

AVALIAÇÃO *IN VIVO* E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO DE HEPATÓCITOS PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO*, EM CAMUNDONGOS SWISS NÃO DIABÉTICOS E DIABÉTICOS TIPO I, DO EFEITO DA INSULINA E DOS HORMÔNIOS CONTRARREGULADORES SOBRE O METABOLISMO SISTÊMICO E HEPÁTICO DA GLICOSE.

Diego G. L. de Rezende (PIBIC/CNPq-FA - UEM), Vilma A. F. de Godoi (Orientadora), Maria Montserrat D. Pedrosa (Co-orientadora)
Email: vafggazola@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Ciências Fisiológicas/Maringá, PR.

Área do conhecimento: Ciências Biológicas; Sub-área do conhecimento: Fisiologia.

Palavras-chave: cortisol, diabetes tipo 1, glutamina dipeptídeo

Resumo: A insulino terapia evita o desenvolvimento de complicações crônicas em pacientes diabéticos tipo 1 (DBT1) mas aumenta a incidência de hipoglicemia induzida por insulina (HII). A HII aciona mecanismos contrarreguladores relacionados a liberação de glucagon, adrenalina e cortisol. O aminoácido não-essencial L-glutamina pode estar em déficit em estados catabólicos como DBT1, e a suplementação na forma de dipeptídeo (GDP) pode ser indicada. Portanto, esta investigação avaliou o efeito dos hormônios glucagon, adrenalina ou cortisol associados ao GDP na recuperação da glicemia durante episódio de HII em camundongos Swiss não diabéticos (NDBT) e DBT1. O glucagon e a adrenalina, nas doses utilizadas, não promoveram efeitos importantes. No entanto, o cortisol promoveu uma melhor recuperação da glicemia na ausência do GDP em animais DBT1. É provável que a presença do GDP sinalize uma proteólise em andamento e isso tenha inibido o efeito direto do cortisol sobre este processo. Como o GDP é oferecido na forma de “bolus”, após ser exaurido há queda dos aminoácidos plasmáticos que associado à reduzida proteólise prejudica a recuperação da glicemia. Portanto, a suplementação com GDP em pacientes com DBT1 deve ser cautelosa.

Introdução: O Diabetes Mellitus tipo 1 (DBT1) é uma doença caracterizada pela hiperglicemia resultante da ausência de insulina (ANGELIS e TIRAPEGUI, 2007). A insulino terapia necessária aumenta o risco de



hipoglicemia induzida por insulina (HII). A hipoglicemia aciona mecanismos hiperglicemiantes que se referem a ação metabólica do glucagon, adrenalina e cortisol (CRYER 2008). Em estados catabólicos intensos, como em pacientes diabéticos tipo 1 (DBT1), há um déficit de L-glutamina e a suplementação, na forma de dipeptídeo (GDP), pode ser considerada (CRUZAT et al., 2014). No entanto, a interação entre a ação hormonal e a suplementação são pouco conhecidas, fazendo-se necessário maiores estudos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar, em camundongos não diabéticos (NDBT) e DBT1, as respostas metabólicas *in vitro* utilizando hepatócitos isolados; os efeitos glicêmicos dos hormônios glucagon, adrenalina e cortisol; assim como os efeitos glicêmicos do GDP *in vivo* durante episódio de HII.

Materiais e métodos:

