



JULIANA CRISTINE ROVANI RODRIGUES

**PAPEL DA TRANSIDROGENASE DE NUCLEOTÍDEO DE NICOTINAMIDA
MITOCONDRIAL (NNT) SOBRE A HOMEOSTASE GLICÊMICA E LIPÍDICA:
ESTUDO EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM C57BL6**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



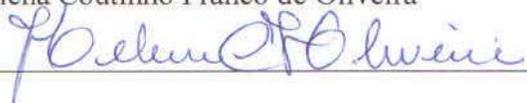
JULIANA CRISTINE ROVANI RODRIGUES

**PAPEL DA TRANSIDROGENASE DE NUCLEOTÍDEO DE NICOTINAMIDA
MITOCONDRIAL (NNT) SOBRE A HOMEOSTASE GLICÊMICA E LIPÍDICA:
ESTUDO EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM C57BL6**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Funcional e Molecular, na Área de Fisiologia.

Orientadora: Helena Coutinho Franco de Oliveira

Este exemplar corresponde á versão final da dissertação defendida pela aluna Juliana Cristine Rovani Rodrigues, e orientada pela Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira



CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R769p Rovani, Juliana Cristine, 1988-
Papel da transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida mitocondrial (NNT) sobre a homeostase glicêmica e lipídica : estudo em camundongos da linhagem C57BL6 / Juliana Cristine Rovani Rodrigues. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Helena Coutinho Franco de Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida. 2. Obesidade. 3. Resistência à insulina. I. Oliveira, Helena Coutinho Franco de, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The role of nicotinamide nucleotide transhydrogenase mitochondrial (NNT) on the glycemic homeostasis and lipidic : study in C57BL6 mice

Palavras-chave em inglês:

Nicotinamide nucleotide transhydrogenase

Obesity

Insulin resistance

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Helena Coutinho Franco de Oliveira [Orientador]

Everardo Magalhães Carneiro

Tiago Rezende Figueira

Data de defesa: 14-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 14 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira
(orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Everardo Magalhaes Carneiro



Assinatura

Dr. Tiago Rezende Figueira



Assinatura

Profa. Dra. Emerielle Cristine Vanzela



Assinatura

Prof. Dr. Roger Frigério Castilho



Assinatura

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Metabolismo de Lípidos** da Área de Fisiologia e Biofísica do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – **UNICAMP**, com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**Fapesp**, processos 2011/14521-7, 2011/50400-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**, processo 304532/2010-0), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT – Obesidade e Diabetes (CNPq e Fapesp), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) – Programa de Pós - graduação em Biologia Funcional e Molecular da UNICAMP.

ABSTRACT

The nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) catalyses the production of NADPH, that is consumed by the mitochondrial antioxidant enzymatic system. Previous studies have shown that NNT mutation causes redox abnormalities in mitochondria and alterations in glucose and lipid metabolism in C57BL6/J mice from The Jackson Laboratory. Metabolic syndrome is characterized by an association of cardio-metabolic disturbances such as visceral obesity, dyslipidemias, glucose intolerance and/or insulin resistance and hypertension. Caloric restriction has been recommended to prevent or treat such metabolic disturbances. Synthetic compounds have been tested as putative mimetic for caloric restriction. The 2,4 dinitrophenol (DNP) is one of this drugs that increase the metabolic rates due to a reduction in the oxidative phosphorylation efficiency and elevation of oxidative metabolism. In this study we demonstrated that mice that carry a NNT gene mutation (B6-J) exhibit increased visceral adiposity, increased liver triglyceride content, glucose intolerance, insulin resistance, and insulin hypersecretion, when compared to control mice with functional NNT. In face of these disturbances, mutant B6-J mice were submitted to a food restriction (FR) or treatment with DNP during 3 months. We observed that B6-J mutant mice under FR present a reduction in adiposity and liver steatosis, improvement of glucose tolerance and insulin resistance and normalization of insulin secretion. After DNP treatment, B6-J mice showed no alterations in lipid disturbances but improved insulin resistance and insulin secretion. These findings suggest that 1- the mouse substrain that carries NNT mutation is predisposed to develop metabolic syndrome, 2- both

treatments, FR and DNP, correct, at least partially, the metabolic disturbances of B6-J mutant mice, and 3- FR treatment was more effective than DNP.

Key words: nicotinamide nucleotide transhydrogenase, obesity and insulin resistance.

RESUMO

A transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida mitocondrial (NNT) é a principal fonte geradora de NADPH da organela, o qual é utilizado pelo sistema antioxidante das mitocôndrias. Estudos prévios mostraram que a mutação nessa enzima está associada a alterações do estado redox de mitocôndrias e alterações do metabolismo glicídico e lipídico em animais C57BL6/J provenientes do Jackson Laboratory (B6-J). A síndrome metabólica é caracterizada pela presença de no mínimo três distúrbios cardio-metabólicos associados dentre obesidade visceral, dislipidemia, intolerância à glicose e/ou resistência à insulina e hipertensão. A restrição calórica tem sido indicada para prevenir e tratar estes distúrbios metabólicos. Compostos sintéticos têm sido testados como potenciais miméticos da restrição calórica. O 2,4-dinitrofenol (DNP) é uma droga que aumenta o gasto energético por provocar redução da eficiência da fosforilação oxidativa e aumentar o metabolismo oxidativo. Neste trabalho, demonstramos que camundongos com mutação no gene da NNT (B6-J) apresentaram aumento de adiposidade visceral, aumento do teor de triglicérides hepático, intolerância à glicose, resistência à insulina e hipersecreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas isoladas e in vivo, quando comparados aos camundongos que tem a NNT intacta (B6-UNI). Diante destes distúrbios metabólicos, submetemos os animais à restrição alimentar (RA) ou ao tratamento com DNP durante 3 meses. Observamos que os animais B6-J sob RA apresentaram redução da adiposidade, esteatose hepática corrigida, melhora da resistência à insulina e diminuição da secreção de insulina. Por outro lado, o tratamento com DNP nos animais B6-J não modificou o metabolismo lipídico, reduziu a insulinemia de jejum e a secreção de insulina e melhorou a sensibilidade periférica à

insulina, mas não alterou a tolerância à glicose. Concluímos que a linhagem portadora da deleção do gene da NNT tem maior predisposição à síndrome metabólica, e que, ambos os tratamentos de RA e DNP corrigiram, pelo menos parcialmente, os distúrbios metabólicos dos animais B6-J, sendo que a RA foi mais efetiva que o DNP.

Palavras chave: transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida, obesidade e resistência à insulina.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	15
AGRADECIMENTOS	17
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE FIGURAS	21
LISTA DE ABREVIATURAS	25
INTRODUÇÃO	27
Transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida	27
Síndrome metabólica e Obesidade	29
Restrição calórica	31
JUSTIFICATIVA	34
OBJETIVO	37
MATERIAIS E MÉTODOS	38
RESULTADOS	46
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	88
1. Resumo da literatura sobre NNT e homeostase glicêmica e adiposidade em linhagens de camundongos	89
2. Resumo apresentado no XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia 2013 como finalista ao prêmio Álvaro Ozório de Almeida em	90

07/09/2013, Ribeirão Preto/SP

- | | |
|--|----|
| 3. Resumo do artigo publicado | 91 |
| 4. Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal | 92 |

Dedicatória

Ao Tiago, meu marido, e aos meus pais, Sebastiana e Nelson,
pelo apoio e incentivo.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a concretização de uma importante etapa em minha vida.

Agradeço às agências brasileiras de fomento Fapesp, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

À minha orientadora, Profa. Helena Coutinho Franco de Oliveira pela paciência e constante contribuição no meu amadurecimento científico.

Aos professores Everardo M. Carneiro, Antonio C. Boschiero e todos os alunos e pesquisadores do laboratório de Pâncreas Endócrino.

Aos co-autores Gabriel Dorighello, Jean Vettorazzi e Luiz Rezende pela ajuda durante a execução dos experimentos e pelo conhecimento teórico.

Aos meus amigos do laboratório 15, Adriene Paiva, Alessandro Salerno, Amarylis Wanschel, Estela Lorza, Gabriel Dorighello, Helena Raposo, Mônica Poleti e Thiago Rentz, pela ajuda e colaboração na execução dos experimentos, troca de conhecimentos e companheirismo fora e dentro do laboratório.

Aos funcionários da Unicamp, especialmente Andréia A. Vigilato e Marise M. Carnelossi por estarem dispostas a ajudar.

Ao meu marido e família pela dedicação, paciência e carinho.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Consumo e eficiência alimentar e parâmetros morfométricos e plasmáticos de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).....	46
Tabela 2: Concentrações plasmáticas de lipídios, proteínas totais e adipocinas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).....	50
Tabela 3: Glicemia, insulinemia e peptídeo C de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).....	51
Tabela 4: Consumo e eficiência alimentar e parâmetros morfométricos e plasmáticos de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados ad libitum (ADL), submetidos à restrição alimentar (RA) e tratamento com 2,4-dinitrofenol (DNP) por 3 meses	58
Tabela 5: Concentrações plasmáticas de lipídios, proteínas totais e adipocinas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados ad libitum (ADL), submetidos à restrição alimentar (RA) e tratamento com 2,4-dinitrofenol (DNP) por 3 meses	63

Tabela 6: Glicemia, insulinemia e peptídeo C de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados ad libitum (ADL), submetidos à restrição alimentar (RA) e tratamento com 2,4-dinitrofenol (DNP) por 3 meses64

Tabela 7: Resumo dos resultados obtidos nas duas sub-linhagens de animais C57BL6 (B6-UNI e B6-J) e suas respostas aos tratamentos com restrição alimentar (RA) ou com 2,4 dinitrofenol (DNP).....70

Lista de Figuras

- Figura 1:** Teor de triglicérides (A) e colesterol (B) no fígado de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).....47
- Figura 2:** Composição corporal de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).48
- Figura 3:** Taxa metabólica corporal de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) no período escuro em estado alimentado49
- Figura 4:** Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e peptídeo C durante o GTT de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).....52
- Figura 5:** Teste de Tolerância à Insulina (ITT) em camundongos C57BL6/J com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).53
- Figura 6:** Secreção (A) e conteúdo (B) de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).....54
- Figura 7:** Curvas representativas das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em resposta à estimulação com a glicose55

Figura 8: Marcadores de estresse oxidativo de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).....56

Figura 9: Teor de triglicérides (A) e colesterol (B) no fígado de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP).....59

Figura 10: Composição corporal de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP)60

Figura 11: Taxa metabólica corporal do período escuro de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP).61

Figura 12: Taxa metabólica corporal do período escuro de camundongos C57BL6 com NNT mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP).62

Figura 13: Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e peptídeo C durante o GTT de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP).....66

Figura 14: Teste de Tolerância à Insulina (ITT) em camundongos C57BL6/J com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP).67

Figura 15: Marcadores de estresse oxidativo de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP).68

Lista de abreviaturas

ADL: *ad libitum*

AGL: ácidos graxos livres

AKT: é conhecida como protein quinase B

AMPK: *AMP-activated protein kinase*

ATP: *adenosine triphosphate*

B6-J: linhagem C57BL6 proveniente do CEMIB com a NNT mutada

B6-UNI: linhagem C57BL6 proveniente do Jackson Laboratory com NNT intacta

CEMIB: centro multidisciplinar da investigação biológica em animais de laboratório

COL: colesterol

DNA: *deoxyribonucleic acid*

DNP: 2,4-dinitrofenol

EE: gasto energético

EROS: espécies reativas de oxigênio

FOX: *forkhead protein*

GLUT-4: transportador de glicose

GSH: glutationa reduzida

GSSG: glutationa oxidada

GTT: glucose tolerance test

GWA: *genome-wide analysis*

HDL: *high density lipoprotein*

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HOMA-IR: *homeostasis model assessment of insulin resistance*

ICDH: isocitrato desidrogenase

IMC: índice massa corporal

ITT: insulin tolerance test

LDL: *low density lipoprotein*

ME2: enzima málica 2 mitocôndria

NAD⁺: *nicotinamide adenine dinucleotide*
NADH: *nicotinamide adenine dinucleotide reduced*
NADP: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NADP⁺: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NADPH: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced*
NF-κβ: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell*
NNT: *nicotinamide nucleotide transhydrogenase*
OMS: *organização mundial da saúde*
p53: *proteína de massa molecular 53 kDa supressora de tumor*
PGC1α: *PPARγ-coativator-1α*
Plagl-1: *pleiomorphic adenoma gene like I*
PPARα: *peroxissome proliferator activated receptors*
QTL: *quantitative trait locus*
RA: *restrição alimentar*
RNAi: *RNA de interferência*
RQ: *coeficiente respiratório*
SIRT1: *sirtuína 1*
SM: *síndrome metabólica*
SNPs: *single nucleotide polymorphisms*
TBARs: *thiobarbituric acid reactive substances*
TG: *triglicérides*
TNF-α: *fator de necrose tumoral alfa*
UCP: *uncoupling protein*
VO₂: *volume de oxigênio*
VCO₂: *volume de dióxido de carbono*
ZFV: *Zentralinstitut fur Versuchstierzucht*

INTRODUÇÃO

Transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida

A transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida (NAD(P)-transidrogenase, EC 1.6.1.1, NNT) é uma enzima que foi descoberta em 1951 em extratos de bactérias e, em seguida, em preparações de membranas de mitocôndria coração (Rydstrom et al, 1976; Rydstrom, 1977). A enzima é um homodímero e cada subunidade dessa proteína é composta por 3 principais domínios: o primeiro e o terceiro domínio se encontram na matriz mitocondrial e contém sítios de ligação para o NADH e NADPH respectivamente, enquanto que o segundo domínio consiste de 14 hélices transmembranas e contém o canal de próton (Arkblad et al, 2002). A enzima NNT está localizada na membrana mitocondrial interna, e por meio do gradiente de próton, catalisa a transferência reversível de hidreto de NADH para NADP^+ de acordo com a reação: $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$, deslocando o equilíbrio da reação no sentido da formação de NADPH (Earle et al, 1978; Pedersen et al, 2008). Estima-se que a NNT seja a fonte principal de NADPH na mitocôndria, e que representa até 45% do fornecimento de NADPH total da célula, sendo o restante resultante da via das pentoses-fosfato, NADP isocitrato-desidrogenase (NADP^+ -ICDH) e NAD(P)- enzima málica mitocondrial (ME2) (Sauer et al, 2004; Vogel et al, 1999). Por re-reduzir NADP a partir de NADH, a NNT é considerada o principal gerador de poder redutor do sistema enzimático antioxidante mitocondrial (Kowaltowski et al, 2001). Diminuição de NADPH causa diminuição da razão GSH/GSSG, tornando o ambiente mitocondrial mais susceptível a danos induzidos por espécies reativas de oxigênio (EROS) (Arkblad et al, 2005). *Caenorhabditis elegans* deficientes de NNT, através de mutações ou silenciamento por RNA de interferência (RNAi), mostraram ser mais sensíveis

ao estresse oxidativo devido a uma redução na razão GSH/GSSG (Arkblad et al., 2005). Silenciamento da NNT em células PC12 por RNAi resultou na redução dos níveis de NADPH celular, alteração no estado redox demonstrada pela redução na razão GSH/GSSG e aumento nos níveis de H₂O₂ (Yin et al., 2012). Um estudo mostrou que os camundongos C57BL6/J, oriundos do *Jackson Laboratory* em Bar Harbor, diferem de outras linhagens C57BL6 por possuírem mutações naturais espontâneas no gene da NNT, surgida entre 1976 e 1984, causando níveis extremamente baixos de sua expressão observada no fígado e pâncreas. Os autores propuseram que a deficiência nesta enzima desencadeou um prejuízo na homeostase glicêmica, caracterizado por intolerância à glicose e secreção de insulina reduzida (Toye et al, 2005). Freeman e colaboradores (2006) propõem que a deleção do gene da NNT afeta a produção de NADPH tornando o ambiente mitocondrial susceptível às EROS, ativando UCP2, reduzindo assim a síntese de ATP (Freeman et al, 2006a). Em outro estudo foi verificado que, os animais com NNT mutada apresentaram menor adiposidade (e hipoinsulinemia) em dieta com baixo teor de gordura (10%), porém desenvolveram maior adiposidade (e normoinsulinemia) em dieta rica em gordura (60%) (Nicholson et al, 2010). Recentemente, Ronchi e colaboradores (2013) mostraram que a deleção da NNT resulta em anormalidades no estado redox mitocondrial indicando que, apesar da respiração mitocondrial de repouso e no estado de fosforilação serem similares nas mitocôndrias com e sem NNT, a capacidade antioxidante das mitocôndrias mutantes está significativamente comprometida e a produção de espécies reativas de oxigênio está aumentada. Recentemente, um estudo em humanos mostrou que mutação do gene da NNT pode ser causa da deficiência de glicocorticóides familiar (Meimaridou et al, 2012).

Como trata-se de enzima mitocondrial essencial para o balanço redox da organela, acreditamos que sua deficiência pode comprometer outras funções bioenergéticas celulares e do organismo como um todo.

Síndrome metabólica e Obesidade

A síndrome metabólica (SM) está associada à morbidade e mortalidade da população mundial, sendo correlacionada diretamente com os distúrbios cardiometabólicos, tais como intolerância à glicose, resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemias, hipertensão, obesidade, os quais predispõe para desenvolvimento de aterosclerose (Eckel et al, 2005). Indivíduos que apresentam no mínimo três desses distúrbios são diagnosticados como portadores de SM. A dislipidemia presente na SM e na obesidade se caracteriza por altos níveis de triglicerídeos e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e níveis reduzidos de lipoproteínas de alta densidade (HDL), um perfil lipídico altamente aterogênico (Steinberger et al, 2009). O diabetes tipo 2 é uma doença metabólica cuja frequência vem crescendo rapidamente no mundo e é caracterizada pela insuficiência das células β pancreáticas em secretarem insulina e/ou pela resistência à ação da insulina no fígado, músculo e tecido adiposo. No diabetes tipo 2, as células β inicialmente aumentam a síntese e secreção de insulina frente ao aumento da glicemia, que resulta de incapacidade dos tecidos periféricos em captar glicose (resistência à insulina). A longo prazo, esta demanda pode desencadear um estresse celular, exaustão e falência das células β pancreáticas (Butler et al 2003; Ashcroft and Rorsman, 2012).

