g de fígado; GSSG, 193.6 ± 52.6 μ mol/g de fígado; razão GSH/GSSG, 52.7 ± 15.4 ; n=5) (figura 7.2), a qual não foi diferente da observada nos grupos ZDF Purina e LZR.

Os níveis de glutatono hepático não parecem estar significativamente alterados nos ratos ZDF, apesar da alimentação com Purina aumentar a oxidação do glutatono (GSSG) nos ZDF e parece tender a diminuir a razão GSH/GSSG.

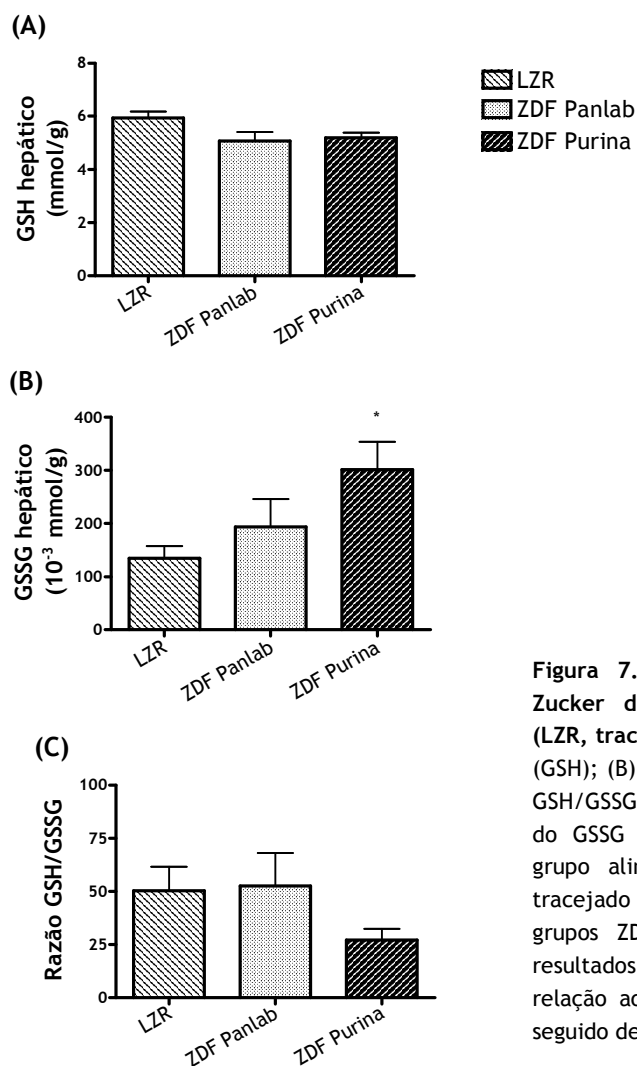


Figura 7.2: Glutatioho hepático em ratos Zucker diabéticos (ZDF) e não diabéticos (LZR, tracejado claro). (A) Glutatioho reduzido (GSH); (B) glutatioho oxidado (GSSG); (C) razão GSH/GSSG. Há uma tendência para o aumento do GSSG e redução da razão GSH/GSSG no grupo alimentado com Purina (ZDF Purina, tracejado escuro à direita), relativamente aos grupos ZDF Panlab (sombreado) e LZR. Os resultados são a média \pm SEM. * $p < 0.05$, em relação ao grupo LZR (teste *one-way* ANOVA, seguido de teste de Tukey-Kramer).

7.3.4. EFEITO DA RAÇÃO NA SENSIBILIDADE À INSULINA PÓS-PRANDIAL EM RATOS ZDF

Na figura 7.3 apresentam-se os perfis total e de cada uma das componentes de acção da insulina em ratos ZDF, alimentados com Purina ou com Panlab.

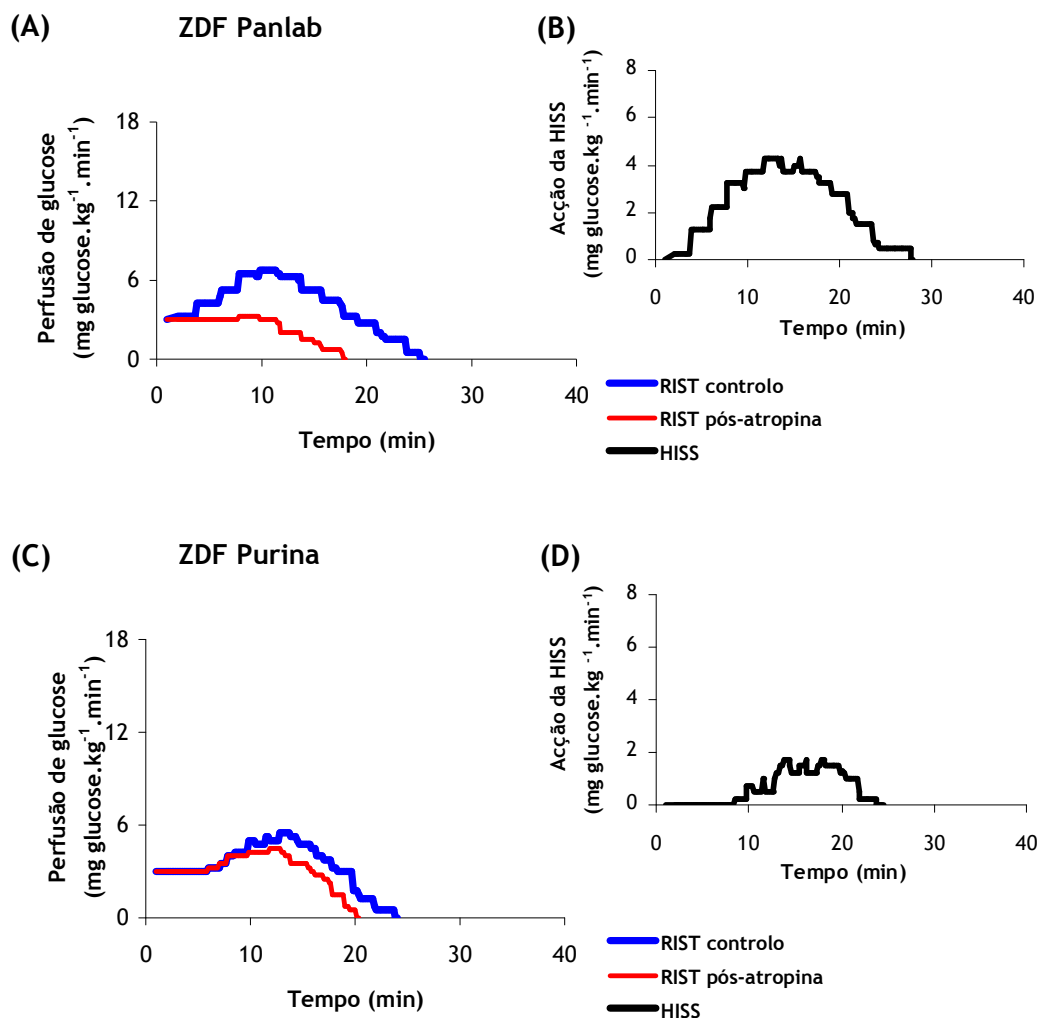


Figura 7.3: Perfis dinâmicos médios dos RISTs controlo, pós-atropina e da acção da HISS, em ratos Zucker diabéticos (ZDF) de 9 semanas, alimentados com Panlab (n=5) ou Purina (n=6). A acção da HISS (a preto) nos ratos ZDF Panlab (B) e nos ratos ZDF Purina (D) foi obtida por subtracção dos perfis do RIST controlo (a azul) pelos do RIST pós-atropina (a vermelho) nos gráficos (A) e (C), respectivamente. A alimentação com Purina parece afectar a acção da insulina dependente da HISS. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. Panlab A04, fornecida por Panlab S.L., Espanha e Purina 5008, por Labdiet, EUA.

O perfil médio de acção total da insulina pós-prandial, dada pelo RIST controlo, não foi significativamente diferente entre o grupo ZDF Purina e o grupo ZDF Panlab (figura 7.3, A e C, a azul). Comparando as curvas de acção da insulina *per se* (componente independente da HISS, dada pelo perfil do RIST pós-atropina), constata-se que também são semelhantes, sugerindo que em ratos ZDF esta componente não é alterada pela ração (figura 7.3, A e C, a vermelho). No entanto, nos ZDF Purina, a diferença entre os perfis do RIST controlo e do RIST pós-atropina é menor do que nos ratos ZDF Panlab, o que traduz uma acção da HISS significativamente diminuída nos ZDF Purina (figura 7.3, B e D), em particular no que respeita ao seu início (ZDF Purina, 9.1 ± 1.0 min; ZDF Panlab, 4.2 ± 1.0 min; $p < 0.05$) e magnitude (ZDF Purina, 2.3 ± 0.8 mg glucose. $\text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; ZDF Panlab, 4.6 ± 0.5 mg glucose. $\text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $p < 0.05$), como se pode observar na tabela XIII.

Na tabela XIII apresenta-se um resumo dos parâmetros das curvas de acção da insulina pós-prandial total (RIST controlo) e de cada uma das suas componentes (dependente e independente da HISS).

Apesar da tendência geral ser de redução dos parâmetros de acção da insulina nos ZDF com a ração de Purina, essa diferença só é estatisticamente significativa no que diz respeito à componente dependente da HISS. Assim, a alimentação com Purina induz uma diminuição do perfil de acção da insulina dependente da HISS neste modelo diabético (ZDF), não afectando significativamente o perfil da componente independente.

Tabela XIII - Parâmetros dos perfis de acção da insulina total (RIST controlo), dependente da HISS e independente da HISS (RIST pós-atropina), em ratos Zucker diabéticos (ZDF) alimentados com Panlab A04 (ZDF Panlab, n=5) ou Purina 5008 (ZDF Purina, n=6). O perfil de acção da insulina dependente da HISS nos ratos ZDF é afectado pela ração Purina. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. Panlab A04, fornecida por Panlab S.L., Espanha e Purina 5008, por Labdiet, EUA. Resultados são média \pm SEM.

		ZDF Panlab	ZDF Purina
RIST controlo	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	7.0 \pm 0.6	5.4 \pm 0.4
	Momento do pico (min)	11.0 \pm 1.4	10.5 \pm 0.8
	Duração (min)	24.9 \pm 2.8	22.4 \pm 2.1
RIST pós-atropina	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	3.5 \pm 0.2	4.0 \pm 0.7
	Momento do pico (min)	8.1 \pm 1.7	8.8 \pm 1.7
	Duração (min)	17.5 \pm 1.2	19.7 \pm 0.2
Acção da HISS	Início de acção (<i>onset</i> , min)	4.2 \pm 1.0	9.1 \pm 1.0 ^a
	Magnitude do pico (mg glucose.kg ⁻¹ .min. ⁻¹)	4.6 \pm 0.5	2.3 \pm 0.8 ^a
	Momento do pico (min)	11.8 \pm 1.6	11.6 \pm 1.1
	Fim da acção (<i>offset</i> , min)	24.9 \pm 2.8	22.8 \pm 0.6
	Duração (min)	20.6 \pm 3.2	13.7 \pm 1.0

^a $p < 0.05$ (em relação ao grupo ZDF Panlab). Teste *t-student*.

A análise dos RISTs índice (áreas sob as curvas de acção da insulina) sugere também que nos ratos ZDF apenas a componente da HISS é afectada pela ração Purina, comparativamente à ração Panlab, o que é apresentado na figura 7.4. Com efeito, a acção total da insulina no estado pós-prandial (RIST índice controlo) não foi estatisticamente diferente entre os dois grupos (ZDF Purina, 78.6 \pm 7.5 mg glucose/kg bw; ZDF Panlab, 99.1 \pm 9.3 mg glucose/kg bw), o mesmo acontecendo com a acção da insulina independente da HISS (RIST pós-atropina: ZDF Purina, 54.8 \pm 9.0 mg glucose/kg bw; ZDF Panlab, 41.5 \pm 3.7 mg glucose/kg bw) (figura 7.4). Por seu lado, a componente

de acção da insulina dependente da HISS encontrava-se significativamente diminuída ($p<0.01$) nos ratos ZDF alimentados com Purina (24.5 ± 5.1 mg glucose/kg bw) em comparação com os ratos ZDF Panlab (57.6 ± 6.5 mg glucose/kg bw), como se pode observar na figura 7.4. Curiosamente, a componente de acção da insulina independente da HISS parece estar ligeiramente aumentada nos ZDF Purina relativamente aos ZDF Panlab, embora a diferença não seja estatisticamente significativa. Isto explica que, apesar da reduzida acção da HISS nos ratos ZDF Purina, o RIST índice controlo seja semelhante ao observado nos ZDF Panlab (figura 7.4).

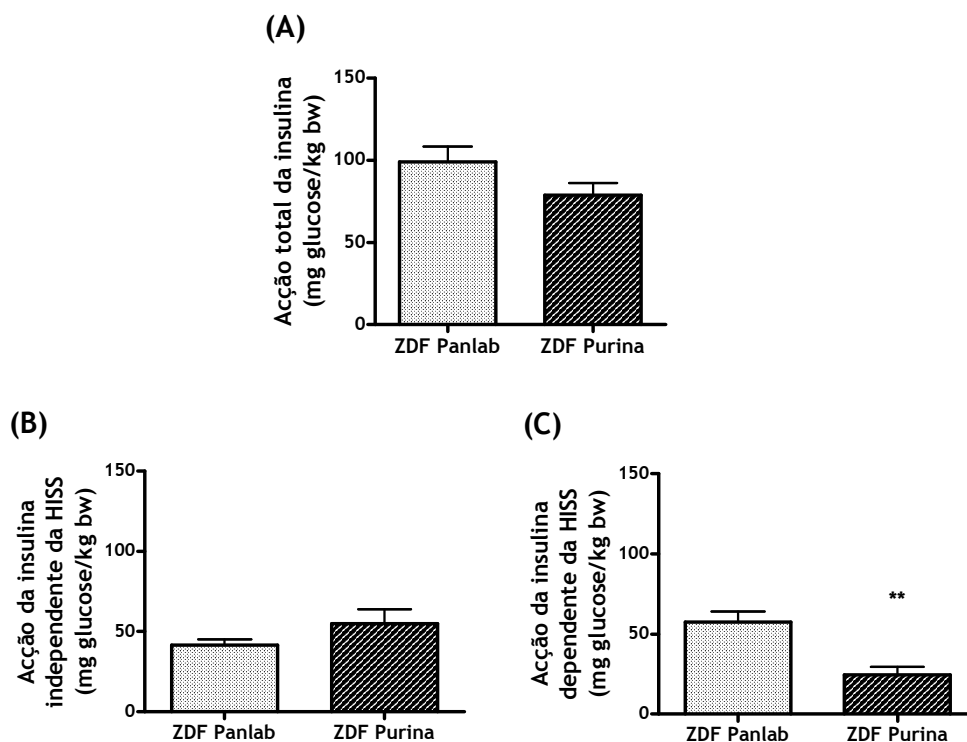


Figura 7.4: Acção hipoglicemiante da insulina (RIST index, mg glucose/kg bw) em ratos Zucker diabéticos (ZDF) com 9 semanas de idade, alimentados com ração Panlab (ZDF Panlab, n=5) ou com ração Purina (n=6). (A) A acção total da insulina pós-prandial e (B) a acção da insulina independente da HISS (pós-atropina) não são diferentes entre ZDF Panlab e ZDF Purina. (C) A componente de acção da insulina dependente da HISS encontra-se comprometida nos ratos ZDF Purina. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. Os resultados são a média \pm SEM. $**p<0.01$ em relação ao grupo ZDF Panlab (teste *t-student*).

A percentagem de inibição da sensibilidade à insulina pós-prandial induzida pela atropina corresponde à percentagem da acção da insulina dependente da via da HISS, a qual foi menor nos ratos ZDF Purina (32.0 ± 7.6 %) do que nos ZDF Panlab (57.8 ± 2.4 %; $p < 0.01$), como se pode ver na figura 7.5, sugerindo que nos ratos ZDF a acção da HISS é comprometida de forma mais acentuada quando os animais são alimentados com Purina. Deste modo, nos ZDF Purina, a acção da insulina no estado pós-prandial deve-se na maior parte à componente independente da HISS (68.0 ± 7.6 %) (figura 7.5).

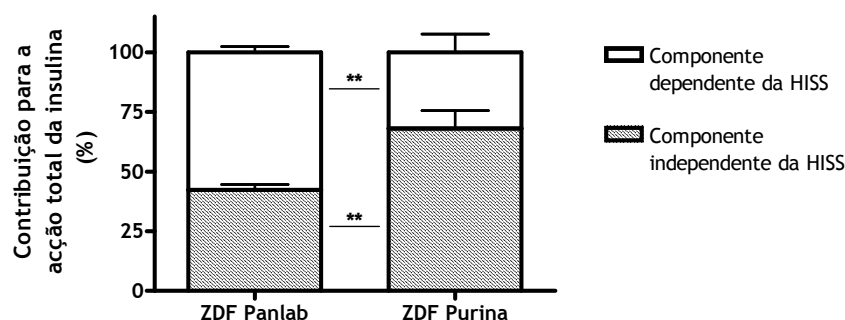


Figura 7.5: Percentagem da acção da insulina que é dependente da HISS em ratos ZDF alimentados com Panlab ou Purina. A percentagem de contribuição da HISS (a branco) para a acção total da insulina no estado pós-prandial é menor nos ratos Zucker diabéticos (ZDF) alimentados com ração Purina (ZDF Purina, $n=6$) do que nos ZDF alimentados com Panlab (ZDF Panlab, $n=5$). A maior contribuição para a acção da insulina nos ZDF Purina é dada pela componente independente da HISS (a tracejado). HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. Os resultados são média \pm SEM. $**p < 0.01$ em relação ao grupo ZDF Panlab (para ambas as componentes). Teste *t-student*.

7.3.5. COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA DEPENDENTE E INDEPENDENTE DA HISS ENTRE RATOS ZUCKER DIABÉTICOS (ZDF) E NÃO DIABÉTICOS (LZR)

Nesta secção, compara-se a sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos ZDF alimentados com Purina 5008, a ração descrita como diabetogénica e indicada pelo fornecedor para estes animais (Charles-River-Laboratories, 2004), com a sensibilidade à insulina em ratos Zucker não diabéticos e não obesos (LZR). Os dados referentes à sensibilidade à insulina no grupo LZR são os descritos no capítulo 6.

Às 9 semanas de idade, os ratos ZDF são insulinoresistentes. Como se pode ver na figura 7.6, o RIST índice controlo nos ratos ZDF Purina (78.6 ± 7.5 mg glucose/kg bw, $n=6$) é significativamente menor do que nos LZR (289.2 ± 24.7 mg glucose/kg bw, $n=6$; $p < 0.001$). A componente de acção da insulina independente da HISS, dada pelo RIST índice pós-atropina, segue o mesmo padrão, isto é, encontra-se diminuída nos ZDF (ZDF, 54.8 ± 9.0 mg glucose/kg bw; LZR, 173.3 ± 20.5 mg glucose/kg bw; $p < 0.01$). Também a acção da insulina dependente da HISS está significativamente comprometida nos ratos ZDF (24.5 ± 5.1 mg glucose/kg bw) em comparação com os LZR (115.9 ± 19.4 mg glucose/kg bw; $p < 0.01$) (figura 7.6).

A inibição da sensibilidade à insulina induzida pela administração de atropina, que corresponde à percentagem de contribuição da via da HISS para a acção total da insulina, não foi estatisticamente diferente entre ZDF (ZDF, 32.0 ± 7.6 %) e LZR (LZR, 40.3 ± 6.6 %).

