

NATÁLIA TOBAR

Efeitos da Diacereína sobre a resistência à
insulina em modelo animal de obesidade e
diabetes mellitus tipo 2

CAMPINAS

2010

NATÁLIA TOBAR

**Efeitos da Diacereína sobre a resistência à
insulina em modelo animal de obesidade e
diabetes mellitus tipo 2**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad

CAMPINAS

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO
Sistemas de Bibliotecas da UNICAMP /
Diretoria de Tratamento da Informação

Bibliotecário: Helena Joana Flipsen – CRB-8ª / 5283

T551e Tobar, Natália.
Efeitos da diacereína sobre a resistência à insulina em
modelo animal de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 /
Natália Tobar. -- Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador: Mario José Abdalla Saad.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Diacereína. 2. Resistência à insulina. 3. Diabetes.
4. Inflamação. I. Saad, Mario José Abdalla. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Título e subtítulo em inglês: Effects of diacerhein on insulin resistance in
animal model of obesity and type 2 diabetes.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Diacerhein; Resistance to insulin;
Diabetes; Inflammation.

Área de Concentração: Ciências Básicas.

Titulação: Mestre em Clínica Médica.

Banca examinadora: Carla Roberta de Oliveira Carvalho, Marco Antonio de
Carvalho Filho, Mario José Abdalla Saad.

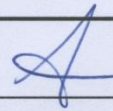
Data da Defesa: 22-10-2010

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

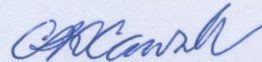
Natália Tobar Toledo Prudente da Silva

Orientador: Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad

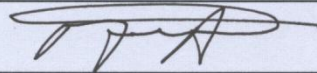


Membros:

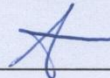
1. Prof^ª. Dr^ª. Carla Roberta de Oliveira Carvalho



2. Prof. Dr. Marco Antonio de Carvalho Filho



3. Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/10/2010

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, meus maiores exemplos e inspiradores, toda minha admiração;

Aos meus pais, pilares e portos seguros da minha vida, minha eterna gratidão e reconhecimento;

Aos meus irmãos, meus companheiros e cúmplices, todo meu afeto.

Obrigada pela coragem, amor, união e apoio incondicional que me fizeram persistir e transpor todos os obstáculos que estiveram presentes durante esta etapa da minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Dr. Mário José Abdalla Saad, professor titular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas, exemplo de dedicação profissional, pela grande oportunidade a mim concedida. Obrigada pela confiança, estímulo e atenção dedicados à concretização deste sonho.
- Aos membros da banca examinadora, pela honra em tê-los como avaliadores deste trabalho e pelos valiosos conselhos e sugestões.
- Ao Alexandre, companheiro de trabalho de todas as horas e um dos principais incentivadores deste sonho. Obrigada pela dedicação, paciência, carinho e discussões (construtivas) de todos os dias.
- A Dioze, pela generosa disposição em me auxiliar em todos os momentos. Obrigada pela amizade, palavras, estímulos, conselhos e contribuição incomensurável nos procedimentos necessários à realização deste trabalho.
- À minha amiga do coração, Renata, pelo companheirismo verdadeiro, pelos momentos compartilhados, pelo conforto e incentivo diante das adversidades. Obrigada por ter feito parte de tudo isso.
- Aos demais autores deste trabalho, Guilherme e Tiago, pela grande generosidade e doação.
- Aos meus companheiros pós-graduandos: Bruno, Eduardo, Rodrigo, Marília, Carol, Carlos, Andréa, Lélia, Francine, Angélica e Kelly, pela valiosa amizade, atenção e paciência.
- Ao Sr. Luís Janeri e Sr. Jósimo Pinheiro, funcionários do Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina, pelo constante suporte, apoio e atenção.

- A Ligia e Ramón, pela preciosa assistência.
- Ao Antônio Calixto, pela colaboração inestimável em dias de extração nuclear.

- Às secretárias da Comissão de Pós-Graduação, Adriana e Cristiane, pelo auxílio, paciência e orientações.

- Ao diretor do Serviço de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da UNICAMP, Dr. Celso Darío Ramos, por compreender a importância desta etapa na construção de minha vida profissional e assim, generosamente permitir a redução de minha carga horária diária neste serviço.

- Às minhas queridas companheiras de trabalho do Serviço de Medicina Nuclear HC/UNICAMP: Edna, Viviana, Gabriela, Juliana e Cristiane pela compreensão, estímulo e incentivo. Muito obrigada por contribuírem diariamente para a concretização deste sonho e por tamanha nobreza de atitudes, palavras e sentimentos.

- Aos residentes do Serviço de Medicina Nuclear HC/UNICAMP: Aline, Cecília, Raquel, Eduardo, Marcos Villela, Daniel, Raul e Priscilla por terem acrescentado aos meus anos de mestrado tanta alegria, risos e descontração.

- À minha mãe do coração Tânia, pelo estímulo, conforto e paz de espírito que tanto me fortaleceram nos momentos de incertezas e tristezas e assim permitiram o êxito de mais esta caminhada.

- Às secretárias do Serviço de Medicina Nuclear HC/UNICAMP: Sônia Mara e Raquel, pelo grande suporte e benevolência diante de tantas atribulações.

- Aos demais funcionários, enfermeiros, residentes e docentes do Serviço de Medicina Nuclear HC/UNICAMP toda minha gratidão pelos anos de companheirismo.

SUMÁRIO

	PÁG.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	<i>x</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>xii</i>
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1 – INTRODUÇÃO.....	16
Epidemiologia.....	17
Obesidade, inflamação e resistência à insulina	18
Serina quinases	24
Diacereína.....	26
2 – OBJETIVOS	31
Objetivo geral	32
Objetivos específicos.....	32
3 – CAPÍTULO	33
Diacerhein improves glucose tolerance and insulin sensitivity in DIO mice.....	34
4 – DISCUSSÃO	71
5 – CONCLUSÕES	78
Conclusões.....	79
Conclusão geral	79

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
7 – APÊNDICE I	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
cDNA	DNA complementar
c-Jun	Substrato da quinase JNK
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GTT	<i>Glucose Tolerance Test</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IKK	Complexo quinase de IκB
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
ITT	<i>Insulin Tolerance Test</i>
iNOS	Óxido nítrico sintase induzido
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
IR	Receptor da insulina
IκB	Inibidor de NFκB
JNK	Proteína quinase da c-Jun
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NFκB	Fator de transcrição <i>nuclear factor kappa B</i>
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução salina fosfatada tamponada

PCR	Proteína C reativa
PI3K	Proteína fosfatidilinositol 3-quinase
PFA	Proteínas de fase aguda
PPAR- γ	Receptor γ ativado por proliferador de peroxissomo
RNA	Ácido ribonucléico
RT- PCR	Reação em cadeia da polimerase- <i>Real Time</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modulação negativa de JNK e o complexo IKK sobre a via de sinalização insulínica

Figura 2. Estrutura molecular da diacereína

RESUMO

As alarmantes estatísticas mundiais sobre a incidência de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) associadas aos seus índices de avanço já considerados epidêmicos permitem classificá-los como alguns dos mais desafiadores problemas de saúde pública da atualidade.

A obesidade representa um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da resistência à insulina e DM2 e o solo comum entre estes eventos encontra-se em um processo inflamatório sistêmico exacerbado, caracterizado por uma produção anormal de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda. Além de contribuem para o desenvolvimento de dislipidemia, hipertensão arterial, obesidade e aterosclerose, mediadores inflamatórios atuam como moduladores negativos da ação da insulina principalmente através da ativação de proteínas intracelulares serina quinases, como JNK e IKK β , que prejudicam a transdução do sinal desencadeado pela ligação da insulina ao seu receptor celular.

A Diacereína é um composto de origem vegetal que apresenta propriedades anti-inflamatórias pouco exploradas em doenças não articulares. A Reína, seu metabólito ativo, tem demonstrado inibir a síntese e atividade de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e principalmente IL-1 β através do constante bloqueio de NF κ B.

Sendo a resistência à insulina e DM2 distúrbios metabólicos associados à obesidade e a um processo inflamatório crônico, e sabendo-se ainda que atualmente os recursos disponíveis para o tratamento de tais desordens apresentam limitada eficácia, acreditamos que os efeitos anti-inflamatórios da Diacereína reflitam positivamente sobre a sinalização

insulínica, permitindo classificá-la como uma alternativa terapêutica em potencial para a redução ou atenuação da manifestação clínica da resistência à insulina e DM2.

ABSTRACT

Obesity represents one of the main risk factors to the development of insulin resistance and type 2 diabetes. The common basis among these events is a chronic and systemic inflammatory process characterized by the activation of JNK and IKK β /NF κ B pathways and upregulated cytokine synthesis. The objective of this work was to evaluate the effects of diacerhein administration, an anti-inflammatory anthraquinone which is probably a JNK and IKK β /NF κ B pathways inhibitor, on the insulin sensitivity in diet-induced obese mice. Swiss mice were fed with conventional chow (C group) or a high-fat diet (DIO group). Later, DIO mice were randomly subdivided in DAR10 and DAR20 groups according to the doses of 10 or 20 mg/kg of diacerhein administered. Through the *Western Blot* analysis, we quantified the expression and phosphorylation of IR, IRS-1 and Akt and of inflammatory mediators which modulate the insulin signaling in a negative way (IKK β , JNK and iNOS). DAR 10 and DAR20 animals presented an expressive improvement in their ITT and GTT, fasting serum glucose and insulin levels and a significant increase in the phosphorylation levels of insulin induced IR, IRS-1 and Akt in liver, muscle and adipose tissue. There was also a relevant inhibition of IKK β , I κ B α and JNK phosphorylation and iNOS expression in treated mice. Our results show that through the reversion of the low-grade subclinical inflammation, diacerhein improved glucose tolerance and insulin sensitivity in DIO animals. It suggests potential beneficial effects of this drug in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes.

Key words: diacerhein, insulin resistance, type 2 diabetes and inflammation

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Epidemiologia

Durante as últimas décadas, a incidência de obesidade bem como de doenças metabólicas a ela associadas como cardiopatias, dislipidemia, hipertensão arterial e em especial diabetes mellitus tipo 2 (DM2) têm alcançado proporções epidêmicas em várias partes do mundo, sobretudo em países da civilização ocidental, onde elevados índices de sedentarismo são predominantes e os hábitos alimentares caracterizam-se pelo consumo de dieta densa em calorias, provenientes principalmente de lipídios (Kopelman 2000; Wing, Goldstein et al. 2001; Weisberg, McCann et al. 2003).

As crescentes estatísticas mundiais sobre o estabelecimento do DM2 permitem classificá-lo como uma das doenças crônicas mais prevalentes deste século e um dos mais desafiantes problemas de saúde pública da atualidade. Agravando esse quadro, o DM2, que até o século XX restringia-se a adultos, acomete agora cada vez mais crianças e jovens (Pinhas-Hamiel, Dolan et al. 1996).

Estima-se hoje que um novo caso de DM2 surja a cada 5 segundos no mundo, o que resulta em uma população de, aproximadamente, 285 milhões de pessoas afetadas (Federation 2009). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, as múltiplas complicações decorrentes da doença, permitem classificá-la como a quinta causa de mortalidade na maioria dos países desenvolvidos. Além disso, as mortes pela enfermidade tendem a aumentar em 50% nos próximos 10 anos.

As complicações decorrentes do DM2 tais como coronariopatias, doenças vasculares periféricas, isquemias, neuropatias, amputações, falência renal, cegueira e, incluída recentemente, a depressão, resultam em invalidez, diminuição da qualidade e

expectativa de vida e dispendiosos gastos para a sociedade. Estima-se que 9% dos recursos financeiros destinados à saúde no Brasil sejam exclusivamente empregados no tratamento do DM2 (Federation 2009). Considera-se, portanto, considerável o impacto socioeconômico inerente à doença, afetando famílias, serviços de saúde e as produtividades individual e nacional.

Obesidade, inflamação e resistência à insulina

A obesidade representa um dos principais fatores de risco para o DM2 (Ahima and Flier 2000; Yuan, Konstantopoulos et al. 2001; Weisberg, McCann et al. 2003; Shoelson, Lee et al. 2006). O excesso de gordura corporal, especialmente quando concentrado na região abdominal, pode levar a consequências extremamente prejudiciais como hipertensão, elevação dos níveis séricos de colesterol e triglicérides e resistência insulínica (Wing, Goldstein et al. 2001).

O impacto negativo do aumento da gordura corporal sobre a sensibilidade à insulina pode ser claramente demonstrado na maioria dos indivíduos obesos. Estudos populacionais prospectivos confirmam esta associação. De acordo com Colditz e Chan et al, o risco de desenvolvimento de DM2 aumenta 93 vezes em mulheres (Colditz, Willett et al. 1995) e 42 vezes em homens (Chan, Rimm et al. 1994) com IMC igual ou superior a 35.

Nota-se, portanto, que obesidade, DM2 e resistência à insulina são distúrbios metabólicos intimamente relacionados. A intersecção entre estes eventos se estabelece em um processo inflamatório sistêmico e subclínico caracterizado por uma produção anormal de citocinas e elevados níveis de proteínas de fase aguda (PFA) (Pickup and Crook 1998; Sethi and Hotamisligil 1999). Evidências crescentes de estudos em populações humanas e animais têm estabelecido, por sua vez, uma correlação causal entre a inflamação crônica e

resistência à insulina, embora os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estejam completamente elucidados (Festa, D'Agostino et al. 2000; Xu, Barnes et al. 2003).

Metabolismo e imunidade estão entre os mais básicos requerimentos para a sobrevivência dos organismos, apresentando-se profundamente ligados e interdependentes. Adipócitos e macrófagos, assim como compostos por eles secretados, incluindo hormônios, citocinas, proteínas de sinalização, fatores de transcrição e lipídios bioativos, podem desempenhar funções tanto metabólicas como imunológicas para manutenção da homeostase energética e da eficácia no combate às infecções. Além de compartilharem alguns dos maquinários celulares e vias de sinalização, esses sistemas também são capazes de regular um ao outro (Wellen and Hotamisligil 2005).

Esta integração, que sob condições normais é equilibrada e extremamente benéfica para a conservação da saúde, torna-se deletéria frente à ocorrência de distúrbios, como o estabelecimento da imunossupressão em organismos que se encontram subnutridos, por exemplo (Chandra 1996; Chandra 1997). Atualmente, porém, este desequilíbrio tem pendido para o lado oposto. Com o advento da obesidade, problemas e complicações associados à sobrecarga metabólica, incluindo diabetes, dislipidemia, doença hepática gordurosa e aterosclerose são decorrentes de um exacerbado processo inflamatório (Pickup, Mattock et al. 1997; Wellen and Hotamisligil 2005).

Lindsay e colaboradores reportaram que em população com alta prevalência de DM2, os níveis de gama-globulinas encontravam-se elevados e prediziam o estabelecimento da doença (Lindsay, Krakoff et al. 2001). Aliados a isso, Pickup et al. demonstraram que as concentrações séricas de marcadores inflamatórios em diabéticos tipo 2 também eram superiores às de indivíduos não diabéticos (Pickup, Mattock et al. 1997).

Rapidamente tornou-se claro que a obesidade é caracterizada por uma resposta inflamatória subclínica causadora de profundas modificações no metabolismo lipídico (Feingold, Hardardottir et al. 1998), as quais favorecem o estabelecimento de um estado catabólico no organismo ao mesmo tempo em que suprimem conservadas vias anabólicas, em especial a da insulina (Wellen and Hotamisligil 2005). Neste contexto, tem-se dado grande atenção ao fato de muitos dos mediadores inflamatórios atuarem como moduladores negativos da ação da insulina, envolvendo-se intimamente na patogênese do DM2 (Pickup 2004).

Várias evidências têm dado suporte a esta hipótese. Estudos em indivíduos não diabéticos e intolerantes à glicose demonstraram que PCR e, por vezes, as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α estão positivamente relacionadas aos índices de sensibilidade e concentração plasmática de insulina, IMC e níveis de triglicérides circulantes (Visser, Bouter et al. 1999; Yudkin, Stehouwer et al. 1999; Frohlich, Imhof et al. 2000; Muller, Martin et al. 2002; Temelkova-Kurktschiev, Henkel et al. 2002). Sabe-se também que os níveis séricos de IL-1, outra importante citocina pró-inflamatória, encontram-se elevados em pacientes com DM e podem estar relacionados tanto à destruição das células β pancreáticas como à alteração da sensibilidade à insulina (Fève and Bastard 2009). Outros trabalhos consideram a circulação de PCR, soro amilóide A, α 1-acidoglicoproteína e ácido siálico, mas em especial IL-6, como fortes preditores do desenvolvimento do DM2, pois encontram-se em níveis superiores aos de indivíduos não diabéticos (Crook, Tutt et al. 1993; Pickup, Mattock et al. 1997; Pickup and Crook 1998; Schmidt, Duncan et al. 1999; Barzilay, Abraham et al. 2001; Pradhan, Manson et al. 2001; Festa, D'Agostino et al. 2002; Temelkova-Kurktschiev, Henkel et al. 2002; Spranger, Kroke et al. 2003). Neste contexto, constatou-se também que as concentrações plasmáticas destes mediadores tendem a se

e elevar proporcionalmente ao número de distúrbios metabólicos presentes em diabéticos tipo 2, a citar, obesidade, doença coronariana, hipertensão, hipertrigliceridemia e baixos níveis de HDL (Pickup, Mattock et al. 1997). É de extrema importância ressaltar que tais resultados independeram da idade, sexo, histórico familiar de DM2, glicemia, atividade física e tabagismo (Pickup 2004)

Em modelos animais de diabetes tipo 2, observou-se que a insulina desempenha, por si só, um papel inibidor da síntese de PFA (Thompson, Harrison et al. 1991; Campos and Baumann 1992; De Feo, Volpi et al. 1993; Festa, D'Agostino et al. 2000). Assim, a resistência ao hormônio induzida por citocinas pró-inflamatórias seria responsável pela intensificação da resposta de fase aguda através de uma sustentada retroalimentação positiva (Pickup, Day et al. 1995).

