



## **MENSURAÇÃO DE MARCADORES DA INFLAMAÇÃO E DA RESISTÊNCIA À INSULINA NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS GOTO-KAKIZAKI DIABÉTICOS TIPO 2, NÃO OBESOS, SUPLEMENTADOS COM ÔMEGA-3**

ISABELE DA SILVA RAMOS; GLAYCE TAVARES RODRIGUES; RENATA GORJÃO;  
RUI CURI; SANDRO M. HIRABARA

### **RESUMO**

Este estudo investigou os efeitos da suplementação com ômega-3 no músculo esquelético gastrocnêmio de ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo não obeso de Diabetes Mellitus Tipo 2 (T2D). O ômega-3 era composto por 540 mg/g de ácido eicosapentaenoico (EPA) e 100 mg/g de ácido docosahexaenoico (DHA). A suplementação foi administrada por gavagem três vezes por semana, por um período de 8 semanas, começando aos 60 dias de idade e terminando aos 120 dias de idade com a dosagem de (2 g/kg). A expressão gênica, de genes ligados a inflamação e sinalização à insulina, citocinas pró e anti-inflamatórias e proteínas envolvidas na sensibilidade à insulina, foram avaliados usando várias técnicas moleculares e bioquímicas, incluindo RT-qPCR, ELISA, Western blotting. Os resultados mostraram uma melhora na sensibilidade à insulina, embora nenhuma alteração significativa tenha sido observada em relação a ouve uma tendência, talvez por nesta idade o músculo desses animais não estarem muito inflamados. Estas descobertas destacam o potencial terapêutico da suplementação de  $\omega$ -3 no tratamento da disfunção muscular e inflamação relacionadas ao DM2, sendo promissor para melhorar a saúde muscular em pacientes com DM2.

**Palavras-chave:** Suplementação; rato não obesos; EPA e DHA

### **1 INTRODUÇÃO**

O T2D é uma doença crônica, caracterizada por resistência periférica à insulina (RI) e hiperglicemia, frequentemente desencadeada por fatores ambientais, como sedentarismo, obesidade e maus hábitos alimentares, sendo que suas complicações incluem lesões e disfunções em diferentes órgãos, incluindo o músculo esquelético (Trierweiler et al., 2018).

Segundo o *Internationale Federation* (2021), 537 milhões de pessoas possuíam o DM no ano 2021, sendo que 90% dessas pessoas são portadores do T2D e, dentre essas pessoas, 10 a 20% não possuem obesidade (“IDF Diabetes Atlas 10th edition”). Assim, torna-se importante o desenvolvimento de estudos voltados para T2D não obesos, sendo o modelo do rato Goto-Kakizaki (GK) utilizado nesse sentido, pois esse animal apresenta T2D de maneira espontânea aos 21 dias de idade, apresentando hiperglicemia, intolerância à glicose, resistência insulínica, inflamação crônica de baixo grau no tecido muscular e ausência de obesidade (Guest, PC. 2019).

Nosso grupo vem desenvolvendo estudos com o modelo GK, visando embasar e direcionar tratamentos mais específicos e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida dessas pessoas.

O músculo gastrocnêmio possui fibras musculares de contração rápida (porção branca) e de contração lenta (porção vermelha) (Butler & Dominy, 2016). Estudos prévios são sugestivos de que ambas as porções são suscetíveis à RI, sendo assim, avaliar o músculo gastrocnêmio nos ratos GK torna-se importante, pois esta análise nos permitirá um maior

entendimento de propriedades metabólicas e funcionais desse músculo frente ao T2D sem obesidade (Butler & Dominy, 2016).

Estudos vêm demonstrando que a ingestão de alimentos ou suplementos ricos em ácidos graxos ômega-3( $\omega$ -3), rico em EPA e DHA, melhora os índices glicêmicos e o processo inflamatório (Burri et al., 2012; Calder, 2010) e realizar a suplementação com  $\omega$ -3 modelo animal sem obesidade é essencial devido às características únicas dessa condição, que se diferencia significativamente do T2D associado à obesidade. relevante. Modelos como o GK permitem explorar mecanismos específicos da doença, isolando fatores genéticos e ambientais que contribuem para a resistência à insulina (RI) e a disfunção das células beta pancreáticas, sem a influência das complicações relacionadas à obesidade. Além disso, esses estudos são fundamentais para o desenvolvimento de terapias mais direcionadas e eficazes para pessoas se obesidade, que frequentemente apresentam uma progressão mais severa da doença e uma resposta mais severa da doença.

