



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

LUÍS AFONSO FIALHO DUARTE GAMAS

***IRISINA E INSULINO-RESISTÊNCIA EM MODELOS
ANIMAIS DE OBESIDADE E DIABETES TIPO 2***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISILOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSORA DOUTORA RAQUEL MARIA FINO SEIÇA
DOUTOR PAULO NUNO CENTEIO MATAFOME**

FEVEREIRO DE 2015

IRISINA E INSULINO-RESISTÊNCIA EM MODELOS ANIMAIS DE OBESIDADE E DIABETES TIPO 2

Gamas L¹, Neves C¹, Fonseca R¹, Rodrigues T¹, Matafome P^{1,2}, Seiça R¹.

- 1- Laboratório de Fisiologia, Instituto de Investigação Biomédica e Ciências da Vida (IBILI), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.
- 2- Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior de Tecnologia da Saúde (ESTeSC), Departamento de Ciências Complementares, Coimbra, Portugal

Contactos

Morada: Pólo III da Universidade de Coimbra, Faculdade de Medicina, Subunidade 1, 1º andar, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 300-354 Coimbra, Portugal.

Email: afonso_gamas@hotmail.com

Trabalho financiado por

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) – Pest-C/SAU/UI3282/2011

RESUMO

A Diabetes Mellitus é uma entidade patológica bastante prevalente a nível mundial. A Diabetes Mellitus tipo 2 caracteriza-se por um estado de insulino-resistência hepática nos tecidos periféricos, principalmente no músculo esquelético, estando frequentemente associada a obesidade e sedentarismo. A hiperglicemia crónica associa-se a disfunção celular, em parte devido à produção de AGE's e seus precursores (glicação), particularmente o metilglioxal. As miocinas constituem um grupo de péptidos expressos e segregados pelo músculo esquelético. Entre eles encontra-se a irisina, que actua no tecido adiposo, promovendo a sua actividade metabólica e termogénese (*browning*), em parte utilizando substratos lipídicos. Assim, o nosso objectivo consiste em avaliar se o metilglioxal potencia os efeitos da dieta hiperlipídica no desenvolvimento de insulino-resistência muscular e na secreção de miocinas num modelo animal. Estudámos quatro grupos de ratos Wistar: um controlo (Ct), um ao qual foi administrado metilglioxal (MG), um mantido com dieta hiperlipídica (HFD) e um mantido com dieta hiperlipídica e administração de metilglioxal (HFDMG). Um grupo de ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo diabético tipo 2 não obeso, com a mesma idade, também foi utilizado. Avaliámos o perfil metabólico sistémico e diversos parâmetros no músculo esquelético. O metilglioxal, quando associado a dieta hiperlipídica, induziu insulino-resistência muscular e intolerância à glicose, quando comparado com os controlos, não se observando alterações significativas nos grupos MG e HFD. Também a administração de metilglioxal juntamente com a dieta hiperlipídica resultou em níveis reduzidos de irisina sérica. Estes resultados sugerem que o metilglioxal pode estar envolvido no desenvolvimento de insulino-resistência muscular, assim como na alteração da expressão ou secreção de miocinas em condições de hiperlipidémia. Desta forma, a glicação poderá contribuir para o desenvolvimento e progressão das alterações metabólicas relacionadas com a insulino-resistência muscular comumente observadas na obesidade e na pré-diabetes.

Palavras chave: Diabetes, AGE's, Metilglioxal, Insulino-resistência, Miocinas, Irisina

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a worldwide prevalent disease characterized by a state of insulin-resistance in liver and peripheral tissues, mainly skeletal muscle. Chronic hyperglycemia is associated with cellular dysfunction, partially due the production of AGE's and their precursors (glycation), namely methylglyoxal. Myokines are a group of peptides expressed and secreted by the skeletal muscle. Among those peptides, irisin is of particular interest, as it acts in adipocytes to promote its lipid catabolism and thermogenesis (browning). Thus, our aim was to assess if methylglyoxal bolsters the effects of a high-fat diet in the development of skeletal muscle insulin-resistance and myokines secretion in rats. Therefore, Wistar rats were divided into four groups: one control group (Ct), one group with methylglyoxal supplementation (MG), one group fed a high-fat diet (HFD) and one group with both (HFDMG). A group of age-matched Goto-Kakizaki rats (GK), a type 2 diabetic model, was also used. The systemic metabolic profile and skeletal muscle parameters were evaluated. Methylglyoxal, when combined with a high-fat diet, induced insulin-resistance in skeletal muscle and glucose intolerance, when compared to the control group, while no significant changes were observed in MG and HFD groups. Furthermore, methylglyoxal combined with high-fat diet resulted in reduced serum irisin. These results suggest that methylglyoxal may be involved in the development of insulin-resistance in skeletal muscle, as well as changes in the expression or secretion of myokines in hyperlipidemia. Thus, this study suggests that glycation may be involved in the development and progression of the metabolic alterations commonly observed in obesity and pre-diabetes.

Keywords: Diabetes, AGE's, Methylglyoxal, Insulin-resistance, Myokines, Irisin

INTRODUÇÃO

A Diabetes Mellitus (DM) é das entidades patológicas mais prevalentes a nível mundial, afectando cerca de 8% da população mundial (Negre-Salvayre 2009). A DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crónica resultante de defeitos na secreção de insulina, na acção da hormona ou ambos. A diabetes tipo 2, a forma mais comum, tem uma etiologia multifactorial, e associa diminuição da sensibilidade dos tecidos periféricos e do fígado à insulina e alterações da secreção pancreática da hormona (Bugianesi 2005). Grande parte dos diabéticos tipo 2 são obesos e a obesidade está muitas vezes associada a um estado de insulino-resistência, consequência do sedentarismo e de alterações do comportamento alimentar, sendo a inactividade física uma das principais causas do desenvolvimento destes desequilíbrios metabólicos (Diabetes Care 2004).

A hiperglicemia crónica acarreta alterações patológicas a nível celular, em particular nas células endoteliais capilares, células mesangiais dos glomérulos renais, neurónios e células gliais. Um dos mecanismos implicados consiste no aumento da formação de precursores de produtos avançados da glicação (AGE's, *advanced glycation end products*), que modificam a função de proteínas intra e extracelulares (Brownlee 2004). Um dos principais precursores dos AGE's é o metilglioxal (MG), produto derivado do metabolismo da glicose e de frutose, cujos níveis plasmáticos se encontram elevados em indivíduos diabéticos. O MG tem diversos efeitos, em concreto a glicação de proteínas, alterando a função de factores de transcrição como o HIF-1- α (*hypoxia inducible factor 1 alfa*) e de proteínas da matriz extracelulares, que se associa às complicações vasculares da diabetes. O MG é igualmente um potente indutor de stress oxidativo (Matafome 2013).

O músculo esquelético ocupa um papel central como alvo da perda da sensibilidade à insulina mas, também, como órgão secretor de factores hormonais, as miocinas, por si envolvidas na homeostasia energética. As miocinas são péptidos expressos e segregados pelo

músculo esquelético, exercendo acções autócrinas, parácrinas ou endócrinas e induzindo variados efeitos sistémicos. Assim, o músculo esquelético deverá ser encarado como órgão endócrino. (Pedersen B.K. 2012) As miocinas são libertadas, na grande maioria, em resposta à contracção muscular, mediando em parte as alterações metabólicas sistémicas e locais do exercício físico, ou em resposta a alterações do estado nutricional. (Pedersen B.K. 2012; Eckardt 2014) As miocinas regulam a actividade de órgãos distantes, tais como tecido adiposo, fígado, pâncreas e intestino, podendo-se considerar a existência de um “cross-talk” entre o músculo esquelético e outros órgãos. (Pedersen L. 2013) Várias miocinas já foram caracterizadas, assim como algumas das suas funções. A lista inclui IL-6, Irisina, Miostatina, LIF, BDNF, IGF-1, FGF-2, FSTL-1, IL-8, IL-15 e Mionectina. (Pedersen B.K. 2012) Destas, destaca-se a Irisina, pelo seu envolvimento na homeostasia dos lípidos e da glicose, em particular no tecido adiposo e, logo, na síndrome metabólica.