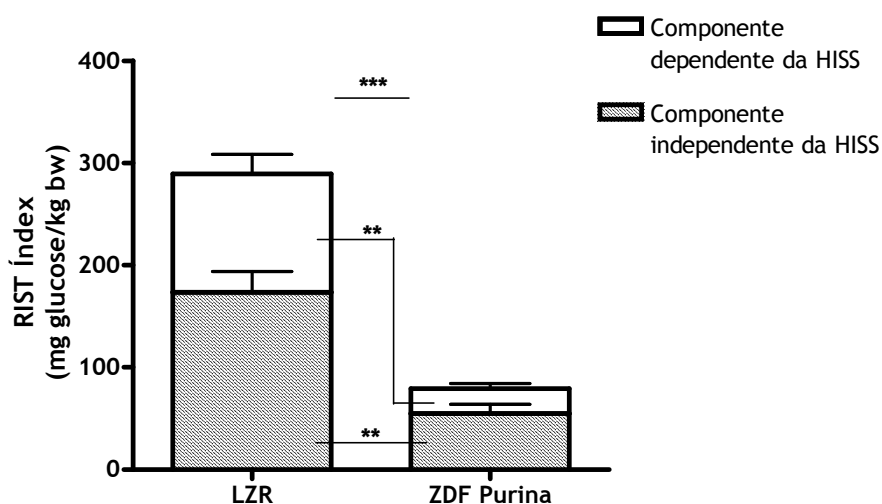


Figura 7.6: Sensibilidade à insulina pós-prandial em ratos Zucker diabéticos (ZDF) e não diabéticos (LZR). A sensibilidade à insulina pós-prandial total (soma das porções a branco e a tracejado) diminui nos ratos Zucker diabéticos obesos (ZDF Purina, $n=6$) relativamente aos seus controlos não obesos não diabéticos (LZR, $n=6$). Tanto a componente de acção da insulina dependente da HISS (a branco) como a componente independente da HISS (a tracejado) estão diminuídas no grupo ZDF Purina. O RIST índice (mg glucose/kg bw) é a medida de acção da insulina. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. Os resultados são a média \pm SEM. *** $p < 0.001$ em relação ao grupo LZR (RIST índice total). ** $p < 0.01$ vs LZR (componentes dependente e independente da HISS). Teste *t-student*.

7.4. DISCUSSÃO

Os resultados descritos ao longo deste capítulo confirmam a existência de uma insulinoresistência marcada nos ratos Zucker diabéticos obesos (ZDF), logo às 9 semanas de idade. A insulinoresistência pronunciada em conjunto com a hiperglicémia acentuada sugerem um estado de (pré)-diabetes nestes animais. O tipo de ração utilizada parece condicionar o grau de insulinoresistência nos ratos ZDF, sendo que a alimentação com Purina 5008 reduz a sensibilidade à insulina dependente da HISS relativamente à alimentação com Panlab A04. A menor sensibilidade à insulina nos ratos ZDF em comparação com os LZR parece dever-se à diminuição de ambas as componentes de acção da insulina. No entanto, a ração Purina induz um decréscimo adicional da componente dependente da HISS, sugerindo que esta componente é afectada de forma mais acentuada.

Hipertensão nos ratos ZDF

A pressão arterial média estava significativamente elevada nos ratos. Ao longo da experiência a pressão arterial média em ratos ZDF manteve-se cerca de 30-40 % acima do observado nos LZR, independentemente da ração utilizada. Esta observação enquadra-se numa condição de hipertensão moderada, conforme está previamente descrito neste e noutros modelos animais de diabetes (Van Zwieten *et al.*, 1996; Lesniewski *et al.*, 2008), bem como em humanos (Natali *et al.*, 2006).

São várias as causas possíveis para a hipertensão em ratos ZDF (Sowers *et al.*, 1991; Van Zwieten *et al.*, 1996; Carlson *et al.*, 2000; Oltman *et al.*, 2005), de entre as quais se destacam a disfunção autonómica e a baixa actividade do enzima NOS (Carlson

et al., 2000; Oltman *et al.*, 2005), cuja consequência directa é a baixa produção ou sinalização do *NO (Lesniewski *et al.*, 2008), que podem afectar a acção da insulina dependente da via da HISS.

Concentração de glutatono hepático nos ratos ZDF

Ao contrário do que foi observado com os ratos Zucker obesos não diabéticos (OZR, capítulo 6), a concentração hepática de glutatono na forma reduzida (GSH) não foi diferente entre ratos diabéticos (ZDF) e respectivos controlos (LZR), embora houvesse um ligeiro aumento (significativo) dos níveis hepáticos de glutatono na forma oxidada (GSSG) e uma tendência para a diminuição da razão GSH/GSSG, o que poderá indicar uma certa incapacidade de manter o glutatono na forma reduzida. Por um lado, a não variação de GSH hepático é consistente com o observado noutros órgãos de ratos ZDF com esta idade (Chander *et al.*, 2004); por outro lado, a tendência demonstrada para um aumento do GSSG pode indiciar uma condição de *stress* oxidativo, que também é consistente com o que está descrito para estes animais (Crabtree *et al.*, 2008).

A diminuição dos níveis hepáticos de GSH e/ou da razão GSH/GSSG podem conduzir ao decréscimo de acção da HISS, a qual está reduzida nos ratos ZDF. Porém, os efeitos a nível do glutatono hepático não parecem ser tão significativos que expliquem por si só a insulinoresistência dependente da HISS observada nos ratos ZDF, embora a sua contribuição deva ser considerada.

Hiperglicémia, insulinoresistência e diabetes nos ratos ZDF

De acordo com o nosso estudo, às 9 semanas de idade os ratos ZDF são hiperglicémicos, apresentando uma glicémia cerca de 45-50 % (ZDF Panlab) e 90-100 % (ZDF Purina) maior do que a dos ratos não diabéticos, LZR. Tratando-se este de um modelo de diabetes, os valores de glicémia estão consistentes com o esperado e previamente reportado (Corsetti *et al.*, 2000).

Uma vez que os ratos ZDF não parecem apresentar diferenças relativamente ao efluxo de glucose hepática (Pickavance *et al.*, 1998; Leonard *et al.*, 2005), a hiperglicémia observada nestes animais deverá resultar da incapacidade da insulina em promover o aporte periférico de glucose, quer porque há uma diminuição da sua secreção, quer porque a sua acção nos tecidos-alvo está comprometida.

Por outro lado, a sensibilidade à insulina encontrava-se significativamente comprometida em ambos os grupos de animais ZDF. Em comparação com os controlos não diabéticos (LZR), a acção total da insulina no estado pós-prandial estava diminuída em aproximadamente 73 % nos ratos ZDF Purina, o que evidencia uma insulinoresistência pronunciada, em conformidade com publicações anteriores (Leonard *et al.*, 2005). Analisando as duas componentes que compõem a acção pós-prandial da insulina, observou-se que acção da insulina *per se* estava diminuída em cerca de 68 % nos ratos ZDF relativamente aos LZR, enquanto que a acção da insulina dependente da HISS apresentou um decréscimo de aproximadamente 79 %. A redução das duas componentes (dependente e independente da HISS) em ratos ZDF não é exactamente igual, apesar da diferença ser ligeira (não significativa).

O facto de ambas as componentes de acção da insulina estarem diminuídas em ambos os grupos de ratos Zucker diabéticos (ZDF) pode dever-se às alterações no músculo esquelético destes animais, à semelhança do que acontece nos ratos Zucker obesos não diabéticos (OZR), estudados no capítulo anterior. Com efeito, tal como os

OZR, também os ratos ZDF apresentam uma diminuição da expressão de GLUT4 no músculo esquelético (Friedman *et al.*, 1991), o que implica uma diminuição de ambas as componentes de acção da insulina. No entanto, as alterações na expressão de GLUT4 em ZDF parecem correlacionar-se com a hiperglicémia nestes animais (Slieker *et al.*, 1992), o que os distingue dos OZR.

Para além disso, em ratos ZDF, tecidos diferentes apresentam graus de insulinoresistência diferentes (Nawano *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2005), sendo que no estado pós-prandial o aporte de glucose insulino dependente não parece ser afectado no tecido adiposo ou no músculo cardíaco, mas apenas no músculo esquelético (Leonard *et al.*, 2005), o qual é o principal destino da glucose em circulação (Kemmer *et al.*, 1979; Kuhlmann *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2005; Dhalla *et al.*, 2008). Esta observação é particularmente relevante no contexto do presente trabalho, uma vez que a HISS não actua no tecido adiposo, fígado, ou músculo cardíaco, mas apenas no músculo esquelético (Xie e Lutt, 1996b), pelo que a sua acção está mais comprometida, ainda que ligeiramente, do que a acção da componente independente da HISS, a qual mantém a sua acção nos restantes tecidos.

Está descrito que a divergência entre a insulinoresistência permanente e a capacidade de produzir uma hiperinsulinémia compensatória resulta em hiperglicémia e ocorre nos ZDF por volta das 7-10 semanas de idade (Pickavance *et al.*, 1998; Corsetti *et al.*, 2000; Oltman *et al.*, 2005), sendo que a maioria dos autores refere que a transição para o estado de diabetes neste modelo animal (ZDF) ocorre entre as 7 e as 12 semanas de idade (Kuhlmann *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2005; Topp *et al.*, 2007; Szocs *et al.*, 2008). No entanto, existem na literatura algumas discrepâncias quanto à idade em que a condição de diabetes se instala nos ratos ZDF, o que se deve provavelmente à ração utilizada para alimentar os ratos ZDF. Os resultados aqui apresentados sugerem que a ração influencia a progressão da insulinoresistência de

forma pronunciada, pelo que diferenças entre as dietas aplicadas nos vários estudos poderão resultar em estadios de insulinoresistência ou diabetes diferentes.

Estas observações são consistentes com os nossos resultados, visto que às 9 semanas de idade os ratos ZDF eram já significativamente hiperglicémicos e marcadamente insulinoresistentes relativamente aos controlos não diabéticos (LZR), configurando um quadro de diabetes.

Efeito da ração na insulinoresistência dos ratos Zucker diabéticos (ZDF)

Os ratos ZDF estão descritos como modelos animais de obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2. Contudo, de acordo com os nossos resultados a condição de obesidade não parece ser uma característica completamente intrínseca a este modelo animal. Com efeito, os ratos ZDF alimentados com a ração *standard* de manutenção (Panlab A04) não apresentavam um peso corporal significativamente diferente do dos ratos controlo (não obesos e não diabéticos, LZR). Apenas os ratos ZDF alimentados com a ração Purina 5008 (ZDF Purina) eram significativamente mais pesados, tanto em relação aos LZR, como em relação aos ZDF Panlab.

Nestes estudos não se mediu a adiposidade corporal. No entanto, a elevada adiposidade em ratos ZDF está bem descrita (Banz *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005).

A sensibilidade à insulina também foi afectada de maneira diferente em ratos ZDF alimentados com Purina e em ZDF alimentados com Panlab. Comparando apenas os grupos ZDF Purina e ZDF Panlab, observou-se que a sensibilidade total à insulina no estado pós-prandial foi ligeiramente menor (cerca de 20 %) no grupo ZDF Purina, embora essa diferença não fosse estatisticamente significativa. Das duas componentes que constituem a acção da insulina pós-prandial, apenas a componente dependente da HISS era diferente entre os dois grupos, sendo aproximadamente 50-60 % menor no

grupo ZDF Purina do que no grupo ZDF Panlab. Assim, para além das deficiências discutidas anteriormente, de certa forma comuns ao modelo OZR e que permitem explicar a redução de ambas as componentes de acção da insulina, parecem existir alterações adicionais induzidas pela alimentação dos ratos ZDF com Purina que explicam o agravamento da acção da HISS nos ZDF Purina relativamente aos ZDF Panlab e que provavelmente também provocam o agravamento da glicémia.

A diferença de sensibilidade à insulina entre ratos ZDF alimentados com Purina e ZDF alimentados com Panlab é consistente com estudos anteriores realizados por outros autores, os quais sugerem que a sensibilidade à insulina em ratos ZDF é muito susceptível a alterações induzidas pela dieta (Unger e Orci, 2001; Fu *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2007; Szocs *et al.*, 2008). Por exemplo, a melhoria das condições metabólicas de ratos ZDF parece ser possível recorrendo a dietas com elevado conteúdo proteico, nomeadamente em proteína de soja (Davis *et al.*, 2007), ou a métodos de restrição calórica (Ohneda *et al.*, 1995), embora os dados disponíveis na literatura não sejam conclusivos. Adicionalmente, tem sido sugerido que rações isocalóricas com razões lípidos/glicídicos diferentes afectam o metabolismo de ratos ZDF de formas distintas (Lee *et al.*, 2000), sendo que rações com maior conteúdo lipídico (em termos energéticos) parecem acelerar o desenvolvimento da obesidade e da falência β -pancreática em ratos ZDF (Corsetti *et al.*, 2000). Os trabalhos desenvolvidos por Unger e Orci sugerem que os ratos ZDF desenvolvem diabetes *mellitus* tipo 2 antes da 14.^a semana de idade, desde que alimentados com uma dieta cuja composição em lípidos forneça pelo menos 6 % do conteúdo energético da dieta (Unger e Orci, 2001).

Ambas as dietas testadas neste trabalho apresentavam uma percentagem de conteúdo energético em lípidos muito superior a 6 %: Purina, 16.7 %; Panlab, 12.0 %, conforme se pode consultar na tabela VIII, do capítulo 3. Tendo em conta as observações de Unger e Orci (Unger e Orci, 2001), ambas as rações estavam em condições de induzir, ou pelo menos acelerar, a condição de insulinoresistência,

hiperglicémia e diabetes tipo 2 nos ratos ZDF, conforme se observou. Para além disso, observámos também que as duas dietas tiveram resultados diferentes, em particular no que diz respeito à acção da insulina dependente da via da HISS: a dieta Purina, com maior conteúdo lipídico, foi mais eficiente na redução da acção da insulina dependente da HISS do que a ração Panlab.

Os nossos resultados demonstram que o tipo de dieta/ração influencia o desenvolvimento da diabetes em ratos ZDF e levam-nos a especular que o aumento do conteúdo lipídico dessa dieta tende a agravar a condição de insulinoresistência pós-prandial. De facto, as deficiências na componente de acção da insulina dependente da HISS em ratos ZDF são agravadas pela alimentação com Purina, sugerindo que esta ração induz uma alteração adicional especificamente na via da HISS, que não é induzida pela ração Panlab. O reduzido efeito hipoglicemiante da componente dependente da HISS nos animais ZDF Purina parece resultar não apenas de uma acção diminuída no músculo esquelético, mas também de uma activação deficiente ou inibição da via hepática que conduz à síntese da HISS.

A associação entre diabetes e alterações do sistema nervoso autónomo é sobejamente conhecida. Apesar dos estudos de neuropatia diabética em ratos ZDF serem escassos, alguns há que apontam para a disfunção autonómica nestes animais. Em ZDF de 9 semanas parece haver um aumento da actividade do sistema nervoso simpático, o qual é, pelo menos em parte, responsável pela hipertensão nestes animais (Carlson *et al.*, 2000) e parece acompanhar a hiperglicémia, conforme se observou no presente estudo. Adicionalmente, em estudos *ex vivo* sugeriram uma reduzida capacidade vasodilatadora em resposta à acetilcolina nestes animais (Carlson *et al.*, 2000; Oltman *et al.*, 2005), a qual é reposta por adição de um dador de *NO (Carlson *et al.*, 2000), o que sugere uma incapacidade da via parassimpático-acetilcolina- *NO . Mais ainda, estudos realizados no nosso laboratório (Fernandes e Macedo, 2008, observações não publicadas) revelaram que a actividade e expressão do enzima NOS (endotelial) está

diminuída no fígado de ratos ZDF, sugerindo que a via parasimpático-^{*}NO hepática esteja também afectada nos ratos ZDF.

Estas observações são de particular relevância, dado que uma inibição da via parassimpático-^{*}NO hepática pode resultar numa menor produção de ^{*}NO no fígado e, conseqüentemente, numa diminuição da síntese da HISS, contribuindo para a insulinoresistência pós-prandial. Esta afirmação, ainda que de certa forma especulativa, abre a porta para trabalhos futuros no âmbito da associação entre a hipertensão e a insulinoresistência dependente da HISS. Esses trabalhos foram já iniciados no nosso laboratório com estudos da acção da insulina dependente da HISS em ratos hipertensos (Afonso *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2007) e da capacidade do carvedilol, um fármaco anti-adrenérgico e anti-hipertensivo, para aumentar os níveis de ^{*}NO plasmático por estimulação do NOS (Afonso *et al.*, 2006a). Será interessante perceber se o antagonismo adrenérgico e o aumento de ^{*}NO endógeno têm um efeito cumulativo na melhoria da pressão arterial e da síntese/acção da HISS em ratos ZDF.

Em conclusão, os resultados aqui apresentados sugerem que efectivamente os ratos ZDF são insulinoresistentes e hiperglicémicos. A insulinoresistência observada nos ratos ZDF deve-se à diminuição de ambas as componentes de acção da insulina, sendo que componente da acção da insulina dependente da HISS é a mais afectada, contribuindo de forma significativa para a insulinoresistência observada nos ratos ZDF.

A alimentação com ração Purina acelera o processo de insulinoresistência e agrava a hiperglicémia nos ratos ZDF, constituindo um factor externo ou ambiental eficiente para o desenvolvimento da diabetes (tipo 2) naqueles animais. Observou-se ainda que, comparativamente ao grupo alimentado com ração Panlab, a alimentação dos ratos ZDF com Purina não afecta a componente de acção da insulina *per se*, mas leva a uma diminuição significativa da sensibilidade à insulina dependente da HISS.

8. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

8. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

O presente capítulo tem por objectivo apresentar uma visão global das conclusões que se podem retirar dos estudos desenvolvidos e apresentados nos capítulos transactos. Na última secção são abordadas algumas questões emergentes desta dissertação que poderão ser merecedores de prossecução em trabalhos futuros.

8.1. EFEITO DA COMPOSIÇÃO DA REFEIÇÃO NA POTENCIAÇÃO DA ACÇÃO DA INSULINA: MECANISMO DEPENDENTE DA HISS, INICIADO NO INTESTINO

Os resultados descritos no capítulo 4 sugerem que em condições fisiológicas a sensibilidade à insulina aumenta significativamente após a ingestão de uma refeição mista, mas não glicídica, por um mecanismo que depende da acção da HISS. Com este estudo observou-se ainda que o mecanismo pós-prandial de activação da via da HISS e potenciação da acção da insulina parece ser iniciado no intestino.

Há três conclusões gerais que se retiram deste estudo.

A primeira é a de que a magnitude da potenciação da acção da insulina induzida pela refeição depende em grande medida da composição da refeição ingerida. Com efeito, uma refeição mista tem a capacidade de potenciar a sensibilidade à insulina de forma significativa, tanto em animais anestesiados, como em animais conscientes. Pelo contrário, as soluções de glucose e de sacarose não foram capazes de activar o

mecanismo de síntese e/ou libertação da HISS conducente ao normal incremento da acção da insulina.

Em segundo lugar, concluiu-se que este mecanismo de potenciação da acção da insulina é dependente da activação dos nervos parassimpáticos hepáticos e, conseqüentemente, da via da HISS. De facto, observou-se que a inibição parassimpática, após a ingestão da refeição mista, induz uma redução da sensibilidade à insulina para valores próximos do observado no jejum. Por outro lado, a secção dos nervos parassimpáticos hepáticos antes da ingestão da refeição mista previne o aumento de acção da insulina. Uma vez que ambos os procedimentos inibem a via da HISS, concluiu-se que esta via é essencial para a potenciação pós-prandial da acção da insulina.

A terceira conclusão de relevo que se infere dos estudos referidos (capítulo 4), diz respeito ao local onde se inicia o mecanismo potenciador da acção da insulina. A presença da refeição líquida mista (ou do quimo) no intestino (duodeno) revelou-se essencial para despoletar a activação da via da HISS e, assim, potenciar a acção da insulina. Tal parece dever-se à absorção intestinal de nutrientes específicos não glicídicos, já que nem a glucose nem a sacarose provocaram o aumento da sensibilidade à insulina. Com efeito, o bloqueio da passagem do quimo do estômago para o duodeno (banda intestinal) impede a activação da HISS pela refeição mista e, concomitantemente, o incremento da sensibilidade à insulina. Estas observações sugerem que o intestino é o local onde se inicia o mecanismo de sensibilização pós-prandial para a acção da insulina.

Potenciação prandial da acção da insulina: eixo entero-cerebro-hepático?

