

## EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA E DA RAPAMICINA NA INGESTÃO, PESO E SENSIBILIDADE À INSULINA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

DRIELE NESKE GARCIA<sup>1</sup>; TATIANA DANDOLINI SACCON<sup>2</sup>; KELVIN RUAN DA SILVA ANDRADE<sup>3</sup>; MONIQUE TOMAZELE ROVANI<sup>4</sup>; CARLOS CASTILHO DE BARROS<sup>5</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – drika\_neske@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – tatianasaccon@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – kelvinruan2@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – mtrovani@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – barroscoppel@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A restrição calórica (RC) pode ser definida como uma redução da ingestão calórica, geralmente entre 20 e 40% a menos quando comparado a ingestão *ad libitum*, sem comprometer a ingestão de nutrientes essenciais (LI et al., 2011). Diversos estudos têm demonstrado o efeito benéfico da RC na longevidade em diferentes espécies como leveduras, *Caenorhabditis elegans*, mosca da fruta, ratos e camundongos (KENYON, 2010). Dentre os efeitos característicos da RC se pode citar a diminuição do tamanho e peso corporal, bem como da adiposidade, além do aumento da sensibilidade à insulina, acompanhada da diminuição dos níveis plasmáticos de glicose e insulina (NIKOLAI et al., 2015).

A rapamicina, é um fármaco imunossupressor (WULLSCHLEGER et al., 2006), muito utilizado na prática clínica em casos de transplantes de órgãos e devido às suas propriedades antiproliferativas, no tratamento do câncer (NIKOLAI et al., 2015). É sabido que a rapamicina quando fornecida de maneira contínua promove aumento da longevidade de maneira muito semelhante ao observado para animais submetidos à RC (ANISIMOV et al., 2011). O uso de rapamicina de maneira crônica promove diminuição significativa do peso corporal, a ingestão de calorias, os níveis séricos de leptina, níveis de glicose em jejum e a quantidade de tecido adiposo em animais recebendo dieta hiperlipídica (BRUCE et al., 2015). Outro estudo também sugere que a administração crônica da rapamicina em ratos submetidos à dieta hiperlipídica diminuiu a ingestão de alimentos, aumentou a perda de peso e a perda específica de massa gorda, porém também induziu intolerância à glicose e hiperinsulinemia (DEBLON et al., 2012).

Existe uma controvérsia entre os estudos com relação ao tempo de tratamento com a rapamicina e os seus efeitos na resistência à insulina. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da restrição calórica e da rapamicina no ganho de peso, consumo da ração e resistência à insulina em camundongos fêmeas.

### 2. METODOLOGIA

Esse estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal, número 23110.009349/2016-31. Foram utilizados 36 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade de 30 dias mantidas em condições controladas de temperatura, luz e umidade ( $22 \pm 2$  °C, ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro e 40%-60% respectivamente).

As 36 camundongas foram distribuídas em três grupos de 12 animais cada: grupo controle, grupo tratamento com rapamicina e grupo submetido à RC de 30%. Todos animais foram alimentados com ração padrão para roedores (Nuvilab® CR-1),

e com água *ad libitum*, sendo o grupo controle e o da rapamicina com ração *ad libitum* e para o grupo RC foi calculado uma quantidade 30% menor levando em consideração a média do consumo da semana anterior do grupo controle. Todos os animais passaram por uma semana de adaptação e logo após foram tratados segundo seu respectivo grupo.

Os animais do grupo tratamento receberam a rapamicina (InLab, Brasil), previamente diluída em DMSO (FANG et al., 2013). A rapamicina foi aplicada intraperitonealmente a cada dois dias durante 91 dias com uma dose de 4mg/kg de peso corporal (FANG et al., 2013). Nos animais do grupo controle e da RC foi administrada uma solução placebo. Os dados de consumo da ração de todos os grupos foram coletados todos os dias durante os 91 dias. Os dados de peso corporal foram coletados uma vez na semana.

