

**Comunicações Orais - *Investigação Básica***

Sexta Feira, 12 de Março de 2010

(11h45)

**Sala Fénix I, II**

(C31 a C36)



SOCIEDADE PORTUGUESA  
DIABETOLOGIA  
PORTUGUESE  
SOCIETY OF DIABETOLOGY

## C31

### THE CHRONIC INGESTION OF CAFFEINE PREVENTS INSULIN RESISTANCE AND HYPERTENSION IN HIGH FAT AND HIGH SUCROSE DIET RATS

Nunes da Silva T, Conde SV, Mota Carmo M, Monteiro EC, Guarino MP

**Introduction:** Insulin resistance and hypertension are core metabolic abnormalities in type 2 diabetes, metabolic syndrome and obstructive sleep apnea. One of the lifestyle changes advised in these diseases is coffee withdrawal, based on several studies describing that caffeine can acutely increase blood pressure and lower insulin sensitivity. However the benefits of coffee withdrawal have been questioned by several studies that suggest no association between long-term coffee consumption and diabetes and hypertension, which seems to indicate that acute and chronic intake may have opposite effects.

**Aims:** We tested the hypothesis that chronic caffeine intake prevents the development of insulin resistance and hypertension in two pathological animal models: the high-fat and the high-sucrose diet rat.

**Methods:** Six groups of animals were used: control, caffeine-treated, high-fat, caffeine-treated high fat, sucrose and caffeine-treated sucrose. The control group was fed a sham diet (7.4% fat + 75% carbohydrate (4% sugar) + 17% protein); the sucrose and high fat models were obtained by the administration of 35% sucrose in drinking water during 28 days or a lipid rich diet (45% fat + 35% carbohydrate + 20% protein) during 21 days, respectively. Caffeine was administered in drinking water (1g/l) during the last 15 days of the experimental protocol. Insulin sensitivity was assessed by means of an insulin tolerance test. Blood pressure, weight gain, visceral fat, insulinemia and serum free fatty acids were also measured.

**Results:** High-fat and sucrose diets induced insulin resistance and hypertension which was reversed by caffeine treatment. Both high-fat and sucrose rats were hyperinsulinemic. Chronic caffeine intake restored insulin levels to control values in high-fat but not in sucrose rats. High-fat rats showed increased weight gain and visceral fat; however these effects were reversed by caffeine. A negative correlation was found between visceral fat and the constant of the insulin tolerance test in sucrose and high-fat animals but not in caffeine-treated groups. Free fatty acids were significantly elevated in sucrose fed rats and caffeine restored serum free fatty acids to control values. No correlations were found between weight gain and free fatty acids and insulin sensitivity in high-fat and sucrose rats neither between blood pressure, weight gain, visceral fat and free fatty acids in any of the groups tested.

**Conclusion:** Chronic caffeine intake prevents the development of insulin resistance and hypertension in high fat and sucrose fed rats, effects that were independent of weight loss, visceral fat and free fatty acids. We propose that lifestyle changes, like coffee withdrawal, in insulin resistant and hypertensive patients should be reevaluated.

## C32

### EFEITOS DA PIRIDOXAMINA NAS COMPLICAÇÕES MACROVASCULARES ASSOCIADAS À DIABETES TIPO 2

Sena CM, Matafome P, Fernandes R, Rodrigues L, Crisóstomo J, Seíça RM

A piridoxamina (PM) é um inibidor da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) tendo também a capacidade de inibir a formação de produtos finais de peroxidação lipídica. Em alguns modelos animais como os ratos obesos Zucker foi descrito que a PM tem a capacidade de reduzir os lípidos e retardar a progressão da nefropatia diabética associada. Dados os efeitos benéficos da PM no desenvolvimento da progressão da nefropatia diabética o principal objectivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da PM na disfunção endotelial observada em modelos animais de diabetes tipo 2. Para isso foram avaliados diferentes grupos de animais diabéticos tipo 2, ratos Goto Kakizaki (GK): grupo controlo (GK), grupo GK tratado com metilglioxal (GK+MG) e grupo GK com metilglioxal ao qual foi administrado PM durante um mês por via oral (GK+PM). Foram avaliados diferentes biomarcadores metabólicos e de stress oxidativo e efectuada a caracterização funcional e estrutural da artéria aorta nos diferentes grupos de animais. Verificámos que a PM melhora a disfunção endotelial e diminui alguns dos parâmetros metabólicos e de stress oxidativo avaliados. Substâncias anti-AGEs têm, por isso, uma importância acrescida no contexto das complicações macrovasculares associadas à diabetes mellitus.

## C33

### EFEITOS BENÉFICOS DA METFORMINA NA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL ASSOCIADA À DIABETES TIPO 2

Sena CM, Matafome P, Louro T, Fernandes R, Seiça RM

A metformina é uma biguanida que melhora a insulino-resistência por mecanismos desconhecidos e, reduzindo a gliconeogénese e aumentando a utilização periférica da glicose, diminui os níveis plasmáticos de glicose. A metformina demonstrou ter benefícios acrescidos na redução do risco cardiovascular para além da sua eficácia na redução da morbilidade e mortalidade associadas à diabetes tipo 2 (UKPDS).