Esse projeto teve como objetivo caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na sinalização da sensibilidade à insulina e no processo inflamatório, do músculo gastrocnêmio de ratos GK, suplementados ou não com  $\omega$ -3.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Foram utilizados neste estudo ratos machos, das linhagens GK e Wistar, com 60 dias de vida, divididos aleatoriamente em quatro grupos: Wistar controle (WC), Wistar suplementados com  $\omega$ -3(W $\omega$ -3), GK controle (GKC) e GK suplementados com  $\omega$ -3(GK  $\omega$ -3). As condições experimentais foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da universidade (protocolo 010/2020), seguindo as diretrizes do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, do *Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences*, Washington, EUA.

### 2.2 Desenho experimental

Na semana anterior à suplementação com ômega-3, os animais foram submetidos a testes de tolerância à glicose (GTT), recebendo uma dose intraperitoneal de solução aquosa de glicose a 50% (2 g/kg de massa corporal). Também foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT), três dias após o GTT, onde os animais receberam uma dose intraperitoneal de insulina regular (0,75 UI/kg de massa corporal).

Os grupos suplementados receberam gavagem com uma dose de  $\omega$ -3 contendo 540 mg de EPA e 100 mg de DHA, totalizando 2 g por kg de massa corporal, administrados a 1,2 g/kg/dia. Todos os resultados foram normalizados pela área de superfície corporal dos animais, seguindo protocolo de Reagan-Shaw *et al.* (2008). Os animais dos grupos WC e GKC receberam água na mesma proporção e tempo para avaliar os efeitos exclusivos da suplementação.

Foi realizada análise gravimétrica do músculo gastrocnêmio. Para a análise por *Western Blotting* (Towbin *et al.*, 1979) foram utilizados os anticorpos antifosfo-Akt (ser473), anti-fosfo-GSK-3, GLUT-4, IR- $\alpha$  e IR- $\beta$ . Para o RT-qPCR, foram analisados genes envolvidos no metabolismo da glicose e na inflamação (GLUT-4, AKT2, NFkB e TNF- $\alpha$ ), onde os tecidos foram homogeneizados em TRIZOL para extração de RNA total conforme protocolo descrito por Lobato, (Lobato.TB et al., 2024a). A análise das citocinas pró e anti inflamatória TNF- $\alpha$ , IL- 6, e IL-1 $\beta$  foi realizada pelo método ELISA (Bortolon, J.R. et al., 2020).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Massa úmida e massa seca do músculo gastrocnêmio

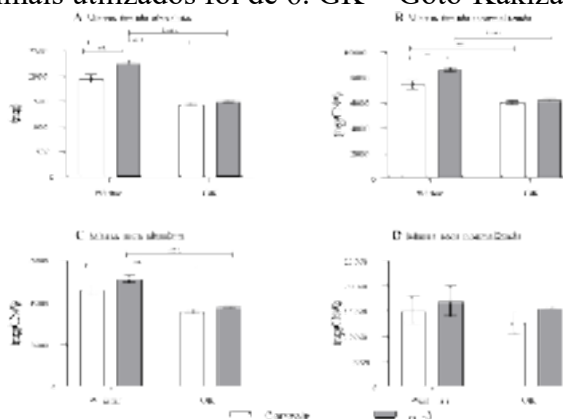
Na análise da massa úmida absoluta do músculo gastrocnêmio, observamos que os ratos GKC apresentaram massa 25,9% menor em relação ao WC; os ratos GK $\omega$ -3 exibiram massa 33,41% menor em relação aos ratos W $\omega$ -3 esta suplementação aumentou a massa úmida do músculo gastrocnêmio 15,83% nos ratos W $\omega$ -3 em relação ao WC, efeito não observado na linhagem GK.