Animais: 30 camundongos machos da linhagem Swiss (28 dias/22 g), com livre acesso à água e ração balanceada Nuvital®, foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (tpt 23°C±1°C, e fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro). CEUA-UEM: 079/2011 **Diabetização:** parte dos camundongos (jejum prévio de 15 h) receberam injeção intraperitoneal (ip) de Aloxana (180 mg/Kg). Após 4 dias, foram considerados DBT1 os animais com glicemia ≥ 300 mg/dL. **Hipoglicemia Induzida por Insulina (HII) Regular:** os camundongos NDBT e DBT1 (jejum noturno de 15 h) receberam injeção ip de insulina (1 U/Kg, Novolin®), este sendo considerado como tempo 0 min para a avaliação da glicemia por até 5 h. **Hormônios contrarreguladores e GDP:** em parte dos animais NDBT e DBT1, 15 min após a injeção de insulina, foi ministrado por via ip os hormônios glucagon (0,02 mg/kg) ou cortisol (20 mg/kg) ou adrenalina (1 mg/kg). Uma parte dos camundongos DBT1, também no tempo 15 min, receberam uma dose oral de GDP (400 mg/Kg). Amostras de sangue foram coletadas por 5 h para dosagem da glicemia. **Isolamento dos hepatócitos:** os animais foram anestesiados (Ketamina/Xilazina 100/10 mg/Kg) e submetidos à laparotomia. Os fígados, foram perfundidos com tampão Krebs-Henseleit-Bicarbonato (pH 7,4, 37°C, saturado com O₂/CO₂ 95/5%) contendo collagenase 3,5%, técnica descrita por Berry & Friend (1969) e modificada por BAZOTTE et al. (1991). A eutanásia ocorreu por choque hipovolêmico. **Glicemia:** avaliada por incisão caudal e glicosímetro nos tempos 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min. **Volumes injetados:** 0,1 mL/100 g pc. **Análise estatística dos resultados:** os valores foram expressos em mM, analisados por teste “t” de Student, empregando-se o programa GraphPad Prism – versão 5.0, média ± desvio padrão de 4-6 experimentos individuais, nível de significância em 95%.

Resultados e Discussão

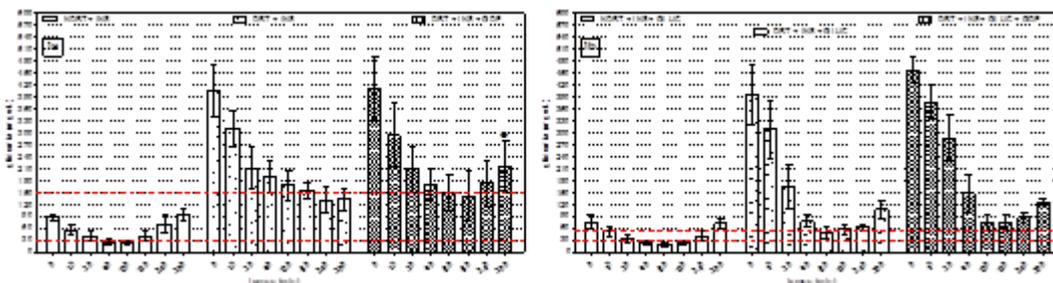


Figura 1 – Perfil glicêmico de camundongos submetidos a HII durante 300 min. O grupo não diabético NDBT+INS e o grupo diabético tipo 1 DBT1+INS receberam insulina no tempo 0 min. O grupo DBT1+INS+GDP recebeu também o GDP 15 min após a injeção de insulina. O grupo não diabético NDBT+INS+GLUC e o grupo diabético tipo 1 DBT1+INS+GLUC receberam insulina no tempo 0 min e glucagon 15 min após. O grupo DBT1+INS+GLUC+GDP recebeu também o GDP 15 min após a injeção de insulina; n=4-6 animais/grupo; • p<0,05, tempo 300 min, DBT1+INS+GDP vs DBT1+INS.

