



**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**

**DANIEL TAVARES REGO**

***O EFEITO DA BERBERINA NA  
SENSIBILIDADE À INSULINA NUM  
MODELO ANIMAL DE DIABETES TIPO 2***

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOLÓGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROFESSORA CRISTINA MARIA TRISTÃO SENA  
PROFESSORA RAQUEL MARIA FINO SEIÇA**

**MARÇO/2013**

# **O Efeito da Berberina na Sensibilidade à Insulina num Modelo Animal de Diabetes Tipo 2**

**Autores:** Daniel Tavares Rego<sup>1</sup>

Cristina Maria Tristão Sena<sup>2</sup>

Raquel Maria Fino Seiça<sup>2</sup>

<sup>1</sup> **Afiliação:** Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

**Endereço:** Praça Fausto Correia, nº 23, 3<sup>o</sup>C, 3000-253 Coimbra

<sup>2</sup> **Afiliação:** Instituto de Fisiologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra,  
Portugal

**Endereço:** Subunidade I – pólo 3, Universidade de Coimbra, Azinhaga de Santa Comba,  
Celas, Portugal

“Man may be the captain of his fate, but he is also the victim of his blood sugar”

Wilfrid Oakley [Trans. Med. Soc. Lond. 78, 16 (1962)]

# ÍNDICE

	página
Resumo.....	iv
Palavras-chave.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Abstract.....	vii
Keywords.....	viii
Abbreviations.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Introdução.....	1
Materiais e Métodos.....	4
Resultados.....	9
Discussão.....	17
Conclusões.....	21
Agradecimentos.....	22
Referências.....	23

## RESUMO

A diabetes *mellitus* tipo 2 é uma doença cuja incidência tem vindo a aumentar em todos os países desenvolvidos, de tal forma que é tida como uma verdadeira epidemia. É uma patologia crónica associada a graves morbilidades macro e microvasculares que incluem patologia retiniana, renal e neurosensitiva, e que resulta de alterações da célula  $\beta$  pancreática e insulinoresistência.

A berberina é um alcalóide natural com propriedades anti-hiperglicémicas e no aumento da sensibilidade à insulina, tendo sido proposto, em diversos estudos, que a ativação da enzima AMPK fosse um dos seus principais mecanismos de ação.

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar os efeitos da berberina no fígado de ratos Goto-Kakizaki, um modelo animal de diabetes tipo 2 não obeso, e perceber melhor o mecanismo de ação deste composto.

Criámos dois grupos de animais, um grupo controlo de ratos Wistar e Goto-Kakizaki e um grupo de ratos Wistar e Goto-Kakizaki tratados durante 3 meses com berberina. Avaliámos o peso corporal, diversos parâmetros metabólicos e os níveis de AMPK, IRS-1 e Akt no tecido hepático.

Apesar da melhoria dos parâmetros metabólicos, não observámos ativação daquelas proteínas, no tecido hepático, após o tratamento com berberina. Sugere-se que possam existir outras vias moleculares que também contribuam para o efeito metabólico da berberina na diabetes.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Diabetes *mellitus* tipo 2; resistência à insulina; berberina; fígado; proteína cinase ativada pelo AMP.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMP – Monofosfato de adenosina;

AMPK – Proteína cinase ativada pelo AMP;

aPKC – Proteína cinase C atípica;

ATP – Trifosfato de adenosina;

DMT2 – Diabetes *mellitus* tipo2;

GK – Goto-Kakizaki;

HbA<sub>1c</sub> – Hemoglobina A<sub>1c</sub>;

HDL – Lipoproteína de alta densidade;

InsR – Recetor da insulina;

IRS – Substrato do recetor da insulina;

PIP<sub>3</sub> – Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato;

PI3K – Fosfatidilinositol 3-cinase;

PKB – Proteína cinase B;

W – Wistar.

## ABSTRACT

Type 2 diabetes *mellitus* is a growing disease in developed countries. Its incidence is increasing in such a way that it is considered as a real epidemic. Type 2 diabetes is a chronic disease, caused by pancreas  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance, with severe morbidity due to its macro and microvascular complications that include retinal, renal and neurosensitive alterations.

Berberine is a natural alkaloid, capable of improving insulin sensitivity, with anti-hyperglycemic properties. The activation of AMPK was proposed as an important action mechanism to explain berberine's effects.

This work intends to study the hepatic effects of berberine treatment on Goto-Kakizaki rats, a non obese type 2 diabetes animal model, and to understand berberine's molecular mechanism of action.

Two groups were studied, a control group comprising Wistar and Goto-Kakizaki rats and a second group with Wistar and Goto-Kakizaki rats treated with berberine during 3 months. Animal weight was analyzed, as well as various metabolic parameters and AMPK, Akt and IRS-1 hepatic expression.

In spite of improving the metabolic parameters, berberine did not activate these proteins on the hepatic tissue. We suggest that other molecular pathways could be involved in the action mechanism of berberine in type 2 diabetes *mellitus*.



## **KEYWORDS**

Type 2 diabetes *mellitus*; insulin resistance; berberine; liver; AMP-activated protein kinase.

