JULIE TAKADA

A MANUTENÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO É FUNDAMENTAL PARA O
CONTROLE METABÓLICO DO DIABETES MELLITUS INDUZIDO EM RATOS

Tese de Doutorado apresentada
Ao Instituto de Ciências Biomédicas
Da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Fisiologia Humana).

Área de Concentração: Fisiologia Humana
Orientador: Fabio Bessa Lima

São Paulo
2008

RESUMO

TAKADA, J. A manutenção do tecido adiposo é fundamental para o controle metabólico do Diabetes Mellitus induzido em ratos. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença complexa e multifatorial que está associada à elevada mortalidade, morbidade e perda na qualidade de vida, decorrentes de suas complicações que acabam afetando diversos órgãos e sistemas do organismo. A forte associação entre obesidade e resistência à insulina encontrada em vários estudos epidemiológicos denota a participação do tecido adiposo na patogênese das anormalidades metabólicas encontradas no DM. Entretanto, não só o excesso, mas a falta de tecido adiposo também pode desencadear sérias complicações metabólicas. Pacientes com lipodistrofias também manifestam severa resistência à insulina, hipertriacilglicerolemia, DM em idade precoce e esteatose hepática, decorrentes da ausência ou falta de tecido adiposo. Dentre as diversas drogas antidiabéticas disponíveis no mercado, a metformina é a mais comumente utilizada como terapia inicial. Sua ação anti-hiperglicemiante consiste basicamente em reduzir o quadro de resistência à insulina em tecidos e órgãos, como músculo e fígado. As tiazolidinedionas (TZDs) são agonistas do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma- gama (PPAR- γ). Eles exercem seu efeito sensibilizador à insulina ligando-se a estes receptores, promovendo assim a transcrição de vários genes insulino-sensíveis. A expressão desses receptores é mais abundante no tecido adiposo e, deste modo, este tecido é considerado o principal sítio de ação das TZDs. O modelo experimental de DM induzido por estreptozotocina (STZ) durante o período neonatal é caracterizado por hiperglicemia, polidipsia, polifagia, perda de peso, alterados níveis circulantes de insulina e um quadro marcante de resistência à insulina na idade adulta. Esta redução no peso corporal é acompanhada por reduzida massa adiposa, assim como do seu tamanho celular. O presente trabalho teve como objetivo verificar o papel da reduzida massa adiposa sobre as anormalidades metabólicas apresentadas por este modelo experimental induzido em ratos, assim como, avaliar as repercussões metabólicas de um tratamento prolongado por oito semanas e com início na quarta semana de vida dos animais. Cinco grupos de animais foram experimentados: controle não diabético (C); diabéticos tratados com: insulina (I); pioglitazona (P); ou metformina (M) e; grupo diabético não tratado (D). Ao final do

acompanhamento, verificamos que: (1) os animais diabéticos tratados apresentaram melhora na glicemia, dos sintomas de polifagia e polidipsia e na sensibilidade sistêmica à insulina; (2) somente os tratamentos com I e P foram capazes de evitar a perda significativa de peso, assim como da massa adiposa peri-epididimal e subcutânea abdominal. (3) A melhora na responsividade à insulina em adipócitos isolados, representada neste estudo por aumento significativo no transporte intracelular de glicose e na sua metabolização, foi apenas observada nos grupos I e P, sendo praticamente inalterada no grupo M. Concomitante ao aumento significativo na captação de glicose pelos adipócitos, os tratamentos com I ou P promoveram: (4) aumento no conteúdo e na expressão de RNAm de GLUT₄. A normalização da massa adiposa observada nos grupos I e P está relacionada a: (5) aumento na expressão de RNAm de fatores de transcrição diretamente relacionados à adipogênese (PPAR- γ , C/EBP- α , ADD-1/SREBP-1c); (5) aumento na incorporação de glicose em lípidos, juntamente com elevação na atividade e na expressão de RNAm das enzimas lipogênicas FAS e G6PDH); (6) aumento significativo nos níveis séricos de insulina, assim como no seu conteúdo pancreático. (7) Entretanto, somente o grupo P apresentou melhora significativa nos níveis circulantes de AGL, peptídeo C e leptina, sendo que os demais tratamentos apenas foram capazes de promover melhora discreta nestes parâmetros. Assim, o tratamento precoce e em longo prazo com pioglitazona é capaz de reverter o quadro de DM, o que indica que a manutenção da massa adiposa exerce um papel-chave no controle metabólico apresentado por este modelo experimental.

Palavras-chave: Diabetes. Resistência à insulina. Tecido Adiposo. Metabolismo de Glicose. Lipogênese. Lipólise. Expressão Gênica.

ABSTRACT

TAKADA, J. The maintenance of adipose tissue is necessary to the metabolic control of Diabetes Mellitus induced in rats. Thesis (PhD. In Sciences) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2008.

Diabetes Mellitus (DM) is a complex and multifactorial disease, associated with high mortality, morbidity and loss of life quality, decurrent from its complications that affect several organs and systems in the organism. A strong relationship between obesity and insulin resistance, described in many epidemiological studies, denotes the participation of adipose tissue in the pathogenesis of metabolic abnormalities seen in DM. However, not only the excess, but the lack of adipose tissue can also trigger serious metabolic complications. Lipodystrophic patients manifest hypertriacylglycerolemia, severe insulin resistance, early onset DM and fatty liver, as a consequence of the absence or lack of adipose tissue. Amongst many anti-diabetic drugs available in the market, metformin is the most commonly used as initial therapy. Its glucose-lowering effect consists basically in reducing insulin resistance in tissues and organs, such as liver and muscle. The thiazolidinediones (TZDs) are peroxisome proliferator activated receptor- γ agonists. They exert its insulin sensitizing effect by binding to these receptors, which can promote the transcription of many insulin sensitive genes. As the expression of these receptors is more abundant in adipose tissue, this site is considered the main target of TZDs action. The experimental model of streptozotocin (STZ) – induced DM during the neonatal period is characterized by hyperglycemia, polydipsia, polyphagia, weight loss, altered insulin levels and marked picture of insulin resistance during adult age. This weight reduction is followed by loss of adipose mass, as well as its cell size. The present study aimed to verify the role of reduced adipose mass on metabolic abnormalities seen in this DM experimental model induced in rats, as well as to evaluate the metabolic repercussions of long-term treatment, starting on the 4th up to the 12th week-old. Five experimental groups were performed: non-diabetic control (C); treated diabetic with: insulin (I); pioglitazone (P); or metformin (M) and; non-treated diabetic (D). At the end of the treatment, we verified that: (1) all treated diabetic groups showed improvement of glycemia and systemic insulin sensitivity and reduction of food and water intake; (2) only I or P treatments were capable to avoid the significant weight loss, as well as the reduction in epididymal and subcutaneous fat pad masses; (3) the

improvement of insulin responsiveness in isolated adipocytes, here characterized by significant increase in intracellular glucose transport and its metabolization, was only observed in groups I and P, being almost unchanged in group M. Concomitant to this improvement, treatment with I or P promoted: (4) increase in GLUT4 content and its mRNA expression. The normalization of adipose mass in groups I and P is related to: (5) normalization of mRNA expression of transcription factors directly related to adipogenesis (PPAR- γ , C/EBP- α , ADD-1/SREBP-1c); (6) increase in glucose incorporation into lipids, together with rise in lipogenic enzymes FAS and G6PDH activity and mRNA expression; (7) significant rise of insulin levels and of its pancreatic content. (7) However, only group P showed significant improvement of FFA, C-peptide and leptin levels. Therefore, long-term treatment with pioglitazone was indeed able to avoid the development of DM abnormalities, indicating that the maintenance of adipose mass exerts a key role in the metabolic control presented by this experimental model.

Key words: Diabetes - Insulin resistance - Adipose Tissue - Glucose Metabolism - Lipogenesis - Lipolysis - Gene Expression

1 INTRODUÇÃO

A incidência de Diabetes Mellitus (DM) vem aumentando dramaticamente nas últimas duas décadas, atingindo proporções epidêmicas em países industrializados e em desenvolvimento. Em 1985, 30 milhões de diabéticos foram diagnosticados no mundo todo. Em 10 anos, este número apresentou um salto para 135 milhões (representando cerca de 3% da população mundial) e, projeções indicam que a incidência de diabetes irá aumentar em 42%, atingindo assim, 300 milhões de pessoas em 2025 (WINER; SOWERS, 2004).

Uma grande parte deste aumento mundial na incidência de diabetes se deve à globalização, que desencadeou uma série de mudanças no estilo de vida principalmente em países industrializados e em desenvolvimento. Ao mesmo tempo em que, avanços nas áreas da medicina e saúde pública têm aumentado a expectativa de vida da população, com a erradicação de várias doenças infecciosas, a disponibilidade e abundância de alimentos, a produção em massa de alimentos industrializados e do tipo ‘*fast food*’, além da modificação no tipo de atividade profissional em grande parte das ocupações que, há 50 anos, exigiam atividade física intensa e, atualmente, passou a ser uma atividade mais sedentária - em parte devido a avanços na tecnologia e no transporte em massa – têm contribuído para a maior incidência de doenças crônicas relacionadas ou agravadas pela obesidade (ZIMMET et al., 2001; WINER; SOWERS, 2004).

O DM é uma doença complexa e multifatorial que está associada à elevada mortalidade, morbidade e perda na qualidade de vida, decorrentes de suas complicações que acabam afetando diversos órgãos e sistemas do organismo. Um estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstrou que 30 a 45% dos diabéticos apresentam retinopatia, 10 a 20% desenvolvem nefropatia, 20 a 35%, neuropatia e 10 a 25% são portadores de doenças cardiovasculares, a principal causa de morte entre os diabéticos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 1997).

A partir destes dados, o DM pode ser considerado como uma doença com conseqüências devastadoras para a economia e, portanto, uma das principais ameaças para a saúde pública no século 21 (WINER; SOWERS, 2004).

A estreita relação entre diabetes e doenças micro e macrovasculares sugere uma via fisiológica comum que envolve resistência à insulina e fatores de risco convencionais, como hipertensão e dislipidemias. De fato, a resistência periférica à ação

da insulina está associada a um grupo de fatores de risco para doenças cardiovasculares, denominado de síndrome metabólica. As principais características desta síndrome incluem: obesidade central (visceral), dislipidemias (caracterizadas pela hipertriacilglicerolemia, reduzidos níveis de HDL-colesterol e elevados níveis de LDL-colesterol), hiperglicemia e hipertensão arterial (MACFARLANE, 2001).

O padrão de distribuição da gordura corporal também apresenta forte correlação com o DM, onde a adiposidade visceral, mesmo na ausência de obesidade clínica, é considerada como um importante indicador da presença de resistência à insulina e hiperinsulinemia. Alguns trabalhos demonstraram que indivíduos que desenvolveram diabetes já apresentavam adiposidade visceral acima do normal e outros tiveram aumento da mesma acompanhando o desenvolvimento da doença (FUJIMOTO, 2000).

Apesar da forte associação entre obesidade e resistência à insulina encontrada em vários estudos epidemiológicos, outros trabalhos demonstraram que o extremo oposto, a falta de tecido adiposo, também pode desencadear sérias complicações metabólicas. As lipodistrofias representam um grupo heterogêneo de desordens do tecido adiposo caracterizadas pela falta seletiva de gordura em várias partes do corpo (FOSTER, 1998). A ausência/perda de gordura pode variar desde depressões subcutâneas bem marcadas (lipodistrofias localizadas) até extensas e espalhadas, com ausência quase completa de gordura corporal (lipodistrofia congênita generalizada). Este último tipo de lipodistrofia também tem seu quadro agravado pela presença de severa resistência à insulina, hipertriacilglicerolemia, DM em idade precoce e fígado gorduroso (esteatose hepática não alcoólica) decorrentes da ausência de tecido adiposo (GARG, 2000).