Outras evidências da íntima correção entre metabolismo e imunidade provêm de estudos com proteínas do sistema imune inato denominadas *toll like receptors* (TLR). A ativação destes receptores celulares por ligantes específicos de patógenos ou mesmo compostos endógenos, como ácidos graxos saturados e livres, em níveis elevados na obesidade, leva a aumentos significativos na expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , quimiocinas e outros efetores da resposta imune inata (Shi, Kokoeva et al. 2006). Além disso, Song e colaboradores demonstraram em seu experimento com cultura de adipócitos que a ativação do TLR4 pelo LPS atenuava a captação de glicose estimulada pela insulina, contribuindo dessa forma para um quadro de resistência ao hormônio (Song, Kim et al. 2006). Concordantemente, Tsukumo et al constataram que defeito na função do TLR4 em camundongos os protegia da obesidade e resistência à insulina induzidas pelo consumo de dieta hiperlipídica (Tsukumo, Carvalho-Filho et al. 2007).

Face ao exposto, é possível que as citocinas pró-inflamatórias exerçam papel chave na ligação entre obesidade, sistema imune e resistência à insulina (Grimble 2002) e, neste contexto, o tecido adiposo, principal fonte de TNF- α e IL-6 (De Feo, Volpi et al. 1993; Hotamisligil, Arner et al. 1995; Mohamed-Ali, Goodrick et al. 1997; Fried, Bunkin et al. 1998), desempenharia importante função, visto não ser mais identificado apenas como um tecido acumulador de gordura, mas como órgão metabolicamente ativo, que contribui para a manutenção da homeostase metabólica sistêmica (Ahima and Flier 2000; Shoelson, Lee et al. 2006; Gutierrez, Puglisi et al. 2009).

Sugere-se que as células inflamatórias infiltradas e os mediadores secretados pelo tecido adiposo desenvolvam um papel ativo na obesidade e contribuam para a patogênese da resistência insulínica a ela associada, revelada, em parte, como uma doença inflamatória crônica iniciada no tecido adiposo (Weisberg, McCann et al. 2003). Porém, contrapondo as evidências de que a inflamação é um fator iniciante da insensibilidade à insulina e distúrbios no metabolismo lipídico, há uma importante vertente de que estados obesos e diabéticos exercem profunda influência inflamatória, o que agravaria ainda mais o quadro de resistência insulínica (Spranger, Kroke et al. 2003).

TNF- α , IL-6 e IL-1 β são mediadores centrais de reações inflamatórias (Spranger, Kroke et al. 2003), efetores essenciais da resposta do sistema imune a patógenos. Tais citocinas são as principais estimuladoras hepáticas da síntese de PFA e iniciam profundas mudanças metabólicas a fim de prover nutrientes dos tecidos do hospedeiro para as células do sistema imunológico, em intensa atividade no curso de uma infecção (Kushner 1993; Feingold, Hardardottir et al. 1998). Sob suas influências ocorre elevação dos lipídios sanguíneos e da gliconeogênese, produção de hormônios catabólicos e diminuição da sensibilidade à insulina (Grimble 2002). A liberação de substratos de fontes endógenas para

sustentar a atividade de linfócitos T e B, neutralizar patógenos e aumentar as defesas antioxidantes para a proteção de tecidos saudáveis constitui um aspecto essencial durante o processo inflamatório (Feingold, Hardardottir et al. 1998; Grimbale 2001).

Por outro lado, estas citocinas representam fatores predisponentes ao desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina (Grimble 2002). Segundo Spranger e colaboradores, reações inflamatórias subclínicas dependentes de aumentados níveis circulantes de IL-1 β e IL-6 parecem estar associadas ao aumento do risco de desenvolvimento de DM2 (Spranger, Kroke et al. 2003)

Além de estimularem a produção de PFA (Spranger, Kroke et al. 2003), TNF- α , IL-6 e IL-1 β contribuem para o desenvolvimento de dislipidemia, hipercortisolemia, hipertensão, obesidade, hipercoagulabilidade e a aceleração da aterosclerose (Nonogaki, Fuller et al. 1995; Grimbale 2002; Zhang, Halbleib et al. 2002). Os mecanismos plausíveis pelos quais as citocinas promovem a resistência à insulina e/ou prejudicam a secreção do hormônio sustentam a hipótese de que concomitante ao DM2 há uma resposta de fase aguda mediada por citocinas intimamente envolvidas na patogênese da doença. (Pickup, Mattock et al. 1997; Pickup and Crook 1998). Estudos envolvendo IL-6, por exemplo, conhecida como a principal estimuladora da síntese da maioria das PFA (Gauldie, Richards et al. 1987; Gabay and Kushner 1999) demonstraram que quando cronicamente em altas concentrações sanguíneas aumenta o risco de DM2 (Pradhan, Manson et al. 2001) e inibe a sinalização da insulina em hepatócitos (Senn, Klover et al. 2002). Além disso, os níveis plasmáticos de IL-6 estão elevados em humanos obesos e reduzidos em indivíduos com maior sensibilidade à insulina (Bastard, Jardel et al. 2000).

A citocina pró-inflamatória TNF- α também tem demonstrado mediar a resistência insulínica induzida pela obesidade, tanto em modelos animais como em humanos (Hotamisligil, Shargill et al. 1993; Hotamisligil, Murray et al. 1994; Hotamisligil and Spiegelman 1994). A expressão de TNF- α encontra-se aumentada no tecido adiposo de roedores e humanos obesos (Hotamisligil, Shargill et al. 1993) enquanto a deficiência da citocina ou da subunidade p55 de seu receptor revelam-se protetores parciais da resistência à insulina (Uysal, Wiesbrock et al. 1997; Ventre, Doebber et al. 1997; Uysal, Wiesbrock et al. 1998; Moller 2000). Dentre os múltiplos mecanismos sugeridos para explicar os efeitos metabólicos do TNF- α destacam-se a *downregulation* de genes requeridos para a ação da insulina, efeito direto na sinalização deste hormônio, indução de níveis séricos elevados de ácidos graxos via estimulação da lipólise e, assim como outras citocinas pró-inflamatórias, regulação negativa do PPAR- γ , um importante receptor nuclear responsável à insulina (Moller 2000; Pickup 2004).

Serina quinases

Os mecanismos moleculares pelos quais as citocinas promovem resistência insulínica têm sido mais esclarecidos recentemente e referem-se, de modo especial, à ativação de proteínas serina quinases, como JNK e IKK β .

Sabe-se que para a insulina desempenhar suas funções, a ativação de seu receptor e substratos deve ocorrer através da fosforilação em resíduos de tirosina, desencadeando uma cascata de sinalização que leva à ativação das vias da PI3K e MAPK (Saltiel and Kahn 2001; Sesti, Federici et al. 2001). As proteínas JNK e IKK β levam à fosforilação em resíduos de serina do receptor de insulina (IR) e de proteínas da família dos substratos do receptor de insulina (IRS), incluindo IRS-1 e 2, reduzindo a capacidade dos últimos de se

associarem ao receptor, e, portanto, prejudicando a transdução do sinal desencadeado pelo hormônio (Hotamisligil, Peraldi et al. 1996; Paz, Hemi et al. 1997; Aguirre, Werner et al. 2002). Em estudos com roedores, a fosforilação em serina no resíduo 307 (Ser³⁰⁷) do IRS-1 tornou-se um indicador molecular de resistência insulínica (Aguirre, Werner et al. 2002).

Sabe-se que JNK pode ser ativada por citocinas pró-inflamatórias e ácidos graxos (Hirosumi, Tuncman et al. 2002), em altas concentrações plasmáticas na obesidade, de modo que a atividade da enzima encontra-se elevada no músculo, fígado e tecido adiposo de indivíduos obesos (Leinonen, Hurt-Camejo et al. 2003). Além disso, a ausência da isoforma JNK1 aumenta a capacidade de sinalização do receptor de insulina por prevenir ou evitar a fosforilação em serina de seu substrato, protegendo camundongos da resistência ao hormônio (Hirosumi, Tuncman et al. 2002). Outros estudos recentes demonstraram ainda que a inibição de JNK em roedores diabéticos ou que apresentam aterosclerose representa uma alternativa terapêutica viável para humanos acometidos por estas doenças (Kaneto, Nakatani et al. 2004; Ricci, Sumara et al. 2004).

Por sua vez, a ativação do complexo IKK (constituído pelas proteínas IKK α , IKK β e IKK γ) pode impactar a via de sinalização da insulina por, no mínimo, duas maneiras. A primeira decorre da fosforilação inibitória em Ser³⁰⁷ do IRS-1, como descrito anteriormente, e a segunda da ativação de vias inflamatórias através da degradação de I κ B e liberação do fator de transcrição NF κ B para o núcleo celular (Beg, Finco et al. 1993; Palombella, Conner et al. 1998). Como já se sabe, NF κ B é um fator de transcrição que entre outras, estimula a síntese de múltiplos mediadores inflamatórios que contribuem para a promoção da resistência insulínica, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Frode-Saleh and Calixto 2000; Shoelson, Lee et al. 2006)

Assim, moduladores negativos da cascata de sinalização intracelular da insulina como JNK e IKK β participam ativamente do estabelecimento do quadro de resistência ao hormônio e representam potenciais alvos terapêuticos para o diabetes.

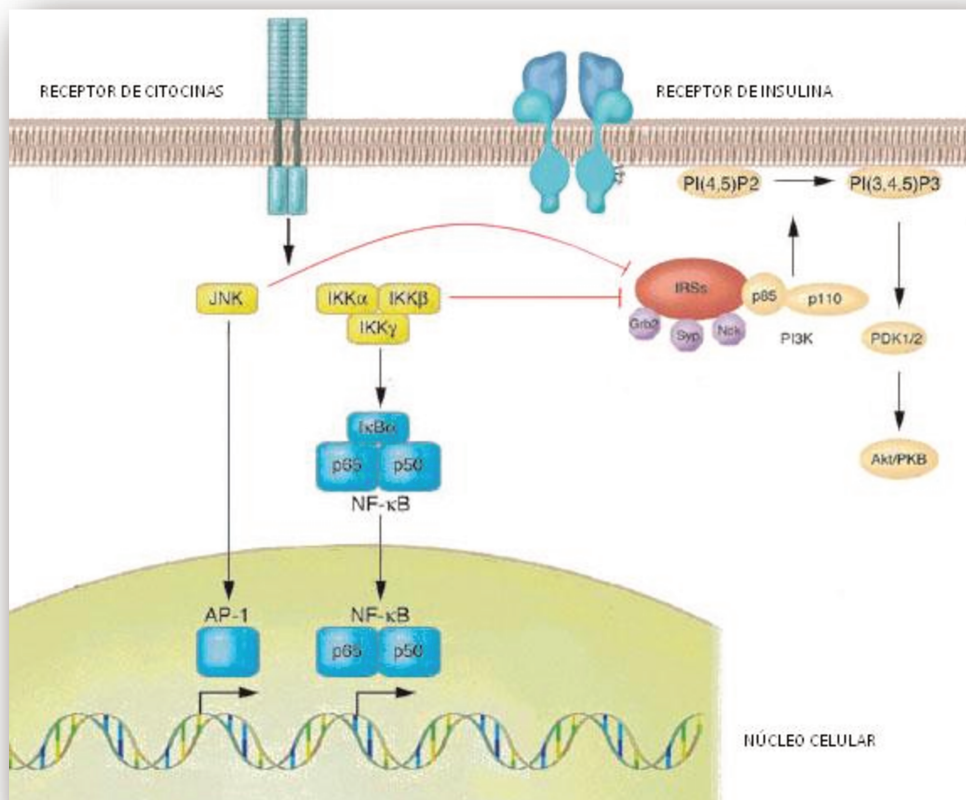


Figura 1. Modulação negativa de JNK e o complexo IKK sobre a via de sinalização insulínica

Diacereína

Desde o século IXX, sabe-se que altas doses de salicilatos, como as aspirinas, diminuem a glicemia e a glicosúria em pacientes diabéticos (Baron 1982; Pickup 2004). Mais recentemente, demonstrou-se que o tratamento de ratos geneticamente obesos *fa/fa* e

camundongos *ob/ob* com estes compostos foi capaz de reverter o quadro de resistência à insulina através da inibição de IKK β e, conseqüentemente, de NF κ B (Kopp and Ghosh 1994; Yin, Yamamoto et al. 1998). As estatinas por sua vez, têm demonstrado ação anti-inflamatória independente da redução dos níveis de colesterol, através do estímulo de PPAR- α e γ , do bloqueio de NF κ B e da inibição da adesão leucocitária (Freeman, Norrie et al. 2001; Munford 2001; McFarlane, Muniyappa et al. 2002; Weitz-Schmidt 2002). Além disso, tem-se evidenciado que hipoglicemiantes como as glitazonas também apresentam propriedades anti-inflamatórias ao inibirem a produção de citocinas, ativação macrocitária e a circulação de PFA (Ebeling, Teppo et al. 1999; Murphy and Holder 2000; van de Ree, Huisman et al. 2003), entre elas, PCR. Como consequência de seus efeitos no combate à inflamação, estudos recentes envolvendo estas drogas têm demonstrado significativa redução no risco do desenvolvimento de DM2 e um controle mais eficaz da doença quando já estabelecida (Pickup 2004).

Neste contexto, Malaguti e colaboradores descobriram recentemente que a antraquinona Diacereína (*1,8-diacetoxy-9,10-dioxo-dihydroanthracene-3-carboxylic acid*) uma vez administrada em camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*) foi responsável pela redução a 40% da incidência do diabetes mellitus tipo I nestes animais. Verificou-se que o composto atuava através da modulação da expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-12, impedindo-as de lesarem as células β das ilhotas pancreáticas, evento autoimune característico da doença (Malaguti, Vilella et al. 2008).

A Diacereína é um fármaco anti-inflamatório encontrado em plantas do gênero *Cassia* que apresenta também moderadas propriedades analgésica e antipirética (Spencer and Wilde 1997). Uma vez administrado, o composto é inteiramente convertido em seu

metabólito ativo desacetilado Reína (*4,5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid*) antes de alcançar a circulação sistêmica.

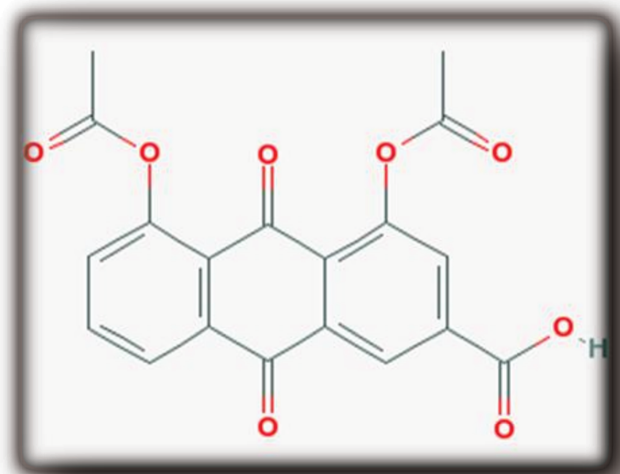


Figura 2. Estrutura molecular da Diacereína

Com base em experimentos em animais e humanos, *in vitro* e *in vivo*, a Reína tem demonstrado inibir a síntese e atividade de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e principalmente IL-1 β (Moore, Greenslade et al. 1998; Nicolas, Tod et al. 1998; Pelletier, Jovanovic et al. 1998; Pelletier, Mineau et al. 1998; Pelletier, Lajeunesse et al. 2001). Mendes et al comprovaram que esta ação farmacológica se deve à inibição da degradação de I κ B α (proteína inibidora de NF κ B), levando ao constante bloqueio de NF κ B.

Atuando diretamente sobre as células participantes do processo inflamatório, a Diacereína inibe a produção de ânions superóxido por neutrófilos humanos (Mian, Brunelleschi et al. 1987), liberação de enzimas lisossomais, quimiotaxia e atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos (Mian, Brunelleschi et al. 1987; Del Rosso, Fibbi et al. 1990; Boittin, Redini et al. 1993; Spencer and Wilde 1997; Martel-Pelletier, Mineau et

al. 1998; Moore, Greenslade et al. 1998; Pelletier, Mineau et al. 1998). Além disso, como consequência direta da inibição de IL-1 β , e possivelmente de outras citocinas também, ocorre a modulação negativa da síntese e atividade de iNOS por meio da diminuição dos níveis de RNAm desta enzima (Pelletier, Mineau et al. 1998; Tamura and Ohmori 2001).

Desde 1994, a Diacereína tem sido amplamente utilizada no tratamento de enfermidades músculo-esqueléticas como a osteoartrite e artrite reumatóide (Pelletier, Yaron et al. 2000; Fidelix, Soares et al. 2006), atuando de modo diferente dos tradicionais fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) uma vez que seu mecanismo de ação, tanto em modelos experimentais como em humanos, não interfere na síntese de prostaglandinas, tromboxanos ou leucotrienos (Pomarelli, Berti et al. 1980; Franchi-Micheli, Lavacchi et al. 1983; La Villa, Marra et al. 1989; ANVISA 2008). Ademais, inúmeros estudos envolvendo cultura de condrócitos humanos ou animais evidenciam efeitos que vão além da redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a inibição da expressão de collagenases e iNOS (Moore, Greenslade et al. 1998; Smith, Myers et al. 1999; ANVISA 2008). Sendo o óxido nítrico um dos mais poderosos indutores da resposta imune, há uma diminuição substancial da síntese de proteases e radical livres de oxigênio concomitante a um o aumento da síntese de proteoglicanos e colágeno, o que impede a degradação da matriz da cartilagem articular, ossos e membrana sinovial, inibindo a patogênese do processo artrósico (Brandt, Smith et al. 1997; ANVISA 2008).