Recentemente, Boström *et al* (Boström *et al.*, 2012), através de um estudo em ratinhos, propôs que o exercício físico, ao induzir a actividade do *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α) no músculo esquelético, induz a expressão do gene codificador de uma proteína transmembranar, FNDC5. Esta proteína é clivada no seu domínio extracelular, dando origem a uma miocina secretada, designada de irisina, que actua no tecido adiposo subcutâneo destes modelos animais, num tipo específico de adipócitos, designados de beges ou brite (*Brown + white*), caracterizados por Wu *et al* (Wu *et al.*, 2012) (Figura 1). Estes adipócitos apresentam características intermédias entre os adipócitos brancos e os adipócitos castanhos. À semelhança dos primeiros, a expressão basal do gene UCP-1 é baixa porém, estes adipócitos têm a capacidade de expressarem esse mesmo gene e apresentarem elevada actividade metabólica e de termogénese, à semelhança dos adipócitos do tecido adiposo castanho clássico. Este processo é conhecido por *browning*. Foi proposto que a irisina induz o *browning* com o conseqüente aumento da termogénese e do dispêndio de

energia, melhorando a homeostasia metabólica e evitando o desenvolvimento de obesidade e insulino-resistência. No entanto, as conclusões de vários outros estudos questionam estas evidências (Elsen 2014). O papel da irisina, assim como a relevância do *browning* em humanos, é ainda controverso.

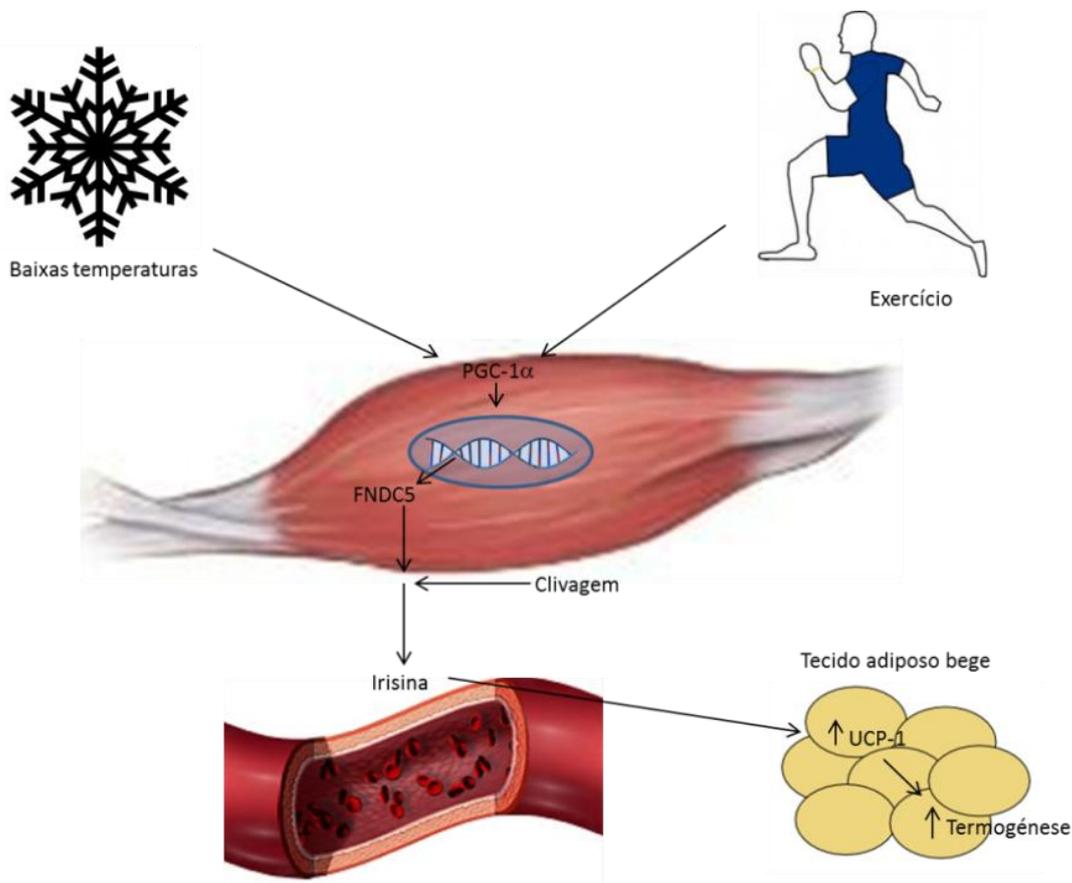


Figura 1 – Mecanismo de regulação e acção da irisina. A irisina é clivada a partir da proteína transmembranar FNDC5, que por sua vez é expressa após activação do PGC-1 α em resposta ao frio e exercício físico. A irisina actua nos acipócitos beges ou *brite* induzindo a expressão da proteína desacopladora UCP-1 e a dissipação de energia sob a forma de calor. PGC-1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*; FNDC5: *Fibronectin type III domain-containing protein 5*; UCP-1: *Uncoupling protein 1*.

OBJECTIVOS

O objectivo deste trabalho consistiu em avaliar se o metilglioxal, precursor dos produtos avançados da glicação, potencia os efeitos da dieta hiperlipídica no desenvolvimento de insulino-resistência muscular e na secreção de irisina em ratos. Confirmando-se esta hipótese, este trabalho possibilitará uma melhor compreensão da fisiopatologia da diabetes mellitus tipo 2, assim como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para melhorar a sensibilidade à insulina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes utilizados

Com exceção daqueles onde é especificado, todos os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos à Sigma (EUA) ou Merck (Alemanha). Os anticorpos utilizados neste trabalho foram direccionados para receptor de insulina (IR, *insulin receptor*, Santa Cruz Biotechnology, EUA), receptor de insulina fosforilado (IR-P, Abcam, RU), proteína cinase activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*, Cell Signaling, EUA), AMPK fosforilada (AMPK-P, Cell Signaling, EUA), Akt (Cell Signaling, EUA), Akt fosforilada (Akt-P, Cell Signaling, EUA) e transportador de glicose tipo 4 (GLUT4, Cell Signaling, EUA).

Modelos animais

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar de 12 meses de idade, os quais foram divididos em grupos, segundo as variáveis dieta hiperlipídica (40% triglicéridos) (HFD, SAFE, França) e administração de metilglioxal (MG), e um modelo animal não obeso de diabetes tipo 2, os ratos Goto-Kakizaki (GK), da mesma idade, ambos obtidos das nossas colónias da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Estudámos um grupo de ratos GK e quatro grupos de ratos Wistar: um controlo (Ct), um ao qual foi administrado metilglioxal (MG), um mantido com dieta gorda (HFD), um mantido com dieta hiperlipídica e administração de metilglioxal (HFDMG). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-24°C), humidade (50-60%) e luz (ciclos de 12h de luz e escuridão), com acesso livre a água e comida. Os protocolos experimentais envolvendo animais estiveram de acordo com os protocolos internacionais de manutenção e utilização de animais de laboratório. Além disso, os procedimentos foram realizados por utilizadores

licenciados (Curso validado pela Federação Europeia das Associações Científicas de Experimentação Animal – FELASA, com certificado da Direcção Geral de Veterinária).

