

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PRECURSORES GLICONEOGÊNICOS HEPÁTICOS NA RECUPERAÇÃO DA HIPOGLICEMIA INDUZIDA POR INSULINA (HII)

Franciele Neves Moreno

Especialista em Fisiologia Humana pela Universidade Estadual de Maringá – UEM. E-mail: francielemoreno@ig.com.br

Kátia Fialho do Nascimento

Docente da Universidade do Paraná – Cascavel. Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular) pela Universidade Estadual de Maringá – UEM. E-mail: Kátia@unipar.br

Vilma Aparecida Ferreira de Godoi Gazola

Docente adjunto do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM; Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular) pela Universidade Estadual de Maringá – UEM. E-mail: vafggazola@uem.br

Rosângela Fernandes Garcia

Docente adjunta do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM; Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular) pela Universidade Estadual de Maringá – UEM; Docente e orientadora do Curso de Pós-Graduação lato sensu em Fisiologia da Universidade Estadual de Maringá – UEM. E-mail: rfgarcia@uem.br

RESUMO: A terapia intensiva de insulina determina um controle glicêmico rigoroso, mas resulta numa incidência aumentada de hipoglicemia induzida pela insulina (HII). A disponibilidade de precursores gliconeogênicos é crucial para a produção hepática de glicose e sua oferta oral promove recuperação diferenciada da glicemia. Considerando que o fígado desempenha papel central na regulação da glicemia, nossa pesquisa teve como objetivo investigar sua participação nos mecanismos de recuperação da HII, a partir da administração oral de precursores gliconeogênicos em ratos com 6 horas de privação alimentar. Nossos resultados demonstraram que o glicerol, o piruvato e a L-glutamina apresentaram tendência de elevar a glicemia aos 8 min após gavagem. No entanto, a partir de 30 min somente a L-alanina e a L-glutamina apresentaram a menor queda da glicemia. O piruvato e o glicerol apresentaram o mesmo efeito efêmero da glicose sobre a recuperação da glicemia, ou seja, elevação inicial e agravamento posterior do quadro. Após 1h da administração o efeito positivo da L-alanina desaparece tornando-a inapropriada contra queda da glicemia em tempos prolongados, enquanto a L-glutamina sustentou um maior valor glicêmico. Concluímos que provavelmente pelo fato do hepatócito encontrar-se mais reduzido quando a L-glutamina é o precursor gliconeogênico o efeito deste aminoácido a longo prazo seria favorecido.

PALAVRAS-CHAVE: Hipoglicemia; Insulina; Gliconeogênese; Metabolismo.

EFFECTS OF ORAL ADMINISTRATION OF HEPATIC GLUCONEOGENIC PRECURSORS IN INSULIN-INDUCED HYPOGLYCAEMIA

ABSTRACT: Although intensive insulin therapy determines a strict glycaemic control, an increased incidence of insulin-induced hypoglycemia (IIH) occurs. The availability of gluconeogenic precursors is crucial for hepatic glucose production and oral supply promotes differentiated recovery of blood glucose. Since the liver plays a central role in the regulation of blood glucose, current research investigates its involvement in the mechanisms of IIH recovery by the oral administration of gluconeogenic precursors in rats fasting for 6

hours. Results show that glycerol, pyruvic acid and L-glutamine tended towards a rise in blood glucose levels 8 min after gavage. However, after 30 min, only L-alanine and L-glutamine showed the lowest decrease in blood glucose. Pyruvic acid and glycerol showed the same transient glucose effect on the recovery of blood glucose, or rather, an initial rise and subsequent worsening of the condition. After one hour the positive effect of L-alanine disappeared and became inappropriate for a decrease in blood glucose during prolonged periods, while L-glutamine maintained a higher glycaemic rate. Perhaps due to the fact that the hepatocyte is reduced when L-glutamine is the gluconeogenic precursor, the effect of this aminoacid would in the long run be favored.

KEYWORDS: Hypoglycaemia; Insulin; Glyconeogenesis; Metabolism.

INTRODUÇÃO

Na última década, o efeito da terapia intensiva de insulina para reduzir as complicações crônicas do diabetes tem sido convincentemente demonstrado em estudos clínicos (DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL, 1993; UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY, 1998). Hoje, não se questiona o valor da terapia intensiva de insulina em proteger contra complicações micro e macrovasculares. Entretanto, o controle glicêmico rigoroso está associado com uma incidência aumentada de hipoglicemia induzida pela insulina (HII), sendo a principal limitação para a implementação do tratamento (DAVIS; ALONSO, 2004).