A conclusão de que o mecanismo de sensibilização para a acção da insulina após absorção intestinal da refeição mista envolve a activação da via da HISS, a qual depende do parassimpático, pode ser de grande relevância no contexto de um possível eixo entero-cerebro-hepático, responsável por activar a via da HISS, na presença de elevados níveis de glutatióno (GSH) hepático.

Uma vez que a concentração glutatióno (GSH) hepático aumenta do jejum para o pós-prandial, a absorção de nutrientes parece ser necessária para que a síntese hepática deste tripéptido ocorra. Recorde-se que o GSH é um tripéptido constituído por cisteína, glutamato e glicina. Destes precursores, só o glutamato e a glicina existem abundantemente dentro das células (Tateishi *et al.*, 1974), pelo que a síntese de GSH é limitada pela disponibilidade de cisteína. Em condições fisiológicas, a cisteína é obtida principalmente da dieta e da degradação proteica, podendo igualmente ser obtida a partir da metionina, um aminoácido nutricionalmente essencial, pela via da cistationina¹ (Marinho, 1995). Assim, uma refeição deve conter resíduos proteicos que possam ser fonte de cisteína para poder permitir a síntese de GSH e potenciar a acção da insulina dependente da HISS, o que não acontece com as refeições puramente glicídicas, mas parece ocorrer com refeições mistas.

Como referido anteriormente, o sinal prandial que conduz à síntese da HISS depende da elevação dos níveis de GSH hepático e da activação parassimpática hepática, ambos decorrentes da ingestão de uma refeição (Tateishi *et al.*, 1977; Uijtdehaage *et al.*, 1992; Guarino *et al.*, 2003; Teff, 2008). Nos estudos apresentados no capítulo 4 da presente dissertação, observou-se pela primeira vez que o intestino

¹ Note-se que, embora a cisteína possa não ser nutricionalmente essencial, a dieta é a principal fonte de cisteína (Marinho, 1995); e a sua síntese depende de um aminoácido essencial - a metionina (via da cistationina). A metionina origina homocisteína, a qual se conjuga com a serina para formar cistationina e, a partir desta, cisteína e homoserina.

desempenha um papel-chave no processo de activação pós-prandial da via da HISS, através da absorção dos substratos necessários à síntese de GSH, mas também por estimulação do sistema nervoso parassimpático. Estes resultados parecem enquadrar-se na conjectura avançada por Lutt (Lutt, 2004), segundo a qual a via da HISS é activada por um reflexo mediado centralmente. Neste contexto, surge a hipótese do envolvimento do eixo entero-cerebral na activação hepática da síntese e/ou libertação da HISS.

O reflexo entero-cerebral depende da estimulação vagal, mas está descrito apenas no controlo as secreções do pâncreas exócrino e da motilidade, secreção e fluxo sanguíneo entéricos (Konturek *et al.*, 2003; Konturek *et al.*, 2004). Adicionalmente, outros autores observaram recentemente que a activação desse reflexo entero-cerebral também afecta o fígado, embora tal apenas esteja descrito na regulação da produção hepática de glucose (Wang *et al.*, 2008). Assim, tendo em conta estas observações e os nossos resultados, pode especular-se acerca da existência de uma associação entre o eixo entero-cerebral e o mecanismo hepático de sensibilização da insulina. De facto, os nossos resultados demonstraram que: (i) a acção da insulina aumenta após ingestão de uma refeição mista; (ii) a potenciação da acção da insulina depende da activação de nervos parassimpáticos, à semelhança do reflexo entero-cerebral, que é mediado pelo vago (Konturek *et al.*, 2003; Konturek *et al.*, 2004); (iii) o mecanismo de potenciação da acção da insulina no estado pós-prandial é despoletado no intestino (duodeno).

Estas observações sugerem a existência de um reflexo prandial, iniciado no intestino após ingestão de uma refeição mista e mediado centralmente, que envolve a estimulação do sistema nervoso parassimpático, o qual, na presença de elevados níveis de GSH, vai activar o mecanismo hepático de síntese e/ou libertação da HISS, promovendo o incremento da sensibilidade à insulina. Esta hipótese está representada na figura 8.1.

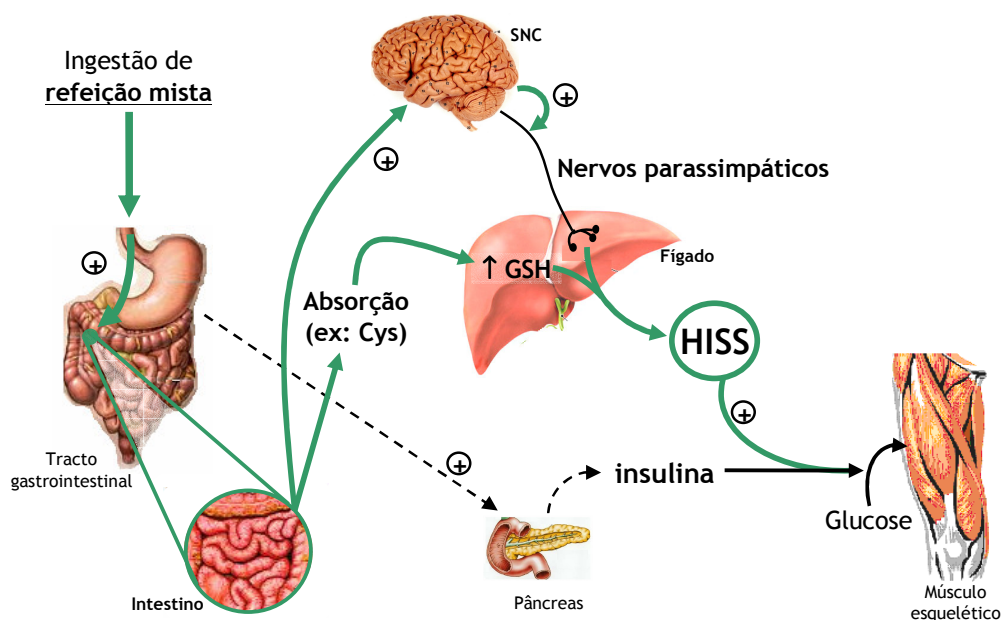


Figura 8.1: A hipótese de activação da via da substância hepática sensibilizadora da insulina (HISS) em resposta à ingestão de uma refeição mista. A absorção intestinal de nutrientes, que ocorre após ingestão de uma refeição mista (composta por glícidos, lípidos e proteínas), permite o aumento da síntese de glutatióno (GSH) hepático, o qual é essencial para a síntese da HISS; simultaneamente, é iniciado no intestino um mecanismo pós-prandial que parece ser mediado pelo sistema nervoso central (SNC) e que vai estimular o fígado, via nervos parassimpáticos, para a síntese e/ou libertação da HISS - hipótese entero-cerebral-hepática (a verde). A HISS actua no músculo esquelético, potenciando a acção da insulina no estado pós-prandial. Cys, cisteína; ⊕ activação.

Implicações nutricionais

As refeições que constituem um sinal prandial eficaz para iniciar o mecanismo de sensibilização pós-prandial para a acção da insulina parecem ser vantajosas do ponto de vista nutricional, por oposição áquelas que que não são capazes de o fazer. Ao contrário das refeições mistas, a glucose e a sacarose, pelo menos isoladamente, constituem um fraco sinal prandial para activação da via da HISS e potenciação da acção da insulina.

Com efeito, a alimentação com dietas ricas em sacarose (Ribeiro *et al.*, 2005) ou com dietas ricas em lípidos (capítulo 5), mesmo durante curtos períodos de tempo, não só não induzem a sensibilização pós-prandial para a acção da insulina, como ainda resultam em resistência à insulina quase totalmente dependente da perda de acção da HISS. Isto leva-nos a especular que o iniciador do mecanismo pós-prandial de sensibilização para a acção da insulina não seja de origem puramente glicídica ou lipídica, e que estas classes de nutrientes tendem, a longo prazo, a inibir a acção pós-prandial da insulina. Claramente, esta afirmação carece de demonstração experimental e a identificação da(s) classe(s) de iniciadores deste mecanismo constitui um objectivo de estudos futuros (secção 8.5), embora se possa especular que tais iniciadores deverão conter ou ser precursores de substratos para a síntese de GSH, bem como ser activadores do eixo entero-cerebro-hepático.

Implicações metodológicas

Do ponto de vista metodológico, os resultados apresentados no capítulo 4 colocam em causa a eficácia dos métodos que recorrem à ingestão oral de glucose, como o OGTT, para estudos nutricionais da homeostase da glucose, uma vez que a glucose não activa a via da HISS e, por isso, não induz uma acção máxima da insulina. Assim, alterações fisiopatológicas da via da HISS não são detectadas eficazmente pelo OGTT, o que é particularmente grave, uma vez que a HISS é essencial para a acção da insulina no pós-prandial, estado esse em que normalmente ocorrem as primeiras anomalias relacionadas com a homeostase da glucose (Ceriello *et al.*, 2008). Deste modo, o OGTT apenas é sensível a alterações relacionadas com a perda de acção da insulina *per se* (independente da HISS).

Pelo contrário, a administração de uma refeição mista activa a via da HISS e induz a acção da insulina na sua totalidade. Isto sugere que a perda de função de uma das componentes (dependente ou independente da HISS) será eficazmente detectada através da realização de um teste de tolerância à refeição mista (MTT). Assim, o MTT, cuja execução é relativamente fácil, poderá permitir a detecção precoce de alterações metabólicas associadas à intolerância à glucose e/ou insulinoresistência no estado pós-prandial - quadro de pré-diabetes.

Por outro lado, a variação da sensibilidade à insulina entre os estados de jejum e pós-prandial pôde ser quantificada de forma rigorosa e eficaz através do RIST, após a ingestão de uma refeição mista. Com efeito, este é um método sensível e reprodutível, que permite detectar diferenças de sensibilidade à insulina, antes e depois da administração intragástrica das várias refeições líquidas e da inibição da via da HISS.

Conclui-se assim que os estudos de sensibilidade à insulina devem ser direccionados para a avaliação da capacidade que um indivíduo apresenta para activar a via da HISS e aumentar a sensibilidade à insulina em resposta à ingestão de uma refeição-teste mista.

8.2. DIFERENTES MODELOS DE OBESIDADE APRESENTAM MECANISMOS DISTINTOS DE INSULINORRESISTÊNCIA PÓS-PRANDIAL

Que a condição de obesidade está intimamente associada ao desenvolvimento de insulinoresistência é algo consensual e perfeitamente descrito. No entanto, até à data, foi dado maior ênfase à acção da insulina no estado de jejum, negligenciando componente de acção da insulina dependente da HISS. No desenvolvimento da obesidade, isto levava a uma detecção tardia e a uma subvalorização da condição de insulinoresistência.

Ao longo dos capítulos 5 e 6 apresentaram-se e discutiram-se os estudos de sensibilidade à insulina pós-prandial em dois modelos animais de obesidade: o primeiro, induzido por factores nutricionais, isto é, por uma dieta hiperlipídica - o rato HFD; e o segundo, de origem genética, com uma mutação no receptor da leptina - o rato Zucker obeso (OZR). A principal conclusão destes estudos é que a insulinoresistência observada em ratos HFD é mecanisticamente diferente da insulinoresistência desenvolvida em OZR, conforme representado na figura 8.2, no final desta secção.

Nos ratos alimentados com a dieta rica em lípidos (HFD, capítulo 5), a insulinoresistência desenvolve-se logo após a primeira semana de alimentação com esta dieta, exclusivamente devido à diminuição de acção da via da HISS, não se observando alterações da acção da insulina *per se*; após 4 semanas, os ratos HFD apresentavam uma perda quase total da função da HISS, à qual se juntou uma diminuição pequena, mas significativa, da componente de acção da insulina independente da HISS (Afonso *et al.*, 2009). O maior contributo para a insulinoresistência pós-prandial nos ratos HFD é dado pela perda de acção da via da HISS. Esta observação parece sugerir que as primeiras alterações responsáveis pela insulinoresistência em condições de obesidade induzida pela dieta devem interferir com a via da HISS, ocorrendo a montante do seu local de acção, como por exemplo no fígado, ao nível da síntese da HISS (Afonso *et al.*, 2007a;

Afonso *et al.*, 2009). Isto pode resultar da baixa concentração de glutatióno hepático ou da baixa actividade do eixo parassimpático- NO , essenciais para a síntese da HISS e também diminuídos nestes animais (figura 8.2). Por outro lado, não é ainda de excluir que nestas condições haja uma deficiente sensibilização para a acção da insulina em resposta a uma refeição mista, o que também se traduziria numa baixa activação da via da HISS e, concomitantemente, numa reduzida acção da insulina pós-prandial.

Nos ratos Zucker obesos (OZR), por seu turno, observou-se uma diminuição semelhante de ambas as componentes que compõem a acção da insulina do estado pós-prandial: como representado na figura 8.2, tanto a componente de acção da insulina dependente como a componente independente da HISS estavam diminuídas e exactamente na mesma proporção (capítulo 6). Estes resultados conduzem-nos a uma de duas conclusões: (i) nos OZR, ocorrem duas deficiências independentes, uma na via da HISS e outra na acção da insulina *per se*, com a coincidência de ambas as componentes serem afectadas de forma quantitativamente idêntica; ou (ii) ocorre uma alteração num ou em vários pontos comuns às duas vias de sinalização (HISS-dependente e HISS-independente) no músculo esquelético, órgão-alvo de ambas as componentes, afectando-as de igual maneira (Afonso *et al.*, 2007b). Apesar de, com base nos dados por nós obtidos, não ser ainda possível excluir nenhuma das duas opções, a segunda parece mais provável. Qualquer que seja o mecanismo de transdução de sinal da HISS no músculo esquelético, este parece promover o aporte de glucose de forma dependente dos GLUT4, cuja translocação parece estar diminuída em OZR (King *et al.*, 1992; Ivy, 2004). Ora, havendo uma redução do número de GLUT4 funcionais na membrana plasmática, haverá forçosamente um baixo aporte de glucose, o qual não será provocado pela baixa secreção de insulina pancreática nem pela baixa libertação de HISS hepática, mas sim pela disfunção de um ponto em comum das vias de sinalização intracelular de ambas as componentes.

A perda de acção da HISS está associada ao aumento da adiposidade corporal total e não especificamente da obesidade viscerο-abdominal

O aumento das adiposidades corporal total e abdominal correlacionou-se significativamente e de igual forma com a perda de acção da HISS, bem como com a perda de acção total da insulina no estado pós-prandial. Adicionalmente, a adiposidade também se correlacionou com a diminuição de acção da insulina *per se*, porém com um impacto consideravelmente menor nesta componente de acção da insulina do que na componente da HISS. Isto confirma uma vez mais que a alimentação com uma dieta rica em lípidos inibe a acção da insulina dependente da HISS de forma mais incisiva (figura 8.2).

Uma questão relevante é também perceber a causalidade da relação entre a perda de função da HISS e o aumento do tecido adiposo. Por um lado, a adiposidade pode afectar um ou vários componentes da via da HISS e assim induzir a insulinoresistência pós-prandial; por outro, é possível que a glucose não captada pelo músculo esquelético devido à reduzida acção da HISS seja dirigida para o tecido adiposo e para o fígado, onde pode ser precursora da síntese de ácidos gordos, aumentando a massa gorda, em particular no fígado, condição muitas vezes associada a insulinoresistência periférica. Os dados apresentados nesta dissertação não permitem esclarecer este ponto.

O facto de não se terem observado diferenças de correlação entre as adiposidades viscerο-abdominal e corporal total sugere que a acumulação de massa adiposa total, independentemente da sua localização, é que está associada à perda de acção da via da HISS. Estes resultados põem em causa a sugestão de que a insulinoresistência pré-diabética é causada principalmente pela acumulação de tecido adiposo na região abdominal, embora não se possa excluir completamente um papel qualitativo (mais do que quantitativo) especificamente da adiposidade viscerο-

abdominal. É ainda necessário alguma cautela na extrapolação destes resultados para a obesidade humana, uma vez que, por exemplo, a distribuição de massa adiposa se faz de forma substancialmente diferente nas duas espécies.

A figura 8.2 resume as principais observações respeitantes à insulinoresistência dependente e independente da HISS nos dois modelos de obesidade estudados - o rato HFD e o OZR.

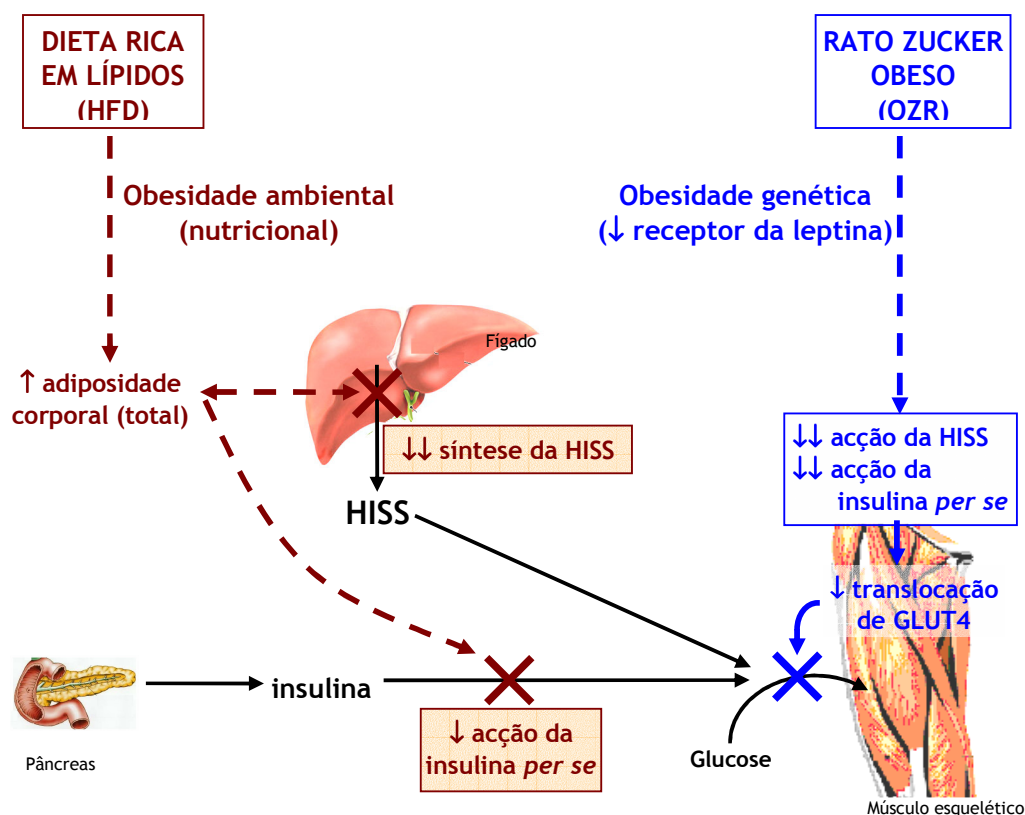


Figura 8.2: Mecanismos de insulinoresistência dependente e independente da HISS em dois modelos animais de obesidade: o rato alimentado com dieta rica em lípidos (HFD) e o rato Zucker obeso (OZR). No rato HFD, ocorre um decréscimo acentuado da componente de acção da insulina dependente da HISS, que precede a diminuição da acção da insulina per se (a vermelho). No OZR, há uma diminuição idêntica da acção da HISS e da insulina per se, sugerindo a existência de um defeito num ponto comum das vias de sinalização intracelular das duas componentes, que resulta numa reduzida translocação de GLUT4 (a azul). HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina; GLUT4, transportador de glucose-4. ↓, decréscimo moderado; ↓↓, decréscimo acentuado.