O metilglioal foi administrado na dose de 100mg/Kg/dia, durante 4 meses (dos 8 aos 12 meses de idade), na água do biberão, com controlo do volume ingerido diariamente, a fim de certificar a dose diária de MG. Os animais foram pesados regularmente para adequação da dose da dieta hiperlipídica, que se manteve igualmente dos 8 aos 12 meses de vida.

Análises *in vivo*

Durante o tratamento, foi monitorizado o consumo de comida dos animais, o controlo da água ingerida e o peso.

No final do tratamento, a glicemia, em jejum (16-18 horas) e na 1ª e 2ª horas após administração intraperitoneal de glicose (1.8g/Kg), foi medida na veia da cauda através do método da glicose oxidase, utilizando um glicómetro (Elite-Bayer SA, Portugal) com as respectivas tiras-teste. Com base nos valores obtidos na prova de tolerância à glicose intraperitoneal foi calculada a área sob a curva (AUC).

No sangue da cauda, foi determinada a percentagem de hemoglobina glicada (HbA1c), utilizando o sistema DCA2000+ (Siemens, Portugal).

Recolha das amostras

Recolha de sangue: No dia do sacrifício, as amostras de sangue foram recolhidas após jejum de 16-18 horas, em animais anestesiados com cloridrato de cetamina (75 mg/Kg, i.m., Parke-Davis, Ann Arbor, EUA) e cloridrato de clorpromazina (2.65 mg/Kg, i.m., Laboratórios Vitória, Portugal). Para a separação do soro e do plasma foram utilizados, respectivamente, tubos BD Vacutainer e BD Vacutainer K3E, com 5.4 mg de EDTA (BD Vacutainer, Reino

Unido). Os sangues foram centrifugados a 35000 xg, 10 minutos, a 4°C e o plasma e o soro foram aliquotados e armazenados a -80°C.

Recolha de órgãos: Após a colheita de sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o tecido muscular esquelético do músculo quadricípete femoral foi imediatamente recolhido, lavado em solução isotónica (0.9% NaCl) e imediatamente congelado em azoto líquido e armazenado a -80°C.

Determinação de parâmetros sistémicos

Foram determinados, em jejum, os níveis sanguíneos de triglicérides, ácidos gordos livres, insulina e irisina. Os níveis de triglicérides e no soro foram determinados utilizando um analisador automático (Olympus-Diagnóstica Portugal, Produtos de Diagnóstico SA, Portugal). Os níveis plasmáticos de ácidos gordos foram determinados utilizando um kit comercial (Zenbio, EUA).

A insulina plasmática foi determinada por ELISA utilizando um kit comercial (Rat Insulin ELISA Kit, Mercodia, Suécia). Os níveis séricos da miocina irisina foram avaliados igualmente por ELISA, através de um kit comercial (Irisin, Recombinant ELISA kit, Phoenix Pharmaceuticals, EUA).

Determinação dos níveis de proteínas nos tecidos – *Western Blotting*

Preparação das amostras: Foram homogeneizadas secções de tecido muscular esquelético (100mg) em 1ml de tampão de lise (25mM Tris-HCl pH7.4; 150mM NaCl; 1% Triton X-100; 0.5% SDS; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 20mM NaF; 2mM Na₃VO₄; 10mM β-glicerofosfato; 2.5mM pirofosfato de sódio; 10mM PMSF e 40μl de *cocktail* inibidor de proteases/g de tecido (Sigma, USA), pH7.7). Os homogeneizados foram depois sonicados e centrifugados a

14000 xg, durante 20 minutos, a 4°C e os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados novamente, aliquotados e mantidos a -80°C. A concentração de proteína total foi determinada pelo método de BCA.

SDS-PAGE: Foi adicionado tampão de *loading* (62.5mM Tris, 1% SDS, 1.25 ml glicerol e 0.01% (w/v) *bromophenol blue*, pH6.8) aos extractos e estes foram separados de acordo com o peso molecular, por SDS-PAGE, num gel de acrilamida, utilizando um tampão de corrida (125mM Tris-base, 480mM glicina, 1% SDS, pH8.8). Foi utilizado o *Precision Plus Protein Standard* (Biorad, EUA) como marcador dos pesos moleculares. A percentagem de acrilamida variou entre os 8 e os 10%. Na polimerização foi utilizada acrilamida a 40% (Biorad, EUA) e as soluções tamponadas de *resolving* (0.75M Tris-HCl, 0.2% SD, pH8.8) e *stacking* (0.25M Tris-HCl, 0.2% SDS, pH6.8).

Transferência: Após separação por peso molecular, as amostras foram transferidas para uma membrana *polyvinylidene fluoride* (PVDF), utilizando um tampão de transferência (50mM CAPS, 2% NaOH, 10% metanol, pH11). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução TBST (250mM Tris, 1.5mM NaCl, pH7.6 + 1% Tween20), suplementada com 5% de albumina de soro bovino (BSA).

Marcação: As membranas foram utilizadas para a marcação de IR, IR-P, AMPK, AMPK-P, Akt, Akt-P e GLUT4. Para tal, as membranas foram incubadas, durante a noite, a 4°C, com os respectivos anticorpos. Depois de lavadas durante 30 minutos com solução TBST, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários (anti-coelho/ ratinho/ cabra; GE Healthcare, Reino Unido), durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois da lavagem, durante 1 hora, as membranas foram incubadas com o reagente ECL e reveladas

num sistema VersaDoc Imaging System (Biorad, EUA). Os resultados foram analisados utilizando o *software* ImageQuant (Molecular Dynamics, EUA).

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média + erro padrão da média. Os testes ANOVA e Tukey post hoc foram utilizados para testar as diferenças estatísticas entre os grupos, tendo sido considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Parâmetros sistêmicos

Peso corporal

Os ratos GK apresentaram menor peso corporal aos 12 meses de idade que os ratos Wistar. Os ratos HFD, mas não os MG e HFDMG, apresentaram um aumento significativo de peso em relação ao grupo controle. Este resultado sugere que a administração de MG inibe o ganho ponderal associado à dieta hiperlipídica (Tabela I).

Tabela I – Ração consumida (g/rato/dia), peso no final do tratamento (g), glicemia em jejum e ao final de duas horas na PTGIP (mg/dl), HbA1c (%) e triglicerídeos (mg/dl).

Grupo	Ct	MG	HFD	HFDMG	GK
Ração (g/rato/dia)	22,9±0,7	24,3±1,6	15,1±1,1 ***	14,4±0,7 ***	25,7±0,6 \$\$\$&&&
Peso (g)	508,8±11,4	508,9±18,4	652,7±35,8 ***	571,6±27,3	398,7±7,7 *#\$\$\$&&&
Glicemia jejum (mg/dl)	68,5±2,0	70,6±1,4	70,9±2,0	71,1±1,6	91,7±3,0 **#*&
HbA1c (%)	3,2±0,1	3,3±0,1	3,3±0,1	3,5±0,1	5,6±0,4 ***## \$\$\$&&&
Glicemia 2h (mg/dl)	77,0±3,1	84,8±2,2	123,6±8,4 ***	143,6±9,7 ***##	305,4±14,8 ***## \$\$\$&&&
Triglicerídeos (mg/dl)	77,2±6,4	69,3±10,7	77,8±5,4	62,3±3,2	160,1±23,1 ***## \$\$\$&&&

Ct – grupo controle; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão médio. *: diferente de Ct; # diferente de MG; \$ diferente de HFD; & diferente de HFDMG. 1 símbolo: p<0,05; 2 símbolos: p<0,01; 3 símbolos: p<0,001.

Perfil glicémico e Hemoglobina A1c

À semelhança de outros estudos realizados no nosso laboratório, os ratos GK apresentaram uma glicemia em jejum mais elevada que os outros grupos (Tabela I) e uma acentuada intolerância à administração de glicose por via intraperitoneal (Tabela I; Figura 2).

A administração de MG não alterou significativamente o perfil glicémico em relação aos controlos (Tabela I; Figura 2).

Os ratos HFD e HFDMG não apresentaram alterações significativas da glicemia em jejum em relação aos controlos (Tabela I). No entanto, apresentaram um aumento da área sob a curva registada durante a PTGIP e da glicemia às 2 horas, sendo este efeito mais pronunciado no grupo HFDMG (Tabela I; Figura 2). Na área sob a curva verificou-se, ainda, uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos HFD e HFDMG, demonstrando que a administração concomitante de MG acentuou a diminuição da tolerância à glicose (Figura 2).

De forma semelhante ao perfil glicémico, os ratos GK apresentaram um aumento da hemoglobina glicada (HbA1c) em relação aos outros grupos, que não apresentaram alterações significativas (Tabela I).

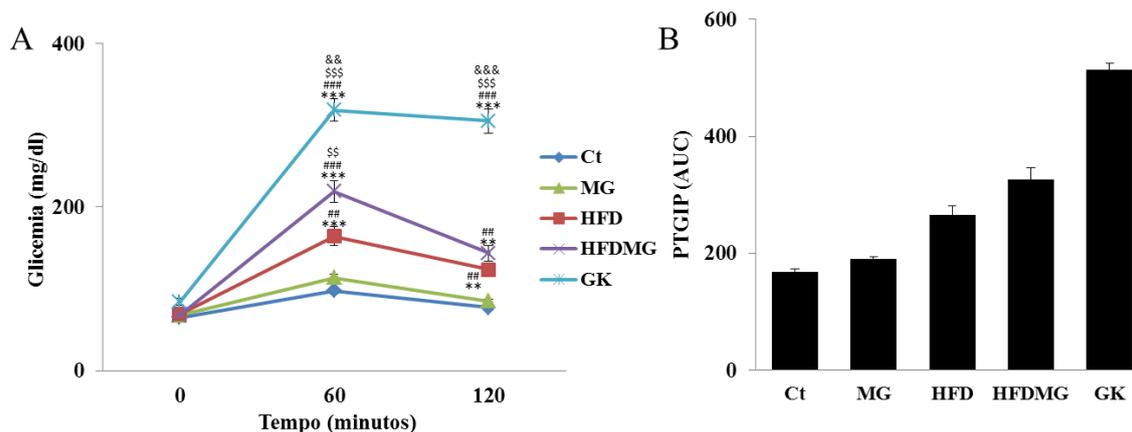


Figura 2 – Registo de duas horas (A) e área sob a curva (B) da prova de tolerância à glicose intra-peritoneal. Verifica-se maior intolerância nos ratos HFDMG, embora menor que nos ratos diabéticos.

Ct – grupo controlo; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

* diferente de Ct; # diferente de MG; \$ diferente de HFD; & diferente de HFDMG. 1 símbolo: $p < 0,05$; 2 símbolos: $p < 0,01$; 3 símbolos: $p < 0,001$.

Perfil lipídico

Nenhum dos tratamentos resultou numa alteração dos níveis séricos de triglicerídeos, verificando-se um aumento apenas nos ratos GK (Tabela I). Os ratos GK apresentaram também níveis plasmáticos de ácidos gordos livres mais elevados que os controlos (Figura 3-A).

A administração de MG e da dieta hiperlipídica isoladamente não alterou significativamente os níveis circulantes de ácidos gordos livres. No entanto, a sua administração conjunta (HFDMG) resultou em níveis significativamente mais elevados dos ácidos gordos circulantes, quando comparados com os controlos, sugerindo que o metilglioxal possa ter influencia no metabolismo lipídico ou na capacidade de armazenamento lipídico (Figura 3-A).

Insulinemia

A insulinemia não se alterou significativamente nos ratos MG e HFD comparativamente aos controlos, contrariamente ao observado no grupo HFDMG (Figura 3-B). Os ratos GK apresentaram uma diminuição marcada na insulinemia em jejum relativamente a todos os outros grupos, reflectindo falência das células β -pancreáticas, característica deste modelo com esta idade (Figura 3-B).

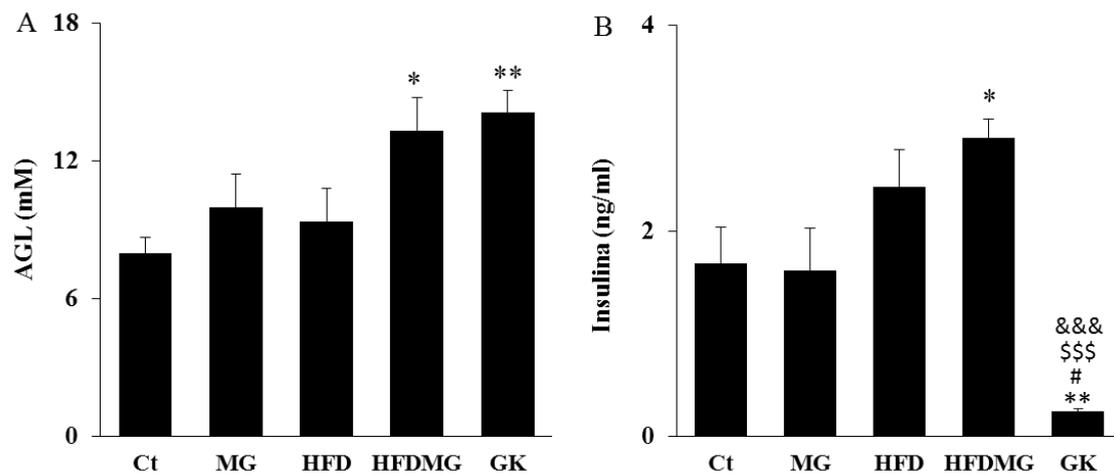


Figura 3 – Níveis plasmáticos de ácidos gordos livres(mM) (AGL) (A) e insulinemia (ng/ml) (B) no final do tratamento. Observa-se um aumento dos níveis de ácidos gordos livres circulantes e de insulinemia no grupo HFDMG e nos ratos diabéticos um aumento dos níveis de ácidos gordos livres circulantes associado a diminuição acentuada da insulinemia.

Ct – grupo controlo; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

* diferente de Ct; # diferente de MG; \$ diferente de HFD; & diferente de HFDMG. 1 símbolo: $p < 0,05$; 2 símbolos: $p < 0,01$; 3 símbolos: $p < 0,001$.

Parâmetros musculares

Receptor de insulina

De acordo com o perfil glicêmico, os ratos GK apresentaram uma redução dos níveis musculares do receptor de insulina (IR) total e da forma fosforilada (IR-P), reflectindo uma resistência aumentada à acção periférica da insulina. A administração de MG ou a dieta hiperlipídica isoladamente não alteraram significativamente os níveis musculares de IR total ou de IR-P. Já a administração de MG a ratos submetidos a dieta hiperlipídica (HFDMG) levou a uma redução significativa nos níveis de IR total em relação aos outros grupos, mas não da forma fosforilada (Figura 4).