A obesidade é um dos principais distúrbios da SM e, em estudos recentes, também tem sido correlacionada com as doenças cardiovasculares (Van Gaal et al, 2006; Mathieu et al, 2009). A incidência da obesidade no mundo vem crescendo drasticamente. A

Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 1 bilhão de adultos no mundo estão com sobrepeso, sendo 300 milhões caracterizados clinicamente como obesos, isto é, apresentando um índice de massa corporal (IMC) igual ou maior que 30 (World Health Organization, 2002). A obesidade é geralmente associada à resistência à insulina (Abbasi et al, 2002), inflamação (Greenberg et al, 2006; Tuncman et al, 2006; Weisberg et al, 2003) e estresse oxidativo (Hulsmans et al, 2011; Perticone et al, 2001). Em excelente revisão bibliográfica, Beltowski (2006) descreveu como a obesidade pode estar diretamente ligada à aterosclerose. Concentrações excessivas de leptina, hormônio secretado pelo tecido adiposo, exercem potentes efeitos aterogênicos, tais como, disfunção endotelial, estímulo à reação inflamatória, estresse oxidativo, agregação plaquetária, diminuição da atividade da paraoxonase, e migração, hipertrofia e proliferação das células do músculo liso vascular. Os adipócitos, especialmente os hipertrofiados, secretam adipocitocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (Matsuzawa, 2006).

Atualmente as condições de estresse oxidativo e de inflamação são consideradas eventos moleculares centrais da síndrome metabólica, uma vez que estão presentes nos diversos distúrbios que constituem esta síndrome (Hotamisligil, 2006). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre estado pró-oxidante e capacidade antioxidante, resultando em acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS). Estas EROS podem ser geradas durante a redução do oxigênio molecular em reações enzimáticas (ex.: sistemas da NADPH oxidase, xantina oxidase, lipoxigenase e ciclooxigenase, etc.), no transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial e por auto-oxidação de diversos compostos (Halliwell and Gutteridge, 1985). As mitocôndrias representam uma das maiores fontes intracelulares de EROS (St-Pierre et al, 2002; Starkov et al, 2004). As EROS são moléculas que, em condições fisiológicas, desempenham funções importantes para as células, tais

como, regulação da expressão gênica, transdução de sinais, aumento da velocidade de metabolismo de macronutrientes, entre outros (Hamanaka and Chandel, 2010). Em indivíduos saudáveis, as EROS são mantidas em níveis adequados devido ao equilíbrio entre sua produção e eliminação por enzimas (superóxido dismutase, glutathione redutase e peroxidase, catalase, entre outras) e compostos não-enzimáticos (ex: vitaminas C, E e outros) (Lassègue and Griendling, 2010; Cavalca et al, 2009; Azumi et al, 2002; Folli et al, 2011). Em condições patológicas e de estresse celular, verifica-se que o excesso de EROS pode causar danos moleculares que podem levar à morte celular (Hamanaka and Chandel, 2010).

Restrição calórica

A redução moderada na ingestão calórica (20 a 40%) tem sido correlacionada com o retardo do envelhecimento e diminuição da incidência de doenças crônicas relacionadas com o avanço da idade (Masoro, 2000). As primeiras evidências relacionando a restrição calórica e o aumento da longevidade foram apresentadas em meados de 1930, quando McCay e colaboradores (McCay et al, 1989) observaram que roedores com ingestão alimentar restrita viveram mais que animais que se alimentavam *ad libitum*. Efeitos similares também foram posteriormente demonstrados em vermes, fungos, peixes e ratos (Lin et al, 2000; Heilbronn and Ravussin, 2003). Estudos em humanos indicaram que alguns marcadores do envelhecimento, como glicemia sanguínea, pressão arterial e colesterol plasmático foram melhorados com dietas de restrição calórica (Verdery and Walford, 1998; Walford et al, 1992; Walford et al, 2002). Evidências sugerem que a perda de peso ocasionada pela restrição calórica pode ser um meio eficaz de melhorar a

sensibilidade à insulina, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de diabetes mellitus (Blanc et al, 2003; Bodkin et al, 2003).

Do ponto de vista molecular, a redução de aporte energético gera profundas mudanças metabólicas (mobilização de glicogênio e gordura, gliconeogênese, cetogênese e possivelmente termogênese), alterações nas concentrações hormonais (insulina, glucagon, adipocinas, glicocorticóides e etc) e variações nos níveis/atividades de proteínas reguladoras (PPAR α , coativador-1 α de PPAR α (PGC1 α), proteína forkhead (FOX), sirtuína 1 (SIRT1) e proteínas desacopladoras (UCP) (Bordone and Guarente, 2005). As sirtuínas são enzimas que têm sido relacionadas com aumento da expectativa de vida dos mamíferos (Haigis and Guarente, 2006; Guarente, 2006). Estudos anteriores já demonstraram a indução da SIRT1 após a restrição calórica (Fulco et al, 2003; Nisoli et al, 2005). A SIRT1 pode desacetilar um grande número de substratos, incluindo p53 (proteína de massa molecular 53 kDa supressora de tumor), Ku70 (proteína envolvida na recombinação não homóloga durante reparo do DNA), NF- κ B (fator nuclear kappa B), FOXO (proteína forkhead), que estão relacionados com a resistência celular ao estresse (Haigis and Guarente, 2006). A SIRT1 também regula as atividades do PPAR α e PGC1- α influenciando a diferenciação das células musculares, a adipogênese e a deposição de gordura no tecido adiposo branco e também o metabolismo hepático (Rodgers et al, 2005). Além disso, a super-expressão da SIRT1 resulta em aumento de secreção de insulina em resposta à glicose (Moynihan et al, 2005).

A restrição calórica também tem sido diretamente correlacionada com a diminuição do estresse oxidativo (Barja, 2004; Gredilla et al, 2001; Sohal and Weindruch, 1996). Segundo Barja, a restrição calórica diminui a taxa de geração de oxigênio reativo mitocondrial, tendo muitos efeitos benéficos sobre o cérebro de roedores e humanos (Barja,

2004). A restrição calórica em roedores, especialmente em ratos, causou uma diminuição na geração de EROS mitocondrial em fígado, cérebro, coração, e músculo esquelético (Gredilla et al, 2001; Lopez-Torres et al, 2002; Sanz et al, 2005, Bevilacqua, 2005). A restrição calórica promove redução de EROS por aumentar a velocidade de respiração mitocondrial (Guarente, 2008; Skulachev, 1998).

Compostos sintéticos têm sido apontados como potenciais miméticos da restrição calórica. O 2,4-dinitrofenol (DNP) é um derivado de benzeno utilizado pela primeira vez na fabricação de munições na França durante a I Guerra Mundial, tendo causado intoxicação e óbitos nos trabalhadores envolvidos com sua manipulação (Colman, 2007). Em 1932, o potencial do dinitrofenol como um agente anti-obesidade foi testado em animais e em seres humanos obesos, tendo alcançado popularidade como potente agente terapêutico. No entanto, somente após inúmeros relatos dos efeitos colaterais, sendo alguns irreversíveis (catarata, toxicidade hepática, renal, cardíaca, muscular e neurológica) em 1938, ocorreu a proibição de seu uso terapêutico (Colman, 2007). De acordo com a literatura, existe apenas uma pequena margem que separa os seus efeitos benéficos dos tóxicos. Dentre estes efeitos tóxicos, os neurológicos mais comuns em humanos são agitação, confusão mental, convulsão e coma (Masserman and Goldsmith, 1934 *apud* Grundlingh et al, 2011).

O DNP funciona como um desacoplador mitocondrial (ionóforo de prótons) permitindo a passagem dos prótons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, desfazendo o gradiente de prótons que é utilizado pela ATP sintetase para a fosforilação oxidativa. A dissipação do gradiente de prótons resulta no aumento da velocidade de transporte de elétrons através da cadeia respiratória e, portanto, aumento do consumo de oxigênio, resultando em maior consumo de substratos energéticos (intermediários do ciclo de Krebs) e reduzindo a eficiência da geração de ATP. Em consequência da redução

intracelular de ATP induzida pelo DNP, ocorre ativação da AMPK (Habegger et al, 2012) com conseqüente estimulação de vias catabólicas e inibição de vias anabólicas. Por ser um agente potente catabólico, esta droga ressurgiu, via internet, como droga anti-obesidade nesta última década, sendo que várias mortes foram relatadas por consumo exagerado intencional (*overdose*) entre 2001-2010 (Grundlingh et al, 2011).

Um estudo recente demonstrou que o tratamento de camundongos Swiss com o desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrofenol, em mínimas doses (100 vezes menor que a dose letal para camundongos) causou um desacoplamento mitocondrial brando, redução na produção de EROS mitocondrial no cérebro, fígado e coração, aumento do metabolismo e da longevidade dos animais (Caldeira da Silva et al, 2008). Por isso, o DNP em doses extremamente baixas é considerado como um composto que poderia mimetizar a ação da restrição calórica nas mitocôndrias.

JUSTIFICATIVA

C57BL6/J é uma das linhagens de camundongos mais amplamente usada em pesquisas em metabolismo energético, inclusive para produção de animais geneticamente modificados. Estes animais são modelos responsivos à obesidade, diabetes e aterosclerose induzidas por dieta. Tratamento destes animais com dieta rica em gordura resulta em vários aspectos da síndrome metabólica, a saber, obesidade central, resistência à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia. Os animais C57BL6/J (provenientes do Jackson Laboratory) diferem de outras linhagens C57BL6 por possuírem mutações naturais no gene da NNT que causa níveis extremamente baixos de expressão da enzima no fígado e pâncreas destes animais (Toye et al., 2005). Trata-se de uma mutação que troca uma

metionina por treonina na seqüência líder mitocondrial acoplada a uma deleção de 5 exons (exon 7-11) que remove as 4 hélices dos domínios transmembranas da proteína resultando na tradução de uma proteína truncada inativa (Toye et al., 2005). Estima-se que esta mutação ocorreu entre 1976 e 1984, mas só foi descrita em 2005 (Toye et al., 2005). Acredita-se que a redução da expressão de NNT nas células beta de camundongos C57BL6/J cause redução da secreção de insulina estimulada por glicose nestes animais (Freeman et al., 2006b; Freeman et al., 2006c). Recentemente, Nicholson et al (2010) compararam a adiposidade de duas sub-linhagens C57BL6, com a NNT intacta (C57BL6/NJ) ou mutada (C57BL6/J). Estes autores verificaram uma resposta dependente do tipo de dieta: os animais com NNT mutada apresentaram menor adiposidade em dieta com baixo teor de gordura (10%), porém desenvolveram maior adiposidade em dieta rica em gordura (60%).

Ao contrário dos C57BL6/J do Jackson Laboratory, os camundongos C57BL/6JUnib gerados localmente no CEMIB (Centro Multidisciplinar da Investigação Biológica em Animais de Laboratório) da Unicamp não apresentam a mutação da NNT. Estes foram obtidos do Zentralinstitut für Versuchstierzucht (ZfV), Hannover, Alemanha, em 1987, os quais foram obtidos do Jackson Laboratory em 1971, portanto antes da ocorrência da mutação da NNT.

A restrição calórica é um regime utilizado com o intuito de tratar ou prevenir distúrbios metabólicos, especialmente aqueles relacionados à síndrome metabólica. Além disso, associa-se a restrição calórica a redução de estresse oxidativo e aumento da longevidade. Substâncias miméticas têm sido estudadas atualmente na tentativa de substituir a restrição calórica e gerar adaptações fisiológicas similarmente benéficas para o organismo. O 2,4-dinitrofenol (DNP) é uma droga que induz redução da eficiência da

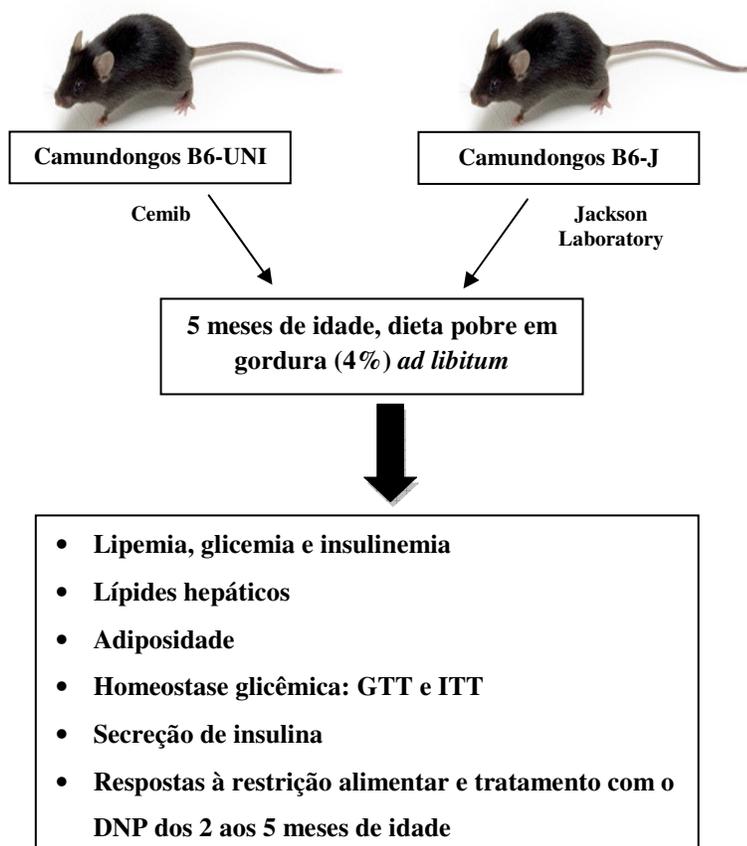
fosforilação oxidativa mitocondrial resultando em maior gasto energético celular. O DNP em doses extremamente baixas é considerado um composto capaz de mimetizar a ação da restrição calórica. Já foi demonstrado que desacoplador mitocondrial (DNP) causa diminuição da produção de EROS mitocondrial no cérebro, fígado e coração, o que também ocorre nos tecidos de animais submetidos à restrição calórica.

Estudos de restrição calórica em camundongos geneticamente hipercolesterolêmicos (knockout do receptor de LDL no background C57BL6/J) realizados em nosso laboratório (Dorighello et al, 2013) mostram que esta manobra alimentar apesar de melhorar a intolerância à glicose, aumenta em 20% a massa adiposa e piora o perfil lipídico aumentando em 40% o colesterol plasmático dos camundongos hipercolesterolêmicos. Por outro lado, o tratamento dos animais hipercolesterolêmicos com o DNP não alterou a homeostase glicêmica e metabolismo lipídico, mas atenuou a aterosclerose nestes animais (Dorighello GG. Tese de Doutorado, 2013, Unicamp). Embora o DNP não possa ser usado como recurso terapêutico devido a sua alta toxicidade, estes resultados servem como “prova de princípio”, apontando que a manipulação de um mecanismo específico de dissipação de energia das mitocôndrias pôde trazer benefícios para os camundongos hipercolesterolêmicos. No entanto, estes camundongos hipercolesterolêmicos, por serem de background C57BL/6J, apresentam além da deficiência de receptor de LDL, a mutação da NNT. Esta mutação tem sido apontada como responsável por variações de respostas metabólicas em animais geneticamente modificados. Assim, neste trabalho verificamos os efeitos da restrição alimentar e do tratamento com baixas doses de DNP em camundongos normolipidêmicos C57BL6 com (Jackson Laboratory) e sem (Cemib) a mutação da NNT.

OBJETIVO

Estudar o papel da transidrogenase mitocondrial (NNT) sobre o perfil metabólico e respostas à restrição alimentar e ao tratamento com 2,4 dinitrofenol. Para tanto, foram comparados camundongos isogênicos da linhagem C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e com a NNT mutada (B6-J) em relação à composição corporal, adiposidade visceral, homeostase glicêmica e lipídica e estresse oxidativo.

FLUXOGRAMA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL



MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos C57BL6/JUnib (B6-UNI) machos oriundos do Centro multidisciplinar de Investigação Biológica em Animais de Laboratório (CEMIB / Unicamp) e camundongos C57BL6/J (B6-J) originalmente provenientes do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME) em 2009, e mantidos no CEMIB. Os protocolos experimentais foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/Unicamp (protocolo nº 2620-1). Os camundongos foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), luminosidade (ciclos de claro e escuro de 12 horas), recebendo água e ração (Nuvital CR1, Colombo, Brasil) *ad libitum*.

Protocolo experimental

Os camundongos com 2 meses de idade foram separados em grupos e submetidos aos diferentes tratamentos de regimes alimentares por 3 meses:

Tratamentos:

Ad libitum (ADL) – ingestão alimentar livre.

Restrição alimentar (RESTRICÇÃO CALÓRICA) – ingestão alimentar dia sim, dia não.

2,4-dinitrofenol (DNP) – ingestão alimentar livre e água de beber contendo 1 mg/L de DNP (Caldeira da Silva et al., 2008).

Ingestão alimentar e ganho ponderal

Os camundongos foram pesados uma vez por semana e o consumo de ração pesado dia-sim-dia-não, durante 3 meses avaliando-se o consumo alimentar cumulativo, ganho de peso e eficiência alimentar. A eficiência foi calculada pelo ganho de peso dividido pelo consumo total multiplicado por 100.

Calorimetria indireta (Respirometria)

A respirometria foi feita em equipamento Oxylet System (Panlab e Harvard Apparatus). Os camundongos com restrição alimentar foram aclimatados 24 horas em estado de jejum, e em seguida suas medidas foram avaliadas no estado alimentado durante 24 horas. Os grupos alimentados ad libitum e tratados com 2,4-dinitrofenol foram aclimatados 24 horas e suas medidas avaliadas por 24 horas em estado alimentado. O software metabolism v2.2.01 forneceu os valores de consumo de oxigênio (VO_2), produção de dióxido de carbono produzido (VCO_2), quociente respiratório (RQ) e gasto energético (EE). Os resultados foram normalizados pela massa corporal dos animais. Esta normalização é crítica para a análise e, embora massas magra e gorda não contribuam da mesma forma para o consumo de oxigênio (Butler and Kozak, 2010), ambas são importantes para a sua determinação (Kaiyala et al, 2010). Neste trabalho optou-se pela normalização por peso corporal, uma vez que se pretendia determinar o consumo de oxigênio do animal como um todo e não apenas de sua massa magra.

Avaliação da massa corporal e tecidual

Os camundongos foram mortos por exsanguinação em estado de jejum e, em seguida, foram coletados o fígado, o tecido adiposo perigonadal, o coração e o cérebro dos camundongos e suas respectivas massas determinadas por gravimetria. Após remoção total

dos órgãos, as carcaças dos animais também foram pesadas. Inicialmente, as carcaças foram desidratadas em estufa durante um período mínimo de 72 horas à temperatura de 50 ± 5 °C (até o peso ficar constante). Após desidratação da carcaça, esta foi colocada em extrator de soxhlet para extração total da gordura com éter de petróleo (Synth®), por um período mínimo de 96 horas (Duivenvoorden et al, 2005). A gordura total foi calculada através da subtração do peso da carcaça seca antes e após a extração com éter de petróleo e a massa magra foi determinada subtraindo-se do peso da carcaça desidratada o peso da gordura total. Os depósitos adiposos e a massa magra foram normalizados pelo peso da carcaça desidratada.