Ao compararmos massa úmida normalizada pelo comprimento nasoanal(CNA), observamos que os ratos GKC apresentaram massa 19,12% menor quando comparados aos ratos WC; esta suplementação resultou em um aumento de 33,41% na massa úmida normalizada nos ratos W $\omega$ -3 em relação ao WC. No entanto, essa diferença não foi observada entre ratos na linhagem GK (figura 1, painel B).

Quando comparamos a massa seca absoluta do músculo gastrocnêmio, observamos que os ratos GKC apresentaram massa 22,43% menor em relação a dos ratos WC; os ratos GK $\omega$ -3 exibiram massa seca absoluta 26,09% menor do que os ratos W $\omega$ -3. Nesse contexto, quando comparamos os animais controles e suplementados, observamos que a suplementação não teve efeito sobre a massa seca absoluta dos grupos.

Ao compararmos a massa seca do músculo gastrocnêmio normalizada pelo CNA, não observamos nenhuma diferença significativa entre os grupos.

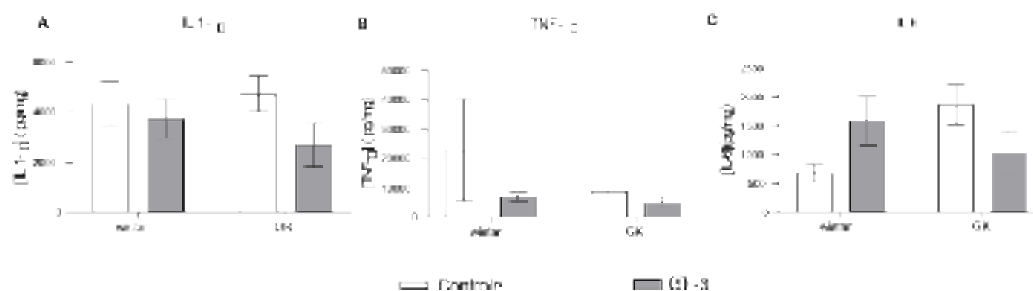
**Figura 1.** Análise gravimétrica do músculo gastrocnêmio: (A) Massa úmida absoluta; (B) Massa úmida normalizada pelo CNA; (C) Massa seca absoluta; (D) Massa seca normalizada pelo CNA do músculo gastrocnêmio dos animais submetidos à suplementação com o ômega-3. Considerou-se: \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  e \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  no teste *Two-Way ANOVA*, seguido do pós-teste de *Tukey*. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O número de animais utilizados foi de 6. GK = Goto-Kakizaki;  $\omega$ -3 = ômega-3.



### 3.2 Reação imunoenzimática - ELISA

Foram analisados por ELISA TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-1 $\beta$ , onde a suplementação com  $\omega$ -3 não resultou em diferenças estatisticamente significativas nas concentrações das citocinas inflamatórias entre os grupos (figura 2).

**Figura 2:** (A) IL1- $\beta$ ; (B) TNF- $\alpha$ ; (C) IL-6 dos animais submetidos a suplementação com  $\omega$ -3 avaliadas durante o período experimental. Os valores estão representados com média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Considerou-se como não estatístico  $P \geq 0,05$ . GK= Goto-Kakizaki;  $\omega$ -3= ômega3.



### 3.3 Western blotting

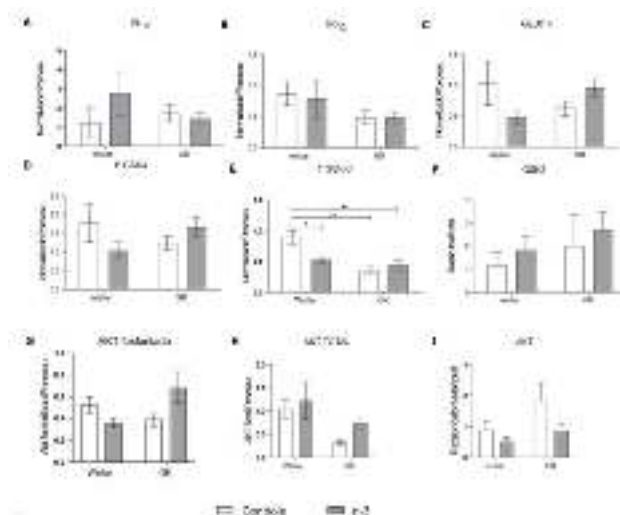
Foram realizadas para análise por Western blotting(WB) das proteínas GSK3 total e fosforilada, IL-1 $\beta$ , IR- $\alpha$ , GLUT-4, AKT Total, P AKT, AKT total e fosforilada.

