



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



MARCIA APARECIDA CARRARA

**COEXISTÊNCIA DE RESISTÊNCIA À INSULINA E
ELEVADA TOLERÂNCIA À GLICOSE EM RATAS
PRENHES: UM MECANISMO FISIOLÓGICO PARA A
MANUTENÇÃO DA GLICEMIA**

MARINGÁ
2013

MARCIA APARECIDA CARRARA

**COEXISTÊNCIA DE RESISTÊNCIA À INSULINA E
ELEVADA TOLERÂNCIA À GLICOSE EM RATAS
PRENHES: UM MECANISMO FISIOLÓGICO PARA A
MANUTENÇÃO DA GLICEMIA**

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto B. Bazotte

MARINGÁ
2013

DEDICATÓRIA

*À minha família por todo apoio, incentivo e dedicação, mas principalmente pelo amor
constante.*

AGRADECIMENTOS

A Deus nosso Pai, criador e fonte de infinita sabedoria, que conduziu e iluminou meu caminho para que eu chegasse até essa etapa de minha vida.

Aos meus pais, Roberto Elias Carrara (*in memorian*) e Zenaide Aparecida Barbosa Carrara, que sempre incentivaram e apoiaram meus estudos, além do seu amor incondicional.

Às minhas irmãs Kátia Regiane Carrara Peri e Cássia Regina Barbosa Carrara Araújo, pelo amor fraternal, cuidado, compreensão e apoio constante.

Ao meu namorado Rodrigo Fernando Albieri Fábio, pela paciência e compreensão em ter sido por vezes privado de minha companhia, mas principalmente pelo amor, apoio e incentivo.

Ao professor Dr. Roberto Barbosa Bazotte, agradeço por toda sua dedicação e competência na orientação deste trabalho. Obrigada pela amizade e incentivo em minha carreira profissional.

À professora Dra. Márcia Regina Batista, agradeço por ter me dado a oportunidade de iniciar minha carreira acadêmica, pela confiança, e pelos anos de amizade e carinho.

Aos amigos de laboratório, Any, Fabi, Ton, Antônio, Vânia, Marcio, Carlão e Soli, pelo companheirismo, alegrias, sorrisos e carinho a cada dia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por ter proporcionado as condições necessárias para realização deste trabalho e aos professores do curso pelos conhecimentos transmitidos.

À secretaria de pós-graduação, na pessoa de Francisca Helena M. de Carvalho, pela dedicação, alegria e disposição em sempre cooperar.

RESUMO

Introdução. Durante a gestação o risco de hiperglicemia (diabetes gestacional) e hipoglicemia está aumentado. Com base neste fato investigou-se a resistência à insulina (RI) e a tolerância à glicose (TG) em ratas prenhes (RP) e não-prenhes (RNP). **Métodos.** Empregou-se ratas Wistar com 0 (RNP), 7 (RP dia 7), 14 (RP dia 14) e 20 (RP dia 20) dias de gestação. Para os testes de tolerância à insulina (ITT) ou à glicose (GTT) convencionais, ratas em jejum (12h) receberam intraperitonealmente insulina regular (1 U/kg) ou glicose (1 g/kg) via oral (gavagem). O sangue para avaliação da glicemia foi coletado 0, 10 e 60 min após a administração de insulina (ITT) ou glicose (GTT). O ITT e o GTT convencionais foram repetidos utilizando a técnica RT-CGMS (monitoração contínua da glicemia em tempo real). Além disso, utilizou-se também a técnica de perfusão de fígado para avaliação da gliconeogênese, inferida pela produção hepática de glicose (PHG) a partir de alanina (5 mM), glutamina (5 mM) e glicerol (2 mM) no estado de jejum (12 h) e o catabolismo do glicogênio (glicogenólise) induzido por adrenalina no estado alimentado. **Resultados.** Após a injeção de insulina (ITT convencional) a redução da glicemia entre 0 e 60 min foi de 70%, 72%, 68% e 55% para os grupos RNP (dia 0), RP (dia 7), RP (dia 14) e RP (dia 20), respectivamente. No GTT convencional, o aumento da glicemia após a administração de glicose entre 0 e 10 min foi de 87%, 87%, 60% e 60% para os grupos RNP (dia 0), RP (dia 7), RP (dia 14) e RP (dia 20), respectivamente. Como o ITT e o GTT convencional demonstraram a coexistência de RI e maior TG no grupo RP (dia 20) este grupo foi empregado nos experimentos subsequentes. A cinética da concentração de glicose de acordo com o RT-CGMS mostrou menor concentração de glicose no jejum e estado alimentado no grupo RP (dia 20) em relação ao grupo RNP. Além disso, o ITT e GTT avaliados por RT-CGMS mostraram RI e maior TG, respectivamente para o grupo RP (dia 20) em relação ao grupo RNP (dia 0). Por outro lado, o grupo RP (dia 20) apresentou menor ($p < 0,05$) PHG a partir da alanina e da glutamina e maior ($p < 0,05$) PHG a partir do glicerol em relação ao grupo RNP (0 dia). Entretanto, as taxas basais da glicogenólise e sua ativação, induzidas por adrenalina, foram semelhantes (RP - dia 20 vs. RNP (dia 0)). **Conclusão:** A PHG através da neogliconeogênese e glicogenólise não contribui para as alterações na glicemia da rata gestante. Porém, a coexistência de RI e maior TG durante a gestação avançada representa um importante mecanismo fisiológico que garantiria a disponibilidade de glicose para sustentar o rápido crescimento fetal durante a gestação avançada e prevenir a hipoglicemia durante o jejum.

Palavras-chave: gestação, diabetes gestacional, produção hepática de glicose, resistência à insulina, hipoglicemia, sistema de monitoração contínua de glicose.

ABSTRACT

Introduction. During the pregnancy there is an increased risk of hyperglycemia (gestational diabetes) and hypoglycemia. For this reason, it was investigated the insulin resistance (IR) and glucose tolerance (GT) in pregnant rats (PR) and no pregnant rats (NPR). **Methods.** Female Wistar rats with 0 (NPR), 7 (PR day 7), 14 (PR day 14) and 20 (PR day 20) days of pregnancy were used. For conventional insulin tolerance test (ITT) or glucose tolerance test (GTT) female rats were fasted (12h) and received intraperitoneal regular insulin (1 U / kg) or oral glucose (1 g/kg) by gavage. To evaluate glycemia, the blood was collected 0, 10, and 60 min after of insulin (ITT) or glucose (GTT) administration. The conventional ITT and GTT were repeated using the RT-CGMS (Real-time Continuous Glucose Monitoring System) technique. Moreover, It was used the liver perfusion technique to evaluate gluconeogenesis, inferred by the hepatic glucose production (HGP) from alanine (5mM), glutamine (5mM) and glycerol (2mM) in the fasted state (12 h) and the glycogen catabolism (glycogenolysis) induced by adrenaline in the fed state. **Results.** After insulin administration (conventional ITT), the blood glucose reduction between 0 and 60 min was 70%, 72%, 68% and 55% for NPR group (day 0), PR (day 7), PR (day 14), and PR (day 20), respectively. Moreover, after oral administration of glucose (conventional GTT) the increase of glycemia between 0 to 10 min was 87%, 87%, 60% and 60% for the NPR group (day 0), PR (day 7), PR (day 14), and PR (day 20), respectively. Since, the conventional ITT and GTT demonstrated the coexistence of IR and increased GT in PR group (day 20), this group was used in the subsequent experiments. The kinetic of glucose concentration according to the RT-CGMS showed lower glucose concentration in the fasted and fed state to the PR group (day 20) in comparison with NPR group (day 0). Moreover, the ITT and GTT evaluated by RT-CGMS showed higher IR and GT, respectively (PR group - day 20 vs. NPR group - day 0). On the other hand, the PR (day 20) group showed lower ($p < 0.05$) HGP from alanine and glutamine and higher HGP ($p < 0.05$) from glycerol in comparison with NPR group (0 day). However, the basal rates of glycogenolysis and its activation induced by adrenaline were similar (PR - day 20 vs. NPR - day 0). **Conclusion.** The HGP from gluconeogenesis and glycogenolysis did not contribute to the glycemic changes of the pregnant rats. However, the coexistence of IR and increased GT during the late pregnancy may represent an important physiological mechanism to permit glucose availability to sustain the rapid fetal growth during late pregnancy and prevent hypoglycemia during fasting.

Keywords: pregnancy, gestational diabetes, liver glucose production, insulin resistance, hypoglycemia, continuous glucose monitoring system.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AF: 4-aminofenazona

AGLs: Ácidos Graxos Livres

AUC: Área sob a Curva

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DMG: Diabetes Mellitus Gestacional

GH: Hormônio do Crescimento

GLUT 4: Transportador de glicose 4

GOD: Glicose Oxidase

GTT: Teste de Tolerância a Glicose

HDL: High-density Lipoprotein

HLP: Hormônio Lactogênico Placentário

IRS-1: Insulin Receptor Substrate-1

ITT: Teste de Tolerância à Insulina

KH: Krebs Henseleit

LDL: Low-density Lipoprotein

PHG: Produção Hepática de Glicose

POD: Peroxidase

RNP: Ratas Não-Prenhes

RP: Ratas Prenhes

RSI: Redução da Sensibilidade a Insulina

RT-CGMS: Real Time- Continuous Glucose Monitoring System

SNC: Sistema Nervoso Central

TG: Tolerância à Glicose

TNF-alfa: Fator de Necrose Tumoral Alfa

UFP: Unidade Feto-Placentária

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Foto 1: Sistema RT-CGMS (Esquema de inserção do equipamento no animal).