Teor de lipídios no fígado

Os lipídeos totais do fígado foram extraídos utilizando o método de Folch (1957): 2 mL de clorofórmio e 1 mL de metanol para aproximadamente 60 mg de fígado, deixados em repouso durante a noite. O extrato total obtido foi filtrado e seco em capela de exaustão. O extrato lipídico seco foi ressuspenso em 500 µL de tampão contendo triton (0,5 M de KH_2PO_4 , 0,25 M de NaCl, 25 mM de ácido cólico e 0,5% de triton X-100 , pH=7,4) e submetido as reações enzimáticas-colorimétricas para determinação das concentrações de colesterol e triglicérides através de kits da Roche-Hitachi® (Alemanha), conforme instruções do fabricante.

Avaliação da lipidemia, glicemia e proteínas totais

As amostras de sangue dos camundongos foram coletadas pelo plexo retro-orbital com auxílio de capilares heparinizados, centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. O colesterol total (Col) e triglicérides (TG) foram dosados no plasma dos camundongos em

jejum (12h), utilizando-se kits enzimáticos colorimétricos da Roche-Hitachi® (Alemanha). As concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (AGL) foram mensuradas após jejum (12h), utilizando-se kit enzimático colorimétrico da Wako chemical (USA). Os níveis de glicose em jejum (12h) e em estado alimentado foram medidos com auxílio de glicosímetro (Roche- Accu-Chek, Suíça) através da coleta de sangue caudal. As proteínas totais foram dosadas no plasma de camundongos em jejum (12h), utilizando-se kit Laborclin da Biodiagnóstica, conforme as instruções do fabricante.

Avaliação das concentrações plasmáticas de insulina, leptina e adiponectina

As amostras de sangue dos camundongos foram coletadas com o auxílio de capilares heparinizados, centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A insulina, leptina e adiponectina foram dosadas em plasma usando kits de Elisa (Millipore, Billerica, MA, USA), conforme instruções do fabricante.

Teste de tolerância à glicose (GTT)

Os camundongos foram mantidos em jejum por 12 horas e uma amostra de sangue basal foi colhida da ponta da cauda (tempo = 0 min). Em seguida, os animais receberam por via oral (gavagem) uma carga de glicose de 1,5 g/Kg de peso corporal e coletas sanguíneas subsequentes foram realizadas nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos (Merat et al, 1999) para a mensuração da glicose com glicosímetro (Roche- Accu-Chek, Suíça) e de peptídeo C por ELISA (kit da Millipore: Rat/Mouse C-Peptide 2), conforme as instruções do fabricante.

Teste de tolerância à insulina (ITT)

Os camundongos foram mantidos em 12 horas de jejum seguido de 2 horas com alimentação disponível e uma amostra de sangue basal foi colhida da ponta da cauda (tempo = 0 min). A carga de insulina humana (Humulin®R, Lilly, França) de 0,75 U/kg de peso corporal foi injetada intra-peritonealmente e amostras de sangue adicionais foram coletadas em tempos subsequentes determinados: 10, 15, 30 e 60 minutos (Pappan et al., 2005) para a mensuração da glicose em glicosímetro (Roche- Accu-Chek, Suíça).

Isolamento de Ilhotas Pancreáticas e Secreção de Insulina

Os camundongos foram mortos por decapitação e, após incisão abdominal, o ducto pancreático foi exposto e obstruído para evitar a saída de solução de colagenase para o duodeno. Na porção distal do conduto biliar comum foi realizada uma pequena incisão no ducto para introduzir uma agulha de insulina pela qual foi injetado no pâncreas 2 a 3 ml de solução de Hanks com colagenase tipo V (0,8 mg/ml; Sigma). O pâncreas foi retirado da cavidade abdominal por dissecação e transferido para um tubo de 15 ml, o qual foi incubado em banho a 37°C durante 11 min. Ao final deste período foi realizada uma pequena agitação de 30 segundos para facilitar a desagregação do tecido pancreático. A digestão do tecido foi interrompida mediante a adição de Hanks a 4°C. O material foi centrifugado com solução de Hanks 4 vezes para a remoção da colagenase e enzimas digestivas liberadas durante a incubação. As ilhotas, completamente separadas do tecido acinar, foram coletadas uma a uma, sob lupa, por aspiração com o auxílio de pipeta Pasteur, previamente estirada e siliconizada. Em seguida, as ilhotas dos grupos estudados foram transferidas para placas de cultura com 24 poços (10 ilhotas/poço) contendo 1 mL de solução de Krebs suplementada com 0,1% de BSA (m/v) na presença de 2,8 mM de

glicose, pH 7,4. As placas foram acondicionadas a 37°C, e mantidas em ambiente umidificado e gaseificado com 95% O₂/5% CO₂ por 30 min. Após este período a solução foi removida e as ilhotas foram novamente incubadas por 1 hora com nova solução contendo 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose. Parte do meio de incubação foi removido e armazenado em tubos de ensaio à -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (RIE), enquanto as ilhotas remanescentes na placa foram ressuspensas e homogeneizadas em 0,1 ml de tampão EDTA 5% + 1% SDS para avaliação de conteúdo total de insulina e de DNA.

Radioimunoensaio (RIE) para insulina

A secreção de insulina e o conteúdo total de insulina foram quantificados pelo método de RIE (Scott et al, 1981), utilizando-se anticorpo específico para insulina de rato para traçar a curva padrão e insulina recombinante humana marcada com Iodo¹²⁵ (Perkin Elmer). As amostras foram lidas em contador de radiação gama (Automatic Gamma Counter - Perkin Elmer).

Registro das oscilações das concentrações intracelulares de cálcio [Ca²⁺]_i em ilhotas pancreáticas

As ilhotas pancreáticas isoladas dos grupos estudados foram incubadas em 1 mL de Krebs contendo 5,6 mM de glicose durante 1h. Em seguida foi adicionado 5 µM fura-2/AM dissolvido em DMSO (0,1%) e mantido por 1h em estufa gaseificada com 95% O₂/5% CO₂ a 37°C. Posteriormente, uma ilhota foi transferida para uma lâmina de vidro previamente tratada com poli-lisina e perfundida na presença de diferentes estímulos (2,8 mM de glicose e 16,7 mM de glicose). Os registros das oscilações de Ca²⁺ foram obtidos por microscópio

invertido (Nikon UK, Kingston, UK). As ondas excitatórias de 340 e 380 nm (F340 e F380, respectivamente) foram selecionadas por uma fonte de luz de xenônio e a emissão foi captada em 510 nm. A alteração na concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) foi detectada como uma mudança na proporção F340/F380 e os dados foram obtidos utilizando o programa Image Master3 (Photon Technology International). O conteúdo total de Ca^{2+} no citoplasma (área abaixo da curva), a amplitude e número das oscilações (durante a condição estimulatória 16,7 mM de glicose) foram determinados após a adição dos diferentes estímulos.

Avaliação do estresse oxidativo

As amostras de plasma foram coletadas com o auxílio de capilares heparinizados e centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A capacidade antioxidante total foi medida no plasma dos camundongos através do Antioxidant Assay Kit (Cayman Chemical, Washington), conforme instruções do fabricante. O ensaio baseia-se na capacidade do antioxidante presente na amostra em inibir a oxidação do ABTS (2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]), sendo a capacidade antioxidante comparada a do Trolox, um análogo do tocoferol solúvel em água.

As amostras de fígado foram coletadas dos camundongos após a morte por exsanguinação. A quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e do conteúdo de proteínas carboniladas foram medidos no homogenizado do fígado usando TBARS Assay Kit e Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical, Washington) respectivamente, conforme instruções do fabricante.

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm ep (erro padrão). As comparações dos dados dos grupos B6-J e B6-UNI foram analisados por Test t de Student. As comparações dentro de cada grupo após os tratamentos (ad libitum *vs* restrição alimentar *vs* dinitrofenol) foram feitas por Anova One Way. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Os testes foram realizados usando o software Graph Pad Prism 5.

RESULTADOS

Efeito da NNT sobre o perfil metabólico: comparação entre as sub-linhagens B6-J (NNT mutada) e B6-UNI (NNT intacta).

O consumo e eficiência alimentar e parâmetros morfométricos dos camundongos B6-J e B6-UNI estão mostrados na **Tabela 1**. Os camundongos mutantes B6-J apresentaram um consumo alimentar 9% menor que os camundongos B6-UNI, porém apresentaram um ganho de peso corporal e eficiência alimentar similares em relação aos camundongos B6-UNI. Isso ocorreu porque os pesos corporais iniciais aos 2 meses de idade dos animais B6-J eram 8% menores que os dos B6-UNI. Com relação ao peso de órgãos internos, verificamos que os camundongos mutantes B6-J apresentaram redução da massa relativa do fígado e nenhuma alteração nas massas do coração e cérebro (**Tabela 1**).

Tabela 1: Consumo e eficiência alimentar e parâmetros morfométricos de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).

	B6-UNI	B6-J	Test T Student (B6-J vs B6-UNI)
Consumo alimentar cumulativo (g)	352,0±9,62 (17)	320,0±7,03 (15)	p=0,0148
Peso corporal inicial (2 meses) (g)	26±0,6 (16)	24±0,4 (15)	p<0,0058
Peso corporal final (5 meses) (g)	30±0,6 (16)	27±0,4 (15)	p=0,0077
Ganho de peso (g)	5,48±0,19 (17)	5,04±0,28 (15)	n.s.
Eficiência alimentar (%)	1,57±0,06 (17)	1,59±0,10 (15)	n.s.
Fígado (%peso corporal)	4,37±0,10 (15)	3,96±0,06 (13)	p=0,0026
Coração (%peso corporal)	0,55±0,02 (9)	0,58±0,02 (9)	n.s.
Cérebro (%peso corporal)	1,48±0,03 (11)	1,53±0,04 (9)	n.s.

Média±ep(n).

Observamos ainda que o teor hepático de triglicérides (TG) nos animais B6-J estava aumentado em aproximadamente 30% em relação aos B6-UNI (**Figura 1A**), enquanto o teor de colesterol hepático (COL) permaneceu similar entre as duas sub-linhagens (**Figura 1B**), caracterizando uma esteatose hepática nos B6-J.

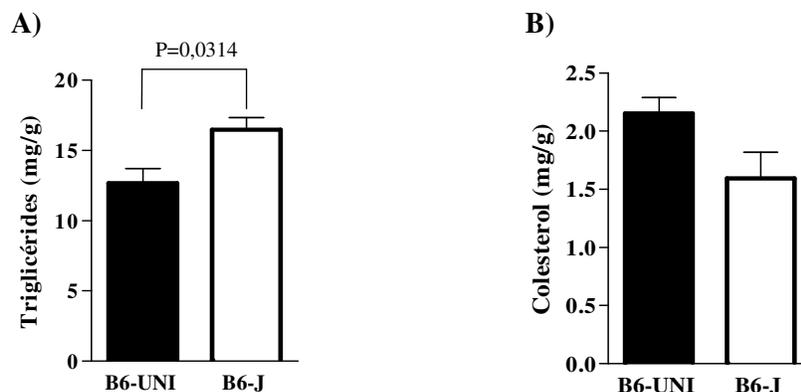


Figura 1: Teor de triglicérides (A) e colesterol (B) no fígado de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J). Média \pm ep (n=5-9). Test t de Student.

A massa adiposa corrigida pelo peso corporal (massa relativa) do depósito de gordura perigonadal estava marcadamente aumentada (75%) nos animais mutantes B6-J quando comparados aos B6-UNI ($p < 0,0001$) (**Figura 2A**). A adiposidade subcutânea foi estimada através da extração de gorduras totais da carcaça dos animais. Como mostrado na **Figura 2B**, observamos que os grupos B6-J e B6-UNI não apresentaram diferenças significativas na massa adiposa da carcaça. Os animais mutantes B6-J apresentaram ainda uma redução significativa de 12% da massa magra (**Figura 2C**). Isso está de acordo com as diferenças de peso corporal observadas entre as sub-linhagens, isto é, menor peso corporal dos animais.

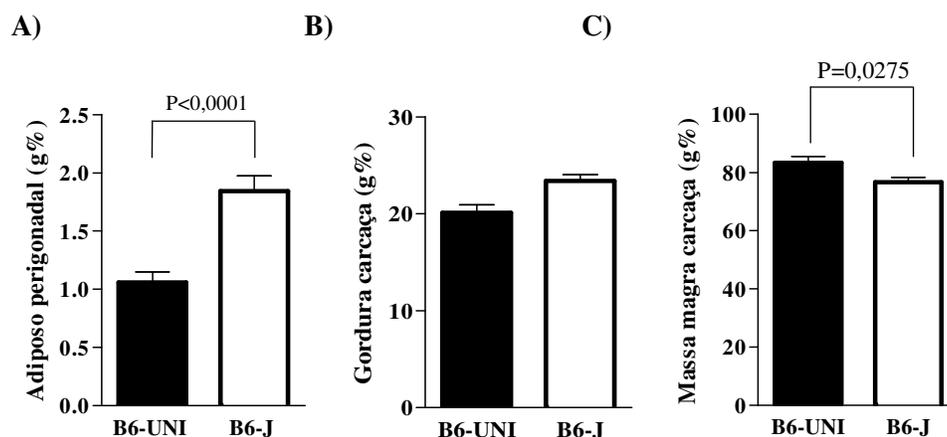


Figura 2: Composição corporal de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J). Painel A: massa relativa do tecido adiposo perigonadal. Painel B: gordura da carcaça. Painel C: massa magra da carcaça. Média±ep (n=7-18). Test t de Student.

Indicadores de metabolismo corporal dos animais foram determinados indiretamente através da calorimetria realizada durante 24 horas com oferta de ração (**Figura 3**). Foram consideradas as avaliações feitas durante o período noturno, correspondente ao período de atividade e alimentação dos animais. Os camundongos B6-J apresentaram velocidades de consumo de oxigênio, produção de CO₂ e gasto energético significativamente reduzidos quando comparados aos animais B6-UNI (**Figura 3A, 3B e 3C**). Estes resultados estão de acordo com a redução de massa magra e aumento da massa adiposa observadas nos animais B6-J. Os valores do quociente respiratório foram semelhantes entre as duas sub-linhagens (**Figura 3D**), indicando que os animais estão utilizando a mesma proporção de substratos energéticos provenientes de lipídios e carboidratos (média no período noturno de 0,88 ±0,001 e 0,85±0,006 para B6-J e B6-UNI, respectivamente).

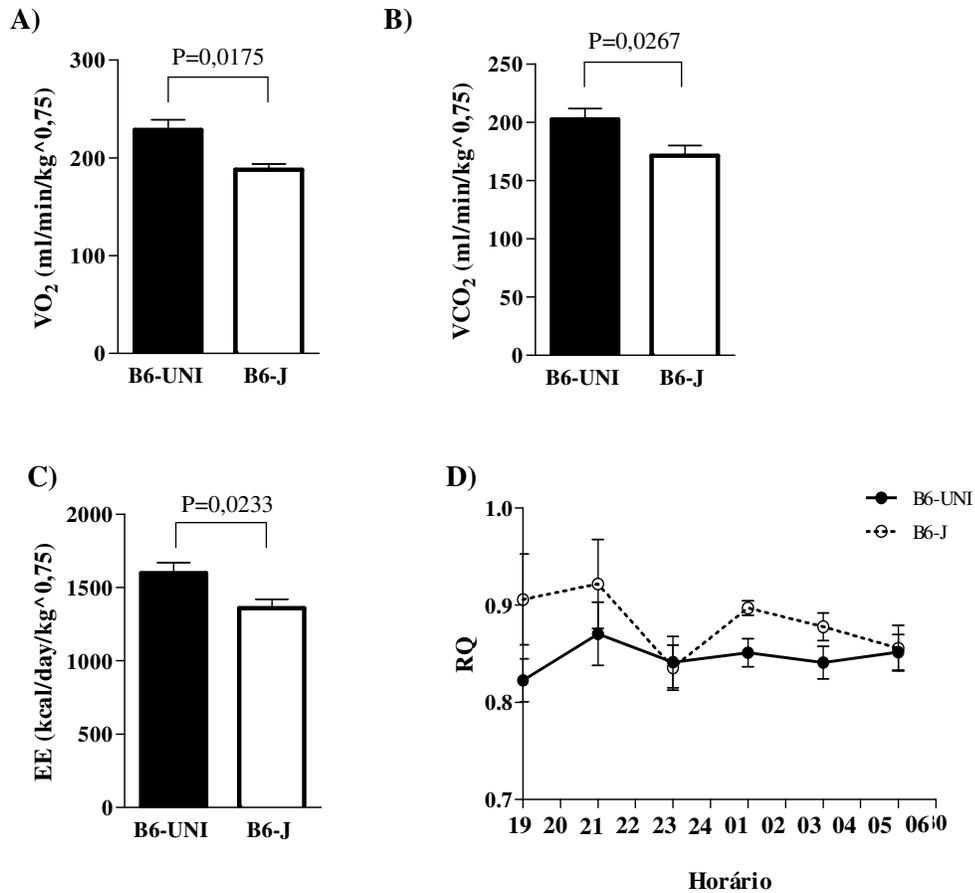


Figura 3: Taxa metabólica corporal do período escuro de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em estado alimentado. Painel A: consumo de oxigênio (VO_2). Painel B: produção de CO_2 (VCO_2). Painel C: gasto energético (EE). Painel D: quociente respiratório (RQ). Média \pm ep (n=8-10). Test t de Student. RQ: não significativa (Anova-repeated measures).

Os níveis plasmáticos de lipídios, proteínas totais e adipocinas são similares nos camundongos B6-J e B6-UNI (**Tabela 2**). Apesar da maior adiposidade visceral observada nos animais B6-J, não verificamos alterações de seus níveis plasmáticos de leptina, os quais representam melhor a massa de tecido adiposo subcutâneo do que a visceral (Rayner et al, 1997).

Tabela 2: Concentrações plasmáticas de lipídios, proteínas totais e adipocinas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).

	B6-UNI	B6-J	Test T Student (B6-J vs B6-UNI)
Colesterol (mg/dl)	87,9±3,55 (18)	85,5±3,69 (14)	n.s
Triglicérides (mg/dl)	66,8±7,15 (12)	55,2±3,78 (14)	n.s
Ácidos graxos livres (mmol/L)	0,62±0,04 (13)	0,66±0,19 (18)	n.s.
Proteínas totais (g/dl)	4,89±0,27 (10)	4,50±0,20 (9)	n.s.
Adiponectina jejum (ng/ml)	6,58 ±1,00 (4)	5,72±0,45 (9)	n.s.
Leptina jejum (ng/ml)	1,00±0,12 (13)	0,80±0,15 (12)	n.s.
Leptina alimentado (ng/ml)	4,68±6,59 (11)	4,99±7,23 (9)	n.s.

Média±ep(n).

A glicemia, insulinemia e indicadores de resistência à insulina e de secreção de insulina nos camundongos B6-J e B6-UNI estão mostrados na **Tabela 3**. Observamos similaridade da glicemia de jejum e do estado alimentado, porém a insulinemia de jejum estava 33% mais elevada nos animais mutantes B6-J. O índice de resistência à insulina HOMA-IR (*Homeostasis model assessment of insulin resistance*) foi 46% maior nos animais B6-J em relação aos B6-UNI. O indicador de secreção de insulina, peptídeo C, estava aproximadamente duas vezes aumentada nos animais mutantes B6-J (**Tabela 3**).