8.3. O ENVELHECIMENTO AFECTA PRINCIPALMENTE A ACÇÃO DA HISS, MAS NÃO AGRAVA A INSULINORRESISTÊNCIA EM RATOS ZUCKER OBESOS

Em condições fisiológicas, o envelhecimento conduz a insulinoresistência pós-prandial, devido à diminuição de ambas as componentes de acção da insulina. À semelhança do observado pelo nosso grupo em ratos Wistar (Ribeiro *et al.*, 2008) e pelo grupo de Lautt em ratos Sprague-Dawley (Lautt *et al.*, 2008), também os ratos Zucker não obesos (LZR) apresentam uma diminuição da acção da insulina pós-prandial. A insulinoresistência associada à idade nos LZR é causada pela perda de acção de ambas as componentes, embora a maior contribuição seja dada pela diminuição de acção da HISS, cujo decréscimo é consideravelmente mais acentuado do que o da componente independente da HISS.

Uma vez que não é possível estudar o processo de envelhecimento na ausência de acumulação de adiposidade, não se pode dissociar a contribuição destes dois factores para o desenvolvimento da insulinoresistência com a idade. No entanto, em ratos obesos (OZR), a insulinoresistência pós-prandial não é agravada com a idade, sendo semelhante entre OZR de 9 e 52 semanas, o que evidencia a debilidade da acção da insulina pós-prandial neste modelo de obesidade. Qualquer que seja a deficiência que está na génese da insulinoresistência nos OZR parece poder concluir-se que tal deficiência: (i) localiza-se principalmente ao nível do músculo esquelético, tecido-alvo da acção da HISS; (ii) surge precocemente no desenvolvimento do OZR, já plenamente insulinoresistentes às 9 semanas de idade; e (iii) não é agravada com a idade, sendo que às 52 semanas a sensibilidade à insulina total e dependente de cada uma das componentes de acção da insulina é semelhante à observada às 9 semanas de idade.

8.4. A ACÇÃO DA INSULINA DEPENDENTE DA HISS ESTÁ COMPROMETIDA EM RATOS ZUCKER DIABÉTICOS E É AGRAVADA POR DETERMINADAS DIETAS

Os resultados apresentados e discutidos no capítulo 7 dizem respeito à avaliação da acção pós-prandial da insulina e, em particular, da componente dependente da HISS num modelo animal de diabetes tipo 2 - o rato Zucker diabético (ZDF).

À semelhança do que acontece com os ratos Zucker obesos não diabéticos (OZR), os ZDF também apresentam uma diminuição de ambas as componentes de acção da insulina. Adicionalmente, comparando os efeitos das duas dietas testadas (Panlab A04, Panlab; e Purina 5008, Labdiet) na sensibilidade à insulina e na glicémia de ratos ZDF, concluiu-se que, para além dos factores genéticos pré-existentes, também os factores nutricionais influenciam a condição diabética nestes animais. Com efeito, animais ZDF alimentados com Purina apresentavam uma insulinoresistência e hiperglicémia mais acentuadas do que ratos ZDF alimentados com Panlab. Estes animais parecem ser muito sensíveis à variação da dieta, uma vez que, apesar das diferenças entre as duas rações serem mínimas (tabela IX, capítulo 3), o seu impacto na acção da HISS foi significativamente diferente. A ração Purina apresenta, em média, uma quantidade de lípidos superior (aproximadamente o dobro) à presente na ração Panlab; tendo em conta os resultados do capítulo 5, a presença de uma concentração de lípidos mais elevada na dieta de ratos ZDF pode ser responsável pelo agravamento da insulinoresistência, o que, em conjugação com o aumento da glicémia, corresponde ao acelerar do quadro diabético. De facto, diversos autores têm sugerido que o aumento de lípidos na dieta pode agravar a condição diabética de ratos ZDF (Unger e Orci, 2001). Nós demonstrámos pela primeira vez que o agravamento da insulinoresistência induzido por uma dieta (Purina *versus* Panlab) se deve ao decréscimo adicional da via da HISS, o qual parece estar associado ao aumento da glicémia em ratos diabéticos (ZDF).

Os resultados obtidos com os modelos genéticos de insulinoresistência (OZR e ZDF), por comparação com modelos ambientais, como os ratos HFD, são ainda interessantes na medida que suportam a hipótese de que há um fundo genético que determina se o indivíduo desenvolverá insulinoresistência, independentemente da condição de obesidade. Nesta hipótese encaixam diversas alterações genéticas, que se demonstrou induzirem insulinoresistência, tais como as mutações nos genes do receptor da insulina ou dos seus substratos (Withers *et al.*, 1998), do enzima PI3K (Shepherd *et al.*, 1998), ou dos GLUT4 (O'Rahilly *et al.*, 1992), entre outras (Kahn, 2003). Para além disso, o desenvolvimento de obesidade e insulinoresistência associada encaixa também no conceito de genes poupadores (*thrifty genes*), proposto por Neel, há mais de 4 décadas (Neel, 1962). Segundo esta teoria, o aparelho genético humano e animal em geral, está adaptado para situações de deficiência nutricional, resultantes da escassez de alimentos, o que leva a que, em situação de abundância, haja acumulação e armazenamento energético. Este mecanismo, que outrora foi muito útil, pode ser altamente prejudicial na sociedade moderna, uma vez que conduzirá ao desenvolvimento de obesidade e, concomitantemente, de insulinoresistência.

Deste modo, um indivíduo com pré-disposição genética para o desenvolvimento de diabetes *mellitus* apresenta alterações metabólicas que parecem ser moduladas por factores ambientais, nomeadamente pela dieta. Isto mesmo está representado na figura 8.3, em baixo.

Pode concluir-se que determinadas dietas, nomeadamente ricas em lípidos ou em glicídios (sacarose), vão induzir ou agravar a condição de insulinoresistência e que tal parece ocorrer primeira e primordialmente no estado pós-prandial, principalmente devido à perda de acção da via da HISS. De facto, o que se observou nos diversos modelos até agora estudados é que a diminuição da acção da insulina é causada maioritariamente pela inibição da via da HISS, a qual pode ocorrer isoladamente ou ser acompanhada pela diminuição da acção da insulina *per se*. No entanto, o inverso nunca

se observou, isto é, em nenhum dos modelos de insulinoresistência estudados foi observada uma redução da componente independente da HISS sem alterações na HISS.

Destas observações pode inferir-se que o quadro pré-diabético, em que ocorre uma insulinoresistência pós-prandial marcada, é causado essencialmente por deficiências na via da HISS, quer a nível hepático, afectando a sua síntese e/ou libertação, quer a nível muscular, por alterações da sua acção. A passagem da pré-diabetes para a condição de diabetes franca parece resultar do somatório de deficiências na acção da HISS, da insulina *per se* e, mais tarde, da secreção pancreática de insulina (figura 8.3).

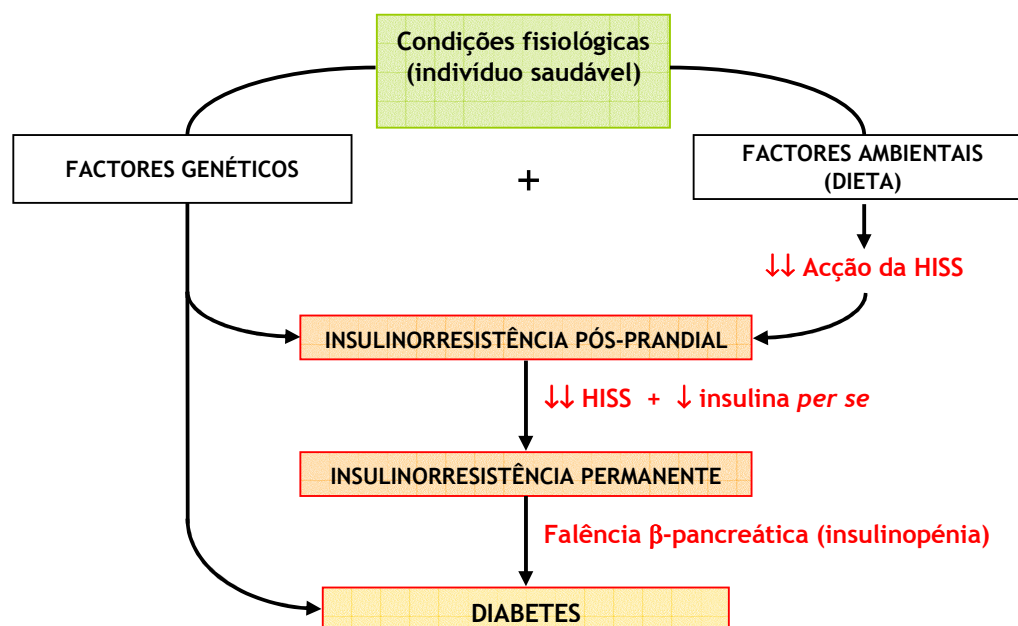


Figura 8.3: A insulinoresistência parece resultar da exposição a factores ambientais, mediante uma predisposição genética. A perda de acção da HISS, provocada por factores ambientais, leva a uma insulinoresistência pós-prandial, o que parece preceder a diminuição da acção da insulina *per se* e, conseqüentemente, a insulinoresistência em jejum. A passagem da pré-diabetes, facilitada por factores genéticos, para a condição de diabetes franca parece resultar do somatório de deficiências na acção da HISS, da insulina *per se*, e, mais tarde, da secreção pancreática de insulina. HISS, substância hepática sensibilizadora da insulina. ↓, decréscimo; ↓↓, decréscimo acentuado.

8.5. PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

Não obstante o trabalho apresentado nesta dissertação responder a uma parte considerável das questões a que se propunha investigar (ver capítulo 2), não completa totalmente o estudo em causa. Por outro lado, como é apanágio de qualquer projecto de investigação, as observações inerentes ao desenvolvimento do próprio trabalho levantam novas questões às quais trabalhos futuros poderão dar resposta.

Deste modo, seriam necessários estudos adicionais de forma a esclarecer alguns pontos:

- Caracterização nutricional do estímulo fisiológico que activa o mecanismo de sensibilização para a acção da insulina após uma refeição. É importante determinar quais os compostos ou classe(s) de compostos que estimulam o intestino, promovendo a activação do sistema nervoso parassimpático e concomitantemente da via da HISS, potenciando a acção da insulina. Neste sentido, experiências preliminares realizadas pelo nosso grupo, em colaboração com o de Lutt, confirmaram que a presença de glucose numa refeição líquida não é necessária para despoletar o mecanismo de potenciação de acção da insulina, o qual parece ser desencadeado por uma mistura de proteínas e triacilgliceróis de cadeia média-longa. Tendo em conta os resultados desta dissertação, os triacilgliceróis não parecem ser o principal candidato a iniciador do mecanismo pós-prandial de activação da HISS, mas sim as proteínas. Estes estudos estão em prossecução.
- As experiências apresentadas nesta dissertação apontam para o intestino como órgão-chave na iniciação do mecanismo de sensibilização para a acção da insulina, em resposta a uma refeição mista. No entanto, estes estudos não foram concludentes quanto ao ser o duodeno, o jejuno ou outra porção intestinal, uma vez que a injeção

da refeição líquida mista foi realizada no duodeno, mas a solução pôde progredir ao longo do intestino. Apesar de se especular que a porção-chave seja o duodeno, pelas suas características neuro-endócrinas, tal carece de confirmação. É assim necessário determinar qual a porção intestinal responsável pela sinalização do mecanismo pós-prandial de potenciação da acção da insulina.

- Identificação do estímulo do mecanismo pós-prandial de activação da via da HISS (potenciação da acção da insulina). Parece ser importante determinar se é activado apenas por um estímulo entérico de origem químico-nutricional, hormonal, neuronal, ou por combinação de vários estímulos.
- Mecanismo de acção da HISS - via de transdução de sinal. Sabe-se que a libertação fisiológica da HISS no estado pós-prandial conduz a uma potenciação da acção da insulina no músculo esquelético. Porém, não se conhece nem a natureza química deste factor humoral (HISS) nem a sua via de sinalização intracelular. Estes aspectos são relevantes, não só do ponto de vista fisiológico, mas principalmente do ponto de vista fisiopatológico, uma vez que podem constituir um importante alvo terapêutico no tratamento da insulinoresistência pós-prandial. Com efeito, os trabalhos apresentados no capítulo 6 da presente dissertação, envolvendo ratos Zucker obesos (OZR), sugerem que as vias de sinalização da HISS e da insulina têm ponto(s) em comum, sendo que ambas parecem estimular o aporte de glucose via GLUT-4. Estudos de transdução de sinal e de captação de glucose marcada ([³H]-2-desoxiglucose) no músculo esquelético de OZR, bem como estudos *in vitro* com culturas primárias de células de músculo esquelético e/ou em co-cultura com hepatócitos poderiam ajudar a esclarecer o presente ponto.
- Deste trabalho concluiu-se que o aumento de adiposidade e a perda de função da HISS correlacionam-se, pelo que se torna relevante estudar a causalidade, bem como

tentar perceber como é que compostos de origem adipocitária, como as adipocitocinas, afectam a acção da HISS e vice-versa.

- Pretende-se prosseguir e aprofundar os estudos nutricionais com ratos Zucker diabéticos (ZDF), a fim de extrapolar para a diabetes humana, cuja etiologia assenta em factores de natureza genética e ambiental. Da presente dissertação concluiu-se que a acção da insulina dependente da HISS está diminuída em ZDF, mas que pode ser agravada por certas dietas. Deste modo, será interessante compreender o mecanismo através do qual certos factores ambientais, nomeadamente nutricionais, podem acentuar a insulinoresistência causada pela perda de acção da HISS e como é que tal contribui para o agravamento da condição de diabetes.
- Finalmente, os estudos iniciados com fármacos bloqueadores α,β -adrenérgicos e capazes de estimular o NOS, como o carvedilol (Afonso *et al.*, 2006b; Afonso *et al.*, 2006a), devem prosseguir-se, podendo estender-se a ratos ZDF, um modelo de diabetes e hipertensão em que a via da HISS (dependente de NO) está fortemente comprometida. Isto permitirá não só compreender, como também constituir um alvo terapêutico para o tratamento da diabetes e hipertensão, evidenciando a via da HISS como *pivot*.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ADEGHATE, E. (2008). Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. *Curr Med Chem*, 15, 1851-62.
- AFONSO, R.A., LAUTT, W.W., RIBEIRO, R.T., LEGARE, D.J. & MACEDO, M.P. (2007a). Insulin resistance in two animal models of obesity: A comparison of HISS-dependent and HISS-independent insulin action in high-fat diet-fed and Zucker rats. *Proc West Pharmacol Soc*, 50, 110-4.
- AFONSO, R.A., LAUTT, W.W., SCHAFER, J., LEGARE, D., OLIVEIRA, A.G. & MACEDO, M.P. (2009). High-fat diet decreases post-prandial insulin sensitivity primarily by impairing the hepatic parasympathetic pathway. *Am. J. Physiol. Reg. I.*, (submetido).
- AFONSO, R.A., PATARRAO, R.S., MACEDO, M.P. & CARMO, M.M. (2006a). Carvedilol action is dependent on endogenous production of nitric oxide. *Am J Hypertens*, 19, 419-25.
- AFONSO, R.A., PATARRAO, R.S., MACEDO, M.P. & CARMO, M.M. (2006b). Carvedilol's actions are largely mediated by endogenous nitric oxide. *Rev Port Cardiol*, 25, 911-7.
- AFONSO, R.A., RIBEIRO, R.T., FERNANDES, A.B., PATARRAO, R.S. & MACEDO, M.P. (2007b). Hepatic-dependent and -independent insulin actions are impaired in the obese Zucker rat model. *Obesity (Obes Res)*, 15, 314-21.
- AFONSO, R.A., RIBEIRO, R.T. & MACEDO, M.P. (2004). Defective hepatic nitric oxide action results in HISS-dependent insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Proc West Pharmacol Soc*, 47, 103-4.
- AHMAD, F. & GOLDSTEIN, B.J. (1995). Increased abundance of specific skeletal muscle protein-tyrosine phosphatases in a genetic model of insulin-resistant obesity and diabetes mellitus. *Metabolism*, 44, 1175-84.
- ANAI, M., FUNAKI, M., OGIHARA, T., TERASAKI, J., INUKAI, K., KATAGIRI, H., FUKUSHIMA, Y., YAZAKI, Y., KIKUCHI, M., OKA, Y. & ASANO, T. (1998). Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. *Diabetes*, 47, 13-23.
- ANDRES, R., SWRDLOFF, R., PZEFKY, T. & COLEMAN, D. (1966). Manual feedback for the control of blood glucose concentration. In *Automation in Analytical Chemistry*. ed Skeggs Jr, L.T. pp. 486-491. New York: Mediad.
- APWEILER, R. & FREUND, P. (1993). Development of glucose intolerance in obese (fa/fa) Zucker rats. *Horm Metab Res*, 25, 521-4.
- ASENSI, M., SASTRE, J., PALLARDO, F.V., GARCIA DE LA ASUNCION, J., ESTRELA, J.M. & VINA, J. (1994). A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem*, 217, 323-8.
- ASHCROFT, S.J., BUNCE, J., LOWRY, M., HANSEN, S.E. & HEDESKOV, C.J. (1978). The effect of sugars on (pro)insulin biosynthesis. *Biochem J*, 174, 517-26.
- BAILEY & FLATT, P.R. (2003). Obesity and nutritional factors in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. In *Textbook of Diabetes*. ed Williams., J.C.P.a.G. pp. 21.1-21.15. Malden: Blackwell Science.
- BANERJI, M.A., LEBOWITZ, J., CHAIKEN, R.L., GORDON, D., KRAL, J.G. & LEBOVITZ, H.E. (1997). Relationship of visceral adipose tissue and glucose disposal is independent of sex in black NIDDM subjects. *Am J Physiol*, 273, E425-32.
- BANZ, W.J., DAVIS, J., PETERSON, R. & IQBAL, M.J. (2004). Gene expression and adiposity are modified by soy protein in male Zucker diabetic fatty rats. *Obes Res*, 12, 1907-13.
- BARTNESS, T.J. (2002). Dual innervation of white adipose tissue: some evidence for parasympathetic nervous system involvement. *J Clin Invest*, 110, 1235-7.
- BARZILAI, N., SHE, L., LIU, B.Q., VUGUIN, P., COHEN, P., WANG, J. & ROSSETTI, L. (1999). Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes*, 48, 94-8.
- BASU, R., BREDA, E., OBERG, A.L., POWELL, C.C., DALLA MAN, C., BASU, A., VITTONI, J.L., KLEE, G.G., ARORA, P., JENSEN, M.D., TOFFOLO, G., COBELLI, C. & RIZZA, R.A. (2003). Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance. *Diabetes*, 52, 1738-48.