Neste contexto, a Diacereína seria um modificador de ação lenta e prolongada dos sintomas de doenças reumáticas e especificamente na osteoartrite, atuaria como um modulador das mudanças estruturais sofridas pelas articulações, apresentando uma razão de risco/benefício melhor que a dos AINES uma vez que não provoca reações adversas no aparelho digestivo ou danos renais, característicos do consumo dos mesmos (Fidelix,

Soares et al. 2006). Além da maior tolerância gástrica, os relatos mais frequentes de efeitos colaterais relacionados ao composto remetem-se apenas a ocasionais eventos de diarreia e dores abdominais em pacientes sensíveis aos derivados antraquinônicos (ANVISA 2008). Apesar do exposto até então, a Diacereína tem sido pouco explorada em doenças não articulares, despertando profundo interesse em seu emprego como agente modulador da resposta imune em outras enfermidades.

Considerando o imenso campo de investigação que o composto propicia e sendo a resistência à insulina e DM2 distúrbios metabólicos polimórficos e multifatoriais, mas de já comprovada origem inflamatória, é de se questionar a eficácia que drogas anti-inflamatórias apresentariam se empregadas como uma nova estratégia terapêutica para essas enfermidades. Tentamos, portanto, demonstrar os potenciais efeitos benéficos do anti-inflamatório Diacereína na sinalização intracelular da insulina e, conseqüentemente, na manifestação clínica da resistência insulínica e do diabetes tipo 2. Acreditamos que deste trabalho provirão importantes implicações na pesquisa por novas terapias voltadas para a redução da morbidade e mortalidade causadas pela obesidade associada a desordens inflamatórias crônicas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1- OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da administração da Diacereína sobre a incidência e manifestação da resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 em camundongos *Swiss* obesos.

2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos anti-inflamatórios da Diacereína sobre a cascata de sinalização intracelular da insulina através da quantificação da expressão e/ou fosforilação das proteínas envolvidas nesta via (IR, IRS-1 e Akt) ou dos fatores que a modulam negativamente (JNK e IKK β).
- Verificar a ação da Diacereína sobre a expressão de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-1 β e iNOS) diante do quadro de obesidade e de resistência à insulina induzidos por dieta hiperlipídica.

CAPÍTULO

**DIACERHEIN IMPROVES GLUCOSE TOLERANCE AND INSULIN
SENSITIVITY IN DIO MICE**

**Natália Tobar, Alexandre G Oliveira, Dioze Guadagnini, Renata A Bagarolli,
Gilherme Z Rocha, Tiago G Araújo, Junia C R Martins, José B C Carvalheira, Mario
J A Saad**

Department of Internal Medicine, State University of Campinas, 13081-970, Campinas,
SP, Brazil.

Please address correspondence to: Mario J. A. Saad, M.D., Departamento de Clínica
Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil,
13081-970, Fax: +55 19 37888950, e-mail: msaad@fcm.unicamp.br

ABSTRACT

Obesity represents one of the main risk factors to the development of insulin resistance and type 2 diabetes. The common basis among these events is a chronic and systemic inflammatory process characterized by the activation of JNK and IKK β /NF κ B pathways and upregulated cytokine synthesis. The objective of this work was to evaluate the effects of diacerhein administration, an anti-inflammatory anthraquinone which is probably a JNK and IKK β /NF κ B pathways inhibitor, on the insulin sensitivity in diet-induced obese mice. Swiss mice were fed with conventional chow (C group) or a high-fat diet (DIO group). Later, DIO mice were randomly subdivided in DAR10 and DAR20 groups according to the doses of 10 or 20 mg/kg of diacerhein administered. Through the *Western Blot* analysis, we quantified the expression and phosphorylation of IR, IRS-1 and Akt and of inflammatory mediators which modulate the insulin signaling in a negative way (IKK β , JNK and iNOS). DAR 10 and DAR20 animals presented an expressive improvement in their ITT and GTT, fasting serum glucose and insulin levels and a significant increase in the phosphorylation levels of insulin induced IR, IRS-1 and Akt in liver, muscle and adipose tissue. There was also a relevant inhibition of IKK β , I κ B α and JNK phosphorylation and iNOS expression in treated mice. Our results show that through the reversion of the low-grade subclinical inflammation, diacerhein improved glucose tolerance and insulin sensitivity in DIO animals. It suggests potential beneficial effects of this drug in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes.

Key words: diacerhein, insulin resistance, type 2 diabetes and inflammation

INTRODUCTION

Obesity, type 2 diabetes (T2D) and insulin resistance are metabolic disturbances deeply interrelated. The intersection among such conditions is linked to a systemic and subclinical inflammatory process characterized by abnormal production of cytokines, NO and acute-phase proteins (1, 2). On the other hand, cytokines as TNF- α , IL-1 β and IL-6 contribute to the development of dyslipidemia, hypercortisolemia, hypertension, obesity, hypercoagulability state and atherosclerosis acceleration besides they stimulate the acute-phase proteins production (3-6). All these linked events are able to amplify and propagate the inflammation process systemically.

In this interdependence context, it has become evident that many inflammatory mediators act as negative modulators of insulin action, playing an important role in the insulin resistance and T2D pathogenesis (7). The molecular mechanisms through cytokines promote insulin resistance have been more clarified recently and make reference, in special, to the activation of serine kinases proteins like JNK and the complex IKK β /NF κ B.

At the molecular level, the insulin signaling begins when the activation of insulin receptor (IR) results in tyrosine phosphorylation of several substrates, including the IR substrate 1 (IRS-1), triggering a cascade which leads to the PI3K and MAPK pathways activation (8). However, JNK and IKK β pathways cause serine residues phosphorylation on IR and IRS-1, reducing the ability of the last one to bind to IR, which contributes to the insulin signaling deregulation (9-11). This way, negative modulators of insulin intracellular cascade like JNK and IKK β are some of the responsables for the establishment of insulin resistance and represent potential therapeutic targets to T2D treatment.

Diacerhein (1,8-diacetoxy-9,10-dioxo-dihydroanthracene-3-carboxylic acid) is an anthraquinone found in *Cassia* gender plants which presents anti-inflammatory proprieties beyond moderate analgesic and antipyretic characteristics (12). Based on *in vitro* and *in vivo* experiments in animals and humans, rhein, the active metabolic of diacerhein, has demonstrated to inhibit the synthesis and activity of proinflammatory cytokines like TNF- α , IL-6 and mainly IL-1 β (13-17). Beside this, the compound acts directly on inflammatory cells inhibiting superoxide anion production by human neutrophils, release of lysosomal enzymes, chemotaxis and phagocytic activity of neutrophils and macrophages (12, 13, 17-21). In addition, diacerhein modulates in a negative way the synthesis and activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) through the decrease of its mRNA levels (17, 22).

Here, we investigate the effects of diacerhein on insulin signaling in liver, skeletal muscle and adipose tissue of diet-induced obese *Swiss* mice treated during 10 days as well as the role of the reduction of JNK and IKK β activation in the regulation of the insulin-signaling pathway in these tissues. Taken together, our findings demonstrate that the diacerhein treatment by reducing the expression of proinflammatory mediators and the activation of the insulin negative modulators, improve the glucose tolerance and insulin sensitivity and signaling in liver, muscle and adipose tissue of DIO mice.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Materials

Male *Swiss* mice used in the experiments were provided by the State University of Campinas Central Breeding Center (Campinas, Brazil). All antibodies were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA), except anti-Akt, anti-phospho-Akt, anti-phospho-IKK β and anti- α -tubulin which were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Human recombinant insulin was from Eli Lilly and Co. (Indianapolis, IN). Diacerhein was kindly ceded by TRB-Pharma (Campinas, Brazil). Routine reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) unless specified elsewhere.

Animal characterization

All experiments were approved by the Ethics Committee at the State University of Campinas. Eight-week-old male *Swiss* mice were maintained under specific pathogen-free (SPF) conditions in a regimen of 12 hours dark/light cycles and room temperature of 21°C. The animals were randomly divided into two groups with similar body weights (30.22 ± 3.95 g) according to the diet they were assigned to receive for 12 consecutive weeks: a standard rodent chow (control group- C) or a high fat diet (diet-induced obesity group- DIO), consisting of 55% calories from fat, 29% from carbohydrate and 16% from protein. Food and water were *ad libitum* and body weight was measured weekly. Food intake was determined by measuring the difference between the weight of chow or high fat diet given and their weights at the end of a 24 hours period. After all weeks of feeding, the animals

had insulin and glucose tolerance tests performed, as previously described (23, 24), and the treatment with diacerhein was introduced as presented below.

Diacerhein administration protocol

Dried diacerhein was diluted in 0.01M PBS to a final concentration of 1.5 mg/ml. Part of DIO animals were randomly distributed in two new subgroups according to the diacerhein dose administrated. While a group received 10 mg/kg/day of diacerhein solution (DAR10), the other one was treated with 20 mg/kg/day from the same solution (DAR20). Drug administration was performed by one gavage per day for 10 consecutive days. The rest of mice from DIO group and those from C group received only the vehicle (0.01M PBS).

Assays

At the end of the treatment with diacerhein, blood samples were taken for the determination of serum concentration of basal insulin by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Linco). Glucose values were measured from the tail venous blood of all animals with a glucose monitor (Glucometer; Bayer).

Tissue extraction

Food was withdrawn 12–14 hours before the tissue extraction. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium thiopental and opened 10–15 minutes later, i.e., as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes. The abdominal cavity was opened, the portal vein exposed and 0.2 ml of normal saline was injected with or without insulin (10^{-6} mol.l⁻¹) in some animals from each group. At 30

seconds after the insulin injection, the liver was removed, and 90 seconds later, gastrocnemius muscle and epididymal adipose tissue were extracted, minced coarsely, and homogenized immediately in extraction buffer, as described elsewhere (25). Extracts were then centrifuged at 15,000 rpm at 4°C for 40 minutes to remove insoluble material. The whole tissue extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting, as previously described (24, 26). The analysis of NFκB p65 activation was also determined through immunoblotting method but using nuclear extracts from the same tissues (27).

Protein analysis by immunoblotting

The whole-tissue and nuclear extracts were treated with Laemmli sample buffer (24) containing 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 5 minutes, after which they were subjected to SDS-PAGE in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Mini-Protean). Proteins from total and nuclear extracts were subjected to SDS-PAGE. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose membranes was performed for 120 minutes at 120 V in a Bio-Rad Mini-Protean transfer apparatus (28). Nonspecific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter for 2 hours in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blot was incubated overnight at 4°C with specific antibodies. The results were visualized by autoradiography with preflashed Kodak XAR film and band intensities were quantified by optical densitometry (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA; model GS300).

Real-time PCR

Total RNA was obtained from liver, gastrocnemius muscle and epididymal adipose tissue of the four groups of mice according to the methods published previously (29). For tissue samples, first-strand cDNA was synthesized using SuperScript II reverse transcriptase and random hexamer primers as described in the manufacturer's protocol (Invitrogen Corp.). Quantitative PCR was run to determine the expressions of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in each tissue fraction. Real-time detection of amplification was performed in an ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) using SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Twenty ng of each cDNA sample were used in the reaction with the following primers: 150 nM of TNF- α (Fw: 5'- AGT TCC CAA ATG GCC TCC C -3'; Rv: 5'- TGT CAC TCG AAT TTT GAG AAG -3'), 150 nM of IL1- β forward and reverse primers (Fw: 5'- ACC TGT CCT GTG TAA TGA AAG ACG -3'; Rv: 5'- GGT ATT GCT TGG GAT CCA CAC T-3') and 150 nM of IL-6 (Fw: 5'- GGA AAT CGT GGA AAT GAG AAA -3'; Rv: 5'- AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT AC -3'). GAPDH expression was used as endogenous control and samples from control mice were used as calibrators. A negative "No Template Control" was also included for each primer pair. The dissociation protocol was performed at the end of each run to check for non-specific amplification. Two replicas were run on the same plate for each sample. Results are expressed as relative expression values.

Morphometry

Five μ m sections from epididymal adipose tissue, liver and pancreas were observed with a Zeiss Axiophot light microscope using $\times 10$ (for the first one) and $\times 40$ (for the others) objectives and digital images were captured with a Canon PowerShot G5. To mark macrophages in the adipose tissue and insulin in the pancreatic islets, specific antibodies

were used according to previous methodologies (27,39). The measurements of adipocytes, pancreatic islets and β cell total areas were assessed using the image analysis system Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Statistical Analysis

Data are expressed as means $\pm$ SEM and the number of independent experiments is indicated. The results of blots are presented as direct comparisons of bands or spots in autoradiographs and quantified by optical densitometry (Scion Image). For statistical analysis, the groups were compared using a 2-way ANOVA with the Bonferroni test for post hoc comparisons. The level of significance adopted was $p < 0.05$.

RESULTS

Physiologic and metabolic parameters

Figure 1 shows comparative data regarding the controls (C), diet-induced obesity mice (DIO) and DIO mice treated with diacerhein for 10 days (DAR10 and DAR20). All animals from DIO group, treated or not, presented similar body weight and epididymal fat pad weight, which were higher when compared to the control group (Fig. 1A and B). During the period of diacerhein administration, food ingestion and the caloric consumption were daily measured and although there was a significant difference about the calories consumed among all groups, food intake was similar between the treated and non-treated groups (Fig. 1C and D). After the tenth day of treatment, the fasting serum glucose concentrations were significantly lower in both treated groups than in the DIO animals and very similar to the C group (Fig. 1E). Fasting serum insulin levels were also reduced in the treated groups and controls compared to the DIO group (Fig. 1F).

To investigate glucose tolerance, we performed an intraperitoneal glucose tolerance test (GTT) and determined serum glucose levels at determined time points. Throughout the test, glucose levels of DIO animals were higher at the all time points. Conversely, DAR10 and DAR20 mice showed an improved glucose profiles, closer to the C group (Fig. 1G). During the insulin tolerance test, we also observed that the reduction in the glucose disappearance rate (KITT) induced by the high-fat diet was restored after treatment with both doses of diacerhein (Fig. 1H and I).

Histological characterization of liver and adipose tissue after the treatment with diacerhein

We assessed whether those metabolic changes found between the groups which received diacerhein or not were related to alterations in hepatic and adipose morphologies. Histological sections from liver of DIO group showed the presence of innumerable fat vesicles compared to the control ones, which characterizes the first group as presenting hepatic steatosis. Nevertheless, the treatment with both doses of diacerhein induced no more fat accumulation in liver parenchyma (Fig 2A-D).

Morphologic analysis of epididymal fat pad revealed large adipocytes and a significant infiltration of inflammatory cells in DIO animals, evidenced through the presence of many crown-like structures and confirmed by the detection of specific macrophage marker F4/80 (Suppl.1). Mice from DAR 10 and DAR 20 groups presented fewer and smaller adipocytes than the DIO group beyond discrete presence of macrophages, a very similar profile found in control animals (Fig 3A-E).

Cytokines analyses

We examined TNF- α , IL-6 and IL1- β mRNA expressions in liver, gastrocnemius muscle and epididymal adipose tissue of the studied groups. As expected, cytokine mRNA expressions in DIO mice were higher than in control group, with an only exception to the expression of TNF- α in muscle (Fig. 4A-H). The relative amount of TNF- α , IL-6 and IL-1 β transcripts were in general significantly reduced in all tissues from DAR 10 and DAR20 animals compared with DIO group (Fig 4A-H). One exception occurred to the IL-6 amount of the D20 group in the adipose tissue.

Effects of diacerhein treatment on insulin signaling in liver, muscle and adipose tissue

We then examined the consequences that the diacerhein administration provoked on the insulin signaling pathway in its main target tissues. As expected, in liver, muscle and adipose tissue of mice fed on high fat diet, insulin-stimulated tyrosine phosphorylation levels of IR β and IRS-1 and Akt serine phosphorylation were significantly reduced compared to the control animals (Fig. 5A-I). Moreover, the groups treated with diacerhein exhibited higher phosphorylation of these proteins in all studied tissues when compared to the non treated group, except to the Akt phosphorylation in muscle, where it was lower in DAR 10 and DAR 20 animals (Fig 5F). While best results in liver were achieved with the dose of 10 mg/kg, in adipose tissue the dose of 20 mg/kg showed, in general, higher efficacy. There were no differences in the IR β , IRS-1 and Akt protein expressions among C, DIO, DAR10 and DAR20 groups.

Effects of diacerhein on JNK pathway

JNK activation was determined by monitoring phosphorylation of JNK1 and of its substrate c-Jun. The DIO group exhibited higher expression and phosphorylation of JNK in the liver, muscle and adipose tissue related to the control animals (Fig 6A-C). In agreement with this, phosphorylation levels of c-Jun were also superior in obese non-treated group (Fig 6D-F). Inversely, the expression and activity of JNK as well as the phosphorylation of c-Jun in these tissues of animals from DAR10 and mainly DAR20 groups were significantly lower when compared to the DIO group and very similar to the controls.

