

O FÓSFORO ORGÂNICO FAVORECE A RESISTÊNCIA À INSULINA PERIFÉRICA

JOAO A.A. RINCÓN¹, MARIA A.A. WEILLER¹, MARCIO BRACHAK¹, VINICIUS M. COPES¹, CARLOS C. BARROS², MÁRCIO N. CORRÉA^{1,3}

¹Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) – UFPel
Campus Universitário – 96010 900 – Pelotas/RS – Brasil

www.ufpel.edu.br/nupeec – joaoal13@hotmail.com

²Faculdade de Nutrição – UFPel

³Faculdade de Veterinária – UFPel – marcio.nunescorrea@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O fósforo, desempenha inúmeras funções em diversos processos biológicos, especialmente nos relacionadas ao metabolismo energético (RAINHA et al., 2012). No metabolismo hepático de carboidratos, o fósforo é essencial tanto na fosforilação, quanto na fosfatação de intermediários das vias do metabolismo da glicose e da β -oxidação, assim como na ativação/inibição de enzimas reguladoras das vias da glicólise e da gliconeogênese (BERG et al., 2006).

Dentre as funções do fósforo, destaca-se sua participação no processo de sinalização celular da insulina, situação que requer processos de fosforilação e desfosforilação (FARESE et al., 2012). Normalmente, a sinalização celular inicia pelo estímulo da insulina, que se liga aos receptores de membrana, os quais têm a capacidade de modificar sua estrutura e se auto-fosforilar, assim como fosforilar os substratos 1 e 2 dos receptores de insulina (IRS-1 e IRS-2) (SALTIEL e KAHN, 2001). Em casos de deficiência de fósforo para realizar fosforilações, pode-se desenvolver resistência hepática à insulina, visto que o processo de sinalização hepática não ocorre adequadamente. Deste modo, diminui a resposta biológica dos tecidos responsivos à insulina, alterando o transporte e captação de glicose (De KOSTER e OPSOMER, 2013).

Em humanos, a resistência à insulina está associada à obesidade. Obesos apresentam maior taxa de lipólise e aumento de ácidos graxos não-esterificados (AGNE), o que favorece o acúmulo de ácidos graxos no fígado (FARESE et al., 2012). Sendo assim, prejudica-se o correto funcionamento do metabolismo hepático, causando interferência no transporte de glicose e na funcionalidade dos hepatócitos (BASTARD et al., 2006).

O butafosfan, uma fonte orgânica de fósforo conhecido quimicamente como 1-butilamino-1-metil ácido etilfosfórico, é um derivado do ácido fosfórico capaz de fornecer íons fosfato, essenciais para a catálise de várias reações celulares, como as envolvidas no metabolismo energético (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). Estudos sugerem, que o butafosfan estimula o metabolismo gliconeogênico, mantém a integridade e correto funcionamento do fígado e melhora a captação de glicose através do aumento de insulina (CUTERI, 2008). Portanto, objetivou-se avaliar o efeito do butafosfan como fonte de fósforo orgânico sobre a resistência à insulina em camundongos alimentados com dieta hipercalórica e submetidos a restrição alimentar.

2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) sob o protocolo 6936. Quatorze camundongos machos da linhagem

C57BL/6 e 90 dias de idade foram alojados no Biotério Central da UFPel, sob regime de 12 horas luz e temperatura ambiente controlada (22°C). Durante nove semanas os animais receberam dieta hipercalórica (3610,5 kcal/kg) *ad libitum*, constituída por: 68% de ração comercial (Nuvital®, Brasil), 26% de leite condensado, 1% de amido de milho, 5% de óleo vegetal e 2,5% de água. No início da décima semana, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: butafosfan ($n=7$) e controle ($n=7$). O grupo butafosfan recebeu uma dose de butafosfan (50mg/kg) via subcutânea a cada 12 h por sete dias, enquanto o grupo controle recebeu solução salina com o mesmo intervalo. Concomitantemente, ambos os grupos foram submetidos à restrição alimentar de 40%, ou seja, foi fornecido 60% da média do consumo diário prévio de ração. Finalizada a décima semana, os animais foram anestesiados com Halotano (Cristália®, Brasil) e realizada eutanásia através de decapitação. Amostras de sangue foram coletadas em microtubos sem anticoagulante mediante exanguinação. Finalmente, coletaram-se amostras de fígado em criotubos e armazenados em nitrogênio líquido.