Tabela 3: Glicemia, insulinemia e peptídeo C de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).

	B6-UNI ADL	B6-J ADL	Test T Student (B6-J vs B6-UNI)
Glicemia jejum (mg/dl)	84,0±3,3 (16)	89,0 ±4,5 (14)	n.s.
Glicemia alimentado (mg/dl)	139,0±3,2 (14)	140,0±3,2 (16)	n.s.
Insulinemia jejum (ng/ml)	0,25±0,02 (12)	0,33±0,03 (13)	p=0,0303
Insulinemia alimentado (ng/ml)	0,91±0,84 (12)	0,84±0,12 (12)	n.s.
HOMA-IR	8,81±0,71 (11)	12,85±1,03 (13)	p=0,0043
Peptídeo C jejum (nmol/l)	156,60±24,70 (4)	298,50±14,66 (4)	p=0,0033

Média±ep (n). HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance): [Insulina pM x glicemia mM] /22,5.

A homeostase glicêmica e sensibilidade à insulina foram avaliadas pelos testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT), mostrados nas **Figuras 4 e 5**. Observamos que os animais mutantes B6-J são intolerantes à sobrecarga oral de glicose quando comparados aos B6-UNI (**Figura 4A**), resultando em um aumento de cerca de 70% da área sob a curva glicêmica (**Figura 4B**). Avaliamos as concentrações de peptídeo C durante o teste de tolerância à glicose para mensurar indiretamente a secreção de insulina *in vivo* nesta condição (**Figura 4C**). Observamos aumento significativo nas concentrações de peptídeo C ao longo do tempo durante o GTT, resultando em uma área sob a curva 2 vezes maior nos camundongos B6-J em relação aos B6-UNI (**Figura 4D**). Estes resultados sugerem que os animais B6-J apresentam aumento de secreção de insulina tanto no jejum como no estado alimentado, indicando que a intolerância à glicose se deve à resistência

periférica à insulina. Assim, avaliamos a sensibilidade periférica à insulina pelo ITT (**Figura 5A**) e verificamos que, de fato, os animais mutantes B6-J apresentam uma menor sensibilidade à insulina, demonstrada pelo aumento de 30% na área sob a curva glicêmica após sobrecarga de insulina (**Figura 5B**), e por uma redução de 35% na velocidade inicial de decaimento da glicose (constante K_{ITT} , **Figura 5C**).

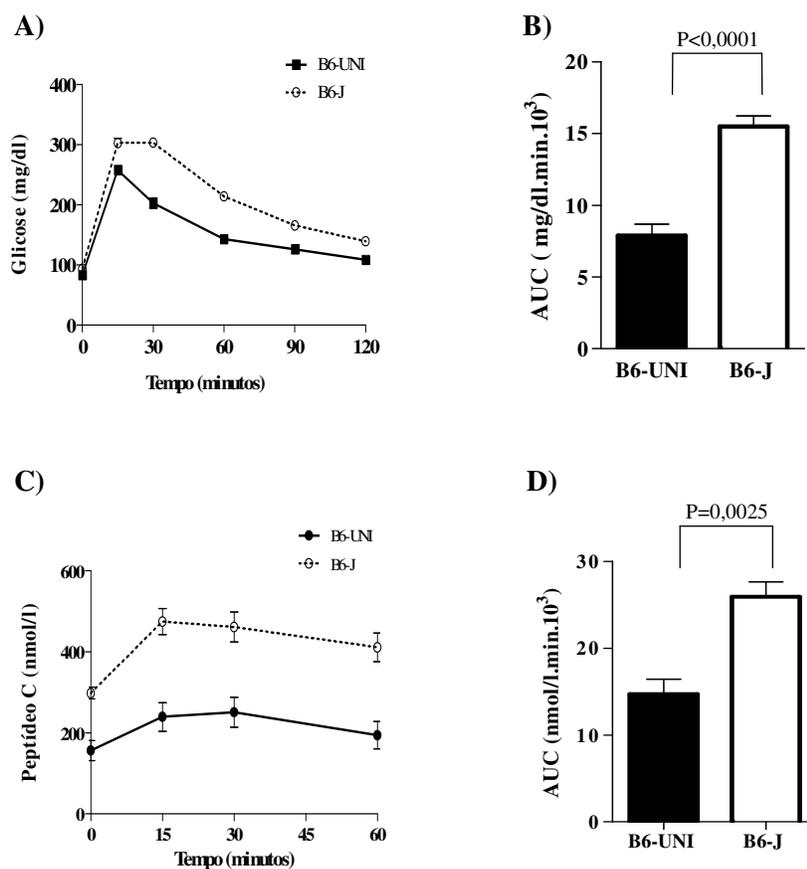


Figura 4: Teste de Tolerância à glicose (GTT) e peptídeo C durante o GTT de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J). Painel A: curvas glicêmicas após dose oral de glicose 1,5g/kg. Painel B: áreas sob as curvas glicêmicas do GTT. Painel C: concentrações de peptídeo C durante o GTT. Painel D: áreas sob as curvas de peptídeo C (AUC). Média±ep (n=4-25). Test t de Student.

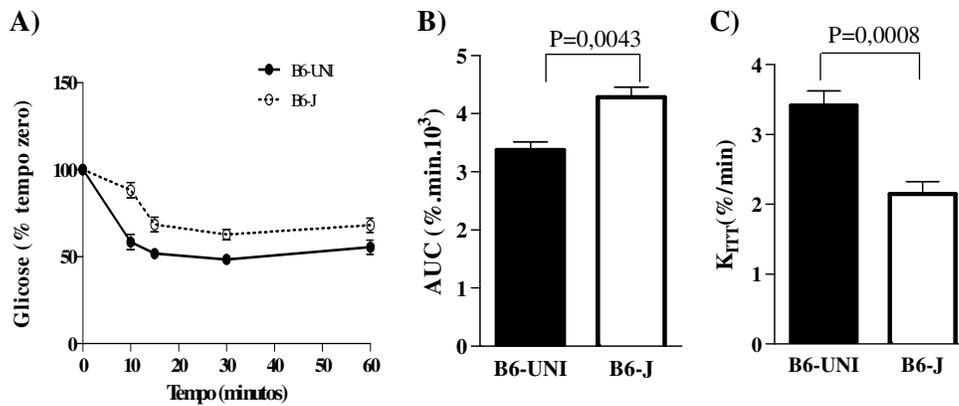


Figura 5: Teste de Tolerância à Insulina (ITT) em camundongos C57BL6/J com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J). Painel A: curvas glicêmicas após dose intraperitoneal de insulina (0,75U/kg). Painel B: áreas sob as curvas (AUC) glicêmicas. Painel C: velocidades de decaimento da glicose (K_{ITT}) após administração de insulina (0,75U/kg). Média±ep (n=5-12). Teste t de Student.

Para confirmar que haveria diferença na secreção de insulina, conforme indicado pelos resultados das concentrações plasmáticas do peptídeo C, avaliamos diretamente a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas dos animais B6-UNI e B6-J (**Figura 6**). Observamos que os animais B6-J apresentaram aumento marcante de 3 vezes na secreção de insulina, tanto no estado basal (2,8 mM de glicose), quando estimulado com altas concentrações de glicose (16,7 mM) (**Figura 6A**). O conteúdo total de insulina das ilhotas dos animais mutantes B6-J também estava 4 vezes aumentado, tanto no estado basal quanto estimulado pela glicose (**Figura 6B**). Assim, estes resultados sugerem que o aumento da secreção de insulina nos animais B6-J foi decorrente do seu elevado conteúdo total de insulina nas suas ilhotas pancreáticas (**Figura 6B**).

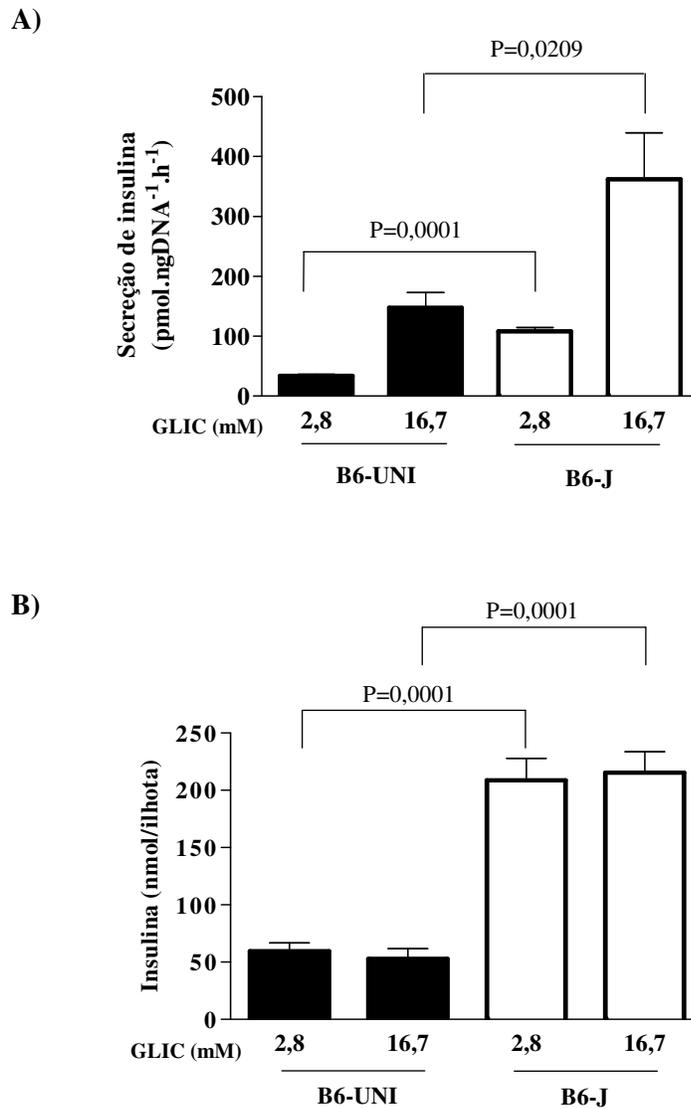


Figura 6: Secreção (A) e conteúdo (B) de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J). Média±ep (n=6). Test t de Student.

Em seguida, avaliamos também as respostas das oscilações da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) nas ilhotas pancreáticas, pois o influxo desse cátion ativa a maquinaria excitotóxica dos grânulos de insulina (Yang and Berggren, 2006; Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008). Observamos que ambos os grupos, B6-UNI e B6-J, não

apresentaram modificações na $[Ca^{2+}]_i$ (**Figura 7A, 7B e 7C**), seja na amplitude de resposta (**Figura 7D**) ou na frequência das oscilações de Ca^{2+} (**Figura 7E**).

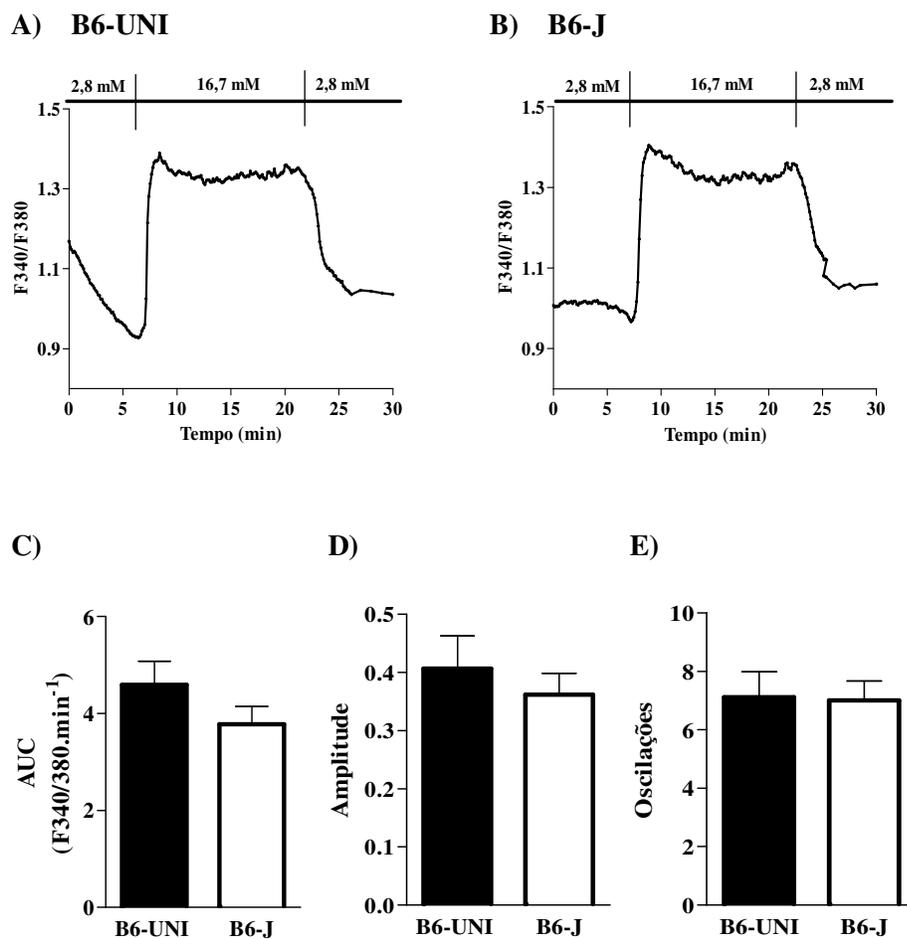


Figura 7: Curvas representativas das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI, painel A) e mutada (B6-J, painel B) em resposta à estimulação com a glicose. Painel C: área sob as curvas. Painel D: amplitude. Painel E: oscilações. Média \pm ep (n= 6).

Considerando que a NNT apresenta a função de detoxificação de espécies reativas de oxigênio através de seu produto NADPH, avaliamos o estado redox sistêmico e hepático dos animais das duas sub-linhagens. A **Figura 8** mostra que a capacidade antioxidante total

plasmática, a peroxidação lipídica (TBARS) e protéica (proteína carbonilada) no fígado são similares nas duas sub-linhagens B6-J e B6-UNI.

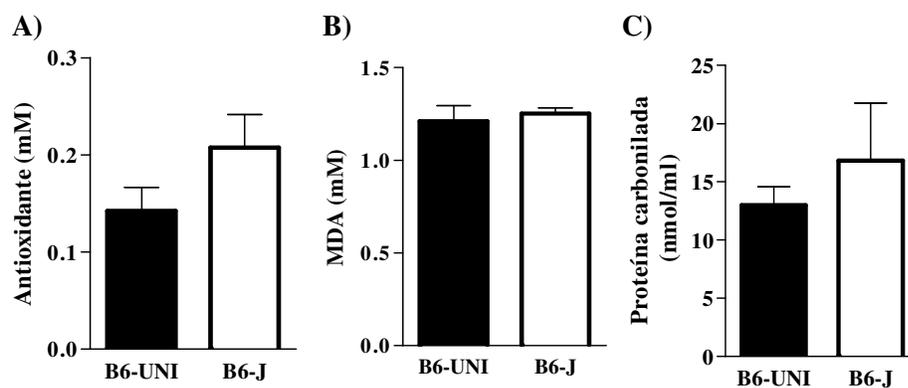


Figura 8: Marcadores de estresse oxidativo de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J). Painel A: capacidade antioxidante total (trolox) do plasma. Painel B: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado. Painel C: teor de proteínas carboniladas no fígado. Média±ep (n= 6-7).

Efeitos da restrição alimentar (RA) e do tratamento com DNP.

Os parâmetros morfométricos dos camundongos B6-UNI e B6-J submetidos à RA ou tratamento com DNP por 3 meses estão apresentados na **Tabela 4**. O regime de RA resultou em uma redução do consumo alimentar cumulativo de 18% nos B6-UNI e 16% nos B6-J em relação aos seus respectivos controles alimentados ad libitum (ADL). A RA também causou uma redução de 22% ($p=0,012$) no ganho de peso corporal dos B6-J, mas não nos B6-UNI. O tratamento com DNP não alterou o consumo alimentar, o ganho de peso e a eficiência alimentar dos animais das duas sub-linhagens, quando usamos a análise anova one-way para comparar as 3 condições ADL, RA e DNP. No entanto, se compararmos apenas o tratamento DNP vs o controle ADL, verificamos que o DNP reduziu

o ganho de peso dos animais B6-J ($p < 0,05$) e marginalmente a eficiência alimentar ($p < 0,08$).

A RA aumentou a massa hepática dos B6-J em 9%, normalizando este parâmetro que estava reduzido em relação aos B6-UNI ADL (**Tabela 4**). O tratamento com DNP não teve efeito sobre massa hepática. As massas do coração e cérebro de ambos os grupos de animais não sofreram efeitos de ambos os tratamentos.

Tabela 4: Consumo e eficiência alimentar e parâmetros morfométricos de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL), submetidos à restrição alimentar (RA) e tratamento com 2,4-dinitrofenol (DNP) por 3 meses.

	ADL	RA	DNP	Anova One-Way	
B6-UNI	Consumo alimentar cumulativo (g)	352,0±9,60 (18)	289,0±8,40*	332,0±11,60	*p<0,0001
	Peso corporal final (5 meses) (g)	30± 0,2 (18)	28 ±0,8 (16)	28 ± 0,8 (10)	n.s.
	Ganho de peso (g)	5,48±0,19 (18)	4,78±0,33 (17)	5,20 ±0,38 (10)	n.s.
	Eficiência alimentar (%)	1,57±0,06 (18)	1,65 ±0,10 (17)	1,57± 0,11 (10)	n.s.
	Fígado (%peso corporal)	4,37±0,10 (14)	4,48± 0,15 (15)	4,23± 0,08 (7)	n.s.
	Coração (%peso corporal)	0,55±0,02 (13)	0,52± 0,03 (11)	0,54± 0,02 (14)	n.s.
	Cérebro (%peso corporal)	1,48±0,03 (13)	1,54 ±0,05 (11)	1,49± 0,05 (14)	n.s.
	B6-J	Consumo alimentar cumulativo (g)	320,0±7,03 (15)	268,0±5,20*	323,0±3,05
Peso corporal final (5 meses) (g)		27±0,4 (15)	26±0,7 (16)	28±0,3 (7)	n.s.
Ganho de peso (g)		5,04±0,28 (15)	3,93±0,21*	4,09 ±0,45 ^a (7)	* p=0,012
Eficiência alimentar (%)		1,59±0,10 (15)	1,44±0,08 (16)	1,27±0,10 ^b (7)	n.s.
Fígado (%peso corporal)		3,96±0,06 (13)	4,33±0,10* (16)	4,30±0,13 (7)	*p=0,016
Coração (%peso corporal)		0,58±0,02 (9)	0,55±0,03 (10)	0,60±0,04 (11)	n.s.
Cérebro (%peso corporal)		1,53±0,04 (9)	1,60±0,05 (10)	1,50±0,03 (11)	n.s.