Aos 87 dias do experimento, foi realizado o Teste de Tolerância a Insulina (TTI) e o Teste de Tolerância à Glicose (TTG) nas fêmeas. Para o TTI foi administrado a dose de 1 U/kg de peso corporal de insulina intraperitonealmente após duas horas de jejum. O sangue foi coletado através de uma pequena incisão na ponta da cauda nos tempos: 0, 5, 20 e 35 minutos após a injeção de insulina e os níveis de glicose foram mensurados com um glicosímetro (AccuChek Activ, Roche Diagnostics®, USA). Para o TTG foi administrado a dose de 2g/kg de peso corporal de glicose intraperitonealmente após 12h de jejum. O sangue também foi coletado através de uma pequena incisão na ponta da cauda nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção de insulina e os níveis de glicose foram mensurados com um glicosímetro.

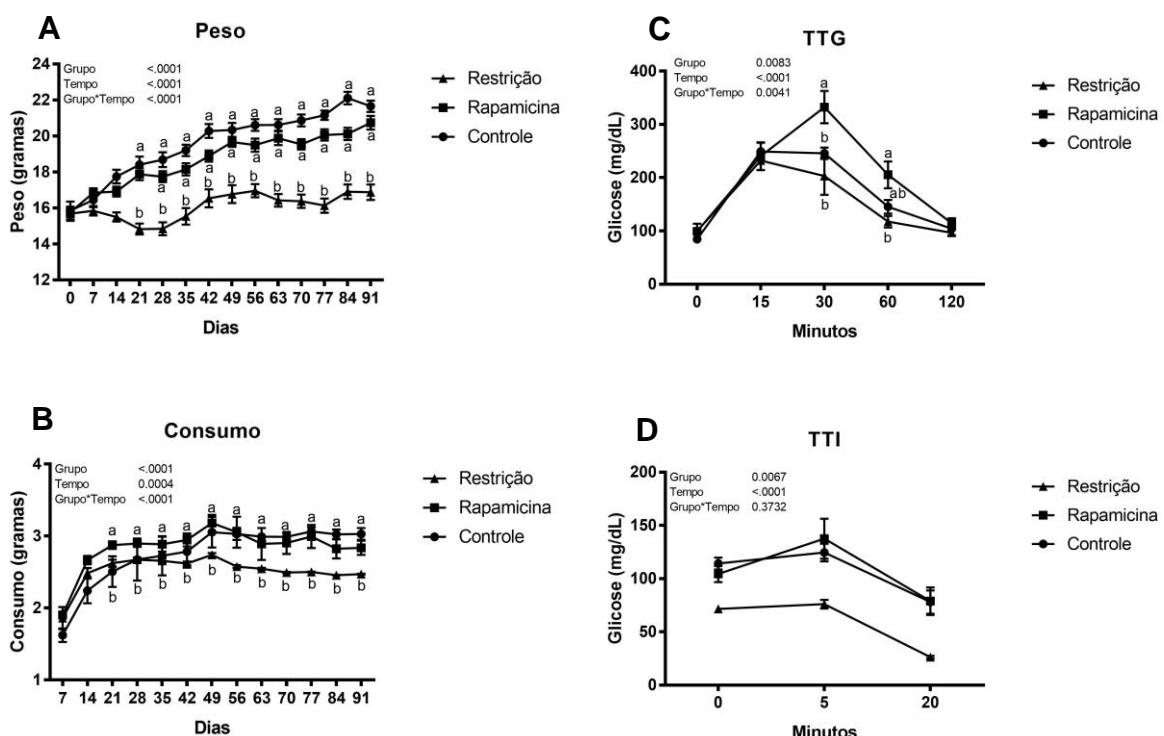
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 6.0. O teste estatístico Two Way ANOVA para medidas repetidas foi utilizado para a análise de variáveis de consumo, peso corporal, TTI e TTG comparando com todos os grupos: controle, rapamicina e RC. O teste de Tukey foi utilizado para múltiplas comparações. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativamente estatísticos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso corporal foi menor no grupo RC, havendo diferença entre os grupos ( $P < 0,0001$ ), quanto ao tempo de experimento ( $P < 0,0001$ ) e houve interação entre grupo e tempo ( $P < 0,0001$ ), sendo diferente a partir da terceira semana até o final do experimento (Gráfico 1A). O ganho de peso foi menor no grupo RC como esperado já que houve a diminuição intencional do consumo, porém não houve diferença entre o ganho de peso do grupo rapamicina comparado ao grupo controle o que pode ser justificado pelo consumo semelhante entre os grupos e pela dosagem de rapamicina utilizada. JOHNSON et al. (2015), observaram que a taxa de ganho de peso diminuiu de forma dependente da dose, onde a dose máxima utilizada, equivalente a 8mg/kg de peso de rapamicina, o dobro do utilizado em nosso estudo, mostrou diminuição do peso em camundongos fêmeas.