## ABBREVIATIONS

AMP – Adenosine monophosphate;

AMPK – AMP-activated protein kinase;

aPKC – Atypical protein kinase C;

ATP – Adenosine triphosphate;

DMT2 – Type 2 diabetes *mellitus*;

GK – Goto-Kakizaki;

HbA<sub>1c</sub> – A<sub>1c</sub> haemoglobin;

HDL – High density lipoprotein;

InsR – Insulin receptor;

IRS – Insulin receptor substrate;

PIP<sub>3</sub> – Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate;

PI3K – Phosphatidylinositol 3-kinase;

PKB – Protein kinase B;

W – Wistar.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Glicemia em jejum dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB). .....Página 10.
- Figura 2** – Glicemia 2 horas após injeção intraperitoneal de glicose dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB). .....Página 11.
- Figura 3** – Hemoglobina glicada nos ratos W, ratos W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB). .....Página 12.
- Figura 4** – **A.** Análise *Western Blot* da expressão da AMPK (fosforilada e total), no fígado dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB); **B.** Razão entre as proteínas AMPK fosforilada e total. .....Página 14.
- Figura 5** – **A.** Análise *Western Blot* da expressão da AKT (fosforilada e total), no fígado dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB); **B.** Razão entre as proteínas AKT fosforilada e total. .....Página 15.
- Figura 6** – **A.** Análise *Western blot* da expressão da IRS-1 (fosforilada e total), no fígado dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB); **B.** Razão entre as proteínas IRS-1 fosforilada e total. .....Página 16.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Soluções utilizadas na técnica de *Western Blot*. .....Página 8.
- Tabela 2** - Peso corporal dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB). .....Página 9.
- Tabela 3** - Perfil lipídico dos ratos W, ratos W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB). Concentrações de triglicérides, colesterol total e colesterol não HDL. ....Página 13.

## INTRODUÇÃO

A diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) é um problema de saúde à escala global. Estima-se que afete mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo e prevê-se que a sua incidência continue a aumentar nas próximas décadas. [1] O tratamento da DMT2 está limitado pela incompleta eficácia e pelos efeitos secundários dos agentes terapêuticos à disposição do médico, daí que a procura de novos agentes antidiabéticos eficazes e seguros seja emergente. [2]

A berberina é um alcalóide natural extraído de rizomas e raízes de várias plantas, incluindo a *Coptis chinensis*, planta usada na medicina tradicional chinesa devido às suas propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias. [3] Estão descritos diversos efeitos terapêuticos da berberina. Entre eles o efeito anticancerígeno, efeitos metabólicos e cardioprotetores em patologias como a DMT2 e a doença aterosclerótica. [4] O interesse da berberina como possível antidiabético é imenso. O seu efeito anti-hiperglicémico foi constatado quando, em 1988, na China, foi utilizada para tratar gastroenterite em doentes diabéticos. [3] Para além do efeito na glicemia, a berberina aparenta melhorar o perfil de resistência à insulina. Não é completamente conhecido o seu mecanismo de ação, mas pensa-se que a ativação da proteína cinase ativada pelo AMP (AMPK) é a principal via que explica os seus efeitos. [4-7]

A AMPK é uma proteína heterotrimétrica formada por uma subunidade catalítica  $\alpha$  e duas subunidades reguladoras  $\beta$  e  $\gamma$ . Conhecem-se sete genes que codificam diferentes isoformas destas subunidades ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ) que permitem gerar 12

combinações diferentes. [2,8] A AMPK, e as suas proteínas ortólogas, encontram-se presentes em todos os seres eucariontes, sendo a única exceção conhecida o *Encephalitozoon cuniculli*, um parasita intracelular obrigatório, desprovido de mitocôndrias. [9] A AMPK parece funcionar como um sensor e interruptor do estado energético celular que “desliga” processos consumidores de energia e “liga” processos produtores de energia. Neste contexto, a AMPK é ativada pelo aumento da razão AMP/ATP, em situações de hipóxia, de restrição calórica e pelo exercício físico. [10] Ao ser fosforilada, é ativada uma cascata metabólica que culmina com a ativação de processos catabólicos como a captação de glicose, a glicólise, e a captação e oxidação de ácidos gordos. Contrariamente, são inibidos processos anabólicos como a síntese de ácidos gordos, fosfolípidos, triglicerídeos, glicogénio e RNA. [9]

Para além de modular a ativação/inativação destas enzimas, através da ativação da AMPK, a berberina demonstrou também influenciar a expressão genética de proteínas hepáticas envolvidas no metabolismo da glicose e dos lípidos. [11]

Outros estudos atribuem o efeito antidiabético da berberina ao aumento da expressão do recetor da insulina (InsR) e da produção de insulina, à regeneração das células  $\beta$  pancreáticas, e à sua ação antioxidante. [12-14] Alguns destes efeitos são controversos, nomeadamente o aumento da expressão de InsR. [3]

Nos animais, o fígado é responsável pela manutenção dos níveis energéticos celulares, tanto a curto, como a longo prazo, através da sua capacidade de controlar o armazenamento e a libertação de energia, consoante as necessidades orgânicas. O fígado funciona como mediador *major* do equilíbrio entre as fontes de energia, endógenas e exógenas, e os órgãos consumidores de energia. Tem a capacidade de alternar entre um estado anabólico e catabólico. Dado o papel central que o fígado ocupa na fisiologia animal, entende-se que distúrbios na função hepática influenciem o metabolismo e a homeostasia de todo o

organismo como acontece na síndrome metabólica e na DMT2. Por conseguinte, é essencial estudar e compreender as alterações do metabolismo hepático nestas doenças para melhor as conhecermos e desenvolver estratégias terapêuticas.