Foto 2: Sistema de perfusão de fígado *in situ*.

Figura 1. Teste convencional de tolerância à insulina (ITT): (A) ratas não-prenhes (0 dia); (B) ratas prenhes (7 dias); (C) ratas prenhes (14 dias); (D) ratas prenhes (20 dias). ^(a) $p < 0,05$ - 0 min vs 10 min, ^(b) $p < 0,05$ - 10 min x 60 min, ^(c) $p < 0,05$ - 0 min vs 60 min. Os dados são apresentados como a média \pm EPM de 7-9 animais por grupo.

Figura 2. Teste convencional de tolerância à glicose: (A) ratas não-prenhes (0 dia); (B) ratas prenhes (7 dias); (C) ratas prenhes (14 dias); (D) ratas prenhes (20 dias). ^(a) $p < 0,05$ - 0 min vs 10 min, ^(b) $p < 0,05$ 10 min x 60 min. Os dados são apresentados como a média \pm EPM de 7-9 animais por grupo.

Figura 3. Cinética da concentração de glicose (mg/dL) no fluido intersticial pela técnica da RT-CGMS, no dia 0 (●) e dia 20 (■) de gestação (nos estados alimentados e de jejum). O horário de início da privação alimentar está representado pela linha vertical pontilhada. Os dados estão representados como a média \pm EPM de 5 medidas.

Figura 4. Experimento demonstrativo das concentrações de glicose (mg/dL) no fluido intersticial pela técnica da RT-CGMS no dia 0 (●) e dia 20 (■) de gestação após administração intraperitoneal de insulina (1 U/kg) (A) e administração oral (gavagem) de glicose (1 g/kg) (B). O horário das administrações está representado pela linha vertical pontilhada.

Figura 5. Gliconeogênese a partir da L-alanina (A), L-glutamina (B) e do glicerol (C) em fígados de ratas no dia 0 (●) e dia 20 (■) de gestação, após jejum de 12h. O efluente perfusato foi colhido em intervalos de 5 min para avaliação de glicose. Os dados são apresentados como a média \pm EPM de 3-6 experimentos. (AUC ($\mu\text{mol/g}$) \pm EPM).

Figura 6. Glicogenólise hepática de ratas alimentadas no dia 0 (●) e dia 20 (■) de gestação durante a infusão de adrenalina. A concentração de glicose a partir do efluente foi avaliada a cada 5 min. Os dados estão representados como a média \pm EPM de 3-6 experimentos. (AUC ($\mu\text{mol/g}$) \pm EPM).

PUBLICAÇÕES DO PRESENTE TRABALHO

ARTIGO PUBLICADO

Marcia Aparecida Carrara, Márcia Regina Batista, Tiago Ribeiro Saruhashi, Antonio Machado Felisberto-Júnior, Marcio Guilhermetti, Roberto Barbosa Bazotte. **Coexistence of insulin resistance and increased glucose tolerance in pregnant rats: a physiological mechanism for glucose maintenance.** *Life Sciences*, v.90, p.831-37, 2012.

CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

Marcia Aparecida Carrara e Roberto Barbosa Bazotte. **Situações Especiais em Diabetes Mellitus.** In: Roberto B. Bazotte. *PACIENTE DIABÉTICO: Cuidados Farmacêuticos*. 1. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2010. cap. 15, p. 157 - 166.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 REGULAÇÃO DA GLICEMIA	13
2.1.1 Variação na concentração sérica de substratos metabólicos	13
2.1.2 Regulação neural	14
2.1.3 Regulação endócrina: insulina e contrarreguladores	15
2.2 GESTAÇÃO.....	17
2.2.1 Mudanças metabólicas durante a gestação	17
2.2.2 Metabolismo de glicose na gestação	18
2.2.2.1 Resistência à insulina na gestação	18
2.2.2.2 Hipoglicemia na gestação	20
2.2.3 Diabetes Mellitus Gestacional	20
2.2.4 Metabolismo dos lipídios na gestação	21
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 ANIMAIS	23
4.1.1 Avaliação do ciclo estral e determinação da gestação.....	23
4.2 MATERIAIS	24
4.3 EXPERIMENTOS.....	24
4.3.1 Teste Convencional de Tolerância à Insulina (ITT).....	24
4.3.2 Teste Convencional de Tolerância à Glicose (GTT).....	25
4.3.3 RT-CGMS (Sistema de Monitoração Contínua da Glicemia em tempo real).....	25
4.3.4 Perfusão de fígado <i>in situ</i>	26
4.3.5 Determinações bioquímicas.....	29
4.3.5.1 Dosagem de glicose no perfusato e no soro	29
4.3.6 Análise Estatística.....	29

5. RESULTADOS	30
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO.....	39
8. REFERÊNCIAS.....	40
9. PUBLICAÇÕES	45
9.1 ARTIGO: Coexistence of insulin resistance and increased glucose tolerance in pregnant rats: a physiological mechanism for glucose maintenance (Anexo)	
9.2 CAPÍTULO DE LIVRO: Situações especiais em diabetes mellitus (Anexo)	

1 INTRODUÇÃO

A gestação tem sido descrita como um estado de “fome acelerada” devido às necessidades metabólicas da mãe (JOHNSON, 2008). É um período marcado por profundas mudanças no padrão metabólico e hormonal da mulher (CATALANO *et al.* 1993). Neste período, a habilidade em regular o balanço de nutrientes é crítica tanto para a saúde da mãe quanto para o crescimento do feto (KIRWAN *et al.* 2002).

As alterações do metabolismo materno se iniciam no primeiro trimestre quando predomina o impacto do aumento da utilização de glicose materna pelo feto, com tendência de hipoglicemia e redução das necessidades de insulina. Entretanto, a principal alteração é a resistência insulínica que se manifesta pela redução aproximada de 50% na sensibilidade à insulina no terceiro trimestre (GOLBERT e CAMPOS, 2008; MELCZER *et al.* 2002; CONNOLLY *et al.* 2007; LAIN e CATALANO, 2007).

Os fatores fisiológicos responsáveis pela diminuição da sensibilidade à insulina na gestação não são bem conhecidos, mas estão parcialmente relacionados com os efeitos metabólicos de vários hormônios e citocinas que estão elevados na circulação materna durante a gestação, resultantes principalmente de alterações importantes na fronteira entre a mãe e o feto, a unidade feto-placentária (UFP). Essa interface é um local de produção e secreção de importantes proteínas e hormônios esteróides e muitas das alterações endócrinas e metabólicas que ocorrem durante a gravidez podem ser diretamente atribuídas a sinais hormonais provenientes da UFP (AL-NOAEMI e SHALAYEL, 2011). Tais hormônios potenciais incluem o hormônio lactogênico placentário (HLP), estrógeno, progesterona, prolactina, cortisol e leptina (LAIN e CATALANO, 2007; KIRWAN *et al.* 2002). Segundo FERRADA *et al.* (2007), o rápido desaparecimento do HLP e a redução das concentrações do hormônio de crescimento (GH) estão associados com um aumento da sensibilidade à insulina,

o que é coerente com a ideia de que tais hormônios estão relacionados com a resistência à insulina durante a gestação.

O aumento do peso corporal também contribui para a diminuição da sensibilidade à insulina (GOLBERT e CAMPOS, 2008).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REGULAÇÃO DA GLICEMIA

A glicose é a principal fonte de energia para o cérebro, e o controle fisiológico da glicemia reflete as necessidades de manter o aporte adequado de combustível após as refeições e durante o jejum (RANG e DALE, 2011). A manutenção da glicemia em uma faixa relativamente estreita (70 a 99 mg/dL no jejum e abaixo de 140 mg/dL após a refeição) é um reflexo do balanço entre as taxas de produção e utilização de glicose (LAIN e CATALANO, 2007).

O fígado é a fonte predominante de produção de glicose endógena (LAIN e CATALANO, 2007). O papel central do fígado na manutenção da glicemia envolve captação do excesso de glicose no sangue e armazenamento como glicogênio ou liberação de glicose para o sangue através da glicogenólise ou da gliconeogênese (GAZOLA *et al.* 2007). Esta produção hepática de glicose depende de processos regulatórios e envolve basicamente a associação de três mecanismos: a regulação pela variação na concentração sérica de substratos metabólicos, a regulação neural e a regulação hormonal (SHIMAZU, 1983).

2.1.1 Variação na Concentração Sérica de Substratos Metabólicos

Esse padrão de resposta hepática à glicemia é também conhecido como auto-regulação hepática, e refere-se à capacidade do fígado de ajustar a captação ou liberação de glicose em resposta a alterações da glicemia, independentemente de influências neuro-humorais. Esse

mecanismo é acionado pela variação de glicose plasmática, de precursores gliconeogênicos e ácidos graxos livres (AGLs) (SHIMAZU, 1983). Por exemplo, quando o fluxo de substratos gliconeogênicos para o fígado aumenta, ocorre aumento da taxa de gliconeogênese. Os AGLs por sua vez regulam a produção hepática de glicose por inibir a glicogenólise e estimular a gliconeogênese a partir do glicerol, L-alanina, L-lactato e piruvato. O efeito estimulatório do aumento da concentração de AGLs sobre a gliconeogênese resulta, em parte, do aumento da beta-oxidação. (SHIMAZU, 1983).