Effects of diacerhein on IKK β /I κ B α /NF κ B pathway

IKK β activity was monitored through IKK β and I κ B α phosphorylation, as previously described (30), and complemented by the analysis of the nuclear expression of

NFκB p65. In the liver, muscle and adipose tissue of DIO group, the phosphorylation levels of IKKβ (Fig 7A-C) and IκBα (Fig 7D-F) were higher when compared to the control one. Related to DIO animals, the treated mice exhibited lower phosphorylation of IKKβ and IκBα in all studied tissues, in special with the dose of 20 mg/Kg. For this reason, we assessed the translocation of NFκB p65 to the nuclei of hepatocytes, muscular cells and adipocytes in animals from DAR20 group. As expected, in nuclear tissue extracts from these mice, we detected lower expression of NFκB p65 compared with the non-treated group and extremely close to what was found in the control animals (Fig. 7G-I).

Effect of diacerhein on iNOS expression

Related to the DIO group, animals treated with diacerhein presented an expressive reduction of iNOS expression in the liver, muscle and adipose tissue (Fig. 8A-C).

DISCUSSION

It is generally agreed that inflammation is a key feature of obesity and type 2 diabetes (31,32). Here we show for the first time that the administration of the anti-inflammatory diacerhein for 10 days in diet-induced obese mice resulted in a marked improvement in glucose tolerance, decrease in macrophage infiltration in adipocytes, reduction of expression and activity of proinflammatory mediators accompanied by an improvement in insulin signaling in liver, muscle and adipose tissue. Taken together, these results indicate that diacerhein treatment improves insulin sensitivity in obesity through the reversion of subclinical chronic inflammation and may be an alternative therapy for insulin resistance.

We hypothesize that this improved insulin signaling occurred primarily through the suppression of proinflammatory mediators, important inducers of insulin resistance such as the inflammatory cytokines and serine kinases proteins. In this context, it is well established that obesity induces a complex signaling pathway that activates IKK β and JNK (32). Interestingly, it is also known that interventions that inhibit their expression or activity significantly improve peripheral insulin sensitivity (33, 34). In agreement, our data demonstrate that reductions in IKK β and JNK activation after diacerhein administration in obese animals increase the phosphorylation levels of important proteins from insulin cascade signaling (IR, IRS-1 and Akt), improving the insulin resistance state as a whole. This confirms the many authors' hypothesis that these serine kinases are possibly key modulators in the cross-talk between inflammatory and metabolic pathways (32, 35).

As previously described, the overlap between stimuli that activate IKK β and JNK and conditions that promote insulin resistance also includes proinflammatory cytokines (32,

34). IKK β activation, through the phosphorylation and degradation of I κ B α , initiates NF κ B-mediated transcription, which in certain cells enhance the production of TNF- α , IL-6 and IL1- β , that further activate JNK and IKK β pathways through a feed-forward mechanism (32, 34). This positive feedback loop could perpetuate a vicious cycle of low-grade inflammatory signaling, contributing to enhance insulin resistance. Our findings predict that IKK β inhibition breaks this cycle. The treatment with diacerhein was able not just to reduce IKK β phosphorylation, but also I κ B α phosphorylation beyond to prevent the translocation of the NF κ B subunit p65 to the cellular nucleus confirming that the inactivation of IKK/NF κ B axis represents an alternative target for the therapy of insulin resistance as indicate by other works (36-38). In this line, the impediment of NF κ B nuclear translocation may, at least in part, explain the low levels of TNF- α , IL-6 and IL1- β detected, in general, in liver, muscle and adipose tissue of diacerhein treated animals and consequently the improvement in the systemic inflammatory process.

Aspirin and salicylates, whose beneficial effects in the treatment of diabetic patients have been known for decades (32, 35), are not only cyclooxygenase blockers but also function as IKK β inhibitors improving insulin sensitivity of obese mice (38, 40). However, the therapeutic usefulness of high-dose aspirin is limited by the antithrombotic and anti-platelet aggregation effects coupled with gastrointestinal irritation and unacceptably high risks of bleeding (32). In this context, diacerhein presents a risk/benefit ratio superior than aspirin once it has the advantage of a higher gastric tolerance and rare side-effects (41).

Besides IKK β pathway downregulation, diacerhein also inhibited the phosphorylation of JNK as well its substrate c-Jun. In obesity, JNK activity is increased in the liver, muscle, and fat tissues (31). Many JNK inhibitors or JNK1 deficiency have demonstrated to prevent the development of insulin resistance, T2D and fatty liver disease,

beyond presented beneficial effects in insulin sensitivity in both genetic and dietary models of obesity. (35, 42). The reduction in JNK phosphorylation found in this work agrees with previous studies in which inhibition of JNK activity in liver improves insulin sensitivity and hepatic steatosis (35). Although it has been described that muscle JNK does not contribute to insulin resistance (43), we observed significant lower levels of JNK phosphorylation in gastrocnemius muscle of DAR10 and DAR20 groups, what may have contributed to the improvement in the systemic insulin responsiveness. Considering the reduced JNK total expression in diacerhein treated animals, we cannot either exclude the possibility of diacerhein exerts a direct effect on JNK transcription or degradation processes.

Modest weight loss, achieved by diet and exercise, can enhance insulin sensitivity and even reverse insulin resistance (47-49). Many JNK inhibitors with greater potency and selectivity have been disclosed (50, 51) and one of them has demonstrated beneficial effects on weight gain (50). However, ten days treatment with diacerhein in mice did not cause any alteration in body weight, epididymal fat pad neither in the amount of food intake what could explain the improvement in insulin sensibility. Considering the difference in the calories ingestion between all groups, we can hypothesize that diacerhein treated animals may not have the same regulation of energy expenditure, although this point deserves further investigation.

In obesity, the analysis of macrophages isolated from adipose tissue demonstrates that they are responsible for almost all TNF- α tissue expression and significant amounts of IL-6, IL-1 β and iNOS expression (44). Moreover, adipose tissue macrophage numbers increase in obesity and these cells participate intensely in inflammatory pathways that are activated in obese individuals (30). Conversely, another study has shown that reduction in

macrophage infiltration can decrease local inflammation in adipose tissue (45). In accordance with these data, our findings reveal that in the adipose tissue of DIO mice treated with diacerhein, besides the reduction in macrophage infiltration and decreased adipocytes size, there were lower expressions of TNF- α , IL-6, IL1- β and iNOS, proving that this drug decreases local inflammation in adipose tissue of obese mice.

Lipid accumulation in the liver is a hallmark of high-fat diet-induced insulin resistance (42). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) often accompanies abdominal adiposity and its pathological spectrum ranges from simple steatosis to steatohepatitis, advanced fibrosis and cirrhosis (32). Inflammation has been recognized clearly to play a pivotal role in the progression of this disease process. Beside this, gene disruption studies in mice have proven that interference with insulin signaling in hepatocytes activates fat-synthesizing enzymes in these cells and results in steatosis. (42). While in hepatic sections of DIO mice there was a large number of fat vesicles amply distributed across the parenchyma, mice treated with diacerhein presented liver parenchyma very similar to the controls, with no evidence of hepatic steatosis. Taking into account that inflammatory pathways and cytokine expression were markedly inhibited while the insulin signaling was restored in liver of treated animals, our results corroborate with what has been known so far now about hepatic morphologic alterations in obesity.

Proinflammatory cytokines increase NO production via increased expression of iNOS in rat skeletal muscle and cultured myocytes and adipocytes (24). Therefore, we can speculate that the significant reduction of iNOS expression in liver, muscle and adipose tissue of diacerhein treated groups may be justified by the reduction of cytokines expression in the tissues of these animals. Beside this, it is known that iNOS induction and NO may be involved in the pathogenesis of obesity-linked T2D and that they are involved

in the impact of insulin pathway through the S-nitrosation of proteins from its signaling cascade (24). For this reason, the improvement in insulin sensitivity may be also related to the reduced expression of iNOS found in the tissues of treated animals. These findings are supported by previous study, which have demonstrated that genetic disruption of iNOS protects against obesity-linked insulin resistance (46).

As it is known, insulin resistance and obesity demand an increase in circulating insulin and several β -cell adaptations, including increased insulin synthesis and secretion, hyperplasia and hypertrophy (39). Therefore, supported by the general increased insulin sensitivity, reduction of subclinical chronic inflammation and also in agreement with Malaguti's work (2008), it is possible to justify the favorable morphologic alterations regarding to the total area of pancreatic islets and β -cells found in treated groups (Suppl. 2).

In summary, our data confirm that IKK β and JNK are key modulators in the cross-talk between inflammatory and metabolic pathways. Too few and expensive tools are currently available to treat patients with insulin resistance and type 2 diabetes and, for this reason, we suggest that serine kinases may provide a valuable target for the discovery of new therapeutic drugs. In this context, diacerhein can be considered as an attractive and more accessible alternative for the treatment of human insulin resistance and T2 diabetes.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

N.T.: researched data, contributed to discussion, wrote/reviewed/edited manuscript;
A.G.O.: researched data, reviewed/edited manuscript; D.G.: researched data; R.A.B.:
researched data; G.Z.R.: researched data; T.A.: researched data; J.C.R.M.: researched data;
J.B.C.C.: contributed to discussion, reviewed/edited manuscript; M.J.A.S.: contributed to
discussion, wrote/ reviewed/edited manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflicts of interest relevant to this work were reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank L. Janieri (Department of Internal Medicine, UNICAMP, Campinas, São Paulo) and J. Pinheiro (Department of Internal Medicine, UNICAMP, Campinas, São Paulo) for their technical assistance.

REFERENCES

1. **Sethi JK, Hotamisligil GS** 1999 The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 10:19-29
2. **Pickup JC, Crook MA** 1998 Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41:1241-1248
3. **Grimble RF** 2002 Inflammatory status and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5:551-559
4. **Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C, Feingold KR** 1995 Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology* 136:2143-2149
5. **Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF** 2003 Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52:812-817
6. **Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS** 2002 Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 51:2929-2935
7. **Pickup JC** 2004 Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:813-823
8. **Saltiel AR, Kahn CR** 2001 Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806
9. **Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM** 1996 IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665-668
10. **Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y** 1997 A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:29911-29918
11. **Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF** 2002 Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277:1531-1537
12. **Spencer CM, Wilde MI** 1997 Diacerein. *Drugs* 53:98-106; discussion 107-108
13. **Moore AR, Greenslade KJ, Alam CA, Willoughby DA** 1998 Effects of diacerein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 6:19-23
14. **Nicolas P, Tod M, Padoin C, Petitjean O** 1998 Clinical pharmacokinetics of diacerein. *Clin Pharmacokinet* 35:347-359
15. **Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Di Battista JA, Martel-Pelletier J** 1998 Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 41:1275-1286

16. **Pelletier JP, Lajeunesse D, Reboul P, Mineau F, Fernandes JC, Sabouret P, Martel-Pelletier J** 2001 Diacerein reduces the excess synthesis of bone remodeling factors by human osteoblast cells from osteoarthritic subchondral bone. *J Rheumatol* 28:814-824
17. **Pelletier JP, Mineau F, Fernandes JC, Duval N, Martel-Pelletier J** 1998 Diacerhein and rhein reduce the interleukin 1beta stimulated inducible nitric oxide synthesis level and activity while stimulating cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *J Rheumatol* 25:2417-2424
18. **Boittin M, Redini F, Loyau G, Pujol JP** 1993 [Effect of diacerhein (ART 50) on the matrix synthesis and collagenase secretion by cultured joint chondrocytes in rabbits]. *Rev Rhum Ed Fr* 60:68S-76S
19. **Del Rosso M, Fibbi G, Magnelli L, Pucci M, Dini G, Grappone C, Caldini R, Serni U, Colombo F, Borella F** 1990 Modulation of urokinase receptors on human synovial cells and osteoarthritic chondrocytes by diacetylrhein. *Int J Tissue React* 12:91-100
20. **Martel-Pelletier J, Mineau F, Jolicoeur FC, Cloutier JM, Pelletier JP** 1998 In vitro effects of diacerhein and rhein on interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes. *J Rheumatol* 25:753-762
21. **Mian M, Brunelleschi S, Tarli S, Rubino A, Benetti D, Fantozzi R, Zilletti L** 1987 Rhein: an anthraquinone that modulates superoxide anion production from human neutrophils. *J Pharm Pharmacol* 39:845-847
22. **Tamura T, Ohmori K** 2001 Diacerein suppresses the increase in plasma nitric oxide in rat adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol* 419:269-274
23. **De Souza CT, Araujo EP, Stoppiglia LF, Pauli JR, Ropelle E, Rocco SA, Marin RM, Franchini KG, Carneiro EM, Velloso LA** 2007 Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *FASEB J* 21:1153-1163
24. **Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carneiro EM, Velloso LA, Curi R, Saad MJ** 2005 S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 54:959-967
25. **Thirone AC, Carneiro EM, Hirabara SM, Velloso LA, Saad MJ** 2004 Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. *Endocrinology* 145:281-293
26. **Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carneiro EM, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ** 2007 Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1986-1998
27. **Prada PO, Ropelle ER, Mourao RH, de Souza CT, Pauli JR, Cintra DE, Schenka A, Rocco SA, Rittner R, Franchini KG, Vassallo J, Velloso LA, Carneiro EM, Saad MJ** 2009 EGFR tyrosine kinase inhibitor (PD153035) improves glucose tolerance and insulin action in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* 58:2910-2919
28. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J** 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354

29. **Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z, Spiegelman BM** 2007 Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem* 282:30014-30021
30. **Gao Z, Zuberi A, Quon MJ, Dong Z, Ye J** 2003 Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J Biol Chem* 278:24944-24950
31. **Hotamisligil GS** 2006 Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867
32. **Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB** 2006 Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116:1793-1801
33. **Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, Shulman GI** 2002 Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 109:1321-1326
34. **Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE** 2001 Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293:1673-1677
35. **Tanti JF, Jager J** 2009 Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol* 9:753-762
36. **Shoelson SE, Lee J, Yuan M** 2003 Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S49-52
37. **Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M** 2005 IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11:191-198
38. **Shoelson SE, Herrero L, Naaz A** 2007 Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132:2169-2180
39. **Rafacho A, Cestari TM, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR** 2009 High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E681-689
40. **Karin M, Yamamoto Y, Wang QM** 2004 The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3:17-26
41. **Fidelix TS, Soares BG, Trevisani VF** 2006 Diacerein for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*:CD005117
42. **Tilg H, Hotamisligil GS** 2006 Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 131:934-945
43. **Witczak CA, Hirshman MF, Jessen N, Fujii N, Seifert MM, Brandauer J, Hotamisligil GS, Goodyear LJ** 2006 JNK1 deficiency does not enhance muscle glucose metabolism in lean mice. *Biochem Biophys Res Commun* 350:1063-1068
44. **Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.** 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808
45. **Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, Kono K, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Sulsky R, Robl JA, Parker RA, Hotamisligil GS** 2007 Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447:959-965

46. **Perreault M, Marette A** 2001 Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7:1138-1143
47. **Vazquez JA, Kazi U** 1994 Lipolysis and gluconeogenesis from glycerol during weight reduction with very-low-calorie diets. *Metabolism* 43:1293-1299
48. **Turner N, Bruce CR, Beale SM, Hoehn KL, So T, Rolph MS, Cooney GJ** 2007 Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes* 56:2085-2092
49. **Toledo FG, Menshikova EV, Azuma K, Radikova Z, Kelley CA, Ritov VB, Kelley DE** 2008 Mitochondrial capacity in skeletal muscle is not stimulated by weight loss despite increases in insulin action and decreases in intramyocellular lipid content. *Diabetes* 57:987-994
50. **Cho H, Black SC, Looper D, Shi M, Kelly-Sullivan D, Timofeevski S, Siegel K, Yu XH, McDonnell SR, Chen P, Yie J, Ogilvie KM, Fraser J, Briscoe CP** 2008 Pharmacological characterization of a small molecule inhibitor of c-Jun kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1142-1151
51. **Zhao H, Serby MD, Xin Z, Szczepankiewicz BG, Liu M, Kosogof C, Liu B, Nelson LT, Johnson EF, Wang S, Pederson T, Gum RJ, Clampit JE, Haasch DL, Abad-Zapatero C, Fry EH, Rondinone C, Trevillyan JM, Sham HL, Liu G** 2006 Discovery of potent, highly selective, and orally bioavailable pyridine carboxamide c-Jun NH2-terminal kinase inhibitors. *J Med Chem* 49:4455-4458

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Physiologic and metabolic parameters in control mice, obese mice and obese mice submitted to the administration of diacerhein for ten days. *A*: Body weight. *B*: Epididymal fat pad weight. *C*: Total food intake *D*: Consumption of calories. *E*: Fasting serum glucose. *F*: Fasting serum insulin. *G*: Glucose response curve during the glucose tolerance test. *H*: Glucose response curve during the insulin tolerance test. *I*: KITT. Data are presented as means $\pm$ SEM of ten mice per group. #*P* < 0.05 vs. control, **P* < 0.05 vs. DIO.

Figure 2. Morphologic characterization of liver samples. *A-D*: Hematoxylin & eosin staining of 5 μ m histological section of liver parenchyma from control mice (*A*), DIO mice (*B*), DAR 20 mice (*C*) and DAR 10 mice (*D*). Original magnification X 400

Figure 3. Morphologic characterization of adipose tissue samples.

A-D: Hematoxylin & eosin staining of 5 μ m histological sections of epididymal fat pad from control mice (*A*), DIO mice (*B*), DAR 20 mice (*C*) and DAR 10 mice (*D*). Quantification of adipocytes area (square micrometers) (*E*). *Red arrows*: Crown-like structures. Scale bar of 50- μ m for all pictures. Original magnification X 100

Figure 4. Effects of diacerhein on TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA tissue expression in control mice, obese mice, and obese mice submitted to the administration of diacerhein for ten days. Determination of TNF- α mRNA expression by real-time PCR in the liver (*A*), gastrocnemius muscle (*B*) and epididymal adipose tissue (*C*). Determination

of IL-6 mRNA expression by real-time PCR in the liver (*D*), gastrocnemius muscle (*E*) and epididymal adipose tissue (*F*). Determination of IL-1 β mRNA expression by real-time PCR in the liver (*G*), gastrocnemius muscle (*H*) and epididymal adipose tissue (*I*). Data are presented as means $\pm$ SEM of ten mice per group, $\#P < 0.0001$ vs. control group and $*P < 0.0001$ vs. DIO.

Figure 5. Effects of diacerhein administration on insulin signaling in high-fat fed mice.

Representative blots show in the liver the tyrosine phosphorylation of IR β (*A*), IRS-1 (*B*), and serine phosphorylation of Akt (*C*) of control mice, DIO mice, DAR20 mice and DAR10 mice (*upper panels*). Total protein expression (*A–C, lower panels*). In the muscle, the tyrosine phosphorylation of IR β (*D*), IRS-1 (*E*), and serine phosphorylation of Akt (*F*). Total protein expression (*D–F, lower panels*). In the adipose tissue, the tyrosine phosphorylation of IR β (*G*), IRS-1 (*H*), and serine phosphorylation of Akt (*I*) of control mice, DIO mice, DAR20 mice and DAR10 mice (*upper panels*). Total protein expression (*G–I, lower panels*). Data are presented as means $\pm$ SEM from six mice per group, $*P < 0.05$ vs. control group and $\#P < 0.05$ vs. DIO. IB, immunoblot.

Figure 6. Effects of diacerhein administration on JNK pathway in DIO mice.

JNK phosphorylation in liver (*A*), muscle (*B*), and adipose tissue (*C*) of control mice, DIO mice, DAR20 mice and DAR10 mice (*upper panels*). Total protein expression of JNK (*A–C, lower panels*). c-Jun phosphorylation in liver (*D*), muscle (*E*), and adipose tissue (*F*) of control mice, DIO mice, DAR20 mice and DAR10 mice. Total protein expression of pc-Jun

(D-F, lower panels). Data are presented as means $\pm$ SEM from six mice per group, $*P < 0.05$ vs. control group and $\#P < 0.05$ vs. DIO. IB, immunoblot.

Figure 7. Effects of diacerhein administration on IKK β /I κ B α /NF κ B pathway in DIO mice. Representative blots show the IKK β phosphorylation in liver (A), muscle (B), and adipose tissue (C) of control mice, DIO mice, DAR20 mice and DAR10 mice (*upper panels*). Total protein expression of IKK β (A–C, *lower panels*). I κ B α phosphorylation in liver (D), muscle (E), and adipose tissue (F) of control mice, DIO mice, DAR20 mice and DAR10 mice (*upper panels*) Total protein expression of I κ B α (D–F, *lower panels*). NF κ B p65 expression in nuclear extracts from liver (G), muscle (H), and adipose tissue (I). Total protein expression of NF κ B p65 (G–I, *lower panels*). Data are presented as means $\pm$ SEM from six mice per group, $*P < 0.05$ vs. control group and $\#P < 0.05$ vs. DIO. IB, immunoblot.

Figure 8. Effect of diacerhein on iNOS tissue expression in DIO mice. iNOS expression in liver (A), muscle (B), and adipose tissue (C) of control mice, DIO mice, DAR20 mice and DAR10 mice (*upper panels*). Total protein expression of iNOS (A–C, *lower panels*). Data are presented as means $\pm$ SEM from six mice per group, $*P < 0.05$ vs. control group and $\#P < 0.05$ vs. DIO. IB, immunoblot.

Supplemental figure 1. Effects of diacerhein on macrophages infiltration in adipose tissue. A–D: Representative immunohistochemical staining of 5 μ m histological sections of epididymal fat pad using the specific macrophage marker F4/80+. Control mice (A), DIO mice (B), DAR 20 mice (C) and DAR 10 mice (D). *Red arrows:* Crown-like structures

through F4/80+ detection. Scale bar of 50- μ m for all pictures. Original magnification X 100.

Supplemental figure 2. Morphologic characterization of pancreatic islets. *A-D*: Representative immunostaining of 5 μ m histological sections of pancreas using marked insulin. Control mice (*A*), DIO mice (*B*), DAR 20 mice (*C*) and DAR 10 mice (*D*). Quantification of pancreatic islets area (square micrometers) (*E*). Quantification of β -cells area (square micrometers) (*F*). Scale bar of 50- μ m for all pictures. Original magnification X 400.

Figure 1

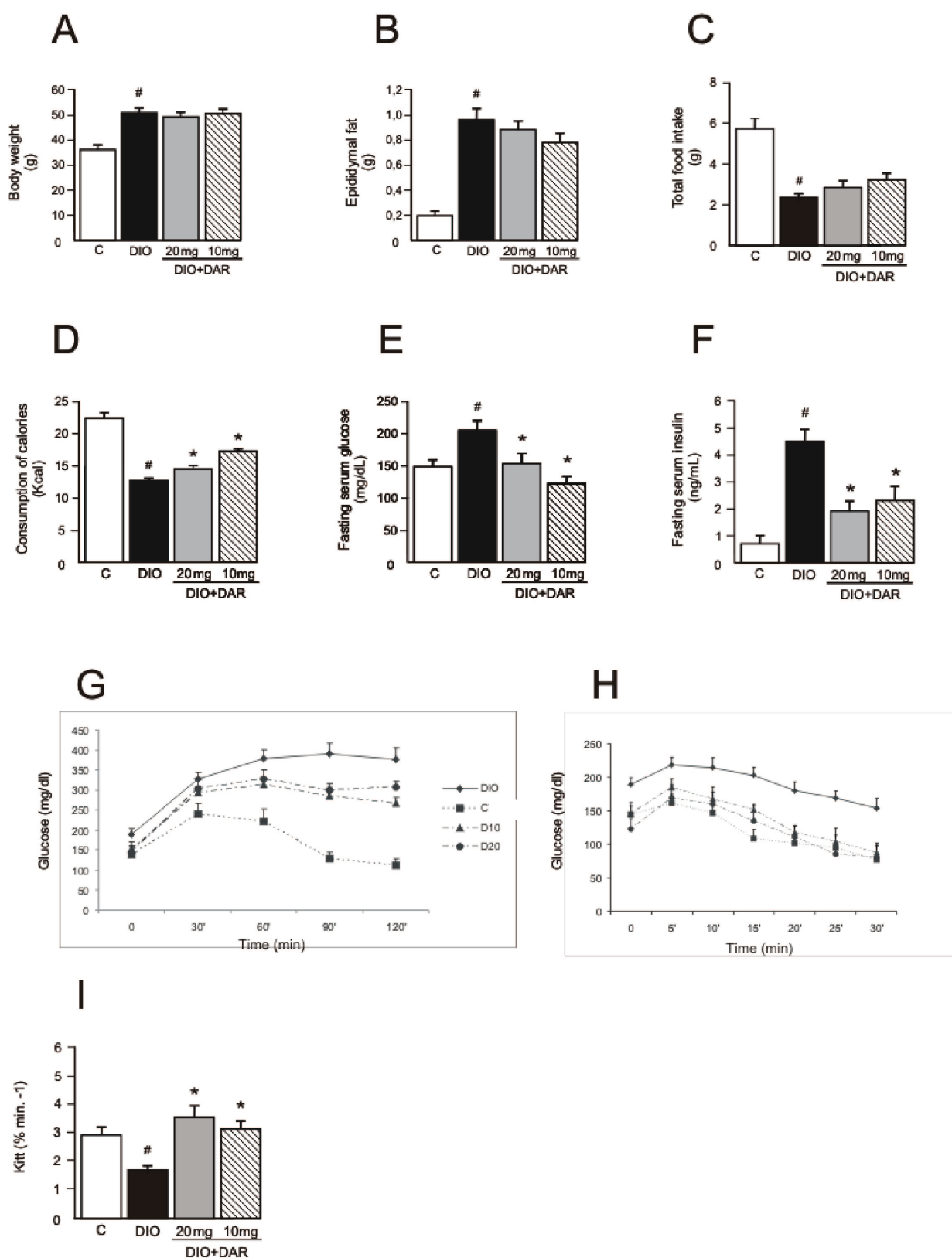
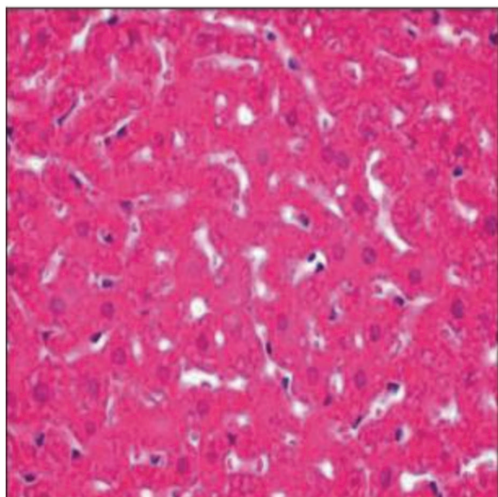
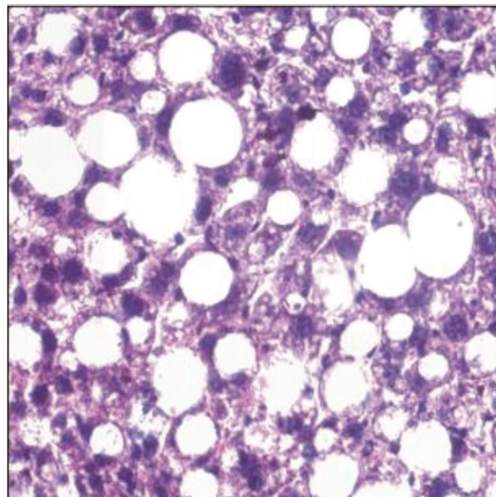


Figure 2

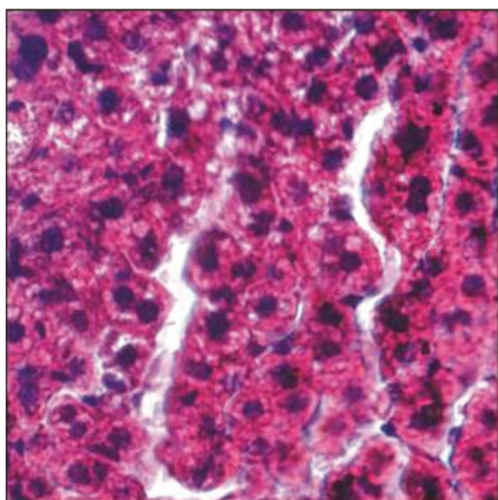
A



B



C



D

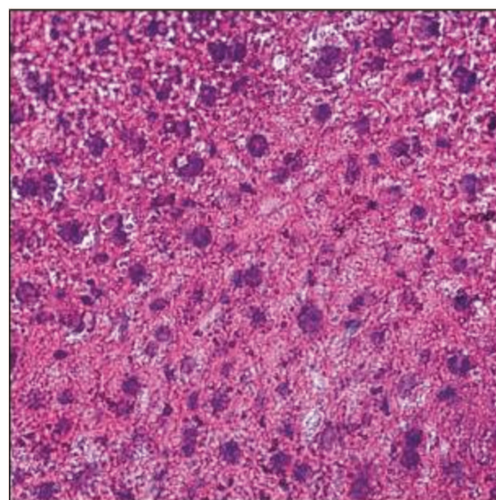
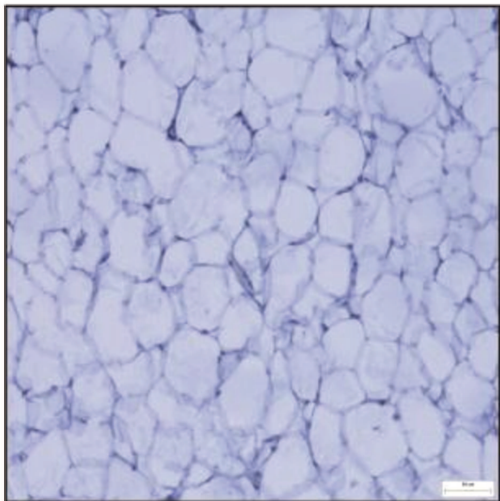
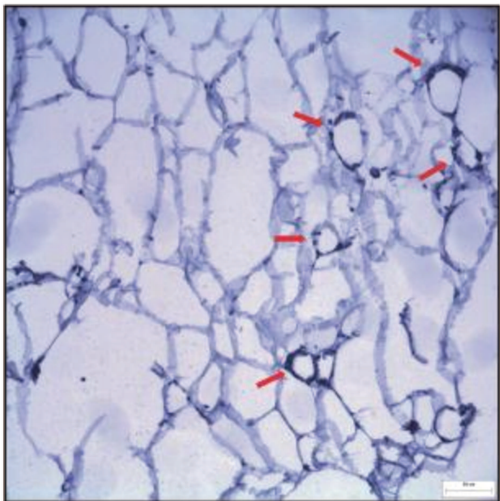


Figure 3

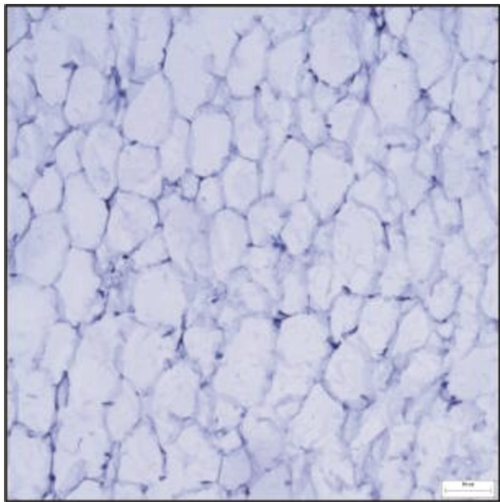
A



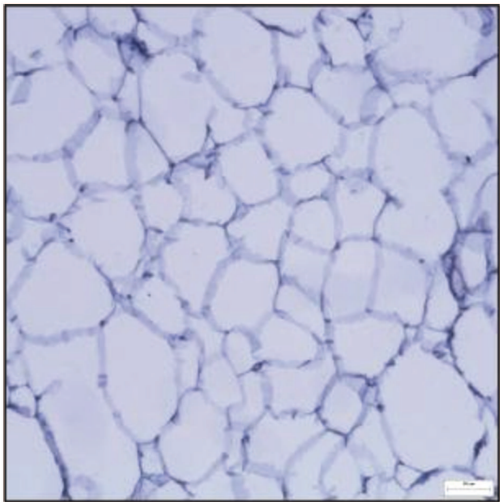
B



C



D



E

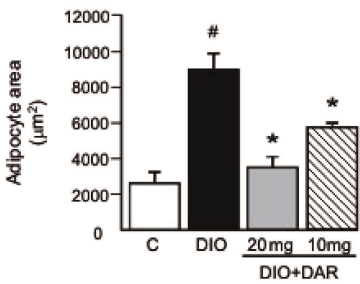


Figure 4

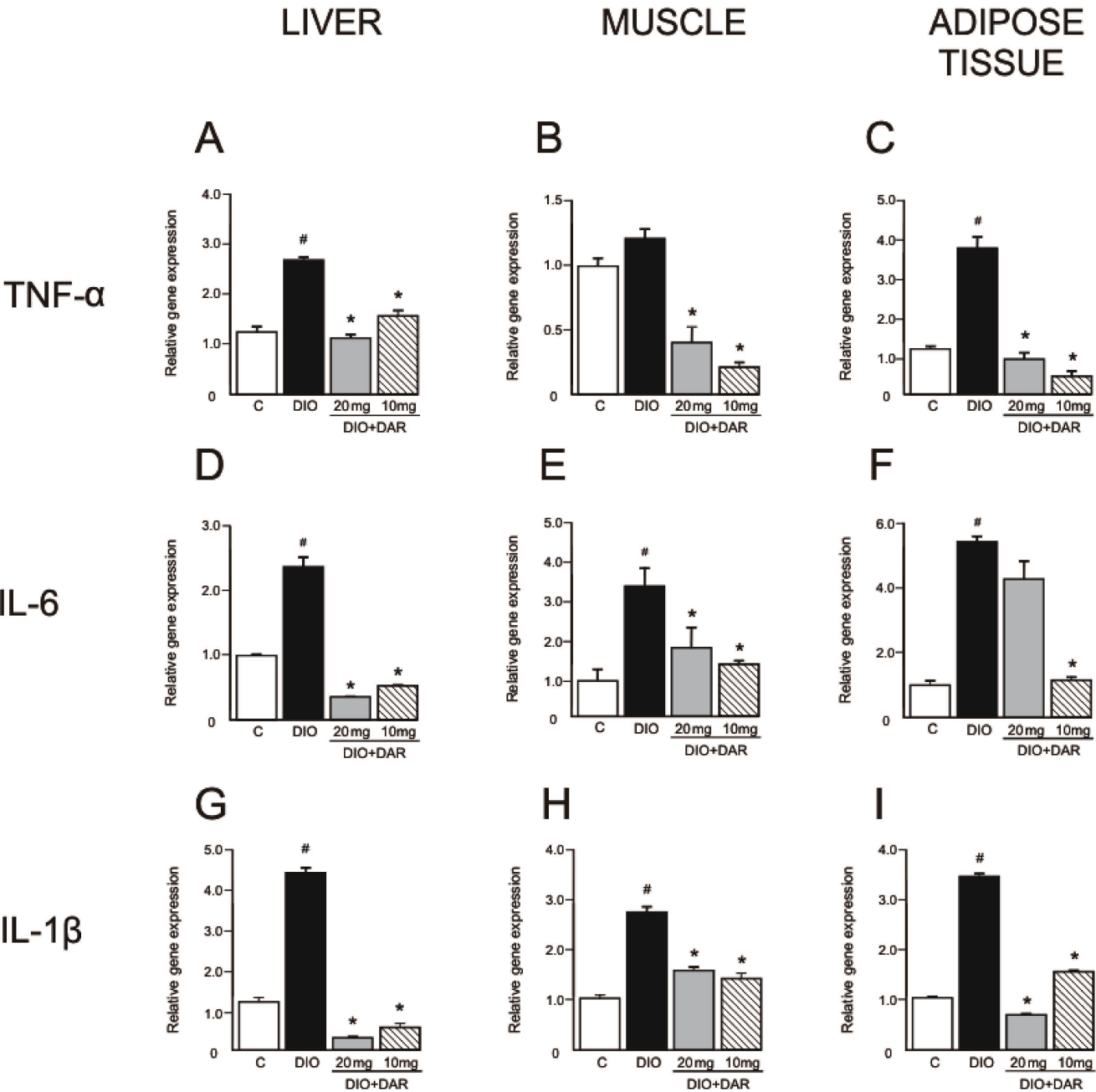


Figure 5

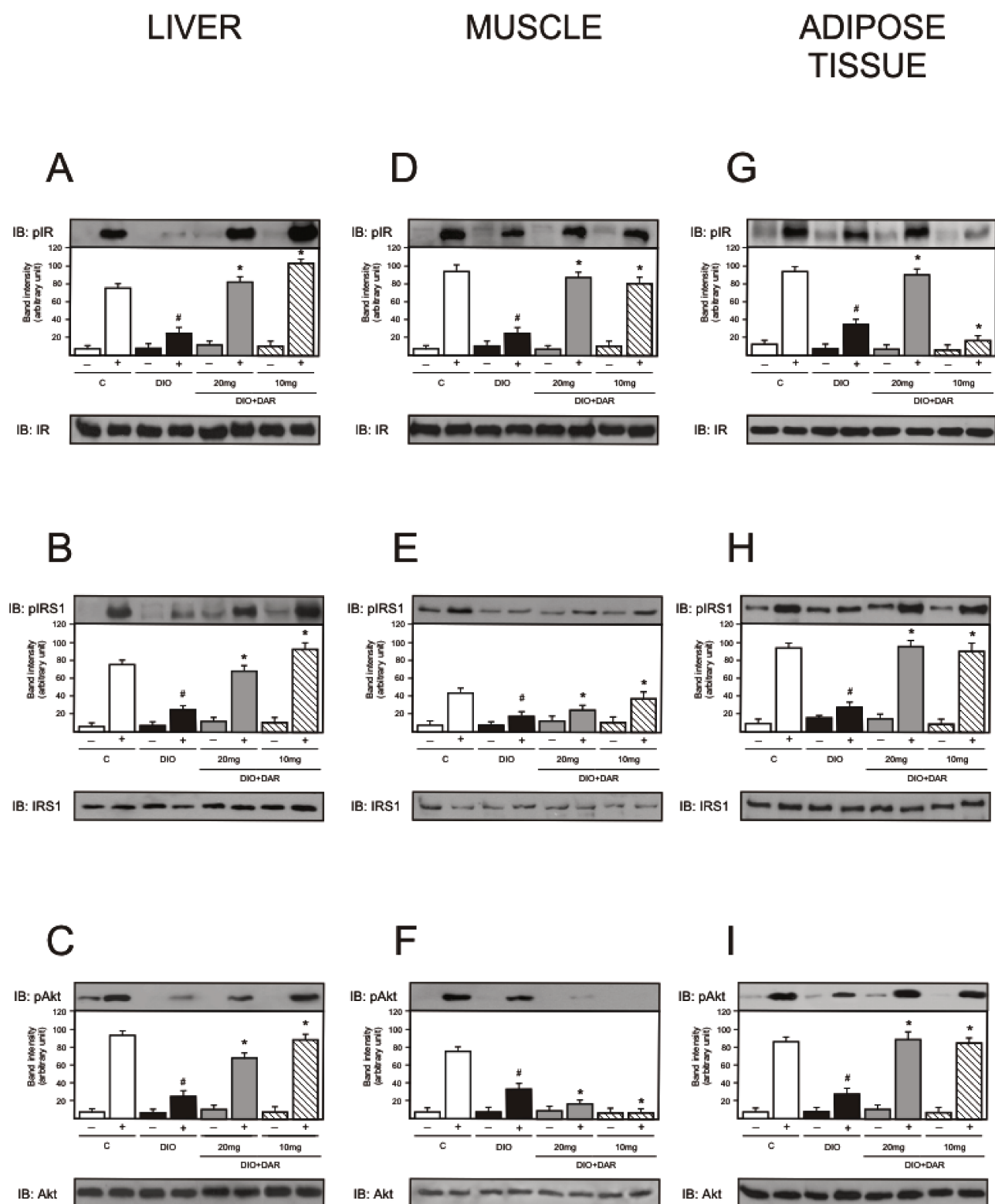


Figure 6

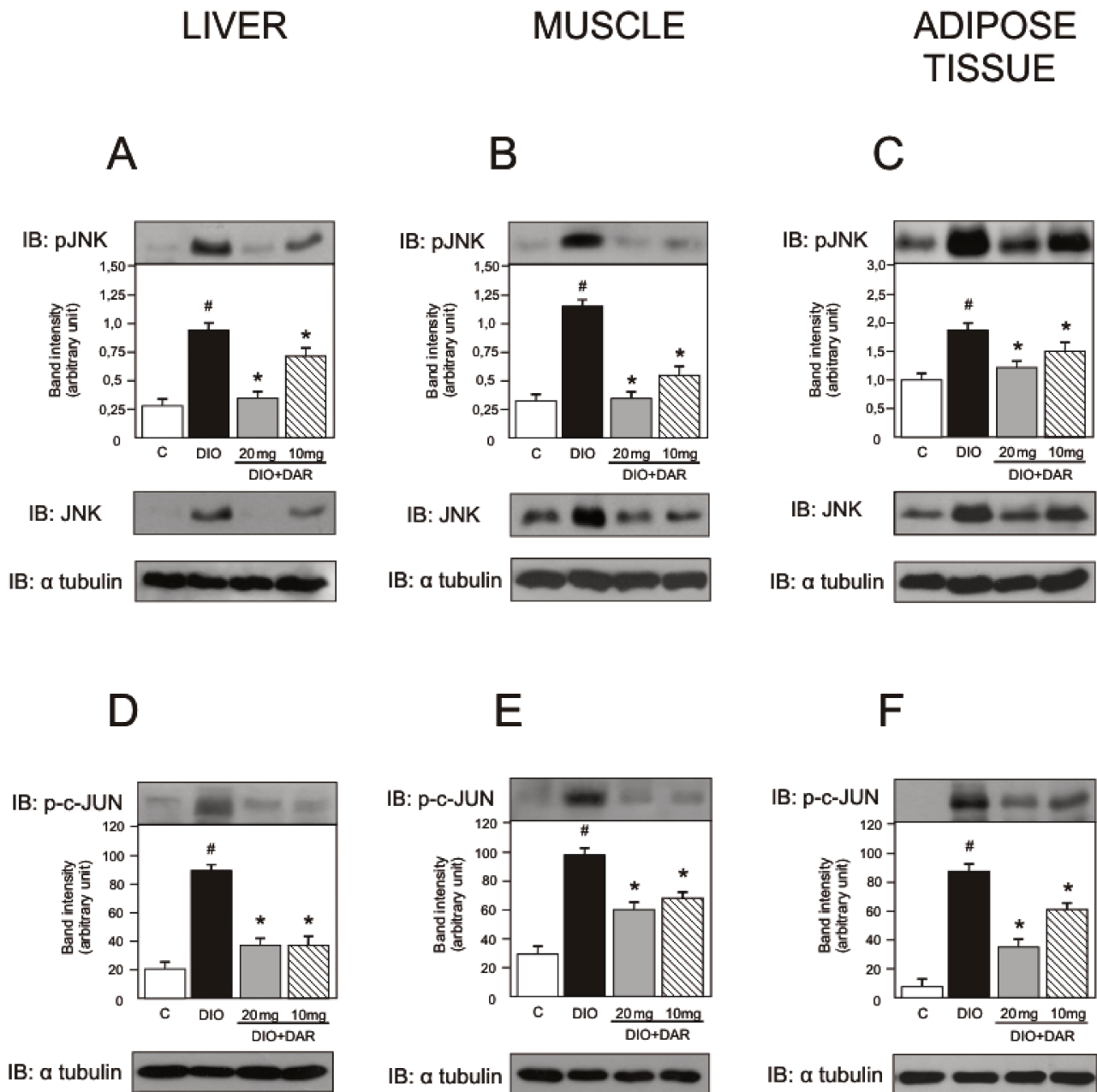


Figure 7

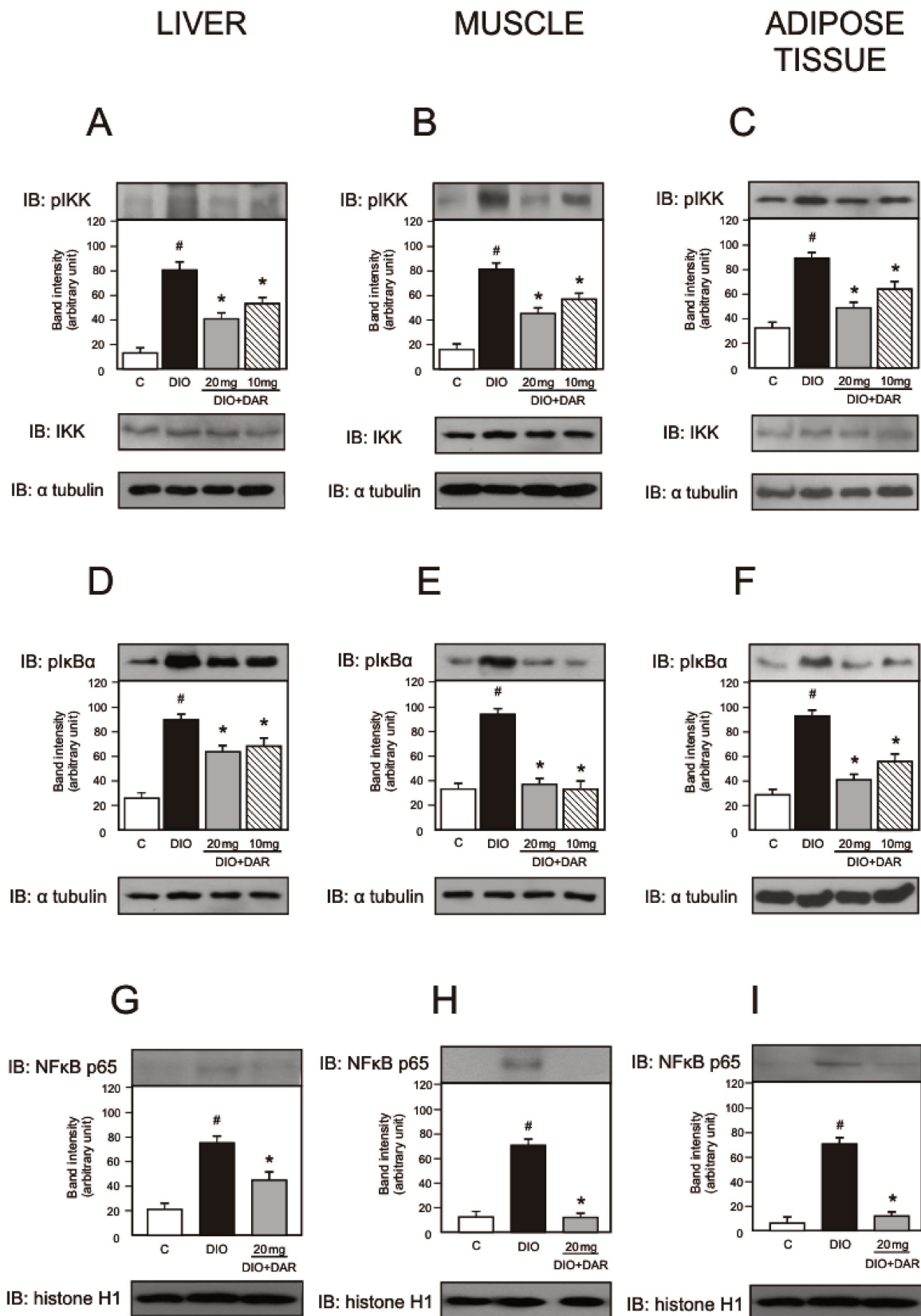
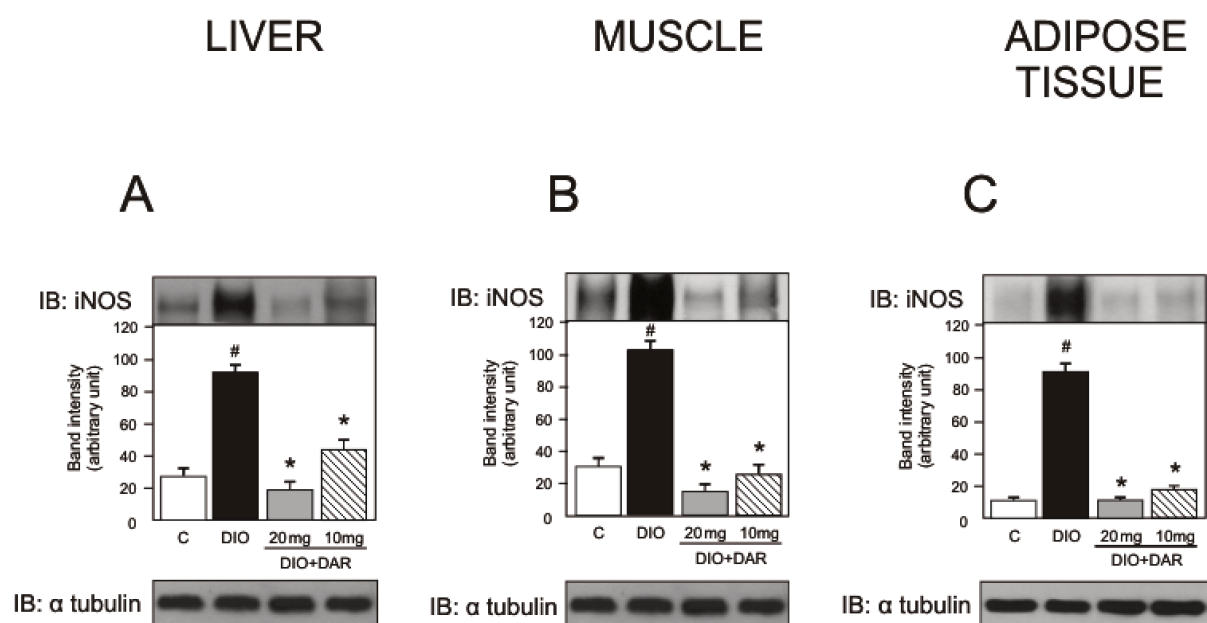
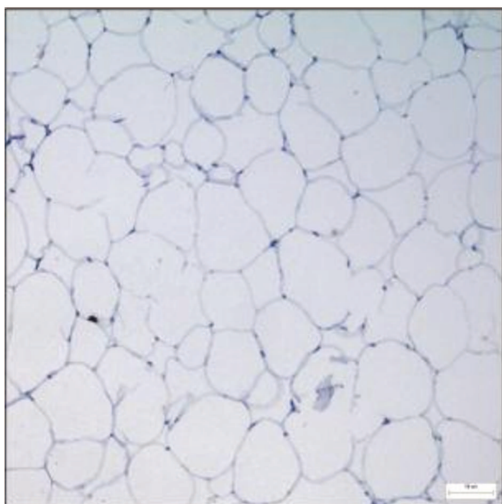