Com este trabalho pretende-se elucidar o papel da berberina nas alterações hepáticas associadas à DMT2 e esclarecer alguns dos mecanismos envolvidos, conducentes à possível utilização terapêutica deste alcalóide.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## I. Materiais

A berberina foi obtida comercialmente (Sigma Aldrich, Espanha). Foram utilizados neste estudo anticorpos anti-AMPK total e fosforilada (Cell Signalling, EUA), anti-Akt total e fosforilada (Cell Signalling, EUA), anti-IRS-1 total e fosforilada (Cell Signalling, EUA) e anti-actina (Chemicon, Sintra, Portugal).

## II. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (W) e ratos diabéticos tipo 2, não obesos, Goto-Kakizaki (GK) obtidos das colónias locais (Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra).

Utilizámos, neste trabalho, 24 ratos (machos) W e 24 GK com 12 meses de idade. Foram constituídos 2 grupos: 1 grupo controlo composto por 12 ratos W e 12 ratos GK; e um segundo grupo experimental, formado por 12 ratos W e 12 ratos GK sujeitos a um tratamento com 100mg/kg/dia de berberina, desde os 9 meses de idade. A berberina foi administrada por via oral (água do biberão).

Os animais foram mantidos numa sala, expostos a períodos de 12 horas de luz intercalados com 12 horas de escuridão, com temperatura controlada de 22-24°C, humidade de 50-60%, e ventilação adequada.

Todos os procedimentos envolvendo os animais foram levados a cabo de acordo com a



Lei Portuguesa de Experimentação com animais de Laboratório de 2004.

### **III. Determinação do peso corporal e recolha das amostras**

O peso dos animais foi determinado aos 12 meses, após 3 meses de tratamento com berberina. Os 2 grupos de animais foram então anestesiados, após 16 horas de jejum com cloridrato de quetamina (75mg/kg) e cloridrato de clorpromazina (3mg/kg) administrados por via intramuscular.

Os animais foram, de seguida, submetidos a uma punção cardíaca para obtenção das amostras de sangue. Foram utilizados para esta recolha do sangue tubos BDVacutainer com 4,5mg de EDTA (obtenção de plasma) e tubos sem EDTA (obtenção de soro). As amostras foram centrifugadas a 2500 r.p.m. à temperatura de 4°C e, posteriormente, armazenadas a -80°C.

Após a punção cardíaca, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. Foi então extraído o fígado de cada animal e rapidamente congelado em azoto líquido para análise.

### **IV. Determinação da glicemia, HbA<sub>1c</sub> e perfil lipídico**

No final do tratamento, foi determinada a glicemia em jejum (de 16 horas) no sangue da veia da cauda dos ratos com recurso a um glicómetro e às respetivas tiras-teste (*Glucometer Elite* – Bayer Portugal SA, Lisboa, Portugal). Após a determinação da glicemia

em jejum, foi injetada intraperitonealmente 6ml/kg de uma solução de glicose a 30% e determinada a glicemia aos 120 minutos, pelo mesmo método.

A Hemoglobina A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) foi avaliada utilizando o DCA 2000 (Bayer Portugal SA, Lisboa, Portugal).

Foram determinados os níveis de colesterol total, HDL e triglicérides através de um analisador automático (Olympus-Diagnóstica, Portugal).

## V. Homogeneização do fígado e deteção das proteínas AMPK, Akt e IRS-1 por *Western Blot*

Foi obtida uma fatia de fígado congelado, com cerca de 200 mg. Esta foi homogeneizada em 2 mL de tampão de lise (tabela 1) e seguidamente sonicada. Procedeu-se, então, a duas centrifugações (20', 14000xg, 4°C), recolhendo-se, sucessivamente, o sobrenadante. Calculou-se a concentração de proteína pelo método do BCA (*BCA protein assay*, Pierce, USA) e as amostras foram aliqüotadas e, após adicionado tampão *Sample*, armazenadas a -80°C.

### **Western Blot**

A identificação e quantificação das proteínas AMPK, Akt e IRS-1 (*Insulin receptor substrate*) foram efetuadas utilizando a técnica de *Western Blot*. A  $\beta$ -actina serviu como controlo interno da quantidade de proteína das amostras. A quantificação das bandas foi calculada com o programa Image Quant, Molecular Dynamics, EUA.

Os géis de acrilamida para separação das proteínas por peso molecular foram polimerizados no sistema de polimerização (*Mini-PROTEAN 3 Cell*, Bio-Rad, EUA), com os tampões *Resolving* e *Stacking* (tabela 1). Após as amostras terem sido desnaturadas e sonicadas, correram-se os géis no sistema *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad, EUA) usando um padrão de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards, Dual Color*, Bio-Rad, EUA), a voltagem constante de 160 V.

Após a ativação das membranas PVDF (*Polyvinylidene fluoride membrane*, Bio-Rad, EUA) com metanol, as proteínas foram transferidas para estas no sistema de transferência (*Mini Trans-Blot*, Bio-Rad, EUA), a amperagem constante de  $\pm 300\text{mA}$ , em tampão *CAPS* (tabela 1).

As membranas foram bloqueadas com solução TBST-BSA a 5% (tabela 1), à temperatura ambiente durante 2 horas e depois lavadas com TBST (tabela 1). Após o bloqueio, as membranas incubaram *overnight* a 4°C com os respetivos anticorpos primários. Repetiu-se a lavagem com TBST e incubaram-se com os respetivos anticorpos secundários durante 2 horas, com agitação constante e à temperatura ambiente.