- BENTHEM, L., KEIZER, K., WIEGMAN, C.H., DE BOER, S.F., STRUBBE, J.H., STEFFENS, A.B., KUIPERS, F. & SCHEURINK, A.J. (2000). Excess portal venous long-chain fatty acids induce syndrome X via HPA axis and sympathetic activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279, E1286-93.
- BERGMAN, R.N. (2000). Non-esterified fatty acids and the liver: why is insulin secreted into the portal vein? *Diabetologia*, 43, 946-52.
- BERGMAN, R.N., FINEGOOD, D.T. & ADER, M. (1985). Assessment of insulin sensitivity in vivo. *Endocr Rev*, 6, 45-86.
- BERGMAN, R.N., IDER, Y.Z., BOWDEN, C.R. & COBELLI, C. (1979). Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol*, 236, E667-77.
- BERGMAN, R.N., KIM, S.P., HSU, I.R., CATALANO, K.J., CHIU, J.D., KABIR, M., RICHEY, J.M. & ADER, M. (2007). Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *Am J Med*, 120, S3-8; discussion S29-32.
- BERTHIAUME, N. & ZINKER, B.A. (2002). Metabolic responses in a model of insulin resistance: comparison between oral glucose and meal tolerance tests. *Metabolism*, 51, 595-8.
- BLOCH-DAMTI, A. & BASHAN, N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 7, 1553-67.
- BODEN, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, 46, 3-10.
- BOLLEN, M., KEPPENS, S. & STALMANS, W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J*, 336 (Pt 1), 19-31.
- BORCH-JOHNSEN, K., NISSEN, H., HENRIKSEN, E., KREINER, S., SALLING, N., DECKERT, T. & NERUP, J. (1987). The natural history of insulin-dependent diabetes mellitus in Denmark: 1. Long-term survival with and without late diabetic complications. *Diabet Med*, 4, 201-10.
- BOSELLO, O. & ZAMBONI, M. (2000). Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev*, 1, 47-56.
- BOULANGE, A., PLANCHE, E. & DE GASQUET, P. (1979). Onset of genetic obesity in the absence of hyperphagia during the first week of life in the Zucker rat (fa/fa). *J Lipid Res*, 20, 857-64.
- BRAY, G.A., MOTHON, S. & COHEN, A.S. (1970). Mobilization of fatty acids in genetically obese rats. *J Lipid Res*, 11, 517-21.
- BROZINICK, J.T., JR., BERKEMEIER, B.A. & ELMENDORF, J.S. (2007). "Actin"g on GLUT4: membrane & cytoskeletal components of insulin action. *Curr Diabetes Rev*, 3, 111-22.
- BROZINICK, J.T., JR., ETGEN, G.J., JR., YASPELKIS, B.B., 3RD & IVY, J.L. (1994). Glucose uptake and GLUT-4 protein distribution in skeletal muscle of the obese Zucker rat. *Am J Physiol*, 267, R236-43.
- BUCHANAN, T.A., YOUN, J.H., CAMPESE, V.M. & SIPOS, G.F. (1992). Enhanced glucose tolerance in spontaneously hypertensive rats. Pancreatic beta-cell hyperfunction with normal insulin sensitivity. *Diabetes*, 41, 872-8.
- CAPERUTO, L.C., ANHE, G.F., CAMBIAGHI, T.D., AKAMINE, E.H., DO CARMO BUONFIGLIO, D., CIPOLLA-NETO, J., CURI, R. & BORDIN, S. (2008). Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology*, 149, 6326-35.
- CARDOSO, S.M., DUARTE, R., BOAVIDA, J.M., CARVALHEIRO, M., CARVALHO, D. & CORREIA, L.G. (2008). Controlo metabólico e terapêutica dos doentes diabéticos em consultas diferenciadas - resultados do estudo TEDDI. *Rev Port Diab*, 3, 5-12.
- CARLSON, S.H., SHELTON, J., WHITE, C.R. & WYSS, J.M. (2000). Elevated sympathetic activity contributes to hypertension and salt sensitivity in diabetic obese Zucker rats. *Hypertension*, 35, 403-8.
- CARMIEL-HAGGAI, M., CEDERBAUM, A.I. & NIETO, N. (2005). A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Faseb J*, 19, 136-8.
- CARPENTIER, J.L., PACCAUD, J.P., BACKER, J., GILBERT, A., ORCI, L., KAHN, C.R. & BAECKER, J. (1993). Two steps of insulin receptor internalization depend on different domains of the beta-subunit. *J Cell Biol*, 122, 1243-52.
- CAUMO, A., BERGMAN, R.N. & COBELLI, C. (2000). Insulin sensitivity from meal tolerance tests in normal subjects: a minimal model index. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 4396-402.
- CEDDIA, R.B., KOISTINEN, H.A., ZIERATH, J.R. & SWEENEY, G. (2002). Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *Faseb J*, 16, 1163-76.

- CERIELLO, A., BORTOLOTTI, N., FALLETI, E., TABOGA, C., TONUTTI, L., CRESCENTINI, A., MOTZ, E., LIZZIO, S., RUSSO, A. & BARTOLI, E. (1997). Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care*, 20, 194-7.
- CERIELLO, A., COLAGIURI, S., GERICH, J. & TUOMILEHTO, J. (2008). Guideline for management of postmeal glucose. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18, S17-33.
- CERIELLO, A., COLAGIURI, S., GERICH, J. & TUOMILEHTO, J. (2007). *International Diabetes Federation (IDF) Guideline for management of postmeal glucose*. Brussels: Lesaffre Printers.
- CERIELLO, A. & MOTZ, E. (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 816-23.
- CHANDER, P.N., GEALEKMAN, O., BRODSKY, S.V., ELITOK, S., TOJO, A., CRABTREE, M., GROSS, S.S. & GOLIGORSKY, M.S. (2004). Nephropathy in Zucker diabetic fat rat is associated with oxidative and nitrosative stress: prevention by chronic therapy with a peroxynitrite scavenger ebselen. *J Am Soc Nephrol*, 15, 2391-403.
- CHANG, L., CHIANG, S.H. & SALTIEL, A.R. (2004). Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med*, 10, 65-71.
- CHARLES-RIVER-LABORATORIES (2004). *Laboratories catalogue, research models - products and services*. Barcelona.
- CHAUDHARY, D.P., BOPARAI, R.K. & BANSAL, D.D. (2007). Implications of oxidative stress in high sucrose low magnesium diet fed rats. *Eur J Nutr*, 46, 383-90.
- CHEESEMAN, C. (2008). GLUT7: a new intestinal facilitated hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, E238-241.
- CHEN, C., GRZEGORZEWSKI, K.J., BARASH, S., ZHAO, Q., SCHNEIDER, H., WANG, Q., SINGH, M., PUKAC, L., BELL, A.C., DUAN, R., COLEMAN, T., DUTTARROY, A., CHENG, S., HIRSCH, J., ZHANG, L., LAZARD, Y., FISCHER, C., BARBER, M.C., MA, Z.D., ZHANG, Y.Q., REAVEY, P., ZHONG, L., TENG, B., SANYAL, I., RUBEN, S.M., BLONDEL, O. & BIRSE, C.E. (2003). An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotechnol*, 21, 294-301.
- CHEN, J.W., JEN, S.L., LEE, W.L., HSU, N.W., LIN, S.J., TING, C.T., CHANG, M.S. & WANG, P.H. (1998). Differential glucose tolerance in dipper and nondipper essential hypertension: the implications of circadian blood pressure regulation on glucose tolerance in hypertension. *Diabetes Care*, 21, 1743-8.
- CHOU, H.F., MCGIVERN, R., BERMAN, N. & IPP, E. (1991). Oscillations of circulating plasma insulin concentrations in the rat. *Life Sci*, 48, 1463-9.
- CHOU, T.C., YEN, M.H., LI, C.Y. & DING, Y.A. (1998). Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*, 31, 643-8.
- CLARK, J.B., PALMER, C.J. & SHAW, W.N. (1983). The diabetic Zucker fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, 173, 68-75.
- COIMBRA, M.A. & DELGADILLO, I. (1997). Definição e classificação de glúcidos. In *Bioquímica*. ed Halpern, M.J. pp. 145-157. Lisboa: Lidel.
- COMMERFORD, S.R., BIZEAU, M.E., MCRAE, H., JAMPOLIS, A., THRESHER, J.S. & PAGLIASSOTTI, M.J. (2001). Hyperglycemia compensates for diet-induced insulin resistance in liver and skeletal muscle of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281, R1380-9.
- COMMERFORD, S.R., PAGLIASSOTTI, M.J., MELBY, C.L., WEI, Y., GAYLES, E.C. & HILL, J.O. (2000). Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279, E875-85.
- CORREIA, N.C., GUARINO, M.P., RAPOSO, J. & MACEDO, M.P. (2002). Hepatic guanylyl cyclase inhibition induces HISS-dependent insulin resistance. *Proc West Pharmacol Soc*, 45, 57-8.
- CORSETTI, J.P., SPARKS, J.D., PETERSON, R.G., SMITH, R.L. & SPARKS, C.E. (2000). Effect of dietary fat on the development of non-insulin dependent diabetes mellitus in obese Zucker diabetic fatty male and female rats. *Atherosclerosis*, 148, 231-41.
- CRABTREE, M.J., SMITH, C.L., LAM, G., GOLIGORSKY, M.S. & GROSS, S.S. (2008). Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, H1530-40.
- CRAPARO, A., FREUND, R. & GUSTAFSON, T.A. (1997). 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. *J Biol Chem*, 272, 11663-9.

- CRAVEN, P.A. & DERUBERTIS, F.R. (1978). Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem*, 253, 8433-43.
- CRETTEZ, M. & JEANRENAUD, B. (1980). Postreceptor alterations in the states of insulin resistance. *Metabolism*, 29, 467-73.
- CRUCIANI-GUGLIEMACCI, C., VINCENT-LAMON, M., ROUCH, C., OROSCO, M., KTORZA, A. & MAGNAN, C. (2005). Early changes in insulin secretion and action induced by high-fat diet are related to a decreased sympathetic tone. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288, E148-54.
- D'ALESSANDRO, M.E., CHICCO, A., KARABATAS, L. & LOMBARDO, Y.B. (2000). Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. *J Nutr Biochem*, 11, 273-80.
- DAVIS, J., HIGGINBOTHAM, A., O'CONNOR, T., MOUSTAID-MOUSSA, N., TEBBE, A., KIM, Y.C., CHO, K.W., SHAY, N., ADLER, S., PETERSON, R. & BANZ, W. (2007). Soy protein and isoflavones influence adiposity and development of metabolic syndrome in the obese male ZDF rat. *Ann Nutr Metab*, 51, 42-52.
- DE MEYTS, P. (1994). The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I receptor binding and negative co-operativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling. *Diabetologia*, 37 Suppl 2, S135-48.
- DEFRONZO, R.A. (1988). Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, 37, 667-87.
- DEFRONZO, R.A. & FERRANNINI, E. (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 14, 173-94.
- DEFRONZO, R.A., JACOT, E., JEQUIER, E., MAEDER, E., WAHREN, J. & FELBER, J.P. (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*, 30, 1000-7.
- DEFRONZO, R.A., TOBIN, J.D. & ANDRES, R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*, 237, E214-23.
- DEMPSTER, P. & AITKENS, S. (1995). A new air displacement method for the determination of human body composition. *Med Sci Sports Exerc*, 27, 1692-7.
- DHALLA, A.K., SANTIKUL, M., CHISHOLM, J.W., BELARDINELLI, L. & REAVEN, G.M. (2008). Comparison of the antilipolytic effects of an A(1) adenosine receptor partial agonist in normal and diabetic rats. *Diabetes Obes Metab*.
- DHALLA, A.K., WONG, M.Y., VOSHOL, P.J., BELARDINELLI, L. & REAVEN, G.M. (2007). A1 adenosine receptor partial agonist lowers plasma FFA and improves insulin resistance induced by high-fat diet in rodents. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292, E1358-63.
- DOWELL, F.J., MARTIN, W., DOMINICZAK, A.F. & HAMILTON, C.A. (1999). Decreased basal despite enhanced agonist-stimulated effects of nitric oxide in 12-week-old stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Eur J Pharmacol*, 379, 175-82.
- DU, X., EDELSTEIN, D., OBICI, S., HIGHAM, N., ZOU, M.H. & BROWNLEE, M. (2006). Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest*, 116, 1071-80.
- DUNN, M.F. (2005). Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review. *Biometals*, 18, 295-303.
- DURHAM, H.A. & TRUETT, G.E. (2006). Development of insulin resistance and hyperphagia in Zucker fatty rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, R652-8.
- EGUEZ, L., LEE, A., CHAVEZ, J.A., MIINEA, C.P., KANE, S., LIENHARD, G.E. & MCGRAW, T.E. (2005). Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab*, 2, 263-72.
- EKBERG, K., LANDAU, B.R., WAJNGOT, A., CHANDRAMOULI, V., EFENDIC, S., BRUNENGRABER, H. & WAHREN, J. (1999). Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*, 48, 292-8.
- ERCAN, N., GANNON, M.C. & NUTTALL, F.Q. (1994). Liver glycogen synthase, phosphorylase, and the glycogen concentration in rats given a glucose load orally: a 24-hour study. *Arch Biochem Biophys*, 315, 35-40.

- ERDEI, N., TOTH, A., PASZTOR, E.T., PAPP, Z., EDES, I., KOLLER, A. & BAGI, Z. (2006). High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291, H2107-15.
- ESCRIVA, F., AGOTE, M., RUBIO, E., MOLERO, J.C., PASCUAL-LEONE, A.M., ANDRES, A., SATRUSTEGUI, J. & CARRASCOSA, J.M. (1997). In vivo insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. *Endocrinology*, 138, 49-54.
- ESCRIVA, F., GAVETE, M.L., FERMIN, Y., PEREZ, C., GALLARDO, N., ALVAREZ, C., ANDRES, A., ROS, M. & CARRASCOSA, J.M. (2007). Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol*, 194, 131-41.
- ESPERANÇA-PINA, J.A. (2000). *Anatomia Humana da Relação*. Porto: Lidel.
- FERNANDES, A.B. (2007). Hepatic nitric oxide synthase activity and expression related to insulin resistance in an ageing obesity animal model. *Diabetologia*, 50, S304.
- FERRANNINI, E. (1998). Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev*, 19, 477-90.
- FERRANNINI, E., BUZZIGOLI, G., BONADONNA, R., GIORICO, M.A., OLEGGINI, M., GRAZIADEI, L., PEDRINELLI, R., BRANDI, L. & BEVILACQUA, S. (1987). Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med*, 317, 350-7.
- FERRANNINI, E. & GROOP, L.C. (1989). Hepatic glucose production in insulin-resistant states. *Diabetes Metab Rev*, 5, 711-26.
- FINK, R.I., KOLTERMAN, O.G., GRIFFIN, J. & OLEFSKY, J.M. (1983). Mechanisms of insulin resistance in aging. *J Clin Invest*, 71, 1523-35.
- FLIERS, E., KREIER, F., VOSHOL, P.J., HAVEKES, L.M., SAUERWEIN, H.P., KALSBECK, A., BUIJS, R.M. & ROMIJN, J.A. (2003). White adipose tissue: getting nervous. *J Neuroendocrinol*, 15, 1005-10.
- FRANSILLA-KALLUNKI, A., SCHALIN-JANTTI, C. & GROOP, L. (1992). Effect of gender on insulin resistance associated with aging. *Am J Physiol*, 263, E780-5.
- FRIEDMAN, J.E., DE VENTE, J.E., PETERSON, R.G. & DOHM, G.L. (1991). Altered expression of muscle glucose transporter GLUT-4 in diabetic fatty Zucker rats (ZDF/Drt-fa). *Am J Physiol*, 261, E782-8.
- FRONTONI, S., OHMAN, L., HAYWOOD, J.R., DEFRONZO, R.A. & ROSSETTI, L. (1992). In vivo insulin action in genetic models of hypertension. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 262, E191-196.
- FRUHBECK, G. (1999). Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes*, 48, 903-8.
- FU, W.J., HAYNES, T.E., KOHLI, R., HU, J., SHI, W., SPENCER, T.E., CARROLL, R.J., MEININGER, C.J. & WU, G. (2005). Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J Nutr*, 135, 714-21.
- GARDEMANN, A. & JUNGERMANN, K. (1986). Control of glucose balance in the perfused rat liver by the parasympathetic innervation. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 367, 559-66.
- GARRUTI, G., COTECCHIA, S., GIAMPETRUZZI, F., GIORGINO, F. & GIORGINO, R. (2008). Neuroendocrine deregulation of food intake, adipose tissue and the gastrointestinal system in obesity and metabolic syndrome. *J Gastrointest Liver Dis*, 17, 193-8.
- GENUTH, S.M. (1998). The endocrine system. In *Physiology*. eds Berne, R.M. & Levy, M.N. pp. 777-1013. St. Louis: Mosby.
- GERICH, J.E. & SMITH, T.S. (2003). Beta-cell defects and pancreatic abnormalities in type 2 diabetes. In *Textbook of Diabetes*. eds Pickup, J.C. & Williams, C.M. pp. 23.1-23.11. Malden: Blackwell Science.
- GIUSTARINI, D., DALLE-DONNE, I., COLOMBO, R., MILZANI, A. & ROSSI, R. (2003). An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free Radic Biol Med*, 35, 1365-72.
- GOODMAN, M.N., DLUZ, S.M., MCELANEY, M.A., BELUR, E. & RUDERMAN, N.B. (1983). Glucose uptake and insulin sensitivity in rat muscle: changes during 3-96 weeks of age. *Am J Physiol*, 244, E93-100.
- GOODMAN, M.N. & RUDERMAN, N.B. (1979). Insulin sensitivity of rat skeletal muscle: effects of starvation and aging. *Am J Physiol*, 236, E519-23.
- GOUVEIA, L.M., KETTELHUT, I.C. & FOSS, M.C. (2000). Abnormalities of glucose metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*, 33, 1357-62.
- GRANNER, D.K. (2003). The diversity of the endocrine system. In *Harper's Illustrated Biochemistry*. ed Murray, R.K. London: McGraw-Hill.
- GREENE, E.C. (1963). *Anatomy of the Rat*. New York: Hafner Publishing Company.

- GRIFFIN, M., MARCUCCI, M., CLINE, G., BELL, K., BARUCCI, N., LEE, D., GOODYEAR, L., KRAEGER, E., WHITE, M. & SHULMAN, G. (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*, 48, 1270-1274.
- GROOP, L. (2003). Bringing diabetes therapeutics to the big screen. *Nat Biotechnol*, 21, 240-1.
- GRUBERT, J.M., LAUTZ, M., LACY, D.B., MOORE, M.C., FARMER, B., PENALOZA, A., CHERRINGTON, A.D. & MCGUINNESS, O.P. (2005). Impact of continuous and pulsatile insulin delivery on net hepatic glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289, E232-40.
- GRUNDLEGER, M.L., GODBOLE, V.Y. & THENEN, S.W. (1980). Age-dependent development of insulin resistance of soleus muscle in genetically obese (ob/ob) mice. *Am J Physiol*, 239, E363-71.
- GRUNDY, S.M., CLEEMAN, J.I., DANIELS, S.R., DONATO, K.A., ECKEL, R.H., FRANKLIN, B.A., GORDON, D.J., KRAUSS, R.M., SAVAGE, P.J., SMITH, S.C., JR., SPERTUS, J.A. & COSTA, F. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, 112, 2735-52.
- GUARINO, M.P., AFONSO, R.A., RAIMUNDO, N., RAPOSO, J.F. & MACEDO, M.P. (2003). Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284, G588-94.
- GUARINO, M.P., CORREIA, N.C., LAUTT, W.W. & MACEDO, M.P. (2004). Insulin sensitivity is mediated by the activation of the ACh/NO/cGMP pathway in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, G527-32.
- GUARINO, M.P. & MACEDO, M.P. (2006). Co-administration of glutathione and nitric oxide enhances insulin sensitivity in Wistar rats. *Br J Pharmacol*, 147, 959-65.
- GUPTA, A.A., BOMHOFF, G.L. & GEIGER, P.C. (2008). Age-related differences in skeletal muscle insulin signaling: the role of stress kinases and heat shock proteins. *J Appl Physiol*, 105, 839-48.
- HALES, C.N. (1997). Non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Br Med Bull*, 53, 109-122.
- HALL, C.B., LUKASKI, H.C. & MARCHELLO, M. (1989). Estimation of rat body composition using tetrapolar bioelectrical impedance analysis. *Nutr Rep Int*, 39, 627-633.
- HANEFELD, M. & TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T. (2002). Control of post-prandial hyperglycemia--an essential part of good diabetes treatment and prevention of cardiovascular complications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 12, 98-107.
- HAVEL, P.J., PARRY, S.J., STERN, J.S., AKPAN, J.O., GINGERICH, R.L., TABORSKY, G.J., JR. & CURRY, D.L. (1994). Redundant parasympathetic and sympathoadrenal mediation of increased glucagon secretion during insulin-induced hypoglycemia in conscious rats. *Metabolism*, 43, 860-6.
- HAYNES, W.G., MORGAN, D.A., WALSH, S.A., MARK, A.L. & SIVITZ, W.I. (1997). Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest*, 100, 270-8.
- HEBERT, L.F., JR., DANIELS, M.C., ZHOU, J., CROOK, E.D., TURNER, R.L., SIMMONS, S.T., NEIDIGH, J.L., ZHU, J.S., BARON, A.D. & MCCLAIN, D.A. (1996). Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J Clin Invest*, 98, 930-6.
- HENNES, M.M., SHRAGO, E. & KISSEBAH, A.H. (1990). Receptor and postreceptor effects of free fatty acids (FFA) on hepatocyte insulin dynamics. *Int J Obes*, 14, 831-41.
- HIDA, K., WADA, J., EGUCHI, J., ZHANG, H., BABA, M., SEIDA, A., HASHIMOTO, I., OKADA, T., YASUHARA, A., NAKATSUKA, A., SHIKATA, K., HOURAI, S., FUTAMI, J., WATANABE, E., MATSUKI, Y., HIRAMATSU, R., AKAGI, S., MAKINO, H. & KANWAR, Y.S. (2005). Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10610-5.
- HIGUCHI, K., MASAKI, T., GOTOH, K., CHIBA, S., KATSURAGI, I., TANAKA, K., KAKUMA, T. & YOSHIMATSU, H. (2007). Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology*, 148, 2690-7.
- HIROSUMI, J., TUNCMAN, G., CHANG, L., GORGUN, C.Z., UYSAL, K.T., MAEDA, K., KARIN, M. & HOTAMISLIGIL, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420, 333-6.
- HIRST, S., PHILLIPS, D.I., VINES, S.K., CLARK, P.M. & HALES, C.N. (1993). Reproducibility of the short insulin tolerance test. *Diabet Med*, 10, 839-42.
- HOFFER, L.J., BISTRAN, B.R., YOUNG, V.R., BLACKBURN, G.L. & MATTHEWS, D.E. (1984). Metabolic effects of very low calorie weight reduction diets. *J Clin Invest*, 73, 750-8.
- HOGAN, K. & MARKOS, F. (2007). Muscarinic type 1 receptors mediate part of nitric oxide's vagal facilitatory effect in the isolated innervated rat right atrium. *Nitric Oxide*, 16, 110-7.