Este estudo teve como objectivo investigar os efeitos da metformina em diversos parâmetros metabólicos e de stress oxidativo e na função endotelial em ratos diabéticos tipo 2 Goto-Kakizaki (GK) com dislipidemia. Foram utilizados 3 grupos de ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo animal de diabetes tipo 2 não obesa: um grupo mantido com dieta normal e dois grupos tratados, durante 4 meses, com dieta aterogénica (grupo DA e grupo DA + metformina). Foram avaliados o perfil glicémico, a função endotelial, a formação de produtos de glicação avançada e biomarcadores de stress oxidativo.

A dieta aterogénica agravou a formação de produtos glicosados, o stress oxidativo, a disfunção endotelial e a hiperglicemia do jejum nos ratos diabéticos GK. A metformina normalizou a função endotelial, diminuiu significativamente a hiperglicemia em jejum, melhorou a sensibilidade à insulina e diminuiu os níveis de stress oxidativo e de productos finais de glicação avançada (AGEs).

Deste estudo podemos concluir que este modelo animal de diabetes tipo 2 com dislipidemia apresentou uma disfunção endotelial significativa que foi totalmente revertida na presença de metformina por um mecanismo que envolve diminuição do stress oxidativo e da glicação de proteínas. Este estudo está de acordo com a utilização da metformina como fármaco de primeira linha no tratamento de pacientes diabéticos com dislipidemia de forma a prevenir ou minimizar futuras complicações macrovasculares nestes pacientes.

## C34

### INVOLVEMENT OF THE IG HEAVY CHAIN LOCUS IN AUTOANTIBODY REACTIVITY IN PORTUGUESE TYPE I DIABETES PATIENTS

Horta Rolim MI<sup>1</sup>, Catarino M<sup>2</sup>, Penha-Gonçalves C<sup>3</sup>

**Background and Aims:** Autoantibodies are linked to Type I Diabetes (T1D), but their role in disease pathogenesis has long been disputed. Autoantibodies are mostly seen as a by-product of the autoimmune attack that targets the pancreatic Beta cell. Nevertheless, autoantibodies are frequently detected before disease onset and non-pancreatic Beta cells are frequently observed in the in Type I Diabetes patients. These observations suggest that autoantibodies may be related take part in early phases of the disease process. The aim of this study was to analyze the contribution of the HLA and IgH loci to autoantibody reactivity and to disease susceptibility.

**Materials and Methods:** Two independent groups of T1D Portuguese patients were analyzed: 138 isolated patients were compared to 130 healthy controls; 103 patients were compared to their parents. All participants were genotyped for 15 genetic markers in IgH loci, specifically 4 SNPs in IgHG locus, 4 SNPs in IgHD locus, 5 in IgHM locus and 2 in IgHV locus. Genetic association with T1D and with the pattern of autoantibodies was evaluated through Transmission Disequilibrium Tests (TDT) and case-control analysis. HLA class II allele (DR3/DR4) association with T1D and autoantibodies was also tested in a group of our cohort, using TDT analysis.

**Results:** We found that rs1950942 and rs1956596, in the IgHM gene were associated to T1D in Portuguese patients: suggestive association was found in Case-Control and TDT analyses performed in 2 independent groups of patients. Transmission Disequilibrium Test was also demonstrated for rs1950942 in T1D patients with 2 or more autoantibodies (multiauto-reactivity). A strong HLA-DR3/DR4 association with T1D and multiauto-reactivity was confirmed in our study group (p value=2.55E-7 and 3.0E-6, respectively).

**Conclusion:** This analysis, in Portuguese population, suggests, for the first time, that the IgH locus is associated to T1D, possibly through controlling autoantibody reactivity. The data also confirm in our cohort the HLA-DR association to the autoantibodies and to the disease.

## C35

**WOUND HEALING IN DIABETIC AND INOS KNOCKOUT MICE: THE ROLE OF NEUROTENSIN**Leal E<sup>1</sup>, Tellechea A<sup>1</sup>, Moura L<sup>1</sup>, Veves A<sup>2</sup>, Carvalho E<sup>1</sup>

**Introduction/Objective:** Peripheral neuropathy impairs wound healing in diabetes, and neuropeptides mediate inflammatory and healing processes. The inducible nitric oxide synthase (iNOS) is known to play an important role. We evaluated the efficacy of neurotensin (NT) in promoting wound healing in normal, streptozotocin (STZ)-induced diabetic and iNOS knockout (iNOSKO) mice.

**Methods:** We studied wild-type C57BL6/J (WT), WT diabetic and iNOSKO mice. Eight weeks prior to wounding, diabetes was induced in WT mice by streptozotocin (STZ, 150 mg/kg ip). Two 6 mm excision wounds were created in the dorsum of each mouse. One wound was treated by daily applications of NT (50  $\mu$ g) and the other with saline. The wound healing process was monitored up to 10 days by acetate tracing. The wound area was expressed by the percentage of baseline (100%) at day 0.