Após remoção do anticorpo secundário em excesso, as membranas foram incubadas durante aproximadamente 2 minutos com o substrato enzimático ECF (*Mouse ECF Western Blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, UK) e reveladas através do leitor de fluorescência (Typhoon, GE Healthcare, USA).

**Tabela 1** – Soluções utilizadas na técnica de *Western Blot*.

<b>Tampão de lise</b>
25 mM Tris-HCl (pH 7,6); 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 20 mM NaF; 2mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 10 mM β-glicerofosfato; 2,5mM pirofosfato de sódio; 10mM PMSF e 20 µl cocktail inibidor de proteases por 0,5 g de tecido.
<b>Tampão Sample</b>
62,5mM Tris-HCl, pH 6,6; 20% SDS 10%; 2,5 mL glicerol; 0,05% Bromefenol Blue
<b>Tampão Resolving</b>
0,75mM Tris-HCl; 0,2% SDS; pH 8,8
<b>Tampão Stacking</b>
0,25mM Tris-HCl; 0,2% SDS; pH 6,8
<b>Tampão Running</b>
125mM Tris-Base; 480mM Glicina; 9mM SDS; pH 8,8
<b>Tampão CAPS</b>
50mM CAS; 2% NaOH; pH 11;10% metanol
<b>Tampão TBS</b>
250mM Tris;1,5mM NaCl; pH 7,6
<b>Tampão TBST</b>
Solução TBS; 1% Tween-20

## VI. Análise estatística

Os dados estão apresentados como valor médio dos resultados ± erro padrão da média (e.p.m.). Foi realizado o teste ANOVA, sendo os valores de  $p < 0,05$  considerados estatisticamente significativos.

## RESULTADOS

### I. Peso corporal

No final dos 3 meses de tratamento, os animais foram pesados e verificou-se que o peso dos ratos Wistar tratados com berberina (W+BRB) era inferior ao peso dos respetivos controlos (W) ( $p < 0,01$ ). Ambos os grupos de ratos GK tinham menor peso do que os grupos de ratos W ( $p < 0,001$ ) (tabela 2).

**Tabela 2** – Peso corporal dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB).

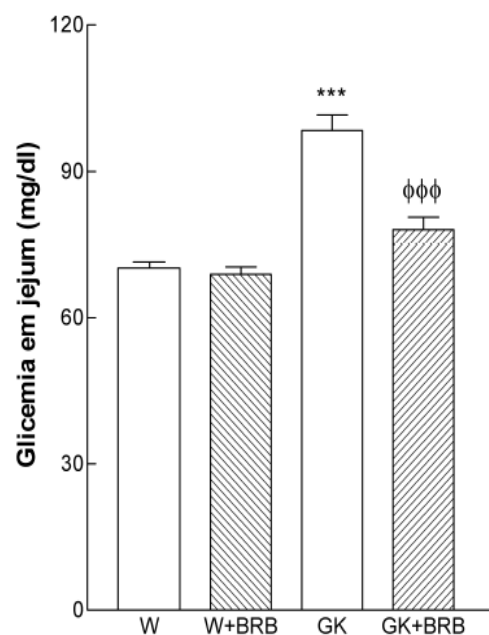
	W	W + BRB	GK	GK+BRB
Peso corporal (g)	531,9 ± 16.1	470,6 ± 15 **	400,1 ± 5.5 ***	388,5 ± 7 ***

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs ratos W

## II. Glicemia em jejum e duas horas após administração de glicose

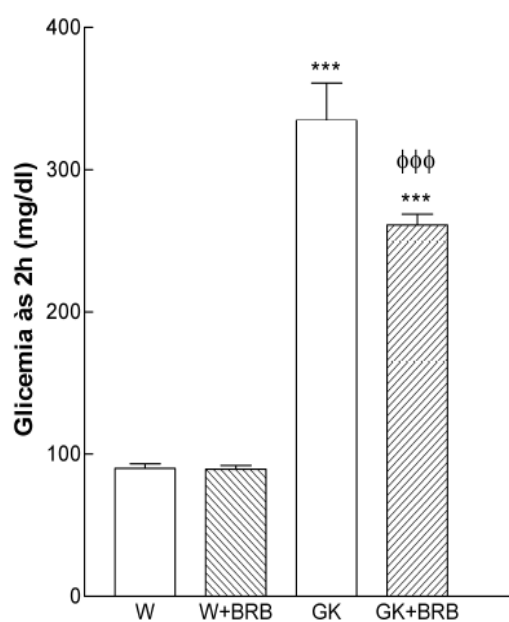
Os ratos GK apresentaram níveis mais elevados de glicose em jejum que diminuíram com o tratamento com berberina ( $p < 0,001$ , figura 1).

Os ratos GK apresentaram uma intolerância marcada à glicose ( $p < 0,001$ ) e a berberina induziu uma redução da glicemia 2h após administração de glicose ( $p < 0,001$ , figura 2).



**Figura 1** – Glicemia em jejum dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB).

Valores médios  $\pm$  epm. \*\*\*  $p < 0,001$  vs ratos W; φφφ  $p < 0,001$  vs ratos GK.