O fígado desempenha papel central na regulação da glicemia (MOORE; CONNOLLY; CHERRINGTON, 1998; CARVALHO *et al.*, 2002; JIANG; ZHANG, 2002), esta função glicorreguladora depende de mecanismos precisos que, atuando sobre o fígado, modulam sua função fazendo-o variar entre a liberação e captação equilibradas da glicose.

Para conhecer melhor o mecanismo de HII, utilizamos um modelo experimental de hipoglicemia obtida por injeção intraperitoneal de uma dose farmacológica de insulina regular em ratos com 6 horas de privação alimentar (SOUZA *et al.*, 1994a; 1994b). Assim, usando este modelo observou-se que a administração de insulina promove não somente hipoglicemia, mas redução da concentração sanguínea de glicerol, L-lactato e L-alanina (SOUZA *et al.*, 2001a; 2001b), que poderia ser atribuída a uma maior utilização destes precursores de glicose e/ou a inibição de sua mobilização pela insulina. Em adição, a

capacidade gliconeogênica hepática apresentou-se aumentada a partir de concentrações saturantes destes substratos gliconeogênicos (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Estes resultados foram reforçados em estudos com ratos submetidos a jejum de 24 horas e HII de curto (GAZOLA *et al.*, 2007) e longo prazo (GARCIA *et al.* 2007; 2008). Concluímos então que a disponibilidade de substratos gliconeogênicos durante HII é crucial para a recuperação da glicemia.

Devido ao fato de que durante HII os níveis destes precursores de glicose encontram-se reduzidos no sangue, foram realizados estudos mostrando que a administração intraperitoneal (SOUZA *et al.*, 2001a) e oral (NASCIMENTO *et al.*, 2008) de precursores gliconeogênicos foi capaz de promover a recuperação da glicemia 30 min após. Entretanto, a recuperação da glicemia após administração oral (gavagem) de glicerol apresentou tal efeito com menor tempo (8 min após gavagem). Este fato nos alertou para um possível efeito tempo dependente de cada precursor gliconeogênico na recuperação da hipoglicemia.

Com o objetivo de dar continuidade aos estudos anteriores em ratos, com 6 horas de privação alimentar e HII, propomos investigar o efeito da administração oral de glicose e sacarose e dos precursores gliconeogênicos L-alanina, L-glutamina, L-lactato, piruvato e glicerol, isolados ou combinados na recuperação da glicemia, por um período de 60 minutos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (180-220 g), oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, mantidos a temperatura em torno de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os animais tiveram livre acesso ao alimento (ração balanceada Nuvilabe) até o dia do experimento e água à vontade. No dia do experimento os animais foram transferidos para gaiolas individuais e o alimento retirado às 8 horas da manhã, de forma que no momento do experimento, a ser iniciado às 14 horas, os animais apresentavam-se com 6 horas de privação alimentar.

2.2 MODELO EXPERIMENTAL

O modelo de HII utilizado foi o previamente estabelecido por Souza e colaboradores (1994a; 1994b) obtido através da administração i.p. de insulina regular (1U/kg), em que a glicemia apresentou declínio significativo 30 min após, tempo selecionado para a realização da gavagem.

2.3 ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PRECURSORES GLICONEOGÊNICOS

Para investigarmos o efeito da administração oral de L-alanina, L-glutamina, L-lactato e piruvato isolados, 100mg/Kg de cada substância foi administrada por gavagem 30 min após a injeção de insulina, um grupo recebeu uma combinação destes precursores gliconeogênicos na dose total de 100 mg/Kg. Além desses, foram incluídos 3 sub-grupos (controles) que receberam glicose ou sacarose (100 mg/Kg) ou salina 30 minutos após a injeção de insulina. Amostras de sangue foram coletadas por via caudal e a glicemia determinada 0, 8, 30 e 60 min após gavagem.

O protocolo experimental de gavagem foi realizado com aprovação pela Comissão de Ética Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEAE) sob o Parecer nº 055/2008.

2.4 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE.

As concentrações de glicose no soro foram medidas pelo método da glicose-oxidase (BERGMEYER; BERNT, 1974). A glicemia foi expressa em mg/dL.

2.5 PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO

As concentrações sanguíneas de glicose foram avaliadas empregando-se o teste “t” de Student através do programa GraphPad-Prism (versão 5.0). Foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todos os valores foram apresentados como média \pm erro padrão (EP).