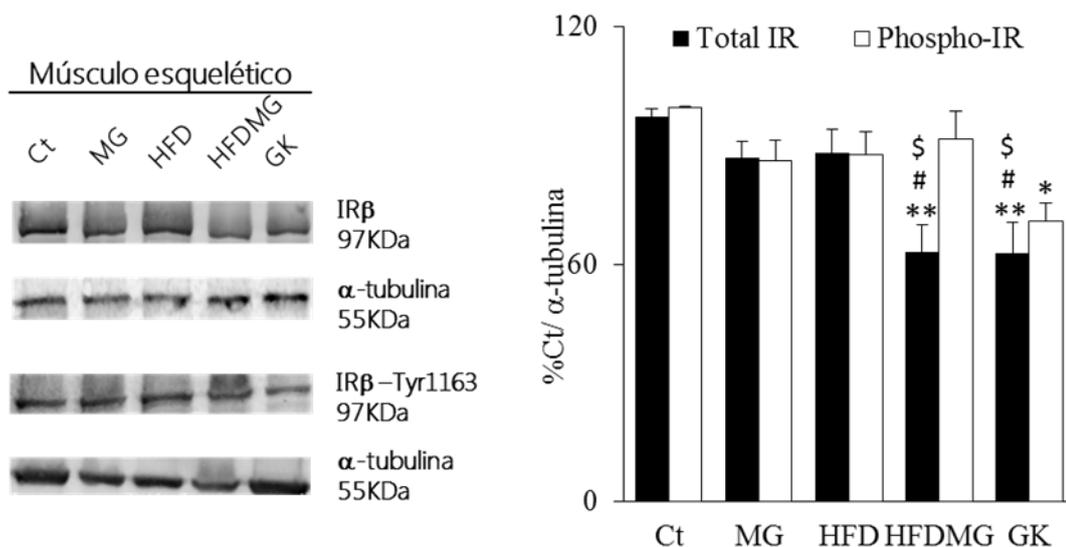


Figura 4 – Determinação por Western blot dos níveis musculares do receptor de insulina na forma total (Total IR) e fosforilada (IRβ-Tyr1163), com membranas representativas. A α-tubulina foi utilizada como controlo de loading. Observa-se uma redução nos níveis da forma fosforilada do receptor da insulina no grupo HFDMG e nos ratos diabéticos uma redução dos níveis de receptor da insulina total e da forma fosforilada.

Ct – grupo controlo; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

* diferente de Ct; # diferente de MG; \$ diferente de HFD; 1 símbolo: p<0,05; 2 símbolos: p<0,01.

Proteína-quinase B ou Akt

Determinámos a Akt, um marcador da sinalização da insulina. Os ratos GK apresentaram uma diminuição significativa nos níveis musculares da forma fosforilada de Akt (Phospho-Akt), mas não da forma total (Total Akt). Tal como observado para o receptor de insulina, a administração de MG e a dieta hiperlipídica isoladamente não tiveram efeitos significativos nos níveis musculares de Akt, quer dos níveis totais, quer da forma fosforilada. No entanto, o grupo HFDMG apresentou uma redução marcada dos níveis musculares de Akt fosforilada, não havendo alterações nos seus níveis totais (Figura 5).

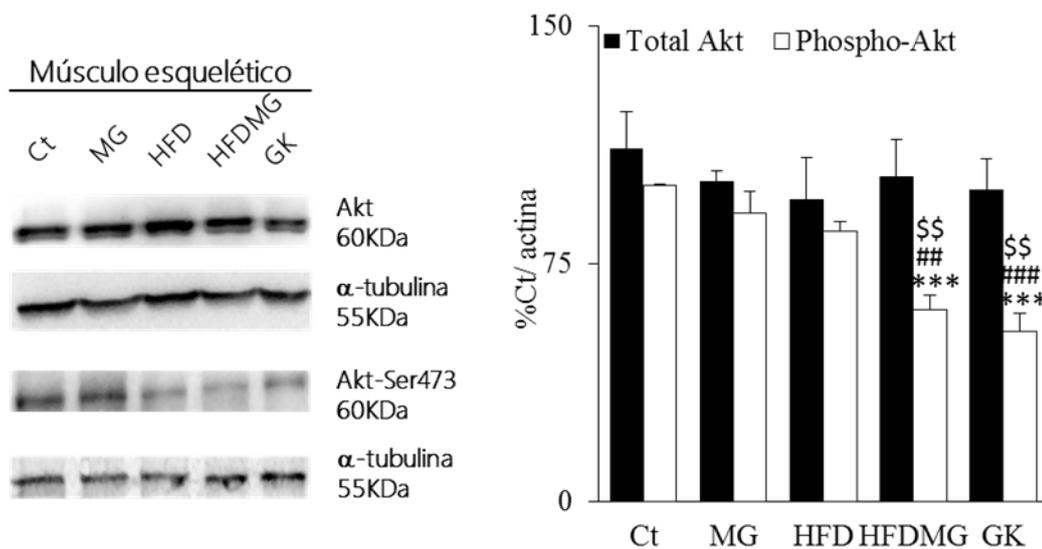


Figura 5 – Determinação por Western blot dos níveis musculares de Akt na forma total (Total Akt) e fosforilada (Akt-Ser473), com membranas representativas. A α -tubulina foi utilizada como controlo de *loading*. Observa-se uma redução nos níveis da forma fosforilada Akt no grupo HFDMG e nos ratos diabéticos, sendo a redução mais significativa neste últimos.

Ct – grupo controlo; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

* diferente de Ct; # diferente de MG; \$ diferente de HFD; 1 símbolo: p<0.05; 2 símbolos: p<0,01; 3 símbolos: p<0,005.

Transportador de glicose - GLUT4

À semelhança das formas fosforiladas do receptor da insulina e da Akt, os ratos GK apresentaram uma redução significativa dos níveis musculares de GLUT4, demonstrando a redução da sensibilidade muscular à insulina. O grupo MG, assim como o grupo HFD, não apresentaram alterações significativas dos níveis musculares de GLUT4 (Figura 6).

No grupo HFDMG observámos uma redução acentuada dos níveis musculares de GLUT4 em relação aos grupos controlo, MG e HFD (Figura 6), resultados que estão de acordo com a redução da tolerância à glicose neste grupo e com a redução dos níveis da Akt fosforilada. Estes resultados sugerem que o MG potencia os efeitos da dieta hiperlipídica na indução de insulino-resistência a nível muscular.

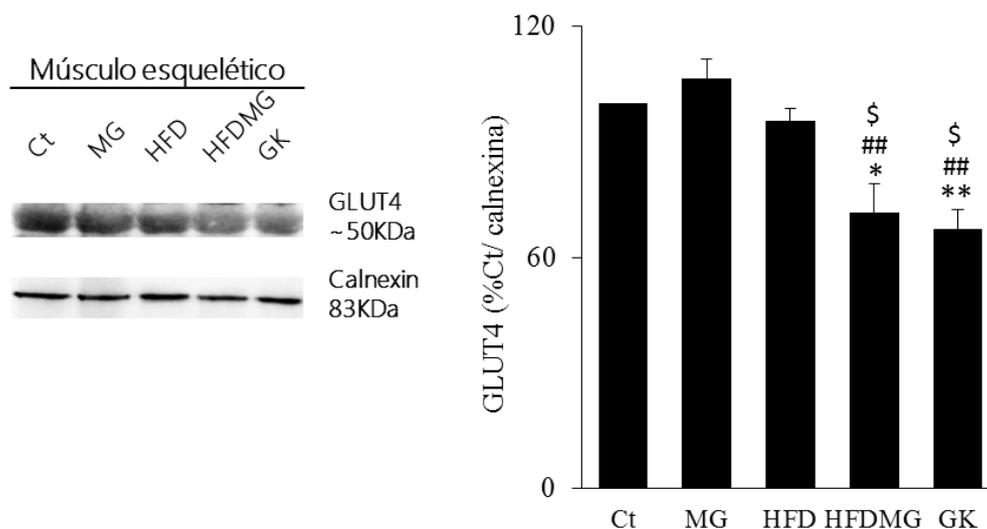


Figura 6 – Determinação por Western blot dos níveis musculares de GLUT4, com membranas representativas. A calnexina foi utilizada como controlo de loading. Observa-se uma redução nos níveis de GLUT4 no grupo HFDMG e nos ratos diabéticos, sendo a redução mais significativa nestes últimos.