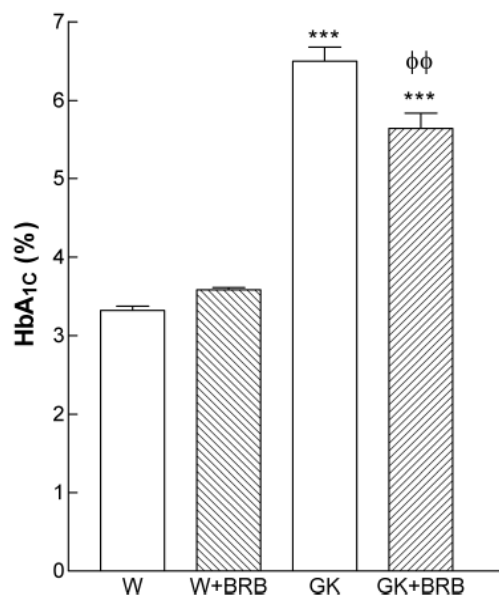


**Figura 2** – Glicemia 2 horas após injeção intraperitoneal de glicose dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB).

Valores médios  $\pm$  epm. \*\*\*  $p < 0,001$  vs ratos W;  $\phi\phi\phi$   $p < 0,001$  vs ratos GK.

### III. Hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>)

Os ratos GK apresentaram valores de HbA<sub>1c</sub> superiores aos dos ratos W ( $p < 0,001$ ). Após o tratamento com berberina os ratos GK apresentaram uma redução dos níveis de hemoglobina glicada ( $p < 0,01$ , figura 3).



**Figura 3** – Hemoglobina glicada nos ratos W, ratos W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB).

Valores médios  $\pm$  epm. \*\*\*  $p < 0,001$  vs ratos W;  $\phi\phi$   $p < 0,01$  vs ratos GK.

#### IV. Perfil lipídico

Observámos, nos ratos GK, um aumento do colesterol total e dos triglicerídeos, quando comparados com os ratos Wistar, não alterado após o tratamento com berberina. O colesterol não HDL, não teve diferenças entre os diferentes grupos de animais (tabela 3).



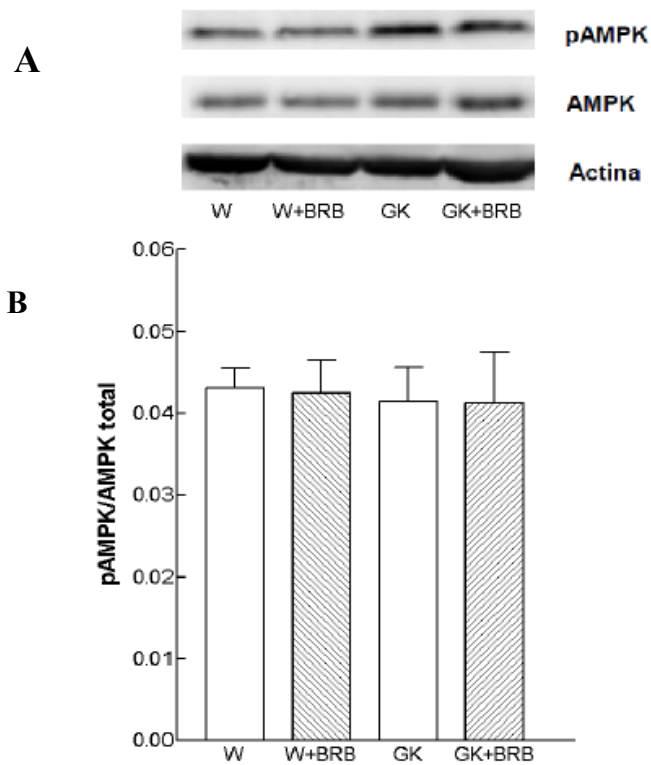
**Tabela 3** – Perfil lipídico dos ratos W, ratos W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB). Concentrações de triglicerídeos, colesterol total e colesterol não HDL.

	W	W + BRB	GK	GK + BRB
Triglicerídeos (mg/dl)	89 ± 7,4	77,9 ± 6,6	127 ± 11,2 *	122,2 ± 11,7
Colesterol total (mg/dl)	113 ± 4,7	109,4 ± 6,4	149,4 ± 7,7 *	132,9 ± 11,3
Colesterol não HDL (mg/dl)	51 ± 2,4	51,8 ± 3,6	53,95 ± 4,7	50,37 ± 5

\* p<0,05 vs ratos W

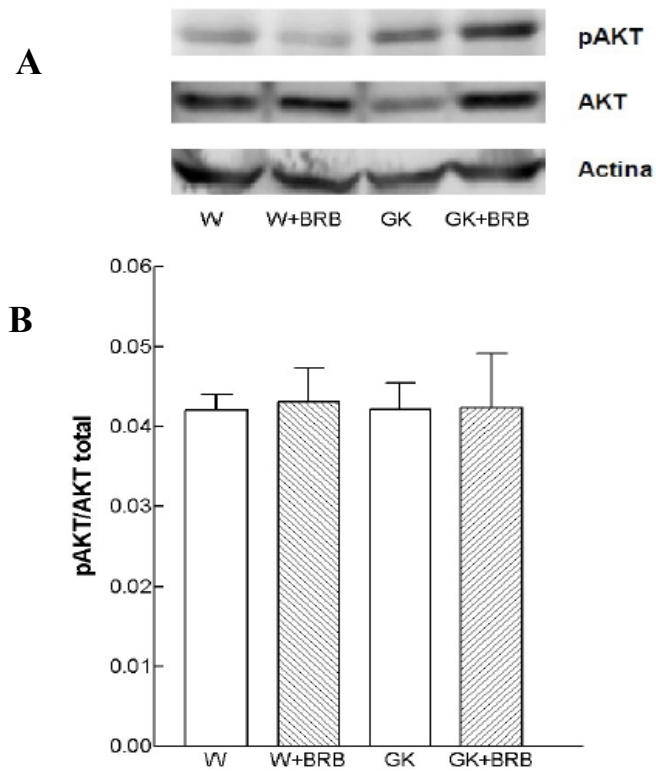
## V. Expressão das proteínas AMPK, Akt e IRS-1