O tecido adiposo desempenha um papel ativo na homeostase energética, representando um importante reservatório energético corporal (mobilizando e estocando lipídeos), assim como apresentando tecidos altamente especializados na produção de calor. Além disso, pela disposição de seus depósitos se mostrar de forma abrangente, envolvendo órgãos e estruturas internas, o tecido adiposo apresenta outras funções, oferecendo proteção mecânica contra choques e traumatismos externos e no deslizamento entre vísceras e feixes musculares, garantindo a integridade e funcionalidade dos mesmos (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

As células do tecido adiposo branco armazenam os lipídeos, sob a forma de triacilgliceróis. Estes adipócitos são altamente especializadas, possuindo enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar

triacilgliceróis em períodos onde a oferta de energia é abundante e, promovendo a sua mobilização (lipólise), em períodos de escassez energética (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Já os depósitos de tecido adiposo marrom são responsáveis pela produção de calor, participando ativamente na regulação da temperatura corporal. É interessante notar que estes depósitos podem ser encontrados em fetos e recém-nascidos, porém se encontram praticamente ausentes em adultos. O tecido adiposo branco, por outro lado, apresenta-se mais abrangente, incluindo derme e tecido subcutâneo e, conseqüentemente, acaba por executar esta importante função na manutenção da temperatura corporal.

Ao contrário do que se considerava antigamente, inúmeros trabalhos publicados nos últimos dez anos vêm demonstrando que o papel do tecido adiposo não se restringe apenas ao balanço energético, isolamento térmico e proteção contra choques mecânicos.

A descoberta de adipocinas (fatores secretados pelos adipócitos) e de suas relações diretas e indiretas em processos que contribuem na aterosclerose, hipertensão arterial, resistência à insulina e DM comprovam a importância do tecido adiposo como elo entre adiposidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares, assim como seu papel endócrino modulando o comportamento funcional do próprio tecido e outros, criando mecanismos de *feedback* entre eles (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

Dentre as inúmeras adipocinas que vêm sendo descobertas na atualidade, alguns fatores parecem ter um elo direto no quadro de resistência à insulina. O fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) age diretamente no adipócito, promovendo apoptose, inibição da lipogênese e aumento da lipólise (ARNER, 1995; MONTAGUE et al., 1998). A secreção e expressão do seu RNAm apresentam-se elevadas em obesos, correlacionando positivamente com o aumento do volume dos adipócitos, em especial do tecido adiposo visceral (WINKLER et al., 2003; KAHN; FLIER 2000; HUBE et al., 1999). Em ratos obesos, a neutralização de TNF- α causou melhora significativa na captação de glicose em resposta à ação da insulina, indicando sua relação com a resistência à insulina na obesidade (HOTAMISLIGIL et al., 1993). A resistina, outra adipocina, promove resistência à insulina por meio de aumento da produção hepática de glicose (RAJALA; SCHERER, 2003). Alguns estudos demonstraram que ela também exerce modulação negativa de uma ou mais etapas da sinalização da insulina para captação de glicose (STEPPAN et al., 2001). Níveis elevados são associados à obesidade e sua expressão pode estar aumentada em até 20% em populações com DM tipo 2 em comparação com

a população não diabética (MCTERNAN et al., 2003). Assim como o TNF- α , sua expressão é 2 a 3 vezes maior no depósito visceral, o que poderia representar um importante elo entre obesidade abdominal e diabetes.

Outra importante adipocina é a leptina, hormônio descoberto em 1994, produto do gene *ob* defeituoso no camundongo obeso *ob/ob*. Estes animais apresentam comprometimento no crescimento, na função reprodutiva e redução no limiar de apetite, levando a um quadro de obesidade semelhante àquele observado em animais diabéticos insulino-resistentes (ZHANG et al., 1994).

A leptina desempenha um importante papel na homeostase energética, estimulando, em neurônios do núcleo arqueado hipotalâmico, a expressão de neuropeptídeos ligados a mecanismos de inibição da ingestão alimentar (pro-ópio-melanocortina - POMC e transcrito relacionado à cocaína e anfetamina - CART) e aumentando o gasto energético total – via inervação simpática. Além disso, em outros neurônios dos mesmos núcleos, a leptina inibe a expressão de neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo *agouti* (AgRP) envolvidos nos mecanismos de aumento de ingestão alimentar e na redução de gasto energético (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Alguns trabalhos trouxeram evidências de que a leptina interfere no metabolismo de lipídeos em consequência de sua ação sobre o sistema nervoso central (SNC). Van Dijk e colaboradores (1999) observaram que a infusão de leptina no terceiro ventrículo cerebral em ratos normais promoveu além da anorexia, uma perda maior de gordura em relação ao grupo controle que apenas recebeu a mesma quantidade de ração (*pair-feeding*) do grupo tratado. A justificativa para este achado foi uma acentuada oxidação de lipídeos (aferida por calorimetria indireta) no grupo que recebeu a infusão, em vista dos seus baixos níveis de ácidos graxos livres e cetonas em relação ao grupo controle. Corroborando com os achados de que a sinalização central da leptina é capaz de regular o acúmulo de lipídeos no fígado, Cohen e colaboradores (2002) observaram que o tratamento com leptina no terceiro ventrículo cerebral foi capaz de reduzir a transcrição hepática de esteroil-CoA desaturase (SCD1), enzima relacionada a síntese de triacilgliceróis (TAG) .

A leptina também exerce efeitos sensibilizadores sobre a ação periférica da insulina. Em modelos animais com deficiência de leptina (camundongos *ob/ob*) e em casos de lipodistrofia, onde a perda de massa adiposa é significativa, o estado de hipoleptinemia resultou em severa resistência à insulina, dislipidemia, deposição de gordura no fígado e diabetes (EBIHARA et al., 2001).

Um outro efeito exercido pela leptina é sobre a célula B. A primeira constatação foi a descoberta da expressão de duas isoformas do receptor (ObRa e ObRb) não só nas células B, mas também nas células D (delta). A leptina atua, por via endócrina, inibindo a secreção de insulina, por meio de vários mecanismos, como ativação dos canais de K_{ATP} , via PKC e também reduzindo os níveis celulares de AMPc (FEHMANN et al., 1997; ZHAO et al., 1998; LEE et al., 2003). Além disso, a leptina também inibe a apoptose de células B. Em ratos Zucker diabéticos e obesos (ZDF), a disfunção da célula B está relacionada ao acúmulo de TAG. A superexpressão do receptor Ob-Rb nesses animais, levou a um aumento na oxidação intracelular de ácidos graxos livres e redução no conteúdo de TAG nas células, restaurando assim a secreção de insulina. Somado a isso, a leptina também regula fatores anti-apoptóticos reduzindo os níveis de óxido nítrico (NO) (ZHAO et al., 2006).

A adiponectina (adipoQ) é outra adipocina que possui efeitos diretos na sensibilidade à insulina. Diferente das demais, seus níveis circulantes se encontram reduzidos na obesidade. Hu e colaboradores (1996) observaram que esta adipocina é reduzida no camundongo ob/ob e outros achados demonstraram que na presença de resistência à leptina, há uma redução na síntese de adipoQ, indicando um possível efeito regulatória da leptina sobre a sua síntese (ZHANG et al., 2002).

Classificação do DM

Por ser uma desordem metabólica complexa atingindo vários órgãos em diversos graus, o DM pode ser classificado, baseado em sua etiologia, segundo o *Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* (COMITÊ DA ÁREA DE DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS, *REPORT 1997*), em:

- diabetes mellitus tipo 1 (diabetes insulino-dependente – DM1);
- diabetes mellitus tipo 2 (diabetes mellitus não-insulino-dependente – DM2);

- outros tipos específicos, como defeitos genéticos na função da célula B ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzido por drogas ou agentes químicos e infecções;
- diabetes mellitus gestacional.

Na maioria dos países, 10% dos pacientes diabéticos são diagnosticados como portadores do clássico DM1 e outros 5% apresentam o diabetes atípico do tipo 1 de início tardio. Aproximadamente 5% dos diabéticos apresentam etiologia de diabetes juvenil de início tardio (MODY), uma forma predominantemente herdada ocasionada por defeitos genéticos que causam redução na secreção de insulina. Já os 80% dos pacientes restantes, apresentam o DM2 (GERICH, 2001).

Alguns autores preferem descartar os termos juvenil ou adulto na caracterização do DM1 e DM2, apesar das diferenças que costumam marcar o início da doença, diante da crescente incidência de adultos recém-diagnosticados como diabéticos tipo 1 e de crianças e adolescentes com fenótipos característicos de DM2 (HARRIS; ROBBINS, 1995; PINHAS-HAMIEL et al., 1996; DABELEA et al., 1998).

Fisiopatologia do DM

A homeostase glicêmica é garantida por três eventos inter-relacionados que ocorrem em sincronia após a ingestão de glicose. O primeiro evento ocorre nas células B pancreáticas, onde o aumento na concentração de glicose plasmática estimula a secreção de insulina. Conseqüentemente, este aumento nos níveis circulantes de insulina inibe a produção endógena de glicose e promove o seu armazenamento na forma de glicogênio, efeitos estes que são vistos em maior intensidade no fígado, o principal órgão-alvo. A elevação da insulinemia em resposta à glicose também afeta a captação desta pelos tecidos periféricos e suprime a liberação dos ácidos graxos pelo tecido adiposo (GROOP et al., 1989; DEFRONZO, 1997; DEFRONZO, 1999). A ação da insulina, inibindo a produção hepática de glicose e estimulando a sua utilização nos tecidos periféricos, possibilita a diminuição da glicemia, permitindo a sua manutenção dentro de níveis normais.

O DM1 é uma condição causada pela destruição autoimune das células B pancreáticas por linfócitos T das classes I e II (CD4+ e CD8+) e pela infiltração de macrófagos nas ilhotas, ocasionando a deficiência na secreção de insulina (DANEMAN, 2006). Das hipóteses que tentam explicar a sua patogênese, duas merecem destaque. A

partir da década de 80, propôs-se um modelo que postulava que qualquer indivíduo poderia desenvolver o DM1, entretanto, apenas uma minoria manifestava a doença devido ao maior grau de suscetibilidade, determinada principalmente pela herança genética (EISENBARTH, 1986; REDONDO et al., 2001; DANEMAN, 2006). Com uma maior suscetibilidade, o indivíduo necessitaria apenas se expor a um ou outro fator ambiental, capaz de engatilhar e alterar o sistema imune, provocando o início do processo de destruição celular. Ainda que nenhum estudo tenha sido capaz de comprovar uma relação direta entre tais fatores e o início da doença, cogita-se a participação de vírus (enterovirus, coxsackie, rubéola congênita), toxinas ambientais (nitrosaminas) e alimentos (exposição precoce às proteínas do leite de vaca, cereais ou glúten) na patogênese do DM1 (DANEMAN, 2006).

Na hipótese aceleradora, Wilkin (2001) postula que o diabetes é uma doença única, sem a clássica distinção dos tipos 1 e 2, sendo que apenas a taxa de perda de células B e o ‘acelerador’ específico responsável seriam os determinantes para o desenvolvimento de um ou de outro fenótipo. Os três ‘aceleradores’ seriam: (1) o potencial intrínseco para a alta taxa de apoptose de células B, essencial, porém insuficiente para desencadear o diabetes; (2) a resistência à insulina, resultante do ganho de peso e da inatividade física, sendo crucial para o elo proposto entre os dois tipos de DM, uma vez que a resistência à insulina prejudicaria ainda mais a função das células B que já apresentariam uma massa comprometida em virtude da apoptose acelerada, contribuindo assim para a expressão do diabetes clínico; e (3) a presença em apenas alguns indivíduos de predisposição geneticamente determinada para autoimunidade para células B. Deste modo, em indivíduos insulino-resistentes com predisposição a um maior ritmo de apoptose, as células se tornariam metabolicamente mais ativas e apresentariam maior risco para uma rápida deterioração funcional e manifestação do DM1 clássico. Já, na ausência deste acelerador imune, a apoptose seria mais lenta e a sua progressão levaria ao quadro de DM2.

O DM2 pode ser definido como uma desordem heterogênea que é produto da interação de vários genes e o envolvimento de numerosos fatores de risco adquiridos ou ambientais (obesidade, dietas ricas em gordura, sedentarismo), que levam ao comprometimento da secreção e da sensibilidade à insulina (GERICH, 2001). Os níveis plasmáticos de insulina estão elevados, ao menos no início, porém são geralmente insuficientes para compensar a resistência presente nos tecidos (WILKIN, 2001).

Como dito anteriormente, a perda do controle glicêmico associada a estes defeitos e a progressão da doença resultam em complicações em longo prazo, de ordem microvascular (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovascular (com aceleração do processo aterosclerótico levando a infarto do miocárdio, doença cérebro-vascular e vasculopatia periférica) (DEFRONZO, 1999; BOUCHE; GERICH, 2001; GOLDFINE, 2003). Recentes trabalhos demonstraram a associação entre hiperglicemia e complicações relacionadas ao diabetes, onde se observou que um bom controle glicêmico leva à redução no risco de desenvolvimento de complicações vasculares (BOUCHE; GOLDFINE, 2003)

Resultados do *United Kingdom Prospective Diabetes Study Group* (UKPDS) apontaram para uma redução de 37% no risco de complicações microvasculares a cada ponto porcentual reduzido na média de hemoglobina glicada em indivíduos com DM2. O estudo conduzido pelo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) indicou uma correlação positiva entre diminuições na média de hemoglobina glicada e reduzido risco para progressão de retinopatia em diabéticos tipo 1 (DCCT RESEARCH GROUP, 1993; UKPDS, 1998).

A implementação precoce de estratégias de tratamento mais agressivo que possam corrigir especificamente os defeitos no metabolismo de glicose associado ao DM2 tem o potencial de melhorar a vida dos pacientes por um longo período de tempo. Um trabalho apresentado pelo *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC), um estudo de quatro anos de acompanhamento conduzido pelo DCCT, revelou que a redução no risco para complicações persistiu por vários anos em pacientes que seguiram um tratamento agressivo desde os primeiros cinco anos de diagnóstico (EDIC, 1999). Em um estudo desenvolvido dentro do UKPDS, pacientes diabéticos recém-diagnosticados foram tratados com terapia convencional envolvendo apenas o controle na dieta ou com terapia intensiva, com insulina ou sulfoniluréia. O acompanhamento perdurou 10 anos e, durante este período, uma diferença de 0,9% nos valores de HbA_{1c} foi mantida entre os grupos que receberam a terapia intensiva em relação ao grupo com terapia convencional. Esta diferença foi associada a uma redução de 25% no risco de complicações microvasculares no grupo que recebeu tratamento intensivo. Um outro estudo em paralelo, onde os pacientes foram divididos em tratamento convencional com dieta e terapia intensiva com metformina, demonstrou uma redução de 42% na mortalidade relacionada ao diabetes e decréscimo de 39% no risco de infarto no miocárdio nos pacientes que receberam o tratamento intensivo.

O papel da resistência periférica à insulina

Durante o período de jejum, o fígado desempenha um importante papel na manutenção da glicemia. A produção endógena da glicose é garantida pela glicogenólise e gliconeogênese. A redução na insulinemia, ocasionada pela condição de jejum, leva a um aumento nos níveis circulantes de ácidos graxos que, indiretamente, promovem uma maior produção de glicose, contribuindo para a normalização da glicemia.

Na ausência de insulina, a liberação de ácidos graxos leva a um aumento dos seus níveis circulantes, promovendo indiretamente maior produção de glicose e contribuindo para a normalização da glicemia.

No DM2, os pacientes apresentam: hiperglicemia de jejum, aumento na produção hepática de glicose e níveis plasmáticos alterados de insulina, o que indica um quadro de resistência à insulina e comprometimento na sua secreção (GERICH, 2001).

DeFronzo e colaboradores (1989) observaram que pacientes diabéticos tipo 2 com hiperglicemia de jejum apresentaram excessiva produção de glicose hepática, apesar da alta concentração de insulina plasmática encontrada nestes pacientes, indicando um quadro evidente de resistência hepática à insulina.

A inabilidade da insulina em suprimir a produção de glicose e a forte correlação existente entre o aumento na produção hepática de glicose e a hiperglicemia de jejum apresentada pelos pacientes sugerem o papel crucial do fígado na fisiopatologia do quadro diabético (DEFRONZO et al., 1989; GROOP et al., 1989; MAGNUSSON et al., 1992; DEFRONZO, 1997).

A resistência periférica à insulina pode ser definida como uma condição de reduzida resposta à insulina e é caracterizada por uma inabilidade desse hormônio em promover o transporte de glicose pelo tecido muscular, em reduzir a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo e em suprimir adequadamente a gliconeogênese pelo tecido hepático e renal (GROOP et al., 1989; BONADONNA et al., 1996; DEFRONZO, 1997).

Estudos envolvendo técnicas de *clamp* de glicose constataram a existência da resistência à insulina em pacientes diabéticos tipo 2, onde a captação de glicose era cerca de 30 a 60% menor do que a de indivíduos normais (WILLIAMSON et al., 1966; SHULMAN et al., 1990).

A habilidade da insulina em estimular a captação de glicose se baseia em uma complexa cascata de sinalização que culmina na translocação de uma proteína

transportadora de glicose - GLUT₄ - do compartimento intracelular para a membrana plasmática (DEFRONZO, 1997).

Defeitos na função do receptor de insulina, na sua via de sinalização, no transporte, na fosforilação e na oxidação de glicose e na síntese de glicogênio observados em pacientes diabéticos contribuem para o quadro de resistência periférica (DEFRONZO, 1997), assim como influências hereditárias e adquiridas. Embora raras, mutações no receptor de insulina, nos transportadores de glicose e em proteínas sinalizadoras já foram descritas (FUJIMOTO, 2000). Fatores ambientais como dieta, sedentarismo e idade interagem com predisposição genética e também contribuem para a prevalência da doença (KAHN, 1996; DEFRONZO, 1997).

Vários fatores têm sido propostos como possíveis elos para a associação entre obesidade e resistência à insulina. Dentre eles, os ácidos graxos livres (AGL) merecem destaque frente ao grande número de trabalhos publicados demonstrando o seu papel no desenvolvimento da resistência à insulina e até mesmo na disfunção da célula B característica do DM (UNGER, 1995; BODEN, 1997; MCGARRY; DOBBINS, 1999; SHULMAN, 2000).

Níveis elevados de AGL são comuns na obesidade e a sua liberação na circulação está associada à expansão da massa adiposa (JENSEN et al., 1989). Ainda, na presença de reduzida sensibilidade à insulina no tecido adiposo, há uma redução na supressão da lipólise mediada pela insulina, levando a um aumento nos níveis circulantes de AGL. Estes, por sua vez, poderiam levar à resistência muscular à insulina, a partir do ciclo proposto por Randle e colaboradores (1963), no qual elevados níveis de AGL competiriam com a glicose como substrato energético no músculo e tecido adiposo. Esta resistência foi comprovada em estudos em músculo cardíaco de rato *in vitro* que demonstraram um aumento na taxa de oxidação de ácidos graxos em relação à oxidação de glicose em resposta a elevadas concentrações de AGL, que foi associado a um decréscimo na captação de glicose estimulado pela insulina no músculo (RANDLE et al., 1963). Estudos posteriores em indivíduos saudáveis e diabéticos tipo 2, utilizando condições de *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, constataram uma redução na captação de glicose estimulada pela insulina de 40 a 55%, após uma infusão lipídica quando comparada aos respectivos grupos controle (BODEN et al., 1994; BODEN; CHEN, 1995; RODEN et al., 1996).

Além do ciclo de Randle, outros mecanismos propostos para o desenvolvimento de resistência à insulina frente a elevados níveis de AGL incluem reduções no

transporte de glicose, na atividade da fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K) e na ativação de PKCs atípicas (DRESNER et al., 1999; GRIFFIN et al., 1999).

As anormalidades metabólicas presentes no DM também se estendem ao metabolismo lipídico. Na ausência de insulina ou em situações onde a sua ação está comprometida, ocorre um aumento na lipólise no tecido adiposo, com conseqüente aumento na sua mobilização, resultando em elevados níveis de AGL. Além disso, ocorre um aumento na gliconeogênese e na cetogênese. As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) estão envolvidas nesses processos, permitindo a quebra de aminoácidos para sua utilização como substrato energético. Portanto, uma elevação nos níveis de atividade destas enzimas é indicativa não só de um aumento na gliconeogênese, mas também de injúria hepática (YANARDAG et al., 2005). Alguns trabalhos têm demonstrado que elevações na atividade da ALT poderiam ser indicadores de maior risco para o desenvolvimento de DM2 independente do índice de massa corporal e consumo de álcool (VOZAROVA et al., 2002; WANNAMETHEE et al., 2005). Um mecanismo proposto para explicar este elo seria o acúmulo de gordura hepática estimulando a produção de citocinas, como TNF- α e IL-6, que influenciariam o metabolismo de lipídeos no fígado, levando ao desenvolvimento da esteatose hepática. Deste modo, os elevados níveis de enzimas hepáticas atuariam resposta inflamatória que, por sua vez, prejudicaria a sinalização da insulina (VOZAROVA et al., 2005).

Ao contrário do DM2, defeito na ação da insulina não é enfatizado como tendo papel primordial na patogênese do DM1. Entretanto, a presença de resistência à insulina é freqüente em pacientes diabéticos tipo 1 e, estados fisiológicos de reduzida sensibilidade à insulina, tais como durante a puberdade e gravidez, estão associados ao início do DM1. Além disso, parentes em primeiro grau positivos para anticorpos de ilhota - indicativos de elevado risco para o desenvolvimento de DM1 - apresentam variados graus de resistência à insulina (FOURLANOS et al., 2004).

A resistência à insulina também poderia precipitar a eclosão da hiperglicemia quando a função das células B não é capaz de acompanhar o aumento das necessidades de insulina, em virtude do processo autoimune (no caso do DM1). A hiperglicemia secundária à resistência à insulina poderia aumentar o processo inflamatório na ilhota e a morte das células B. Alguns estudos já demonstraram que a glicose é capaz de induzir a produção de interleucina-1 β (IL-1 β), uma das citocinas pró-inflamatórias nas ilhotas, que regula a expressão do receptor Fas (CD95) – elemento-chave para o engatilamento

da via de sinalização extrínseca para a morte celular - e de autoantígenos nas células B, induzindo a sua apoptose (DONATH et al., 1999; MAEDLER et al., 2002).

Secreção alterada de insulina

A patogênese do DM também envolve o comprometimento do estímulo secretório de insulina mediado pela glicose. Indivíduos normais exibem uma resposta secretória bifásica em resposta à infusão de glicose. Após uma liberação aguda de insulina, ocorre uma segunda fase de secreção diretamente relacionada ao grau de elevação da glicemia (EDELMAN, 1998; DEFRONZO, 1999). Em pacientes diabéticos, a primeira fase de secreção está atenuada ou ausente e este defeito parece desempenhar um papel importante para a hiperglicemia pós-prandial. Além disso, a segunda fase de secreção está diminuída em comparação com indivíduos normais (MITRAKOU et al., 1992; POLONSKY et al., 1996).

É possível observar diferentes níveis de insulinemia em pacientes diabéticos, de acordo com a progressão da doença, com a severidade da resistência à insulina e com o grau de hiperglicemia de jejum. Saad e colaboradores (1989) observaram que pacientes diabéticos com hiperglicemia de jejum moderada (< 140 mg/dL) apresentavam níveis elevados de insulina plasmática durante o teste de tolerância à glicose, que aparentemente não eram suficientes para compensar a resistência à insulina. Entretanto, em glicemias de jejum superiores a 140 mg/dL, foi notada uma diminuição progressiva da insulinemia e deficiente secreção do hormônio.

Ainda que as anormalidades na homeostase glicêmica dos pacientes diagnosticados com DM já estejam identificadas, a sequência etiológica sobre qual defeito - resistência à ou secreção prejudicada de insulina – dá início à cascata de eventos que levam ao desenvolvimento do quadro franco de diabetes continua sendo matéria de constante debate. Entretanto, sabe-se que a resistência à insulina e a sua secreção alterada estão presentes no diagnóstico do diabetes e, assim, estes dois fatores têm sido alvo da ação da grande maioria das drogas desenvolvidas pela indústria farmacêutica (DEFRONZO, 1999; GERICH, 2001).