Ao analisarmos o GSK3 total dos ratos GK  $\omega$ -3 com observamos que esta proteína se apresentava da seguinte maneira: O GSK3 Total do músculo gastrocnêmio do GKC foi 20,95% menor do que o GSK3 total do músculo gastrocnêmio do GK  $\omega$ -3, o GSK3 total do músculo gastrocnêmio dos ratos WC foi 41,74% maior do que o GSK3 total do músculo gastrocnêmio dos ratos W $\omega$ -3 o GSK3 total do músculo gastrocnêmio dos ratos WC foi 59,34% maior do que o GSK3 total do músculo gastrocnêmio a dos ratos GKC, o GSK3 total do músculo gastrocnêmio dos ratos W $\omega$ -3 foi 50,82% maior do que o GSK3 total do músculo gastrocnêmio dos ratos

GK $\omega$ -3.

A suplementação não resultou em diferenças estatisticamente significativas na expressão das proteínas envolvidas na sinalização da insulina e na sensibilidade à insulina, como Akt, IR- $\beta$ , IR- $\alpha$  e GLUT4, avaliados por WB (figura 3).

**FIGURA 3:** Análise das proteínas pelo método de western blotting; (A)IR- $\beta$ ; (B) IR- $\alpha$ ; (C) GLUT 4; (D) PGSK3; (E) TGSK3; (F) P AKT; (G) T AKT; (H) Razão fosf/totaldo músculo gastrocnêmio, Considerouse ns P>0,05; \*\* P $\leq$ 0,001; \*\*\*P $\leq$ 0,0001 no teste Two-Way Anova seguida pelos pós teste de Tukey's. Os valores estão apresentados como média  $\pm$ erro padrão da média (EPM). Foram utilizados seis animais por grupo. WT= wistar; GK= Goto-Kakizaki.  $\omega$ -3= Ômega-3.

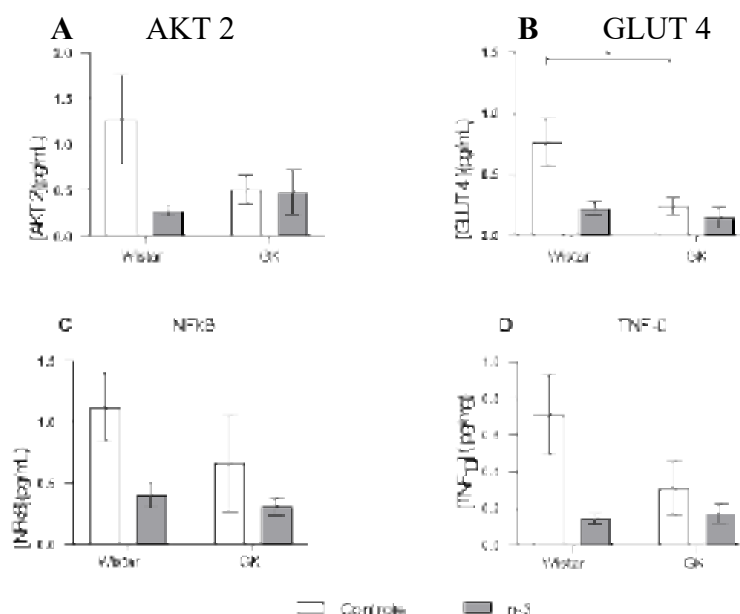


### 3.4 Análise da expressão gênica por RTq-PCR

Ao analisarmos o GLUT 4 pelo método de PCR no músculo gastrocnêmio dos ratos GK suplementados com  $\omega$ -3, observamos que os ratos wistar apresentam maior expressão deste gene(P $\leq$ 0,05) em relação ao GK controle.

Em relação aos demais genes analisados não observamos diferenças estatisticamente

significativas na expressão dos genes analisados.