2.1.2 Regulação Neural

Um segundo controle regulatório do metabolismo energético envolve a regulação neural. O Sistema Nervoso Central (SNC) não utiliza ácidos graxos livres e requer glicose como fonte de energia. Nesse sentido, quando ocorrem situações em que há tendência à redução das concentrações circulantes de glicose, o SNC através da sua divisão autônoma intervém impedindo ou amenizando a queda da glicemia (MIGLIORINI e KETTELHUT, 2004).

O hipotálamo controla, através de suas conexões esplâncnicas e vagais, a regulação neural direta e indireta do metabolismo hepático de glicose. O monitoramento funcional da glicemia é realizado por glicorreceptores hipotalâmicos e hepáticos, que respondem à glicopenia resultando em aumento no tônus simpático para as adrenais e pâncreas e conseqüentemente em aumento da secreção de catecolaminas e glucagon (SHIMAZU, 1983).

Na regulação neural direta, o hipotálamo estimula terminais simpáticos do fígado que controlam a secreção das enzimas responsáveis pelo metabolismo glicêmico, excluindo a interferência de fatores hormonais, o que promove uma rápida liberação hepática de glicose para o sangue, destinada a pequenos ajustes na glicemia. Já na regulação indireta, o hipotálamo promove alteração da secreção dos hormônios envolvidos no metabolismo do

glicogênio, como o glucagon secretado pelas células alfa das ilhotas de Langerhans e as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) secretadas pela medula adrenal, resultando assim na manutenção e consolidação das alterações metabólicas iniciadas pela resposta neural direta (SHIMAZU, 1983; STUMPEL *et al.* 1996; MIGLIORINI e KETTELHUT, 2004).

O aumento do tônus simpático para o fígado é devido à ativação de neurônios sensíveis à concentração de glicose, localizados no SNC. Tais neurônios foram localizados em diversas regiões do SNC e que são sensíveis a outros metabólitos. Porém sua capacidade de ativar as vias simpáticas eferentes para o fígado passa a ser a atividade predominante em situações de redução do suprimento de glicose (MIGLIORINI e KETTELHUT, 2004).

2.1.3 Regulação Endócrina: Insulina e Contrarreguladores

Um terceiro mecanismo de controle da produção hepática de glicose é endócrino e envolve a insulina e os hormônios contrarreguladores: glucagon, adrenalina, cortisol e GH (SHIMAZU, 1983).

A insulina é o principal hormônio regulador da glicemia. É sintetizado pelas células beta das ilhotas de Langerhans, e sua secreção ocorre em resposta a sinais integrados dos nutrientes (glicose e aminoácidos), hormônios (insulina, peptídeo semelhante ao glucagon-1, somatostatina e adrenalina) e neurotransmissores (noradrenalina e acetilcolina) (MOLINA, 2007). Assim, após uma refeição, a elevação da glicemia estimula a secreção de insulina, a qual aumenta a captação de glicose pelas células musculares e adipócitos, diminuindo a glicemia. Com a redução da glicemia diminui o estímulo secretório e, conseqüentemente, a secreção de insulina. Estabelece-se assim um importante mecanismo regulador da glicemia, fundamental para a manutenção da homeostase (BAZOTTE; BERTOLINI, 2010).

É importante salientar que a ação da insulina no transporte de glicose é complementada por sua ação no metabolismo intracelular, favorecendo a utilização de glicose

como fonte de energia (ativa as enzimas da glicólise e ciclo de Krebs) ou o seu armazenamento como glicogênio (músculo e fígado) ou como triacilglicerol (tecido adiposo). Além disso, ao mesmo tempo em que favorece a síntese de glicogênio e triacilglicerol, a insulina inibe a mobilização de ambos ao inibir a glicogenólise e a lipólise, respectivamente (BAZOTTE *et al.* 2007).

Na ausência de insulina ou de uma redução de sua secreção ou ação, diversos processos metabólicos ficarão comprometidos e trarão grandes prejuízos ao organismo. O principal resultado será a elevação da glicemia em decorrência de uma deficiência no transporte de glicose na membrana plasmática, ou de alterações no metabolismo hepático ou ainda nas células musculares e adiposas (BAZOTTE; FELISBERTO JUNIOR, 2010).

Além da insulina, pelo menos quatro outros hormônios também desempenham papéis importantes na regulação da glicemia sendo chamados de contrarreguladores por antagonizarem as ações da insulina, são eles: o glucagon, secretado pelas células alfa das ilhotas de Langerhans do pâncreas, a adrenalina, secretada pela medula adrenal, o cortisol, secretado pelo córtex adrenal, e o GH, produzido pela hipófise anterior. Esses hormônios se elevam durante o jejum, quando atuam exercendo ações opostas à insulina (GUYTON e HALL, 2011).

O glucagon tem como principal estímulo secretório baixas concentrações de glicose sanguínea, ou seja, a secreção de glucagon é estimulada pela hipoglicemia. O glucagon se liga a seus receptores específicos nos hepatócitos ativando a glicogenólise e gliconeogênese, além de inibir a glicólise, contribuindo para a regulação da glicemia na hipoglicemia (LODISH *et al.* 2002; MOLINA 2007; OLIVEIRA-YAMASHITA *et al.* 2009).

A adrenalina favorece o aumento da glicemia ao ativar a glicogenólise no fígado, liberando assim, no intervalo de minutos, grande quantidade de glicose no sangue. Além disso, tem ação lipolítica direta nos adipócitos, por ativar a lipase lipoprotéica do tecido

adiposo, aumentando também a concentração plasmática de ácidos graxos. Quantitativamente, o aumento dos ácidos graxos é superior ao aumento da glicemia (GUYTON e HALL, 2011).

O cortisol produzido pelo córtex suprarrenal afeta profundamente o metabolismo da glicose, proteínas e dos AGLs. Seus efeitos estão relacionados ao catabolismo de proteínas musculares gerando aminoácidos que são transportados ao fígado para serem transformados em glicose através da gliconeogênese. O cortisol também inibe a captação e oxidação de glicose, promove a ativação da lipase lipoprotéica e a degradação dos triacilgliceróis no tecido adiposo, formando AGLs e glicerol que são utilizados para produção de energia, e assim promovem a manutenção da glicemia no jejum (BUENO e GOUVÊIA, 2011).

O GH possui ações opostas à insulina, ou seja, aumenta a concentração de glicose circulante que por sua vez estimula a secreção de insulina. O GH também promove redução da captação de glicose e de sua oxidação em vários tecidos, aumento da lipólise e da oxidação de ácidos graxos (tecido adiposo, musculatura esquelética e cardíaca) e estimula a produção hepática de glicose, principalmente pela ativação da glicogenólise (CRUZAT *et al.* 2008).

2.2 GESTAÇÃO

2.2.1 Mudanças Metabólicas durante a Gestação

A gestação é caracterizada como um “estado diabetogênico” devido a alterações no padrão de secreção e sensibilidade a insulina (HOD e YOGEV, 2007).

Em seu início, a gestação pode ser vista como um estado anabólico, com aumento nos depósitos maternos de gordura e pequenos aumentos na sensibilidade à insulina (LAIN e CATALANO, 2007; HERRERA, 2002). Assim, os nutrientes são armazenados no início da gravidez para atender às demandas feto-placentária e materna da gestação e da lactação. Diferente desse período, o final da gestação é caracterizado por um estado catabólico com redução da sensibilidade à insulina. Esta redução da sensibilidade à insulina resulta em

aumento das concentrações de glicose, AGLs e corpos cetônicos permitindo uma maior disponibilidade de substratos para o crescimento fetal (LAIN e CATALANO, 2007) e no jejum (HERRERA *et al.* 1994; HERRERA, 2000).

Embora a gestação esteja associada com o aumento da massa de células beta e aumento do nível de insulina durante toda a gestação, algumas mulheres grávidas são incapazes de regular a produção de insulina num grau maior, em relação ao grau de resistência à insulina e, conseqüentemente, tornam-se hiperglicêmicas, desenvolvendo diabetes mellitus gestacional (AL-NOAEMI e SHALAYEL, 2011).

2.2.2 Metabolismo da Glicose na Gestação

A glicose é o principal combustível metabólico requerido durante o desenvolvimento fetal, como fonte de energia para o metabolismo celular ou para fornecer energia para a síntese de proteínas, lipídios e glicogênio. (LANOUE, 1999; AL-NOAEMI e SHALAYEL, 2011). O feto se beneficia de uma constante transferência placentar de glicose (LANOUE, 1999), de maneira que o metabolismo de glicose, tanto basal como pós-prandial, muda gradualmente ao longo da gestação para atender as demandas nutricionais da mãe e do feto (LAIN e CATALANO, 2007).