Tratamento

A intolerância à glicose ocorre como parte de uma síndrome metabólica complexa de resistência à insulina que pode envolver dislipidemia, hipertensão, obesidade entre outros defeitos.

A obesidade é um fator de risco para doenças cardiovasculares e estudos indicam que a perda de peso pode reverter o quadro de resistência à insulina e melhorar marcadamente o controle glicêmico em pacientes obesos com DM.

O controle de peso, dieta equilibrada e a prática de atividades físicas são importantes componentes para o tratamento do DM. Entretanto, quando a dieta e o exercício falham em controlar a hiperglicemia, a intervenção farmacológica tem que ser associada (BECK-NIELSEN et al., 1979; DEFRONZO, 1999).

A indústria farmacêutica vem desenvolvendo, ao longo dos anos, diversas drogas na tentativa de melhorar a qualidade de vida dos diabéticos. Os agentes anti-hiperglicemiantes atuam de diversas maneiras, retardando a absorção de glicose mediante inibição de enzimas dessacaridases (acarbose), estimulando a secreção de insulina (sulfoniluréias, glimetinidas e seus análogos) e melhorando a sua sensibilidade (biguanidas e tiazolidinedionas). Em pacientes que apresentam um quadro de deficiência de insulina, devido à progressão da doença ou mesmo no DM1, a lista de insulinas sintéticas disponíveis no mercado é extensa, possibilitando um estilo de vida com menos privações. Aqui, abordaremos com maiores detalhes, a biguanida, a tiazolidinediona e a insulina por serem objetos de estudo neste trabalho.

Biguanidas

O uso de guanidinas e seus derivados como agentes farmacoterápicos para o tratamento do DM data do início do século XIX. A guanidina foi também reconhecida como o constituinte hipoglicemiante ativo do lilás francês (*Gallega officinalis*), cujo emprego era muito comum na Europa para o tratamento do DM. A primeira biguanida a ser utilizada para esta finalidade foi a fenformina (fenil-etil-biguanida) na década de 50, entretanto, ela foi retirada do mercado devido a sua associação com acidose láctica (BAILEY, 1993; BAILEY e TURNER, 1996; GOODARZI; BRYER-ASH, 2005).

A metformina é outro agente pertencente à classe das biguanidas, com estrutura química distinta da fenformina, com ausência de cadeia lateral lipofílica e sem formação de anéis. Além disso, ela não é metabolizada pelo fígado e, portanto a incidência de acidose láctica é muito rara (CAMPBELL et al., 1996). Esta droga é largamente utilizada no tratamento de DM2. Sua ação anti-hiperglicemiante não envolve estímulo à secreção de insulina e, conseqüentemente, não promove ganho de peso e hipoglicemia. (STUMVOLL et al., 1995; WIERNSPERGER; BAILEY, 1999). Este agente ainda apresenta outros efeitos benéficos, como a diminuição dos níveis de TAG, de LDL-

colesterol e de AGL (REAVEN et al., 1992; JEPPESEN et al., 1994; PERRIELLO et al., 1994).

Figura 1. Estrutura química da

metformina Entre os seus principais efeitos terapêuticos, o decréscimo da produção hepática de glicose e o aumento na captação de glicose no músculo contribuem para promover a redução nas concentrações de glicose sanguínea (GALUSKA et al., 1994; STUMVOLL et al., 1995). Alguns estudos apontam fortes indícios de que a quinase protéica ativada pela AMP (AMPK) esteja envolvida nos efeitos metabólicos da metformina.

A AMPK é uma enzima com três subunidades (uma catalítica - α ; e duas reguladoras - β e γ) reconhecida como a principal reguladora das vias de biossíntese de lipídeos devido ao seu papel na fosforilação e na inativação de enzimas-chave da via lipogênica (ZHOU et al., 2001).

Além disso, a AMPK responde a flutuações nos níveis celulares energéticos, promovendo a manutenção da homeostase energética, desativando vias consumidoras e ativando vias regeneradoras de ATP, em situações de estresse, como, por exemplo, durante o exercício, a isquemia cardíaca e a hipóxia (KEMP et al., 1999). A forma ativa da AMPK promove fosforilação e inibição da acetil-CoA carboxilase (ACC), o que leva a uma redução na produção de malonil-CoA. Esta, por sua vez, deixa de inibir a carnitina palmitoiltransferase I (CPT-1), desencadeando o transporte mediado por CPT-1 de ácidos graxos para a mitocôndria, promovendo a sua beta-oxidação. No músculo cardíaco e esquelético, este efeito leva à melhora na sensibilidade à insulina devido a um aumento na beta-oxidação de ácidos graxos (por meio da redução nos níveis de malonil-CoA) e melhor sinalização intracelular de insulina (mediante redução na geração de metabólitos lipídicos, como ceramidas e diacilglicerol) (SCHIMMACK et al., 2006). Já no fígado, além de estimular a oxidação de ácidos graxos e de inibir a ACC, a AMPK regula uma série de proteínas-chave envolvidas na síntese de colesterol, como a hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMGCR) (SCHIMMACK et al., 2006). Além disso, a AMPK parece mediar a expressão de RNAm da proteína 1c ligadora do elemento responsivo a esterol (SREBP-1 ou ADD-1), um importante fator de

transcrição estimulado pela insulina, envolvido na patogênese da resistência à insulina, dislipidemias e DM2 e cujos genes-alvos incluem enzimas envolvidas na via lipogênica, como a ácido graxo sintase (FAS) (KAKUMA et al., 2000; SHIMOMURA et al., 2000).

Os estudos em tecido adiposo apresentam resultados controversos. Alguns estudos mostram que a AMPK promove a síntese de lipídeos e, outros, a lipólise (SULLIVAN et al., 1994; BERGERON et al., 2001). Alguns pesquisadores relataram que os efeitos periféricos da leptina envolvem a participação da AMPK, especialmente em músculo e fígado (MINOKOSHI et al., 2002). Além disso, esta quinase protéica também estaria envolvida nos efeitos metabólicos da adiponectina (YAMAUCHI et al., 2002). Estudos mais recentes confirmaram esses achados e mostraram que a adipoQ ativa a AMPK e inibe a ACC no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo e que os efeitos metabólicos desta adipocina são abolidos quando há bloqueio da via AMPK-dependente (YAMAUCHI et al., 2002; WU et al., 2003).

Tiazolidinedionas ou Glitazonas (TZDs)

As glitazonas englobam um grupo de compostos com um forte efeito sensibilizador de insulina. Dentre as drogas pertencentes a esta classe, as disponíveis comercialmente são: pioglitazona e rosiglitazona. Assim como a metformina, este grupo de agentes aumenta a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos sem afetar a secreção de insulina. Apresentam como característica de sua estrutura química, um anel diona, que confere a atividade anti-hiperglicêmica que, entretanto, depende da presença de insulina. O restante da estrutura da molécula difere entre as drogas do grupo e é responsável pelas características farmacodinâmicas e farmacocinéticas (SALTIEL e OLEFSKY, 1996; GROSSMAN e LESSEM, 1997; MAGGS et al., 1998; GOMES, 2006).

Figura 2. Estrutura química das tiazolidinedionas atualmente disponíveis no mercado: pioglitazona e rosiglitazona.

Fonte: GOMES, 2006

Estes agentes melhoram a sensibilidade à insulina se ligando ao receptor ativado por proliferadores de peroxissoma – gama (PPAR- γ) que, por sua vez, ao dimerizar com

o receptor de ácido cis-retinóico (RXR), promove a transcrição de inúmeros genes insulino-sensíveis, como a lipase de lipoproteína (LPL), proteína transportadora de ácido graxo (FATP), proteína ligadora de ácido graxo no adipócito (aP2), GLUT₄ entre outros (TRIPATHI et al., 2006).

PPAR- γ pertence a uma sub-família da família de receptores nucleares que regulam a expressão gênica em resposta à ligação em um sítio específico. Os PPARs formam heterodímeros com o RXR que, ao serem ativados, sofrem uma alteração na sua conformação levando a liberação do co-repressor e ligação do co-ativador. Deste modo, os heterodímeros são capazes de propagar ou reprimir a expressão gênica através da ligação do elemento responsivo específico ao PPAR (PPRE) na região promotora dos genes-alvo (HAMMARSTEDT et al., 2005).

Até o momento, três formas de PPAR (α , β , γ) foram identificadas, apresentando diferentes padrões de expressão e funções fisiológicas. O PPAR γ , cujo receptor é alvo das TZDs apresenta 2 isoformas: PPAR γ 1 e γ 2, que diferem na sua porção N-terminal. O PPAR γ 1 apresenta padrão de expressão similar ao PPAR α e está principalmente envolvido na regulação de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos. Já o PPAR γ 2 é predominantemente expresso no tecido adiposo, onde regula a diferenciação do adipócito (HAMMARSTEDT et al., 2005).

O tratamento de pacientes diabéticos com TZDs reduz consistentemente as glicemias de jejum e pós-prandial, os níveis de AGL e aumenta os níveis de HDL-colesterol. Esta melhora é acompanhada por um remodelamento do tecido adiposo, onde grandes adipócitos são substituídos por células menores e mais insulino-sensíveis e, paradoxalmente, por algum ganho de peso (NOLAN et al., 1994; HALLAKOU et al., 1997; MAGGS et al., 1998; OKUNO et al., 1998; SPIEGELMAN, 1998).

Alguns trabalhos relataram efeitos favoráveis das TZDs na sinalização de insulina e na captação de glicose em adipócitos. Apesar de não promover um aumento no conteúdo protéico e na expressão gênica do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e no receptor de insulina (IR) no tecido adiposo, as glitazonas foram capazes de aumentar a fosforilação tirosina destas proteínas, além de ativar a cascata e aumentar a fosforilação em serina da Akt/PKB (HAMMARSTEDT et al., 2005). Outros trabalhos descreveram um aumento na expressão do GLUT₄ com o tratamento com TZDs em células humanas e em modelos animais (YOUNG et al., 1995; SALTIEL; OLEFSKY, 1996; RIEUSSET et al., 1999; FURUTA et al., 2002).

Alguns estudos indicam que este aumento na sensibilidade do adipócito à insulina provavelmente leva a uma inibição das taxas aceleradas de lipólise e uma redução nos níveis plasmáticos de AGL. Com a remodelação do tecido adiposo, as TZDs parecem inibir a liberação de adipocinas, como TNF- α , IL-6 e resistina, conhecidas promotoras de resistência à insulina no músculo e estimular a secreção do hormônio sensibilizador de insulina, a adipoQ (ZIERATH et al., 1998; KAHN et al., 2000; MIYAZAKI et al., 2004). Além disso, estudos em culturas de células e *in vivo* demonstraram que as glitazonas também estimulam diretamente a via da AMPK no fígado e tecido adiposo e, portanto, a ativação desta via também poderia contribuir para o efeito anti-hiperglicemiante das TZDs (SAHA et al., 2004).

Insulinoterapia

A utilização da insulina é tipicamente reservada para pacientes com DM1 e no DM2, quando outros tipos de tratamento, como modificações na dieta, atividade física, e agentes hipoglicemiantes orais, não obtiveram êxito no controle da glicemia.

A insulinoterapia geralmente garante um efetivo controle glicêmico, entretanto, tendo em vista a sua administração (subcutânea) não se assemelhar à via fisiológica (porta-hepática), ela não restaura completamente o padrão normal de controle e, apesar da glicotoxicidade estar diminuída, este tratamento não rompe o ciclo vicioso caracterizado por resistência à insulina e hiperinsulinemia (BAILEY, 1999).

O Modelo Experimental de DM

Por se tratar de uma doença complexa com o envolvimento de vários órgãos e tecidos e sua crescente incidência em todo o mundo, o DM é objeto de estudo em vários laboratórios. Pesquisadores têm voltado a sua atenção aos mecanismos fisiopatológicos ainda não bem elucidados como um caminho para a busca de uma solução para o problema que aflige uma grande parcela da população mundial. Outra linha de pesquisa é o desenvolvimento de novas drogas que atuem nos mecanismos já conhecidos, como a resistência periférica à ação da insulina e a sua secreção prejudicada.