3 RESULTADOS

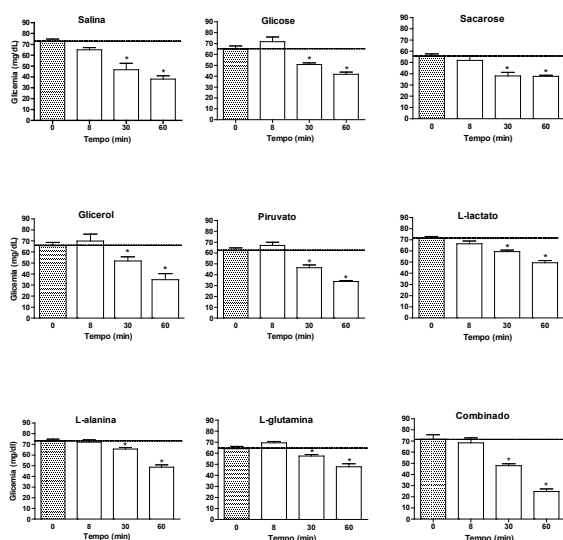
Todos os resultados estão expressos na figura 1. Os valores glicêmicos obtidos a partir da administração oral de salina demonstraram tendência de queda da glicemia 8 min após a gavagem. Esta queda tornou-se mais intensa ($p < 0,05$) aos 30 e 60 min, atingindo valores glicêmicos perigosamente baixos.

Em comparação com o grupo salina, o grupo que recebeu glicose teve uma elevação transitória da glicemia acima do valor inicial seguida de queda progressiva aos 30 e 60 min ($p < 0,05$) após a sua administração. O grupo que recebeu sacarose não apresentou elevação transitória da glicemia, mas queda significativa e sustentada a partir de 30 min.

A administração oral dos precursores gliconeogênicos glicerol, piruvato e L-lactato também apresentou queda progressiva ($p < 0,05$) da glicemia a partir de 30 min. No entanto, glicerol e piruvato, mostraram elevação transitória da glicemia acima do valor inicial aos 8 min, efeito não observado quando o precursor foi o L-lactato.

Comparando com o grupo que recebeu salina, os animais que receberam os aminoácidos L-alanina e L-glutamina apresentaram uma menor queda da glicemia a partir dos 30 min. Assim como a glicose, piruvato e glicerol, a L-glutamina também apresentou elevação transitória da glicemia 8 min após a gavagem. O aminoácido L-glutamina foi o precursor que apresentou menor queda glicêmica 60 min após a gavagem.

A oferta oral dos precursores combinados sustentou a glicemia nos primeiros minutos, no entanto, promoveu queda glicêmica maior que os precursores isolados 60 min após a sua administração, atingindo valores menores que a ausência de precursor.



Figural: Resposta glicêmica de ratos normais submetidos à privação alimentar de 6h e HII.

Os animais de cada grupo receberam administração oral de salina ou 100mg/Kg de glicose, sacarose, glicerol, piruvato,

L-lactato, L-alanina, L-glutamina ou a combinação dos precursores gliconeogênicos 30 min após a administração de insulina (tempo 0 min). A glicemia foi monitorada por um período de 60 min após a gavagem. Os dados foram expressos como média \pm EP de 6–8 experimentos individuais.

* $p < 0,05$ vs tempo 0 min.

4 DISCUSSÃO

A disponibilidade de precursores gliconeogênicos é crucial para a produção hepática de glicose. Está bem estabelecido que a HII provoca a liberação dos hormônios contrarreguladores glucagon (DOBBINS *et al.*, 1991), epinefrina (BOLLI, 1998), hormônio do crescimento (CREYER, 1996) e cortisol (DE FEO *et al.*, 1989) que superam o efeito inibitório da insulina na gliconeogênese hepática (NEWSHOLME; LEECH, 1983). Todavia, a possibilidade desta alteração metabólica auxiliar na recuperação da glicemia é limitada, visto que a concentração dos precursores de glicose no sangue diminua

durante a HII (SOUZA *et al.*, 2001a; 2001b; GARCIA *et al.*, 2007; GAZOLA *et al.* 2007).

Ratos submetidos à HII e privação alimentar de 6 horas apresentaram uma recuperação diferenciada da glicemia quando precursores gliconeogênicos foram administrados por via oral 30 min após gavagem, mostrando o efeito de curto prazo do glicerol (NASCIMENTO *et al.*, 2008). O resultado obtido com o glicerol mostrou-nos a necessidade de fazer uma avaliação temporal mais detalhada e ampla da glicemia, por isso realizamos uma avaliação temporal acompanhando a glicemia por um período de 60 min após a administração oral, ou seja, 90 min após a injeção de insulina. Além disso, incluímos uma avaliação temporal da própria glicose, visto ser o principal antídoto utilizado contra a hipoglicemia (MOORE; WOOLLARD, 2005) e da sacarose (açúcar comercial mais comum) na nossa análise.