A gestação afeta os mecanismos de regulação da glicemia através de uma redução da sensibilidade à insulina, que reduz o transporte de glicose para os tecidos aumentando a glicemia, além de suprimir os mecanismos contrarregulatórios que respondem a hipoglicemia (JOHNSON, 2008).

2.2.2.1 Resistência à insulina na gestação

Durante a gestação, a resistência à insulina é aumentada em cerca de três vezes em relação ao estado não-gestacional (AL-NOAEMI e SHALAYEL, 2011).

Essa resistência à insulina aumentada suprime o transporte de glicose aos tecidos (com diminuída utilização de glicose), criando uma relativa deficiência energética intracelular e aumentando as concentrações de glicose no sangue. A progesterona, o estradiol, o GH, o HPL, e citocinas placentárias têm papéis importantes neste processo (LAIN e CATALANO, 2007; JOHNSON, 2008).

Na gestação, a sensibilidade à insulina diminuída é melhor caracterizada por uma alteração pós-receptor, resultando na diminuição da capacidade da insulina em provocar a mobilização do GLUT4 do interior para a superfície da célula (JOHNSON, 2008; AL-NOAEMI e SHALAYEL, 2011).

O TNF-alfa (fator de necrose tumoral alfa), uma citocina pró-inflamatória que está associada com a redução na sensibilidade à insulina em várias condições (obesidade, envelhecimento, sepsis) promove a fosforilação em serina do substrato do receptor da insulina-1 (IRS-1), dificultando sua associação com o receptor de insulina e consequentemente atenuando a sinalização da insulina. A placenta é uma importante fonte de TNF-alfa durante a gestação, e as concentrações circulantes dessa citocina tem uma correlação inversa com a sensibilidade à insulina. Portanto, parece plausível que elevadas concentrações de TNF-alfa na gestação avançada atenuem as ações da insulina. Além disso, em comparação à leptina, cortisol, HPL, gonadotrofinas coriônica humana, estradiol, progesterona e prolactina, o TNF-alfa foi o único preditor significativo da alteração na sensibilidade à insulina durante a gestação (KIRWAN *et al.* 2002; LAIN e CATALANO, 2007).

Portanto, a redução na sensibilidade à insulina na gestação é importante para assegurar a energia necessária ao feto em desenvolvimento, pois permite a mobilização de AGLs a partir dos adipócitos, e uma mudança da síntese hepática de gordura para a oxidação lipídica e cetogênese (LAIN e CATALANO, 2007; JOHNSON, 2008).

2.2.2.2 Hipoglicemia na gestação

Com o avanço da gestação, a glicemia de jejum diminui progressivamente. Esse mecanismo é complexo e não é bem compreendido, mas, fatores potenciais que contribuem para essa redução incluem: aumento do volume de plasma (no início da gestação), intensificação da utilização de glicose com o avanço da gestação, aumento da função das células beta (com aumento da secreção de insulina), supressão dos mecanismos contrarregulatórios associados à redução da glicemia mediados pelo glucagon, adrenalina e cortisol e/ou redução da produção de glicose via gliconeogênese e glicogenólise hepática (JOHNSON, 2008; LAIN e CATALANO, 2007; MIGLIORINI e KETTELHUT, 2004).

2.2.3 Diabetes Mellitus Gestacional

O diabetes mellitus gestacional (DMG) é definido como uma intolerância à glicose reconhecida pela primeira vez na gestação em curso, afetando cerca de 5 a 7% das gestações (HOD e YOGEV, 2007).

O DMG está associado com um risco aumentado de complicações maternas e perinatais tais como pré-eclâmpsia, macrossomia fetal, distócia de ombro, e hipoglicemia neonatal. Além disso, os descendentes de gestações com DMG têm um risco aumentado de desenvolver obesidade e diabetes tipo 2 na vida futura (RADAELLI *et al.* 2010).

Mulheres com DMG têm um risco extremamente alto (~ 50%) de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 (DM2) nos 5-10 anos subsequentes. Os fatores de risco incluem intolerância à glicose preexistente, hiperglicemia de jejum, necessidade de insulina, DMG diagnosticado antes da 24^a semana de gestação, obesidade, pertencer a um grupo étnico com alta prevalência de DM2 e tolerância prejudicada à glicose em seis semanas pós-parto. As mulheres multíparas com DMG também têm risco maior de desenvolver DM2 (BARBOUR, 2010).

O DMG é causado por pelo menos 3 fatores: resistência à insulina em função da produção aumentada do HLP, GH, TNF-alfa e outras citocinas inflamatórias; o aumento da produção hepática de glicose, resultado da supressão inadequada da gliconeogênese pela insulina; e menor secreção de insulina em função de comprometimento das célula beta (BARBOUR, 2010).

No DMG observa-se maior glicemia de jejum. Porém, a produção hepática basal de glicose não é diferente das gestantes não diabéticas. A insulina de jejum também aumenta durante a gestação principalmente em mulheres obesas com DMG e é maior que em gestantes não diabéticas. O aumento na glicemia apesar da aumentada insulinemia e similar produção endógena de glicose em mulheres com DMG em relação a gestantes não diabéticas sugere um desequilíbrio entre as necessidades de insulina para a regulação da glicemia e a capacidade das células beta em atender estes requisitos (LAIN e CATALANO, 2007).

Além das mudanças na sinalização da insulina que ocorrem na gestação normal observam-se alterações adicionais no DMG, por exemplo, menor capacidade de fosforilação em resíduos de tirosina da subunidade beta do receptor de insulina. Esse ajuste não é encontrado em gestantes com tolerância normal à glicose e resulta em redução em torno de 25 % no transporte de glicose (LAIN e CATALANO, 2007).

2.2.4 Metabolismo dos Lipídios na Gestação

Além das alterações no metabolismo de carboidratos, também ocorrem modificações significativas no metabolismo lipídico. Numa perspectiva corporal geral, os aumentos do tecido adiposo materno em gestantes não obesas acompanham o aumento significativo na água corporal. Mulheres não obesas ganham aproximadamente 3,5 Kg de gordura durante a gestação normal, mas há uma grande variação entre os vários grupos étnicos ou raciais bem como dentro de um mesmo grupo étnico ou racial (LAIN e CATALANO, 2007). Neste

contexto, os estoques subcutâneos são uma fonte de calorías para a mãe e o feto, especialmente no final da gestação e durante a lactação. Quanto à gordura visceral, seu aumento pode estar relacionado à diminuição na sensibilidade à insulina no final da gestação (LAIN e CATALANO, 2007).

A redução na sensibilidade à insulina em gestantes também é observada no metabolismo lipídico (CATALANO, 2010). Por exemplo, a hipertriacilgliceridemia gestacional parece resultar da aumentada produção de triacilglicerol no fígado e reduzida depuração dos triacilgliceróis circulantes, que decorre da reduzida atividade da lipase lipoprotéica no tecido adiposo (MUNILLA e HERRERA, 2000).

Em gestantes as concentrações totais de triacilglicerol aumentam de 2 a 4 vezes e as concentrações totais de colesterol aumentam de 25 a 50%. Além disso, há um aumento de 50% no colesterol LDL e 30% no colesterol HDL até metade da gestação, seguida por uma ligeira diminuição no HDL até o termo (LAIN e CATALANO, 2007). Tais aumentos são mais acentuados no DMG em relação a gestantes não diabéticas. O aumento na concentração de AGLs está relacionado com a diminuída capacidade da insulina em suprimir a lipólise na gestação avançada. Porém, tal aumento é útil para fornecer uma fonte de energia para as necessidades maternas em período final da gestação, quando as necessidades energéticas são maiores (CATALANO, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o controle glicêmico de ratas Wistar em diferentes fases gestacionais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a variação da glicemia em ratas Wistar prenhes durante o jejum e estado alimentado.
- Verificar a participação da resistência à insulina e da tolerância à glicose na manutenção da glicemia em diferentes fases da gestação.
- Investigar o papel da produção hepática de glicose na manutenção da glicemia de ratas Wistar prenhes em gestação avançada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Utilizou-se ratos Wistar adultos (70-80 dias) machos (para acasalamento) e fêmeas (70-80 dias) com 0 (virgens), 7, 14 e 20 dias de gestação, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos em biotério setorial do Departamento de Farmacologia e Terapêutica e receberam água e ração balanceada *ad libitum*, permanecendo em temperatura controlada ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro controlado de 12/12 h.

O cuidado com os animais, assim como os experimentos foram realizados em conformidade com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa animal da Universidade Estadual de Maringá (Parecer n° 058/2008).

4.1.1 Avaliação do ciclo estral e determinação da gestação

O ciclo estral de parte das ratas virgens foi avaliado, a partir de coletas do fluido vaginal após administração de salina (NaCl 0,9%). Uma gota desse material foi colocada em lâmina, e analisada em microscópio ótico. As fases do ciclo estral foram determinadas de

acordo com o tipo celular encontrado, sendo possível a ocorrência das fases: metaestro, diestro, proestro e pseudo-estro.

Na ocorrência de células características dos períodos proestro e pseudo-estro (fases de maior fertilidade), as ratas foram colocadas em gaiolas junto com os machos, por um período (noturno) de 12h. O procedimento de coleta foi repetido nesses animais após esse período, e havendo presença de espermatozóides no fluido vaginal, essas ratas foram consideradas prenhes, sendo este, considerado o primeiro dia de gestação.