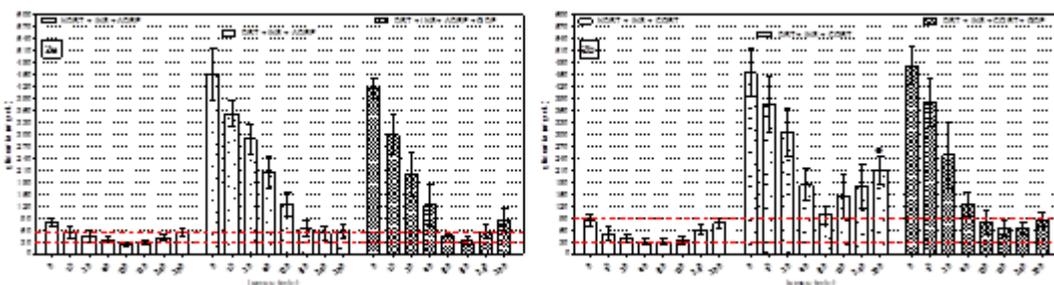


Figura 2 – Perfil glicêmico de camundongos submetidos a HII durante 300 min. O grupo não diabético NDBT+INS+ADRE e o grupo diabético tipo 1 DBT1+INS+ADRE receberam insulina no tempo 0 min e adrenalina 15 min após. O grupo DBT1+INS+ADRE+GDP recebeu também o GDP 15 min após a injeção de insulina. O grupo não diabético NDBT+INS+CORT e o grupo diabético tipo 1 DBT1+INS+CORT receberam insulina no tempo 0 min e cortisol 15 min após. O grupo DBT1+INS+CORT+GDP recebeu também o GDP 15 min após a injeção de insulina; n=4-6 animais/grupo. • p<0,05, tempo 300 min, DBT1+INS+CORT+GDP vs DBT1+INS+CORT.

Por entraves metodológicos não solucionados até o momento, não foi possível realizar o isolamento dos hepatócitos para os experimentos *in vitro*. Os experimentos *in vivo* foram realizados com sucesso e são descritos a seguir. Os camundongos DBT1 que receberam GDP (Fig 1a) apresentaram, após o tempo 180 min, uma tendência ($p>0,05$) de melhora da glicemia. No entanto, o glucagon (Fig 1b), a adrenalina (Fig 2a) e o GDP (Fig 1b e 2a) não alteraram ($p>0,05$), de forma significativa, a capacidade de recuperação da glicemia aos 300 min. O cortisol (Fig 2b) não impediu a instalação da crise hipoglicêmica mas melhorou ($p<0,05$) a capacidade de recuperação da glicemia aos 300 min. Este efeito não foi observado em animais NDBT. No entanto, na presença de GDP esse efeito foi abolido ($p<0,05$).

Conclusões: Somente o hormônio cortisol promoveu uma melhor recuperação da glicemia nos camundongos DBT1 submetidos à HII, no



entanto, esse efeito foi neutralizado pelo GDP. É provável que a presença do GDP sinalize uma proteólise em andamento e isso tenha inibido o efeito direto do cortisol sobre este processo. Como o GDP é oferecido na forma de “bolus”, após ser exaurido do sangue, há queda drástica dos aminoácidos plasmáticos, reduzida proteólise e prejuízo da recuperação da glicemia.

Agradecimentos

Ao programa PIBIC/CNPq-FA-UEM pelo incentivo à pesquisa.

Referências

ANGELIS, C.; TIRAPEGUI, J. Fisiologia da Nutrição Humana. Aspectos básicos, aplicados e funcionais. São Paulo: **Atheneu**, 2007.

CRUZAT, V.F.; BITTENCOURT, A.; SCOMAZZON, S.P.; LEITE, J.S.M.; BITTENCOURT, P.I.H.; TIRAPEGUI, J. Oral free and dipeptide forms of glutamine upplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. **Nutrition**, v. 30, p. 602–611, 2014.

BERRY, M.N.; FRIEND, D.S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. **J. Cell Biol.**, v. 43, p. 506-520, 1969.

BAZOTTE, R. B.; PEREIRA, B.; HIGHAM, S.; SHOSHAN-BARMATZ, V.; KRAUS-FRIEDMANN, N. Effects of ryanodine on calcium sequestration in the rat liver. **Biochem. Pharmac.**, v. 42, p. 1799-1803, 1991.