**Figura 4:** (A) AKT2; (B) GLUT 4; (C) NFkB; (D) TNF- $\alpha$  dos animais submetidos a suplementação com  $\omega$ -3 avaliadas durante o período experimental. Os valores estão representados com média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Considerou-se não estatístico  $P \geq 0,05$ .

Conforme demonstrado em um estudo publicado recentemente pelo nosso grupo (Lobato BT. et al., 2024b), onde compartilhamos os mesmos animais durante a suplementação com  $\omega$ -3, observamos uma melhora na sensibilidade à insulina nos ratos GK $\omega$ -3, incluindo melhorias nos níveis de glicose de jejum, insulina, índice HOMA e teste QUICKI. Adicionalmente, observamos redução no peso corporal e melhoria nos marcadores plasmáticos (PCR, creatina fosfoquinase, uréia e LDL) nos ratos GK $\omega$ -3. Além disso, a suplementação reduziu o peso corporal sem alterações na ingestão calórica diária, ou adiposidade.

Sugerimos que a falta de uma resposta mais expressiva do  $\omega$ -3 no músculo gastrocnêmio dos ratos GK $\omega$ -3 pode ser atribuída ao estágio inicial da progressão da doença neste músculo, uma vez que o T2D é uma doença crônica que as comorbidades se agravam ao longo do tempo e na idade de 120 dias os impactos são menos pronunciados (Trierweiler et al., 2018).

#### 4 Conclusão

A dose de intervenção utilizada no nosso estudo se mostrou eficaz para a redução dos índices glicêmicos e melhora do perfil inflamatório se mostrando benéfico para o tratamento do T2D em modelo animal GK não obeso. Esses achados sugerem que a suplementação com  $\omega$ -3 pode ser uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento do DM2, especialmente em indivíduos não obesos.

#### REFERÊNCIAS

Bortolon, J. R. et al. Recovery of Diabetic Rats After Physical Exhaustion: Kinetic Alterations in Muscle Inflammation and Muscle-Signaling Proteins to Atrophy and Hypertrophy. *Frontiers in Physiology*, 2020, v. 11, 12.

Burri L, Hoem N, Banni S, Berge K. Marine omega-3 phospholipids: metabolism and

biological activities. *Int J Mol Sci.* 2012, 13(11):15401-19.

Butler EE, Dominy NJ. Architecture and functional ecology of the human gastrocnemius muscle-tendon unit. *J Anat.* 2016 Apr;228(4):561-8.

Calder, P.C.; Albers, R.; Antoine, J.-M.; Blum, S.; Bourdet-Sicard, R.; Ferns, G.A.; Folkerts, G.; Friedmann, P.S.; Frost, G.S.; Guarner, F.; et al. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *Br. J. Nutr.* 2009, 101 (Suppl. 1), S1–S45.

Guest PC. Characterization of the Goto-Kakizaki (GK) Rat Model of Type 2 Diabetes. *Methods Mol Biol.* 2019, 1916:203-211.

International Diabetes Federation. *IDF DiabetesAtlas*, 10th edn. Brussels, Belgium: 2021. Available at: <https://www.diabetesatlas.org> Accessed 13 dez. 2024.

Lobato, T.B.; Manoel, R.; Pereira, A.C.G.; Correa, I.S.; Iser-Bem, P.N.; de Sousa Santos, E.S.; Pereira, J.N.B.; de Araújo, M.J.L.; de Oliveira Borges, J.C.; Pauferro, J.R.B.; et al. Insulin Resistance in Nonobese Type 2 Diabetic Goto Kakizaki Rats Is Associated with a Proinflammatory T Lymphocyte Profile. *FEBS Lett.* 2024a, 598, 2566–2580.

Lobato, T. B., Santos, E. S., Iser-Bem, P. N., Falcão, H. S., Gimenes, G. M., Pauferro, J. R. B., et al. Omega-3 Fatty Acids Weaken Lymphocyte Inflammatory Features and Improve Glycemic Control. *Nutrients*, 2024b. 16, 4106.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008; 22(3):659-61, 2008.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979, 76(9):4350-4, 1979.

Trierweiler H, Kisielewicz G, Hoffmann Jonasson T, Rasmussen Petterle R, Aguiar Moreira C, Zeghbi Cochenski Borba V. Sarcopenia: a chronic complication of type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr.* 2018, 3;10:25.