4.2 MATERIAIS

Os sensores de glicose utilizados para os experimentos com o RT-CGMS foram obtidos da Medtronic[®] (São Paulo, SP, Brasil). A glicose usada para o teste de tolerância à glicose (GTT) foi obtida da Sigma-Aldrich Chemical company (St. Louis, USA) e a insulina regular (Humulin[®]) usada para o teste de tolerância à insulina (ITT), da Lilly (São Paulo, SP, Brasil). A L-alanina e a L-glutamina foram obtidas da ICN Biochemical's (Costa Mesa, CA, USA). Os demais reagentes utilizados foram obtidos com a maior pureza.

4.3 EXPERIMENTOS

4.3.1 Teste convencional de tolerância à insulina (ITT)

Utilizou-se ratas com 0 (virgens), 7, 14 e 20 dias de gestação. Esses animais foram submetidos a jejum de 12 h (20h-08h). Posteriormente, receberam injeção intraperitoneal de insulina regular (1U/kg) (GAZOLA *et al.* 2007) e em seguida sacrificadas por decapitação 0, 10 e 60 min após a administração do hormônio. A partir do sangue coletado avaliou-se a glicemia pelo método da glicose oxidase (BERGMEYER e BERNT, 1974). As ratas foram consideradas hipoglicêmicas para valores de glicemia menores do que 40 mg/dL.

4.3.2 Teste convencional de tolerância à glicose (GTT)

Utilizou-se ratas com 0 (virgens), 7, 14 e 20 dias de gestação que foram submetidas a jejum de 12 h (20h-08h). Após o jejum, os animais receberam glicose oral por gavagem (1g/kg) sendo em seguida sacrificadas por decapitação 0, 10 e 60 min após a administração de glicose. A partir do sangue coletado avaliou-se a glicemia pelo método da glicose oxidase (BERGMEYER e BERNT, 1974).

4.3.3 RT-CGMS (sistema de monitoração contínua da glicemia em tempo real)

O sistema é constituído de um sensor de glicose formado por um eletrodo coberto por membrana, que detecta as concentrações de glicose presente no fluido intersticial. Esse sensor é responsável por enviar as informações captadas para um transmissor, e esse as encaminha para um monitor através de ondas de rádio de alta frequência. O monitor armazena os dados e fornece as leituras em tempo real.

As concentrações de glicose (na faixa de 40-400 mg/dL) são obtidas a cada 5 min o que permite obter 280 avaliações diárias.

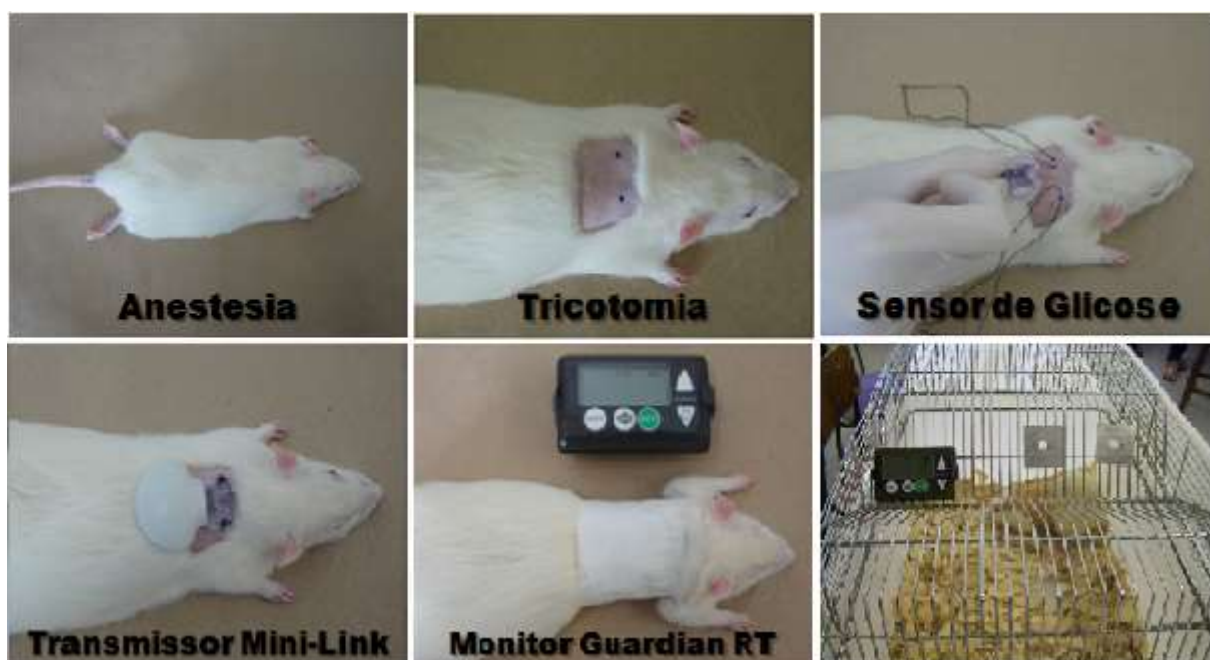


Foto 1 – Sistema RT-CGMS (Esquema de inserção do equipamento no animal).

Para a inserção do sensor de glicose e instalação do transmissor a ele, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de tiopental sódico (45 mg/kg). Após a anestesia, a área de inserção do sensor foi tricotomizada e em seguida, o sensor foi inserido subcutaneamente na região interescapular. O transmissor foi então anexado ao sensor e conectado com o monitor, que foi mantido na parte superior da gaiola do animal (Foto 1).

Depois de ligar o transmissor ao monitor, um período de 2 h é necessário para a inicialização antes de realizar a calibração do RT-CGMS. A primeira e segunda calibrações foram realizadas 2 h e 6 h após a instalação do RT-CGMS e repetidas a cada 12 h, medindo-se a glicemia com um glicosímetro (Diagnostics Accu-Chek[®] Active glucometer). Para este propósito, uma gota de sangue foi obtida após uma pequena incisão feita na extremidade da cauda. Durante o período de observação, o local da cirurgia para a inserção do sensor e transmissor não mostrou qualquer sinal de infecção ou inflamação. Finalmente, o sensor foi removido e os dados armazenados no monitor foram transferidos para um receptor (Con Link[®] Medtronic) permitindo que os dados fossem transferidos para um computador pessoal ligado a um programa de análise on-line (CareLink personal[®] Medtronic).

A cinética das mudanças de concentração de glicose foram avaliadas em ratas gestantes (dia 20) alimentadas ou em jejum e comparadas a ratas virgens (dia 0) que foram submetidas ao mesmo procedimento experimental. Além disso, a cinética das mudanças de concentração de glicose de ratas gestantes (20 dias) após injeção intraperitoneal de insulina regular (1U/Kg) (ITT) ou administração oral de glicose (1g/Kg) (GTT) foram avaliadas em tempo real com o auxílio do RT-CGMS. Ratas virgens (dia 0) foram submetidas aos mesmos procedimentos experimentais para fins de comparação.

4.3.4 Perfusão de Fígado *in situ*

O sistema de perfusão é constituído de um oxigenador de membrana, um cilindro de alumínio, uma bomba peristáltica, uma bomba de circulação externa de água aquecida e um

capta bolhas (Foto 2).

O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, ao redor do qual estão enrolados tubos de borracha de silicone de parede fina (0,25 mm), com diâmetro interno de 2 mm e comprimento total de 15 metros. A câmara interna do cilindro é termostatizada pelo banho-maria, por meio da bomba de circulação externa de água aquecida. O cilindro fica isolado do ambiente por uma cobertura de plástico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de mistura carbogênica nas proporções de 95/5% de O₂/CO₂, respectivamente. O sistema contém ainda um dispositivo que impede a entrada de ar no fígado denominado capta-bolhas.



Foto 2 – Sistema de Perfusão de Fígado *in situ*

O líquido de perfusão utilizado foi o tampão Krebs-Henseleit-bicarbonato (KH) contendo: NaCl, 116mM; NaHCO₃, 25mM; KCl, 5,9mM; NaSO₄, 1,2mM; MgCl₂.6H₂O, 1,18mM; NaH₂PO₄, 1,24mM e CaCl₂, 2,5mM. Esse líquido, ou seja, o KH é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador onde ocorrem as trocas gasosas. O O₂ e CO₂ contidos na atmosfera carbogênica, por troca passiva, passam para o KH que circula no

interior dos tubos de borracha de silicone. A fina espessura da parede destes tubos, seu pequeno diâmetro e o seu comprimento total favorecem as trocas. Desse modo, o KH é saturado com O₂ enquanto o CO₂ diminui o seu pH inicial de 7,6 para 7,4. Assim, o KH que chega à cânula inserida na veia porta, está oxigenado, aquecido a 37°C e com um pH 7,4.

Após jejum de 12h, as ratas foram anestesiadas com uma injeção intraperitoneal de tiopental sódico (45 mg/kg) e fixadas em mesa cirúrgica. Após a laparotomia retirou-se os filhotes que foram pesados para inferir o peso da rata gestante. Ligaduras frouxas foram colocadas ao redor da veia cava inferior logo acima da veia renal direita e ao redor da veia porta, para fixação das cânulas. Em seguida, a veia porta foi canulada sob baixo fluxo e a veia cava inferior, porção infra-hepática, foi seccionada para o completo dessangramento do fígado. Na sequência, a veia cava inferior (porção infra-hepática) foi canulada para a coleta do líquido efluente (perfusato), e o tórax do animal foi aberto para o livre acesso à veia cava inferior (porção supra-hepática), acima do diafragma, cuja oclusão permitiu o desvio do KH apenas para a veia cava inferior (porção infra-hepática). Finalmente o fluxo foi ajustado para valores que permitiram a oxigenação adequada (cerca de 4 mL.min⁻¹.g⁻¹ de fígado). Este fluxo está muito acima dos valores fisiológicos, mas visa compensar a ausência de eritrócitos no líquido de perfusão, garantindo a oxigenação hepática.

Após 30 min iniciais de perfusão com KH, para adaptação do fígado às novas condições, amostras do perfusato foram coletadas a cada 5 min para determinação da glicose (BERGMEYER e BERNT, 1974), conforme o seguinte protocolo:

Pré-infusão com KH	Período de infusão do precursor (KH + precursor)	Pós-infusão com KH
0'	10'	80' 90'

Para quantificar a produção hepática de glicose (neoglicogênese) utilizou-se os seguintes precursores: L-glutamina (5 mM), L-alanina (5 mM) e glicerol (2 mM)

(NASCIMENTO et al. 2008) enquanto que, para a avaliação da ativação da glicogenólise no estado alimentado, utilizou-se a adrenalina (1 μM) de acordo com o seguinte protocolo:

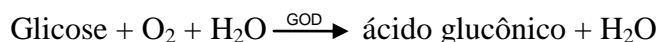
Pré-infusão KH	com	Período de infusão de adrenalina (KH + adrenalina)	Pós-infusão com KH
0'		12'	45'
			60'

Ao final de cada experimento, o fígado foi retirado e pesado para que a produção de glicose ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de fígado) fosse calculada.

4.3.5 Determinações Bioquímicas

4.3.5.1 Dosagem de glicose no perfusato e no soro

A concentração de glicose no soro (mg/dL) e no perfusato ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de fígado) foi avaliada pelo método da glicose-oxidase (GOD) em que a glicose é oxidada pela GOD a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 em presença de peroxidase (POD) produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF) originando um cromógeno com máximo de absorção em 505 nm de acordo com as seguintes reações:



4.3.6 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm EPM com o auxílio do programa GraphPad Prism (version 5.0). Os dados foram avaliados pelo teste *t* de student e por análise de variância (ANOVA), sendo a diferença entre as médias avaliada pelo teste de Tukey. A área sob a curva (AUC) do período de infusão dos substratos gliconeogênicos e da adrenalina foi expressa como $\mu\text{mol/g}$, e foram considerados estatisticamente diferentes os *p* valores < 0,05.

5. RESULTADOS

A redução da glicemia pós-injeção de insulina (ITT convencional) entre 0 e 60 min foi de 70%, 72%, 68% e 55% para RNP, RP (dia 7), RP (dia 14) e RP (dia 20), respectivamente. Portanto, RP (dia 20) possui menor glicemia de jejum (0 min) e redução menos intensa da glicemia 10 e 60 min ($p < 0,05$) após a injeção de insulina (Figura 1).

No GTT convencional o aumento da glicemia após a administração da glicose entre 0 e 10 min foi de 87%, 87%, 60% e 60% para os grupos RNP (dia 0), RP (dia 7), RP (dia 14) e RP (dia 20), respectivamente. Portanto, ratas em gestação avançada (dia 20) apresentam aumento menos intenso da glicemia 10 min após a administração oral de glicose em relação a ratas não prenhes (Figura 2).

Como o ITT e o GTT convencional demonstraram coexistência de redução da sensibilidade a Insulina (RSI) e maior tolerância à glicose (TG) no grupo RP (dia 20) este grupo foi empregado nos demais estudos tendo RNP como controle.

Ao utilizarmos a técnica de RT-CGMS avaliamos a cinética da concentração de glicose intersticial quando observamos menor concentração de glicose (Figura 3) tanto no período de jejum como no estado alimentado para a rata do grupo RP (dia 20).

Ao repetirmos o GTT e ITT convencionais empregando a técnica de RT-CGMS na avaliação da glicemia observamos que RP (20 dias) possuem RSI (Figura 4A) e maior TG (Figura 4B) em relação à RNP. Como ambos os testes foram feitos no mesmo animal, porém em dias distintos, pudemos observar a ocorrência simultânea desses dois eventos.

Em relação aos experimentos em fígado *in situ*, observamos menor ($p < 0,05$) PHG a partir da L-alanina (Figura 5A) e L-glutamina (Figura 5B) no grupo RP (dia 20) e maior ($p < 0,05$) produção hepática de glicose (PHG) a partir do glicerol (Figura 5C) em RP (20 dias) em relação a RNP. Além disso, a PHG a partir da glicogenólise promovida pela adrenalina foi

avaliada, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos RNP e RP (dia 20) (Figura 6).

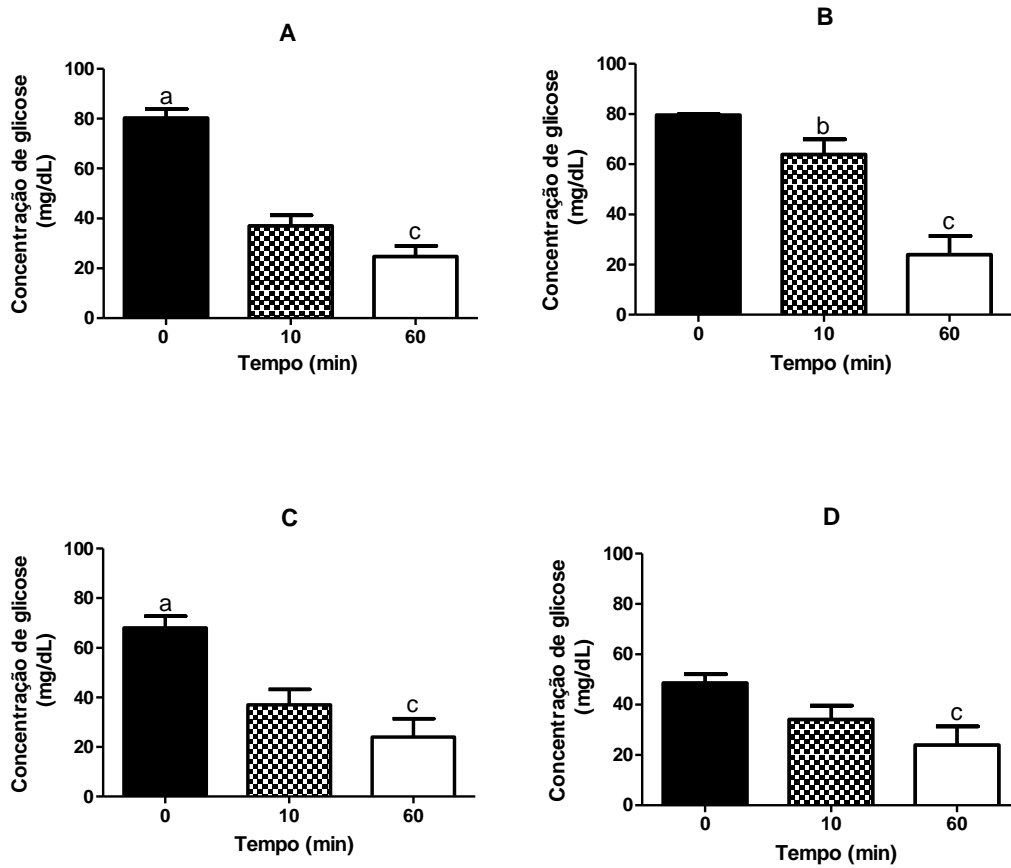


Figura 1. Teste convencional de tolerância à insulina (ITT): (A) ratas não-prenhes (0 dia); (B) ratas prenhes (7 dias); (C) ratas prenhes (14 dias); (D) ratas prenhes (20 dias). ^(a) $p < 0,05$ - 0 min vs 10 min, ^(b) $p < 0,05$ - 10 min x 60 min, ^(c) $p < 0,05$ - 0 min vs 60 min. Os dados são apresentados como a média \pm EPM de 7-9 animais por grupo.

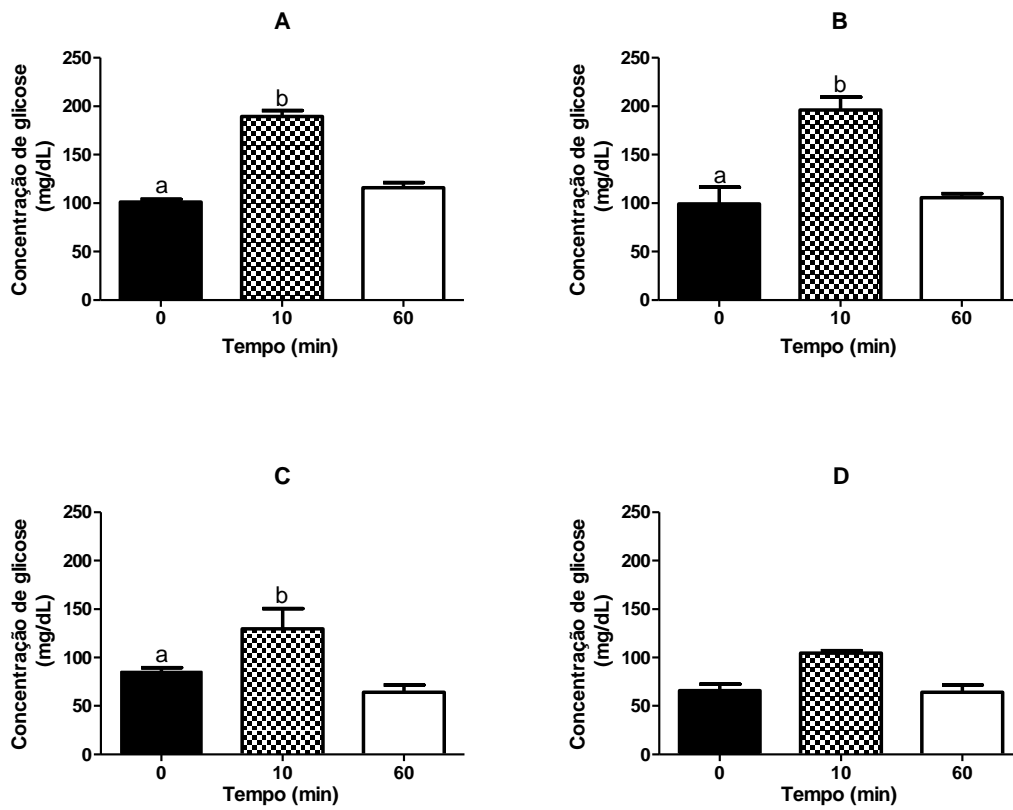


Figura 2. Teste convencional de tolerância à glicose: (A) ratas não-prenhes (0 dia); (B) ratas prenhes (7 dias); (C) ratas prenhes (14 dias); (D) ratas prenhes (20 dias). ^(a) $p < 0,05$ - 0 min vs 10 min, ^(b) $p < 0,05$ 10 min x 60 min. Os dados são apresentados como a média \pm EPM de 7-9 animais por grupo.

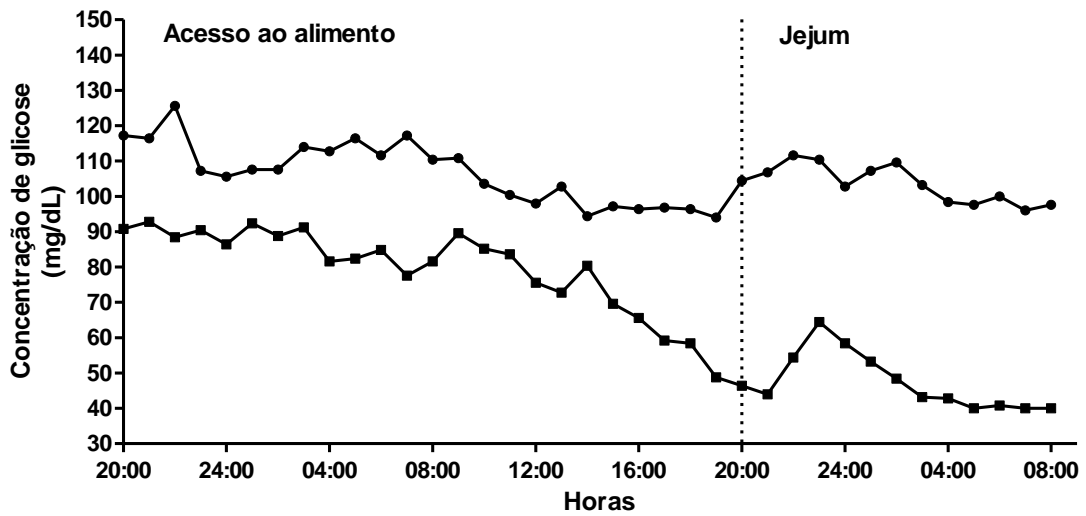


Figura 3. Cinética da concentração de glicose (mg/dL) no fluido intersticial pela técnica da RT-CGMS, no dia 0 (●) e dia 20 (■) de gestação (nos estados alimentados e de jejum). O horário de início da privação alimentar está representado pela linha vertical pontilhada. Os dados estão representados como a média \pm EPM de 5 medidas.

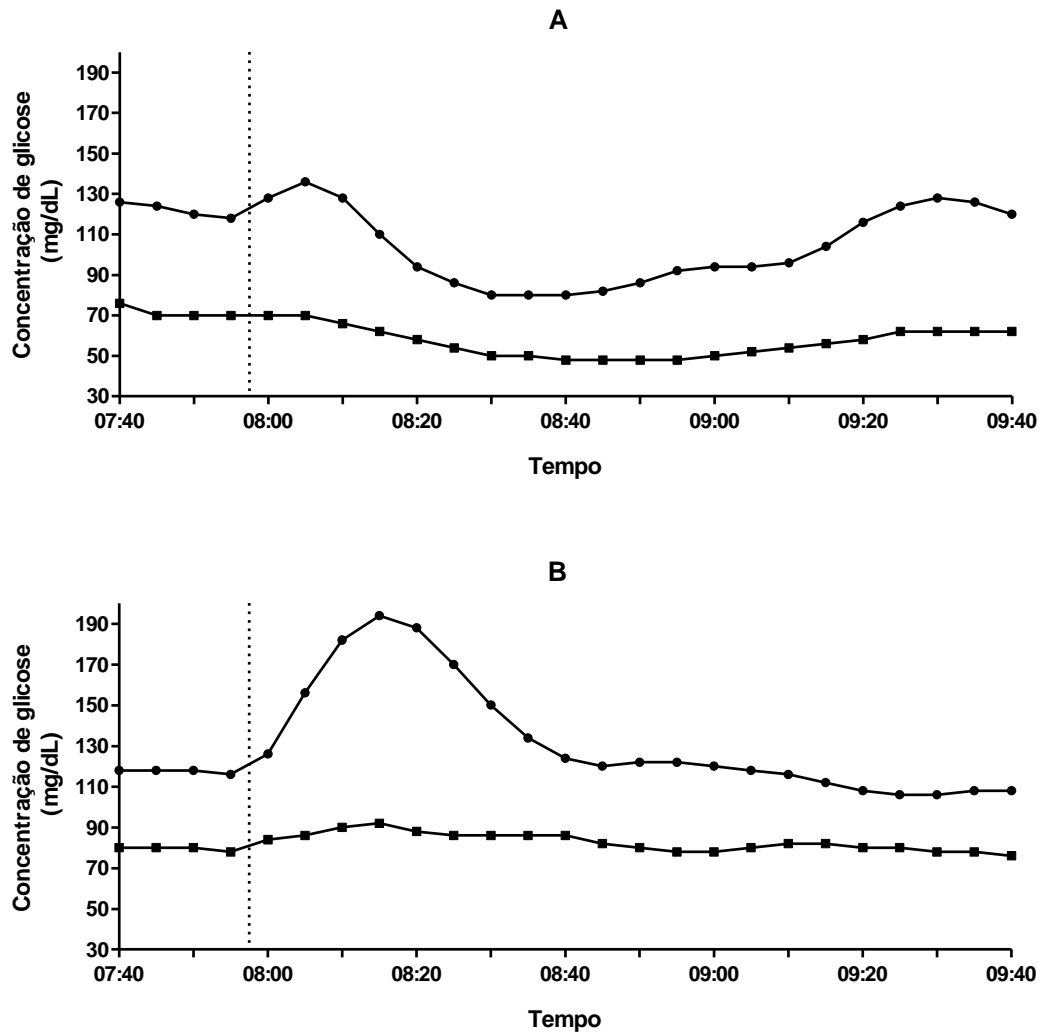


Figura 4. Experimento demonstrativo das concentrações de glicose (mg/dL) no fluido intersticial pela técnica da RT-CGMS no dia 0 (●) e dia 20 (■) de gestação após administração intraperitoneal de insulina (1 U/kg) (A) e administração oral (gavagem) de glicose (1 g/kg) (B). O horário das administrações está representado pela linha vertical pontilhada.