Média±ep (n). Anova one way: *RA vs ADL. Test t de Student: DNP vs ADL ^ap<0,05 e ^bp= 0,08.

O teor de TG e COL hepático dos animais submetidos aos dois tratamentos está mostrado na **Figura 9**. Observa-se que a RA reduziu significativamente o teor de TG hepático dos camundongos mutantes B6-J (**Figura 9C**, 27%, p=0,005), corrigindo a

esteatose hepática quando comparados aos B6-UNI ADL (**Figura. 1A**). O tratamento com DNP não modificou o teor de TG e COL hepático de ambos os grupos.

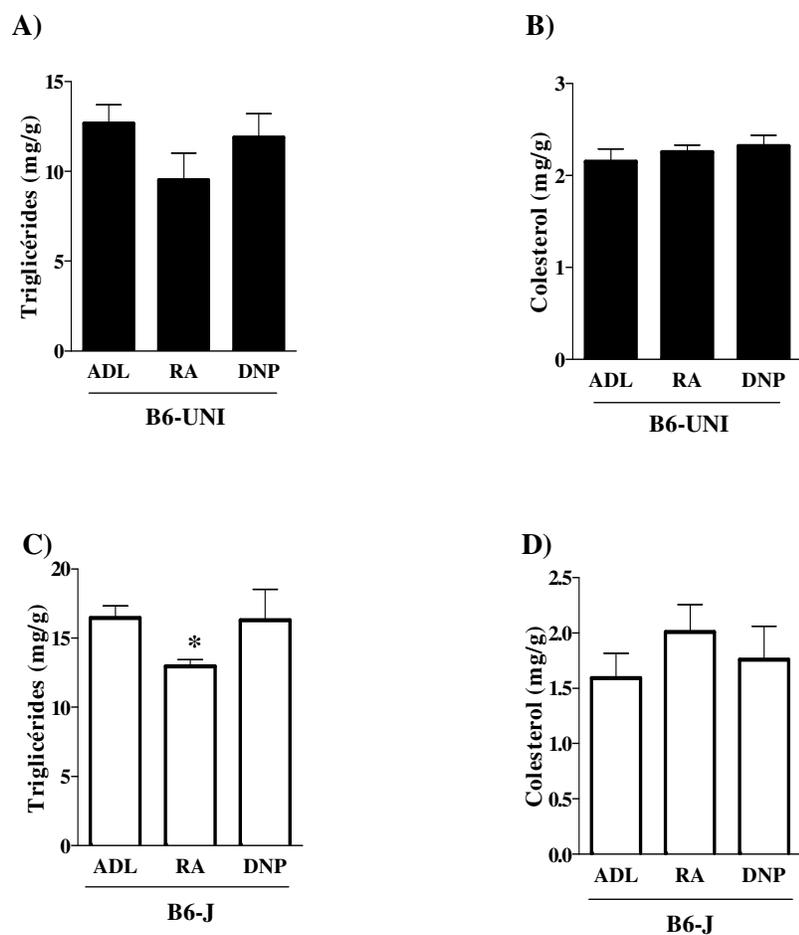


Figura 9: Teor de lipídios no fígado de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP). Painel A e Painel C: triglicérides. Painel B e Painel D: colesterol. Média±ep (n=6-9). Test t de Student: *RA vs ADL; p=0,0055.

A composição corporal dos camundongos das duas sub-linhagens submetidos aos dois tratamentos, RA e DNP, está mostrada na **Figura 10**. A RA induziu uma redução da massa corporal magra dos B6-UNI (**Figura 10C**, 8%, p=0,04) e uma redução da massa de tecido adiposo visceral nos B6-J (**Figura 10D**, 19%, p=0,033). O tratamento com DNP não modificou a composição corporal das 2 sub-linhagens de camundongos.

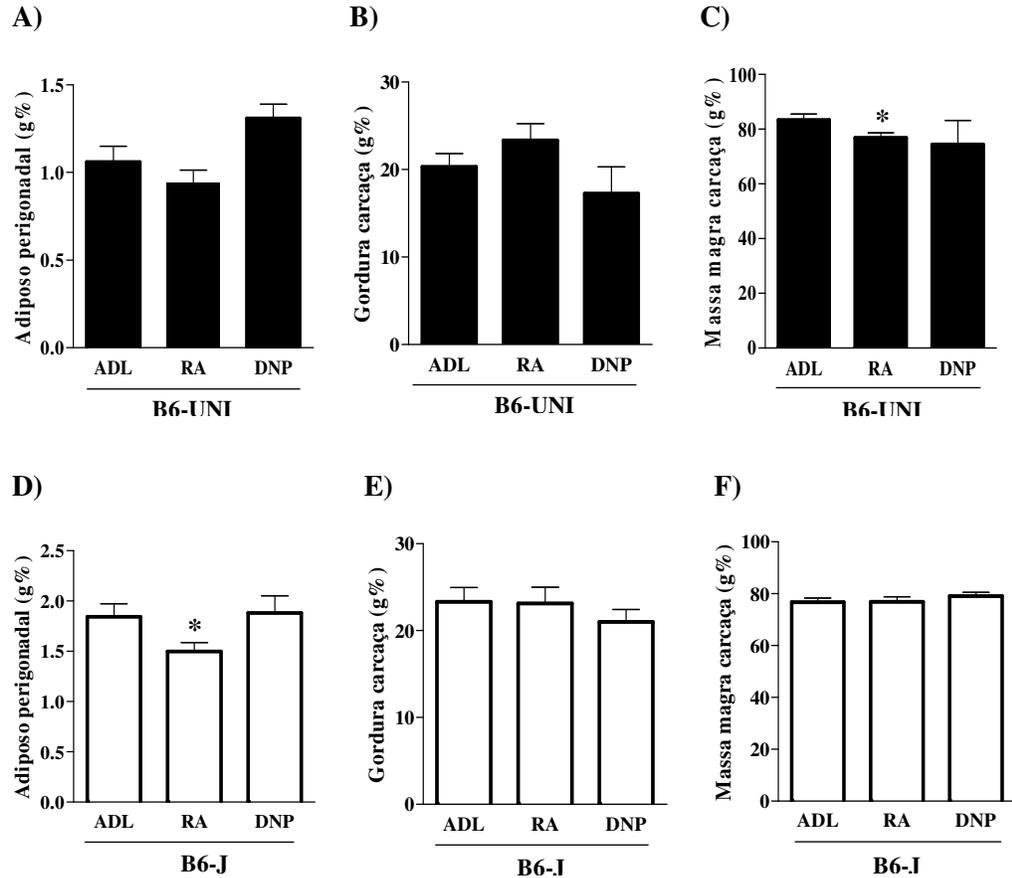


Figura 10: Composição corporal de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP). Painel A e Painel D: massa relativa do tecido adiposo perigonadal. Painel B e Painel E: gordura da carcaça. Painel C e Painel F: massa magra da carcaça. Média±ep (n=6-17). Test t de Student: *RA vs ADL; p<0,05.

Os indicadores de metabolismo corporal aferidos por respirometria dos animais no estado alimentado após os 3 meses de tratamentos com RA e DNP estão mostrados na **Figura 11** (B6-UNI) e **Figura 12** (B6-J). Os camundongos B6-UNI não exibiram nenhuma alteração significativa de seu consumo de oxigênio, produção de CO₂, gasto energético e quociente respiratório em função dos tratamentos com RA e DNP (**Figura 11**). Por outro lado, os animais mutantes B6-J submetidos a RA exibiram aumentos significativos de consumo de oxigênio, produção de CO₂ e o gasto energético (17%) (**Figura 12A, 12B,**

12C) quando comparados seus controles ADL. Estes resultados podem explicar a diminuição da adiposidade perigonadal neste grupo. A RA também aumentou significativamente o valor do quociente respiratório ($p=0,031$) nos animais B6-J, indicando que estes estão utilizando mais carboidrato como substrato energético do que seus controles ADL (**Figura 12D**: valores médios de RQ no período para os animais B6-J ADL, RA e DNP são, respectivamente, 0,89, 0,94 e 0,92, $p<0,03$). Assim como ocorreu com os B6-UNI, o tratamento com DNP não alterou os resultados da respirometria dos animais B6-J.

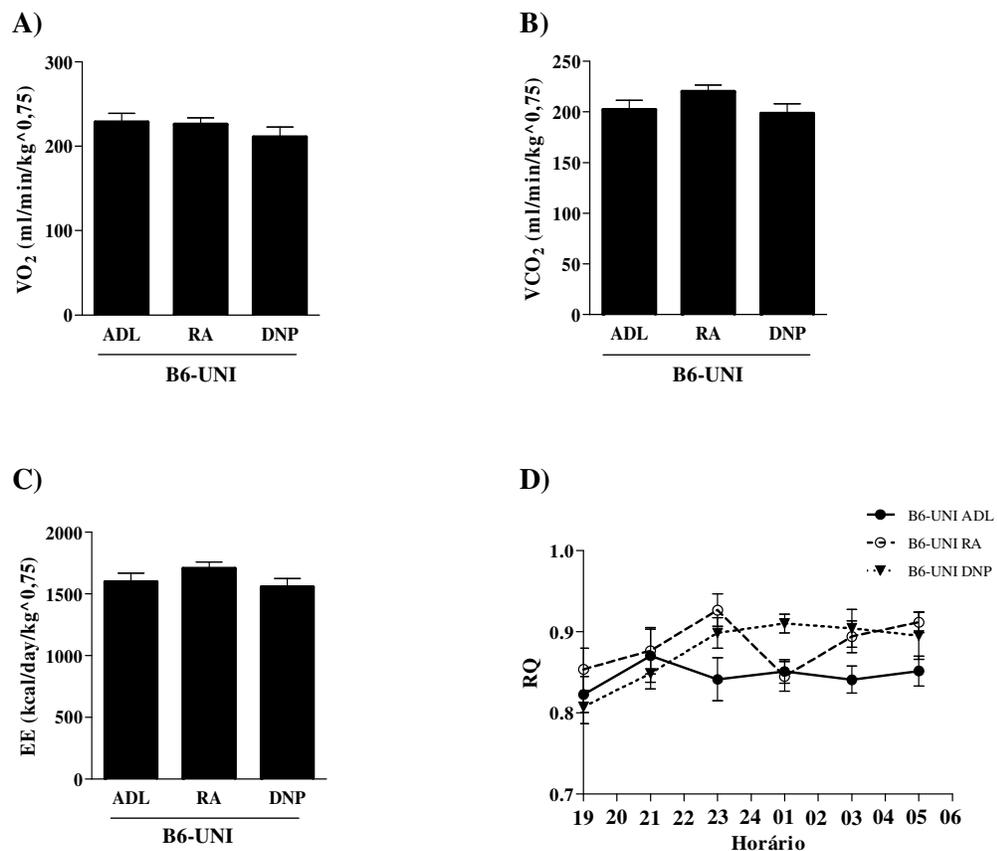


Figura 11: Taxa metabólica corporal do período escuro de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP). Painel A: consumo de oxigênio (VO_2). Painel B: produção de CO_2 (VCO_2). Painel C: gasto energético (EE). Painel D: quociente respiratório (RQ). Média \pm ep (n=10). Anova-repeated measures para RQ: não significante.

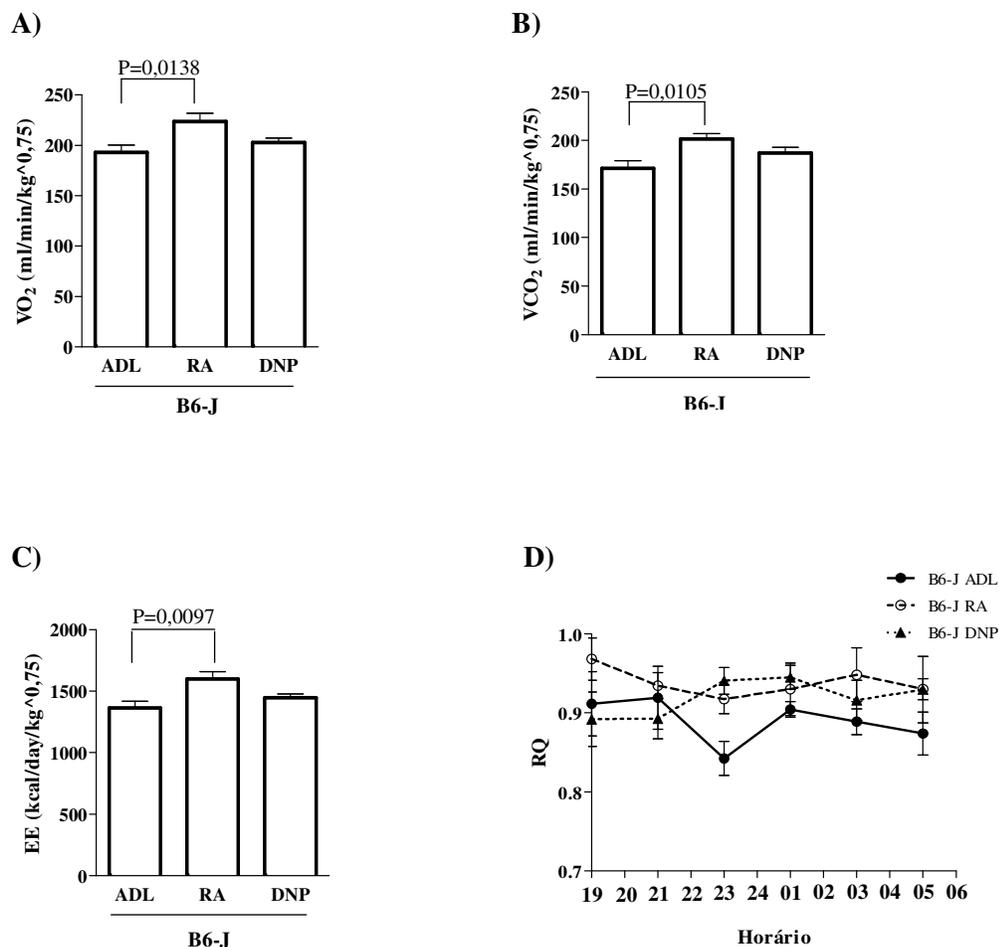


Figura 12: Taxa metabólica corporal do período escuro de camundongos C57BL6 com NNT mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP). Painel A: consumo de oxigênio (VO_2). Painel B: produção de CO_2 (VCO_2). Painel C: gasto energético (EE). Painel D: quociente respiratório (RQ). Média \pm ep (n=8-10). Anova one way para painéis A, B e C. Anova-repeated measures para RQ: $p<0,030$ RA vs ADL.

Os níveis plasmáticos de lípidos, proteínas totais e adipocinas das duas sublinhagens de animais sob os dois tratamentos, RA e DNP, são mostrados na **Tabela 5**. A única alteração induzida pela RA nos animais B6-UNI foi uma redução dos níveis de ácidos graxos livres, enquanto nos animais B6-J, além da redução significativa de AGL, houve também redução da colesterolemia. O tratamento com DNP não teve efeito nestes parâmetros plasmáticos dos dois grupos de animais.

Tabela 5: Concentrações plasmáticas de lipídios, proteínas totais e adipocinas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL), submetidos à restrição alimentar (RA) e tratamento com 2,4-dinitrofenol (DNP) por 3 meses.

	ADL	RA	DNP	Anova One-Way	
B6-UNI	Colesterol (mg/dl)	87,9±3,55 (18)	89,8±4,21 (16)	87,9±4,98 (9)	n.s
	Triglicérides (mg/dl)	67,0±7,15 (12)	65,0±3,17 (14)	66,0±3,37 (10)	n.s
	Ácidos graxos livres (mmol/l)	0,62±0,04 (13)	0,33±0,03* (12)	0,61±0,06 (13)	*p=0,0001
	Proteínas totais (g/dl)	4,50±0,20 (9)	4,11±0,15 (9)	4,40±0,16 (13)	n.s.
	Adiponectina jejum (ng/ml)	5,72±0,45 (5)	5,43±0,19 (9)	5,64±0,47 (9)	n.s
	Leptina jejum (ng/ml)	0,80±0,15 (9)	0,71±0,11 (12)	0,61±0,08 (11)	n.s
	Leptina alimentado (ng/ml)	4,99±7,24 (9)	4,46±0,46 (5)	3,60±0,48 (5)	n.s.
B6-J	Colesterol (mg/dl)	85,5±3,69 (14)	64,6±1,92* (15)	78,2±4,00 (7)	*p<0,0001
	Triglicérides (mg/dl)	55,2±3,78 (14)	48,0±4,79 (14)	59,9±4,05 (12)	n.s
	Ácidos graxos livres (mmol/l)	0,66±0,19 (18)	0,48±0,03* (15)	0,60±0,04 (14)	*p=0,0001
	Proteínas totais (g/dl)	4,50±0,20 (9)	4,66±0,29 (9)	4,72±0,31 (12)	n.s.
	Adiponectina jejum (ng/ml)	6,58±1,00 (4)	8,09±0,92 (7)	8,37±0,66 (7)	n.s
	Leptina jejum (ng/ml)	0,90±0,12 (13)	0,97±0,13 (12)	0,91±0,12 (10)	n.s
	Leptina alimentado (ng/ml)	4,68±6,59 (11)	3,82±2,83 (6)	3,574±6,12 (5)	n.s.

Média±ep (n). Anova one way: *RA vs ADL.

Com relação à glicemia e insulinemia (**Tabela 6**), observamos que ambos os tratamentos RA e DNP induziram uma marcada redução de 2/3 nas concentrações plasmáticas de peptídeo C nos animais B6-UNI, sugerindo redução de secreção de insulina

in vivo nestes animais. Estes resultados também foram observados no grupo de animais B6-J, que mostraram uma redução de 50% nas concentrações plasmáticas de peptídeo C com os dois tratamentos RA e DNP. Além disso, os B6-J exibiram uma redução da insulinemia de jejum e do HOMA-IR após o tratamento com DNP.

Tabela 6: Glicemia, insulinemia e peptídeo C de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL), submetidos à restrição alimentar (RA) e tratamento com 2,4-dinitrofenol (DNP) por 3 meses.

	ADL	RA	DNP	Anova One-Way	
B6-UNI	Glicemia jejum (mg/dl)	84,0±3,3 (15)	87,0±4,3 (17)	80,0±2,2 (7)	n.s
	Glicemia alimentado (mg/dl)	146,4±3,8 (21)	134,8±3,9 (21)	157,0±3,7 (11)	n.s
	Insulina jejum (ng/ml)	0,25±0,02 (12)	0,26±0,02 (8)	0,26±0,04 (13)	n.s
	Insulina alimentado (ng/ml)	0,91±0,84 (12)	1,40±0,17 (8)	1,05±0,15 (13)	n.s
	HOMA-IR	8,81±0,71 (11)	11,16±1,14 (6)	11,22±1,25 (12)	n.s.
	Peptídeo C jejum (nmol/l)	156,60±27,40 (4)	57,67±2,04* (4)	66,52±12,88# (4)	*#p=0,0033
B6-J	Glicemia jejum (mg/dl)	89,0±4,5 (14)	97,5±5,4 (16)	84,0±1,1 (7)	n.s
	Glicemia alimentado (mg/dl)	147,0±3,9 (21)	148,7±5,3 (23)	158,0±3,2 (11)	n.s.
	Insulina jejum (ng/ml)	0,33±0,03 (13)	0,29±0,03 (10)	0,23±0,03# (15)	#p=0,0411
	Insulina alimentado (ng/ml)	0,84±0,12 (12)	0,70±0,08 (8)	1,29±0,30 (11)	n.s
	HOMA-IR	12,85±1,03 (13)	12,35±1,25 (10)	8,83±0,99# (15)	#p=0,0179
	Peptídeo C jejum (nmol/l)	298,50±14,66 (4)	157,00±16,17* (4)	160,50±43,09# (4)	*#p=0,0088

Média±ep (n). *RA vs ADL, #DNP vs ADL. HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) = (Insulina pM x glicemia mM) /22,5.

Os efeitos dos tratamentos RA e DNP sobre a homeostase glicêmica (GTT) e sensibilidade à insulina (ITT) estão mostrados nas **Figuras 13 e 14**. Os tratamentos RA e

DNP não modificaram as áreas sob as curvas glicêmicas após a sobrecarga oral de glicose nos dois grupos de animais, B6-UNI e B6-J (**Figura 13A e 13D**). No entanto, analisando ponto a ponto, verificamos que tanto a RA quanto o DNP reduziram a concentração de glicose no tempo 15 minutos nos B6-UNI e a RA reduziu as concentrações de glicose nos tempos 30 e 60 minutos após a sobrecarga de glicose nos B6-J. Assim, os tratamentos mostraram algum benefício sobre a tolerância à glicose em ambos os grupos de animais. Além disso, os tratamentos RA e DNP reduziram marcadamente as concentrações plasmáticas de peptídeo C tanto nos B6-UNI (**Figura 13B e 13C**) quanto nos B6-J (**Figura 13E e 13F**), sugerindo que os tratamentos reduziram a secreção de insulina em ambas sublinhagens. Quanto à sensibilidade periférica à insulina (**Figura 14**), verificamos que a RA e o DNP não tiveram efeitos nos animais B6-UNI (**Figura 14A, 14B e 14C**), enquanto que a área sob a curva glicêmica estava diminuída e a velocidade inicial de decaimento plasmático da glicose (K_{ITT}) estava acelerada nos animais B6-J submetidos à RA (**Figura 14D, 14E, 14F**), evidenciando uma melhora da sensibilidade periférica à insulina.

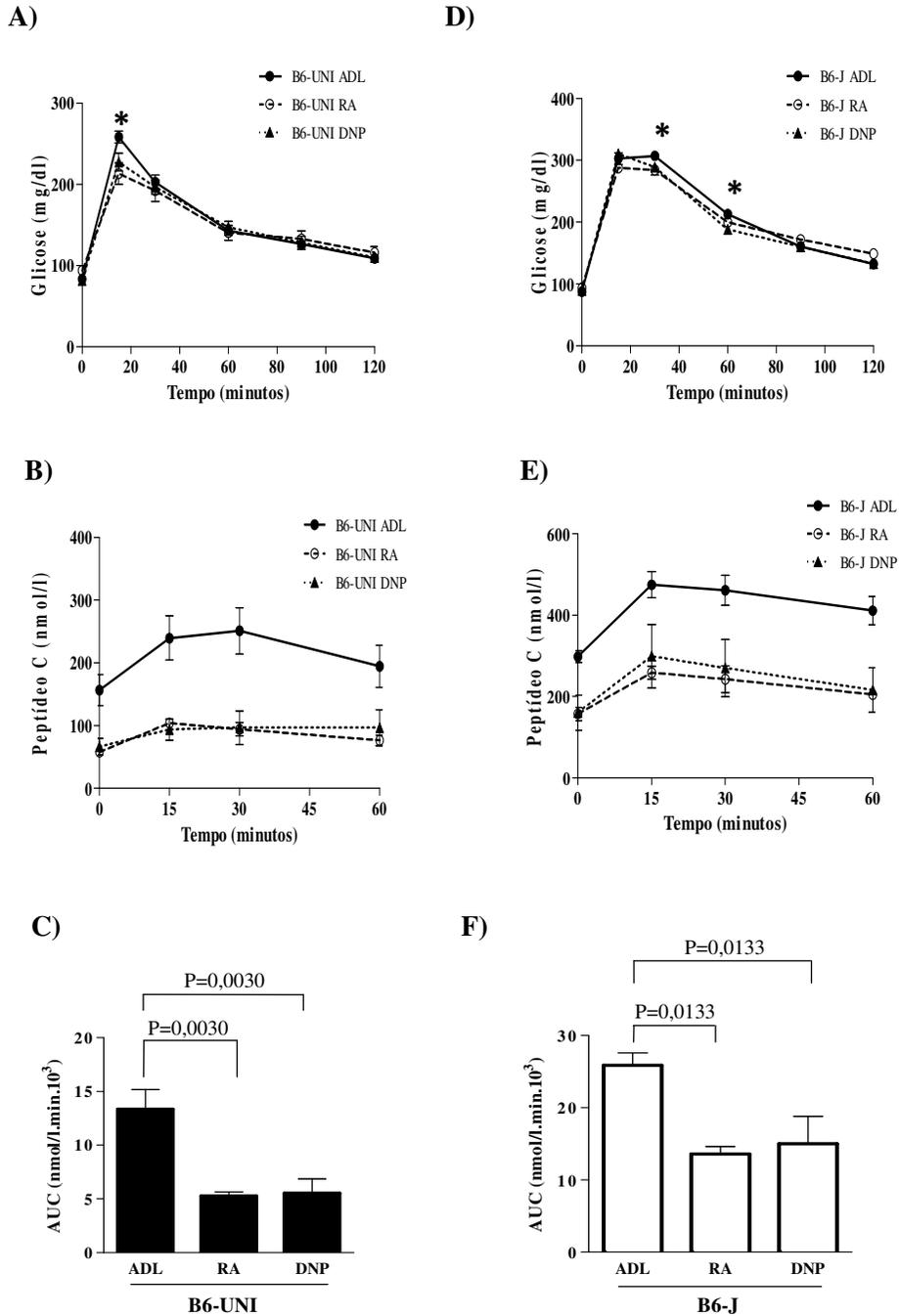


Figura 13: Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e peptídeo C durante o GTT de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP). Painel A e Painel D: curva glicêmica após dose oral de glicose 1,5g/kg. Painel B e Painel E: concentrações de peptídeo C durante o GTT. Painel C e Painel F: áreas sob as curvas de peptídeo C (AUC). Média±ep (n=4-14). *Glicemia reduzida em 15 min B6-UNI (RA e DNP vs ADL) e *em 30 e 60 min B6-J (RA e DNP vs ADL). Anova one-way para peptídeo C (painel C e F).

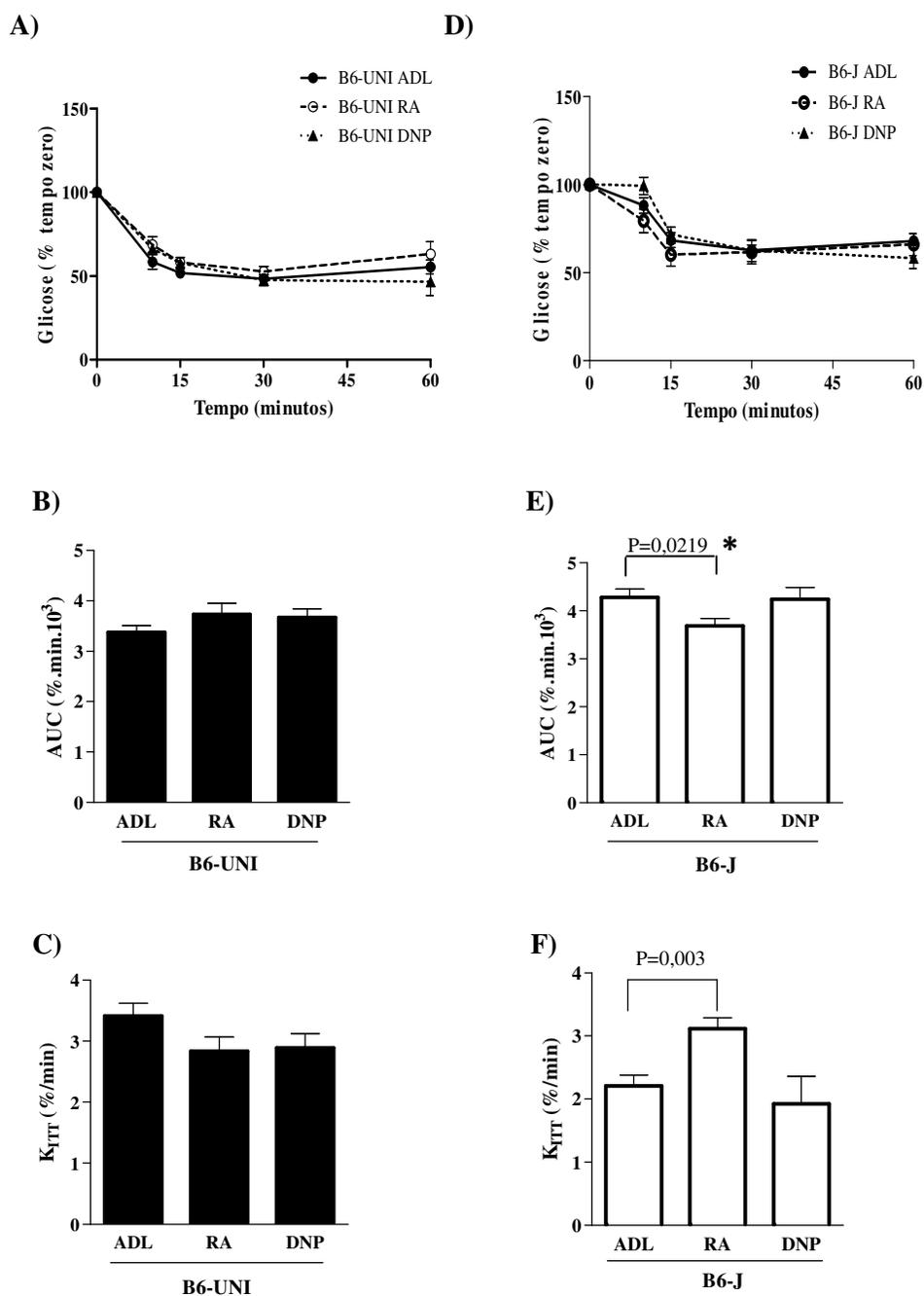


Figura 14: Teste de Tolerância à Insulina (ITT) em camundongos C57BL6/J com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP). Painel A e Painel D: curvas glicêmicas após dose intraperitoneal de insulina (0,75U/kg). Painel B e Painel E: área sob a curva (AUC) mostrada no painel A e D. Painel C e Painel F: velocidade de decaimento da glicose (K_{ITT}) após administração de insulina (0,75U/kg). Média±ep (n=5-12). Test t de Student: *RA vs ADL (painel E). Anova one way (painel F).

Avaliamos também como os tratamentos afetaram alguns marcadores de estresse oxidativo (**Figura 15**). Tanto a RA como o tratamento com DNP não modificaram a capacidade antioxidante total plasmática, e os indicadores de peroxidação lipídica (TBARS) e protéica (proteína carbonilada) no fígado dos dois grupos de animais B6-UNI (**Figura 15A, 15B e 15C**) e B6-J (**Figura 15D, 15E e 15F**).

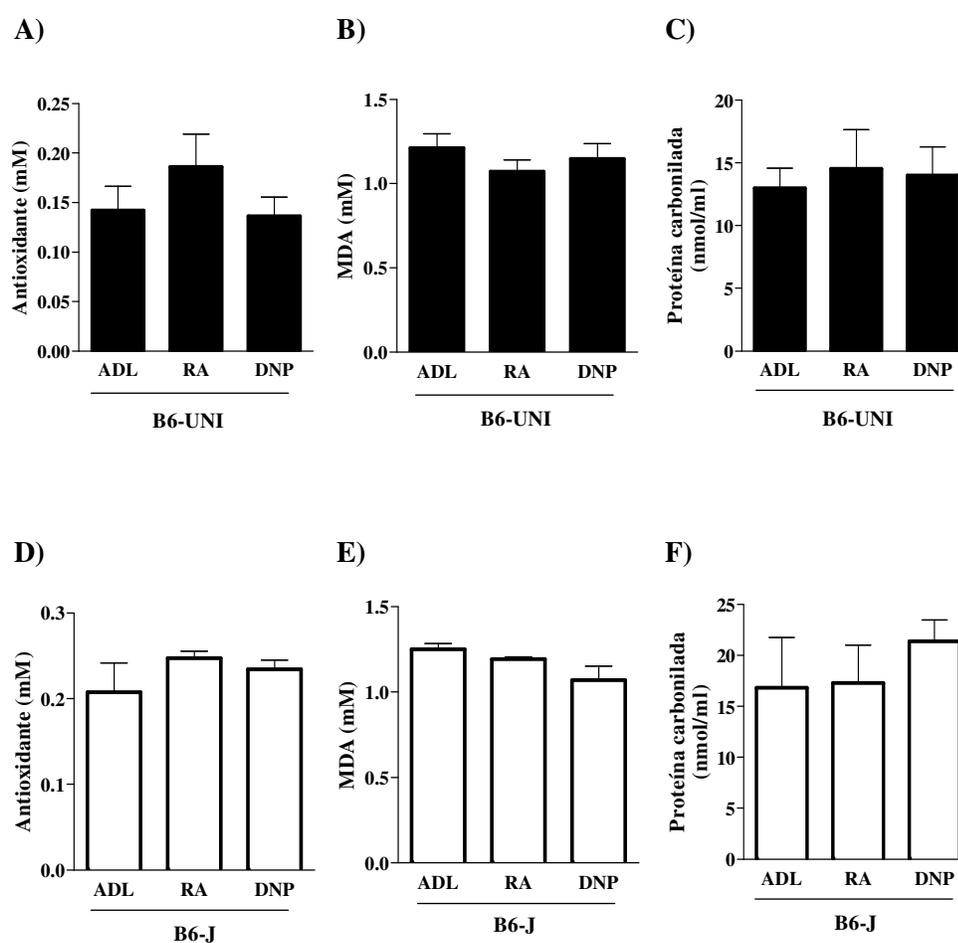


Figura 15: Marcadores de estresse oxidativo de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) alimentados *ad libitum* (ADL) e submetidos a 3 meses de restrição alimentar (RA) e tratamento com o 2,4-dinitrofenol (DNP). Painel A e Painel D: capacidade antioxidante total (trolox) do plasma. Painel B e Painel E: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado. Painel C e Painel F: teor de proteínas carboniladas no fígado. Média±ep (n=5-7).

Apresentamos na **Tabela 7** um quadro geral com o resumo de todos os resultados. Comparando as duas sub-linhagens com NNT mutada (B6-J) e intacta (B6-UNI) em condições fisiológicas (alimentação *ad libitum*), verificamos que, os animais mutantes apresentam maior adiposidade visceral, maior concentração de TG hepático, maior insulinemia de jejum, intolerância à glicose, resistência periférica à insulina, hipersecreção de insulina *in vivo* (peptídeo C) e por ilhotas pancreáticas isoladas. Em conjunto, estes resultados evidenciam claramente um quadro de síndrome metabólica nos animais B6-J. De modo geral os tratamentos de restrição alimentar e DNP corrigiram, pelo menos parcialmente, várias das alterações metabólicas, especialmente a restrição alimentar.

Tabela 7: Resumo dos resultados obtidos nas duas sub-linhagens de animais C57BL6 (B6-UNI e B6-J) e suas respostas aos tratamentos com restrição alimentar (RA) ou com 2,4 dinitrofenol (DNP).

	B6-J vs B6-UNI* (ADL)	B6-UNI[#] (NNT intacta)		B6-J[#] (NNT mutada)	
		RA	DNP	RA	DNP
Consumo alimentar	-	↓ 18%	ns	↓ 16%	Ns
Eficiência alimentar	-	ns	ns	Ns	↓ 20%*
Massa adiposa	↑ 75%	ns	ns	↓ 19%*	Ns
Massa magra	↓ 12%	↓ 8%*	ns	Ns	Ns
Gasto metabólico (estado alimentado)	↓ 18%	ns	ns	↑ 17%	Ns
Massa hepática	↓ 9%	ns	ns	↑ 9%	Ns
[TG] hepático	↑ 30%	ns	ns	↓ 27%*	Ns
[COL] plasma	ns	ns	ns	↓ 24%	Ns
[AGL] plasma	ns	↓ 47%	ns	↓ 27%	Ns
Glicemia alimentado	ns	ns	ns	Ns	Ns
Glicemia jejum	ns	ns	ns	Ns	Ns
Insulinemia alimentado	ns	ns	ns	Ns	Ns
Insulinemia jejum	↑ 33%	ns	ns	Ns	↓ 37%
[Peptídeo C] plasma	↑ 100%	↓ 50%	↓ 50%	↓ 50%	↓ 72%
HOMA-IR	↑ 46%	ns	ns	Ns	↓ 45%
Intolerância à glicose (AUC)	↑ 68%	↓ 17%* ^{&}	↓ 12%* ^{&}	↓ 7%* [§]	ns.
Sensibilidade à insulina (K _{ITT})	↓ 35%	ns	ns	↑ 41%	Ns
Sensibilidade à insulina (AUC)	↓ 27%	ns	ns	↑ 14%*	Ns

^{**}P<0,05; [#]Anova one way: ADL vs RA vs DNP e ^{*}Test t de Student vs ADL. [&] Glicemia reduzida em 15 min e [§] em 30 e 60 min após sobrecarga oral de glicose. ns: não-significante. TG: triglicérides. COL: colesterol. AGL: ácidos graxos livre. HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance. AUC: área sob a curva glicêmica. K_{ITT}: constante de decaimento da glicemia durante o teste de tolerância à insulina.

DISCUSSÃO

A perda da função da enzima NNT causa um prejuízo na capacidade antioxidante mitocondrial aumentando os riscos de danos celulares ocasionados pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (EROS) de origem mitocondrial (Ronchi, 2013). Neste trabalho, revelamos que a deficiência de NNT também modifica desfavoravelmente o fenótipo metabólico. Os animais deficientes de NNT apresentam distúrbios do metabolismo lipídico e glicídico característicos da síndrome metabólica. Os mecanismos responsáveis por este efeito da deficiência da NNT estão provavelmente ligados à ação sinalizadora das EROS. Já está bem estabelecido que diferentes concentrações de EROS regulam diversos processos celulares (Hamanaka and Chandel, 2010). Por exemplo, baixas concentrações de EROS são necessárias para proliferação e diferenciação celular, concentrações moderadas de EROS ativam programas adaptativos como a regulação da transcrição de genes antioxidantes, e concentrações elevadas de EROS sinalizam o envelhecimento e a morte celular (Hamanaka and Chandel, 2010).