- HOLST, J.J. (1999). Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1): An Intestinal Hormone, Signalling Nutritional Abundance, with an Unusual Therapeutic Potential. *Trends Endocrinol Metab*, 10, 229-235.
- HOLST, J.J. & GROMADA, J. (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287, E199-206.
- HOUSTIS, N., ROSEN, E.D. & LANDER, E.S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, 440, 944-8.
- HULMAN, S., FALKNER, B. & CHEN, Y.Q. (1991). Insulin resistance in the spontaneously hypertensive rat. *Metabolism*, 40, 359-61.
- HYOGO, H. & YAMAGISHI, S. (2008). Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease. *Curr Pharm Des*, 14, 969-72.
- IGNARRO, L.J. (1992). Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans*, 20, 465-9.
- INGALLS, A.M., DICKIE, M.M. & SNELL, G.D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*, 41, 317-8.
- IVY, J.L. (2004). Muscle insulin resistance amended with exercise training: role of GLUT4 expression. *Med Sci Sports Exerc*, 36, 1207-11.
- JEBB, S.A. (1999). Measuring body composition: from the laboratory to the clinic. In *Clinical Obesity*. eds Kopelman, P.G. & Stock, M.J. pp. 18-49. Malden: Blackwell Science.
- JORDENS, I., MARSMAN, M., KUIJL, C. & NEEFJES, J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic*, 6, 1070-7.
- KAHN, C.R. (2003). Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes. *Exp Diabetes Res*, 4, 169-82.
- KAHN, S.E. (2001). The Importance of β -Cell Failure in the Development and Progression of Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 4047-4058.
- KAMOHARA, S., BURCELIN, R., HALAAS, J.L., FRIEDMAN, J.M. & CHARRON, M.J. (1997). Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, 389, 374-7.
- KANE, S., SANO, H., LIU, S.C., ASARA, J.M., LANE, W.S., GARNER, C.C. & LIENHARD, G.E. (2002). A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J Biol Chem*, 277, 22115-8.
- KANETO, A., KOSAKA, K. & NAKAO, K. (1967). Effects of stimulation of the vagus nerve on insulin secretion. *Endocrinology*, 80, 530-6.
- KANETO, H., NAKATANI, Y., KAWAMORI, D., MIYATSUKA, T. & MATSUOKA, T.A. (2004). Involvement of oxidative stress and the JNK pathway in glucose toxicity. *Rev Diabet Stud*, 1, 165-74.
- KANZAKI, M., MORA, S., HWANG, J.B., SALTIEL, A.R. & PESSIN, J.E. (2004). Atypical protein kinase C (PKC ζ / λ) is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *J. Cell Biol.*, 164, 279-290.
- KARAKASH, C. & JEANRENAUD, B. (1983). Insulin binding and removal by livers of genetically obese rats. *Diabetes*, 32, 605-9.
- KARAM, J.H., GRODSKY, G.M., CHING, K.N., SCHMID, F., BURRILL, K. & FORSHAM, P.H. (1974). "Staircase" glucose stimulation of insulin secretion in obesity. Measure of beta-cell sensitivity and capacity. *Diabetes*, 23, 763-70.
- KASHYAP, S.R. & DEFRONZO, R.A. (2007). The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diab Vasc Dis Res*, 4, 13-9.
- KATZ, A. (2007). Modulation of glucose transport in skeletal muscle by reactive oxygen species. *J Appl Physiol*, 102, 1671-6.
- KATZ, A., NAMBI, S.S., MATHER, K., BARON, A.D., FOLLMANN, D.A., SULLIVAN, G. & QUON, M.J. (2000). Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 2402-10.
- KELLEY, D.E., MOKAN, M., SIMONEAU, J.A. & MANDARINO, L.J. (1993). Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *J Clin Invest*, 92, 91-8.
- KEMMER, F.W., BERGER, M., HERBERG, L., GRIES, F.A., WIRDEIER, A. & BECKER, K. (1979). Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Demonstration of insulin resistance in the obese Zucker rat. *Biochem J*, 178, 733-41.

- KHAMAISSI, M., KAVEL, O., ROSENSTOCK, M., PORAT, M., YULI, M., KAISER, N. & RUDICH, A. (2000). Effect of inhibition of glutathione synthesis on insulin action: in vivo and in vitro studies using buthionine sulfoximine. *Biochem. J.*, 349, 579-586.
- KIM, H.J., HIGASHIMORI, T., PARK, S.Y., CHOI, H., DONG, J., KIM, Y.J., NOH, H.L., CHO, Y.R., CLINE, G., KIM, Y.B. & KIM, J.K. (2004). Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes*, 53, 1060-7.
- KIM, J.Y., NOLTE, L.A., HANSEN, P.A., HAN, D.H., KAWANAKA, K. & HOLLOSZY, J.O. (1999). Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. *Am J Physiol*, 276, R665-72.
- KING, P.A., HORTON, E.D., HIRSHMAN, M.F. & HORTON, E.S. (1992). Insulin resistance in obese Zucker rat (fa/fa) skeletal muscle is associated with a failure of glucose transporter translocation. *J Clin Invest*, 90, 1568-75.
- KLOVER, P.J., CLEMENTI, A.H. & MOONEY, R.A. (2005). Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology*, 146, 3417-27.
- KONERU, B., REDDY, M.C., DELA TORRE, A.N., PATEL, D., IPPOLITO, T. & FERRANTE, R.J. (1995). Studies of hepatic warm ischemia in the obese Zucker rat. *Transplantation*, 59, 942-6.
- KONTUREK, S.J., KONTUREK, J.W., PAWLIK, T. & BRZOZOWSKI, T. (2004). Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol*, 55, 137-54.
- KONTUREK, S.J., PEPERA, J., ZABIELSKI, K., KONTUREK, P.C., PAWLIK, T., SZLACHCIC, A. & HAHN, E.G. (2003). Brain-gut axis in pancreatic secretion and appetite control. *J Physiol Pharmacol*, 54, 293-317.
- KORACH-ANDRE, M., GAO, J., GOUNARIDES, J.S., DEACON, R., ISLAM, A. & LAURENT, D. (2005). Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two rat models of insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288, E106-16.
- KOYAMA, K., CHEN, G., LEE, Y. & UNGER, R.H. (1997). Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am J Physiol*, 273, E708-13.
- KREIER, F., FLIERS, E., VOSHOL, P.J., VAN EDEN, C.G., HAVEKES, L.M., KALSBECK, A., VAN HEIJNINGEN, C.L., SLUITER, A.A., METTENLEITER, T.C., ROMIJN, J.A., SAUERWEIN, H.P. & BUIJS, R.M. (2002). Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. *J Clin Invest*, 110, 1243-50.
- KUHLMANN, J., NEUMANN-HAEFELIN, C., BELZ, U., KALISCH, J., JURETSCHKE, H.-P., STEIN, M., KLEINSCHMIDT, E., KRAMER, W. & HERLING, A.W. (2003). Intramyocellular Lipid and Insulin Resistance: A Longitudinal In Vivo 1H-Spectroscopic Study in Zucker Diabetic Fatty Rats *Diabetes*, 52, 138-144.
- KULAS, D.T., ZHANG, W.R., GOLDSTEIN, B.J., FURLANETTO, R.W. & MOONEY, R.A. (1995). Insulin receptor signaling is augmented by antisense inhibition of the protein tyrosine phosphatase LAR. *J Biol Chem*, 270, 2435-8.
- LAAKSO, M., EDELMAN, S.V., BRECHTEL, G. & BARON, A.D. (1990). Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance. *J Clin Invest*, 85, 1844-52.
- LAIGHT, D.W., DESAI, K.M., GOPAUL, N.K., ANGGARD, E.E. & CARRIER, M.J. (1999). Pro-oxidant challenge in vivo provokes the onset of NIDDM in the insulin resistant obese Zucker rat. *Br J Pharmacol*, 128, 269-71.
- LANDSBERG, L. (2001). Insulin-mediated sympathetic stimulation: role in the pathogenesis of obesity-related hypertension (or, how insulin affects blood pressure, and why). *J Hypertens*, 19, 523-8.
- LANG, C.H., BAGBY, G.J., HARGROVE, D.M., HYDE, P.M. & SPITZER, J.J. (1987). Alterations in glucose kinetics induced by pentobarbital anesthesia. *Am J Physiol*, 253, E657-63.
- LANG, D.A., MATTHEWS, D.R., PETO, J. & TURNER, R.C. (1979). Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *N Engl J Med*, 301, 1023-7.
- LANG, G., GOLDSTEIN, M.S. & LEVINE, R. (1954). Influence of the liver on uptake of glucose by extrahepatic tissues. *Am J Physiol*, 177, 447-50.
- LANG, J. (1999). Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem*, 259, 3-17.
- LARGE, V. & ARNER, P. (1998). Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab*, 24, 409-18.
- LATOUR, M.G. & CHAN, C.C. (2002). A rapid insulin sensitivity test (RIST) in the anesthetized mice. *Diabetes*, 51 (Suppl 2), A422 (Abstract).

- LATOUR, M.G. & LAUTT, W.W. (2002a). The hepatic vagus nerve in the control of insulin sensitivity in the rat. *Auton Neurosci*, 95, 125-30.
- LATOUR, M.G. & LAUTT, W.W. (2002b). Insulin sensitivity regulated by feeding in the conscious unrestrained rat. *Can J Physiol Pharmacol*, 80, 8-12.
- LAUTT, W.W. (1983). Afferent and efferent neural roles in liver function. *Prog Neurobiol*, 21, 323-48.
- LAUTT, W.W. (1980). Hepatic parasympathetic neuropathy as cause of maturity-onset diabetes? *Gen Pharmacol*, 11, 343-5.
- LAUTT, W.W. (1999). The HISS story overview: a novel hepatic neurohumoral regulation of peripheral insulin sensitivity in health and diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*, 77, 553-62.
- LAUTT, W.W. (2005). Insulin sensitivity in skeletal muscle regulated by a hepatic hormone, HISS. *Can J Appl Physiol*, 30, 304-12.
- LAUTT, W.W. (2004). A new paradigm for diabetes and obesity: the hepatic insulin sensitizing substance (HISS) hypothesis. *J Pharmacol Sci*, 95, 9-17.
- LAUTT, W.W. (2007). Postprandial insulin resistance as an early predictor of cardiovascular risk. *Ther Clin Risk Manag*, 3, 761-70.
- LAUTT, W.W., MACEDO, M.P., SADRI, P., TAKAYAMA, S., DUARTE RAMOS, F. & LEGARE, D.J. (2001). Hepatic parasympathetic (HISS) control of insulin sensitivity determined by feeding and fasting. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, G29-36.
- LAUTT, W.W., MING, Z., MACEDO, M.P. & LEGARE, D.J. (2008). HISS-dependent insulin resistance (HIR) in aged rats is associated with adiposity, progresses to syndrome X, and is attenuated by a unique antioxidant cocktail. *Exp Gerontol*, 43, 790-800.
- LAUTT, W.W., WANG, X., SADRI, P., LEGARE, D.J. & MACEDO, M.P. (1998). Rapid insulin sensitivity test (RIST). *Can J Physiol Pharmacol*, 76, 1080-6.
- LAUTT, W.W. & WONG, C. (1978a). Hepatic glucose balance in response to direct stimulation of sympathetic nerves in the intact liver of cats. *Can J Physiol Pharmacol*, 56, 1022-8.
- LAUTT, W.W. & WONG, C. (1978b). Hepatic parasympathetic neural effect on glucose balance in the intact liver. *Can J Physiol Pharmacol*, 56, 679-82.
- LAWRENCE, M.C., MCKERN, N.M. & WARD, C.W. (2007). Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Current Opinion in Structural Biology*, 17, 699-705.
- LEE, K., PICARD, G., BESKE, S.D., HWANG, G.S. & TAYLOR, J.A. (2008). Effects of fitness and age on the response to vagotonic atropine. *Auton Neurosci*, 139, 60-7.
- LEE, P.Y., YUN, A.J. & BAZAR, K.A. (2004). Conditions of aging as manifestations of sympathetic bias unmasked by loss of parasympathetic function. *Med Hypotheses*, 62, 868-70.
- LEE, W.N., BASSILIAN, S., LIM, S. & BOROS, L.G. (2000). Loss of regulation of lipogenesis in the Zucker diabetic (ZDF) rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279, E425-32.
- LEITER, L.A., CERIELLO, A., DAVIDSON, J.A., HANEFELD, M., MONNIER, L., OWENS, D.R., TAJIMA, N. & TUOMILEHTO, J. (2005). Postprandial glucose regulation: new data and new implications. *Clin Ther*, 27 Suppl B, S42-56.
- LEMIEUX, S., PRUD'HOMME, D., BOUCHARD, C., TREMBLAY, A. & DESPRES, J.P. (1996). A single threshold value of waist girth identifies normal-weight and overweight subjects with excess visceral adipose tissue. *Am J Clin Nutr*, 64, 685-93.
- LEONARD, B.L., WATSON, R.N., LOOMES, K.M., PHILLIPS, A.R. & COOPER, G.J. (2005). Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol*, 42, 162-70.
- LEONARD, T.O. & LYDIC, R. (1997). Pontine nitric oxide modulates acetylcholine release, rapid eye movement sleep generation, and respiratory rate. *J Neurosci*, 17, 774-85.
- LESNIEWSKI, L.A., DONATO, A.J., BEHNKE, B.J., WOODMAN, C.R., LAUGHLIN, M.H., RAY, C.A. & DELP, M.D. (2008). Decreased NO signaling leads to enhanced vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle arterioles of the ZDF rat prior to overt diabetes and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, H1840-50.
- LETTNER, A. & RODEN, M. (2008). Ectopic fat and insulin resistance. *Curr Diab Rep*, 8, 185-91.
- LI, Q., CHEN, R., MORIYA, J., YAMAKAWA, J., SUMINO, H., KANDA, T. & TAKAHASHI, T. (2008). A novel adipocytokine, visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor (vaspin), and obesity. *J Int Med Res*, 36, 625-9.

- LIN, C.C. & YIN, M.C. (2008). Effects of cysteine-containing compounds on biosynthesis of triacylglycerol and cholesterol and anti-oxidative protection in liver from mice consuming a high-fat diet. *Br J Nutr*, 99, 37-43.
- LINDMARK, S., LONN, L., WIKLUND, U., TUFVESSON, M., OLSSON, T. & ERIKSSON, J.W. (2005). Dysregulation of the autonomic nervous system can be a link between visceral adiposity and insulin resistance. *Obes Res*, 13, 717-28.
- LOPEZ-JARAMILLO, P., GONZALEZ, M.C., PALMER, R.M. & MONCADA, S. (1990). The crucial role of physiological Ca²⁺ concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol*, 101, 489-93.
- LUKASKI, H.C., BOLONCHUK, W.W., HALL, C.B. & SIDERS, W.A. (1986). Validation of tetrapolar bioelectrical impedance method to assess human body composition. *J Appl Physiol*, 60, 1327-32.
- LUMB, W.W. & JONES, E.W. (1996). *Veterinary Anesthesia*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- MADDUX, B.A., SEE, W., LAWRENCE, J.C., JR., GOLDFINE, A.L., GOLDFINE, I.D. & EVANS, J.L. (2001). Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes*, 50, 404-10.
- MARCHESINI, G., BRIZI, M., MORSELLI-LABATE, A.M., BIANCHI, G., BUGIANESI, E., MCCULLOUGH, A.J., FORLANI, G. & MELCHIONDA, N. (1999). Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med*, 107, 450-5.
- MARCIANI, L., GOWLAND, P.A., SPILLER, R.C., MANOJ, P., MOORE, R.J., YOUNG, P., AL-SAHAB, S., BUSH, D., WRIGHT, J. & FILLERY-TRAVIS, A.J. (2000). Gastric Response to Increased Meal Viscosity Assessed by Echo-Planar Magnetic Resonance Imaging in Humans. *J. Nutr.*, 130, 122-127.
- MARINHO, S. (1995). Metabolismo do glutationo no fígado de rato normal e no fígado de rato hepatomizado. In *Química e Bioquímica*. Lisboa: Universidade de Lisboa.
- MARTYN, J.A., KANEKI, M. & YASUHARA, S. (2008). Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology*, 109, 137-48.
- MATSUDA, M. & DEFRONZO, R.A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*, 22, 1462-70.
- MATTHEWS, D.R., HOSKER, J.P., RUDENSKI, A.S., NAYLOR, B.A., TREACHER, D.F. & TURNER, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28, 412-9.
- MATTHEWS, D.R., NAYLOR, B.A., JONES, R.G., WARD, G.M. & TURNER, R.C. (1983). Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery. *Diabetes*, 32, 617-21.
- MCGROWDER, D., RAGOORISINGH, D. & BROWN, P. (2006). Acute effects of exogenous nitric oxide on glucose uptake in skeletal muscle of normoglycaemic and diabetic rats. *Med Sci Monit*, 12, BR28-35.
- MCINTYRE, N., HOLDSWORTH, C.D. & TURNER, D.S. (1965). Intestinal factors in the control of insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 25, 1317-24.
- MEIER, J.J. & NAUCK, M.A. (2004). Clinical endocrinology and metabolism. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide/gastric inhibitory polypeptide. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 18, 587-606.
- MERTZ, W. & SCHWARZK (1962). An effect of liver extracts on glucose tolerance in rats. *Am J Physiol*, 203, 53-6.
- MILAGRO, F.I., CAMPION, J. & MARTINEZ, J.A. (2006). Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)*, 14, 1118-23.
- MING, Z., FAN, Y.J., YANG, X. & LAUTT, W.W. (2006). Synergistic protection by S-adenosylmethionine with vitamins C and E on liver injury induced by thioacetamide in rats. *Free Radic Biol Med*, 40, 617-24.
- MINOKOSHI, Y., KIM, Y.B., PERONI, O.D., FRYER, L.G., MULLER, C., CARLING, D. & KAHN, B.B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 415, 339-43.
- MODAN, M., HALKIN, H., ALMOG, S., LUSKY, A., ESHKOL, A., SHEFI, M., SHITRIT, A. & FUCHS, Z. (1985). Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance. *J Clin Invest*, 75, 809-17.
- MONDON, C.E. & BURTON, S.D. (1971). Factors modifying carbohydrate metabolism and effect of insulin in perfused rat liver. *Am J Physiol*, 220, 724-34.
- MONDON, C.E. & REAVEN, G.M. (1988). Evidence of abnormalities of insulin metabolism in rats with spontaneous hypertension. *Metabolism*, 37, 303-5.

