



## **AVALIAÇÃO DA GLICONEOGÊNESE EM HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATOS SOB RESTRIÇÃO ALIMENTAR PROLONGADA**

Gabrielle Yasmin Muller (PIBIC/CNPq/Uem), Maria Montserrat Diaz Pedrosa (Orientador), e-mail: gabiyasminmuller@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Área de conhecimento: fisiologia – fisiologia de órgãos e sistemas**

**Palavras-chave:** restrição alimentar, ratos Wistar, metabolismo hepático.

### **Resumo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio da técnica de hepatócitos isolados, a gliconeogênese hepática de ratos adultos, alimentados livremente ou sob restrição alimentar prolongada. Os animais foram divididos em dois grupos: Controle (GC), com ninhada de 6 filhotes e alimentação à vontade; Restrição (GR), com ninhada de 12 filhotes, e redução de 50% do alimento. Os protocolos experimentais, realizados aos 50-60 dias de idade, envolveram incubação de hepatócitos com substratos gliconeogênicos (5mM) em animais em jejum. A gliconeogênese, avaliada pela produção de glicose estimulada por glicerol, lactato, alanina e glutamina, nos ratos do GR foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que no grupo GC. A produção de amônia e ureia não mostrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos. Com isso sugere-se que esses animais exibem uma falha nos mecanismos contrarreguladores da glicemia, resultando em reduzida gliconeogênese.

### **Introdução**

O fígado é um órgão central na regulação da homeostase glicêmica em particular que responde diretamente à concentração de glicose no sangue. Sob a ação da insulina, o fígado é direcionado a um estado anabólico, em que a síntese de glicogênio e ácidos graxos é favorecida. Os hormônios contrarreguladores (glucagon, catecolaminas, cortisol, GH – antagonistas da insulina) tem um efeito contrário ao da insulina.





Em nosso laboratório, ratos submetidos a restrição alimentar de 50% desde o nascimento ( ninhadas de 12 filhotes e com redução de 50% no alimento após o desmame) foram comparados com ratos controles ( ninhadas de seis filhotes e alimentados livremente após o desmame). Os ratos controles mostraram baixa liberação hepática residual de glicose após jejum noturno, pouca resposta a agentes glicogenolíticos, e gliconeogênese favorecida. Em ratos sob restrição alimentar prolongada, por outro lado, houve uma elevada liberação hepática residual de glicose, indicando intensa glicogenólise, mesmo após o jejum noturno (BABATA et al., 2014). Nesses animais, a gliconeogênese a partir de alanina não foi acentuada, e o mesmo parece acontecer com o lactato (MALTA et al., 2010).

Considerando essas observações, é importante traçar um perfil mais amplo do metabolismo hepático da glicose, por meio da técnica de hepatócitos isolados. Este trabalho sustenta a hipótese de que a gliconeogênese hepática está comprometida em animais sob restrição alimentar prolongada.

## **Materiais e métodos**

### *Tratamento dos Animais*

Foram utilizados ratos *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar. Os protocolos foram aprovados pela CEUA da UEM (parecer 183/2014). Depois do desmame, foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

Grupo Controle (GC): ratos de ninhadas de seis filhotes; fornecimento livre de água e ração durante todo o período de acompanhamento;

Grupo Restrição (GR): ratos de ninhadas de doze filhotes; fornecimento livre de água; o suprimento de alimento foi reduzido em 50% em relação ao GC de idade correspondente, durante todo o período de acompanhamento.

Os experimentos foram realizados quando os animais chegaram aos 50-60 dias de idade, sob jejum noturno (aproximadamente 14 horas).

### *Incubação dos Hepatócitos e dosagens bioquímicas*

Após isolamento dos hepatócitos, alíquotas de  $1 \times 10^6$  células/mL foram incubadas em frascos com tampão Krebs, pH 7,4, 37°C, saturado com mistura carbogênica, durante uma hora, contendo um substrato gliconeogênico a 5 mM: alanina ou glutamina ou lactato ou glicerol; ou sem esses compostos (controle). As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante dos frascos foi usado para determinação das concentrações de glicose, piruvato, lactato, amônia e ureia, expressas em  $\mu\text{mol}/10^6$  cels/hora.





### Análise Estatística

Os dados foram expressos como média±desvio padrão. Os grupos foram comparados por teste t ou Mann-Whitney. O nível de significância foi de 5%.

### Resultados e Discussão

Na condição basal (sem substratos), a liberação de glicose foi maior pelos hepatócitos do grupo GR, mas conforme as células foram estimuladas pelos substratos gliconeogênicos os animais do GC apresentaram maior liberação de glicose na presença de todos os substratos quando comparados ao GR (Figura 1).