Não foram observadas variações significativas na razão entre as frações fosforiladas e proteínas totais, obtidas por densitometria média dos *blots*, da AMPK (figura 4), nem da Akt (figura 5) (pAMPK/AMPK total e pAkt/Akt total) nos diferentes grupos tratados. O mesmo foi observado na expressão da IRS-1, fração fosforilada e proteínas totais (pIRS-1/IRS-1 total) (figura 6).



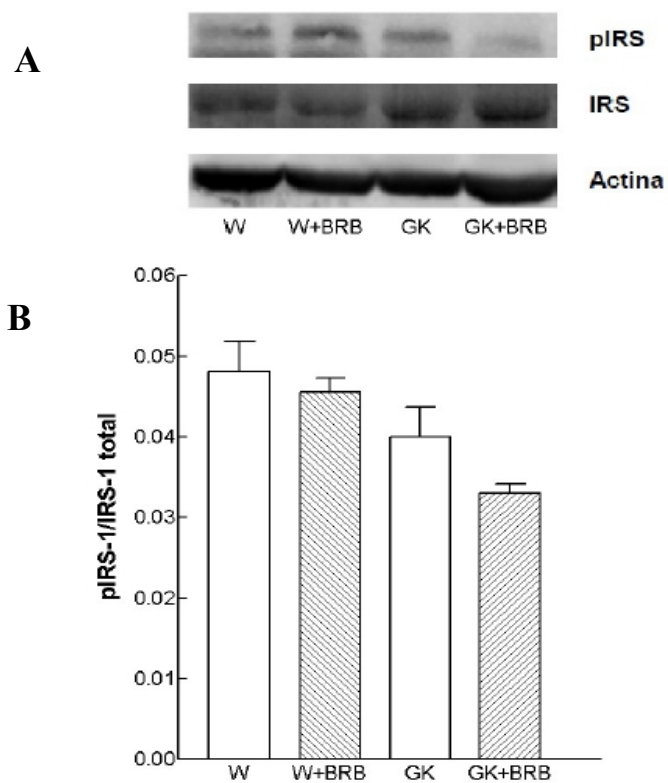
**Figura 4 – A.** Análise *Western Blot* da expressão da AMPK (fosforilada e total), no fígado dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB); **B.** Razão entre as proteínas AMPK fosforilada e total.

Valores médios  $\pm$  epm (n=8).



**Figura 5 – A.** Análise *Western Blot* da expressão da AKT (fosforilada e total), no fígado dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB); **B.** Razão entre as proteínas AKT fosforilada e total.

Valores médios  $\pm$  epm (n=8).



**Figura 6 – A.** Análise *Western blot* da expressão da IRS-1 (fosforilada e total), no fígado dos ratos W, W tratados com berberina (W + BRB), GK e GK tratados com berberina (GK + BRB); **B.** Razão entre as proteínas IRS-1 fosforilada e total.

Valores médios  $\pm$  epm (n=8).

## DISCUSSÃO

A berberina tem despertado o interesse da comunidade científica nos últimos 10 anos devido às suas propriedades e efeitos benéficos em várias patologias. Neste trabalho verificou-se o efeito anti-hiperglicêmico, e na redução do peso corporal, da berberina. No entanto os resultados obtidos relativamente à AMPK, IRS-1 e Akt não permitem tirar conclusões quanto ao mecanismo de ação da berberina.

Os ratos GK são um modelo de DMT2 não obesa caracterizados por apresentarem precocemente hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina. [15]

A DMT2 é uma patologia de etiologia multifatorial que afeta diversos órgãos, caracterizada por hiperglicemia, poliúria, polidipsia compensatória, letargia e, com a progressão da doença, pelas suas complicações macro e microvasculares. [16] À DMT2 associa-se muito frequentemente a hipertensão e a dislipidemia. [17] Um dos fatores que explicam a fisiopatologia da DMT2 é a insulinoresistência. Esta pode ser entendida como a situação clínica em que os órgãos que normalmente estão sujeitos ao efeito da insulina são resistentes à sua ação sendo, por isso, necessárias concentrações mais elevadas de insulina (hiperinsulinemia compensatória) para se verificar o mesmo efeito. [18]

A insulina exerce o seu efeito, após ligação ao seu recetor, no fígado, músculo, tecido adiposo, e em outros órgãos como o cérebro e nas próprias células  $\beta$  do pâncreas. Os recetores da insulina são proteínas pertencentes à sub-família de tirosina cinases e já foram identificados vários substratos desses recetores. Pelo menos quatro desses substratos intracelulares pertencem à família das IRS (*Insulin-receptor substrate*), entre eles, a IRS-1.