Ct – grupo controlo; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

* diferente de Ct; # diferente de MG; \$ diferente de HFD; 1 símbolo: $p < 0,05$; 2 símbolos: $p < 0,01$.

Proteína cinase activada pelo AMP - AMPK

Determinámos os níveis musculares de AMPK, totais (Total AMPK) e da sua forma fosforilada (Phospho-AMPK). O AMPK intervém na via do transporte da glicose independente do receptor da insulina. Os ácidos gordos livres activam a Acetil-CoA carboxylase (ACC), que inibe a AMPK.

Observámos uma tendência para o aumento dos níveis totais de AMPK muscular nos grupos MG, HFD e HFDMG, apesar de não se verificar diferenças estatisticamente significativas, o que não foi observado nos ratos GK. (Figura 7). Os níveis da forma fosforilada não apresentaram alterações em relação aos controlos em nenhum dos grupos (Figura 7). Os ratos GK não apresentaram alterações nos níveis de AMPK total ou fosforilada em relação aos ratos Wistar.

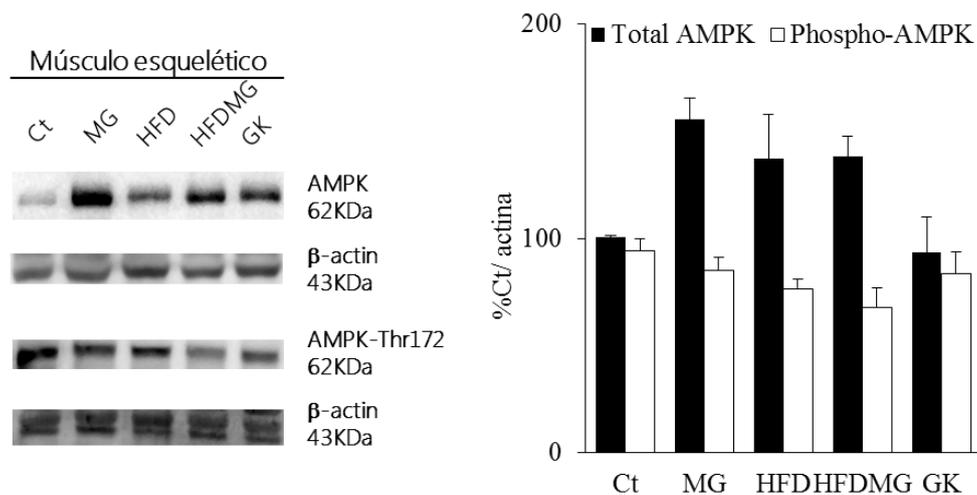


Figura 7 – Determinação por Western blot dos níveis musculares de AMPK na forma total (Total Akt) e fosforilada (AMPK-Thr172), com membranas representativas. A β -actina foi utilizada como controlo de *loading*. Não se observam alterações significativas.

Ct – grupo controlo; MG – Metilgloxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilgloxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

Irisina

Os níveis de irisina sérica apresentaram-se marcadamente diminuídos nos ratos GK em relação aos controlos. A administração de MG ou de HFD isoladamente cursaram com uma ligeira redução nos níveis séricos de irisina, não havendo, ainda assim, diferenças estatisticamente significativas. A administração conjunta de metilglioxal e de dieta hiperlipídica (HFDMG), resultou numa redução significativa nos níveis de irisina circulante, embora não sendo tão marcada como no grupo GK. (Figura 8).

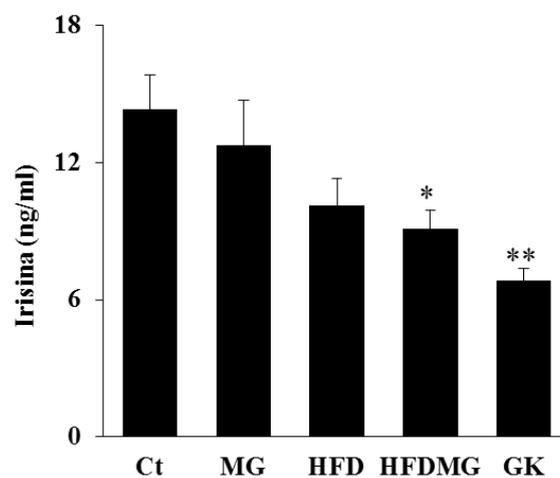


Figura 8 – Níveis séricos de irisina, medidos por ELISA. Observa-se redução dos níveis de irisina circulante no grupo HFDMG e nos ratos diabéticos, sendo a redução mais significativa nestes últimos.

Ct – grupo controlo; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

* diferente de Ct; 1 símbolo: $p < 0,05$; 2 símbolos: $p < 0,01$.

DISCUSSÃO

Neste estudo verificámos que a administração de metilglioxal a animais mantidos com dieta gorda causa uma diminuição da actividade da via do receptor da insulina, evidenciada pelos níveis de receptor da insulina, Akt e GLUT4, no músculo esquelético, concomitante com intolerância à glicose e aumento dos níveis circulantes de ácidos gordos livres e insulina e diminuição da irisina, mas menos marcados marcados que nos ratos diabéticos.

O metilglioxal, precursor de AGE's, apresenta níveis plasmáticos elevados em doentes diabéticos (Odani *et al* 1999; Lapolla *et al.*, 2003). Vários estudos têm-se focalizado nos possíveis efeitos do metilglioxal na via de sinalização da insulina e consequente contribuição para a insulino-resistência. Jia *et al* (Jia *et al.*, 2006) verificou que a incubação de adipócitos 3T3-L1 e de miócitos com aductos MG-insulina, produto da glicação da insulina, resultou em redução da captação de glicose mediada por insulina, por interferência na ligação insulina-receptor. Este efeito não se verificou em culturas celulares incubadas com MG isoladamente. Riboulet-Chavey *et al* verificou, num estudo com culturas de células musculares de ratos, que o MG induz uma redução na captação de glicose dependente de insulina, associada a uma redução da actividade do mediador de sinalização IRS-1 (Riboulet-Chavey *et al.*, 2006). Jia *et al*, num outro estudo realizado em ratos Sprague-Dawley, demonstrou que o tratamento com frutose, precursor metabólico do MG, resultou em níveis de MG aumentados no plasma e no tecido adiposo, assim como redução da captação de glicose estimulada pela insulina. Os mesmos autores verificaram que a incubação de adipócitos com MG resulta numa redução da fosforilação do IRS-1 e da actividade da PI3K. Este efeito foi revertido com o tratamento com NAC (N-acetil-cisteína), um sequestrador do MG (Jia *et al.*, 2007). Dhar *et al*, num estudo em ratos Sprague-Dawley submetidos durante 28 dias a infusões endovenosas de MG na dose de 60mg/Kg/dia por um sistema “minipump”, demonstrou que a administração crónica de MG induz insulino-resistência, com aumento da glicemia em jejum e da intolerância à glicose. Os

autores demonstraram ainda, em adipócitos isolados destes ratos, que o tratamento crónico com MG reduz a captação de glicose estimulada pela insulina, assim como a translocação de GLUT4 para a membrana citoplasmática, a fosforilação do IRS-1 e a actividade da PI3K (Dhar *et al.*, 2011).

Estes resultados sugerem que o metilglioxal induz alterações metabólicas consideráveis, podendo ser um dos principais mecanismos que relacione as dietas hiperglicídicas com o desenvolvimento de insulino-resistência. No entanto há que considerar que as doses utilizadas de MG nestes estudos não foram comparadas com os níveis de MG em modelos animais de diabetes tipo 2. Neste sentido, as doses utilizadas poderão ter sido superiores aos níveis endógenos na diabetes tipo 2, levando a uma sobrestimação do efeito do MG.

