

## **CINÉTICA DA AÇÃO DA ADRENALINA EM HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATOS WISTAR COM ALIMENTAÇÃO LIVRE OU RESTRIÇÃO CALÓRICA PROLONGADA**

Gabrielle Yasmin Muller (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Vilma Aparecida Ferreira de Godoi (Co-orientadora), Maria Montserrat Diaz Pedrosa (Orientadora) e-mail: mmontserratpedrosa@gmail.com.

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

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

**Palavras-chave:** glicogenólise, regime alimentar, metabolismo hepático.

### **Resumo**

Em ratos sob restrição calórica prolongada, o metabolismo de glicose pelo fígado perfundido *in situ* difere daquele de ratos alimentados livremente, especialmente na ação glicogenolítica da adrenalina. Objetivou-se avaliar a cinética da ação da adrenalina em hepatócitos isolados. Ratos criados em ninhadas de 12 filhotes com redução de 50% no alimento ofertado após o desmame (GR), foram comparados com ratos controles (GC, ninhadas de seis filhotes e alimentados livremente após o desmame). Os protocolos experimentais, realizados aos 50-60 dias de idade, envolveram incubação de hepatócitos *in vitro* com adrenalina 1  $\mu$ M em animais em jejum, por períodos de 10, 30 ou 60 minutos. A liberação hepática de glicose mostrou tendência de incremento com os diferentes tempos de incubação (10, 30 e 60 min), indicando que a cinética do agente glicogenolítico não pode ser adequadamente avaliada em hepatócitos isolados.

### **Introdução**

A restrição alimentar é uma intervenção alimentar de longo prazo, na qual a ingestão calórica é inferior ao gasto energético do indivíduo, sem que se chegue ao quadro de desnutrição (BABATA et al., 2015).

O fígado é um órgão central na regulação da homeostase glicêmica 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 (BABATA et al., 2014).

Ratos alimentados livremente após o desmame mostram baixa liberação hepática residual de glicose após jejum noturno, pouca resposta a agentes

glicogenolíticos, e gliconeogênese favorecida, como esperado, uma vez que o jejum depleta os estoques hepáticos de glicogênio e favorece a gliconeogênese. Em ratos sob restrição alimentar prolongada, por outro lado, há uma elevada liberação hepática residual de glicose, indicando intensa glicogenólise mesmo após o jejum noturno. A glicogenólise nesses animais é ainda mais aumentada por adrenalina (BABATA et al., 2014). Em hepatócitos isolados, a liberação residual elevada de glicose nesses ratos foi confirmada; entretanto, a ação da adrenalina mostrou grande variação (dados não publicados).

Como a ação glicogenolítica da adrenalina dura poucos minutos, este trabalho teve como principal objetivo avaliar se é possível acompanhar a cinética da ação da adrenalina em hepatócitos isolados em relação à incubação durante um período fixo de uma hora, tanto em animais provenientes de ninhadas convencionais alimentados livremente (GC) quanto de ninhadas expandidas submetidos a restrição alimentar prolongada (GR).

## Materiais e métodos

### *Tratamento dos Animais*

Foram utilizados *Rattus norvegicus* machos 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, contendo adrenalina 1  $\mu$ M ou sem esse composto (controle), sendo 3 frascos para cada condição. Durante a incubação, ocorreu a parte prática da cinética da ação do composto. No tempo 10 min, foram retirados um frasco de adrenalina e um de controle. O mesmo ocorreu nos tempos 30 e 60 min.

As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante dos frascos foi usado para determinação das concentrações de glicose, piruvato e lactato, expressas em  $\mu$ mol/10<sup>6</sup> cels/hora. Com base nos valores obtidos foi calculada a taxa de glicogenólise por meio da fórmula: prod. de glicose + 1/2(prod. de piruvato + prod. de lactato).

## Resultados e Discussão

Na tabela 1, é possível observar que houve uma tendência de liberação crescente de glicose observada no grupo GC; no entanto, ela foi associada a um efeito cumulativo decorrente do tempo de incubação e não da adrenalina, pois ocorreu a mesma produção crescente de glicose na condição basal (controle). Esses resultados indicam que apesar da adrenalina ter ações hepáticas de curta duração (10-20 minutos), a remoção dos frascos de incubação em intervalos progressivos (10, 30 e 60 min) não permitiu evidenciar a cinética de ação desse agente glicogenolítico. Além disso, ao contrário do observado na perfusão de fígado *in situ* (BABATA et al., 2014), os valores obtidos no grupo GC foram maiores do que aqueles do grupo GR quando tempos e condições correspondentes foram comparados.

Tabela 1: Valores médios da liberação hepática de glicose basal (sem substratos) e estimulada por adrenalina, nos tempos de 10, 30 e 60 minutos, de ratos controle (GC) e sob restrição alimentar de 50% (GR), em jejum noturno, por meio da técnica de hepatócitos isolados.

	CONTROLE			ADRENALINA		
	10'	30'	60'	10'	30'	60'
<b>GC</b>	0,194	0,355	0,899	0,217	0,312	0,815
<b>GR</b>	-	0,219	0,190	-	0,114	0,184

Valores em  $\mu\text{mol}/10^6$  cels/hora.

A tabela 2 mostra a taxa de glicogenólise dos ratos do grupo controle (GC) e restrição alimentar (GR) tanto na condição basal (controle), isto é, sem adição de adrenalina, quanto estimulada por esse agente glicogenolítico, nos tempos de 10, 30 e 60 minutos. Em função da liberação cumulativa de glicose (tabela 1), as taxas de glicogenólise também foram crescentes ao longo da incubação, e mais uma vez os valores do grupo GC foram maiores do que do grupo GR.

Tabela 2: Taxa de glicogenólise basal e estimulada por adrenalina, nos tempos 10, 30 e 60 minutos, de ratos controle (GC) e sob restrição alimentar de 50% (GR), em jejum noturno, por meio da técnica de hepatócitos isolados.

	CONTROLE			ADRENALINA		
	10'	30'	60'	10'	30'	60'
<b>GC</b>	0,276	0,438	1,002	0,318	0,373	0,927
<b>GR</b>	-	0,262	0,225	-	0,168	0,217

Valores em  $\mu\text{mol}/10^6$  cels/hora.

De qualquer forma, os resultados obtidos indicam que a incubação de hepatócitos por períodos de tempo progressivamente mais longos, 10, 30 e 60 minutos, não permite evidenciar a cinética de ação do agente

glicogenolítico adrenalina, em contraste com os resultados obtidos em perfusão de fígado *in situ*. Nesta, a cinética da liberação hepática de glicose é vista claramente.

## Conclusões

Os resultados obtidos indicam que a incubação de hepatócitos por períodos de tempo progressivamente maiores não permite avaliar a cinética da ação de um agente glicogenolítico (adrenalina) sobre os hepatócitos isolados. Desta forma, essa avaliação ainda depende da perfusão de fígado, onde a coleta de amostras do fluido de perfusão mostra com clareza a ação progressiva desse agente.

## 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.; MALTA, A.; GODOI, V. A. F.; PEDROSA, M. M. D. Acute exercise and caffeine improve insulin-induced hypoglycemia in normal and malnourished rats. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v.37(1), n. 123-130, 2015.

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, artigo 969137, 2014.