- MOORE, M.C., SATAKE, S., BARANOWSKI, B., HSIEH, P.S., NEAL, D.W. & CHERRINGTON, A.D. (2002). Effect of hepatic denervation on peripheral insulin sensitivity in conscious dogs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282, E286-96.
- MORLEY, J.E. & MATTAMMAL, M.B. (1996). Nitric oxide synthase levels in obese Zucker rats. *Neurosci Lett*, 209, 137-9.
- MOSTHAF, L., GRAKO, K., DULL, T.J., COUSSENS, L., ULLRICH, A. & McCLAIN, D.A. (1990). Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *Embo J*, 9, 2409-13.
- MUECKLER, M., CARUSO, C., BALDWIN, S.A., PANICO, M., BLENCH, I., MORRIS, H.R., ALLARD, W.J., LIENHARD, G.E. & LODISH, H.F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, 229, 941-5.
- MULLER, G., ERTL, J., GERL, M. & PREIBISCH, G. (1997). Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, 272, 10585-93.
- MURRANT, C.L. & REID, M.B. (2001). Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech*, 55, 236-48.
- NAGY, K., LEVY, J. & GRUNBERGER, G. (1990). High-fat feeding induces tissue-specific alteration in proportion of activated insulin receptors in rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 122, 361-8.
- NARIMIYA, M., AZHAR, S., DOLKAS, C.B., MONDON, C.E., SIMS, C., WRIGHT, D.W. & REAVEN, G.M. (1984). Insulin resistance in older rats. *Am J Physiol*, 246, E397-404.
- NATALI, A. & FERRANNINI, E. (2004). Hypertension, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 33, 417-29.
- NATALI, A., QUINONES GALVAN, A., PECORI, N., SANNA, G., TOSCHI, E. & FERRANNINI, E. (1998). Vasodilation with sodium nitroprusside does not improve insulin action in essential hypertension. *Hypertension*, 31, 632-6.
- NATALI, A., TOSCHI, E., BALDEWEG, S., CIOCIARO, D., FAVILLA, S., SACCA, L. & FERRANNINI, E. (2006). Clustering of insulin resistance with vascular dysfunction and low-grade inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes*, 55, 1133-40.
- NATHAN, D.M., SCHREIBER, E., FOGEL, H., MOJSOV, S. & HABENER, J.F. (1992). Insulinotropic action of glucagonlike peptide-1-(7-37) in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care*, 15, 270-6.
- NAWANO, M., OKU, A., UETA, K., UMEBAYASHI, I., ISHIRAHARA, T., ARAKAWA, K., SAITO, A., ANAI, M., KIKUCHI, M. & ASANO, T. (2000). Hyperglycemia contributes insulin resistance in hepatic and adipose tissue but not skeletal muscle of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278, E535-43.
- NEEL, J.V. (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet*, 14, 353-62.
- NETEA, M.G., JOOSTEN, L.A., LEWIS, E., JENSEN, D.R., VOSHOL, P.J., KULLBERG, B.J., TACK, C.J., VAN KRIEKEN, H., KIM, S.H., STALENHOF, A.F., VAN DE LOO, F.A., VERSCHUEREN, I., PULAWA, L., AKIRA, S., ECKEL, R.H., DINARELLO, C.A., VAN DEN BERG, W. & VAN DER MEER, J.W. (2006). Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nat Med*, 12, 650-6.
- NEWGARD, C.B. & MCGARRY, J.D. (1995). Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 64, 689-719.
- NEWSHOLME, P., BRENNAN, L., RUBI, B. & MAECHLER, P. (2005). New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clin Sci (Lond)*, 108, 185-94.
- NIEWOEHNER, C.B. & NUTTALL, F.Q. (1995). Glycogen concentration and regulation of synthase activity in rat liver in vivo. *Arch Biochem Biophys*, 318, 271-8.
- NIJIMA, A. (1998). An electrophysiological study on hepatovisceral reflex: the role played by vagal afferents from chemosensors in the hepatoportal region. In *Liver and Nervous System*. eds Haussinger, D. & Jungermann, K. pp. 159-172. Dordrecht: Kluwer Academic.
- NILSSON, T., ARKHAMMAR, P., RORSMAN, P. & BERGGREN, P.O. (1989). Suppression of insulin release by galanin and somatostatin is mediated by a G-protein. An effect involving repolarization and reduction in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration. *J Biol Chem*, 264, 973-80.
- NRC (1995). *National Research Council - Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. Washington DC: National Academy Press.
- OBEN, J., MORGAN, L., FLETCHER, J. & MARKS, V. (1991). Effect of the entero-pancreatic hormones, gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like polypeptide-1(7-36) amide, on fatty acid synthesis in explants of rat adipose tissue. *J Endocrinol*, 130, 267-72.

- O'BRIEN, I.A., O'HARE, P. & CORRALL, R.J. (1986). Heart rate variability in healthy subjects: effect of age and the derivation of normal ranges for tests of autonomic function. *Br. Heart J.*, 55, 348-354.
- O'HARTE, F.P., GRAY, A.M., ABDEL-WAHAB, Y.H. & FLATT, P.R. (1997). Effects of non-glycated and glycated glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glucose metabolism in isolated mouse abdominal muscle. *Peptides*, 18, 1327-33.
- OHNEDA, M., INMAN, L.R. & UNGER, R.H. (1995). Caloric restriction in obese pre-diabetic rats prevents beta-cell depletion, loss of beta-cell GLUT 2 and glucose incompetence. *Diabetologia*, 38, 173-9.
- OKAMOTO, T., KANEMOTO, N., OHBUCHI, Y., OKANO, M., FUKUI, H. & SUDO, T. (2008). Characterization of STZ-Induced Type 2 Diabetes in Zucker Fatty Rats. *Exp Anim*, 57, 335-45.
- OLDS, R.J. & OLDS, J.R. (1991). *A Colour Atlas of The Rat - Dissection Guide*. Aylesbury: Wolfe Medical Publications.
- OLTMAN, C.L., COPPEY, L.J., GELLETT, J.S., DAVIDSON, E.P., LUND, D.D. & YOREK, M.A. (2005). Progression of vascular and neural dysfunction in sciatic nerves of Zucker diabetic fatty and Zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289, E113-22.
- OPARA, E.C. (2004). Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control. *J Investig Med*, 52, 19-23.
- O'RAHILLY, S., KROOK, A., MORGAN, R., REES, A., FLIER, J.S. & MOLLER, D.E. (1992). Insulin receptor and insulin-responsive glucose transporter (GLUT 4) mutations and polymorphisms in a Welsh type 2 (non-insulin-dependent) diabetic population. *Diabetologia*, 35, 486-9.
- ORCI, L., RAVAZZOLA, M., BAETENS, D., INMAN, L., AMHERDT, M., PETERSON, R.G., NEWGARD, C.B., JOHNSON, J.H. & UNGER, R.H. (1990). Evidence that down-regulation of beta-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9953-7.
- OU DOT, A., BEHR-ROUSSEL, D., COMPAGNIE, S., CAISEY, S., LE COZ, O., GORNY, D., ALEXANDRE, L. & GIULIANO, F. (2008). Endothelial dysfunction in insulin resistant rats is associated with oxidative stress and cox pathway dysregulation. *Physiol Res*.
- PAGANO, C., ENGLARO, P., GRANZOTTO, M., BLUM, W.F., SAGRILLO, E., FERRETTI, E., FEDERSPIL, G. & VETTOR, R. (1997). Insulin induces rapid changes of plasma leptin in lean but not in genetically obese (fa/fa) rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 21, 614-8.
- PAGLIASSOTTI, M.J., GAYLES, E.C., PODOLIN, D.A., WEI, Y. & MORIN, C.L. (2000). Developmental stage modifies diet-induced peripheral insulin resistance in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 278, R66-73.
- PAGLIASSOTTI, M.J., SHAHROKHI, K.A. & MOSCARELLO, M. (1994). Involvement of liver and skeletal muscle in sucrose-induced insulin resistance: dose-response studies. *Am J Physiol*, 266, R1637-44.
- PAOLISSO, G., DI MARO, G., PIZZA, G., D'AMORE, A., SGAMBATO, S., TESAURO, P., VARRICCHIO, M. & D'ONOFRIO, F. (1992a). Plasma GSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetics. *Am J Physiol*, 263, E435-40.
- PAOLISSO, G., GIUGLIANO, D., PIZZA, G., GAMBARDILLA, A., TESAURO, P., VARRICCHIO, M. & D'ONOFRIO, F. (1992b). Glutathione infusion potentiates glucose-induced insulin secretion in aged patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, 15, 1-7.
- PAOLISSO, G., SCHEEN, A.J., GIUGLIANO, D., SGAMBATO, S., ALBERT, A., VARRICCHIO, M., D'ONOFRIO, F. & LEFEBVRE, P.J. (1991). Pulsatile insulin delivery has greater metabolic effects than continuous hormone administration in man: importance of pulse frequency. *J Clin Endocrinol Metab*, 72, 607-15.
- PAOLISSO, G., SGAMBATO, S., GENTILE, S., MEMOLI, P., GIUGLIANO, D., VARRICCHIO, M. & D'ONOFRIO, F. (1988). Advantageous metabolic effects of pulsatile insulin delivery in noninsulin-dependent diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 67, 1005-10.
- PATARRAO, R.S., LAUTT, W.W., AFONSO, R.A., RIBEIRO, R.T., GUARINO, M.P., FERNANDES, A.B., BOAVIDA, J.M. & MACEDO, M.P. (2008). Meal-induced insulin sensitization and its parasympathetic regulation in humans. *Can J Physiol Pharmacol*, 86, 880-8.
- PATARRAO, R.S., LAUTT, W.W., GUARINO, M.P., AFONSO, R.A., RIBEIRO, R.T., FERNANDES, A.B., BOAVIDA, J.M. & MACEDO, M.P. (2007). A new technique to assess insulin sensitivity in humans: the rapid insulin sensitivity test (RIST). *Proc West Pharmacol Soc*, 50, 105-9.
- PATRUNO, A., SPERANZA, L., TETE, S., MASTRANGELO, F., DE LUTII, M.A., PESCE, M., FRANCESCHELLI, S., VINCIGUERRA, I., FELACO, M. & GRILLI, A. (2007). iNOS activity in the aged rat liver tissue. *J Biol Regul Homeost Agents*, 21, 89-95.

- PATTI, M.E., VIRKAMAKI, A., LANDAKER, E.J., KAHN, C.R. & YKI-JARVINEN, H. (1999). Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes*, 48, 1562-71.
- PEITL, B. & SZILVASSY, Z. (2007). The inhibitory effect of proglumide on meal-induced insulin sensitization in rats. *Metabolism*, 56, 863-4.
- PENICAUD, L., FERRE, P., TERRETAZ, J., KINEBANYAN, M.F., LETURQUE, A., DORE, E., GIRARD, J., JEANRENAUD, B. & PICON, L. (1987). Development of obesity in Zucker rats. Early insulin resistance in muscles but normal sensitivity in white adipose tissue. *Diabetes*, 36, 626-31.
- PETERSEN, K.F. & TYGSTRUP, N. (1994). A liver factor increasing glucose uptake in rat hindquarters. *J Hepatol*, 20, 461-5.
- PETERSON, H.R., ROTHSCHILD, M., WEINBERG, C.R., FELL, R.D., MCLEISH, K.R. & PFEIFER, M.A. (1988). Body fat and the activity of the autonomic nervous system. *N Engl J Med*, 318, 1077-83.
- PHILLIPS, M.S., LIU, Q., HAMMOND, H.A., DUGAN, V., HEY, P.J., CASKEY, C.J. & HESS, J.F. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet*, 13, 18-9.
- PHILLIPS, R.J. & POWLEY, T.L. (2007). Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *Auton Neurosci*, 136, 1-19.
- PICKAVANCE, L., WIDDOWSON, P.S., KING, P., ISHII, S., TANAKA, H. & WILLIAMS, G. (1998). The development of overt diabetes in young Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats and the effects of chronic MCC-555 treatment. *Br J Pharmacol*, 125, 767-70.
- PITKANEN, O.-P., LAINE, H., KEMPPAINEN, J., ERONEN, E., ALANEN, A., RAITAKARI, M., KIRVELA, O., RUOTSALAINEN, U., KNUUTI, J., KOIVISTO, V.A. & NUUTILA, P. (1999). Sodium nitroprusside increases human skeletal muscle blood flow, but does not change flow distribution or glucose uptake. *J Physiol*, 521, 729-737.
- PITOMBO, C., ARAUJO, E.P., DE SOUZA, C.T., PAREJA, J.C., GELONEZE, B. & VELLOSO, L.A. (2006). Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. *J Endocrinol*, 191, 699-706.
- PRATLEY, R.E. & WEYER, C. (2001). The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, 44, 929-45.
- PUNITHAVATHI, V.R., ANUTHAMA, R. & PRINCE, P.S. (2008). Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male Wistar rats. *J Appl Toxicol*, 28, 806-13.
- PUSCHEL, G.P. (2004). Control of hepatocyte metabolism by sympathetic and parasympathetic hepatic nerves. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 280, 854-67.
- RADZIUK, J. (2000). Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 4426-33.
- REAVEN, G.M. (1995). Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev*, 75, 473-86.
- REBRIN, I., KAMZALOV, S. & SOHAL, R.S. (2003). Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radic Biol Med*, 35, 626-35.
- REBRIN, I. & SOHAL, R.S. (2004). Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevity. *Exp Gerontol*, 39, 1513-9.
- REID, M.A., LATOUR, M.G., LEGARE, D.J., RONG, N. & LAUTT, W.W. (2002). Comparison of the rapid insulin sensitivity test (RIST), the insulin tolerance test (ITT), and the hyperinsulinemic euglycemic clamp (HIEC) to measure insulin action in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 80, 811-8.
- REID, M.A. & LAUTT, W.W. (2004). Pattern of insulin delivery affects hepatic insulin sensitizing substance (HISS) action and insulin resistance. *Can J Physiol Pharmacol*, 82, 1068-74.
- RIBEIRO, R.T., AFONSO, R.A., GUARINO, M.P. & MACEDO, M.P. (2008). Loss of postprandial insulin sensitization during aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63, 560-5.
- RIBEIRO, R.T., AFONSO, R.A. & MACEDO, M.P. (2002). The action of hepatic insulin-sensitizing substance: gender comparison in Wistar rats. *Proc West Pharmacol Soc*, 45, 55-6.
- RIBEIRO, R.T., AFONSO, R.A. & MACEDO, M.P. (2007). Hepatic parasympathetic role in insulin resistance on an animal model of hypertension. *Metabolism*, 56, 227-33.
- RIBEIRO, R.T., LAUTT, W.W., LEGARE, D.J. & MACEDO, M.P. (2005). Insulin resistance induced by sucrose feeding in rats is due to an impairment of the hepatic parasympathetic nerves. *Diabetologia*, 48, 976-83.
- RIBON, V. & SALTIEL, A.R. (1997). Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J*, 324 (Pt 3), 839-45.

- ROBERTS, C.K., BARNARD, R.J., SINDHU, R.K., JURCZAK, M., EHDAIE, A. & VAZIRI, N.D. (2006). Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism*, 55, 928-34.
- RODEN, M., PRICE, T.B., PERSEGHIN, G., PETERSEN, K.F., ROTHMAN, D.L., CLINE, G.W. & SHULMAN, G.I. (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*, 97, 2859-65.
- RORSMAN, P., ELIASSON, L., RENSTROM, E., GROMADA, J., BARG, S. & GOPEL, S. (2000). The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci*, 15, 72-77.
- RUDICH, A., TIROSH, A., POTASHNIK, R., KHAMAISI, M. & BASHAN, N. (1999). Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*, 42, 949-57.
- SADRI, P. & LAUTT, W.W. (1999). Blockade of hepatic nitric oxide synthase causes insulin resistance. *Am J Physiol*, 277, G101-8.
- SADRI, P. & LAUTT, W.W. (2000). Glucose disposal by insulin, but not IGF-1, is dependent on the hepatic parasympathetic nerves. *Can J Physiol Pharmacol*, 78, 807-12.
- SADRI, P., LEGARE, D.J. & LAUTT, W.W. (1997). Insulin resistance caused by nitric oxide synthase inhibition. *Proc West Pharmacol Soc*, 40, 19-20.
- SADRI, P., REID, M.A., AFONSO, R.A., SCHAFER, J., LEGARE, D.J., PAULA MACEDO, M. & WAYNE LAUTT, W. (2006). Meal-induced insulin sensitization in conscious and anaesthetized rat models comparing liquid mixed meal with glucose and sucrose. *Br J Nutr*, 95, 288-95.
- SAHA, J.K., XIA, J., GRONDIN, J.M., ENGLE, S.K. & JAKUBOWSKI, J.A. (2005). Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230, 777-84.
- SAITO, M., LESSARD, S.J., RIVAS, D.A., REEDER, D.W., HAWLEY, J.A. & YASPELKIS III, B.B. (2008). Activation of atypical protein kinase C[ζ] toward TC10 is regulated by high-fat diet and aerobic exercise in skeletal muscle. *Metabolism*, 57, 1173-1180.
- SALTIEL, A.R. & KAHN, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806.
- SALTIEL, A.R. & PESSIN, J.E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol*, 12, 65-71.
- SAMOLS, E., STAGNER, J.I., EWART, R.B. & MARKS, V. (1988). The order of islet microvascular cellular perfusion is B---A---D in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest*, 82, 350-3.
- SANDERSON, A.L., RADDA, G.K. & LEIGHTON, B. (1996). Abnormal regulation of hexokinase in insulin-resistant skeletal muscle. *Biochem Mol Med*, 59, 80-6.
- SANO, H., KANE, S., SANO, E., MIINEA, C.P., ASARA, J.M., LANE, W.S., GARNER, C.W. & LIENHARD, G.E. (2003). Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem*, 278, 14599-602.
- SAVKUR, R.S., PHILIPS, A.V. & COOPER, T.A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet*, 29, 40-7.
- SCHEEN, A.J., PAQUOT, N., CASTILLO, M.J. & LEFEBVRE, P.J. (1994). How to measure insulin action in vivo. *Diabetes Metab Rev*, 10, 151-88.
- SCHMIDT, C., HOCHERL, K. & BUCHER, M. (2007). Regulation of renal glucose transporters during severe inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, F804-811.
- SCHMIDT, S., JOOST, H.G. & SCHURMANN, A. (2009). GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- SCHMITZ-PEIFFER, C. (2000). Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal*, 12, 583-94.
- SCHMITZ-PEIFFER, C., BROWNE, C.L., OAKES, N.D., WATKINSON, A., CHISHOLM, D.J., KRAEGEN, E.W. & BIDEN, T.J. (1997). Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. *Diabetes*, 46, 169-78.
- SCHNEEBERGER, D., TAPPY, L., TEMPLER, E. & JEQUIER, E. (1991). Effects of muscarinic blockade on insulin secretion and on glucose-induced thermogenesis in lean and obese human subjects. *Eur J Clin Invest*, 21, 608-15.