Nesta cascata de sinalização da insulina seguem-se a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) que se liga aos substratos do recetor da insulina quando fosforilados e que leva, entre outras coisas, à formação de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). O incremento das concentrações de PIP<sub>3</sub> leva então à ativação da proteína cinase C atípica (aPKC) e da proteína cinase B (PKB)/Akt. Enquanto a aPKC está envolvida na síntese de lípidos, a Akt modula o transporte e o metabolismo da glicose e do glicogénio. Quando ativada, a Akt inibe a síntese hepática de glicose e promove a glicogénese a partir da restante glicose. [19-21] Ao analisarmos a expressão e fosforilação da IRS-1 e Akt, procurámos perceber se a berberina modelava de alguma forma a via de sinalização da insulina e se esse efeito estava relacionado com a ativação da AMPK. Não observámos variações significativas na expressão da IRS-1 e da Akt nos fígados dos ratos GK nem alterações após tratamento com berberina. Estes resultados não estão em concordância com os resultados de outros trabalhos que mostraram um aumento da expressão da Akt fosforilada hepática [22] após tratamento com berberina. Xie *et al.* mostraram que em ratos com diabetes induzida pelo aloxano, os níveis de Akt e IRS fosforiladas eram menores quando comparados com um grupo controlo e que o tratamento com a berberina era capaz de repor os níveis das frações fosforiladas. [23] Outros estudos demonstraram, contudo, uma fraca ou até mesmo inexistente ativação da AKT e de IRS-1 após o tratamento com a berberina. [8,24,26] Também não verificámos ativação da AMPK após o tratamento com a berberina em ambas as estirpes. Em oposição a estes resultados, vários estudos demonstraram, de forma consistente, a ativação da AMPK pela berberina. [4,5,24,25] No entanto, é plausível que a via de ação da berberina não passe exclusivamente pela ativação da AMPK, como já foi proposto em outros trabalhos. [11] Foretz *et al.* mostrou que a metformina, um antidiabético oral que também ativa a AMPK, diminuiu de igual forma a gliconeogénese e a glicemia de ratos sem a subunidade catalítica  $\alpha$  da AMPK (AMPK $\alpha$

*knockout*). [27] Também as baixas concentrações de berberina alcançadas nos tecidos-alvo, podem justificar os nossos resultados; a concentração de 100 mg/kg/dia pode ter sido insuficiente para induzir efeitos. De facto, Zhang e colaboradores administraram 250mg/kg/dia no seu estudo com ratos diabéticos KKAY. [7] Por outro lado, o modo de administração da berberina, poderá não ter sido o mais eficaz para assegurar uma dose precisa de berberina para cada animal. A somar a estas variáveis, é conhecido que a farmacocinética da berberina dificulta a biodisponibilidade nos tecidos em que atua. A absorção da berberina por via oral está, em parte, comprometida por uma glicoproteína-P, presente nas células epiteliais da parede intestinal, responsável pelo transporte ativo da berberina, do enterócito, de volta para o lúmen intestinal. [14] Um estudo publicado em 2002, revelou que apenas 5% da berberina ingerida era absorvida, e que quando administrada concomitantemente com inibidores conhecidos da glicoproteína-P, como a ciclosporina A e o verapamil, a absorção da berberina era seis vezes superior. [28] Assim sendo, é possível que as concentrações hepáticas conseguidas de berberina não tenham sido suficientes para demonstrar, de forma estatisticamente significativa, ativação da AMPK, mas que tenha sido suficiente para provocar alguns dos efeitos metabólicos já conhecidos da berberina.

Neste trabalho, constatou-se uma diminuição do peso apenas nos ratos normais tratados com a berberina. A diminuição do peso corporal já tinha sido demonstrada em indivíduos submetidos ao tratamento com a berberina. Zhang e colaboradores (2008) demonstraram uma diminuição do peso corporal de doentes com DMT2 após o tratamento com berberina. [29] Não obstante, a berberina não demonstrou, num outro estudo, efeito sobre o peso corporal de ratos diabéticos KKAY. [7] O nosso trabalho põe em evidência o efeito da berberina no perfil glicémico (glicemia em jejum e às 2h e na HbA<sub>1c</sub>). Estes resultados estão concordantes com outros estudos que demonstraram igualmente uma diminuição da glicemia

em jejum e da hemoglobina glicada, bem como uma melhoria da glicemia pós-prandial nos indivíduos diabéticos tipo 2 submetidos ao tratamento com berberina. [24,29,30] Yin e seus colaboradores (2008) mostraram que os resultados do tratamento com berberina eram sobreponíveis ao tratamento com metformina. Em relação ao perfil lipídico, os nossos resultados não são concordantes com os resultados dos trabalhos de Yin e Zhang que demonstraram uma diminuição dos níveis de triglicerídeos, colesterol total e LDL doentes com diabetes tipo 2. [29,30]



## CONCLUSÕES

Com este nosso trabalho, demonstrámos que a berberina tem potencial como possível agente antidiabético. Usada na medicina tradicional chinesa, a berberina poderá ser usada na medicina ocidental como um agente natural, seguro, com efeitos benéficos na DMT2 e na síndrome metabólica, ao melhorar o perfil glicémico e diminuir o peso corporal. Apesar de não termos mostrado ativação da AMPK, pela berberina, sugerimos que estes efeitos metabólicos não estão somente dependentes da ativação da AMPK. O mecanismo de ação da berberina continuará certamente a ser estudado e novos desenvolvimentos permitirão uma compreensão sobre as principais vias através das quais este alcalóide exerce os seus efeitos metabólicos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Professora Cristina Sena e à Professora Raquel Seiça pela oportunidade de participar neste projeto. Pelo seu rigor, pela sua dedicação e apoio com que me presentearam desde o 3º ano deste Mestrado Integrado em Medicina.