Figure 8

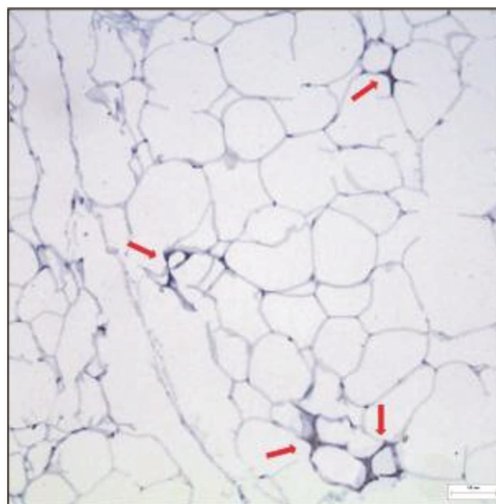


Supplementar figure 1

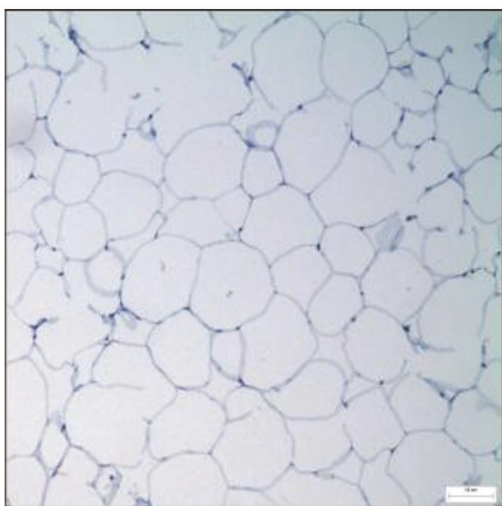
A



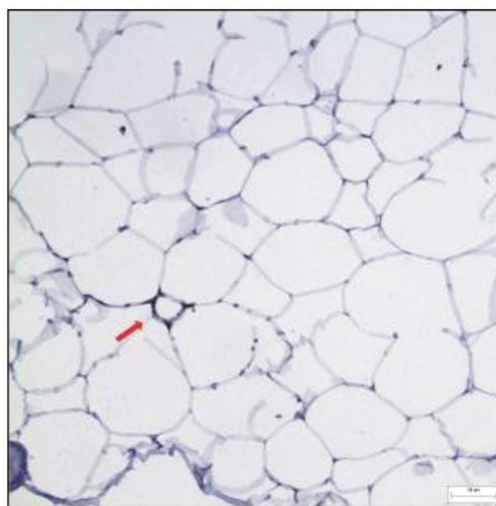
B



C

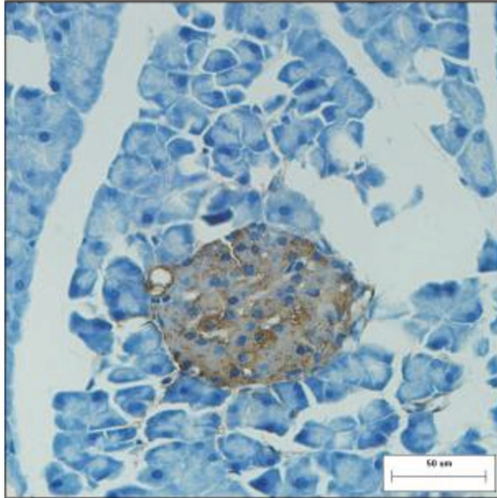


D

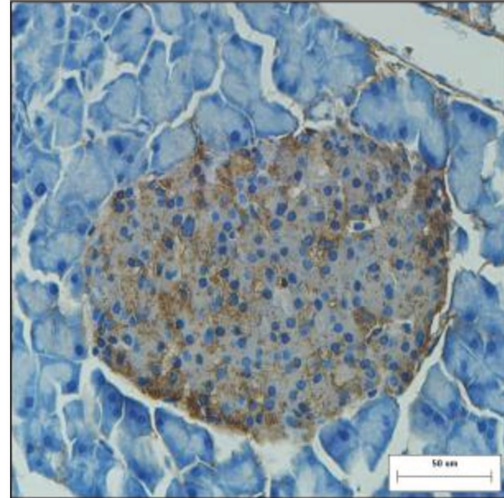


Supplementar figure 2

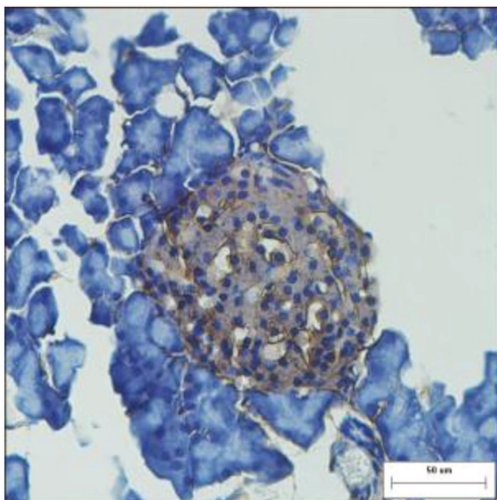
A



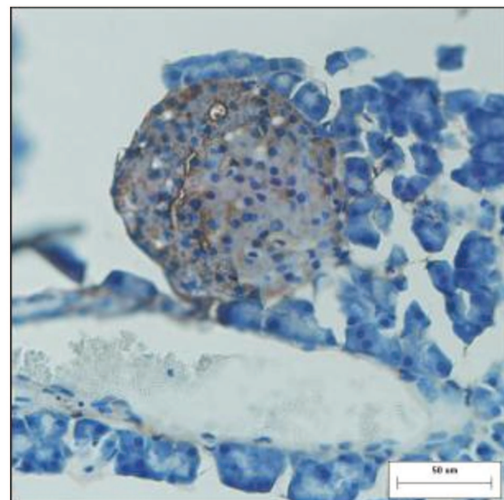
B



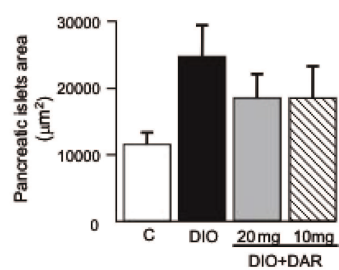
C



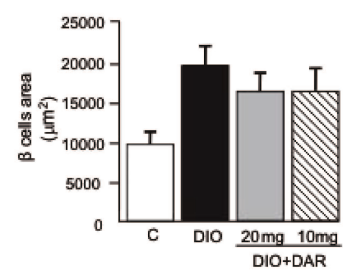
D



E



F



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

É de comum acordo que a inflamação representa fator chave na obesidade e DM2 (Hotamisligil 2006; Shoelson, Lee et al. 2006). Neste trabalho, procuramos demonstrar, pioneiramente, que a administração do anti-inflamatório Diacereína por 10 dias em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica promoveu uma melhora notável na tolerância à glicose, diminuição na infiltração macrocitária em adipócitos, redução da expressão e atividade de mediadores inflamatórios acompanhada pela melhora na sinalização da insulina no fígado, músculo e tecido adiposo nesses animais. Face ao exposto, os resultados indicam que o tratamento com Diacereína melhora a sensibilidade à insulina na obesidade através da reversão do processo inflamatório subclínico e representa uma alternativa terapêutica para a resistência ao hormônio.

Nossa hipótese inicial quanto à melhora geral observada em parâmetros metabólicos e moleculares após a administração de Diacereína baseia-se na supressão de mediadores pró-inflamatórios, importantes indutores de resistência à insulina, tais como citocinas e proteínas serina quinases. Neste contexto, é bem estabelecido que a obesidade induz um complexo de sinalização que ativa IKK β e JNK (Shoelson, Lee et al. 2006) e, interessante, que intervenções que inibem sua expressão ou ativação melhoram de modo significativo a sensibilidade insulínica periférica (Yuan, Konstantopoulos et al. 2001; Hundal, Petersen et al. 2002). Corroborando tais estudos, nossos dados demonstram que reduções na ativação de IKK β e JNK em animais obesos tratados com Diacereína aumentam os níveis de fosforização de importantes proteínas integrantes da via de sinalização da insulina (IR, IRS-1 e Akt), melhorando a resistência ao hormônio sistemicamente. Isto confirma a hipótese de muitos autores de que tais serina quinases são

possivelmente moduladoras chave no elo entre vias inflamatórias e metabólicas (Shoelson, Lee et al. 2006; Tanti and Jager 2009).

Como descrito anteriormente, a intersecção de estímulos que ativam IKK β e JNK e condições que promovem resistência insulínica incluem também citocinas pró-inflamatórias. (Yuan, Konstantopoulos et al. 2001; Shoelson, Lee et al. 2006). A ativação de IKK β inicia a transcrição gênica mediada por NF κ B, através da fosforilação e degradação de I κ B α , que em certas células promove um aumento da síntese de TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Estas, por sua vez, ativam as vias JNK e IKK β por meio de uma sustentada retroalimentação positiva (Yuan, Konstantopoulos et al 2001;. Shoelson, Lee et al 2006), levando a um ciclo vicioso de sinais inflamatórios subclínicos, o que intensifica o estabelecimento da resistência à insulina. Nossos achados revelam que a inibição de IKK β interrompe a perpetuação deste ciclo. O tratamento com Diacereína foi capaz não apenas de reduzir a fosforilação de IKK β , mas também a de I κ B α e impedir a translocação da subunidade p65 do NF κ B para o núcleo celular, o que confirma a inativação do eixo IKK/NF κ B como um alvo alternativo para o tratamento da resistência à insulina (Shoelson, Lee et al 2003;. Arkan, Hevener et al 2005;. Shoelson, Herrero et al 2007). Tendo em vista o impedimento da translocação nuclear de NF κ B, pode-se explicar, ao menos em parte, os baixos níveis de expressão de TNF- α , IL-6 e IL-1 β detectados de modo geral no fígado, músculo e tecido adiposo dos animais tratados com Diacereína e, conseqüentemente, a melhora no padrão inflamatório como um todo.

Aspirina e salicilatos, cujos efeitos benéficos no tratamento de pacientes diabéticos tem sido conhecidos há décadas (Shoelson, Lee et al 2006;. Tanti e Jager 2009), não são apenas bloqueadores da ciclooxigenase, mas atuam também como inibidores de IKK β , melhorando a sensibilidade à insulina em camundongos obesos (Karin, Yamamoto et al

2004; Shoelson, Herrero et al 2007). No entanto, a utilidade terapêutica da aspirina em altas doses é limitada pelos efeitos antitrombóticos e inibidores da agregação plaquetária combinados à ocorrência de distúrbios gastrointestinais e alto risco de hemorragias (Shoelson, Lee et al. 2006). Neste contexto, a Diacereína apresenta uma relação risco / benefício melhor do que a da aspirina, uma vez que apresenta maior tolerância gástrica e raros efeitos colaterais (Fidelix, Soares et al. 2006).

Além do bloqueio da via $IKK\beta$, a Diacereína também inibiu a fosforilação da JNK bem como a de seu substrato c-Jun. Em um quadro de obesidade, a atividade de JNK encontra-se aumentada no fígado, músculo e tecido adiposo (Hotamisligil 2006). Muitos inibidores desta proteína ou a deficiência da isoforma JNK1 têm demonstrado prevenir o desenvolvimento de resistência insulínica, DM2 e doença hepática gordurosa, além de apresentarem efeitos benéficos na sensibilidade à insulina em modelos genéticos e alimentares de obesidade. (Tilg Hotamisligil e 2006; Tanti Jager e 2009). A redução na fosforilação de JNK verificada neste trabalho concorda com estudos anteriores nos quais a inibição de sua atividade no fígado melhora a sensibilidade à insulina e a esteatose neste tecido (Tanti e Jager 2009). Embora tenha sido descrito que a ativação de JNK em músculo não contribui para a promoção da resistência insulínica (Witczak, Hirshman et al. 2006), observaram-se níveis significativamente mais baixos de fosforilação da proteína em músculo gastrocnêmio de animais dos grupos DAR10 e DAR20, o que acreditamos possa ter contribuído para a melhora sistêmica da sensibilidade ao hormônio. Considerando a redução da expressão total de JNK nos camundongos tratados, não podemos excluir a possibilidade de a Diacereína exercer ainda um efeito direto sobre os processos de transcrição ou degradação de JNK.

Modestas perdas de peso, alcançadas através de dieta e exercícios físicos, pode aumentar a sensibilidade à insulina e até mesmo reverter a resistência ao hormônio (Vazquez e Kazi 1994;. Turner, Bruce et al 2007; Toledo, Menshikova et al 2008). Muitos inibidores de JNK com maior potência e seletividade têm sido divulgados (Zhao, Serby et al 2006;. Cho, Black et al 2008), tendo um deles demonstrado efeitos benéficos quanto ao ganho de massa corporal (Cho, Black et al 2008). Entretanto, o tratamento de 10 dias com Diacereína em camundongos não provocou qualquer alteração no peso total, gordura epididimal nem na quantidade de alimento ingerido, o que poderia explicar a melhora da sensibilidade à insulina. Considerando a diferença na ingestão de calorias entre todos os grupos, podemos supor que animais tratados com Diacereína podem não ter a mesma regulação de gasto energético que os demais, embora este ponto mereça uma investigação mais aprofundada.

Na obesidade, a análise de macrófagos isolados de tecido adiposo demonstra que são responsáveis por quase toda a expressão tecidual de TNF- α e quantidades significativas de IL-6, IL-1 β e iNOS (Weisberg, McCann et al. 2003). Além disso, a quantidade de macrófagos neste tecido está elevada na obesidade e tais células participam intensamente de vias inflamatórias superativadas em indivíduos obesos (Gao, Zuberi et al. 2003). Reciprocamente, a redução da infiltração macrocitária tem demonstrado diminuir a inflamação local no tecido adiposo (Furuhashi, Tuncman et al. 2007). De acordo com esses dados, nossos resultados evidenciam que em camundongos DIO tratados com Diacereína, além da redução na infiltração de macrófagos e diminuição do tamanho dos adipócitos, houve menor expressão de TNF- α , IL- 6, IL-1 β e iNOS, indicando que a droga diminui a inflamação local no tecido adiposo de animais obesos.

O acúmulo de lipídios no fígado é característico da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica (Tilg Hotamisligil e 2006). A doença hepática gordurosa não-alcoólica (*Nonalcoholic fatty liver disease* – NAFLD) muitas vezes acompanha adiposidade abdominal e seu espectro patológico pode evoluir de uma simples esteatose para esteato-hepatite, fibrose avançada e cirrose (Shoelson, Lee et al. 2006). A inflamação tem sido claramente reconhecida por desempenhar um papel fundamental na progressão desta doença. Além disso, estudos de disrupção gênica em camundongos provaram que a interferência na sinalização da insulina em hepatócitos ativa as enzimas envolvidas na síntese de gordura nessas células levando ao desenvolvimento da esteatose. (Tilg Hotamisligil e 2006). Enquanto nos cortes histológicos de fígado de camundongos DIO detectou-se um grande número de vesículas de gordura amplamente distribuídas pelo parênquima, os animais tratados com Diacereína apresentaram parênquima muito semelhante ao dos controles, sem qualquer evidência de esteatose. Tendo em vista a inibição de vias inflamatórias e expressão de citocinas concomitante à restauração da sinalização da insulina no fígado de animais tratados, nossos resultados corroboram com o que se tem descoberto até o momento sobre alterações morfológicas hepáticas induzidas pela obesidade.

Citocinas pró-inflamatórias promovem o aumento da produção de NO por induzirem a expressão de iNOS no músculo esquelético de ratos e em culturas de adipócitos e miócitos. (Carvalho-Filho, Ueno et al. 2005). Portanto, pode-se especular que a redução significativa da expressão de iNOS no fígado, músculo e tecido adiposo dos grupos tratados com Diacereína se justifica pela redução da expressão de citocinas nos tecidos desses animais. Ademais, sabe-se que a indução da iNOS e NO pode estar envolvida na patogênese do DM2 ligado à obesidade e que ambas moléculas estão relacionadas ao

impacto da via da insulina através da S-nitrosação de proteínas de sua cascata de sinalização (Carvalho-Filho, Ueno et al. 2005). Por esta razão, a melhora na sensibilidade à insulina também pode estar associada à redução da expressão de iNOS verificada nos tecidos dos animais tratados. Esta conclusão apoia-se em dados da literatura, os quais afirmam que disrupções gênicas da iNOS possuem efeito protetor contra a resistência insulínica induzida pela obesidade (Perreault e Marette 2001).

Como já se sabe, a resistência à insulina e obesidade demandam um aumento de insulina circulante e, conseqüentemente, várias adaptações das células β , incluindo síntese e secreção aumentadas do hormônio, hiperplasia e hipertrofia (39). Portanto, baseado na melhora sistêmica da sensibilidade insulínica e do padrão inflamatório e ainda em concordância com o trabalho de Malaguti e colaboradores (2008), é possível justificar as alterações morfológicas favoráveis relacionadas à área total das ilhotas pancreáticas e das células β notadas nos grupos tratados (Suppl. 2).

Em resumo, nossos dados comprovam que IKK β e JNK são moduladores-chave no *cross-talk* de vias inflamatórias e metabólicas. São poucas e dispendiosas as ferramentas disponíveis atualmente para tratar pacientes com resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 e, por essa razão, sugerimos que serina quinases representam um alvo valioso para a descoberta de novas drogas terapêuticas. Neste contexto, consideramos a Diacereína como uma alternativa atraente e mais acessível para o tratamento da resistência à insulina e DM2 em humanos.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A administração do composto Diacereína em camundongos obesos melhorou expressivamente a sinalização intracelular da insulina no fígado, músculo e tecido adiposo desses animais. A melhora decorre, sobretudo, do aumento da fosforilação de proteínas da via insulínica e diminuição da fosforilação de proteínas da via inflamatória (JNK e IKK β).

A inibição dos moduladores negativos da cascata de sinalização da insulina permitiu a significativa redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias no fígado, músculo e tecido adiposo além de impedir o acúmulo de macrófagos sobre adipócitos e reverter o quadro de esteatose hepática.

A recuperação da ação insulínica nos tecidos dos animais obesos tratados refletiu-se na melhora de parâmetros metabólicos associados à resistência à insulina como o aumento da tolerância à glicose e diminuição dos níveis séricos basais de insulina e glicemia de jejum.