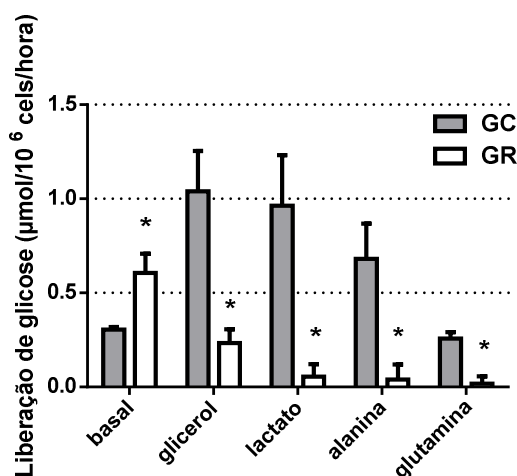


Figura 1- Liberação de glicose estimulada por glicerol, lactato, alanina e glutamina (5mM) por hepatócitos de ratos controles (GC) e ratos sob restrição alimentar de 50% (GR) em jejum noturno. Dados mostrados como média±DP de 3-5 repetições. \* $p < 0,05$  em relação ao GC, teste t.

Os grupos GC e GR não diferiram na produção de amônia ( $p > 0,05$ , Figura 2A) ou de ureia ( $p > 0,05$ , Figura 2B).

### Conclusões

Este estudo mostra que em animais sob restrição alimentar a gliconeogênese está comprometida, com uma produção de glicose significativamente menor em comparação com os animais que receberam alimentação à vontade. Isso confirma e expande experimentos anteriores,





usando perfusão de fígado *in situ*. Com isso sugere-se que esses animais exibem uma falha nos mecanismos contrarreguladores da glicemia.

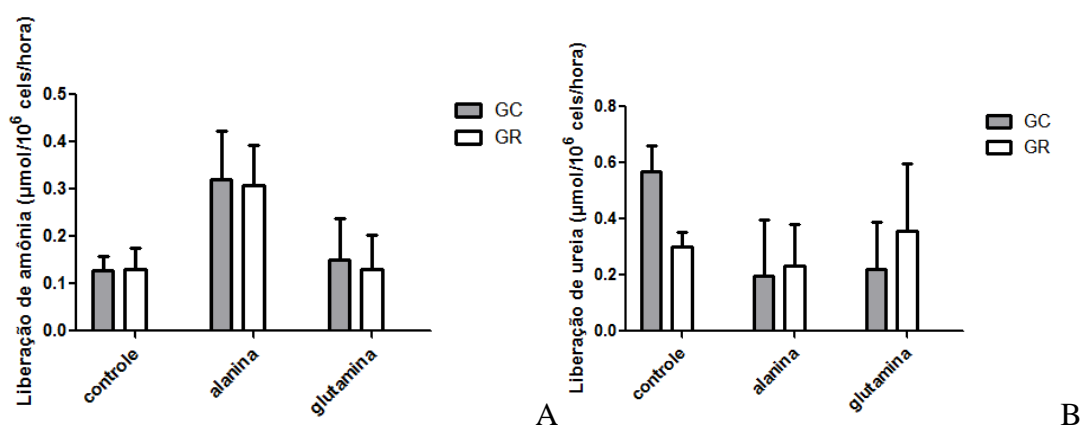


Figura 2- Liberação de amônia (A) e ureia (B) na presença de alanina e glutamina (5mM) em hepatócitos de ratos controles (GC) e de ratos sob restrição alimentar de 50% (GR) em jejum noturno. Dados mostrados como média±DP de 3-5 repetições.

## Agradecimentos

Ao programa CNPq/PIBIC e à Fundação Araucária pelo financiamento do projeto de pesquisa e aos membros do Laboratório de Fisiologia da UEM pelo apoio durante a execução do trabalho.

## Referências

BABATA, L. K. R.; PEDROSA, M. M. D.; GARCIA, R. F.; PEICHER, M. V.; GODOI, V. A. F. Sustained liver glucose release in response to adrenaline can improve hypoglycaemic episodes in rats under food restriction subjected to acute exercise. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

MALTA, A.; FURLAN, M.P.; VITORIANO, A.S.; BARRENA, H.C.; BAZOTTE, R.B.; GAZOLA, V.G. Insulin sensitivity and liver glucose production in the rat are influenced by lifetime food restriction. **Nutrition Research**, v. 30, n. 9, p. 626-631, 2010.