O nosso grupo estudou anteriormente ratos Wistar submetidos a administração por via oral de MG na dose de 50 a 70 mg/Kg/dia durante 14 semanas e comparou os níveis de MG plasmáticos e no tecido adiposo com os níveis num modelo animal de diabetes tipo 2, os ratos GK. A dose administrada resultou em níveis de MG equivalentes aos verificados nos modelos diabéticos. Foi igualmente observado que a administração de MG não alterou os parâmetros glicémicos dos ratos Wistar, contrariando os resultados dos estudos anteriores (Matafome 2012). Num outro estudo do nosso laboratório com ratos Wistar submetidos a MG por via oral na dose de 75 mg/Kg/dia durante 8 semanas, também não foram encontradas alterações no perfil glicémico em relação aos controlos (Rodrigues 2013). Estes resultados sugerem que o metilglioxal, por si só, não é suficiente ou não tem um papel relevante no desenvolvimento de insulino-resistência.

O presente estudo, no entanto, sugere o envolvimento do metilglioxal no desenvolvimento de insulino-resistência muscular, mas em circunstâncias de sobrecarga, como aquela induzida pela dieta hiperlipídica. O facto de as variáveis dieta hiperlipídica e MG não induzirem insulino-resistência quando isoladamente, mas apenas quando combinadas

sugere uma de três hipóteses: o MG potencia o efeito da dieta hiperlipídica no desenvolvimento de insulino-resistência, a dieta hiperlipídica potencia os efeitos do metilglioxal ou são dois mecanismos que se potenciam mutuamente.

Um dos mecanismos causais poderá envolver um aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Os níveis de ácidos gordos aumentados, característicos das dietas com elevado teor de lípidos, estimulam a sua β -oxidação muscular, levando à produção aumentada de ROS e conseqüente *stress* oxidativo (Qatanani & Lazar 2007). A acumulação de ROS, além de por si só induzir insulino-resistência através da activação de cinases de serina que interferem na via de sinalização da insulina, tais como JNK, p38-MAPK e IKK, provoca disfunção no metabolismo oxidativo mitocondrial. (Abdul-Ghani & DeFronzo 2010). Este fenómeno gera a acumulação de ácidos gordos e metabolitos lipídicos, indutores de insulino-resistência. O metilglioxal, por sua vez, também é um potente indutor do *stress* oxidativo. Além de directamente aumentar a produção de ROS, também reduz as defesas antioxidantes (Matafome 2013). É possível que a administração crónica de MG amplifique o *stress* oxidativo gerado pela dieta hiperlipídica, induzindo insulino-resistência e disfunção mitocondrial, com as conseqüências descritas.

Outro mecanismo poderá envolver a inibição da destoxificação do metilglioxal na presença de níveis elevados de lípidos intra-musculares. O metilglioxal é destoxificado principalmente pela enzima glioxalase-1 (GLO-1), a qual é dependente do glutatião (GSH). É possível que a produção aumentada de ROS associada à dieta hiperlipídica resulte num consumo de GSH, o qual fica indisponível para activar a GLO-1. Nestas condições, a acumulação de MG poderia ser suficiente e equivalente aos estudos anteriormente referidos para induzir insulino-resistência. Há ainda que considerar a possibilidade de todos estes mecanismos actuarem em conjunto.

O aumento dos ácidos gordos livres circulantes verificada nos ratos HFDMG sugere que haja disfunção do metabolismo lipídico. Os ratos HFD não apresentaram diferenças significativas neste parâmetro, indicando que muito possivelmente a dieta hiperlipídica isoladamente não é suficiente para interferir com a oxidação lipídica e/ou o seu armazenamento a nível do tecido adiposo. Porém, a suplementação com metilglioxal pode induzir disfunção mitocondrial, como referido anteriormente, provocando o aumento plasmático dos ácidos gordos livres. Não se pode excluir uma eventual disfunção do tecido adiposo, induzida pelo metilglioxal.

Um dado interessante foi a redução marcada dos níveis séricos de irisina nos ratos diabéticos GK. Como foi referido anteriormente, os estados de insulino-resistência estão associados a disfunção oxidativa mitocondrial. Alguns estudos sugerem que, em parte, esta disfunção se deve à expressão reduzida de genes envolvidos na biogénese mitocondrial, nomeadamente o gene PGC-1 α (Mootha *et al.*, 2003; Patti *et al.*, 2003). Como referido, segundo Böstrom (2012), o PGC-1 α induz a expressão de FNDC5 e, conseqüentemente, de irisina. A insulino-resistência, que caracteriza a diabetes, poderá estar assim associada a níveis reduzidos de irisina, como se demonstrou neste estudo. Os ratos HFDMG também apresentaram uma redução nos níveis séricos de irisina, que se poderá igualmente relacionar com a diminuição da sensibilidade muscular à insulina. É possível que a acumulação acentuada de ROS ou de MG interfira na expressão ou função do gene PGC-1 α . Outros estudos serão necessários para esclarecer este mecanismo. De qualquer forma, uma redução na irisina circulante poderá resultar na diminuição do dispêndio energético corporal e na acumulação ectópica de ácidos gordos, nomeadamente no músculo esquelético, perpetuando um ciclo vicioso de insulino-resistência.

Há ainda a considerar que os mecanismos reguladores da expressão e secreção de irisina são controversos. Alguns estudos demonstraram uma correlação negativa entre os níveis

plasmáticos de irisina e insulino-resistência (Kurdiova *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2013), enquanto outros demonstraram uma correlação positiva (Park *et al.*, 2013; Ebert *et al.*, 2014). Além disso, em alguns estudos em que foi induzida a expressão de PGC-1 α não se verificou aumento da expressão de FNDC5 (Besse-Patin *et al.*, 2014; Norheim *et al.*, 2014; Raschke *et al.*, 2013), o que questiona o papel do PGC-1 α como regulador do FNDC5 e consequentemente da irisina. Assim, mais estudos serão necessários para esclarecer os mecanismos de regulação da irisina e a sua relação com a insulino-resistência.

CONCLUSÃO

O metilglioxal potencia os efeitos da dieta hiperlipídica no desenvolvimento de intolerância à glicose e insulino-resistência muscular e altera a função endócrina do músculo esquelético, especificamente a produção da irisina conduzindo a alterações da homeostasia metabólica muscular e sistêmica.

Apesar de a Diabetes Mellitus ser uma patologia na qual se tem feito grandes avanços no sentido da compreensão da sua fisiopatologia e abordagem terapêutica, muitos mecanismos subjacentes ao seu desenvolvimento ainda são desconhecidos. Este estudo poderá ajudar a aprofundar a compreensão desses mecanismos, assim como levar ao desenvolvimento de novas estratégias preventivas e terapêuticas.

AGRADECIMENTOS

Cumpre-me antes de mais agradecer aos meus pais, que tornaram possível e viveram o meu progresso académico até este ponto.

Um agradecimento que a todos toca vai para a equipa do laboratório, pelo bom clima de amizade e apoio dados na actividade de investigação.

Por fim, cumpre-me destacar a minha mais viva gratidão para os meus dois orientadores: o co-orientador Doutor Paulo Matafome, cuja supervisão se desenvolveu aliando a crítica competente à amizade que se foi sedimentando, e, com particular ênfase, a Professora Doutora Raquel Seiça, que com a sua competência, a sua amizade e a sua palavra de estímulo, soube não só orientar-me, como despertar o meu interesse para a investigação laboratorial. Bem-haja por isso, Professora.