Um grande número de trabalhos tem utilizado um modelo experimental de DM induzido por uma droga diabetogênica (estreptozotocina – STZ) para abordar diversos aspectos relacionados à sua fisiopatologia. Portha e colaboradores (1989) observaram que a injeção de STZ no período neonatal (segundo e quinto dias de vida) em ratos levava a um quadro caracterizado por hiperglicemia, significativo decréscimo nos

estoques pancreáticos de insulina, hipoinsulinemia frente aos elevados níveis de glicose plasmática e altos níveis de glucagon. Diante destas observações, este autor concluiu que o modelo seria viável para o estudo do crescimento das células B e das conseqüências a longo prazo da redução na massa pancreática de células B.

Um estudo comparativo do dia de indução do diabetes revelou que a injeção da droga no dia do nascimento levava a um quadro passageiro de diabetes com alterados níveis plasmáticos de insulina e glicose que voltavam à normalidade logo após a primeira semana de vida (PORTHA et al., 1989). Uma explicação para este efeito seria a produção de novas células B a partir da mitose de células indiferenciadas dos ductos pancreáticos (DUTRILLAUX et al., 1982).

Sabe-se que a estreptozotocina induz o diabetes em ratos a partir de um efeito citotóxico seletivo nas células B do pâncreas, onde o transportador de glicose 2 (GLUT₂) seria o responsável pela captação de glicose e teria participação na captação desta droga apenas pelas células B, explicando assim o dano preferencial por estas células produtoras de insulina. O mecanismo exato da destruição da massa celular ainda não é bem entendido, porém envolve a fragmentação do DNA e de proteínas através da formação de radicais livres alquilantes que levariam a uma redução nos níveis celulares de nucleotídeos e outros compostos, como NAD⁺, causando a rápida necrose das células B (RERUP, 1970; THULESEN et al., 1997; NIELSEN et al., 1999). Esta destruição celular no período neonatal leva a uma diminuição na secreção de insulina, ocasionando o quadro hiperglicêmico. Este, por sua vez, desencadearia o desenvolvimento de secreção de insulina prejudicada, a qual seria compensada por um aumento na secreção deste hormônio pelas células B restantes, mantendo os níveis glicêmicos dentro da normalidade. Entretanto, a partir da terceira semana de vida, estas células se tornariam incapazes de manter este mecanismo de compensação, entrando em exaustão. Neste período, o quadro de diabetes se instalaria com alterados níveis glicêmicos e insulinêmicos, estendendo-se por um período prolongado (AHRÉN, 1989).

Apesar de vários estudos trabalharem com este modelo, existem poucos dados referentes a uma caracterização mais detalhada do ponto de vista metabólico, em particular sobre a existência de resistência periférica à ação da insulina a partir da injeção de estreptozotocina no período neonatal.

Takada e colaboradores (2007) caracterizaram o metabolismo celular deste modelo experimental de diabetes mellitus induzido no período neonatal.

O acompanhamento semanal destes animais até completarem 12 semanas de vida revelou um quadro clínico típico de diabetes descompensado, com hiperglicemias pós-prandial e de jejum, aumento no consumo alimentar e hídrico (polifagia e polidipsia, respectivamente), aumento no volume urinário (poliúria) e presença de glicose na urina (glicosúria). Uma observação peculiar durante este acompanhamento semanal foi o marcante aumento nas glicemias e no consumo alimentar e hídrico destes animais a partir da sétima semana de vida. O teste de tolerância à glicose indicou que este modelo é intolerante, com secreção deficiente de insulina. A análise do conteúdo pancreático indicou uma reserva reduzida de insulina neste modelo experimental de diabetes na 12ª semana de vida deste modelo experimental de diabetes, indicando a exaustão das células B pancreáticas (TAKADA et al., 2007).

Durante as 8 semanas de acompanhamento, observou-se uma piora no quadro diabético entre a 7ª e a 8ª semana de vida, com aumento na glicemia pós-prandial, agravamento dos sintomas clínicos de polifagia e polidipsia e redução no ritmo de ganho de peso semanal. Esta piora provavelmente está relacionada ao ganho de massa corporal, uma vez que estudos utilizando ratos diabéticos induzidos por STZ na fase pré-púbere observaram que a castração não foi capaz de evitar o aumento na glicemia durante a puberdade (TRENT et al., 1983).

Ensaio biológico em adipócitos demonstraram que esse modelo de diabetes STZ-induzido apresentou infra-regulação de receptores de insulina, uma baixa captação de glicose estimulada pela insulina e uma reduzida metabolização da hexose dentro da célula (oxidação ou a conversão a CO₂ e incorporação em lípidos), revelando um quadro claro de resistência à insulina (TAKADA et al., 2007).

Além deste quadro clínico clássico de DM descompensado e resistência à insulina, alguns detalhes nos chamaram a atenção. Foi possível observar um menor ritmo semanal de ganho de peso corporal, resultando ao final de 8 semanas de acompanhamento, em animais com reduzido peso corporal e diminuição marcante na massa de tecido adiposo periepídimal. O reduzido diâmetro dos adipócitos apresentado por esses animais também corroborou com estes dados. É certo que este sério comprometimento na massa de tecido adiposo se deve ao quadro metabólico apresentado pelo devido modelo que, em alguns aspectos, se assemelha ao diabetes lipodistrófico, onde a ausência de tecido adiposo é um fator determinante para o quadro de resistência à insulina (TAKADA et al., 2007).

Tendo em vista estas observações e considerando o fato que este modelo é útil para o estudo do tratamento prolongado do DM, algumas questões podem ser levantadas. É claro que o quadro clínico apresentado por este modelo se deve em grande parte à limitada produção de insulina, resultante da destruição de grande parte das células B pela estreptozotocina, porém existem dúvidas a respeito de quem poderia ser o responsável pelo quadro marcante de resistência à insulina apresentado pelos animais. A reduzida massa de células B produziria hormônio em quantidade insuficiente para normalizar a glicemia, porém esta glicotoxicidade seria capaz de desencadear o processo de resistência periférica à insulina apresentada por este modelo? Ou haveria a participação de algum outro elemento neste processo? Existe um número cada vez maior de trabalhos demonstrando a importância não só metabólica, mas também endócrina do tecido adiposo branco. A observação de reduzida massa de gordura visceral peri-epididimal aliada à reduzida sensibilidade à insulina neste modelo levanta uma questão muito interessante para se avaliar.

O acompanhamento em longo prazo deste modelo experimental mostrou que, apesar de apresentarem glicemias elevadas desde o início, os animais diabéticos tiveram um agravamento do quadro ao longo do tempo, resultante das consequências catabólicas da falta de insulina. Entretanto, quais seriam as repercussões de uma intervenção medicamentosa anterior ao período de piora do quadro destes animais?

Podemos encontrar na literatura, uma infinidade de trabalhos avaliando o efeito do tratamento com diversos anti-hiperglicemiantes orais e insulina em modelos experimentais de diabetes e até mesmo em pacientes diagnosticados como diabéticos. Contudo, pouco se sabe a respeito do efeito de um tratamento precoce em longo prazo sobre o tecido adiposo e a sua relação com a melhora no quadro metabólico, o que indica a necessidade de trabalhos neste sentido.

Com o intuito de verificar a melhora no quadro metabólico e clínico neste modelo experimental, assim como a influência do tecido adiposo e como ele se insere no quadro geral, propomos avaliar o efeito do seu tratamento neste modelo experimental submetido a três abordagens com ações distintas sobre o quadro de diabetes: (a) metformina, que possui ações específicas em minimizar a resistência à insulina; (b) insulina, cuja ação hipoglicemiante está relacionada à redução na piora do quadro metabólico, poupando a função secretória das células B; e (c) pioglitazona, que possui ações específicas em minimizar a resistência à insulina principalmente no tecido adiposo.

6 CONCLUSÕES

A intervenção medicamentosa precoce e em longo prazo corrigiu consideravelmente as anormalidades metabólicas apresentadas pelo modelo experimental de DM induzido por STZ no período neonatal.

Dentre os três tipos de tratamento, a metformina foi a menos efetiva, apresentando redução pouco significativa da glicemia, inalterados níveis de insulina e peptídeo C, pouco efeito sobre a responsividade do tecido adiposo à ação da insulina e manutenção da reduzida massa adiposa.

Os tratamentos com insulina ou pioglitazona tiveram êxito em reduzir efetivamente a glicemia e corrigir significativamente o quadro de resistência à insulina, concomitante a recuperação da massa adiposa.

A recuperação dos coxins adiposos peri-epididimais promovida pelo tratamento com insulina ou pioglitazona pode ser explicada pelo: (a) aumento nos níveis circulantes de insulina; (b) aumento na sensibilidade à insulina para captação intracelular de glicose e; (c) na sua incorporação em lipídeos; (d) maior atividade das enzimas lipogênicas G6PDH e FAS; (e) redução na lipólise e; (f) aumento na expressão gênica de fatores de transcrição envolvidos na adipogênese e lipogênese.

Desta forma, o quadro de resistência à insulina apresentado pelo modelo experimental de DM induzido por STZ no período neonatal está relacionado diretamente à reduzida massa adiposa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.; MONTAGUE, C.T.; PRINS, J.B.; HOLDER, J.C.; SMITH, S.A.; SANDERS, L.; DIGBY, J.E.; SEWTER, C.P.; LAZAR, M.A.; CHATTERJEE, V.K.; O'RAHILLY, S. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. **J. Clin. Invest.** , v. 100, n. 12, p. 3149-53, 1997.

AHRÉN, B.; SKOGLUND, G. Insulin secretion in neonatally streptozotocin-injected mice. **Diabetes Res.**, v. 11, n.4, p. 185-190, 1989.

ALONSO-VALE, M.I.; ANDREOTTI, S.; PERES, S.B.; ANHÊ, G.F.; DAS NEVES BORGES-SILVA, C.; NETO, J.C.; LIMA, F.B. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** , v. 288, n. 4, p. E805-12, 2005.

ARNER, P. Control of lipolysis and its relevance to development of obesity in man. **Diab. Metab. Rev.**, v. 4, p. 507-515, 1988.

ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Ann. Med.** , v. 27, n. 7, p. 435-8, 1995.

BAILEY, C.J. Metformin--an update. **Gen. Pharmacol.** , v. 24, n. 6, p. 1299-309, 1993.

BAILEY, C.J.; TURNER, R.C. Metformin. **N. Engl. J. Med.** , v. 334, p. 574-9, 1996.

BAILEY, C.J. Insulin resistance and antidiabetic drugs. **Biochem. Pharmacol.** , v. 58, n. 10, p. 1511-20, 1999.

BARZILAI, N.; SHE, L.; LIU, B.Q.; VUGUIN, P.; COHEN, P.; WANG, J. et al. Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. **Diabetes** , v. 48, p. 94-8, 1999.

BAZIN, R.; FERRÉ, P. Adipose Tissue Protocols. In AILHAUD, G. (Ed.) **Methods in Molecular Biology**. Totowa, NJ, EUA: Humana Press Inc, 2001, p. 121-7.

BEALES, P.E.; POZZILLI, P.: Thiazolidinediones for the prevention of diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse: implications for human type 1 diabetes. **Diabetes Metab. Res. Rev.** , v. 18, n. 2, p. 114-7, 2002.

BECK-NIELSEN, H.; PEDERSEN, O.; LINDSKOV, H.O. Normalization of the insulin sensitivity and the cellular insulin binding during treatment of obese diabetics for one year. **Acta Endocrinol.**, v. 90, p. 103-112, 1979.

BERGERON, R.; PREVIS, S.F.; CLINE, G.W., PERRET, P.; RUSSELL R.R.; YOUNG, L.H.; SHULMAN, G.I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. **Diabetes** , v. 50, n. 5, p. 1076-82, 2001.

BERGMAYER, H.U.; BERNT, E.D. D-glucose determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: BERGMAYER, H.U. (Ed.) **Methods of Enzymatic Analysis**. Londres, Inglaterra, 1974, p. 1196-1201.