CONCLUSÃO GERAL

Tendo em vista os resultados expostos, concluímos que a Diacereína revela-se como uma alternativa terapêutica em potencial para reverter ou ao menos melhorar o quadro clínico de DM2 e resistência à insulina associados à obesidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, V., E. D. Werner, et al. (2002). "Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action." J Biol Chem **277**(2): 1531-1537.
- Ahima, R. S. and J. S. Flier (2000). "Adipose tissue as an endocrine organ." Trends Endocrinol Metab **11**(8): 327-332.
- ANVISA, A. N. d. V. S.-. (2008). "ARTRODAR (diacereína)."
- Arkan, M. C., A. L. Hevener, et al. (2005). "IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance." Nat Med **11**(2): 191-198.
- Baron, S. H. (1982). "Salicylates as hypoglycemic agents." Diabetes Care **5**(1): 64-71.
- Barzilay, J. I., L. Abraham, et al. (2001). "The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study." Diabetes **50**(10): 2384-2389.
- Bastard, J. P., C. Jardel, et al. (2000). "Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss." J Clin Endocrinol Metab **85**(9): 3338-3342.
- Beg, A. A., T. S. Finco, et al. (1993). "Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation." Mol Cell Biol **13**(6): 3301-3310.
- Boittin, M., F. Redini, et al. (1993). "[Effect of diacerhein (ART 50) on the matrix synthesis and collagenase secretion by cultured joint chondrocytes in rabbits]." Rev Rhum Ed Fr **60**(6 Pt 2): 68S-76S.
- Brandt, K. D., G. Smith, et al. (1997). "Effects of diacerhein in an accelerated canine model of osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **5**(6): 438-449.
- Campos, S. P. and H. Baumann (1992). "Insulin is a prominent modulator of the cytokine-stimulated expression of acute-phase plasma protein genes." Mol Cell Biol **12**(4): 1789-1797.
- Carvalho-Filho, M. A., M. Ueno, et al. (2005). "S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance." Diabetes **54**(4): 959-967.
- Chan, J. M., E. B. Rimm, et al. (1994). "Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men." Diabetes Care **17**(9): 961-969.
- Chandra, R. K. (1996). "Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14304-14307.
- Chandra, R. K. (1997). "Nutrition and the immune system: an introduction." Am J Clin Nutr **66**(2): 460S-463S.
- Cho, H., S. C. Black, et al. (2008). "Pharmacological characterization of a small molecule inhibitor of c-Jun kinase." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(5): E1142-1151.
- Colditz, G. A., W. C. Willett, et al. (1995). "Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women." Ann Intern Med **122**(7): 481-486.
- Crook, M. A., P. Tutt, et al. (1993). "Serum sialic acid and acute phase proteins in type 1 and type 2 diabetes mellitus." Clin Chim Acta **219**(1-2): 131-138.

- De Feo, P., E. Volpi, et al. (1993). "Physiological increments in plasma insulin concentrations have selective and different effects on synthesis of hepatic proteins in normal humans." Diabetes **42**(7): 995-1002.
- De Souza, C. T., E. P. Araujo, et al. (2007). "Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action." FASEB J **21**(4): 1153-1163.
- Del Rosso, M., G. Fibbi, et al. (1990). "Modulation of urokinase receptors on human synovial cells and osteoarthritic chondrocytes by diacetylrhein." Int J Tissue React **12**(2): 91-100.
- Ebeling, P., A. M. Teppo, et al. (1999). "Troglitazone reduces hyperglycaemia and selectively acute-phase serum proteins in patients with Type II diabetes." Diabetologia **42**(12): 1433-1438.
- Federation, I. D. (2009). IDF Diabetes Atlas 4th ed. .
- Feingold, K. R., I. Hardardottir, et al. (1998). "Beneficial effects of cytokine induced hyperlipidemia." Z Ernahrungswiss **37 Suppl 1**: 66-74.
- Festa, A., R. D'Agostino, Jr., et al. (2000). "Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS)." Circulation **102**(1): 42-47.
- Festa, A., R. D'Agostino, Jr., et al. (2002). "Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study." Diabetes **51**(4): 1131-1137.
- Feve, B. and J. P. Bastard (2009). "The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus." Nat Rev Endocrinol **5**(6): 305-311.
- Fidelix, T. S., B. G. Soares, et al. (2006). "Diacerein for osteoarthritis." Cochrane Database Syst Rev(1): CD005117.
- Franchi-Micheli, S., L. Lavacchi, et al. (1983). "The influence of rhein on the biosynthesis of prostaglandin-like substances in-vitro." J Pharm Pharmacol **35**(4): 262-264.
- Freeman, D. J., J. Norrie, et al. (2001). "Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study." Circulation **103**(3): 357-362.
- Fried, S. K., D. A. Bunkin, et al. (1998). "Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid." J Clin Endocrinol Metab **83**(3): 847-850.
- Frode-Saleh, T. S. and J. B. Calixto (2000). "Synergistic antiinflammatory effect of NF-kappaB inhibitors and steroidal or non steroidal antiinflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice." Inflamm Res **49**(7): 330-337.
- Frohlich, M., A. Imhof, et al. (2000). "Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study." Diabetes Care **23**(12): 1835-1839.
- Furuhashi, M., G. Tuncman, et al. (2007). "Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2." Nature **447**(7147): 959-965.
- Gabay, C. and I. Kushner (1999). "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation." N Engl J Med **340**(6): 448-454.
- Gao, Z., A. Zuberi, et al. (2003). "Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases." J Biol Chem **278**(27): 24944-24950.

- Gauldie, J., C. Richards, et al. (1987). "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7251-7255.
- Grimble, R. F. (2001). "Stress proteins in disease: metabolism on a knife edge." Clin Nutr **20**(6): 469-476.
- Grimble, R. F. (2002). "Inflammatory status and insulin resistance." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **5**(5): 551-559.
- Gutierrez, D. A., M. J. Puglisi, et al. (2009). "Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia." Curr Diab Rep **9**(1): 26-32.
- Handschin, C., S. Chin, et al. (2007). "Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals." J Biol Chem **282**(41): 30014-30021.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." Nature **420**(6913): 333-336.
- Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." Nature **444**(7121): 860-867.
- Hotamisligil, G. S., P. Arner, et al. (1995). "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." J Clin Invest **95**(5): 2409-2415.
- Hotamisligil, G. S., D. L. Murray, et al. (1994). "Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4854-4858.
- Hotamisligil, G. S., P. Peraldi, et al. (1996). "IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance." Science **271**(5249): 665-668.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.
- Hotamisligil, G. S. and B. M. Spiegelman (1994). "Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link." Diabetes **43**(11): 1271-1278.
- Hundal, R. S., K. F. Petersen, et al. (2002). "Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes." J Clin Invest **109**(10): 1321-1326.
- Kaneto, H., Y. Nakatani, et al. (2004). "Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide." Nat Med **10**(10): 1128-1132.
- Karin, M., Y. Yamamoto, et al. (2004). "The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development." Nat Rev Drug Discov **3**(1): 17-26.
- Kopelman, P. G. (2000). "Obesity as a medical problem." Nature **404**(6778): 635-643.
- Kopp, E. and S. Ghosh (1994). "Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin." Science **265**(5174): 956-959.
- Kushner, I. (1993). "Regulation of the acute phase response by cytokines." Perspect Biol Med **36**(4): 611-622.
- La Villa, G., F. Marra, et al. (1989). "Effects of rhein on renal arachidonic acid metabolism and renal function in patients with congestive heart failure." Eur J Clin Pharmacol **37**(1): 1-5.
- Leinonen, E., E. Hurt-Camejo, et al. (2003). "Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes." Atherosclerosis **166**(2): 387-394.

- Lindsay, R. S., J. Krakoff, et al. (2001). "Gamma globulin levels predict type 2 diabetes in the Pima Indian population." Diabetes **50**(7): 1598-1603.
- Malaguti, C., C. A. Vilella, et al. (2008). "Diacerhein downregulate proinflammatory cytokines expression and decrease the autoimmune diabetes frequency in nonobese diabetic (NOD) mice." Int Immunopharmacol **8**(6): 782-791.
- Martel-Pelletier, J., F. Mineau, et al. (1998). "In vitro effects of diacerhein and rhein on interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes." J Rheumatol **25**(4): 753-762.
- McFarlane, S. I., R. Muniyappa, et al. (2002). "Clinical review 145: Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond." J Clin Endocrinol Metab **87**(4): 1451-1458.
- Mian, M., S. Brunelleschi, et al. (1987). "Rhein: an anthraquinone that modulates superoxide anion production from human neutrophils." J Pharm Pharmacol **39**(10): 845-847.
- Mohamed-Ali, V., S. Goodrick, et al. (1997). "Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo." J Clin Endocrinol Metab **82**(12): 4196-4200.
- Moller, D. E. (2000). "Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes." Trends Endocrinol Metab **11**(6): 212-217.
- Moore, A. R., K. J. Greenslade, et al. (1998). "Effects of diacerhein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse." Osteoarthritis Cartilage **6**(1): 19-23.
- Muller, S., S. Martin, et al. (2002). "Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors." Diabetologia **45**(6): 805-812.
- Munford, R. S. (2001). "Statins and the acute-phase response." N Engl J Med **344**(26): 2016-2018.
- Murphy, G. J. and J. C. Holder (2000). "PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer." Trends Pharmacol Sci **21**(12): 469-474.
- Nicolas, P., M. Tod, et al. (1998). "Clinical pharmacokinetics of diacerein." Clin Pharmacokinet **35**(5): 347-359.
- Nonogaki, K., G. M. Fuller, et al. (1995). "Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats." Endocrinology **136**(5): 2143-2149.
- Palombella, V. J., E. M. Conner, et al. (1998). "Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15671-15676.
- Paz, K., R. Hemi, et al. (1997). "A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **272**(47): 29911-29918.
- Pelletier, J. P., D. Jovanovic, et al. (1998). "Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase." Arthritis Rheum **41**(7): 1275-1286.
- Pelletier, J. P., D. Lajeunesse, et al. (2001). "Diacerein reduces the excess synthesis of bone remodeling factors by human osteoblast cells from osteoarthritic subchondral bone." J Rheumatol **28**(4): 814-824.
- Pelletier, J. P., F. Mineau, et al. (1998). "Diacerhein and rhein reduce the interleukin 1beta stimulated inducible nitric oxide synthesis level and activity while stimulating

- cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes." J Rheumatol **25**(12): 2417-2424.
- Pelletier, J. P., M. Yaron, et al. (2000). "Efficacy and safety of diacerein in osteoarthritis of the knee: a double-blind, placebo-controlled trial. The Diacerein Study Group." Arthritis Rheum **43**(10): 2339-2348.
- Perreault, M. and A. Marette (2001). "Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle." Nat Med **7**(10): 1138-1143.
- Pickup, J. C. (2004). "Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes." Diabetes Care **27**(3): 813-823.
- Pickup, J. C. and M. A. Crook (1998). "Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?" Diabetologia **41**(10): 1241-1248.
- Pickup, J. C., C. Day, et al. (1995). "Plasma sialic acid in animal models of diabetes mellitus: evidence for modulation of sialic acid concentrations by insulin deficiency." Life Sci **57**(14): 1383-1391.
- Pickup, J. C., M. B. Mattock, et al. (1997). "NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X." Diabetologia **40**(11): 1286-1292.
- Pinhas-Hamiel, O., L. M. Dolan, et al. (1996). "Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents." J Pediatr **128**(5 Pt 1): 608-615.
- Pomarelli, P., M. Berti, et al. (1980). "A non steroidal anti-inflammatory drug that stimulates prostaglandin release." Farmaco [Sci] **35**(10): 836-842.
- Prada, P. O., E. R. Ropelle, et al. (2009). "EGFR tyrosine kinase inhibitor (PD153035) improves glucose tolerance and insulin action in high-fat diet-fed mice." Diabetes **58**(12): 2910-2919.
- Pradhan, A. D., J. E. Manson, et al. (2001). "C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus." JAMA **286**(3): 327-334.
- Ricci, R., G. Sumara, et al. (2004). "Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis." Science **306**(5701): 1558-1561.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.
- Schmidt, M. I., B. B. Duncan, et al. (1999). "Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study." Lancet **353**(9165): 1649-1652.
- Senn, J. J., P. J. Klover, et al. (2002). "Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes." Diabetes **51**(12): 3391-3399.
- Sesti, G., M. Federici, et al. (2001). "Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders." FASEB J **15**(12): 2099-2111.
- Sethi, J. K. and G. S. Hotamisligil (1999). "The role of TNF alpha in adipocyte metabolism." Semin Cell Dev Biol **10**(1): 19-29.
- Shi, H., M. V. Kokoeva, et al. (2006). "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance." J Clin Invest **116**(11): 3015-3025.
- Shoelson, S. E., L. Herrero, et al. (2007). "Obesity, inflammation, and insulin resistance." Gastroenterology **132**(6): 2169-2180.
- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2006). "Inflammation and insulin resistance." J Clin Invest **116**(7): 1793-1801.

- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2003). "Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance." Int J Obes Relat Metab Disord **27 Suppl 3**: S49-52.
- Siebenlist, U., G. Franzoso, et al. (1994). "Structure, regulation and function of NF-kappa B." Annu Rev Cell Biol **10**: 405-455.
- Smith, G. N., Jr., S. L. Myers, et al. (1999). "Diacerein treatment reduces the severity of osteoarthritis in the canine cruciate-deficiency model of osteoarthritis." Arthritis Rheum **42**(3): 545-554.
- Song, M. J., K. H. Kim, et al. (2006). "Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes." Biochem Biophys Res Commun **346**(3): 739-745.
- Spencer, C. M. and M. I. Wilde (1997). "Diacerein." Drugs **53**(1): 98-106; discussion 107-108.
- Spranger, J., A. Kroke, et al. (2003). "Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study." Diabetes **52**(3): 812-817.
- Tamura, T. and K. Ohmori (2001). "Diacerein suppresses the increase in plasma nitric oxide in rat adjuvant-induced arthritis." Eur J Pharmacol **419**(2-3): 269-274.
- Tanti, J. F. and J. Jager (2009). "Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation." Curr Opin Pharmacol **9**(6): 753-762.
- Temelkova-Kurktschiev, T., E. Henkel, et al. (2002). "Subclinical inflammation in newly detected Type II diabetes and impaired glucose tolerance." Diabetologia **45**(1): 151.
- Thirone, A. C., J. B. Carvalheira, et al. (2004). "Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance." Endocrinology **145**(1): 281-293.
- Thompson, D., S. P. Harrison, et al. (1991). "Insulin modulation of acute-phase protein production in a human hepatoma cell line." Cytokine **3**(6): 619-626.
- Tilg, H. and G. S. Hotamisligil (2006). "Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance." Gastroenterology **131**(3): 934-945.
- Toledo, F. G., E. V. Menshikova, et al. (2008). "Mitochondrial capacity in skeletal muscle is not stimulated by weight loss despite increases in insulin action and decreases in intramyocellular lipid content." Diabetes **57**(4): 987-994.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Tsukumo, D. M., M. A. Carvalho-Filho, et al. (2007). "Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance." Diabetes **56**(8): 1986-1998.
- Turner, N., C. R. Bruce, et al. (2007). "Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents." Diabetes **56**(8): 2085-2092.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, et al. (1998). "Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity." Endocrinology **139**(12): 4832-4838.

- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, et al. (1997). "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function." Nature **389**(6651): 610-614.
- van de Ree, M. A., M. V. Huisman, et al. (2003). "Strong decrease of high sensitivity C-reactive protein with high-dose atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus." Atherosclerosis **166**(1): 129-135.
- Vazquez, J. A. and U. Kazi (1994). "Lipolysis and gluconeogenesis from glycerol during weight reduction with very-low-calorie diets." Metabolism **43**(10): 1293-1299.
- Ventre, J., T. Doebber, et al. (1997). "Targeted disruption of the tumor necrosis factor- α gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice." Diabetes **46**(9): 1526-1531.
- Visser, M., L. M. Bouter, et al. (1999). "Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults." JAMA **282**(22): 2131-2135.
- Weisberg, S. P., D. McCann, et al. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." J Clin Invest **112**(12): 1796-1808.
- Weitz-Schmidt, G. (2002). "Statins as anti-inflammatory agents." Trends Pharmacol Sci **23**(10): 482-486.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2005). "Inflammation, stress, and diabetes." J Clin Invest **115**(5): 1111-1119.
- Wing, R. R., M. G. Goldstein, et al. (2001). "Behavioral science research in diabetes: lifestyle changes related to obesity, eating behavior, and physical activity." Diabetes Care **24**(1): 117-123.
- Witczak, C. A., M. F. Hirshman, et al. (2006). "JNK1 deficiency does not enhance muscle glucose metabolism in lean mice." Biochem Biophys Res Commun **350**(4): 1063-1068.
- Xu, H., G. T. Barnes, et al. (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." J Clin Invest **112**(12): 1821-1830.
- Yin, M. J., Y. Yamamoto, et al. (1998). "The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(κ)B kinase- β ." Nature **396**(6706): 77-80.
- Yoshida, S., T. Kato, et al. (1999). "Inhibition of IL-6 and IL-8 induction from cultured rheumatoid synovial fibroblasts by treatment with aurothioglucose." Int Immunol **11**(2): 151-158.
- Yuan, M., N. Konstantopoulos, et al. (2001). "Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I κ kbeta." Science **293**(5535): 1673-1677.
- Yudkin, J. S., C. D. Stehouwer, et al. (1999). "C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(4): 972-978.
- Zhang, H. H., M. Halbleib, et al. (2002). "Tumor necrosis factor- α stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP." Diabetes **51**(10): 2929-2935.
- Zhao, H., M. D. Serby, et al. (2006). "Discovery of potent, highly selective, and orally bioavailable pyridine carboxamide c-Jun NH₂-terminal kinase inhibitors." J Med Chem **49**(15): 4455-4458.

APÊNDICE I

APÊNDICE I

TABELA 1. Quantificação e valores nutricionais das substâncias componentes da dieta hiperlipídica consumida pelo grupo DIO

Ingredientes	Ração convencional (g/Kg)	Kcal/Kg	Dieta hiperlipídica (g/Kg)	Kcal/Kg
Amido de milho (Q.S.P)	397,5	1590	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Amido dextrinado	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	312	2808
Óleo de Soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mistura/minerais	35	-	35	-
Mistura/vitaminas	10	-	10	-
L-cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948	1000	5358