O consumo da ração foi maior no grupo rapamicina e houve diferença entre os grupos ( $P < 0,0001$ ), quanto ao tempo de experimento ( $P = 0,0004$ ) e houve interação entre grupo e tempo ( $P < 0,0001$ ) a partir da terceira semana até o final do experimento (Gráfico 1B). Não houve diferença entre o consumo do grupo rapamicina e controle, no entanto FANG et al. (2013), observou que o consumo e o peso corporal dos camundongos tratados com rapamicina em seu experimento, diminuíram somente após 20 semanas de tratamento em comparação ao controle,

demonstrando que os efeitos da rapamicina sobre o peso e o consumo são dependentes da cronicidade do tratamento.



**Gráfico 1.** Análise do peso corporal (A), consumo da ração (B), Teste de Tolerância Glicose (TTG) (C) e Teste de Tolerância a insulina (TTI) (D) dos grupos restrição calórica, rapamicina e controle comparados ao devido tempo de experimento. Letras diferentes representam diferença entre os grupos.

Os maiores níveis glicêmicos no TTG foram observados para o grupo rapamicina e houve diferença entre os grupos ( $P = 0,0083$ ), quanto ao tempo de experimento ( $P < 0,0001$ ) e houve interação entre grupo e tempo ( $P = 0,0041$ ), sendo maior no grupo rapamicina no tempo 30 e 60 minutos (Gráfico 1C). Portanto, as fêmeas do grupo rapamicina apresentaram maior intolerância a glicose. FANG et al. (2013) obteve resultado semelhante quando o tratamento foi de 2, 6 e 20 semanas, porém a partir da semana 20 notou-se uma metabolização mais rápida da glicose, embora a glicemia ainda fosse maior no grupo rapamicina comparado ao controle. Estudos têm associado o efeito da rapamicina sobre a resistência à insulina a inibição de via de sinalização dependente de insulina que leva a expressão de transportadores de glicose GLUT 4, contribuem para esse efeito sobre o músculo e o aumento da lipólise hepática também parece contribuir. (DEBLON et al., 2012).

Quanto ao TTI, os menores níveis glicêmicos foram observados para o grupo RC, e houve diferença entre os grupos ( $P = 0,0067$ ), quanto ao tempo de experimento ( $P < 0,0001$ ), porém não houve interação entre grupo e tempo ( $P = 0,3732$ ) (Gráfico 1D). As fêmeas do grupo RC tiveram maior sensibilidade à insulina durante o teste comparado ao grupo controle e ao RC. Outros estudos têm encontrado o mesmo resultado, WIESENBORN et al. (2014) encontraram maior expressão de GLUT 4 no músculo de camundongos submetidos à RC comparado com controle *Ad libitum*. Além disso, aumento dos níveis plasmáticos de adiponectina devido a diminuição da gordura corporal podem contribuir para este efeito (NIKOLAI et al., 2015).

#### 4. CONCLUSÕES

Nesse estudo, camundongos fêmeas tratadas com rapamicina apresentaram maior intolerância a glicose, porém sem alteração do peso corporal, enquanto isso as fêmeas submetidas a RC tiveram menor peso acompanhado de maior sensibilidade a insulina. Visto que ambos os tratamentos estão associados a longevidade, mais estudos são necessários para entender como seus efeitos divergentes levam a este fenótipo.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LI, L; FU, Y.C; XU, J.J; CHEN, X.C; LIN, X.H; LUO, L.L. Caloric restriction promotes the reproductive capacity of female rats via modulating the level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1). **General and Comparative Endocrinology**, Shantou, v. 174, n. 2, p. 232 – 7, 2011.
- KENYON, C.J. The genetics of ageing. **Nature**, California, v. 464, n. 7288, p. 504 – 12, 2010.
- NIKOLAI, S; PALLAUF, K; HUEBBE, P; RIMBACH, G. Energy restriction and potential energy restriction mimetics. **Nutrition Research Reviews**, Kiel, v. 28, n. 2, p. 100-120, 2015.
- WULLSCHLEGER, S; LOEWITH, R; HALL, M.N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, Basel, v. 124, n. 3, p. 471-84, 2006.
- ANISIMOV, V.N; ZABESHINSKI, M.A; POPOVICH, I.G; PISKUNOVA, T.S; SEMENCHENKO, A.V; TYNDYK, M.L; YUROVA, M.N; ROSENFIELD, S.V; BLAGOSKLONNY, M.V. Rapamycin increases lifespan and inhibits spontaneous tumorigenesis in inbred female mice. **Cell Cycle**, St. Petersburg, v. 10, n. 24, p. 4230-6, 2011.
- BRUCE, E; SAKARYA, Y; MATHENY, M; KIRICHENKO, N; TOKLU, H; MORGAN, D; TUMER, N; CARTER, C; SCARPACE, P. Rapamycin as a Potential Treatment for Obesity. **The FASEB Journal**, Florida, v. 29, n. 1, p. 818-6, 2015.
- DEBLON, N; BOURGOIN, L; VEYRAT-DUREBEX, C; PEYROU, M; VINCIGUERRA, M; CAILLON, A; MAEDER, C; FOURNIER, M; MONTET, X; ROHNER-JEANRENAUD, F; FOTI, M. Chronic mTOR inhibition by rapamycin induces muscle insulin resistance despite weight loss in rats. **British Journal of Pharmacology**, Geneva, v. 165, n. 7, p. 2325-40, 2012.
- FANG, Y; WESTBROOK, R; HILL, C; BOPARAI, R.K; ARUM, O; SPONG, A; WANG, F; JAVORS, M.A; CHEN, J; SUN, L.Y; BARTKE, A. Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. **Cell Metabolism**, Springfield, v. 17, n. 3, p. 456-62, 2013.
- JOHNSON, S.C; YANOS, M.E; BITTO, A; CASTANZA, A; GAGNIDZE, A; GONZALES, B; GUPTA, K; HUI, J; JARVIE, C; JOHNSON, B.M; LETEXIER, N; MCCANTA, L; SANGESLAND, M; TAMIS, O; UHDE, L; VAN DEN ENDE, A; RABINOVITCH, P.S; SUH, Y; KAEBERLEIN, M. Dose-dependent effects of mTOR inhibition on weight and mitochondrial disease in mice. **Frontiers in Genetics**, New York, v. 6, p. 247, 2015.
- WIESENBORN, D.S; MENON, V; ZHI, X; DO, A; GESING, A; WANG, Z; BARTKE, A; ALTOMARE, D.A; MASTERNAK, M.M. The effect of calorie restriction on insulin signaling in skeletal muscle and adipose tissue of Ames dwarf mice. **Aging**, Albany, v. 6, n. 10, p. 900-912, 2014.