BODEN, G.; CHEN, X.; RUIZ, J.; WHITE, J.V.; ROSSETTI, L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 2438-46, 1994.

BODEN, G.; CHEN, X. Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 1261-8, 1995.

BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes**, v. 46, p. 3-10, 1997.

BONADONNA, R.C.; DEL PRATO, S.; BONORA, E.; SACCOMANI, M.P.; GULLI, G. et al. Roles of glucose transport and glucose phosphorylation in muscle insulin resistance of NIDDM. **Diabetes**, v. 45, p. 915-925, 1996.

BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 68, n. 2, p. 374-8, 1989.

BOUCHE, C.; GOLDFINE, A.B. Prevention of type 2 diabetes: are we ready? **Minerva Med.**, v. 94, n. 1, p. 9-18, 2003.

CAMPBELL, R.K.; WHITE, J.R.; SAULIE, B.A. Metformin: A new oral biguanide. **Clin. Ther.**, v. 18, n. 3, p. 360-71, 1996.

CAREY, D.G.; COWIN, G.J.; GALLOWAY, G.J.; JONES, N.P.; RICHARDS, J.C. et al. Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients. **Obes. Res.**, v. 10, n. 10, p. 1008-15, 2002.

COHEN, P.; MIYASAKI, M.; SOCCI, N.D.; HAGGE-GREENBERG, A.; LIEDTKE, W. et al. Role of stearoyl-CoA desaturase in leptin-mediated weight loss. **Science**, v. 297, p. 240-43, 2002.

CONSIDINE, R.V.; NYCE, M.R.; KOLACZYNSKI, J.W.; ZHANG, P.L.; OHANNESIAN, J.P.; MOORE, J.H. Jr; FOX, J.W.; CARO, J.F. Dexamethasone stimulates leptin release from human adipocytes: unexpected inhibition by insulin. **J. Cell. Biochem.**, v. 65, p. 254-58, 1997.

CORBETT, J.A.; WANG, J.L.; SWEETLAND, M.A.; LANCASTER, J.R.; McDANIEL, M.L. Interleukin-1 beta induces the formation of nitric oxide by beta-cells purified from rodents islets of Langerhans Evidence for the beta-cell as a source and site of action of nitric oxide. **J. Clin. Invest.**, v. 90, p. 2384-91, 1992.

DABELEA, D.; HANSON, R.I.; BENNETT, P.H.; ROUMAIN, J.; KNOWLER, W.C. et al. Increasing prevalence of type 2 diabetes in American Indian children. **Diabetologia**, v. 41, p. 904-10, 1998.

DANEMAN, D. Type 1 Diabetes. **Lancet**, v. 367, p. 847-58, 2006.

DEFRONZO, R.A.; FERRANNINI, E.; SIMONSON, D.C. Fasting hyperglycemia in non-insulin dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. **Metabolism**, v. 38, p. 387-95, 1989.

DEFRONZO, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes: Metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. **Diabetes Rev.**, v. 5, p. 177-269, 1997.

DEFRONZO, R.A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Ann. Intern. Med.**, v. 131, p. 281-303, 1999.

DESPRÉS, J.P. Potential contribution of metformin to the management of cardiovascular disease risk in patients with abdominal obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Metab.**, v. 29, p. 6S53-61, 2003.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, p. 329, p. 977-986, 1993.

DONATH, M.Y.; GROSS, D.J.; CERASI, E.; KAISER, N. Hyperglycemia –induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. **Diabetes**, v. 48, p. 738-44, 1999.

DRESNER, A.; LAURENT, D.; MARCUCCI, M.; GRIFFIN, M.E.; DUFOUR, S. et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **J. Clin. Invest.**, v. 103, p. 253-9, 1999.

DUTRILLAUX, M.C.; PORTHA, B.; ROZÉ, C.; HOLLANDE, E. Ultrastructural study of pancreatic B cell regeneration in newborn rats after destruction by streptozotocin. **Virchows Arch. B. Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.**, v. 39, n. 2, p. 173-85, 1982.

EBIHARA, K.; OGAWA, Y.; MASUZAKA, H.; SHINTANI, M.; MIYANAGA, F. et al. Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipodystrophic diabetes. **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1440-48, 2001.

EDELMAN, S.V. Type II diabetes mellitus. **Adv. Intern. Med.**, v. 43, p. 449-500, 1998

EDWARDS, P.A. Fatty livers and reduced adipose tissue, who wants it? **J. Clin. Invest.**, v. 98, n. 7, p. 1506-7, 1996.

EFANOVA, I.B.; ZAITSEV, S.V.; ZHIVOTOVSKY, B.; KOHLER, M.; EFENDIC, S.; ORRENIUS, S. et al. Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic β -cells: A process dependent on intracellular Ca^{+2} concentration. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 33501-33507, 1998.

EISENBARTH, G.S. Type 1 diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 314, p. 1360-68, 1986.

EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS (EDIC). Design, implementation, and preliminary results of a long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial cohort. **Diabetes Care**, v.22, p. 99-111, 1999.

ERICSSON, J.; JACKSON, S.M.; KIM, J.B.; SPIEGELMAN, B.M.; EDWARDS, P.A. Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 11, p. 7298-7305, 1997.

FARNEY, A.C.; XENOS, E.; SUTHERLAND, D.E.; WIDMER, M.; STEPHANIAN, E.; FIELD, M.J. et al. Inhibition of pancreatic islet beta cell function by tumor necrosis factor is blocked by a soluble tumor necrosis factor receptor. **Transplant Proc.**, v. 25, p. 865-6, 1993.

FEHMANN, H.C.; PEISER, C.; BODE, H.P.; STAMM, M.; STAATS, P.; HEDETOFT, C. et al.: Leptin: A potent inhibitor of insulin secretion. **Peptides**, v. 18, n. 8, p. 1267-73, 1997.

FINE, J.B.; DIGIROLAMO, M. A simple method to predict cellular density in adipocyte metabolic incubations. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 21, n. 9, p. 764-8, 1997.

FINEGOOD, D.T.; MCARTHUR, M.D.; KOJWANG, D.; THOMAS, M.J.; TOPP, B.G.; LEONARD, T. et al. Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 1021-9, 2001.

FLIER, J.S.; HOLLENBERG, A.N. ADD-1 provides major new insight into the mechanism of insulin action. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 25, p. 14191-2, 1999.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.; LIMA, F.B. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 216-29, 2006.

FOSTER, D.W. The lipodystrophies and other rare disorders of adipose tissue. In: FAUCI, A.S.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J. et al. (Eds.) **Harrison's Principles of Internal Medicine**. New York, McGraw-Hill, 2209-2214, 1998.

FOURLANOS, S.; NARENDHAN, P.; BYRNES, G.B.; COLMAN, P.G.; HARRISON, L.C. Insulin resistance is a risk factor for progression to Type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 47, p. 1661-67, 2004.

FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, p. 763-70, 1998.

FUJIMOTO, W.Y. The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Am. J. Med.**, v. 108, n. 6A, p. 9S-14S, 2000.

FURUTA, M.; YANO, Y.; GABAZZA, E.C.; ARAKI-SASAKI, R.; TANAKA, T.; KASTUKI, A. et al. Troglitazone improves GLUT4 expression in adipose tissue in an animal model of obese type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 56, p. 159-71, 2002.

GALUSKA, D.; NOLTE, L.A.; ZIERATH, J.R.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. Effect of metformina on insulin-stimulated glucose transport in isolated skeletal muscle obtained from patients with NIDDM. **Diabetologia**, v. 37, p. 826-32, 1994.

GARG, A. Lipodystrophies: review. **Am. J. Med.**, v. 108, p. 143-152, 2000.

GAVRILOVA, O.; LEON, L.R.; MARCUS-SAMUELS, B.; MASON, M.M.; CASTLE, A.L.; REFETOFF, S.; VINSON, C.; REITMAN, M.L. Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and-independent mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 14623-14628, 1999.

GAVRILOVA, O.; MARCUS-SAMUELS, B.; GRAHAM, D.; KIM, J.K.; SHULMAN, G.I.; CASTLE, A.L. et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 271-8, 2000.

GAVRILOVA, O.; MARCUS-SAMUELS, B.; LEON, L.R.; VINSON, C.; REITMAN, M.L. Leptin and diabetes in lipoatrophic mice. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 850; discussion 850-1, 2000.

GELOEN A, COLLET AJ, GUAY G, BUKOWIECKI LJ: Insulin stimulates in vivo cell proliferation in white adipose tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 25, p. C190-96, 1989.

GERICH, J.E. Matching treatment to pathophysiology in type 2 diabetes. **Clin. Ther.**, v. 23, n. 5, p. 646-659, 2001.

GIRARD, J.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 17, p. 325-352, 1997.

GOMES, M.B. Glitazones and the metabolic syndrome: mechanism of action, pathophysiology and therapeutic indications. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 271-80, 2006.

GOODARZI, M.O.; BRYER-ASH, M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 7, n. 6, p. 654-65, 2005.

GREENSBERG, A.S.; MCDANIEL, M.L. Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 32, Supl.3, p. 24-34, 2002.

GREGOIRE, F.M.; SMAS, C.M.; SUL, H.S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiol. Rev.**, v.78, n.3, p. 783-809, 1998.

GRIFFIN, M.E.; MARCUCCI, M.J.; CLINE, G.W.; BELL, K.; BARUCCI, N.; LEE, D. et al.: Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. **Diabetes** 48:1270-4, 1999.

GROOP, L.C.; BONADONNA, R.C.; DELPRATO, S.; RATHEISER, K.; ZYCK, K.; FERRANNINI, E. et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 205-213, 1989.

GROSSMAN, S.P. The role of glucose, insulin and glucagon in the regulation of food intake and body weight. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 10, n. 3, p. 295-315, 1986.

GROSSMAN, S.; LESSEM, J. Mechanisms and clinical effects of thiazolidinediones. **Exp. Opin. Invest. Drugs**, v. 6, p. 1025-40, 1997.

HALLAKOU, S.; DOARE, L.; FOUFELLE, F.; KERGOAT, M.; GUERRE-MILLO, M.; BETHAULT, M.F. et al. Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. **Diabetes**, v. 46, p. 1393-9, 1997.

HAMMARSTEDT, A.; ANDERSSON, C.X.; SOPASAKIS, V.R.; SMITH, U. The effect of PPAR γ ligands on the adipose tissue in insulin resistance. **Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 73, p. 65-75, 2005.

HAMMARSTEDT, A.; ROTTER-SOPASAKIS, V.; GOGG, S.; JANSSON, P.A.; SMITH, U. Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation following short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin-resistant subjects. **Diabetologia**, v. 48, p. 96-104, 2005.

HARRIS, M.I.; ROBBINS, D.C. Prevalence of adult-onset diabetes in the US population. **Diabetes Care**, v. 18, p. 885-86, 1995.

HERMSDORFF, H.H.M.; MONTEIRO, J.B.R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: Onde está o problema? **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 48, n. 6, p. 803-11, 2004.

HOFMANN, C.; LORENZ, K.; COLCA, J.R. Glucose transport deficiency in diabetic animals is corrected by treatment with the oral antihyperglycemic agent pioglitazone. **Endocrinology**, v. 129, p. 1915-25, 1991.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G.S.; MURRAY, D.L.; CHOY, L.N.; SPIEGELMAN, B.M. Tumor necrosis factor α inhibits signalling from the insulin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 4854-8, 1994.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B.M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 10697-10703, 1996.

HUBE, F.; BRIGEL, M.; LEE, Y.M.; HAUNER, H. Expression pattern of tumor necrosis factor receptors in subcutaneous and omental human adipose tissue: role of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur. Clin. Invest.**, v. 29, n. 8, p. 672-8, 1999.

IKEDA, H.; TAKETOMI, S.; SUGIYAMA, Y.; SHIMURA, Y.; SOHDA, T.; MEGURO, K. et al. Effects of pioglitazone on glucose and lipid metabolism in normal and insulin resistant animals. **Arzneimittelforschung**, v. 40, p. 156-62, 1990.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION TASK FORCE on Diabetes Health Economics: Facts, figures and forecasts. Brussels: International Diabetes Federation, 1997.