Nossos resultados indicam que a integridade da enzima NNT é altamente relevante para determinação da adiposidade e da homeostase glicêmica. Em nosso trabalho observamos aumento da adiposidade dos camundongos B6-J associado ao menor gasto energético dos animais, quando em dieta pobre em gordura. Em termos de obesidade, existem apenas dois estudos que associam a NNT e adiposidade. Nicholson et al. (2010) descreveram que os camundongos mutantes B6/J apresentam menor massa adiposa corporal (40%) em relação a uma linhagem controle que possuía a NNT intacta (B6/NJ), quando em dieta pobre em gordura. Porém, quando alimentados por 14 semanas com dieta rica em gordura (60%), os mutantes B6/J apresentaram maior adiposidade corporal (25%) e

tornaram-se mais intolerantes à glicose que os B6/NJ. O background genético é extremamente importante na determinação da adiposidade em resposta a dieta rica em gordura, como por exemplo, Kern et al (2012) estudando 2 sub-linhagens de camundongos B6 (C57BL/6NTac vs C57BL/6JRj), as quais diferem em 11 de 1449 SNPs (single nucleotide polymorphisms), mostraram que os B6JRj tem maior ingestão alimentar e acumulam apenas 1/5 da massa adiposa dos B6NTac. Recentemente, Heiker et al (2013), trabalhando com amostras de tecido adiposo de humanos, mostraram que a expressão do RNAm da NNT era maior em indivíduos obesos e esta estava positivamente correlacionada com indicadores de obesidade (IMC, % de gordura corporal, área de gordura visceral e circunferência da cintura). Os autores sugerem que esta expressão aumentada de NNT nos depósitos de gordura visceral representa um mecanismo de defesa das células para reduzir estresse oxidativo e disfunção do adipócito.

A intolerância à glicose observada nos animais B6-J mutantes da NNT em relação a controles com NNT intacta está de acordo com a maior parte dos estudos encontrados na literatura que comparam os B6-J com outras linhagens ou sub-linhagens de camundongos (**Anexo I**). No entanto, a explicação desta intolerância à glicose é geralmente atribuída a um defeito de secreção de insulina, enquanto que em nosso estudo, ao contrário, apontamos a resistência periférica à insulina como responsável tanto pela hipersecreção de insulina como pela intolerância à glicose. Toyé e colaboradores (2005) compararam camundongos C57BL6/J (mutantes para a NNT) com linhagens totalmente distintas C3H/HeH, DBA/2 e Balb/c e verificaram que os primeiros são os animais mais intolerantes à glicose. Em análises adicionais entre os B6/J e C3H verificaram redução da secreção de insulina induzida por glicose nas ilhotas pancreáticas isoladas. Estes autores foram os primeiros a indicar que o gene candidato mais forte para explicar este fenótipo era a NNT ausente nos

B6/J e intacto nas outras linhagens. Freeman et al (2006c) comprovaram a implicação da deficiência da NNT na intolerância à glicose e alteração na secreção de insulina através da manipulação genética dos animais, i.e., super-expressando o gene da NNT nos animais C57BL6/J mutantes recuperaram inteiramente homeostase glicêmica. No entanto, diferentemente de nossos resultados, ambos os trabalhos de Toyé et al (2005) e de Freeman et al (2006c) expressaram os dados de secreção de insulina como porcentagem do conteúdo total de insulina das ilhotas, sem revelar se havia diferença na quantidade de insulina das ilhotas. Em nosso estudo expressamos a secreção de insulina por massa de DNA, já que as ilhotas dos B6-J apresentavam um conteúdo de insulina 4 vezes maior que as dos B6-UNI. Portanto, os resultados daqueles autores podem estar enviesados por diferenças do teor de insulina das ilhotas. Em nosso estudo, observamos exatamente o oposto, i.e., hiperinsulinemia, aumento de peptídeo C e hipersecreção de insulina pelas ilhotas isoladas nos animais B6-J. Tanto a hipersecreção de insulina quanto a intolerância à glicose podem ser atribuídas à resistência periférica a este hormônio conforme dados do HOMA e teste de tolerância à insulina (AUC_{ITT} e K_{ITT}).

Duas linhagens independentes de camundongos, DBA/2 e C57BLKS, as quais compartilham 25% do genoma, apresentam hipersecreção de insulina em resposta à glicose quando comparados aos C57BL6, e são linhagens consideradas mais suscetíveis à falência da célula beta e diabetes (Aston-Mourney et al, 2007; Anderson et al, 2009). Aston-Mourney et al (2007) mostraram que os camundongos DBA/2 tem tolerância à glicose inalterada às custas do aumento da insulinemia durante o GTT comparados aos C57BL6 (ambos provenientes do The Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research, Austrália). Este autores realizaram análises genética (QTL, quantitative trait locus) e genômica (GWA, genome-wide analysis) dos descendentes do cruzamento (C57BL6 vs

DBA/2) vs C57BL6 e mostraram uma associação significativa do aumento da insulinemia em resposta à glicose com uma região do cromossomo 13 que continha 9 genes candidatos. Destes, o único gene com expressão diferencialmente elevada nos DBA/2 em relação aos C57BL6 foi o gene da NNT. Assim, os autores concluem que o aumento da NNT predispõe à hipersecreção de insulina. Anderson et al (2009) compararam o comportamento da secreção de insulina por ilhotas isoladas nas linhagens C57BLKS/J e C57BL6/J (The Jackson Laboratory, EUA). Os animais BLKS/J apresentam uma composição genotípica de 71% dos B6, 25% dos DBA e 4% de outras linhagens. Os autores mostraram que os BLKS/J exibiram elevada secreção de insulina e aumento de tolerância à glicose em relação aos B6/J. Por mapeamento genético sugeriram que 2 genes (dentro de loci DBA) podem ser os principais determinantes do aumento da secreção de insulina nas ilhotas dos BLKS/J, a saber, a NNT e o *Plagl-1 (pleiomorphic adenoma gene like 1)*, cujas expressões estavam aumentadas 4 e 7 vezes, respectivamente. Adicionalmente vários outros genes inflamatórios responsivos à glicose são mais expressos nos animais BLKS/J.

Wong et al (2010) compararam camundongos C57BL/6J (provenientes do Hall Institute, Austrália) com C57BL/6NTac (Taconics Farm, EUA) e mostraram que os B6J, apesar de mutantes para NNT, apresentaram uma atividade de redução de NADP⁺ normal e similar aos B6NTac, sugerindo que existe algum mecanismo enzimático compensatório para manter os níveis de NADPH nas células dos B6J provenientes do Hall Institute. Estes dois grupos de animais não mostraram diferenças significativas quanto à tolerância à glicose, secreção de insulina e adiposidade.

Nicholson et al (2010) estudando as sub-linhagens B6/J e B6/NJ (ambos do Jackson Lab) mostraram que os mutantes B6/J, apesar de exibir uma insulinemia de jejum muito menor que os B6/NJ (NNT intacta) quando em dieta com baixo teor de gordura, respondem

a uma dieta rica em gordura com aumento da insulinemia até níveis similares aos dos B6/NJ. Portanto, não se pode concluir que os mutantes B6/J tem defeito de secreção de insulina com esta alta capacidade responsiva à dieta. Mesmo assim, estes animais permanecem mais intolerantes à glicose que os B6/NJ, e, portanto, deduz-se que os mutantes de NNT são mais resistentes à insulina, tal qual nossos resultados demonstram.

Os nossos resultados e os destes estudos prévios revelam definitivamente que a expressão e atividade da NNT são altamente relevantes para homeostase glicêmica. Em nosso estudo comparamos C57BL/6J com os C57BL/6JUnib, sub-linhagens bastante similares que diferem em apenas 3 SNPs de 196 marcadores genéticos selecionados. Os primeiros não só apresentam NNT mutada como também redução drástica de sua atividade sem compensação de redução de NADP⁺ (Ronchi et al 2013). Nós propomos que a deficiência da NNT afeta particularmente a sensibilidade periférica à insulina e como consequência ocorre aumento de síntese (maior conteúdo total de insulina) e de secreção de insulina, porém não suficiente para resolver a intolerância à glicose. Nossa hipótese mecanística é de que a falta da NNT nos tecidos alvos da insulina causa disfunção mitocondrial, super-produção de EROS e prejuízo da sinalização da insulina. Dados recentes de Wang et al (2013) dão suporte a nossa hipótese. Esses autores induziram disfunção mitocondrial em linhagens de células adiposas (3T3-L1 diferenciadas) usando inibidores da cadeia respiratória (oligomicina A ou antimicina A) ou por knockdown do fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA), causando super-produção de EROS e atenuação da sinalização da insulina. Verificou-se nestas células com disfunção mitocondrial redução da captação da glicose, redução da fosforilação de AKT, e redução da expressão do GLUT-4 e da secreção de adiponectina. Além disso, a resistência à insulina nestas células correlacionou-se com a severidade da disfunção mitocondrial. Como a

deficiência da NNT diminui marcadamente a capacidade antioxidante e aumenta a geração de EROS nas mitocôndrias hepáticas dos animais B6-J (Ronchi et al, 2013), é provável que a sinalização da insulina esteja prejudicada nos tecidos alvos da insulina.

Demonstramos que a RA corrigiu, pelo menos parcialmente, o aumento da adiposidade visceral dos animais B6-J (19%), possivelmente por ter aumentado o seu gasto energético nos animais B6-J (17%). Além disso, a RA corrigiu completamente a esteatose hepática observada nos B6-J, característica da síndrome metabólica e da obesidade e indicativo de lipotoxicidade hepática (Bell et al 2008; McClain et al, 2007). Hempenstall e colaboradores (2010) submeteram animais C57BL6/J e DBA/2 à uma restrição calórica mais severa (30%) durante 1 a 5 semanas e verificaram através da técnica de dual-energy X-ray absorptiometry, redução significativa da massa adiposa em ambas linhagens. Bowman et al (2010) demonstraram que uma restrição calórica de 30% por 2-3 meses em ratos selecionados para a característica de síndrome metabólica (*low capacity runners rats*) reduziu a obesidade visceral e melhorou a esteatose hepática.

Quanto à homeostase glicêmica, observamos que a RA trouxe benefícios tanto para os animais B6-UNI quanto para os B6-J melhorando a tolerância, diminuindo os níveis de peptídeo C durante o GTT (secreção de insulina *in vivo*) e nos B6-J corrigiu também a sensibilidade periférica à insulina. Estudos prévios mostraram que a restrição calórica de 20% em camundongos obesos (ob/ob) melhorou a intolerância à glicose e a sinalização da insulina no fígado, embora não tenha corrigido a resistência à insulina globalmente (Tsutsumi et al, 2011). Hempenstall e colaboradores (2010) mostraram que a restrição calórica de 30% durante 1 a 5 semanas melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade periférica à insulina nos animais C57BL6/J e dos DBA/2. Existem muitas evidências na literatura de que a restrição calórica e a conseqüente perda de peso em obesos (diabéticos e

não diabéticos) melhora o metabolismo da glicose, melhorando a sensibilidade periférica à insulina (Heilbronn and Ravussin, 2010).

Estudos prévios feito por Barziliaia e colaboradores (1999) mostraram que a restrição calórica de 50% reverteu à resistência a insulina hepática em ratos Sprague-Dawley por reduzir a sua massa adiposa visceral. Em 2002, Gabriely et al também mostraram que restrição calórica em ratos Zucker reduziu o depósito adiposo visceral melhorando a resistência à insulina apresentada anteriormente nesses animais. A redução dos níveis de glicemia e aumento da sensibilidade à insulina induzidas pela restrição calórica podem contribuir para redução da glicação de proteínas e melhorar as taxas mitogênicas ao longo do processo de envelhecimento. Estudos de restrição calórica com macacos (*Macaca fascicularis*) submetidos à dieta rica em gordura e colesterol nos regimes *ad libitum* comparados a uma restrição calórica de 30% durante 4 anos induziram redução significativa na glicemia de jejum e melhora na sensibilidade à insulina, redução da gordura intra-abdominal, porém não houve alteração do perfil lipídico plasmático nem redução da aterosclerose (Kemnitz et al, 1994; Cefalu et al, 2004).

Além disso, há evidências de que restrição calórica pode normalizar a função mitocondrial diminuída com o envelhecimento, provavelmente por induzir transcrição de genes envolvidos no sistema transportador de elétrons na mitocôndria e biogênese mitocondrial (Anderson and Weindruch, 2007). Assim, esse seria um dos mecanismos possíveis para explicar a correção da resistência periférica à insulina pela RA observada nos camundongos B6-J, já que esses animais apresentam uma disfunção mitocondrial importante. Portanto, a restrição alimentar aplicada em nosso estudo foi bem eficiente para os camundongos B6-J, reduzindo massa adiposa, AGL no plasma, normalizando a

sensibilidade periférica à insulina, e conseqüentemente reduzindo a secreção de insulina e melhorando levemente a tolerância à glicose nesses animais.

O DNP é um composto com atividade protonófora em mitocôndrias que causa desacoplamento mitocondrial, menor eficiência da fosforilação oxidativa, induzindo maior velocidade de respiração mitocondrial e conseqüentemente maior velocidade do metabolismo oxidativo e gasto energético (Harper et al, 2001; Hong et al, 2001). Em doses altas o DNP é extremamente tóxico, porém em doses 100 vezes menor que a dose letal, o DNP foi capaz de reduzir estresse oxidativo, concentrações plasmáticas de TG e de glicose após 5 meses de tratamento e prolongar a sobrevivência de camundongos Swiss ao longo de 2 anos de estudo (Caldeira da Silva et al, 2008). Em nosso estudo, o tratamento com DNP não alterou a massa adiposa, o metabolismo lipídico e o metabolismo corporal nas duas sub-linhagens, B6-UNI e B6-J, resultados provavelmente em consequência das doses extremamente baixas e tempo curto do tratamento. No entanto, o tratamento com DNP trouxe benefícios para a homeostase glicêmica. Nos animais B6-UNI houve diminuição dos níveis plasmáticos de peptídeo C (secreção de insulina *in vivo*) e da resposta glicêmica 15 minutos após carga oral de glicose. Nos animais B6-J, o DNP reduziu a insulinemia de jejum, peptídeo C e o índice HOMA-IR, porém não corrigiu a intolerância à glicose. Sugerimos que a ação desacopladora do DNP nos tecidos periféricos tenha melhorado a sinalização da insulina via aumento do metabolismo lipídico e redução de EROS. Por outro lado, a diminuição da secreção de insulina nos animais tratados com o DNP deve ser consequência tanto da menor resistência periférica à insulina, quanto da menor eficiência da fosforilação oxidativa e conseqüente redução da produção de ATP nas ilhotas. Como efeito de redução de secreção de insulina foi bem mais forte nos animais B6-J que nos B6-UNI, estes animais ainda permaneceram intolerantes à glicose.

Comparando os efeitos do DNP com os efeitos da RA podemos afirmar que o DNP não é um mimético da RA (**Tabela 7**: resumo dos resultados), como postulado por alguns (Wolkow and Iser, 2006; Andrews et al, 2005) pelo menos dentro do período de 3 meses de tratamento, especialmente no que concerne ao metabolismo lipídico.

CONCLUSÕES

Ao comparar os camundongos B6-J (mutantes da NNT) com os B6-UNI (NNT intacta) em seu estado basal (alimentados *ad libitum*), observamos que os B6-J apresentam maior adiposidade, maior teor de TG hepático, menor taxa metabólica corporal, maior insulinemia de jejum, intolerância à glicose, sensibilidade periférica à insulina prejudicada, maior secreção de insulina e maior conteúdo de insulina em ilhotas pancreáticas. Estes resultados nos levam a concluir que a deficiência da NNT nos camundongos B6-J predispõe à síndrome metabólica.

O tratamento dos animais B6-J (mutantes da NNT) com restrição alimentar causou redução da adiposidade, do acúmulo de TG no fígado, dos níveis plasmáticos de colesterol e ácidos graxos livres, aumento da taxa do metabolismo corporal, melhora da tolerância à glicose e da sensibilidade periférica à insulina. O tratamento com dinitrofenol (DNP) nesses animais reduziu a insulinemia de jejum, as concentrações plasmáticas de peptídeo C e melhorou a sensibilidade periférica à insulina (HOMA).

Concluimos que a deleção do gene da NNT é responsável por diferenças metabólicas marcantes, as quais são corrigidas, pelo menos parcialmente, por restrição alimentar ou tratamento com DNP. O tratamento com a restrição alimentar foi mais eficiente do que com o DNP, pois melhorou e corrigiu distúrbios do metabolismo lipídico e melhorou parcialmente o metabolismo glicídico nos animais B6-J.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi F, Brown BW Jr, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(5):937-43.
- Anderson AA, Helmering J, Juan T, Li CM, McCormick J, Graham M, Baker DM, Damore MA, Véniant MM, Lloyd DJ. Pancreatic islet expression profiling in diabetes-prone C57BLKS/J mice reveals transcriptional differences contributed by DBA loci, including *Plagl1* and *Nnt*. *Pathogenetics*. 2009;2(1):1.
- Anderson RM, Weindruch R. Metabolic reprogramming in dietary restriction. *Interdiscip Top Gerontol*. 2007;35:18-38.
- Andrews ZB, Diano S, Horvath TL. Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(11):829-40.
- Arkblad EL, Egorov M, Shakhparonov M, Romanova L, Polzikov M, Rydström J. Expression of proton-pumping nicotinamide nucleotide transhydrogenase in mouse, human brain and *C elegans*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2002;133(1):13-21.
- Arkblad EL, Tuck S, Pestov NB, Dmitriev RI, Kostina MB, Stenvall J, Tranberg M, Rydström J. A *Caenorhabditis elegans* mutant lacking functional nicotinamide nucleotide transhydrogenase displays increased sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(11):1518-25.
- Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. *Cell*. 2012;148(6):1160-71.
- Aston-Mourney K, Wong N, Kebede M, Zraika S, Balmer L, McMahon JM, Fam BC, Favaloro J, Proietto J, Morahan G, Andrikopoulos S. Increased nicotinamide nucleotide transhydrogenase levels predispose to insulin hypersecretion in a mouse strain susceptible to diabetes. *Diabetologia*. 2007;50(12):2476-85.
- Austad SN. Ageing: Mixed results for dieting monkeys. *Nature*. 2012;489(7415):210-11.
- Azumi H, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Mori T, Fujita H, Awano K, Kobayashi K, Maeda K, Hata K, Shinke T, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Itabe H, Hayashi Y, Imajoh-Ohmi S, Itoh H, Yokoyama M. Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(11):1838-44.
- Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci*. 2004;27(10):595-600.
- Barzilai N, She L, Liu BQ, Vuguin P, Cohen P, Wang J, Rossetti L. Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes*. 1999;48(1):94-8.
- Bell M, Wang H, Chen H, McLenithan JC, Gong DW, Yang RZ, Yu D, Fried SK, Quon MJ, Londos C, Sztalryd C. Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes*. 2008;57(8):2037-45.
- Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006;189(1):47-60.
- Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289(3):E429-38.