Foram avaliadas as concentrações séricas de AGNE (Wako, USA), glicose e fósforo (Labtest® Brasil) por método colorimétrico e, as concentrações de insulina através do método de ELISA (EMD Millipore, Alemanha) utilizando kits comerciais conforme as recomendações do fabricante. A atividade de células β , sensibilidade à insulina e o índice de resistência à insulina (HOMA-IR) foram calculados a partir dos resultados de glicose e insulina usando o software HOMA-IR calculator (OXFORD UNIVERSITY, UK).

Para análise da expressão gênica no fígado, foi extraído RNA usando Trizol® e colunas MiRNEasy mini Kit (Qiagen, Alemanha). A síntese de cDNA foi realizada utilizando i-script cDNA synthesis Kit (BIORAD®, EUA), conforme as recomendações do fabricante. A reação de PCR em tempo real (qRT-PCR) foi conduzida utilizando SybrGreen Mastermix (Applied Biosystems®, EUA) no sistema ECO™ Real-Time PCR System (iLlumina®, EUA). Para cada ensaio foram corridos 45 ciclos (95°C durante 10s e 60°C durante 30s) e uma curva de dissociação foi incluída no final da reação para verificar a amplificação de um único produto de PCR. O gene β -actina foi utilizado como controle endógeno e avaliados os genes: IRS-1, IRS-2 e Gck. A eficiência da PCR foi calculada usando o software LinReg PCR® (RUIJTER et al., 2009), e com isto, calculada a abundância relativa de cada gene através da equação: Abundância = 1/(eficiência $^{\Delta Cq}$), onde; ΔCq = Cq gene alvo – Cq gene controle. Finalmente, foram comparadas as médias das variáveis avaliadas entre grupos, através do “teste de t” no software GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism®, EUA), sendo considerados significantes valores de $P>0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho são resultados parciais da dissertação de mestrado do segundo autor.

Durante as nove semanas em que foi fornecida a dieta hipercalórica não houve diferença no consumo de ração ($5,83\pm0,25$ g e $5,33\pm0,24$ g; $P=0,16$), no peso ($32,20\pm1,60$ g e $34,71\pm1,32$ g; $P=0,25$) e nos níveis séricos de fósforo ($8,75\pm0,06$ mg/dL e $9,28\pm0,34$ mg/dL; $P=0,36$) entre o grupo controle e o grupo butafosfan respectivamente.

No presente estudo, o grupo butafosfan apresentou maiores concentrações de glicose em relação ao grupo controle (Tabela 1), semelhante ao observado em vacas leiteiras (FÜRLL et al., 2010; PEREIRA, et al., 2013a) e em ovelhas (PEREIRA, et al., 2013b) quando administrado Catosal®, uma associação entre

butafosfan e cianocobalamina. Em contrapartida, o grupo butafosfan apresentou maior concentração de AGNEs, oposto ao observado em vacas leiteiras (FÜRLL et al., 2010; PEREIRA, et al., 2013a) e em ovelhas (PEREIRA, et al., 2013b) tratadas com Catosal®.

De acordo com os resultados do HOMA-IR, o grupo butafosfan apresentou maior grau de resistência à insulina quando comparado com o grupo controle, suportado pela menor sensibilidade à insulina e menor atividade das células β pancreáticas (Tabela 1). No entanto, o modelo matemático HOMA-IR utiliza os níveis glicêmicos e insulinêmicos em jejum para mensurar à resistência à insulina total (OXFORD UNIVERSITY, 2013), sem distinguir entre resistência hepática e periférica, dificultando a interpretação isolada dos resultados. Todavia, no grupo butafosfan foi observada maior expressão dos genes hepáticos IRS-1, IRS-2 e Gck, importantes mediadores do processo de sinalização da insulina e da captação de glicose no fígado. Isto sugere que, no grupo butafosfan, a captação de glicose no fígado estaria aumentada, ou seja, não apresentaria resistência hepática à insulina, quando comparado com o grupo controle.

Tabela1. Parâmetros avaliados em camundongos tratados ou não com butafosfan, alimentados com dieta hipercalórica e submetidos a restrição alimentar.