ISHIDA, H.; TAKIZAWA, M.; OZAWA, S.; NAKAMICHI, Y.; YAMAGUCHI, S.; KATSUTA, H. et al. Pioglitazone improves insulin secretory capacity and prevents the loss of beta-cell mass in obese diabetic db/db mice: Possible protection of beta cells from oxidative stress. **Metabolism**, v. 53, n. 4, p. 488-94, 2004.

JENSEN, M.D.; HAYMOND, M.W.; RIZZA, R.A.; CRYER, P.E.; MILES, J.M. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 1168-73, 1989.

JEPPESSEN, J.; ZHOU, M.Y.; CHEN, Y.D.; REAVEN, G.M. Effect of metformin on postprandial lipemia in patients with fairly to poorly controlled NIDDM. **Diabetes Care**, v. 17, p. 1093-9, 1994.

KAHN, B.B.; FLIER, J.S. Obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 106, n. 4, p. 473-81, 2000.

KAHN, C.R.; VICENT, D.; DORIA, A. Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. **Annu. Rev. Med.**, v. 47, p. 509-531, 1996.

KAHN, C.R.; CHEN, L.; COHEN, S.E. Unraveling the mechanism of action of thiazolidinediones. **J. Clin. Invest.**, v. 106, p. 1305-07, 2000.

KAKUMA, T.; LEE, Y.; HIGA, M.; WANG, Z.; PAN, W.; SHIMOMURA, I. et al. Leptin, troglitazone and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p. 8536-8541, 2000.

KANU, A.; FAIN, J.N.; BAHOUTH, S.W.; COWAN, G.S. Regulation of leptin release by insulin, glucocorticoids, G(i)-coupled receptor agonists, and pertussis toxin in adipocytes and adipose tissue explants from obese humans in primary culture. **Metabolism**, v. 52, p. 60-66, 2003.

KATAHIRA, H.; NAGAMATSU, S.; OZAWA, S.; NAKAMICHI, Y.; YAMAGUCHI, S. FURUKAWA, H. et al. Acute inhibition of proinsulin biosynthesis at the translational level by palmitic acid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 282, p. 507-10, 2001.

KELLY, I.E.; HAN, T.S.; WALSH, K.; LEAN, M.E. Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, p. 288-93, 1999.

KEMP, B.E.; MITCHLHILL, L.I.; STAPLETON, D.; MICHELL, B.J.; CHEN, Z.P.; WITTERS, L.A. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. **Trends Biochem. Sci.**, v. 24, p. 22-25, 1999.

KIM, J.B.; SPIEGELMAN, B.M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. **Genes Dev.**, v. 10, p. 1096-1107, 1996.

KIM, J.B.; SARRAF, P.; WRIGHT, M.; YAO, K.M.; MUELLER, E.; SOLANES, G. et al. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. **J. Clin. Invest.**, v. 101, n. 1, p. 1-9, 1998.

KLIEWER, S.A.; SUNDSETH, S.S.; JONES, S.A.; BROWN, P.J.; WISELY, G.B.; KOBLE, C.S. et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 4318-4323, 1997.

KOLACZYNSKI, I.J.W.; NYCE, M.R.; CONSIDINE, R.V.; BODEN, G.; NOLAN, J.J.; HENRY, R. et al. Acute and chronic effect of insulin on leptin production in humans. Studies in vivo and in vitro. **Diabetes**, v. 45, p. 699-701, 1996.

KRUEGER, N.J.; HAMMOND, J.B.W. Immunodetection of proteins on "Western" blots using ¹²⁵I labelled protein A. **Methods Mol. Biol.**, v. 3, p. 409-17, 1980.

KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; MIKI, H.; TAMEMOTO, H.; YAMAUCHI, T.; KOMEDA, K. et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. **Mol. Cell**, v. 4, n.4, p. 597-609, 1999.

LACY, P.E.; KOSTIANOVSKY, M. Methods for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Pancreas**, v. 16, n. 1, p. 35-9, 1967.

LARGE, V.; ARNER, P. Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes and hyperlipidaemia. **Diab. Metab.**, v. 24, p. 409-418, 1998.

LEE, A.; MORLEY, J.E. Metformin decreases food consumption and induces weight loss in subjects with obesity with type II non-insulin-dependent diabetes. **Obes. Res.**, v. 6, n. 1, p. 47-53, 1998.

LEE, J.W.; SWICK, A.G.; ROMSOS, D.R. Leptin constrains phospholipase C-protein kinase C-induced insulin secretion via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. **Exp. Biol. Med.**, v. 228, p. 175-82, 2003.

LIU, K.; PATERSON, A.J.; CHIN, E.; KUDLOW, J.E. Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic β cells: Linkage of O-linked GlcNAc to β cell death **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 2820-2825, 2000.

LOTT, J.A.; TURNER, K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. **Clin. Chem.**, v. 21, p. 1754-1760, 1975.

LOWRY, O.H.; ROSEMBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-75, 1951.

LUPI, R.; DEL GUERRA, S.; MARSELLI, L.; BUGLIANI, M.; BOGGI, U.; MOSCA, F. et al. Rosiglitazone prevents the impairment of human islet function induced by fatty acids: evidence for a role of PPAR γ 2 in the modulation of insulin secretion. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 286, p. E560-67, 2004.

MACFARLANE, S.I.; BANERJI, M.; SOWERS, J.R. Insulin resistance and cardiovascular disease. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, p. 713-18, 2001.

MCGARRY, J.D.; DOBBINS, R.L. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. **Diabetologia**, v. 42, p. 128-38, 1999.

MCHUGH, K.M.; DRAKE, R.L. Insulin-mediated regulation of epididymal fat pad malic enzyme. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 62, n.2, p. 227-233, 1989.

MCTERNAN, P.G.; FISHER, F.M.; VALSAMAKIS, G.; CHETTY, R.; HARTE, A.; MACTERNAN, C.L. et al. Resistin and type 2 diabetes: regulation of resistin expression by insulin and rosiglitazone and the effects of recombinant resistin on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, p. 6098-106, 2003.

MAEDLER, K.; SERGEEV, P.; RIS, F.; OBERHOLZER, J.; JOLLER-JEMELKA, H.I.; SPINAS, G.A. et al. Glucose-induced beta cell production of IL-beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 851-60, 2002.

MAGGS, D.G.; BUCHANAN, T.A.; BURANT, C.F.; CLINE, G.; GUMBINER, B.; HSUEH, W.A. et al. Metabolic effects of troglitazone monotherapy in type 2 diabetes mellitus. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Ann. Intern. Med.**, v. 128, p. 176-85, 1998.

MAGNUSSON, I.; ROTHMAN, D.L.; KATZ, L.D.; SHULMAN, R.G.; SHULMAN, G.I. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study. **J. Clin. Invest.**, v. 90, p. 1323-7, 1992.

MÄKIMATTILA, S.; NIKKILÄ, K.; YKI-JÄRVINEN, H. Causes of weight gain during insulin therapy with and without metformin in patients with Type II diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 42, n. 4, p. 406-12, 1999.

MALMSTROM, R.; TASKINEN, M.R.; KARONEN, S.L.; YKI-JÄRVINEN, H. Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. **Diabetologia**, v. 39, p. 993-96, 1996.

MATHIAS, C.P.F.; SALVATO, E.M.; CURI, R.; MALAISSE, W.J.; CARPINELLI, A.R. Effect of epinephrine on ^{86}Rb efflux. ^{45}Ca outflow and insulin release from

pancreatic islets perfused in the presence of propranolol. **Horm. Metabol. Res.**, v. 25, p. 138-41, 1993.

MINOKOSHI, Y.; KIM, Y.B.; PERONI, O.D.; FRYER, L.G.; MULLER, L.C.; CARLING, D. et al.: Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature**, v. 415, p. 339-43, 2002.

MISRA, A.; GARG, A. Clinical features and metabolic derangements in acquired generalized lipodystrophy – Case reports and review of the literature. **Medicine**, v. 82, n.2, p. 129-143, 2003.

MITRAKOU, A.; KELLEY, D.; MOKAN, M.; VENEMAN, T.; PANGBURN, T.; REILLY, J. et al. Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. **N. Engl. J. Med.**, v. 326, p. 22-29, 1992.

MIYAZAKI, Y.; MAHANKALI, A.; WAJCBERG, E.; BAJAJ, M.; MANDARINO, L.J.; DEFRONZO, R.A. Effect of pioglitazone on circulating adipocytokine levels and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, p. 4312-19, 2004.

MONTAGUE, C.T.; PRINS, J.B.; SANDERS, L.; ZHANG, J.; SEWTER, C.P.; DIGBY, J. et al. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. **Diabetes**, v. 47, p. 1384-90, 1998.

MONTAGUE, C.T.; O'RAHILLY, S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. **Diabetes**, v. 49, p. 883-8, 2000.

MORRISON, R.F.; FARMER, S.R. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. **J. Nutr.**, v.130, n. 12, p. 3116S-3121S, 2000.

MOUSTAID, N.; JONES, B.H.; TAYLOR, J. W. Insulin increases lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. **J. Nutr.**, v. 126, p. 865-870, 1996.

MUSCELLI, E.; CAMASTRA, S.; MASONI, A.; BALDI, S.; SIRONI, A.M.; NATALI, A. et al. Acute insulin administration does not affect plasma leptin levels in lean or obese subjects. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 26, p. 940-43, 1996.

NIELSEN, K.; KARLSEN, A.E.; DECKERT, M.; MADSEN, O.D.; SERUP, P.; MANDRUP-POULSEN, T. et al. Beta-cell maturation leads to in vitro sensitivity to cytotoxins. **Diabetes**, v. 48, n. 12, p. 2324-32, 1999.

NOLAN, J.J.; LUDVIK, P.; BEERDSSEN, P.; JOYCE, J.; OLEFSKY, J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, p. 1188-93, 1994.

OKUNO, A.; TAMEMOTO, H.; TOBE, K.; UEKI, K.; MORI, Y.; IWAMOTO, K. et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 1354-61, 1998.

PAPA, P.C.; SERAPHIM, P.M.; MACHADO, U.F. Loss of weight restores GLUT4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice. **Int. J. Obes.**, v. 21, p. 1065-70, 1997.

PERRIELLO, G.; MISERICORDIA, P.; VOLPI, E.; SANTUCCI, A.; SANTUCCI, C.; FERRANNINI, E. et al. Acute antihyperglycemic mechanisms of metformin in NIDDM: evidence for suppression of lipid oxidation and hepatic glucose production. **Diabetes**, v. 43, p. 920-8, 1994.

PINHAS-HAMIEL, O.; DOLAN, L.M.; DANIELS, S.R.; STANDIFORD, D.; KHOURY, P.R.; ZEITLER, P. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. **J. Pediatr.**, v. 128, p. 608-15, 1996.

POITOUT, V.; ROBERTSON, R.P. Minireview: Secondary β cell failure in type 2 diabetes – A convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. **Endocrinology**, v. 143, p. 339-42, 2002.

POLONSKY, K.S.; STURIS, J.; BELL, G.I. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus – a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 777-783, 1996.

PORTHA, B.; BLONDEL, O.; SERRADAS, P.; MCEVOY, R.; GIROIX, M.H.; KERGOAT, M. et al. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. **Diabete Metab.**, v. 15, n. 2, p. 61-75, 1989.

PURNELL, J.Q.; WEYER, C. Weight effect of current and experimental drugs for diabetes mellitus: from promotion to alleviation of obesity. **Treat. Endocrinol.**, v. 2, n. 1, p. 33-47, 2003.

RAJALA, M.W.; SCHERER, P.E. Minireview: the adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Neuroendocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3765-73, 2003.

RANDLE, P.J.; GARLAND, P.B.; HALES, C.N.; NEWSHOLME, E.A. The glucose-fatty-acid cycle, its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, p. 785-89, 1963.

RASOULI, N.; YAO-BORENGASSER, A.; MILES, L.M.; ELBEIN, S.C.; KERN, P.A. Increased plasma adiponectin in response to pioglitazone does not result from increased gene expression. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 290, p. E42-E46, 2006.