À Ana Faustino, à Ana Pereira, e aos restantes investigadores e funcionários do Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, que tanto me ajudaram durante a minha passagem no laboratório. Agradeço pela sua disponibilidade e pelos seus esclarecimentos.

À Vanessa Aguiar que me acompanhou durante a realização deste trabalho. Agradeço por todo o seu apoio e pela partilha de ideias.

## REFERÊNCIAS

1. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. 2011;378(9785):31-40.
2. Zhang B, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism*. 2009;9:407-16.
3. Yin J, Gao Z, Liu D, Liu Z, Ye J. Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294:148-156.
4. Wang Q, Zhang M, Liang B, Shirwany N, Zhu Y, Zhou M. Activation of AMP-activated protein kinase is required for berberine-induced reduction of atherosclerosis in mice: the role of uncoupling protein 2. *Plos one*. 2011;6(9):1-9.
5. Li Y, Ren G, Wang YX, Kong W, Yang P, Wang YM, Li YM, Yi H, Li Z, Song D, Jiang J. Bioactivities of berberine metabolites after transformation through CYP450 isoenzymes. *Journal of Translational Medicine*. 2011;9:62-72.
6. Xia X, Yan J, Shen Y, Tang K, Yin J, Zhang Y, Yang D, Liang H, Ye J, Weng J. Berberine

improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *Plos one*. 2011;6(2):1-10.

7. Zhang Q, Xiao X, Feng K, Wang T, Li W, Yuan T, Sun X, Sun Q, Xiang H, Wang H. Berberine moderates glucose and lipid metabolism through multipathway mechanism. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2011;2011:1-10.

8. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hébrand S, Lantier L, Mounier R, Andreelli F, Foretz M. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol*. 2009;196(1):81-98.

9. Hardie D. AMP-activated protein kinase – an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development*. 2011;25:1895-1908.

10. Wang S, Song P, Zou M. AMP- activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases. *Clin Sci*. 2012;122(22):555-573.

11. Ge Y, Zhang Y, Li R, Chen W, Li Y, Chen G. Berberine regulated Gck, G6pc, Pck1 and Srebp-1c expression and activated AMP-activated protein kinase in primary rat hepatocytes. *Int J Biol Sci*. 2011;7:673-683.

12. Zhang H, Wei J, Xue R, Wu J, Zhao W, Wang Z, Wang S, Zhou Z, Song D, Wang Y, Pan H, Kong W, Jiang J. Berberine lowers blood glucose in type 2 diabetes melitus patients through increasing insulin receptor expression. *Metabolism Clinical and Experimental*.

2010;59:285-292.

13. Kong W, Zhang H, Song D, Xue R, Zhao W, Wei J, Wang Y, Shan N, Zhou Z, Yang P, You X, Li Z, Si S, Zhao L, Pan H, Jiang J. berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2009;58:109-119.

14. Vuddanda P, Chakraborty S, Singh S. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010;19(10):1297-1307.

15. Sena CM, Matafome P, Louro T, Nunes E, Fernandes R, Seica RM. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *British Journal of Pharmacology*. 2011;163:424-437.

16. Lin Y, Sun Z. Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*. 2010;204:1-11.

17. Tierney LM. *Current medical diagnosis and treatment*. New York: Lange Medical Books/McGraw.Hill; 2005.

18. Mercurio V, Carlomagno G, Fazio V, Fazio S. Insulin resistance: is it time for primary prevention?. *World J Cardiol*. 2012;4(1):1-7.

19. Farese RV, Sajan MP, Standaert ML. Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp*

Biol Med. 2005;230(9):593-605.

20. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.

21. Iynedjian PB, Roth RA, Fleischmann M, Gjinovci A. Activation of protein kinase B/cAkt in hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase. *Biochem J*. 2000;351:621-7.

22. Zhao H, Sui Y, Qiao C, Yip K, Leung R, Tsui S, Wong H, Zhu X, Siu J, He L, Guan J, Liu L, Lee H, Xu H, Tong P, Chan J. Sustained antidiabetic effects of a berberine-containing chinese herbal medicine through regulation of hepatic gene expression. *Diabetes*. 2012;3950:1-23.

23. Xie X, Li W, Lan T, Liu W, Peng J, Huang K, Huang J, Shen X, Liu P, Huang H. Berberine ameliorates hyperglycemia in alloxan-induced diabetic C57BL/6 mice through activation of Akt signaling pathway. *Endocrine Journal*. 2011;58(9):761-8.

24. Cheng Z, Pang T, Gu M, Gao A, Xie C, Li J, Nan F, Li J. Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006;1760(11):1682-9.

25. Turner N, Li J, Gosby A, To SWC, Cheng Z, Miyoshi H, Taketo M, Cooney G, Kraegen E, James D, Hu LH, Li J, Ye J. Berberine and its more biologically available derivative,

dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I. A mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action. *Diabetes*. 2008;57:1414-8.

26. Kim S, Shin E, Kim ED, Bayaraa T, Frost S, Hyun C. Berberine activates GLUT1-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(11):2120-5.

27. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2355-69.

28. Pan G, Wang G, Liu X, Fawcett P, Xie Y. The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption. *Pharmacology & Toxicology*. 2002;91(4):193-7.

29. Zhang Y, Li X, Zou D, Liu W, Yang J, Zhu N, Huo L, Wang M, Hong J, Wu P, Ren G, Ning G. The treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(7):2559-65.

30. Yin J, Xing H, Ye J. Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2008;57(5):712-7.