REFERÊNCIAS

- Abdul-Ghani, M a.; DeFronzo, R a. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 2010, 476279.
- Besse-Patin, a.; Montastier, E.; Vinel, C.; Castan-Laurell, I.; Louche, K.; Dray, C.; Daviaud, D.; Mir, L.; Marques, M.; Thalamas, C.; Valet, P.; Langin, D.; Moro, C.; Viguerie, N. Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine. *Int. J. Obes. (Lond.)*, **2014**, 38, 707–13.
- Boström, P.; Wu, J.; Jedrychowski, MP.; Korde, A.; Ye, L.; Lo, JC.; Rasbach, KA.; Boström, EA.; Choi, JH.; Long, JZ.; Kajimura, S.; Zingaretti, MC.; Vind, BF.; Tu, H.; Cinti, S.; Højlund, K.; Gygi, SP.; Spiegelman, BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, **2012**, 481, 463–468.
- Brownlee, M. The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. *Diabetes*, **2005**, 54, 1615–1625.
- Bugianesi, E.; McCullough, AJ.; Marchesini, G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*, **2005**, 42, 987–1000.
- Choi, Y-K.; Kim, M-K.; Bae, KH.; Seo, H-A.; Jeong, J-Y.; Lee, W-K.; Kim, J-G.; Lee, I-K.; Park, K-G. Serum irisin levels in new-onset type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **2013**, 100, 96–101.
- Dhar, A.; Dhar, I.; Jiang, B.; Desai, KM.; Wu, L. Chronic methylglyoxal infusion by minipump causes pancreatic beta-cell dysfunction and induces type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats. *Diabetes*, **2011**, 60, 899–908.
- Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **2014**, 37 Suppl 1, S81–90.
- Ebert, T.; Focke, D.; Petroff, D.; Wurst, U.; Richter, J.; Bachmann, A.; Lössner, U.; Kralisch, S.; Kratzsch, J.; Beige, J.; Bast, I.; Anders, M.; Blüher, M.; Stumvoll M.; Fasshauer M. Serum levels of the myokine irisin in relation to metabolic and renal function. *Eur. J. Endocrinol.*, **2014**, 170, 501–506.
- Eckardt, K.; Görgens, SW.; Raschke, S.; Eckel, J. Myokines in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia*, **2014**, 57, 1087–99.
- Elsen, M.; Raschke, S.; Eckel, J. Browning of white fat: Does irisin play a role in humans?. *J. Endocrinol.*, **2014**, 222, 366–376.
- Jia, X.; Olson, DJH.; Ross, ARS.; Wu, L. Structural and functional changes in human insulin induced by methylglyoxal. *FASEB J.*, **2006**, 20, 1555–7.
- Jia, X.; Wu, L. Accumulation of endogenous methylglyoxal impaired insulin signaling in adipose tissue of fructose-fed rats. *Mol. Cell. Biochem.*, **2007**, 306, 133–9.

- Kurdiova, T.; Balaz, M.; Mayer, A.; Maderova, D.; Belan, V.; Wolfrum, C.; Ukropec, J.; Ukropcova, B. Exercise-mimicking treatment fails to increase Fndc5 mRNA & irisin secretion in primary human myotubes. *Peptides*, **2014**, *56*, 1–7.
- Lapolla, A.; Flamini, R.; Dalla Vedova, A.; Senesi, A.; Reitano, R.; Fedele, D.; Basso, E.; Seraglia, R.; Traldi, P. Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **2003**, *41*, 1166–73.
- Liu, J-J.; Wong, MDS.; Toy, WC.; Tan, CSH.; Liu, S.; Ng, XW.; Tavintharan, S.; Sum, CF.; Lim, SC. Lower circulating irisin is associated with type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Complications*, **2013**, *27*, 365–9.
- Matafome, P.; Santos-Silva, D.; Crisóstomo, J.; Rodrigues, T.; Rodrigues, L.; Sena, CM.; Pereira, P.; Seica, R. Methylglyoxal causes structural and functional alterations in adipose tissue independently of obesity. *Arch. Physiol. Biochem.*, **2012**, *118*, 58–68.
- Matafome, P.; Sena, C.; Seica, R. Methylglyoxal, obesity, and diabetes. *Endocrine*, **2013**, *43*, 472–484.
- Mootha, VK.; Lindgren, CM.; Eriksson, K.; Subramanian, A.; Sihag, S.; Lehar, J.; Puigserver, P.; Carlsson, E.; Ridderstråle, M.; Laurila, E.; Houstis, N.; Daly, MJ.; Patterson, N.; Mesirov, JP.; Golub, TR.; Tamayo, P.; Spiegelman, B.; Lander, ES.; Hirschhorn, JN.; Altshuler, D.; Groop, LC. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.*, **2003**, *34*, 267–273.
- Negre-Salvayre, A.; Salvayre, R.; Augé, N.; Pamplona, R.; Portero-Otín, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid. Redox Signal.*, **2009**, *11*, 3071–3109.
- Norheim, F.; Langleite, TM.; Hjorth, M.; Holen, T.; Kielland, A.; Stadheim, HK.; Gulseth, HL.; Birkeland, KI.; Jensen, J.; Drevon, C a. The effects of acute and chronic exercise on PGC-1 α , irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. *FEBS J.*, **2014**, *281*, 739–49.
- Odani, H.; Shinzato, T.; Matsumoto, Y.; Usami, J.; Maeda, K. Increase in Three α,β -Dicarbonyl Compound Levels in Human Uremic Plasma : Specific in Vivo Determination of Intermediates in Advanced Maillard Reaction. **1999**, *93*, 89–93.
- Park, KH.; Zaichenko, L.; Brinkoetter, M.; Thakkar, B.; Sahin-Efe, A.; Joung, KE.; Tsoukas, M a.; Geladari, E V.; Huh, JY.; Dincer, F.; Davis, CR.; Crowell, J a.; Mantzoros, CS. Circulating irisin in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2013**, *98*, 4899–907.
- Patti, ME.; Butte, AJ.; Crunkhorn, S.; Cusi, K.; Berria, R.; Kashyap, S.; Miyazaki, Y.; Kohane, I.; Costello, M.; Saccone, R.; Landaker, EJ.; Goldfine, AB.; Mun, E.; DeFronzo, R.; Finlayson, J.; Kahn, CR.; Mandarino, LJ. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**, *100*, 8466–71.
- Pedersen, BK.; Febbraio, MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **2012**, *8*, 457–465.

Pedersen, L.; Hojman, P. Muscle-to-organ cross talk mediated by myokines. *Adipocyte*, **2012**, *1*, 164–167.

Qatanani, M.; Lazar, MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance : many choices on the menu. *Genes Dev.*, **2007**, *21*, 1443–1455.

Raschke, S.; Elsen, M.; Gassenhuber, H.; Sommerfeld, M.; Schwahn, U.; Brockmann, B.; Jung, R.; Wisløff, U.; Tjønnå, AE.; Raastad, T.; Hallén, J.; Norheim, F.; Drevon, C a.; Romacho, T.; Eckardt, K.; Eckel, J. Evidence against a beneficial effect of irisin in humans. *PLoS One*, **2013**, *8*, e73680.

Riboulet-Chavey, a.; Pierron, a.; Durand, I.; Murdaca, J.; Giudicelli, J.; Van Obberghen, E. Methylglyoxal Impairs the Insulin Signaling Pathways Independently of the Formation of Intracellular Reactive Oxygen Species. *Diabetes*, **2006**, *55*, 1289–1299.

Rodrigues, T.; Matafome, P.; Seica, R. Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. *Arch. Physiol. Biochem.*, **2013**, *119*, 209–18.

Wu, J.; Boström, P.; Sparks, LM.; Ye, L.; Choi, JH.; Giang, AH.; Khandekar, M.; Virtanen, KA.; Nuutila, P.; Schaart, G.; Huang, K.; Tu, H.; Van Marken Lichtenbelt, WD.; Hoeks, J.; Enerbäck, S.; Schrauwen, P.; Spiegelman, BM. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, **2012**, *150*, 366–376.