REAVEN, G.M.; JOHNSTON, P.; HOLLENBECK, C.B.; SKOWRONSKI, R.; ZHANG, J.C.; GOLDFINE, I.D. et al. Combined metformin-sulfonylurea treatment of patients with noninsulin-dependent diabetes in fair to poor glycemic control. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 74, p. 1020-6, 1992.

REDONDO, M.J.; FAIN, P.R.; EISENBARTH, G.S. Genetics of type 1A diabetes. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 56, p. 69-89, 2001.

REITMAN, M.L.; ARIOGLU, E.; GAVRILOVA, O.; TAYLOR, S.I. Lipoatrophy revisited. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 11, n. 10, p. 410-416, 2000.

REITMAN, M.L.; GAVRILOVA, O. A-ZIP/F-1 mice lacking white fat: a model for understanding lipoatrophic diabetes. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 24, Supl. 4, p. S11-4, 2000.

REPORT OF THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. **Diabetes Care**, v. 20, p. 1183-1197, 1997.

RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacol. Rev.**, v. 22, n. 4, p. 485-518, 1970.

RIEUSSET, J.; AUWERX, J.; VIDAL, H. Regulation of gene expression by activation of the peroxisome proliferators-activated receptor gamma with rosiglitazone (BRL 49653) in human adipocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 265, p. 265-271, 1999.

RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. **J. Biol. Chem.**, v. 239, p. 375-80, 1964.

RODEN, M.; PRICE, T.B.; PERSEGHIN, G.; PETERSEN, K.F.; ROTHMAN, D.L.; CLINE, G.W. et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. **J. Clin. Invest.**, v. 97, p. 2859-65, 1996.

ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B.M. Molecular regulation of adipogenesis. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 16, p. 145-71, 2000.

ROSEN, E.D.; SARRAF, P.; TROY, A.E.; BRADWIN, G.; MOORE, K. et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. **Mol. Cell**, v. 4, p. 611-17, 1999.

RUSSELL, C.D.; PETERSEN, R.N.; RAO, S.P.; RICCI, M.R.; PRASAD, A.; ZHANG, Y.; et al. Leptin expression in adipose tissue from obese humans: depot-specific regulation by insulin and dexamethasone. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 275, p. E507-15, 1998.

RYAN, A.S.; ELAHI, D. The effects of acute hyperglycemia and hyperinsulinemia on plasma leptin levels: its relationships with body fat, visceral adiposity, and age in women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, p. 4433-38, 1996.

SAAD, M.F.; KNOWLER, W.C.; PETTITT, D.J.; NELSON, R.G.; MOTT, D.M.; BENNETT, P.H. Sequential changes in serum insulin concentration during development of non-insulin-dependent diabetes. **Lancet**, v. 1, p. 1356-9, 1989.

SAHA, A.K.; AVILUCEA, P.R.; YE, J.M.; ASSIFI, M.M.; KRAEGEN, E.W.; RUDERMAN, N.B. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 314, p. 580-85, 2004.

SALTIEL, A.R. ;OLEFSKY, J.M. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. **Diabetes**, v. 45, p. 1661-9, 1996.

SCHIMMACK, G.; DEFRONZO, R.A.; MUSI, N. AMP-activated protein kinase: role in metabolism and therapeutic implications. **Diab. Obes. Metab.**, v. 8, p. 591-602, 2006.

SETTER, S.M.; ILTZ, J.L.; THAMS, J.; CAMPBELL, R.K. Metformin hydrochloride in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a clinical review with a focus on dual therapy. **Clin. Ther.**, v. 25, n. 12, p. 2991-3026, 2003.

SHIMABUKURO, M.; KOYAMA, K.; CHEN, G.; WANG, M.Y.; TRIEU, F.; LEE, Y.; et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 4637-4641, 1997.

SHIMABUKURO, M.; ZHOU, Y.T.; LEE, Y.; UNGER, R.H. Troglitazone lowers islet fat and restores beta cell function of Zucker diabetic fatty rats. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 3547-3550, 1998.

SHIMANO, H.; YAHAGI, N.; AMEMIYA-KUDO, M.; HASTY, A.H.; OSUGA, J.; TAMURA, Y.; et al. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 50, p. 35832-35839, 1999.

SHIMOMURA, I.; MATSUDA, M.; HAMMER, R.E.; BASHMAKOV, Y.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. **Mol. Cell**, v. 6, p. 77-86, 2000.

SHULMAN, G.I.; ROTHMAN, D.L.; JUE, T.; STEIN, P.; DEFRONZO, R.A.; SHULMAN, R.G. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, p. 223-8, 1990.

SHULMAN, G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 106, p. 171-6, 2000.

SMITH, S.R.; DE JONGE, L.; VOLAUFOVA, J.; LI, Y.; XIE, H.; BRAY, G.A. Effect of pioglitazone on body composition and energy expenditure: a randomized controlled trial. **Metabolism**, v. 54, n. 1, p. 24-32, 2005.

SPIEGELMAN, B.M. PPAR- gamma: adipogenic regulator and thiazolidinediones receptor. **Diabetes**, v. 47, p. 507-14, 1998.

STEPPAN, C.M.; BAILEY, S.T.; BHAT, S.; BROWN, E.J.; BANERJEE, R.R.; WRIGHT, C.; et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, p. 307-12, 2001.

STUMVOLL, N.; NURJHAN, N.; PERRIELLO, G.; DAILEY, G.; GERICH, J.E. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, p. 550-4, 1995.

SULLIVAN, J.E.; BROCKLEHURST, K.J.; MARLEY, A.E.; CAREY, F.; CARLING, D.; BERI, R.K. Inhibition of lypolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. **FEBS Lett.**, v. 353, p. 33-36, 1994.

TAKADA, J.; MACHADO, M.A.; PERES, S.B.; BRITO, L.C.; BORGES-SILVA, C.N.; COSTA, C.E.; et al. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. **Metabolism**, v. 56, n. 7, p. 977-84, 2007.

THULESEN, J.; ORSKOV, C.; HOLST, J.J.; POULSEN, S.S. Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 62-8, 1997.

TIKKAINEN, M.; HAKKINEN, A.M.; KORSHENINNIKOVA, E.; NYMAN, T.; MAKIMATTILA, S.; YKI-JARVINEN, H. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 2169-2176, 2004.

TIMMONS, T.M.; DUNBAR, B. Protein blotting and immunodetection. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 679-88, 1990.

TOBIN, B.W.; WELCH-HOLLAND, K.R.; MARCHELLO, M.J. Increased body fat in streptozotocin diabetic rats treated with intensive subcutaneous insulin therapy vs. Islet transplantation. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 78, p. 622-30, 2000.

TONELLI, J.; LI, W.; KISHORE, P.; PAJVANI, U.B.; KWON, E.; WEAVER, C.; et al. Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 1621-1629, 2004.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, 1979.

TRENT, D.F.; FLETCHER, D.J.; MAY, J.M.; BONNER-WEIR, S.; WEIR, G.C. Abnormal islet and adipocyte function in young B-cell-deficient rats with near-normoglycemia. **Diabetes**, v. 33, n. 2, p. 170-5, 1984.

TRIPATHI, B.K.; SRIVASTAVA, A.K. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. **Med. Sci. Monit.**, v. 12, n. 7, p. RA130-47, 2006.

UNGER, R.H. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. **Diabetes**, v. 44, p. 863-70, 1995.

UNGER, R.H. Lipotoxic diseases. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 319-36, 2002.

UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in over-weight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). **Lancet**, v. 352, p. 854-865, 1998.

URAKAMI, T.; MORIMOTO, S.; OWADA, M.; HARADA, K. Usefulness of the addition of metformin to insulin in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. **Pediatrics Int.**, v. 47, p. 430-33, 2005.

VAN DIJK, G.; SEELEY, R.J.; THIELE, T.E.; FRIEDMAN, M.I.; JI, H.; WILKINSIN, C.W.; et al. Metabolic, gastrointestinal and CNS neuropeptide effects of brain leptin administration in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. R1425-R1433, 1999.

VAN DIJK, G.; DE VRIES, K.; BENTHEM, L.; NYAKAS, C.; BUWALDA, B.; SCHEURINK, A.J. Neuroendocrinology of insulin resistance: metabolic and endocrine aspects of adiposity. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 480, p. 31-42, 2003.

VAUGHAN, M. The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 237, p. 3354-3358, 1962.

VOZAROVA, B.; STEFAN, N.; LINDSAY, R.S.; SAREMI, A.; PRATLEY, R.E.; BOGARDUS, C.; et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, p. 1889-95, 2002.

WANNAMETHEE, S.G.; LENNON, L.; SHAPER, A.G.; WHINCUP, P. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. **Diabetes Care**, v. 28, n. 12, p. 2913-18, 2005.

WIERNSPERGER, N.F.; BAILEY, C.J. The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms. **Drugs**, v. 58, p. 31-39, 1999.

WILKIN, T.J. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes. **Diabetologia**, v. 44, p. 914-22, 2001.

WILLIAMSON, J.; KREISBERG, R.; FELTS, P. Mechanism for the stimulation of gluconeogenesis by fatty acids in perfused rat liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 56, p. 247-54, 1966.

WINER, N.; SOWERS, J.R. Epidemiology of Diabetes. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 44, p. 397-405, 2004.

WINKLER, G.; KISS, S.; KETSZTHELY, L.; SAPI, Z.; ORY, I.; SALAMON, F. et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 149, n. 2, p. 129-35, 2003.

WOLFE, R.R.; PETERS, E.J. Lipolytic response to glucose infusion in human subjects. **Am. J. Physiol.**, v. 252, p. E218-E223, 1987.

WOLFE, R.R.; KLEIN, S.; CARRARO, F.; WEBER, J.M. Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. E382-E389, 1990.

WU, X.; MOTOSHIMA, H.; MAHADEV, K.; STALKER, T.J.; SCALIA, R.; GOLDSTEIN, B.J. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. **Diabetes**, v. 52, p. 1355-63, 2003.

WU, Z.; ROSEN, E.D.; BRUN, R.; HAUSER, S.; ADELMANT, G.; TROY, A.E.; et al. Cross-regulation of C/EBP-alpha and PPAR-gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. **Mol. Cell**, v. 3, p. 151-58, 1999.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; MINOKOSHI, Y.; ITO, Y.; WAKI, H.; UCHIDA, S.; et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat. Med.**, v. 8, p. 1288-95, 2002.

YANARDAG, R.; OZSOY-SCAN, O.; BOLKENT, S.; ORAK, H.; KARABULUT-BULAN, O. Protective effects of metformin treatment on the liver injury of streptozotocin-diabetic rats. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 24, p. 129-35, 2005.

YOUNG, P.W.; CAWTHORNE, M.A.; COYLE, P.J.; HOLDER, J.C.; HOLMAN, G.D.; KOZKA, I.J.; et al. Repeat treatment of obese mice with BRL 49653, a new potent insulin sensitizer, enhances insulin action in white adipocytes. Association with increased insulin binding and cell-surface GLUT4 as measured by photo-affinity labeling. **Diabetes**, v. 44, p. 1087-92, 1995.

ZHANG, Y.; PROENÇA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, 1994.

ZHANG, Y.; MATHENY, M.; ZOLOTUKHIN, S.; TURNER, N.; SCARPACE, P.J. Regulation of adiponectin and gene expression in white and brown adipose tissue: influence of beta-3 adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1584, p. 115-122, 2002.

ZHAO, A.Z.; BORNFELDT, K.W.; BEAVO, J.A. Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. **J. Clin. Invest.**, v. 102, p. 869-73, 1998.

ZHAO, Y.F.; FENG, D.D.; CHEN, C. Contribution of adipocyte-derived factors to beta-cell dysfunction in diabetes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 38, p. 804-19, 2006.

ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y.; CHEN, Y.; SHEN, X.; FENYK-MELODY, J.; et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 1167-74, 2001.

ZIERATH, J.R.; RYDER, J.W.; DOEBBER, T.; WOODS, J.; WU, M.; VENTRE, J. et al. Role of skeletal muscle in thiazolidinedione insulin sensitizer (PPARgamma agonist) action. **Endocrinology**, v. 139, p. 5034-41, 1998.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, p. 782-7, 2001.