Apesar de a glicose mostrar tendência de elevar transitoriamente a glicemia aos 8 min, sua oferta oral resultou posteriormente numa queda pronunciada da glicemia, reforçando resultados obtidos anteriormente (SOUZA *et al.*, 2001a; 2001b; GAZOLA *et al.*, 2007), onde observamos um efeito refratário da glicose sobre a recuperação endógena da glicemia após HII. A sacarose mostrou um comportamento diferente da glicose por não promover elevação da glicemia 8 min após sua administração. Após 30 min da administração de glicose e sacarose, ambas apresentaram uma queda significativa da glicemia sustentada nos 30 min seguintes pelos ratos que receberam sacarose oral, mas acentuada pela gavagem com glicose.

A sacarose é um dissacarídeo e sua hidrólise intestinal gera os monossacarídeos glicose e frutose que, uma vez livres, são absorvidos pelos enterócitos. Provavelmente por isso não há tendência inicial de elevação da glicemia aos 8 min como visto com a glicose pura. No entanto, a diferença de resposta nos tempos 30 min e 60 min são um alerta, ou seja, é provável que diferentes açúcares, agindo por diferentes mecanismos, promovam efeitos diferenciados sobre a glicemia e merecem ser posteriormente investigados.

Os precursores glicerol, piruvato e L-glutamina apresentaram tendência de elevar transitoriamente a glicemia aos 8 min, efeito compartilhado com a própria glicose. Entretanto o L-lactato apresentou tendência em reduzir a glicemia aos 8 min aproximando-se do valor do grupo salina (sem precursor).

No entanto, 30 min após a gavagem somente a L-alanina e a L-glutamina apresentaram a menor queda da glicemia. A

presença desses aminoácidos resultou numa queda da glicemia de somente 10% a partir do valor inicial, enquanto os outros precursores provocaram quedas que variaram entre 17% (L-lactato) a 33% (combinação). Os precursores piruvato e glicerol apresentaram o mesmo efeito efêmero da glicose sobre a recuperação da glicemia, ou seja, elevação inicial e agravamento do quadro posteriormente.

Era esperado que o piruvato, o L-lactato, e o glicerol, por serem os precursores mais simples e de acesso direto à gliconeogênese hepática, demonstrassem resultados melhores do que os obtidos. No entanto, os aminoácidos se mostraram mais eficientes como precursores de glicose, apesar da formação simultânea de ureia consumir energia e intermediários gliconeogênicos (GAZOLA *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2008).

Após 60 min o glicerol, piruvato e a combinação apresentaram os piores resultados glicêmicos, atingindo valores de glicemia inferiores ao do grupo que recebeu salina, ou seja, o efeito inicial benéfico do glicerol e do piruvato converte-se num efeito maléfico importante ao longo do tempo. A combinação dos precursores foi inválida em atingir as vias em tempos diferentes e com isso obter benefícios glicêmicos. Aparentemente essa combinação acentua o efeito negativo. Uma opção seria selecionar e oferecer os precursores que englobassem somente efeitos positivos sobre a glicemia em todos os tempos.

De todos os precursores utilizados, a L-glutamina foi o precursor que apresentou menor queda a partir do tempo inicial (25%). Como a via gliconeogênica é dependente da presença de equivalentes redutores, a metabolização diferenciada da L-alanina e da L-glutamina pode ser um fator importante na correção da glicemia. A L-alanina tem metabolização principalmente citoplasmática e a L-glutamina mitocondrial. A geração de equivalentes redutores é principalmente mitocondrial e, à medida que a hipoglicemia progride, há depleção dos mesmos. Resultados anteriores (SOUZA *et al.*, 2001a), em perfusão de fígado *in situ*, mostraram que o citosol encontra-se mais reduzido quando a L-glutamina é o precursor gliconeogênico e mais oxidado quando a L-alanina é utilizada. Este pode ser um fator importante na redução de efeito da L-alanina e favorecimento do efeito da L-glutamina a longo prazo.

A relação entre dose e efeito não foi considerada nestes experimentos, e experimentos anteriores (GARCIA *et al.*, 2007; 2008; GAZOLA *et al.*, 2007) demonstraram que há uma clara relação entre a recuperação hepática da glicemia e a

concentração do precursor.