**Results:** Neurotensin significantly reduced the wound area at days 5 (64%,  $p < 0.01$ ), 8 (35%,  $p < 0.05$ ) and 10 (16%,  $p < 0.05$ ) post-wounding in normal mice, when compared with saline-treated wounds (day 5 - 88%; day 8 - 52%; day 10 - 32%). The effect of neurotensin in diabetic wounds starts earlier, showing an improved healing at days 3 (77%,  $p < 0.05$ ), 5 (55%,  $p < 0.01$ ), 8 (47%,  $p < 0.05$ ) and 10 (33%,  $p = 0.05$ ), when compared with saline-treated wounds (day 3 - 112%; day 5 - 96%; day 8 - 69%; day 10 - 51%). Also, neurotensin significantly reduced wound area in iNOSKO mice at day 8 (29%,  $p < 0.05$ ), although at day 10 neurotensin did not have a significant effect, the wound area decreased to 15% ( $p = 0.08$ ) when compared with saline-treated wounds (40%).

**Conclusions:** These results suggest that NT could be a good candidate for future therapeutic approaches in diabetic foot ulceration. Also, NT improves wound healing in iNOS knockout animals, although to a lower extent. This may suggest that NT effect can be partially due to iNOS.

## C36

**A SENSIBILIDADE À INSULINA EM INDIVÍDUOS COM EXCESSO DE PESO ESTÁ COMPROMETIDA NO ESTADO PÓS-PRANDIAL E NÃO NO ESTADO DE JEJUM**Patrão RS<sup>1,2</sup>, Lutt W<sup>3</sup>, Afonso RA<sup>2</sup>, Ribeiro RT<sup>1</sup>, Fernandes AB<sup>1</sup>, Boavida JM<sup>1</sup>, Macedo MP<sup>1,4</sup>

Após a ingestão de uma refeição a resposta dinâmica à insulina é potenciada. Este mecanismo de potenciação induzido pela refeição ocorre como resultado da acção da insulina no fígado e é explicado pela hipótese da Substância Hepática Sensibilizadora da Insulina (HISS). Através da activação dos nervos parassimpáticos hepáticos, a HISS é libertada do fígado e estimula a captação periférica de glucose. A secreção/acção da HISS é máxima após uma refeição e mínima no estado de jejum quando a sua acção não é solicitada nem desejável. Em modelos animais de obesidade, observou-se que estes apresentavam resistência à insulina, sendo a inibição da HISS a principal responsável pela resistência à insulina observada. Neste trabalho, foi testada a hipótese de que a resistência à insulina observada em indivíduos com excesso de peso é devida a uma deficiência da secreção/acção da HISS.

Em voluntários sexo masculino magros ( $27.0 \pm 1.9$  anos, IMC  $22.7 \pm 1.1$  kg/m<sup>2</sup>) e com excesso de peso ( $24.3 \pm 0.9$  anos, IMC  $27.7 \pm 0.4$  kg/m<sup>2</sup>), a sensibilidade à insulina foi avaliada através do Teste Rápido de Sensibilidade à Insulina (RIST), no estado de jejum (24h de jejum) e após a ingestão de uma refeição standard. O RIST consiste num clamp euglicémico, efectuado após a administração de um bólus de 50mU/kg de insulina, sendo o RIST Index a quantidade de glucose (mg glucose/kg) que é necessária administrar de modo a manter a euglicémia. Todos os protocolos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética do Instituto Português de Oncologia, Dr. Francisco Gentil - Lisboa.

A sensibilidade à insulina avaliada após o jejum de 24h foi semelhante entre os indivíduos magros ( $215.5 \pm 20.8$ mg glucose/kg bw) e os indivíduos com excesso de peso ( $177.8 \pm 40.5$ mg glucose/kg bw). Após a ingestão da refeição, a sensibilidade à insulina aumentou para  $681.2 \pm 60.9$ mg glucose/kg bw ( $p < 0.001$ ) nos indivíduos magros e para  $388.8 \pm 107.3$ mg glucose/kg bw ( $p < 0.05$ ) nos indivíduos com excesso de peso revelando que a sensibilidade à insulina no estado pós-prandial foi menor nos indivíduos com excesso de peso do que nos indivíduos magros ( $p < 0.05$ ).

Os nossos resultados sugerem que em indivíduos com excesso de peso a avaliação da sensibilidade à insulina após 24h de jejum não difere entre indivíduos magros e com excesso de peso. Contudo, quando avaliados no estado pós-prandial, os indivíduos com excesso de peso apresentam um decréscimo bastante acentuado da sensibilidade à insulina, sendo a HISS responsável pela resistência à insulina observada. Estes resultados sugerem a importância da avaliação da sensibilidade no estado pós-prandial.

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito dos projectos PPTDC/SAU-OBS/56716/2004 e PIC/IC/82956/2007 e da bolsa SFRH/BD/5806/2001.

(1) Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra.

(2) Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

(1) Departamento de Fisiologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa.

(2) Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa.

(3) Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada.

(4) APDP - Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal.