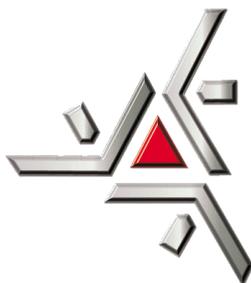


FABIANA DE OLIVEIRA YAMASHITA

**RESPONSIVIDADE HEPÁTICA A
SUBSTRATOS GLICONEOGÊNICOS
DURANTE HIPOGLICEMIA INDUZIDA POR
INSULINA (HII) EM RATOS RECEM
DESMAMADOS**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto B. Bazotte

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosangela F.

Garcia

MARINGÁ

2007

FABIANA DE OLIVEIRA YAMASHITA

RESPONSIVIDADE HEPÁTICA A SUBSTRATOS GLICONEOGÊNICOS DURANTE
HIPOGLICEMIA INDUZIDA POR INSULINA (HII) EM RATOS RECÉM
DESMAMADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto B. Bazotte

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosângela F. Garcia

MARINGÁ
2007

Dedico este trabalho

A Deus por estar sob suas bênçãos e sua proteção.

Ao meu marido Rodrigo por todo amor, dedicação e incentivo constante.

Ao meu filho um abençoado presente de Deus.

Agradecimento especial

Ao professor Roberto Barbosa Bazotte, meus sinceros agradecimentos, pelos ensinamentos, por acreditar em mim e possibilitar o desenvolvimento deste trabalho e pela admirável maneira que orienta os seus alunos.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por ter proporcionado as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Aos meus pais por sempre estarem ao meu lado me apoiando e ajudando nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos por serem pessoas tão especiais e importantes em minha vida.

À minha irmã que mesmo longe sempre procurou uma maneira de me ajudar, sendo muitas vezes com palavras carinhosas.

Às Professoras Dr. Vilma A. F. Gazola e Dr. Rosângela F. Garcia por me ensinarem os caminhos da perfusão.

Aos meus amigos Solidalva e Carlos pelo carinho e amizade.

À Francisca Helena M. de Carvalho e Sônia L. Batista da Silva, secretárias da Pós-Graduação, pela eficiência na execução de seus trabalhos, pelo carinho e amizade demonstrada e por todas as suas contribuições.

A todos os meus amigos do Laboratório de Farmacologia Endócrina e Fisiologia pelo carinho, amizade e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos da Faculdades Luiz Meneghel pelo carinho e apoio.

RESUMO

Estudos de nosso laboratório demonstraram uma aumentada responsividade hepática à substratos gliconeogênicos durante a hipoglicemia induzida por insulina (HI) em ratos adultos. No presente trabalho expandiu-se estes estudos para ratos desmamados. Para alcançar este propósito, comparou-se ratos machos Wistar recém desmamado, com 12 horas de privação alimentar que receberam insulina (Grupo HI) ou salina (Grupo Controle). A glicemia foi avaliada 30 minutos após a injeção de insulina ou salina em todos os animais. Além disso, realizou-se experimentos de perfusão de fígado “in situ” empregando concentrações saturantes de L-alanina (5 mM), L-glutamina (10 mM), L-lactato (2 mM) e glicerol (2 mM) ou a infusão combinada destas substâncias objetivando avaliar a produção de glicose. Em parte dos experimentos determinou-se a produção hepática de L-lactato e piruvato. Demonstrou-se que a HI aumenta a capacidade hepática de produção de glicose a partir de glutamina. Porém, o mesmo efeito não ocorre para a L-alanina, glicerol e L-lactato. Assim, verificou-se em ratos desmamados que a maior responsividade hepática à L-glutamina, mas não ao L-lactato e L-alanina podem ser atribuídas a uma imaturidade dos sistemas enzimáticos da gliconeogênese, particularmente em relação à enzima piruvato carboxiquinase. Desta forma, podemos concluir que a L-glutamina poderia ser um importante substrato gliconeogênico na promoção da recuperação da glicemia em ratos desmamados hipoglicêmicos.

Palavras-chave: Hipoglicemia, Gliconeogênese, Desmame, Insulina, L-glutamina.

ABSTRACT

Previous studies from our laboratory have demonstrated an increased hepatic responsiveness to gluconeogenic substrates during insulin induced hypoglycemia (IIH) in adult rats. In this work, we expanded these studies to weaned rats. For this purpose, 12 h food deprived male Wistar rats which received insulin (IIH group) or saline (Control group) were compared. Glycemia was measured 30 min after insulin or saline injection in all animals. Moreover, liver perfusion experiments with saturating concentrations of L-alanine (5 mM), L-glutamine (10 mM), L-lactate (2 mM) and glycerol (2 mM) or combined infusion of these glucose precursors were done to measure hepatic glucose production. In part of the experiments hepatic production of L-lactate and pyruvate were determined. The results demonstrated that IIH increased the hepatic capacity to produce glucose from L-glutamine. The study also shown that the same effect did not occur to L-alanine, glycerol and L-lactate. Thus, we can conclude that the greater hepatic responsiveness to L-glutamine, but not to L-lactate and L-alanine could be attributed to an immaturity of enzymatic systems of hepatic gluconeogenesis in weaned rats, particularly with respect to pyruvate carboxykinase enzyme. Therefore, we can conclude that L-glutamine could be an important gluconeogenic substrate to promote glucose recovery in weaned rats hypoglycemic.

Keywords: Hypoglycemia, Gluconeogenesis, Insulin, weaned rats, L-glutamine.

LISTA DE ABREVIATURAS

AUC - Área sob a curva

AUC_c - Área sob a curva do grupo controle

AUC_{HII} - Área sob a curva do grupo HII

DCCT - Diabetes Control and Complications Trial

DM – Diabetes mellitus

DP – Desvio padrão

GOD - Glicose-oxidase

HII - Hipoglicemia induzida por insulina

ip - Intraperitoneal

KH - Krebs/Henseleit-bicarbonato

LDH - Lactato-desidrogenase

Min - Minuto

PC – Piruvato carboxilase

PEPCK – Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

POD - Peroxidase

4-AF - 4-aminofenazona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Fisiologia e Fisiopatologia da resposta contrarregulatória	11
1.2	Recuperação da HII	13
2	OBJETIVO	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	Animais e tratamento	16
3.2	Drogas e reagentes	17
3.3	Indução da hipoglicemia induzida por insulina (HII)	17
3.4	Coleta de sangue	17
3.5	Sistema de perfusão do fígado “<i>in situ</i>”	18
3.5.1	O líquido de perfusão	19
3.5.2	A perfusão do fígado “<i>in situ</i>”	20
3.6	Determinações Bioquímicas	22
3.6.1	Dosagem de glicose no perfusado e no soro	22
3.6.2	Dosagem de L-lactato no perfusado	22
3.6.3	Dosagem de piruvato no perfusado	23
3.6.4	Dosagem de L-glutamina no soro	23
3.6.5	Dosagem de Insulina no soro	24
3.7	Procedimento estatístico	24
4	RESULTADOS	26
4.1	Concentração sérica de glicose, insulina e L-glutamina	26

4.2	Capacidade neoglicogênica hepática a partir de L-alanina, L-lactato, L-glutamina, glicerol ou da combinação destes precursores.....	26
4.2.1	Produção de glicose, L-lactato e piruvato a partir de L-alanina (5 mM).....	26
4.2.2	Produção de glicose e piruvato a partir de L-lactato (2 mM).....	27
4.2.3	Produção de glicose a partir de L-glutamina (10 mM).....	27
4.2.4	Produção de glicose a partir de glicerol (2 mM).....	27
4.2.5	Produção de glicose e piruvato a partir de precursores combinados.....	27
5	DISCUSSÃO.....	37
6	REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) tipo 1 é predominante em crianças e adolescentes com o pico de surgimento entre 10 e 14 anos (GOMES, 2003). Esta forma da doença resulta da destruição das células β pancreáticas, mediada por resposta auto-imune, e geralmente leva à deficiência absoluta de insulina (ATKINSON; MACLAREN, 1994; GOMES, 2003). A hiperglicemia, o principal efeito do déficit absoluto de insulina, é o fator preponderante do desencadeamento das complicações crônicas como a nefropatia, retinopatia e neuropatia (KOWLURU et al., 2004; KASTENBAUER et al., 2004).

A prevenção das complicações crônicas é extremamente importante para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com diabetes (GERICH, 2005). Para isto, estudos como o do “Diabetes Control and Complications Trial”, publicado em 1993 (DCCT, 1993), demonstraram a necessidade de um controle glicêmico estrito, através de uma insulino terapia intensiva, em reduzir o surgimento e a progressão das complicações microvasculares. Apesar da intensificação da insulino terapia diminuir a incidência das complicações crônicas do DM, o mesmo estudo, observou a ocorrência de um maior risco de HII. Assim, a HII constitui o principal obstáculo para a implementação da terapia insulínica intensiva (McNAY; SHERWIN, 2004).

Embora, Wysocki et al. (2003) não associem hipoglicemia severa à redução das funções cognitivas no DM tipo 1, a maioria dos estudos apontam para uma forte correlação entre HII e déficit cognitivo em crianças (ROVET; EHRLICH, 1999; WARREN; FRIER, 2005). Além disso, estudos empregando ratos recém-nascidos

também têm demonstrado que a hipoglicemia acarreta diminuição do peso, celularidade e conteúdo protéico cerebral (CHASE et al., 1973). Dentro deste mesmo contexto, Yamada, Rensing e Thio (2005) verificaram que episódios recorrentes de hipoglicemia ocasionava morte neuronal em ratos com idade entre 21 e 25 dias.

Muitos estudos sugerem que o risco de déficit cognitivo promovido por HII encontra-se fortemente associado à duração, intensidade e frequência de episódios hipoglicêmicos (DESROCHER; ROVET, 2004; WARREN; FRIER, 2005). Além disso, estudos clínicos demonstram que o déficit cognitivo está mais presente em crianças, pois estas são mais susceptíveis à hipoglicemia, principalmente se fazem uso intensivo de insulina (HERSHEY et al., 1999; WAGNER; GRABERT; HOLL, 2005;).

A hipoglicemia se desenvolve quando a taxa de glicose que entra na circulação sistêmica está relativamente reduzida comparada à captação de glicose pelos tecidos. Sob condições fisiológicas, a hipoglicemia é corrigida por uma combinação de complexos mecanismos de defesa denominados de glicorreguladores que envolvem mecanismos auto-reguladores, neurais e hormonais (DAVIS; ALONSO, 2004).

1.1 Fisiologia e Fisiopatologia da resposta contrarregulatória

A redução da glicemia faz com que o organismo, ative uma resposta contrarreguladora na qual está envolvida redução da secreção de insulina e aumento na secreção de glucagon, epinefrina, hormônio do crescimento e cortisol (DAVIS; ALONSO, 2004).

A liberação dos hormônios envolvidos na resposta contrarregulatória é extremamente importante, pois são capazes de aumentar a gliconeogênese e a glicogenólise. De acordo com Hume et al. (2005) a produção hepática de glicose através da glicogenólise e gliconeogênese é essencial para a normalização da glicemia.

O glucagon é o primeiro e o mais importante hormônio contrarregulador a atuar no fígado, e o limiar glicêmico para a intensificação de sua liberação situa-se entre 65 e 70 mg/dL (SCHWARTZ et al., 1987; MITRAKOU et al., 1991). Seus principais efeitos são a intensificação da glicogenólise e gliconeogênese, que são mediados pela ativação de enzimas-chave destas vias (BUSSEY et al., 1985; JITRAPAKDEE; WALLACE, 1999).

A epinefrina possui limiar glicêmico e efeito no metabolismo hepático qualitativamente semelhante ao do glucagon (CHU et al., 1996; SACCAÀ et al., 1983; DAVIS; ALONSO, 2004). Além disso, as catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) também são capazes de estimular a lipólise, inibir a captação muscular de glicose e provocar sintomas adrenérgicos como palpitações e tremores (HEPBURN et al., 1991).

As funções do glucagon e epinefrina descritas anteriormente ocorrem em indivíduos saudáveis, entretanto, o mesmo não acontece no DM tipo 1, o que o torna mais susceptível às hipoglicemias. A falta de elevação do glucagon durante esta condição pode ser devido à deficiência de insulina, e a atenuada liberação de adrenalina é decorrente do ciclo vicioso de hipoglicemias recorrentes que se instala devido ao defeito na contrarregulação; o que leva ao esgotamento das reservas adrenais (RYAN, 2004). Desta forma, quando estes indivíduos estão expostos à insulina exógena, se ocorrer queda na glicemia, poderá haver deficiência na

elevação compensatória da secreção de glucagon (WHITE et al., 1983) e epinefrina (CRYER, 2002; DAVIS; ALONSO, 2004) o que pode levar ao desenvolvimento de hipoglicemia despercebida.

Outros hormônios envolvidos na resposta contrarregulatória com participações mais tardias são o cortisol e o hormônio do crescimento, sendo a ação de ambos favorecer a lipólise e a gliconeogênese. O cortisol também é capaz de estimular a proteólise (JITRAPAKDEE; WALLACE, 1999; CYNOBER, 2002) e favorecer a ação do glucagon na glicogenólise (EXTON et al. 1972) e na gliconeogênese (MOKUDA; SAKAMOTO, 1997).

Através do exposto, verifica-se que em situações de hipoglicemia, o organismo lança mão de um mecanismo glicorregulador capaz de aumentar a capacidade hepática de produção de glicose. Além disso, controlar a glicemia é importante, já que hipoglicemias recorrentes reduzem a efetividade da resposta contrarregulatória e favorecem o aparecimento de déficit cognitivo.

1.2 – Recuperação da HII

Após a primeira descrição de reversão do coma hipoglicêmico com aminoácidos (KEMALI et al., 1967), estudos em animais experimentais, voluntários saudáveis e pacientes com DM tem mostrado a possibilidade do uso de novas substâncias no tratamento da HII. Por exemplo, os trabalhos de Wiethop e Cryer (1993) e Evans et al. (2004), demonstraram que a administração de L-alanina via oral (Wiethop; Cryer, 1993) ou por infusão endovenosa (EVANS et al., 2004) pode auxiliar na recuperação da HII.

Dentro deste contexto, nosso laboratório vem investigando mecanismos de recuperação da glicemia durante a HII em ratos adultos desde 1992 (SOUZA et al., 1994a, 1994b, 1995, 2001). O modelo de HII foi estabelecido através da administração intraperitoneal de 1U/Kg de insulina regular. Este modelo faz com que o fígado de ratos HII encontre-se sobre a influência simultânea de insulina exógena e contrarreguladores endógenos. A insulina é um hormônio que suprime a produção hepática de glicose através da inibição da glicogenólise (IKEZAWA et al., 2001) e gliconeogênese (KOOPMANS et al., 1998) enquanto os hormônios contrarreguladores possuem efeitos opostos.

Diante destes fatos, Borba-Murad et al. (1999) demonstraram que apesar da hiperinsulinemia, a capacidade hepática de produção de glicose a partir de L-alanina e L-glutamina aumentava durante a HII. Ainda nesta mesma linha de pesquisa, Souza et al., (2001) observaram que a administração combinada de precursores de glicose era mais eficiente que a glicose na recuperação da glicemia. Além disso, em estudo recente, Galende (2005) verificou que a administração intraperitoneal de glicose 30 minutos após a administração de insulina, inibe a produção hepática de glicose.

Os estudos desenvolvidos em nosso laboratório descritos anteriormente sugerem que a intensificação da gliconeogênese hepática possui papel crucial na recuperação da HII. Entretanto todos os dados foram obtidos empregando ratos Wistar adultos pesando entre 180 e 220 g e com uma média de idade entre 50 e 55 dias. Em face do exposto e considerando que em nossa espécie, quanto mais jovem o indivíduo maior é a propensão à HII, decidimos investigar em ratos recém desmamados, com idade média de 21 dias, a participação da produção hepática de glicose no processo de contrarregulação glicêmica.

2 OBJETIVO

Avaliar a responsividade hepática a substratos neoglicogênicos durante hipoglicemia induzida por insulina (HII) em ratos recém desmamados, através da utilização de precursores como L-alanina, L-glutamina, glicerol e L-lactato.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e tratamento

Utilizou-se ratos machos da linhagem Wistar recém-desmamados (Figura 1), pesando 45-60 g, que recebiam água e ração balanceada (Nuvilab[®]) *ad libitum*. No dia anterior ao experimento o alimento era retirado às 18:30 (início do jejum) e no dia seguinte às 6:30 iniciava-se os procedimentos experimentais em um momento em que os animais estavam com 12 horas de jejum.



FIGURA 1 – Ratos Wistar recém-desmamados pesando entre 45 e 60 g (acima), e rato Wistar adulto pesando entre 180 e 220 g (abaixo).

3.2. Drogas e reagentes

Insulina humana regular (Novolin® R) foi adquirida do laboratório Novo Nordisk. Os substratos gliconeogênicos e os demais reagentes foram procedentes da Sigma Chemical Company, Merck, Labsynth e ICN Biomedicals.

3.3. Indução da hipoglicemia induzida por insulina (HII)

Nestes experimentos, o modelo de HII estabelecido em nosso laboratório (SOUZA *et al.*, 1994a, 1994b, 1996) foi utilizado. A HII foi obtida através de injeção intraperitoneal (ip) de insulina regular (1U/kg) em ratos (jejum de 12 horas). Os animais foram submetidos à perfusão de fígado *in situ* ou decapitados para a coleta de sangue, 30 minutos da injeção de insulina (grupo HII) ou salina (grupo controle),

Os experimentos foram iniciados 30 minutos após a administração de insulina ou salina, pois neste momento os animais do grupo (HII) encontravam-se hipoglicêmicos e hiperinsulinêmicos.

3.4 Coleta de sangue

Para avaliação da concentração sérica de glicose, L-glutamina e insulina, os ratos foram decapitados 30 minutos após a administração de insulina (grupo HII) ou salina (grupo controle) e o sangue coletado. Além disso, nos experimentos de perfusão de fígado o sangue foi retirado da veia cava inferior antes de se iniciar este procedimento, para avaliar a glicemia visando comprovar se os animais do grupo HII encontravam-se hipoglicêmicos no momento do experimento.

3.5. Sistema de perfusão do fígado “*in situ*”

O sistema de perfusão do fígado (Figura 2) é composto por reservatórios para o líquido de perfusão, uma bomba peristáltica e um oxigenador de membrana, acoplados a um banho-maria com bomba de circulação externa de água aquecida e um cilindro com mistura carbogênica ($O_2/CO_2=95/5\%$).

O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, ao redor do qual estão enrolados tubos de borracha de silicone com parede de 0,25 mm de espessura, diâmetro interno de 2 mm e comprimento total de 15 metros. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostatizada pelo banho-maria, por meio da bomba de circulação externa de água aquecida a 42°C. Esta temperatura permite que o líquido de perfusão quando atinge a cânula inserida na veia porta, esteja com uma temperatura de 37°C. O cilindro de alumínio está isolado do ambiente por uma cobertura cilíndrica de acrílico, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de O_2 e CO_2 , nas proporções de 95:5. O sistema ainda contém um dispositivo que impede a entrada de bolhas de ar no fígado (capta-bolhas).

O líquido de perfusão é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador. Neste local se processam as trocas gasosas. O O_2 e o CO_2 contidos na atmosfera carbogênica (95% O_2 / 5% CO_2), por troca passiva, passam para o líquido de perfusão que circula no interior dos tubos de borracha silicone. A fina espessura da parede destes tubos, seu pequeno diâmetro e o seu comprimento total (grande área de secção transversa) favorecem as trocas. Com os fluxos normalmente utilizados (nunca acima de 10 mL por minuto), o tempo de permanência do líquido no oxigenador de membrana é de aproximadamente 7 minutos. Desse modo, o

líquido por troca passiva é saturado com oxigênio. Vale ressaltar, que a entrada de CO_2 no líquido de perfusão diminui o seu pH inicial de 7,6 para 7,4.

O líquido de perfusão quando chega à cânula inserida na veia porta, está oxigenado, aquecido a 37°C e com um pH 7,4.

3.5.1. O líquido de perfusão

O líquido de perfusão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KH) (KREBS; HENSELEIT, 1932 *apud* KELMER-BRACHT, 1993), que contém a seguinte composição: NaCl, 115 mM; NaHCO_3 , 25 mM; KCl, 5,8 mM; Na_2SO_4 , 1,2 mM; MgCl_2 , 1,18 mM; NaH_2PO_4 , 1,2 mM e CaCl_2 , 2,5 mM.

Precusores gliconeogênicos, quando utilizados, foram dissolvidos no líquido de perfusão nas seguintes concentrações: L-alanina (5 mM), L-glutamina (10 mM), L-alactato (2 mM) e glicerol (2 mM) combinados ou isolados.

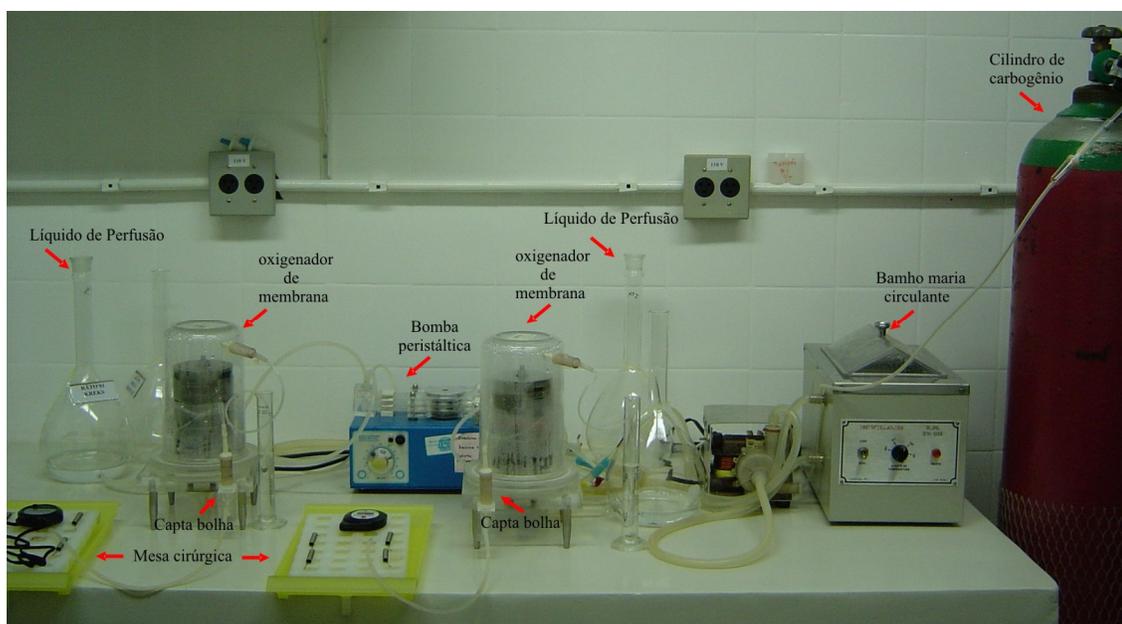


FIGURA 2 - Vista parcial do sistema de perfusão do fígado.

3.5.2. A perfusão do fígado “*in situ*”

Decorridos 30 minutos da administração de insulina (grupo HII) ou salina (grupo controle), os animais foram anestesiados com injeção ip de tiopental sódico (40mg/Kg) e fixados em mesa cirúrgica. O abdômen foi aberto até a altura do diafragma por uma incisão longitudinal central e duas incisões laterais, com exposição do fígado e dos demais órgãos. Ligaduras frouxas foram colocadas ao redor da veia cava inferior, logo acima da veia renal direita, e ao redor da veia porta (Figura 3). Após a coleta de amostra de sangue da veia cava inferior em porção infra-hepática, para constatação do estado hipoglicêmico no grupo HII, a veia porta foi canulada (Figura 3) sob baixo fluxo, (cerca de 6 mL/minuto) e, imediatamente após a canulação foi realizada uma pequena secção na veia cava inferior, porção infra-hepática, para que ocorresse completo dessangramento deste órgão. Esta incisão dá vazão ao líquido extra que é bombeado para o sistema circulatório, evitando o aumento excessivo da pressão, que poderia causar inchaço do órgão. Em seguida, o fluxo foi elevado para garantir a oxigenação hepática, e a ligadura em torno da veia porta foi amarrada para fixação da cânula. O tórax foi aberto, e a veia cava superior, acima do diafragma, foi ocluída para desviar o líquido para a veia cava inferior, abaixo do fígado. Posteriormente, a veia cava inferior (porção infra-hepática) foi canulada para a coleta do líquido efluente (perfusado) que deixa o fígado através da veia hepática. Finalmente, o fluxo foi ajustado para valores que permitem a oxigenação adequada (cerca de $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de fígado). Este fluxo está muito acima dos valores fisiológicos (cerca de $0,15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$) e visa compensar a ausência de eritrócitos no líquido de perfusão.

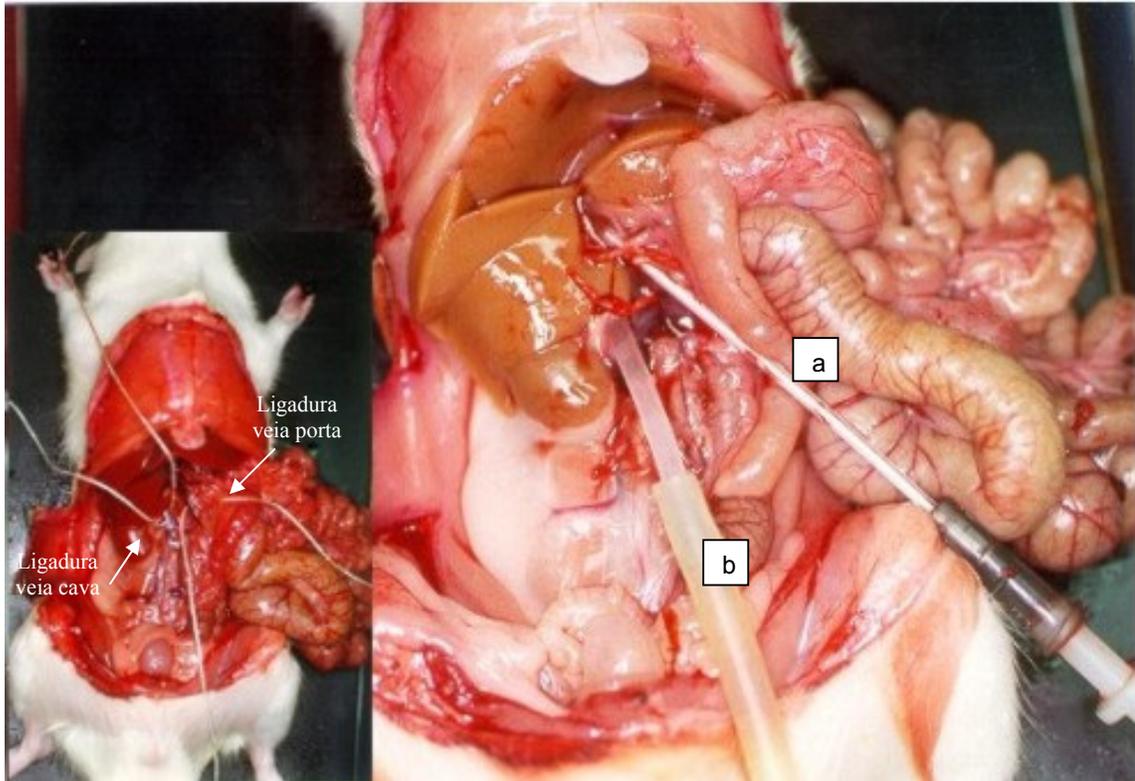


FIGURA 3 – Posições das ligaduras utilizadas para fixação das cânulas, no momento do início dos experimentos de perfusão. As cânulas foram inseridas na veia porta (a) e na veia cava inferior (b).

A perfusão foi, portanto, realizada em sistema aberto (não-recirculante), sendo o direcionamento do fluxo no sentido do hepatócito periportal para o hepatócito perivenoso (perfusão monovascular anterógrada).

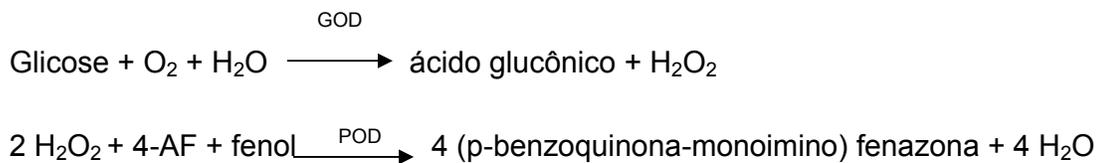
Após os 20 minutos iniciais de perfusão, para adaptação do fígado às novas condições, amostras do perfusado foram coletadas em intervalos de 5 minutos para a determinação de parâmetros bioquímicos. Durante este período a perfusão do fígado foi realizada do seguinte modo: 10 minutos com o tampão KH e 30 minutos com o tampão KH mais o substrato gliconeogênico.

Ao final do experimento o fígado foi retirado e pesado para que as produções de glicose, L-lactato e piruvato, por grama de fígado ($\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{g}$), fossem quantificadas. A expressão dos resultados em relação ao peso do órgão permite comparar experimentos onde empregaram-se fígados de diferentes pesos.

3.6 Determinações Bioquímicas

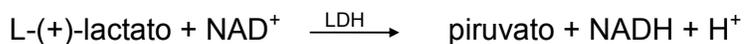
3.6.1. Dosagem de glicose no perfusado e no soro

Empregou-se o método da glicose oxidase (BERGMEYER; BERNT,1974), no qual a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose-oxidase (GOD) gerando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O H₂O₂, em presença de peroxidase (POD), produz ligação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF) e dá origem a um cromógeno com máxima absorção em 505 nm. Os valores obtidos para o perfusado e soro foram expressos respectivamente em $\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{g}$ e mg/dL. O esquema a seguir resume estas reações:



3.6.2. Dosagem de L-lactato no perfusado

Foi realizada por um método enzimático, segundo a técnica de GUTMAN e WAHLEFELD (1974). Neste método, o L-lactato é oxidado a piruvato pelo NAD⁺ em uma reação catalisada pela lactato-desidrogenase (LDH), como segue:



A formação de NADH é proporcional à concentração de L-lactato e medida em espectrofotometro a 340 nm, e os valores obtidos expressos em $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$.

3.6.3. Dosagem de piruvato no perfusado

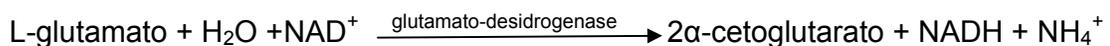
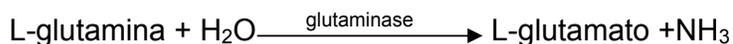
Foi quantificada pelo método de CZOK e LAMPRECHT (1974) no qual o piruvato é convertido enzimaticamente a L-lactato, com oxidação de quantidades estequiométricas de NADH, em reação catalisada pela LDH, conforme o esquema:



A oxidação de NADH é proporcional à quantidade de piruvato reduzida a L-lactato e medida espectrofotometricamente a 340 nm. Os valores obtidos foram expressos em $\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{g}$.

3.6.4. Dosagem de L-glutamina no soro

Utilizou-se o método descrito por Lund (1974) onde a L-glutamina é hidrolisada pela glutaminase a L-glutamato, sendo este oxidado pela glutamato-desidrogenase a 2 α -cetoglutarato pelo NAD^+ conforme o esquema:



A formação de NADH é medida espectrofotometricamente a 340 nm. Os valores obtidos foram expressos em mM.

3.6.5. Dosagem de insulina no soro

A insulinemia foi quantificada pelo método radioimunológico (RIE) de (DESBUQUOIS; AURBACH, 1971). Trata-se de uma reação de competição entre antígeno (insulina fria ou insulina marcada) para ligação a um anticorpo específico. Essa reação obedece à lei da ação das massas. Portanto, quanto mais insulina fria estiver presente, formar-se-á mais complexo insulina fria-anticorpo, acarretando queda na quantidade de complexo insulina marcada-anticorpo.

Mantendo-se fixos os volumes de insulina marcada com ^{125}I e anticorpo anti-insulina, determinou-se a queda de radiação à medida que aumentava a concentração de insulina fria nos tubos de ensaio. A reação de ligação competitiva de insulina fria e da marcada pelo anticorpo completou-se em 48 horas de incubação a 4°C. Após esta fase, acrescentou-se solução de polietileno-glicol à qual o complexo hormônio-anticorpo fica adsorvido. Através de centrifugação a 2000 rpm por 30 minutos e a 4°C, separou-se o complexo hormônio-anticorpo, a partir do qual foi quantificada a emissão de radiação gama da curva padrão e das amostras de soro. As insulinemias de ratos foram aferidas nesta curva padrão. A concentração sérica de insulina foi expressa em ng/mL de amostra.

3.7. Procedimento estatístico

A produção hepática de glicose, L-lactato e piruvato foram quantificadas pelos cálculos das áreas sob a curva (AUCs), expressa em $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$, utilizando-se o

programa GraphPad Prism-versão 4.0. A significância estatística das diferenças das AUCs foi avaliada pelo “test **t**” de Student, empregando-se o mesmo programa. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi adotado. Todos os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

4. RESULTADOS

4.1 Concentração sérica de glicose, insulina e L-glutamina

Visando caracterizar a condição de HII, avaliou-se 30 minutos após a administração de insulina ou salina, a glicemia e a insulinemia. Verificou-se redução da glicemia e elevação da insulinemia (Tabela 1). Posteriormente, visando obter informações adicionais aos resultados em perfusão de fígado *in situ* com L-glutamina, realizou-se a dosagem deste aminoácido no soro, quando verificou-se que os valores de L-glutamina foram semelhantes nos dois grupos (Tabela 1).

TABELA 1 – Concentração sanguínea de glicose, insulina e L-glutamina 30 minutos após injeção intraperitoneal de salina (grupo controle) ou insulina (grupo HII). Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 experimentos. (* $p < 0,05$ vs grupo controle).

	Grupo Controle	Grupo HII
Glicose (mg/dL)	103,09 \pm 7,09	26,21 \pm 6,12 *
Insulina (ng/mL)	4,05 \pm 0,47	35,15 \pm 11,69 *
L-Glutamina (mM)	1,31 \pm 0,09	1,27 \pm 0,13

4.2 Capacidade gliconeogênica hepática a partir de L-alanina, L-lactato, L-glutamina, glicerol ou da combinação destes precursores

4.2.1 Produção de glicose, L-lactato e piruvato a partir de L-alanina (5 mM)

A infusão de L-alanina (Figuras 4A, 5A e 6A) promoveu aumento na produção de glicose ($AUC_C = 4,24 \pm 1,06$ vs. $AUC_{HII} = 5,73 \pm 0,99 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$), piruvato ($AUC_C = 2,21 \pm 0,47$ vs. $AUC_{HII} = 2,29 \pm 0,60 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$) e L-lactato ($AUC_C = 6,85 \pm 1,35$ vs.

$AUC_{HII} = 7,54 \pm 1,08 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$) nos grupos controle e HII a partir dos valores basais. Porém, a intensidade do aumento foi semelhante (Figuras 4B, 5B e 6B).

4.2.2 Produção de glicose e piruvato a partir de L-lactato (2 mM)

A infusão de L-lactato (Figuras 7A e 8A) elevou a produção de glicose ($AUC_C = 12,72 \pm 6,21$ vs. $AUC_{HII} = 12,01 \pm 3,75 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$) e piruvato ($AUC_C = 2,88 \pm 0,82$ vs. $AUC_{HII} = 2,79 \pm 0,90 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$) nos grupos controle e HII a partir dos valores basais. Porém, a intensidade do aumento foi semelhante (Figuras 7B e 8B).

4.2.3 Produção de glicose a partir de L-glutamina (10 mM)

A infusão de L-glutamina (Figura 9A) promoveu aumento na produção de glicose nos grupos controle e HII em relação aos valores basais. Porém, este aumento foi mais intenso ($p < 0,05$) no grupo HII (Figura 9B) em relação ao grupo controle ($AUC_{HII} = 6,905 \pm 0,90$ vs. $AUC_C = 3,767 \pm 0,62 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$).

4.2.4 Produção de glicose a partir de glicerol (2 mM)

A infusão do glicerol (Figura 10A) elevou a produção de glicose ($AUC_C = 9,83 \pm 3,47$ vs. $AUC_{HII} = 10,64 \pm 3,42 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$) nos grupos controle e HII a partir dos valores basais. Porém, a intensidade do aumento foi semelhante (Figura 10B).

4.2.5 Produção de glicose e piruvato a partir de precursores combinados

A infusão combinada de precursores de glicose (Figuras 11A e 12A) elevou a produção de glicose ($AUC_C = 15,73 \pm 1,72$ vs. $AUC_{HII} = 15,63 \pm 1,22 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$) e piruvato ($AUC_C = 1,72 \pm 0,29$ vs. $AUC_{HII} = 1,72 \pm 0,30 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$) a partir dos valores basais. Porém, a intensidade do aumento foi semelhante (Figura 11B e 12B).

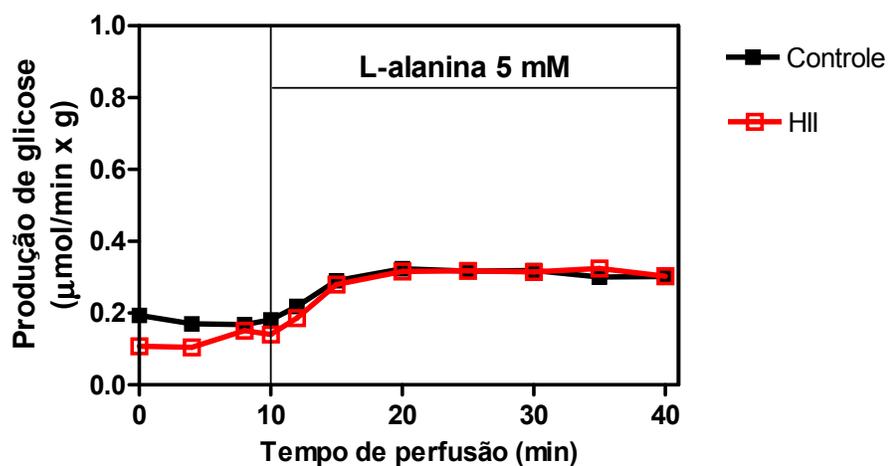


FIGURA 4A – Produção hepática de glicose a partir da infusão de L-alanina. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. L-alanina foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Os resultados representam a média de 6 experimentos.

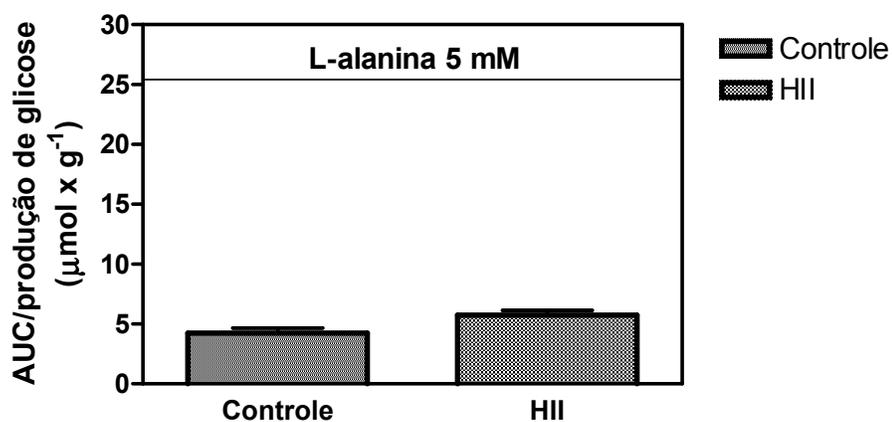


FIGURA 4B – Produção hepática de glicose a partir da infusão de L-alanina. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. AUC = área sob a curva. Os resultados representam a média \pm DP de 6 experimentos.

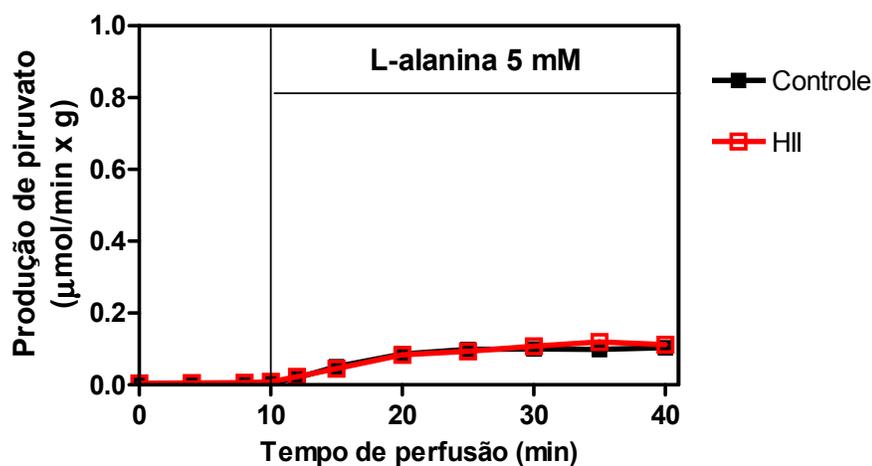


FIGURA 5A – Produção hepática de piruvato a partir da infusão de L-alanina. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. L-alanina foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Os resultados representam a média de 7 experimentos.

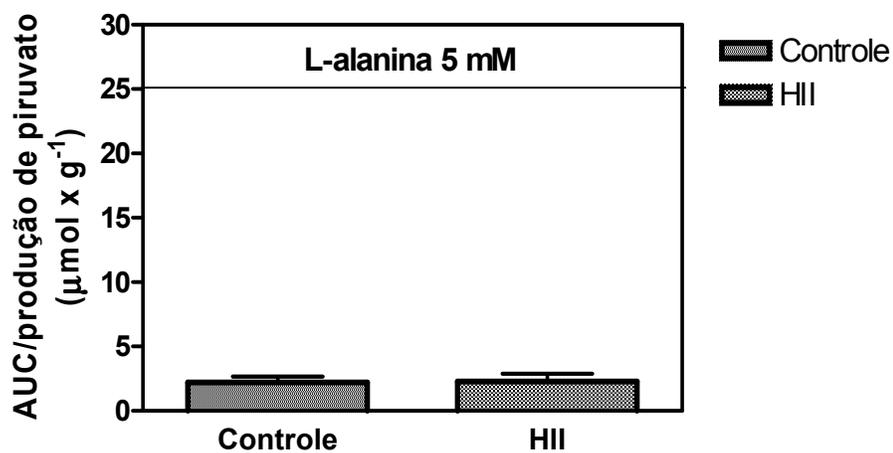


FIGURA 5B – Produção hepática de piruvato a partir da infusão de L-alanina. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. AUC = área sob a curva. Os resultados representam a média ± DP de 7 experimentos.

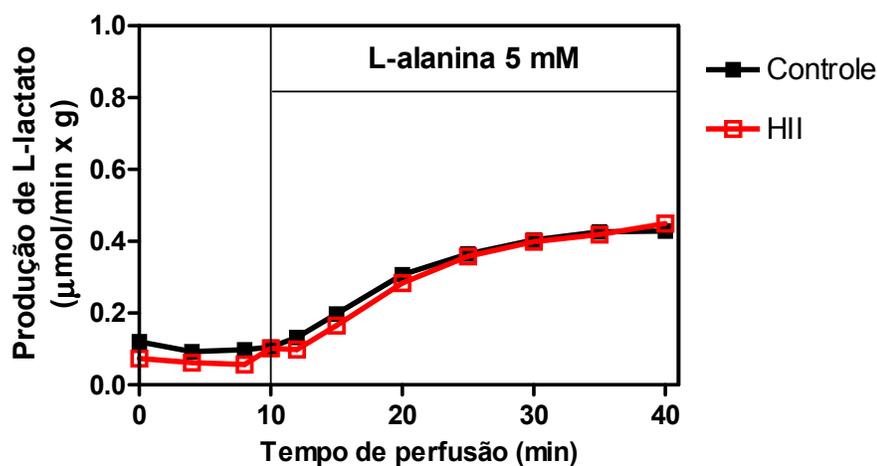


FIGURA 6A – Produção hepática de L-lactato a partir da infusão de L-alanina. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. L-alanina foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Os resultados representam a média de 6 experimentos.

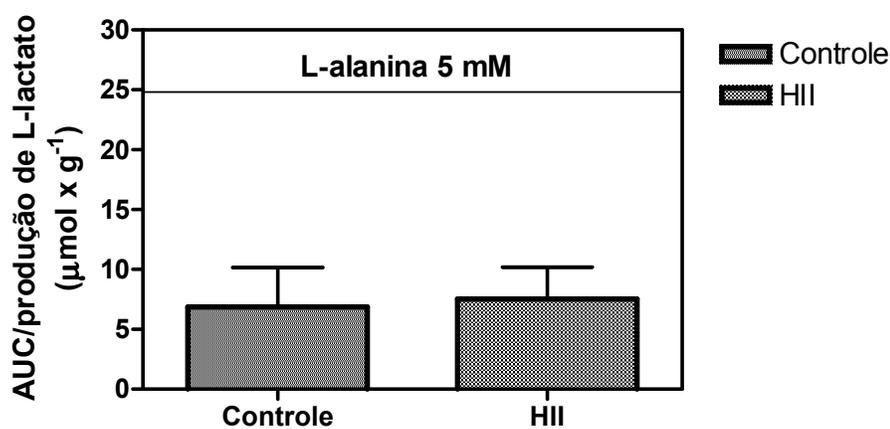


FIGURA 6B – Produção hepática de L-lactato a partir da infusão de L-alanina 5mM. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. AUC = área sob a curva. Os resultados representam a média ± DP de 6 experimentos.

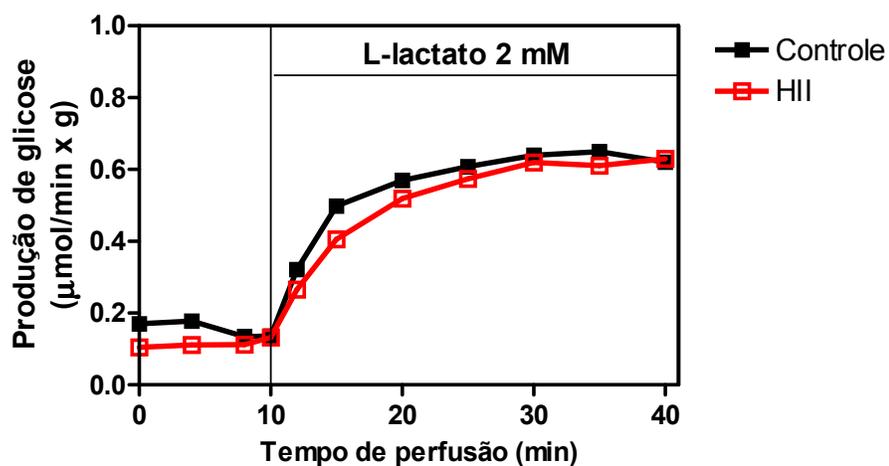


FIGURA 7A – Produção hepática de glicose a partir infusão de L-lactato. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. L-lactato foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Os resultados representam a média de 4 e 5 experimentos para o Grupo Controle e HII respectivamente.

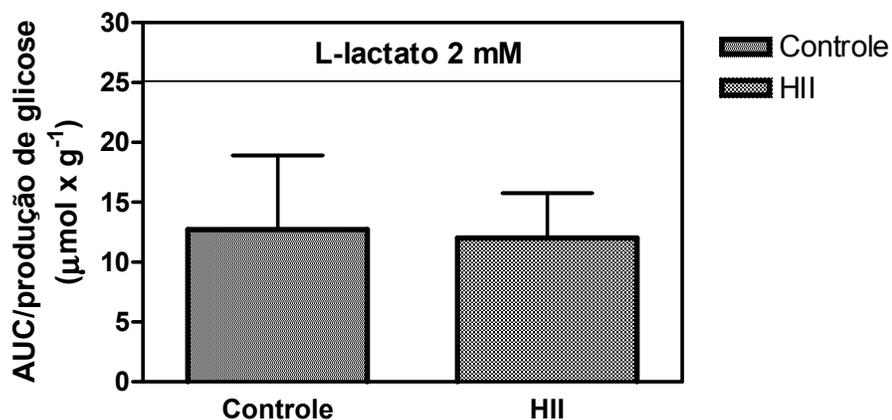


FIGURA 7B – Produção hepática de glicose a partir da infusão de L-lactato. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. AUC = área sob a curva. Os resultados representam a média ± DP de 4 e 5 experimentos para o Grupo Controle e HII respectivamente.

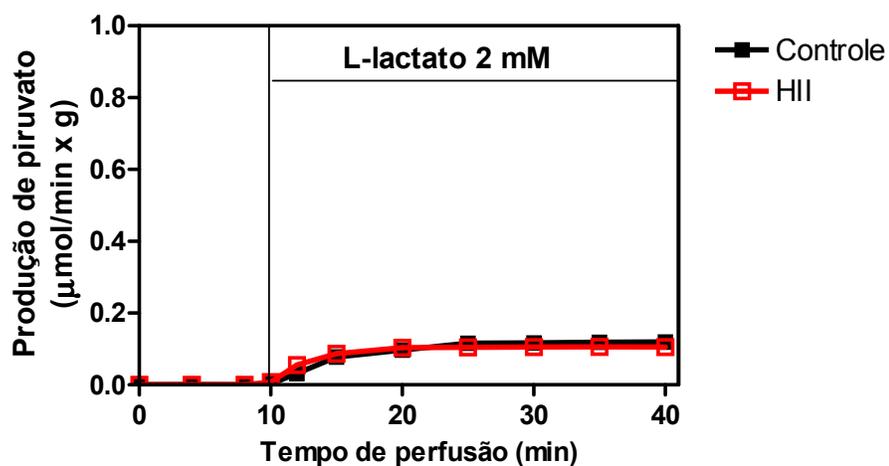


FIGURA 8A – Produção hepática de piruvato a partir da infusão de L-lactato. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. L-lactato foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Os resultados representam a média de 4 e 5 experimentos para o Grupo Controle e Grupo HII respectivamente.

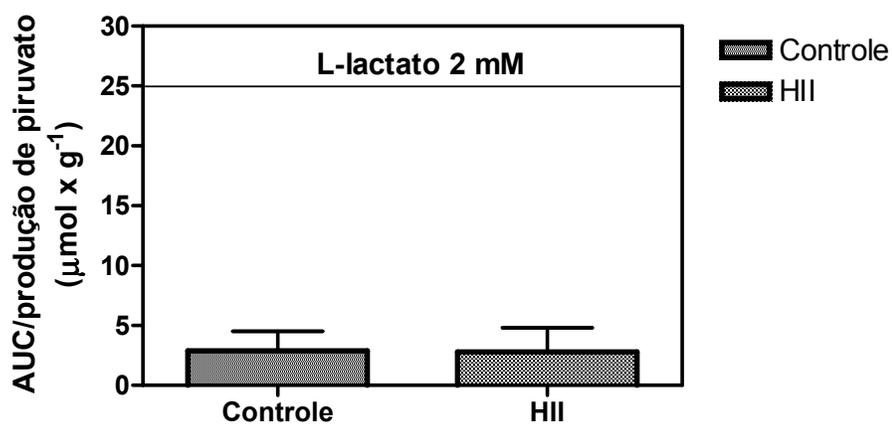


FIGURA 8B – Produção hepática de piruvato a partir da infusão de L-lactato. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. AUC = área sob a curva. Os resultados representam a média \pm DP de 4 e 5 experimentos para o Grupo Controle e HII respectivamente.

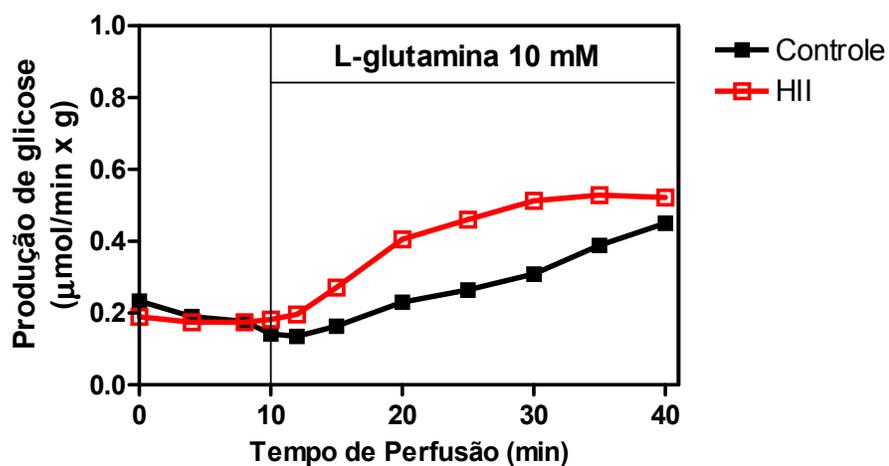


FIGURA 9A – Produção hepática de glicose a partir da infusão de L-glutamina. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. L-glutamina 10mM foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Os resultados representam a média de 4 experimentos.

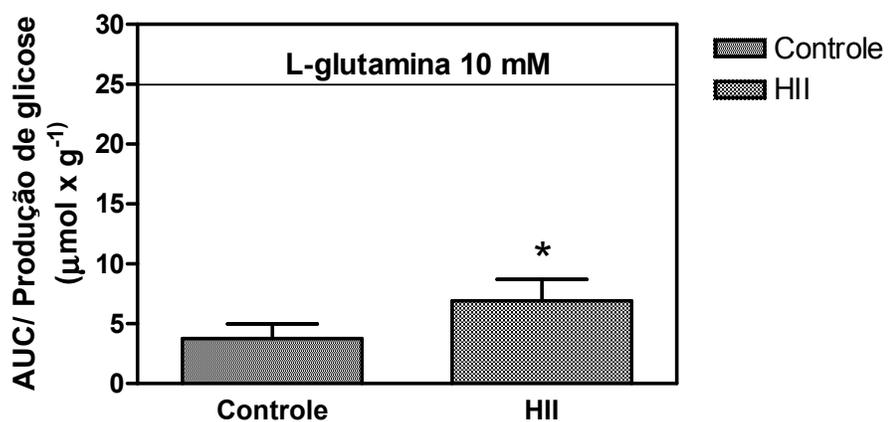


FIGURA 9B – Produção hepática de glicose a partir da infusão de L-glutamina. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (HII) ou salina (Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. AUC = área sob a curva. Os resultados representam a média \pm DP de 4 experimentos.

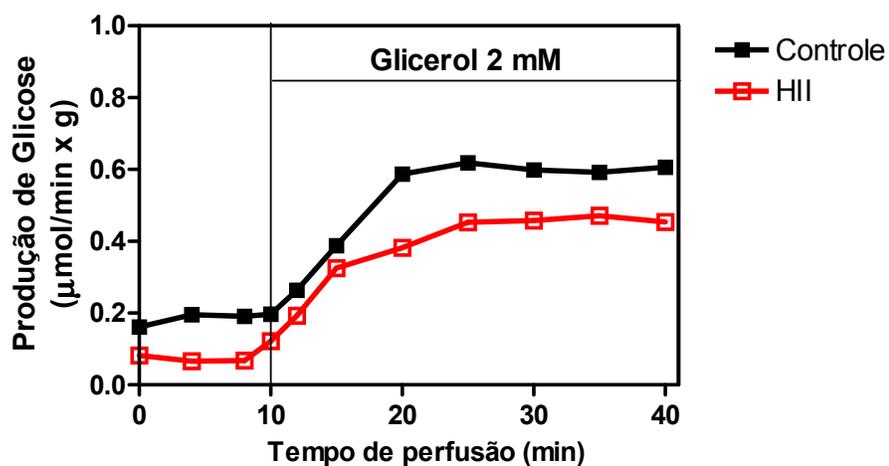


FIGURA 10A – Produção hepática de glicose a partir infusão de glicerol. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. Glicerol foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Os resultados representam a média de 6 experimentos.

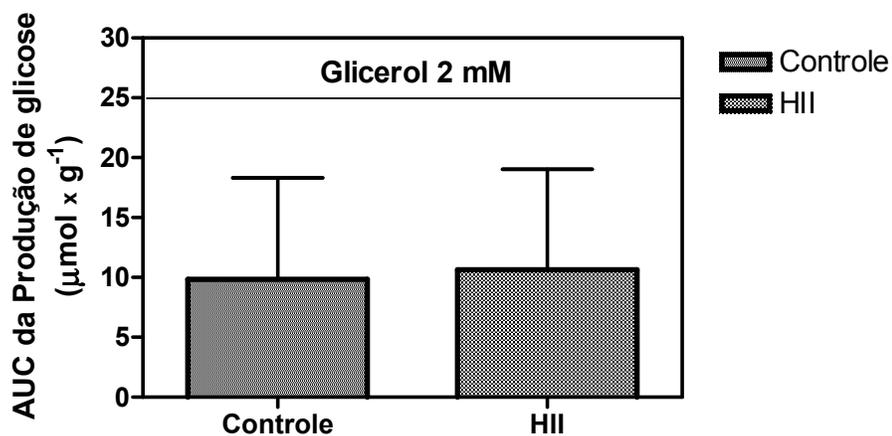


FIGURA 10B – Produção hepática de glicose a partir infusão de glicerol. Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. AUC = área sob a curva. Os resultados representam a média \pm DP de 6 experimentos.

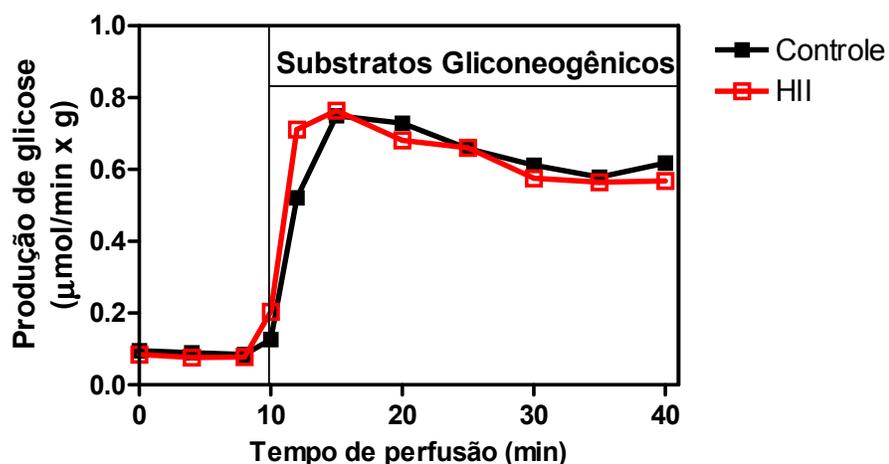


FIGURA 11A – Produção hepática de glicose a partir da infusão combinada de precursores neoglicogênicos: L-alanina (5 mM), L-glutamina (10 mM), glicerol (2mM) e L-lactato (2 mM). Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. Os Precursoros foram infundidos no intervalo entre 10 e 40 minutos. Os resultados representam a média de 5 e 6 experimentos para o Grupo Controle e Grupo HII respectivamente.

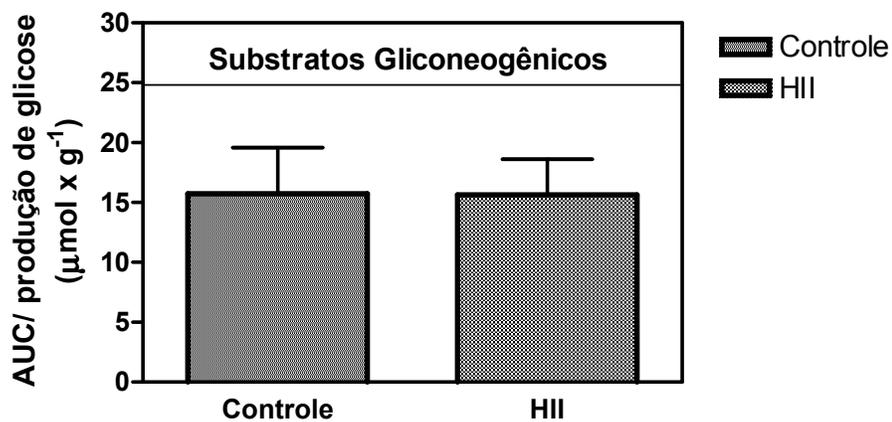


FIGURA 11B – Produção hepática de glicose a partir da infusão combinada de precursores gliconeogênicos: L-alanina (5 mM), L-glutamina (10 mM), glicerol (2mM) e L-lactato (2 mM). Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. AUC = área sob a curva. Os resultados representam a média ± DP de 5 e 6 experimentos para o Grupo Controle e HII respectivamente.

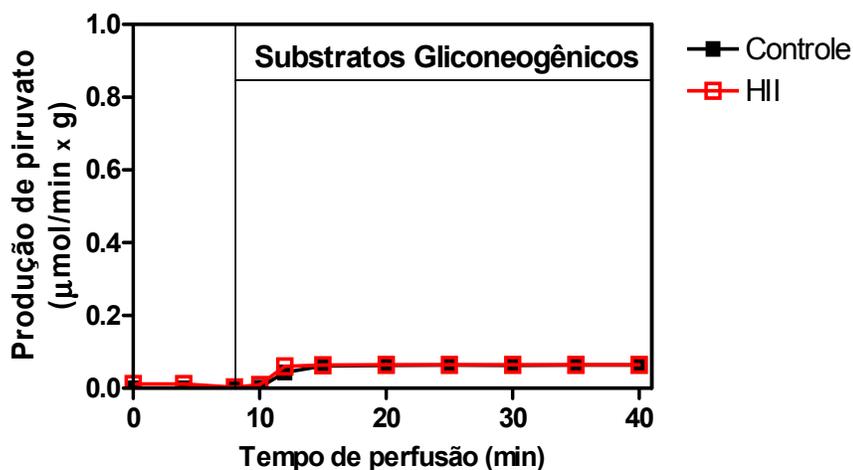


FIGURA 12A – Produção hepática de piruvato a partir da infusão combinada de precursores neoglicogênicos: L-alanina (5 mM), L-glutamina (10 mM), glicerol (2mM) e L-lactato (2 mM). Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. Os Precursores foram infundidos no intervalo entre 10 e 40 minutos. Os resultados representam a média de 6 experimentos.

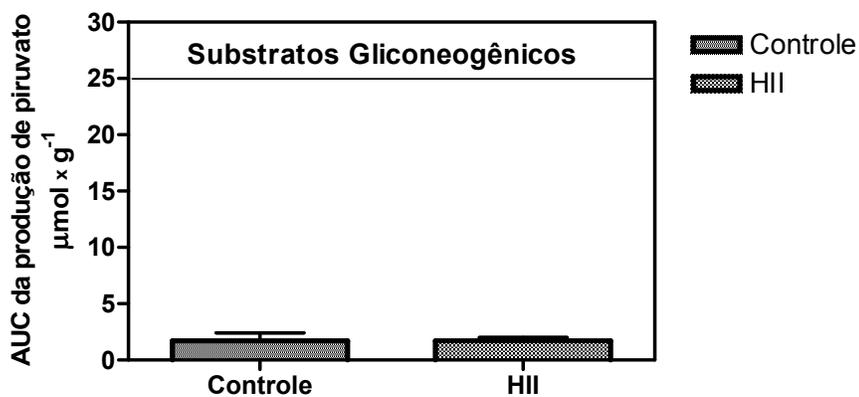


FIGURA 12B – Produção hepática de piruvato a partir da infusão combinada de precursores neoglicogênicos: L-alanina (5 mM), L-glutamina (10 mM), glicerol (2mM) e L-lactato (2 mM). Ratos com 12 horas de privação alimentar receberam insulina (Grupo HII) ou salina (Grupo Controle) e 30 minutos depois foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. AUC = área sob a curva. Os resultados representam a média ± DP de 6 experimentos.

5. DISCUSSÃO

Tendo em vista os resultados previamente obtidos em nosso laboratório, com o emprego de ratos adultos, descritos na introdução deste trabalho, o presente estudo expandiu esta linha de investigação para ratos recém desmamados.

O intuito de se utilizar ratos desmamados foi o emprego de um modelo experimental que simule hipoglicemia e recuperação da glicemia em crianças, que são mais susceptíveis à HII (WAGNER; GRABERT; HOLL, 2005).

A condição dos animais no momento do experimento, foi de hiperinsulinemia/hipoglicemia (Tabela 1) e esta situação foi obtida em função de os experimentos se iniciarem 30 minutos após a administração i.p. de uma dose farmacológica de insulina, ou seja, 1U/kg, o que permite alcançar uma insulinemia cerca de 8 vezes superior aos valores fisiológicos.

Assim, empregando modelo experimental com as características anteriormente descritas realizou-se experimentos de perfusão de fígado “*in situ*” visando avaliar o efeito da HII na gliconeogênese hepática em ratos recém-desmamados. Os substratos utilizados foram L-alanina (5 mM), L-lactato (2 mM), L-glutamina (10 mM) e glicerol (2 mM) isolados ou combinados.

A produção de glicose a partir de L-alanina foi semelhante nos grupos Controle e HII (Figura 4). De acordo com estes resultados, verificou-se que o catabolismo da L-alanina não se altera durante a HII, pois a produção de piruvato (Figura 5) e L-lactato (Figura 6) foram semelhantes nos grupos Controle e HII.

Resultados semelhantes aos obtidos com L-alanina foram observados com o L-lactato, ou seja, não houve diferença significativa na produção hepática de glicose

entre os grupos Controle e HII (Figura 7). De acordo com estes resultados, verificou-se que o catabolismo deste substrato gliconeogênico não se altera durante a hipoglicemia, pois a produção de piruvato a partir de L-lactato (Figura 8) foi semelhante entre os grupos Controle e HII.

Em concordância com os resultados obtidos com L-alanina e L-lactato, a produção de glicose a partir de glicerol em ratos normoglicêmicos (grupo Controle) e hipoglicêmicos (grupo HII) também não mostrou diferença significativa (Figura 10).

Em contraste à L-alanina, L-lactato e glicerol, a produção hepática de glicose a partir de L-glutamina foi maior ($p < 0,05$) em fígados provenientes de ratos submetidos a HII (Figura 9).

Neste momento é importante enfatizar que apesar da insulina inibir a gliconeogênese (IKEZAWA et al., 2001) e os animais do grupo HII apresentarem-se hiperinsulinêmicos (Tabela 1), estes apresentaram capacidade gliconeogênica inalterada, com exceção da L-glutamina, para a qual o grupo HII apresentou uma produção de glicose mais intensificada (Figura 9).

Os resultados obtidos devem-se provavelmente ao fato de que a HII desencadeia uma resposta contrarreguladora a qual aumenta a gliconeogênese hepática (SCHWARTZ et al., 1987; MITRAKOU et al., 1991). Embora tenha sido observado em bebês de menos de 3 meses que a hipoglicemia não eleva o glucagon, catecolaminas, GH e cortisol sanguíneo (HUME et al., 1999; JACKSON et al., 2004; CROFTON; MIDGLEY, 2004).

Porém, deve se enfatizar que com exceção da L-glutamina, nossos resultados empregando ratos recém desmamados contrastam com os resultados obtidos em ratos adultos no que se refere ao L-lactato e L-alanina, para os quais havíamos observado uma elevação mais intensa da produção da glicose (SOUZA et al., 2001).

Ainda, comparando a capacidade hepática de produção de glicose de ratos recém desmamados em relação a ratos adultos vale ressaltar os dados obtidos por Gazola et al. (2007). Os resultados publicados pelos autores, demonstram que a produção hepática de glicose em ratos hipoglicêmicos, para os substratos L-alanina 5mM e L-glutamina 10mM é superior aos encontrados para ratos recém desmamados, sendo que para o substrato L-alanina é quase o dobro.

Os resultados de Souza et al. (2001) e Gazola et al. (2007) quando comparados aos obtidos neste trabalho, sugerem que a via gliconeogênica em ratos recém desmamados ainda encontra-se em desenvolvimento, existindo uma possível imaturidade no sistema enzimático envolvido no processo de gliconeogênese, particularmente da enzima piruvato carboxilase (PC). Em concordância com esta hipótese, Bussey et al. (1985), com base em estudos em ratos recém nascidos, sugere que estes possuem inadequada atividade das enzimas envolvidas no processo de gliconeogênese. De acordo com estes resultados, Van Kempen et al. (2003a, 2003b), demonstraram em nossa espécie que recém nascidos possuem dificuldade em aumentar a produção hepática de glicose, o que atribuíram a uma menor ativação da gliconeogênese, particularmente da enzima glicose-6-fosfatase.

A enzima PC, que de acordo com os resultados obtidos, sugere-se estar com menor capacidade de resposta, situa-se na matriz mitocondrial e é responsável pela síntese de oxaloacetato a partir do piruvato (AHMAD, F.; AHMAD, P.; MENDEZ, 1986). A atividade desta enzima varia de acordo com o estado nutricional, hormonal e estado de desenvolvimento. Em relação à participação hormonal, a insulina reduz a atividade da PC (MACKALL; LANE, 1977; WEINBERG; UTTER, 1980) enquanto o glucagon e os glicocorticóides aumentam a atividade desta enzima (JITRAPAKDEE; WALLACE, 1999). Dentro desta mesma linha de estudo, Ferre et al. (1979)

verificaram que a gliconeogênese de ratos recém nascidos encontra-se reduzida em situações de extrema fome, devido uma redução na atividade da PC. Além disso, Ballard e Hanson (1967) verificaram que a atividade da PC hepática encontra-se reduzida em fetos de ratos. Entretanto, a atividade da enzima aumenta durante os 7 primeiros dias de vida e após este período começa a declinar (BALLARD; HANSON, 1967; JITRAPAKDEE; WALLACE, 1999). Assim, verifica-se que a imaturidade enzimática dos ratos utilizados nos experimentos é ainda somada a fatores como jejum e hiperinsulinemia, que também afetam a atividade da enzima PC.

A PEPCK hepática também altera sua atividade em função das condições hormonais e nutricionais (CASSUTO et al., 1999). Ballard e Hanson (1967) observaram que fígados de fetos de ratos, possuem alta atividade desta enzima e que após o nascimento, há expressiva elevação da atividade da PEPCK. Além disso, Hanson et al. (1973) verificaram que a atividade da PEPCK de ratos, aumenta durante o jejum e diabetes enquanto Shrago et al. (1963) observaram que a glicose, frutose e glicerol reduzem a atividade da PEPCK em ratos em jejum.

Considerando, os fatores envolvidos na regulação da via gliconeogênica, Van Kempen et al. (2003b) descrevem que esta via é dependente da disponibilidade de precursores de glicose, secreção de hormônios contrareguladores e adequada atividade do sistema enzimático envolvido na produção de glicose.

Neste trabalho empregamos concentrações supra-fisiológicas de substratos gliconeogênicos, excluindo a possibilidade de os resultados obtidos decorrerem de insuficiente disponibilidade de substratos. Outra razão da não elevação da responsividade hepática à L-alanina e L-lactato, seria uma ineficaz secreção de hormônios contrarreguladores durante a HII. Porém, esta possibilidade é duvidosa,

pois observou-se no grupo HII maior capacidade hepática de produção de glicose para a L-glutamina (Figura 9).

Para uma melhor visão dos resultados obtidos, a Figura 13 representa um resumo da entrada dos precursores na via neoglicogênica.

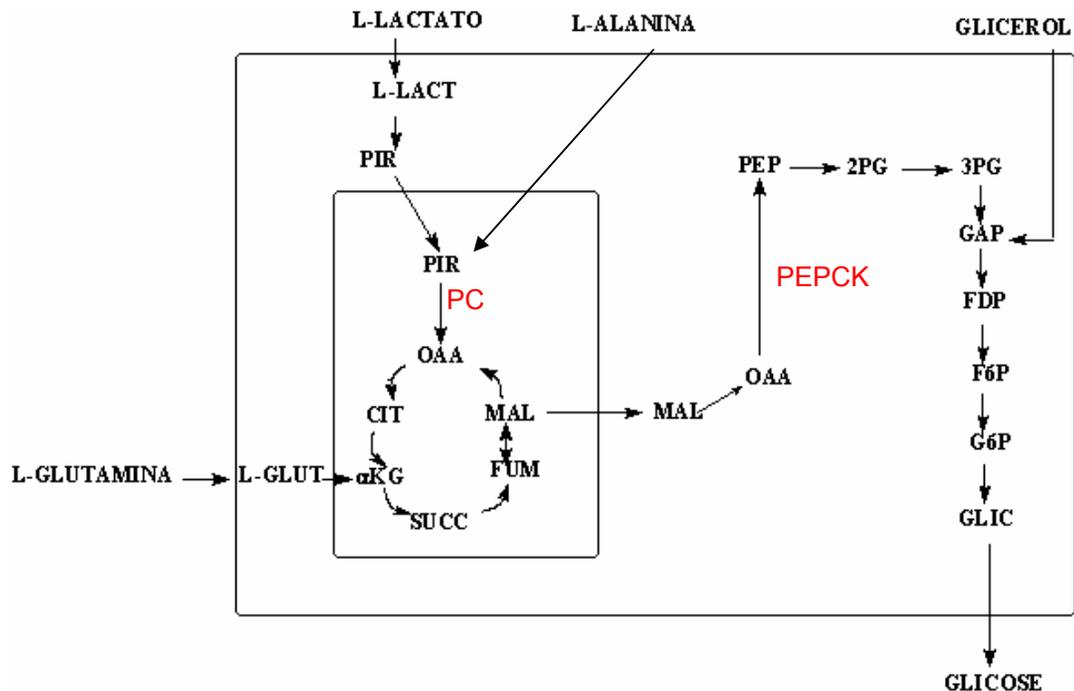


FIGURA 13. Representação da gliconeogênese no hepatócito. A membrana plasmática é representada pelo retângulo maior. A mitocôndria é representada pelo retângulo menor. Abreviações: LACT, L-lactato; PIR, Piruvato; L-GLUT, L-glutamina; CIT, Citrato; α KG, alfa-cetoglutarato; SUCC, Succinato; FUM, Fumarato; MAL, Malato; OAA, Oxaloacetato; PEP, Fosfoenolpiruvato; 2PG, 2-Fosfoglicerato; 3PG, 3-Fosfoglicerato; GAP, Gliceraldeído 3-fosfato; FDP, Frutose 1,6-bisfosfato; F6P, Frutose 6-fosfato; G6P, Glicose 6-fosfato; GLIC, Glicose.

Como mostra a Figura 13, cada precursor utilizado possui entrada distinta na via. A L-alanina e o L-lactato são convertidos em piruvato, que é convertido em oxaloacetato na mitocôndria pela ação da enzima PC. O oxaloacetato transforma-se em fosfoenolpiruvato através da enzima PEPCK. Por outro lado, a L-glutamina origina o α -cetoglutarato que é convertido em oxaloacetato, e este em

fosfoenolpiruvato pela ação da enzima PEPCK. Como a L-glutamina não necessita da ação da enzima PC, como ocorre para o L-lactato e L-alanina, esta seria uma possível razão para a produção hepática de glicose a partir da L-glutamina comportar-se de maneira diferente da L-alanina e L-lactato.

O glicerol entra na via através do gliceraldeído-3-fosfato (NEWSHOLME et al., 2003), algumas etapas posteriores às enzimas PC e PEPCK, justificando o fato de a produção de glicose a partir de glicerol não sofrer modificações (Figura 10).

Outro aspecto relevante é o fato de que apesar de haver uma melhor resposta à L-glutamina isoladamente, quando esta é infundida com a L-alanina, L-lactato e glicerol, a resposta gliconeogênica dos grupos HII e Controle é semelhante (Figura 11). Estes resultados sugerem que diferente de ratos adultos (Souza et al., 2001), a HII não eleva a capacidade gliconeogênica hepática em ratos recém desmamados.

Considerando que a capacidade gliconeogênica de ratos desmamados submetidos a HII é mais elevada apenas para a L-glutamina e que a concentração sérica deste aminoácido encontra-se inalterada (Tabela 1), abre-se a possibilidade de a administração de L-glutamina contribuir na recuperação da HII. Se esta possibilidade for confirmada em ratos recém desmamados, abre-se a perspectiva do emprego de L-glutamina na prevenção e tratamento da HII em crianças submetidas a insulinoterapia, condição na qual episódios de HII limitam o controle adequado da glicemia nestes pacientes.

6. REFERÊNCIAS

AHMAD, F.; AHMAD, P. M.; MENDEZ, A. Rat liver pyruvate carboxylase. *The Biochemical Journal.*, v. 236, p. 527-533, 1986.

ATKINSON, M. A.; MACLAREN N. K. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *The New England Journal of Medicine.*, v. 331, n. 21, p. 1428-1436, 1994.

BALLARD, F. J.; HANSON, R. W. Phosphoenolpyruvate carboxykinase an pyruvate carboxylase in developing rat liver. *The Biochemical Journal.*, v. 104, p. 866-871, 1967.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H. U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 1974. v. 2, p. 1205-1215.

BORBA-MURAD, G. R.; VARDENEGA-PEICHER, M.; SOUZA, H. M.; LOPES, G.; FONSECA, M. H.; BAZOTE, R. B. Hipoglycemia induced by insulin increases hepatic capacity to produce glucose from gluconeogenic amino acids. *Acta Pharmacologica Sinica.*, v. 20, no. 12, p. 1083-1086, 1999.

BUSSEY, M. E.; FINLEY, S.; LaBARBERA, A.; OGATA, E. Hypoglycemia in the newborn growth-retarded rat: delayed phosphoenolpyruvate carboxykinase induction despite increased glucagon availability. *Pediatric Research.*, v. 19, n. 4, p. 363-367, 1985.

CASSUTO, H.; ARAN, A.; COHEN, H.; EISENBERGER, C. L.; RESHEF, L. Repression and activation of transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene during liver development. *FEBS Letters.*, v. 457, p. 441-444, 1999.

CHASE, H. P.; MARLOW, R. A.; DABIÈRE, C. S.; WELCH, N. N. Hypoglycemia and brain development. *Pediatrics.*, v. 52, n. 4, p. 513-520, 1973.

CHU, C. A.; SINDERLAR, D. K.; NEAL, D. W.; CHERRINGTON, A. D. Direct effects of catecholamines on hepatic glucose production in conscious dog are due to glycogenolysis. *The American Journal Physiology.*, v. 27 (1 Pt 1), p. E127-E137, 1996.

CROFTON, P. M.; MIDGLEY, P.C. Cortisol and growth hormone responses to spontaneous hypoglycaemia in infants and children. *Archives of Disease in Childhood.*, v. 89, p. 472-478, 2004.

CRYER, P. E. Hypoglycaemia: the limiting factor in the glycaemic management of type I and type II diabetes. *Diabetologia.*, v. 45, p. 937-948, 2002.

CYNOBER, L. A. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition.*, v. 18, p. 761-766, 2002.

CZOK, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D- glycerate-2-phosphate. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 1974. v. 2, p. 1446-1448.

DAVIS, S.; ALONSO, M. D. Hypoglycemia as a barrier to glycemic control. *Journal of Diabetes and Its Complications.*, v. 8, p. 60-68, 2004.

DESBUQUOIS, B.; AURBACH, G. D. Use of polyethyleneglycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *The Journal of Clinical Endocrinology.*, v. 33, p. 732-738, 1971.

DESROCHER, M.; ROVET, J. Neurocognitive correlates of type 1 diabetes mellitus in childhood. *Child Neuropsychology.*, v. 10, n. 1, p 36-52, 2004.

Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Reserch Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine.*, v. 329, p. 977-986, 1993.

EVANS, M. L.; HOPKINS, D.; MacDONALD, I. A.; AMIEL, S. A. Alanine infusion during hypoglycaemia partly supports cognitive performance in healthy human subjects. *Diabetic Medicine.*, v. 21, n. 5, p. 440-446, 2004.

EXTON, J. H.; FRIEDMANN, N.; WONG, E. H.; BRINEAUX, J. P.; CORBIN, J. D.; PARK, C. R. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. *The Journal of Biological Chemistry.*, v. 10;247, n. 11, p. 3579-3588, 1972.

FERRÉ, P.; PÉGORIER, J. P.; WILLIAMSON, D. H.; GIRARD, J. Interaction *in vivo* between oxidation of non-esterified fatty acids and gluconeogenesis in the newborn rat. *The Biochemical Journal.*, v. 182, p. 593-598, 1979.

GALENDE, S. B. *Inibição da Produção Hepática de Glicose Promovida pela Administração de Glicose em Ratos submetidos à Hipoglicemia Induzida por Insulina*. 2005. 61f. Dissertacao (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

GAZOLA, V. A. F. G.; GARCIA, R. F.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C.; MOHAMAD, M. S.; HARTMANN, E. M.; BARRENA, H. C.; BAZOTTE, R. B. Acute effects of isolated and combined L-alanine and L-glutamine on hepatic gluconeogenesis, ureagenesis and glycaemia recovery in experimental short-term insulin induced hypoglycaemia. *Cell Biochemistry and Function.*, v. 25, n. 2, p. 211-216, 2007.

GERICH, J. E. The importance of tight glycemic control. *The American Journal of Medicine.*, v. 118, p. 7S -11S, 2005.

GOMES, M. B. Epidemiologia do Diabetes Tipo 2. In: BANDEIRA, F. *Endocrinologia e Diabetes*. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. cap. 69. p. 800-806.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: BERGMAYER, H. U. (Ed). *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Pr

HANSON, R. W.; GARBER, A. J.; RESHEF, L.; BALLARD, F. J. Phosphoenolpyruvate carboxykinase. II. Hormonal controls. *The American Journal of Clinical Nutrition.*, v. 26, p. 55-63, 1973.

HEPBURN, D. A.; DEARY, I. J.; FRIER, B. M.; PATRICK, A. W.; QUINN, J. D.; FISHER, B. M. Symptoms of acute insulin-induced hypoglycemia in humans with end without IDDM. Factor-analysis approach. *Diabetes Care.*, v. 14, n. 11, p. 949-957, 1991.

HERSHEY, T.; BHARGAVA, N.; SADLER, M.; WHITE, N. H. Conventional versus intensive diabetes therapy in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care.*, v. 22, n. 8, p. 1318-1324, 1999.

HUME, R.; MCGEECHAN, A.; BURCHELL, A. Failure to detect preterm infants at risk of hypoglycaemia prior to discharge home. *The Journal of Pediatrics.*, v. 134, n. 4, p. 499-502, 1999.

HUME, R.; BURCHEL, A.; WILLIAMS, F. L.; KOH, D. K. Glucose homeostasis in the newborn. *Early Human Development.*, v. 81, p. 95-101, 2005.

IKEZAWA, Y.; YAMATANI, K.; OHNUMA, H.; IGARASHI, M.; DAIMON, M.; MANAKA, H.; SASAKI, H. Insulin inhibits glucagon-induced glycogenolysis in perivenous hepatocytes specifically. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.*, v. 138, no. 6, p. 387-392, 2001.

JACKSON, L.; WILLIAMS, F. L.; BURCHELL, A.; COUGHTRIE, M. W.; HUME, R. Plasma catecholamines and the counter-regulatory responses to hypoglycaemia in infants: a critical role for epinephrine and cortisol. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.*, v. 89, n. 12, p. 6251-6256, 2004.

JITRAPAKDEE, S.; WALLACE, J. C. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *The Biochemical Journal.*, v. 340, p. 1-16, 1999.

KASTENBAUER, T.; IRSIGLE, P.; SAUSENG, S.; GRIMM, A.; PRAGER, R. The prevalence of symptoms of sensorimotor and autonomic neuropathy in Type 1 and Type 2 diabetic subjects. *Journal of Diabetes and Its Complications.*, v. 18, p. 27-31, 2004.

KELMER-BRACHT, A. M. *Efeitos metabólicos e transporte do ácido niflúmico no fígado de rato*. 1993. 152f. Tese (Doutorado) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1993.

KEMALI, D., CIOFFI, F., SMALTINO, F. Interruption of hypoglycaemic coma by aminoacids infusion. *Acta Neurologica.*, v. 22, no. 6, p. 895-901, 1967.

- KOOPMANS, S. J.; MANDARINO, L.; DeFRONZO, R. A. Time course of insulin action on tissue-specific intracellular glucose metabolism in normal rats. *The American Journal of Physiology.*, v. 274, p. 642-650, 1998.
- KOWLURU, R. A.; ABBAS, S. N.; ODENBACH, S. Reversal of hyperglycemia and diabetic nephropathy Effect of reinstatement of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *Journal of Diabetes and Its Complications.*, v. 18, p. 282-288, 2004.
- LUND, P. Determination with glutaminase and glutamate dehydrogenase. In: BERGMAYER, H. U. (ed.). *Methods of enzymatic analysis*. New York, Academic Press, 1974. p. 1719-1722.
- MACKAL, J. C.; LANE, M. D. Role of pyruvate carboxylase in fatty acid synthesis: alterations during preadipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, v. 79, n. 3, p. 720-725, 1977.
- McNAY, E. C.; SHERWIN, R. S. Effect of recurrent hypoglycemia on spatial cognition and cognitive metabolism in normal and diabetic rats. *Diabetes.*, v. 53, p. 418-425, 2004.
- MITRAKOU, A.; RYAN, C.; VENEMAN, T.; MOKAN, M.; JENSSEN, T.; KISS, I.; DURRANT, J.; CRYER, P.; GERICH, J. Hierarchy of glycemic thresholds for counterregulatory hormone secretion, symptoms, and cerebral dysfunction. *The American Journal of Physiology.*, v. 260, p. E67-E74, 1991.
- MOKUDA, O.; SAKAMOTO, Y. Increased glucagon action on lactate gluconeogenesis in perfused liver of dexametasone-treated rats. *Biochemical and Molecular Medicine.*, v. 62, p. 65-69, 1997.
- NEWSHOLME, P.; LIMA, M. M.; PROCOPPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; DOI, S. Q.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*, v. 36, p. 153-163, 2003.
- RYAN, C. M. Does moderately severe hypoglycemia cause cognitive dysfunction in children?. *Pediatric Diabetes.*, v. 5, p. 59-62, 2004.
- ROVET, J. F.; EHRLICH, R. M. The effect of hypoglycemic seizures on cognitive function in children with diabetes: A 7-year prospective study. *The Journal of Pediatrics.*, v. 134, p. 503-506, 1999.
- SACCÀ, L.; VIGORITO, C.; CICALA, M.; CORSO, G.; SHERWIN, R. S. Role of gluconeogenesis in epinephrine-stimulated hepatic glucose production in humans. *The American Journal of Physiology.*, v. 245, no. 8, p. E294-E302, 1983.
- SCHWARTZ, N. S.; CLUTTER, W. E.; SHAH, S. D.; CRYER, P. E. Glycemic thresholds for activation of glucose counterregulatory systems are higher than the thresholds for symptoms. *The Journal of Clinical Investigation.*, v. 79, p. 777-781, 1987.

SHRAGO, E.; LARDY, H. A.; NORDLIE, R. C.; FOSTER, D. O. Metabolic and hormonal control of phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme in rat liver. *The Journal Biological Chemistry*. v. 238, p. 3188-3192, 1963.

SOUZA, H. M. et al. Effect of combined administration of counterregulatory hormones during insulin induced hypoglycemia in rats: lipolysis mediated by a β -adrenergic mechanism contributes to hyperglycemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*., v. 27, p. 2883-2887, 1994a.

SOUZA, H. M.; HELL, N. S.; LOPES, G.; BAZOTTE, R. B. Uma nova abordagem experimental para investigação da interação sinérgica de hormônios contrarreguladores na recuperação da glicemia após hipoglicemia induzida por insulina em ratos. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*., v. 37, no. 4, p. 737-744, 1994b.

SOUZA, H. M. Efeito da administração de hormônios contrarreguladores na recuperação da hipoglicemia induzida por insulina: estudos *in vivo*, em perfusão de fígado *in situ* e em hepatócitos isolados. 1995. 86f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1995.

SOUZA, H. M.; HELL, N. S.; LOPES, G.; BAZOTTE, R. B. Synergistic effect of counterregulatory hormones during insulin-induced hypoglycemia in rats: participation of lipolysis and gluconeogenesis to hyperglycemia. *Acta Pharmacologica Sinica*., v. 17, p. 455-459, 1996.

SOUZA, H. M.; BORBA-MURAD, G. R.; CURI, R.; GALLETTO, R.; BAZOTTE, R. B. Combined administration of glucose precursors is more efficient than that of glucose itself in recovery from hypoglycemia. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*., v. 110, p. 264-272, 2001.

VAN KEMPEN, A. A.; ROMIJN, J. A.; RUITER, A. F.; ACKERMANS, M. T.; ENDERT, E.; HOEKSTRA, J. H.; KOK, J. H.; SAUERWEIN, H. P. Adaptation of Glucose Production and Gluconeogenesis to Diminishing Glucose Infusion in Preterm Infants at Varying Gestational Ages. *Pediatric Research*., v. 53, n. 4, p. 628-634, 2003a.

VAN KEMPEN, A. A.; ROMIJN, J. A.; RUITER, A. F.; ACKERMANS, M. T.; ENDERT, E.; HOEKSTRA, J. H.; KOK, J. H.; SAUERWEIN, H. P. Alanine Administration Does Not Stimulate Gluconeogenesis in Preterm Infants. *Metabolism*., v. 52, n. 8, p. 945-949, 2003b.

WAGNER, V. M.; GRABERT, M.; HOLL, R. W. Severe Hypoglycaemia, metabolic control and diabetes management in children with type 1 diabetes in the decade after the Diabetes Control and Complications Trial – a large-scale multicentre study. *European Journal of Pediatrics*., v. 164, p. 73-79, 2005.

WARREN, R. E.; FRIER, B. M. Hypoglycaemia and cognitive function. *Diabetes, Obesity and Metabolism*., v. 7, p. 493-503, 2005.

WEINBERG, M. B.; UTTER, M. F. Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on the turnover of rat liver pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase. *The Biochemical Journal.*, v. 188, p. 601-608, 1980.

WHITE, N. H.; SHOR, D. A.; CRYER, P. E.; LEVANDOSKI, L. A.; BIER, D. M.; SANTIAGO, J. V. Identification of type I diabetic patients at increased risk for hypoglycemia during intensive therapy. *The New England Journal of Medicine.*, v. 308, p. 485-491, 1983.

WIETHOP, B.V.; CRYER, P.E. Alanine and terbutaline of hypoglycemia in IDDM. *Diabetes Care.*, v. 16, p. 1131-36, 1993.

WYSOCKI, T.; HARRIS, M. A.; MAURAS, N.; FOX, L.; TAYLOR, A.; JACKSON, S.C.; WHITE, N. H. Absence of adverse effects of severe hypoglycemia on cognitive function in schoolaged children with diabetes over 18 months. *Diabetes Care.*, v.26, n. 4, p. 1100-1105, 2003.

YAMADA, K. A.; RENSING, N.; THIO, L. L. Ketogenic diet reduces hypoglycemia-induced neuronal death in young rats. *Neuroscience Letters.*, v. 385, p.210-214, 2005.