Os resultados obtidos demonstraram que os precursores de glicose apresentam tempo de resposta diferenciado, provavelmente devido às características individuais de cada um. Portanto, a continuidade das investigações é necessária para determinar a viabilidade de utilização de precursores de glicose no tratamento do HII, além do mais a diferença de resultado entre glicose e sacarose também deve ser investigada já que a sacarose é o açúcar mais utilizado pela população.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nestes resultados, verificamos que a L-glutamina é o precursor que promove menor queda da glicemia, apresentando um “efeito protetor”. Nossas investigações sugerem a possibilidade da administração de precursores de glicose no tratamento da HII, entretanto, experimentos adicionais e investigações clínicas são necessários para confirmar essa sugestão.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem ao CNPq (Iniciação Científica) e a Elizete Rosa dos Santos pelo auxílio técnico.

REFERÊNCIAS

- BERGMEYER, H. U.; BERNT, E.. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. New York: Verlag Chemie-Academic Press, 1974. p. 1205-1215.
- BOLLI, G. B. Importance of catecholamines in defense against insulin hypoglycemia in humans. **Adv. Pharmacol.**, v. 42, p. 627-630, 1998.
- CARVALHO, R. A. *et al.*. Hepatic gluconeogenesis and Krebs cycle fluxes in a CCl₄ model of acute liver failure. **NMR Biomed.**, v. 15, n. 1, p. 45-51, 2002.
- CREYER, P. E.. Role of growth hormone in glucose counterregulation. **Horm. Res.**, v. 46, p. 192-194, 1996.
- DAVIS, S.; ALONSO, M. D. Hypoglycemia as a barrier to glycemic control. **J. Diab. Compl.**, v. 18, p. 60-68, 2004.
- DE FEO, P. *et al.*. Contribution of cortisol to glucose counterregulation in humans. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. E35-E42, 1989.

- DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL – DCCT. Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 977-986, 1993.
- DOBBINS, R. L. *et al.* Role of glucagon in countering hypoglycemia induced by insulin infusion in dogs. **Am. J. Physiol.**, v. 261, n. 24, p. E773-E781, 1991.
- GARCIA, R. F. *et al.* Blood amino acids concentration during insulin induced hypoglycemia in rats: the role of alanine and glutamine in glucose recovery. **Amino Acids**, v. 33, n. 1, p. 151-155, 2007.
- GARCIA, R. F. *et al.* Oral Glutamine Dipeptide Promotes Acute Glycemia Recovery in Rats Submitted to Long-Term Insulin Induced Hypoglycemia. **Lat. Am. J. Pharm.**, n. 27, n. 2, p. 229-234, 2008.
- GAZOLA, V A. *et al.* Acute effects of isolated and combined L-alanine and L-glutamine on hepatic gluconeogenesis, ureagenesis and glycaemic recovery in experimental short-term insulin induced hypoglycemia. **Cell Biochem. Funct.**, v. 25, n. 2, p. 211-216, 2007.
- JIANG, G.; ZHANG, B. B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 284, p. E671-E678, 2002.
- MOORE, M. C.; CONNOLLY, C. C.; CHERRINGTON, A. D. Autoregulation of hepatic glucose production. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 138, p. 240-248, 1998.
- MOORE, C.; WOOLLARD, M.. Dextrose 10% or 50% in the treatment of hypoglycemia out of hospital? A randomized controlled trial. **Emergency Med. J.**, v. 22, p. 512-515, 2005.
- NASCIMENTO, K. F. *et al.* Contribution of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in the defense against short-term insulin induced hypoglycemia in rats. **Life Sci.**, v. 82, p. 1018-1022, 2008.
- NEWSHOLME, E. A.; LEECH, A. R.. **Biochemistry for Medical Sciences**. [S. L.]: John Wiley & Sons, 1983.
- SOUZA, H. M. *et al.* Effect of combined administration of counterregulatory hormones during insulin induced hypoglycemia in rats: lipolysis mediated by a b-adrenergic mechanism contributes to hyperglycemia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2883-2887, 1994a.
- _____ *et al.* Uma nova abordagem experimental para investigação da interação sinérgica de hormônios contrarreguladores na recuperação da glicemia após hipoglicemia induzida por insulina em ratos. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 37, n. 4, p. 737-744, 1994b.
- _____ *et al.* Rat liver responsiveness to gluconeogenic substrates during insulin-induced hypoglycemia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 771-777, 2001a.
- _____ *et al.* Combined administration of glucose precursors is more efficient than that of glucose itself to recovery from hypoglycemia. **Res. Commun. Molec. Pathol. Pharmacol.**, v. 110, p. 246-272, 2001b.
- UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY - UKPDS group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**, v. 352, p. 837-853, 1998.

Recebido em: 08 Fevereiro 2011

Aceito em: 03 Setembro 2011