Variável	Controle	Butafosfan	Valor de P
AGNE (mmol/L)	0,65 ± 0,06	0,85 ± 0,04	0,036
Glicose (mmol/L)	7,51 ± 0,80	11,18 ± 0,25	0,001
Insulina (ng/mL)	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,045
Atividade de células β (%)	41,75 ± 8,43	19,90 ± 2,68	0,019
Sensibilidade a insulina (%)	141,30 ± 8,32	93,67 ± 9,23	0,007
HOMA-IR	0,75 ± 0,04	0,99 ± 0,04	0,008
IRS-1*	0,09 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,019
IRS-2*	0,14 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,026
Gck*	0,18 ± 0,02	0,34 ± 0,046	0,016

Dados apresentados como Média ± Erro padrão, *abundância relativa (resultados da qRT-PCR).

Contudo, os animais tratados com butafosfan apresentaram maiores concentrações séricas de glicose e insulina, decorrente da resistência à insulina, justificada pelo maior HOMA-IR. Porém, também tiveram maior expressão de genes intermediários na sinalização da insulina e captação de glicose no fígado, sugerindo assim, que a resistência à insulina causada pela suplementação com butafosfan seja periférica e não hepática. Dentre os tecidos periféricos, o músculo é responsável por ~75% da captação de glicose e o tecido adiposo por 5% (DeFRONZO, 2004). Portanto, a resistência à insulina no tecido muscular e/ou no tecido adiposo, justificaria os níveis elevados de glicose, insulina e AGNEs observados nos animais tratados com butafosfan. Adicional a isto, sabe-se que o jejum aumenta a produção de glucagon que por sua vez estimula a glicogênese, a gliconeogênese, e posteriormente a lipólise, aumentando a concentração sanguínea dos AGNEs. Além disso, Nuber et al (2015) observaram que vacas tratadas com butafosfan apresentaram maiores concentrações de glucagon, quando comparado as vacas que não foram tratadas. Sendo assim, o aumento de glucagon acompanhado da resistência à insulina no tecido adiposo também justificaria as concentrações de AGNE elevadas nos animais tratados com butafosfan.

4. CONCLUSÕES

O butafosfan, uma fonte de fósforo orgânico promove a resistência à insulina periférica mediante mecanismos que precisam ser melhor elucidados. Além disso, diminui a resistência à insulina hepática, justificado pelo aumento da expressão de genes intermediários da sinalização da insulina e da captação de glicose no fígado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTARD, J. P., et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European cytokine network**, v.1, n.1, p.4-12, 2006.
- BERG, J. M., et al. Glycolysis and gluconeogenesis. **Biochemistry**, 6th edition, p. 433-474, 2006.
- CUTERI; V., et al. Clinical Field evaluation of a butafosfan + vitamin B12 compound in the treatment of sub clinical ketosis in dairy cows. **Oral and Posters Abstracts XXV Jubilee World Buiatrics Congress**. (Budapest). Hungary: 2008.
- DeFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Medical Clinics of North America**, Jul. v. 88, n.4, p.787-835, 2004.
- De KOSTER, J. D. e OPSOMER, G. Insulin resistance in dairy cows. **Veterinary Clinics of Norht América: Food Animal Practice**, v.29, n.2, p.299-322, 2013.
- FARESE, R. V., et al. The problem of establishing relationships between hepatic esteatosis and hepatic insulin resistance. **Cell metabolism**, v.15, n.5, p. 570-573, 2012.
- FÜRLL, M., et al. Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.4155–4164, 2010.
- GONZÁLES, F. H. D. e SILVA, S. C. **Introdução a Bioquímica Veterinária**; Editora da UFRGS; 2^a Edição; p.55, 229-230, 2006.
- NUBER, U. Effects butafosfan with or without cyanocobalamin on the metabolism of early lactating cows with subclinical ketosis. **Journal of Animal physiology and animal nutrition**, v.100, p.146-155, 2015.
- PEREIRA, R. A., et al. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows.z **Animal**, v.7, n.7, p.1143 -1147, 2013a.
- PEREIRA, R. A., et al. Metabolic parameters and dry matter intake of ewes treated with butaphosphan and cyanocobalamin in the early postpartum period, **Small Ruminant Research**, v.114, p.140-145, 2013b.
- RAINHA, R., et al. Phosphorus Metabolism. **Journal Nephrology and Therapeutics**, v.3, p. 21611-0959, 2012.
- RUIJTER, J. M., et al. Amplification Efficiecy: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v.37, n.6, 2009.
- SALTIEL, A. R. e KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, n.6865, p.799-806, 2001.