- SCHRAMMEL, A., PFEIFFER, S., SCHMIDT, K., KOESLING, D. & MAYER, B. (1998). Activation of soluble guanylyl cyclase by the nitrovasodilator 3-morpholininosydnonimine involves formation of S-nitrosoglutathione. *Mol Pharmacol*, 54, 207-12.
- SHARP, P.E. & LAREGINA, M.C. (1998). *The Laboratory Rat*. New York: CRC Press.
- SHEPHERD, P.R., WITHERS, D.J. & SIDDLE, K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J*, 333 (Pt 3), 471-90.
- SHERMAN, W.M., KATZ, A.L., CUTLER, C.L., WITHERS, R.T. & IVY, J.L. (1988). Glucose transport: locus of muscle insulin resistance in obese Zucker rats. *Am J Physiol*, 255, E374-82.
- SHERWIN, R.S., KRAMER, K.J., TOBIN, J.D., INSEL, P.A., LILJENQUIST, J.E., BERMAN, M. & ANDRES, R. (1974). A model of the kinetics of insulin in man. *J Clin Invest*, 53, 1481-92.
- SHIMAZU, T. (1971). Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. V. Activation of glycogen synthetase by vagal stimulation. *Biochim Biophys Acta*, 252, 28-38.
- SHULMAN, G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 106, 171-6.
- SLIEKER, L.J., SUNDELL, K.L., HEATH, W.F., OSBORNE, H.E., BUE, J., MANETTA, J. & SPORTSMAN, J.R. (1992). Glucose transporter levels in tissues of spontaneously diabetic Zucker fa/fa rat (ZDF/drt) and viable yellow mouse (Avy/a). *Diabetes*, 41, 187-93.
- SMITH, T.K. & MCCARRON, S.L. (1998). Nitric oxide modulates cholinergic reflex pathways to the longitudinal and circular muscle in the isolated guinea-pig distal colon. *J Physiol*, 512, 893-906.
- SOLOMON, T.P., MARCHETTI, C.M., KRISHNAN, R.K., GONZALEZ, F. & KIRWAN, J.P. (2008). Effects of aging on basal fat oxidation in obese humans. *Metabolism*, 57, 1141-7.
- SOLTYS, K., DIKDAN, G. & KONERU, B. (2001). Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology*, 34, 13-8.
- SOWERS, J.R., STANDLEY, P.R., RAM, J.L., ZEMEL, M.B. & RESNICK, L.M. (1991). Insulin resistance, carbohydrate metabolism, and hypertension. *Am J Hypertens*, 4, 466S-472S.
- SQUADRITO, F., CALAPAI, G., CUCINOTTA, D., ALTAVILLA, D., ZINGARELLI, B., IOCULANO, M., URNA, G., SARDELLA, A., CAMPO, G.M. & CAPUTI, A.P. (1993). Anorectic activity of NG-nitro-L-arginine, an inhibitor of brain nitric oxide synthase, in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol*, 230, 125-8.
- SRINIVASAN, K., VISWANAD, B., ASRAT, L., KAUL, C.L. & RAMARAO, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*, 52, 313-20.
- STE MARIE, L., LUQUET, S., CURTIS, W. & PALMITER, R.D. (2005). Norepinephrine- and epinephrine-deficient mice gain weight normally on a high-fat diet. *Obes Res*, 13, 1518-22.
- STEIL, G.M., HWU, C.M., JANOWSKI, R., HARIRI, F., JINAGOUA, S., DARWIN, C., TADROS, S., REBRIN, K. & SAAD, M.F. (2004). Evaluation of insulin sensitivity and beta-cell function indexes obtained from minimal model analysis of a meal tolerance test. *Diabetes*, 53, 1201-7.
- STEINBAUM, E.A. & MILLER, N.E. (1965). Obesity from Eating Elicited by Daily Stimulation of Hypothalamus. *Am J Physiol*, 208, 1-5.
- STOCK, M.J. (1999). Energy balance and animal models of obesity. In *Clinical Obesity*. eds Kopelman, P.G. & Stock, M.J. pp. 50-72. Malden: Blackwell Science.
- STOJANOVSKA, L., ROSELLA, G. & PROIETTO, J. (1990). Evolution of dexamethasone-induced insulin resistance in rats. *Am J Physiol*, 258, E748-56.
- STRACZKOWSKI, M., KOWALSKA, I., DZIENIS-STRACZKOWSKA, S., KINALSKI, M., GORSKI, J. & KINALSKA, I. (2001). The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high-fat diet. *Diabetes Metab*, 27, 19-23.
- SUMIDA, K.D., CRANDALL, S.C., CHADHA, P.L. & QURESHI, T. (2002). Hepatic gluconeogenic capacity from various precursors in young versus old rats. *Metabolism: clinical and experimental*, 51, 876-880.
- SWISLOCKI, A.L., GOODMAN, M.N., KHUU, D.T. & FANN, K.Y. (1997). Insulin resistance and hypertension: in vivo and in vitro insulin action in skeletal muscle in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Hypertens*, 10, 1159-64.
- SZOCZ, Z., BRUNMAIR, B., STADLBAUER, K., NOWOTNY, P., BAUER, L., LUGER, A. & FURNSINN, C. (2008). Age-Dependent Development of Metabolic Derangement and Effects of Intervention with Pioglitazone in Zucker Diabetic Fatty Rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 326, 323-329.

- TAKAHASHI, M., TAKAHASHI, Y., TAKAHASHI, K., ZOLOTARYOV, F.N., HONG, K.S., KITAZAWA, R., IIDA, K., OKIMURA, Y., KAJI, H., KITAZAWA, S., KASUGA, M. & CHIHARA, K. (2008). Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*, 582, 573-8.
- TAKAYAMA, S., LEGARE, D.J. & LAUTT, W.W. (2000). Dose-related atropine-induced insulin resistance: comparing intraportal versus intravenous administration. *Proc West Pharmacol Soc*, 43, 33-4.
- TAKAYAMA, S., SAKURA, H., KATSUMORI, K., WASADA, T. & IWAMOTO, Y. (2001). A possible involvement of parasympathetic neuropathy on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 24, 968-9.
- TANAKA, K., INOUE, S., NAGASE, H., TAKAMURA, Y. & NIJIMA, A. (1990). Amino acid sensors sensitive to alanine and leucine exist in the hepato-portal system in the rat. *J Auton Nerv Syst*, 31, 41-6.
- TANTI, J.F., GREMEAUX, T., VAN OBERGHEEN, E. & LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. (1994). Insulin receptor substrate 1 is phosphorylated by the serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J*, 304 (Pt 1), 17-21.
- TATEISHI, N., HIGASHI, T., NARUSE, A., NAKASHIMA, K., SHIOZAKI, H. & SAKAMOTO, Y. (1977). Rat Liver Glutathione: Possible Role as a Reservoir of Cysteine. *J. Nutr.*, 107, 51-60.
- TATEISHI, N., HIGASHI, T., SHINYA, S., NARUSE, A. & SAKAMOTO, Y. (1974). Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J Biochem*, 75, 93-103.
- TAZAWA, S., YAMATO, T., FUJIKURA, H., HIRATOCHI, M., ITOH, F., TOMAE, M., TAKEMURA, Y., MARUYAMA, H., SUGIYAMA, T., WAKAMATSU, A., ISOGAI, T. & ISAJI, M. (2005). SLC5A9/SGLT4, a new Na⁺-dependent glucose transporter, is an essential transporter for mannose, 1,5-anhydro-D-glucitol, and fructose. *Life Sci*, 76, 1039-50.
- TEFF, K.L. (2008). Visceral nerves: vagal and sympathetic innervation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 32, 569-71.
- TEFF, K.L., ALAVI, A., CHEN, J., POURDEHNAD, M. & TOWNSEND, R.R. (1999). Muscarinic blockade inhibits gastric emptying of mixed-nutrient meal: effects of weight and gender. *Am J Physiol*, 276, R707-14.
- TEFF, K.L. & TOWNSEND, R.R. (1999). Early phase insulin infusion and muscarinic blockade in obese and lean subjects. *Am J Physiol*, 277, R198-208.
- TENTOLOURIS, N., LIATSIATIS, S. & KATSILAMBROS, N. (2006). Sympathetic System Activity in Obesity and Metabolic Syndrome. *Ann NY Acad Sci*, 1083, 129-152.
- TERAUCHI, Y., TAKAMOTO, I., KUBOTA, N., MATSUI, J., SUZUKI, R., KOMEDA, K., HARA, A., TOYODA, Y., MIWA, I., AIZAWA, S., TSUTSUMI, S., TSUBAMOTO, Y., HASHIMOTO, S., ETO, K., NAKAMURA, A., NODA, M., TOBE, K., ABURATANI, H., NAGAI, R. & KADOWAKI, T. (2007). Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 117, 246-57.
- TERRETTAZ, J., ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F. & JEANRENAUD, B. (1986). Severe hepatic and peripheral insulin resistance as evidenced by euglycemic clamps in genetically obese fa/fa rats. *Endocrinology*, 118, 674-8.
- THIRONE, A.C., HUANG, C. & KLIP, A. (2006). Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab*, 17, 72-8.
- TILG, H. & MOSCHEN, A.R. (2008). Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*, 14, 222-31.
- TOPP, B.G., ATKINSON, L.L. & FINEGOOD, D.T. (2007). Dynamics of insulin sensitivity, β -cell function, and β -cell mass during the development of diabetes in fa/fa rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293, E1730-5.
- TRIPPODO, N.C. & FROHLICH, E.D. (1981). Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res*, 48, 309-19.
- TROUT, K.K., HOMKO, C. & TKACS, N.C. (2007). Methods of measuring insulin sensitivity. *Biol Res Nurs*, 8, 305-18.
- TSUCHIYA, K., SAKAI, H., SUZUKI, N., IWASHIMA, F., YOSHIMOTO, T., SHICHIRI, M. & HIRATA, Y. (2007). Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology*, 148, 4548-56.
- TSUTSU, N., TAKATA, Y., NUNOI, K., KIKUCHI, M., TAKISHITA, S., SADOSHIMA, S. & FUJISHIMA, M. (1989). Glucose tolerance and insulin secretion in conscious and unrestrained normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Metabolism*, 38, 63-6.
- UIJTDEHAAGE, S.H., STERN, R.M. & KOCH, K.L. (1992). Effects of eating onvection-induced motion sickness, cardiac vagal tone, and gastric myoelectric activity. *Psychophysiology*, 29, 193-201.

- UNGER, R.H. & ORCI, L. (2001). Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *Faseb J*, 15, 312-21.
- UNGER, R.H. & ORCI, L. (2000). Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24 Suppl 4, S28-32.
- UYVAL, K.T., WIESBROCK, S.M., MARINO, M.W. & HOTAMISLIGIL, G.S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 389, 610-4.
- VAN DE BORNE, P., HAUSBERG, M., HOFFMAN, R.P., MARK, A.L. & ANDERSON, E.A. (1999). Hyperinsulinemia produces cardiac vagal withdrawal and nonuniform sympathetic activation in normal subjects. *Am J Physiol*, 276, R178-83.
- VAN EXEL, E., GUSSEKLOO, J., DE CRAEN, A.J., FROLICH, M., BOOTSMA-VAN DER WIEL, A. & WESTENDORP, R.G. (2002). Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes*, 51, 1088-92.
- VAN VLIET, B.N., HALL, J.E., MIZELLE, H.L., MONTANI, J.P. & SMITH, M.J., JR. (1995). Reduced parasympathetic control of heart rate in obese dogs. *Am J Physiol*, 269, H629-37.
- VAN ZWIETEN, P.A., KAM, K.L., PIJL, A.J., HENDRIKS, M.G., BEENEN, O.H. & PFAFFENDORF, M. (1996). Hypertensive diabetic rats in pharmacological studies. *Pharmacol Res*, 33, 95-105.
- VARA, E. & TAMARIT-RODRIGUEZ, J. (1986). Effects of L-leucine on palmitate metabolism and insulin release by isolated islets of fed and starved rats. *Endocrinology*, 119, 404-7.
- VECCHIONE, C., MAFFEI, A., COLELLA, S., ARETINI, A., POULET, R., FRATI, G., GENTILE, M.T., FRATTA, L., TRIMARCO, V., TRIMARCO, B. & LEMBO, G. (2002). Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*, 51, 168-73.
- WAHREN, J., FELIG, P., CERASI, E. & LUFT, R. (1972). Splanchnic and peripheral glucose and amino acid metabolism in diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 51, 1870-8.
- WANG, P.Y., CASPI, L., LAM, C.K., CHARI, M., LI, X., LIGHT, P.E., GUTIERREZ-JUAREZ, R., ANG, M., SCHWARTZ, G.J. & LAM, T.K. (2008). Upper intestinal lipids trigger a gut-brain-liver axis to regulate glucose production. *Nature*, 452, 1012-6.
- WARD, G.M., MARANGOU, A.G., BEST, J.D., AITKEN, P.M. & ALFORD, F.P. (1989). Effects of short-term pulsatile and continuous insulin delivery on glucagon secretion and insulin secretion and action. *Metabolism*, 38, 297-302.
- WARD, W.K., BOLGIANO, D.C., MCKNIGHT, B., HALTER, J.B. & PORTE, D., JR. (1984). Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 74, 1318-28.
- WATSON, R.T. & PESSIN, J.E. (2001). Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res*, 56, 175-93.
- WATSON, R.T., SHIGEMATSU, S., CHIANG, S.H., MORA, S., KANZAKI, M., MACARA, I.G., SALTIEL, A.R. & PESSIN, J.E. (2001). Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J Cell Biol*, 154, 829-40.
- WEILL, J.H. (2000). *Bioquímica Geral*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- WELLEN, K.E. & HOTAMISLIGIL, G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 115, 1111-9.
- WHITE, M.F. (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia*, 40 Suppl 2, S2-17.
- WHITE, M.F. & KAHN, C.R. (1994). The insulin signaling system. *J Biol Chem*, 269, 1-4.
- WHITE, T.W., SRINIVAS, M., RIPPS, H., TROVATO-SALINARO, A., CONDORELLI, D.F. & BRUZZONE, R. (2002). Virtual cloning, functional expression, and gating analysis of human connexin31.9. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283, C960-70.
- WHITEHEAD, J.P., CLARK, S.F., URSO, B. & JAMES, D.E. (2000). Signalling through the insulin receptor. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 222-8.
- WILDING, J. & WILLIAMS, G. (1998). Diabetes and obesity. In *Clinical Obesity*. eds Kopelman, P.G. & Stock, M.J. pp. 308-349. London: Blackwell Science.
- WILDING, J.P.H. (2003). Obesity and nutritional factors in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. In *Textbook of Diabetes*. eds Pickup, J.C. & Williams, G. pp. 21.1-21.15. Malden: Blackwell Science.
- WINGATE, E.L. & EWART, W.R. (1981). The brain-gut axis. In *Textbook of Gastroenterology*. eds Yamada, T., Alpers, D.H., Owyang, C., Powell, D.W. & Silverstein, F.E. Philadelphia: B. Lippincott Co.
- WITHERS, D.J., GUTIERREZ, J.S., TOWERY, H., BURKS, D.J., REN, J.M., PREVIS, S., ZHANG, Y., BERNAL, D., PONS, S., SHULMAN, G.I., BONNER-WEIR, S. & WHITE, M.F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391, 900-4.

- WOLLHEIM, C.B. (2000). Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in type II diabetes. *Diabetologia*, 43, 265-77.
- WOOD, I.S. & TRAYHURN, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*, 89, 3-9.
- WRIGHT, G.L., MORRISON, R., FULTZ, M.E., WRIGHT, G., MCCUMBEE, W., WEHNER, P. & STUDENY, M. (2003). Effect of fasting on vascular contractility in lean and obese Zucker rats. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 22, 359-363.
- WU, C.C. & BOHR, D.F. (1990). Role of endothelium in the response to endothelin in hypertension. *Hypertension*, 16, 677-81.
- XIE, H. & LAUTT, W.W. (1995a). Induction of insulin resistance by cholinergic blockade with atropine in the cat. *J Auton Pharmacol*, 15, 361-9.
- XIE, H. & LAUTT, W.W. (1996a). Insulin resistance caused by hepatic cholinergic interruption and reversed by acetylcholine administration. *Am J Physiol*, 271, E587-92.
- XIE, H. & LAUTT, W.W. (1996b). Insulin resistance of skeletal muscle produced by hepatic parasympathetic interruption. *Am J Physiol*, 270, E858-63.
- XIE, H. & LAUTT, W.W. (1994). Insulin resistance produced by hepatic denervation or muscarinic cholinergic blockade. *Proc West Pharmacol Soc*, 37, 39-40.
- XIE, H. & LAUTT, W.W. (1995b). M1 muscarinic receptor blockade causes insulin resistance in the cat. *Proc West Pharmacol Soc*, 38, 83-4.
- XIE, H., TSYBENKO, V.A., JOHNSON, M.V. & LAUTT, W.W. (1993). Insulin resistance of glucose response produced by hepatic denervations. *Can J Physiol Pharmacol*, 71, 175-8.
- XIE, H., ZHU, L., ZHANG, Y.L., LEGARE, D.J. & LAUTT, W.W. (1996). Insulin sensitivity tested with a modified euglycemic technique in cats and rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 35, 77-82.
- YAMAGUCHI, N. (1992). Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. *Can J Physiol Pharmacol*, 70, 167-206.
- YANG, Q., GRAHAM, T.E., MODY, N., PREITNER, F., PERONI, O.D., ZABOLOTNY, J.M., KOTANI, K., QUADRO, L. & KAHN, B.B. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, 436, 356-62.
- YANG, Y.S., LI, X.Y., HONG, J., GU, W.Q., ZHANG, Y.F., YANG, J., SONG, H.D., CHEN, J.L. & NING, G. (2007). Interleukin-18 enhances glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrine*, 32, 297-302.
- YIP, R.G. & GOODMAN, H.M. (1999). Growth hormone and dexamethasone stimulate lipolysis and activate adenylyl cyclase in rat adipocytes by selectively shifting Gi alpha2 to lower density membrane fractions. *Endocrinology*, 140, 1219-27.
- YKI-JARVINEN, H. (2003). Insulin resistance in type 2 diabetes. In *Textbook of Diabetes*. eds Pickup, J.C. & Williams, G. pp. 22.1-22.19. Malden: Blackwell Science.
- YKI-JARVINEN, H. (1984). Sex and insulin sensitivity. *Metabolism*, 33, 1011-5.
- YKI-JARVINEN, H., HELVE, E. & KOIVISTO, V.A. (1987). Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes. *Diabetes*, 36, 892-6.
- YOUNG, M.E. & LEIGHTON, B. (1998). Evidence for altered sensitivity of the nitric oxide/cGMP signalling cascade in insulin-resistant skeletal muscle. *Biochem J*, 329, 73-9.
- YOUNG, M.E., RADDA, G.K. & LEIGHTON, B. (1997). Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem J*, 322 (Pt 1), 223-8.
- YSI (2001). *Yellow Springs Instrument: Glucose Analyzer Operations Manual*. Yellow Springs: YSI Inc.
- YUAN, M., KONSTANTOPOULOS, N., LEE, J., HANSEN, L., LI, Z.W., KARIN, M. & SHOELSON, S.E. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*, 293, 1673-7.
- YUASA, H., MATSUDA, K. & WATANABE, J. (1993). Influence of anesthetic regimens on intestinal absorption in rats. *Pharm Res*, 10, 884-8.
- ZECCHIN, H.G., PRIVIERO, F.B.M., SOUZA, C.T., ZECCHIN, K.G., PRADA, P.O., CARVALHEIRA, J.B.C., VELLOSO, L.A., ANTUNES, E. & SAAD, M.J.A. (2007). Defective Insulin and Acetylcholine Induction of Endothelial Cell-Nitric Oxide Synthase Through Insulin Receptor Substrate/Akt Signaling Pathway in Aorta of Obese Rats. *Diabetes*, 56, 1014-1024.

- ZHANG, B., SALITURO, G., SZALKOWSKI, D., LI, Z., ZHANG, Y., ROYO, I., VILELLA, D., DIEZ, M.T., PELAEZ, F., RUBY, C., KENDALL, R.L., MAO, X., GRIFFIN, P., CALAYCAY, J., ZIERATH, J.R., HECK, J.V., SMITH, R.G. & MOLLER, D.E. (1999). Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*, 284, 974-7.
- ZHANG, F., YE, C., LI, G., DING, W., ZHOU, W., ZHU, H., CHEN, G., LUO, T., GUANG, M., LIU, Y., ZHANG, D., ZHENG, S., YANG, J., GU, Y., XIE, X. & LUO, M. (2003). The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. *Exp Anim*, 52, 401-7.
- ZHAO, A.Z., BORNFELDT, K.E. & BEAVO, J.A. (1998). Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J Clin Invest*, 102, 869-73.
- ZHAO, F.Q. & KEATING, A.F. (2007). Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics*, 8, 113-28.
- ZHOU, Q., DOLAN, P.L. & DOHM, G.L. (1999). Dephosphorylation increases insulin-stimulated receptor kinase activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. *Mol Cell Biochem*, 194, 209-16.
- ZIERATH, J.R., FREVERT, E.U., RYDER, J.W., BERGGREN, P.O. & KAHN, B.B. (1998). Evidence against a direct effect of leptin on glucose transport in skeletal muscle and adipocytes. *Diabetes*, 47, 1-4.
- ZUCKER, L.M. (1965). Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Ann N Y Acad Sci*, 131, 447-58.