- Bizouarn T, Meuller J, Axelsson M, Rydström J. The transmembrane domain and the proton channel in proton-pumping transhydrogenases. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1459(2-3):284-90.
- Blanc S, Schoeller D, Kemnitz J, Weindruch R, Colman R, Newton W, Wink K, Baum S, Ramsey J. Energy expenditure of rhesus monkeys subjected to 11 years of dietary restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(1):16-23.
- Bodkin NL, Alexander TM, Ortmeier HK, Johnson E, Hansen BC. Mortality and morbidity in laboratory-maintained Rhesus monkeys and effects of long-term dietary restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003;58(3):212-9.
- Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(4):298-305.
- Bowman TA, Ramakrishnan SK, Kaw M, Lee SJ, Patel PR, Golla VK, Bourey RE, Haram PM, Koch LG, Britton SL, Wisløff U, Lee AD, Najjar SM. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance and steatosis in rats with low aerobic capacity. *Endocrinology*. 2010;151(11):5157-64.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(1):102-10.
- Butler AA, Kozak LP. A recurring problem with the analysis of energy expenditure in genetic models expressing lean and obese phenotypes. *Diabetes*. 2010;59(2):323-9.
- Caldeira da Silva CC, Cerqueira FM, Barbosa LF, Medeiros MH, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell*. 2008;7(4):552-60.
- Cavalca V, Veglia F, Squellerio I, Marenzi G, Minardi F, De Metrio M, Cighetti G, Boccotti L, Ravagnani P, Tremoli E. Glutathione, vitamin E and oxidative stress in coronary artery disease: relevance of age and gender. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(4):267-72.
- Cefalu WT, Wang ZQ, Bell-Farrow AD, Collins J, Morgan T, Wagner JD. Caloric restriction and cardiovascular aging in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): metabolic, physiologic, and atherosclerotic measures from a 4-year intervention trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59(10):1007-14.
- Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, Hoffman E, Veech RL, Sartorelli V. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell*. 2003;12(1):51-62.
- Colman E. Dinitrophenol and obesity: an early twentieth-century regulatory dilemma. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2007;48(2):115-7.
- Dorighello GG, Rovani JC, Luhman CJ, Paim BA, Raposo HF, Vercesi AE, Oliveira HC. Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. *Br J Nutr*. 2013:1-8.
- Dorighello GG. Efeitos da restrição calórica e do 2,4 dinitrofenol sobre o metabolismo e desenvolvimento da aterosclerose em camundongos hipercolesterolêmicos. 2013, Unicamp.
- Duivenvoorden I, Teusink B, Rensen PC, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2005;54(3):664-71.

- Earle SR, O'Neal SG, Fisher RR. Chemical modification of mitochondrial transhydrogenase: evidence for two classes of sulfhydryl groups. *Biochemistry*. 1978;17(22):4683-90.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9468):1415-28.
- Ferguson SJ, Sorgato MC. Proton electrochemical gradients and energy-transduction processes. *Annu Rev Biochem*. 1982;51:185-217.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.
- Folli F, Corradi D, Fanti P, Davalli A, Paez A, Giaccari A, Perego C, Muscogiuri G. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Curr Diabetes Rev*. 2011;7(5):313-24.
- Freeman H, Shimomura K, Cox RD, Ashcroft FM. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a link between insulin secretion, glucose metabolism and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2006a;34(Pt 5):806-10.
- Freeman H, Shimomura K, Horner E, Cox RD, Ashcroft FM. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a key role in insulin secretion. *Cell Metab*. 2006b;3(1):35-45.
- Freeman HC, Hugill A, Dear NT, Ashcroft FM, Cox RD. Deletion of Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase: A new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes* 2006c;55:2153–2156.
- Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes*. 2002;51(10):2951-8.
- Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M, Barja G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J*. 2001;15(9):1589-91.
- Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(2):461S-465S.
- Grundlingh J, Dargan PI, El-Zanfaly M, Wood DM. 2,4-dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death. *J Med Toxicol*. 2011;7(3):205-12.
- Guarente L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell*. 2008;132(2):171-6.
- Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature*. 2006;444(7121):868-74.
- Habegger KM, Hoffman NJ, Ridenour CM, Brozinick JT, Elmendorf JS. AMPK enhances insulin-stimulated GLUT4 regulation via lowering membrane cholesterol. *Endocrinology*. 2012;153(5):2130-41
- Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev*. 2006;20(21):2913-21.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med*. 1985;8(2):89-193.
- Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(9):505-13.
- Harper JA, Dickinson K, Brand MD. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obes Rev*. 2001;2(4):255-65.

- Heiker JT, Kern M, Kosacka J, Flehmig G, Stumvoll M, Shang E, Lohmann T, Dreßler M, Kovacs P, Blüher M, Klötting Nicotinamide nucleotide transhydrogenase mRNA expression is related to human obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(3):529-34.
- Heilbronn LK, Ravussin E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr*. 2003;78(3):361-9.
- Hempenstall S, Picchio L, Mitchell SE, Speakman JR, Selman C. The impact of acute caloric restriction on the metabolic phenotype in male C57BL/6 and DBA/2 mice. *Mech Ageing Dev*. 2010;131(2):111-8.
- Höjeberg B, Rydström J. Purification of mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase from beef heart. *Methods Enzymol*. 1979;55:275-83.
- Hiriart M, Aguilar-Bryan L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(6):E1298-306.
- Hong Y, Fink BD, Dillon JS, Sivitz WI. Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells. *Endocrinology*. 2001;142(1):249-56.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
- Hulsmans M, De Keyzer D, Holvoet P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB J*. 2011;25(8):2515-27.
- Ingram DK, Cutler RG, Weindruch R, Renquist DM, Knapka JJ, April M, Belcher CT, Clark MA, Hatcherson CD, Marriott BM, et al. Dietary restriction and aging: the initiation of a primate study. *J Gerontol*. 1990;45(5):B148-63.
- Ivarsson R, Quintens R, Dejonghe S, Tsukamoto K, in 't Veld P, Renström E, Schuit FC. Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes*. 2005;54(7):2132-42.
- Jackson JB, White SA, Quirk PG, Venning JD. The alternating site, binding change mechanism for proton translocation by transhydrogenase. *Biochemistry*. 2002;41(13):4173-85.
- Kaiyala KJ, Morton GJ, Leroux BG, Ogimoto K, Wisse B, Schwartz MW. Identification of body fat mass as a major determinant of metabolic rate in mice. *Diabetes*. 2010;59(7):1657-66.
- Kemnitz JW, Roecker EB, Weindruch R, Elson DF, Baum ST, Bergman RN. Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. *Am J Physiol*. 1994;266(4 Pt 1):E540-7.
- Kern M, Knigge A, Heiker JT, Kosacka J, Stumvoll M, Kovacs P, Blüher M, Klötting N. C57BL/6JRj mice are protected against diet induced obesity (DIO). *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417(2):717-20.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*. 2001;495(1-2):12-5.
- Lassègue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(4):653-61.
- Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 2000;289(5487):2126-8.
- López-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(9):882-9.
- Masoro EJ. Caloric restriction and aging: an update. *Ex Gerontol*. 2000;35(3):299-305.

- Mathieu P, Poirier P, Pibarot P, Lemieux I, Després JP. Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension*. 2009;53(4):577-84.
- Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett*. 2006;580(12):2917-21.
- McCay CM, Crowell MF, Maynard LA The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition*. 1989;5(3):155-71;
- McClain CJ, Barve S, Deaciuc I. Good fat/bad fat. *Hepatology*. 2007;45(6):1343-6.
- Meimaridou E, Kowalczyk J, Guasti L, Hughes CR, Wagner F, Frommolt P, Nürnberg P, Mann NP, Banerjee R, Saka HN, Chapple JP, King PJ, Clark AJ, Metherell LA. Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nat Genet*. 2012;44(7):740-2.
- Merat S, Casanada F, Sutphin M, Palinski W, Reaven PD. Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(5):1223-30.
- Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Méneur C, Permutt MA, Imai S. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab*. 2005;2(2):105-17.
- Nicholson A, Reifsnyder PC, Malcolm RD, Lucas CA, MacGregor GR, Zhang W, Leiter EH. Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(10):1902-5.
- Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*. 2005;310(5746):314-7.
- Pappan KL, Pan Z, Kwon G, Marshall CA, Coleman T, Goldberg IJ, McDaniel ML, Semenkovich CF. Pancreatic beta-cell lipoprotein lipase independently regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion. *J Biol Chem*. 2005;280(10):9023-9
- Pedersen A, Karlsson GB, Rydström J. Proton-translocating transhydrogenase: an update of unsolved and controversial issues. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40(5):463-73.
- Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, Ventura G, Iacopino S, Sinopoli F, Mattioli PL. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. *Diabetes*. 2001;50(1):159-65.
- Rayner DV, Dalgliesh GD, Duncan JS, Hardie LJ, Hoggard N, Trayhurn P. Postnatal development of the ob gene system: elevated leptin levels in suckling fa/fa rats. *Am J Physiol*. 1997;273(1 Pt 2):R446-50.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. 2005;434(7029):113-8.
- Ronchi JA, Figueira TR, Ravagnani FG, Oliveira HC, Vercesi AE, Castilho RF. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radic Biol Med*. 2013;63:446-56.

- Rydstrom, J., Hoek, J. B. & Ernster, L. In *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed.) vol. 13, pp. 51-88, Academic Press, New York. 1976.
- Rydström J. Energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenases. *Biochim Biophys Acta*. 1977;463(2):155-84.
- Sanz A, Caro P, Ibañez J, Gómez J, Gredilla R, Barja G. Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J Bioenerg Biomembr*. 2005;37(2):83-90.
- Sauer U, Canonaco F, Heri S, Perrenoud A, Fischer E. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2004;279(8):6613-9.
- Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*. 1981;21(5):470-5.
- Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1363(2):100-24.
- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996;273(5271):59-63.
- Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*. 2004;24(36):7779-88.
- Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, Hayman L, Lustig RH, McCrindle B, Mietus-Snyder ML. Progress and challenges in metabolic syndrome in children and adolescents: a scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2009;119(4):628-47.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2002;277(47):44784-90.
- The World Health Report 2002 *Reducing Risks, Promoting Healthy Life* (World Health Organization, Geneva, 2002).
- Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, Mijat V, Goldsworthy M, Moir L, Haynes A, Quarterman J, Freeman HC, Ashcroft FM, Cox RD. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*. 2005;48(4):675-86.
- Tsutsumi A, Motoshima H, Kondo T, Kawasaki S, Matsumura T, Hanatani S, Igata M, Ishii N, Kinoshita H, Kawashima J, Taketa K, Furukawa N, Tsuruzoe K, Nishikawa T, Araki E. Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(1):339-44.
- Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(28):10741-6.
- Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006;444(7121):875-80.
- Verdery RB, Walford RL. Changes in plasma lipids and lipoproteins in humans during a 2-year period of dietary restriction in Biosphere 2. *Arch Intern Med*. 1998;158(8):900-6.

- Vogel R, Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R. The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. *Neurosci Lett*. 1999;275(2):97-100.
- Walford RL, Harris SB, Gunion MW. The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in Biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(23):11533-7.
- Walford RL, Mock D, Verdery R, MacCallum T. Calorie restriction in biosphere 2: alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in humans restricted for a 2-year period. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2002;57(6):B211-24.
- Wang CH, Wang CC, Huang HC, Wei YH. Mitochondrial dysfunction leads to impairment of insulin sensitivity and adiponectin secretion in adipocytes. *FEBS J*. 2013;280(4):1039-50.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.
- Wolkow CA, Iser WB. Uncoupling protein homologs may provide a link between mitochondria, metabolism and lifespan. *Ageing Res Rev*. 2006;5(2):196-208.
- Wong N, Blair AR, Morahan G, Andrikopoulos S. The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) does not affect insulin secretion or glucose tolerance. *Endocrinology*. 2010;151(1):96-102.
- Yang SN, Berggren PO. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev*. 2006;27(6):621-76.
- Yin F, Sancheti H, Cadenas E. Silencing of nicotinamide nucleotide transhydrogenase impairs cellular redox homeostasis and energy metabolism in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1817(3):401-9.

Anexos

Anexo 1: Resumo da literatura sobre homeostase glicêmica e adiposidade em linhagens de camundongos

Referência	Linhagens estudadas	Expressão da NNT	Intolerância à glicose	Insulina	Adiposidade
Toye (2005)	C57BL/6J (Jackson Laboratory) vs C3H/HeH (Oxfordshire, UK)	Deficiente Aumentada	↑	↓ (ilhotas)	
Freeman (2006)	C57BL/6J (Jackson Laboratory) vs C57BL/6J + NNT gene	Deficiente Aumentada (super-expressão)	↑	↓ (ilhotas)	
Aston (2007)	C57BL6 (Hall Institute) vs DBA/2	Normal Aumentada	=	↑ (no GTT)	
Anderson (2009)	C57BL6/J (Jackson Laboratory) vs C57BLKS	Deficiente Aumentada	↓	↑ (ilhotas)	
Nicholson (2010)	C57BL6/J (Jackson Lab) vs C57BL6/NJ (Jackson Lab) Sob dieta rica em gordura	Deficiente Normal	↑	= (plasma)	↑
Wong (2010)	C57BL/6J (Hall Institute) vs C57BL/6NTac (Taconic Farms, Inc.)	NNT mutada mas atividade normal* Normal	=	= (no GTT)	=

*Alegada atividade total de redução de NADP⁺ no pâncreas semelhante nas 2 sub-linhagens por ensaio enzimático atípico.

Anexo 2: Resumo apresentado no XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia 2013 como finalista ao prêmio Álvaro Ozório de Almeida em 07/09/2013, Ribeirão Preto/SP

A DEFICIÊNCIA DA TRANSIDROGENASE DE NUCLEOTÍDEO DE NICOTINAMIDA MITOCONDRIAL EM CAMUNDONGOS PREDISPÕE À SÍNDROME METABÓLICA.
ROVANI, JC, DORIGHELLO, GG, OLIVEIRA, HCF,

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL, UNICAMP, CAMPINAS, SP.

JULIANA CRISTINE ROVANI; GABRIEL GABRIEL DORIGHELLO.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, CAMPINAS - SP - BRASIL.

Palavras-chave: Transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida; Síndrome metabólica; Resistência à insulina

A síndrome metabólica, caracterizada por distúrbios do metabolismo de lípidos e de carboidratos, apresenta alta incidência mundial. A transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida (NNT) é uma translocase de prótons da membrana mitocondrial interna importante para a manutenção do estado redox da organela. Recentemente foi descrito que sua deficiência pode afetar homeostase glicêmica e a secreção de insulina. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da NNT mitocondrial no metabolismo lipídico e glicídico comparando camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6/UNI) e mutada (B6/J). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética da UNICAMP (nº 2620-1). Aos 5 meses de idade, comparados aos animais B6-UNI, os B6-J apresentaram 75% de aumento da massa adiposa perigonadal relativa ($1,84 \pm 0,13$ e $1,06 \pm 0,09$ %, $N=15$, $p < 0,0001$), 9% de redução na massa hepática ($3,96 \pm 0,06$ e $4,37 \pm 0,10$ %, $N=15$, $p < 0,0001$) e 30% de aumento de triglicérides hepáticos ($16,5 \pm 0,87$ e $12,7 \pm 1,04$ mg/g, $N=9$, $p < 0,05$). A lipemia e glicemia não variaram entre os grupos. A insulinemia tanto em jejum ($1,92 \pm 0,31$ e $0,42 \pm 0,17$ ng/mL, $N=6$; $p=0,0018$) quanto no estado alimentado ($4,75 \pm 1,20$ e $0,83 \pm 0,11$ ng/mL, $N=6$; $p=0,015$) estavam 5 vezes maiores nos animais B6-J, os quais apresentaram ainda intolerância à glicose, com aumento de 26% na área sob a curva glicêmica do GTT ($N=18$, $p=0,0232$). O indicador de resistência à insulina HOMA-IR foi 7 vezes maior nos animais B6-J ($N=5$, $p < 0,001$). Resumindo, os B6-J apresentaram maior adiposidade, maior conteúdo de triglicérides hepático, maior insulinemia, resistência à insulina e intolerância à glicose. Podemos concluir que a deleção da NNT nos camundongos B6-J caracteriza o fenótipo da síndrome metabólica.

Apoio: CNPq e FAPESP

Anexo 3: Resumo do artigo publicado

Br J Nutr. 2013 Nov 1:1-8. [Epub ahead of print]

Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice.

Dorighello GG, Rovani JC, Luhman CJ, Paim BA, Raposo HF, Vercesi AE, Oliveira HC.

Author information

Abstract

Different regimens of food restriction have been associated with protection against obesity, diabetes and CVD. In the present study, we hypothesised that food restriction would bring benefits to atherosclerosis- and diabetes-prone hypercholesterolaemic LDL-receptor knockout mice. For this purpose, 2-month-old mice were submitted to an intermittent fasting (IF) regimen (fasting every other day) over a 3-month period, which resulted in an overall 20 % reduction in food intake. Contrary to our expectation, epididymal and carcass fat depots and adipocyte size were significantly enlarged by 15, 72 and 68 %, respectively, in the IF mice compared with the ad libitum-fed mice. Accordingly, plasma levels of leptin were 50 % higher in the IF mice than in the ad libitum-fed mice. In addition, the IF mice showed increased plasma levels of total cholesterol (37 %), VLDL-cholesterol (195 %) and LDL-cholesterol (50 %). As expected, in wild-type mice, the IF regimen decreased plasma cholesterol levels and epididymal fat mass. Glucose homeostasis was also disturbed by the IF regimen in LDL-receptor knockout mice. Elevated levels of glycaemia (40 %), insulinaemia (50 %), glucose intolerance and insulin resistance were observed in the IF mice. Systemic inflammatory markers, TNF- α and C-reactive protein, were significantly increased and spontaneous atherosclerosis development was markedly increased (3-fold) in the IF mice. In conclusion, the IF regimen induced obesity and diabetes and worsened the development of spontaneous atherosclerosis in LDL-receptor knockout mice. Although being efficient in a wild-type background, this type of food restriction is not beneficial in the context of genetic hypercholesterolaemia.

Anexo 4: Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal



UNICAMP



CEUA/Unicamp

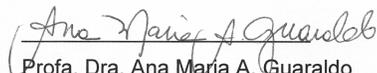
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

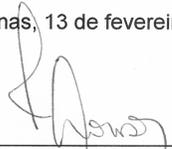
Certificamos que o projeto "Papel da transidrogenase mitocondrial na resposta metabólica à restrição calórica ou desacoplamento mitocondrial em camundongos" (protocolo nº 2620-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira / Juliana Cristine Rovani, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 13 de fevereiro de 2012.

Campinas, 13 de fevereiro de 2012.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>