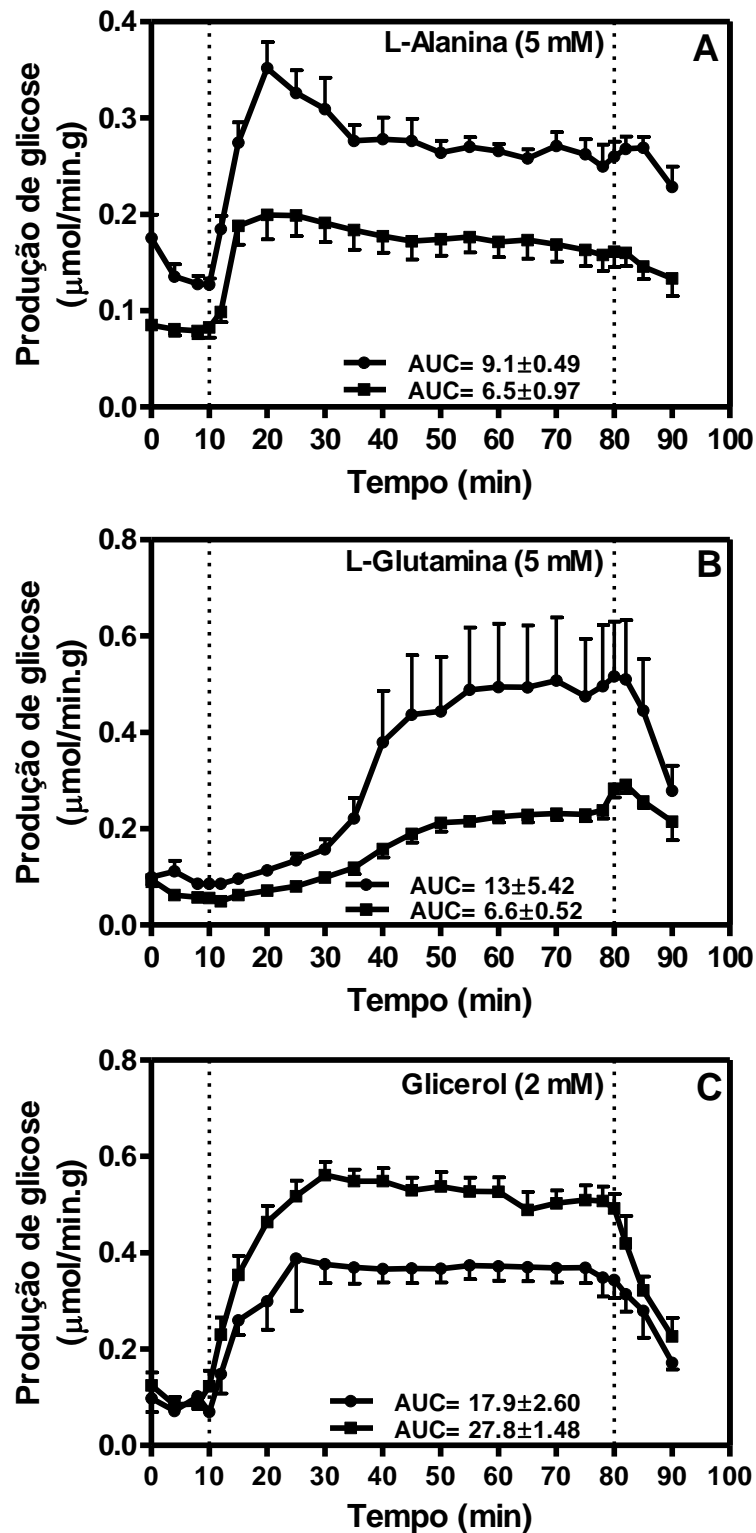


Figura 5. Gliconeogênese a partir da L-alanina (A), L-glutamina (B) e do glicerol (C) em fígados de ratas no dia 0 (●) e dia 20 (■) de gestação, após jejum de 12h. O efluente perfusato foi colhido em intervalos de 5 min para avaliação de glicose. Os dados são apresentados como a média \pm EPM de 3-6 experimentos (AUC ($\mu\text{mol}/\text{g}$) \pm EPM).

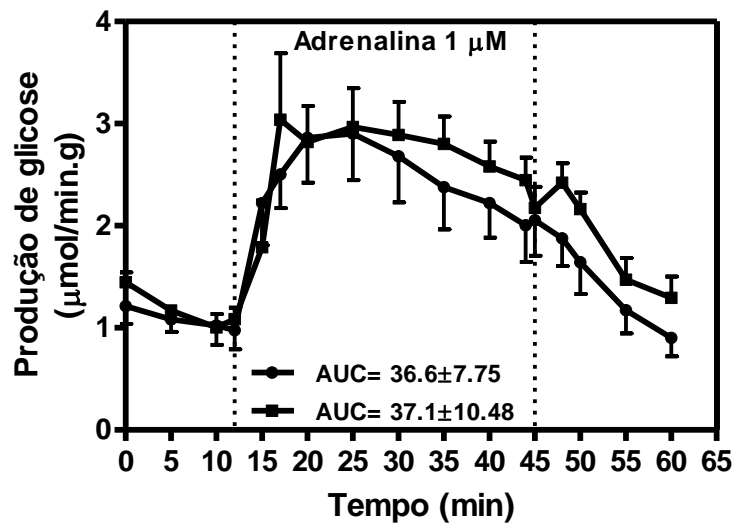


Figura 6. Glicogenólise hepática de ratas alimentadas no dia 0 (●) e dia 20 (■) de gestação durante a infusão de adrenalina. A concentração de glicose a partir do efluente foi avaliada a cada 5 min. Os dados estão representados como a média \pm EPM de 3-6 experimentos. (AUC (μ mol/g) \pm EPM).

6. DISCUSSÃO

Em mamíferos a menor responsividade à insulina é uma característica comum da gestação avançada (HERRERA, 2000). De acordo com esta observação, o grupo RP (dia 20) mostrou menor redução da glicemia após a administração de insulina (RP dia 20 *vs.* RNP). Porém, enquanto a RSI em humanos se associa ao DMG, esta alteração não ocorre em ratas Wistar prenhes, exceto quando recebem dietas (HOLEMANS *et al.* 2004) ou drogas diabetogênicas (SAITO *et al.* 2010).

O grupo RP (dia 20), também mostrou maior TG em relação às RNP. Devido à ocorrência simultânea de RSI e aumentada TG no 20º dia de gestação, este dia foi escolhido para os estudos de GTT e ITT utilizando a técnica de RT-CGMS cujos resultados mostraram que o grupo RP (dia 20) apresenta menor ($p < 0,05$) concentração de glicose, alimentado e em jejum. Consistente com estes resultados outros estudos demonstraram que durante a gestação avançada há maior risco de hipoglicemia (JOHNSON, 2008). Além disso, a simultânea RSI e maior TG demonstrada pelo ITT e GTT convencionais foram confirmadas pela técnica do RT-CGMS.

Na gestação avançada, a presença de RSI no músculo (BARROS *et al.* 2008; CAMPS *et al.* 1990) e tecido adiposo (WADA *et al.* 2010) está bem estabelecida. No entanto, a presença de RSI no fígado em final de gestação é controversa (DAVIDSON, 1984; GILBERT *et al.* 1991). Além disso, considerando que a excessiva PHG é o principal efeito da RSI no fígado, investigou-se a PHG a partir da gliconeogênese e da glicogenólise. Ao observarmos a gliconeogênese, as ratas em gestação avançada apresentaram maior ($p < 0,05$) PHG a partir de glicerol, e menor ($p < 0,05$) PHG a partir de alanina e glutamina. Esses resultados são compatíveis com a ideia de que no final da gestação, o catabolismo aumentado de lipídios e a intensificação da gliconeogênese a partir do glicerol podem ser um mecanismo fisiológico para proteção contra a perda de proteínas (NAISMITH e MORGAN, 1976). Além disso, estes

resultados sugerem que a alteração na gliconeogênese hepática no final da gestação é específica para cada substrato gliconeogênico e é consistente com a estratégia bem estabelecida do uso de metabólitos da lipólise durante um período de reduzida disponibilidade de aminoácidos no sangue (HERRERA e ORTEGA-SENOVILLA, 2010).

Embora ocorra aumento da atividade simpato-adrenal responsável pela lipomobilização acelerada durante a gestação (HERRERA *et al.* 1994) este aspecto não pode ser expandido para a produção de glicose a partir das reservas de glicogênio hepático, pois a intensificação da glicogenólise hepática promovida pela adrenalina não foi diferente entre os grupos RP e RNP. Assim, esses dados sugerem que a glicogenólise não foi alterada pela gestação.

7. CONCLUSÃO

A coexistência de resistência à insulina e aumentada tolerância à glicose na gestação avançada pode representar um mecanismo fisiológico importante que garante a disponibilidade de glicose para sustentar o rápido crescimento fetal na gestação avançada e prevenir a redução de glicose sanguínea durante o jejum.

Além disso, nossos resultados são de interesse clínico por ressaltarem as dificuldades em se estabelecer um valor de referência comum para as concentrações de glicose no diagnóstico do DMG. Nesse sentido surgem dois questionamentos: O que podemos considerar como valores normais para as concentrações de glicose de jejum durante a gestação? E como distinguimos resistência à insulina fisiológica e patológica durante a gestação?

As respostas a estas questões e o estabelecimento de uma melhor compreensão da coexistência de resistência à insulina e o aumento da tolerância à glicose serão necessários antes de se atingir um consenso acerca dos valores da glicemia para o diagnóstico do DMG,

conforme já tem sugerido vários estudos que propõem uma reavaliação dos valores normais de glicemia de jejum e testes de tolerância a glicose para o diagnóstico do DMG.

8. REFERÊNCIAS

AL-NOAEMI, M. C.; SHALAYEL, M. H. F. Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus: The past, the present and the future. In: RADENKOVIC, M. **Gestational Diabetes**. Published online: November 2, 2011: Intech, 2011. cap 6, p. 91-114.

BARBOUR, L. A. Diabetes na gravidez. In: MCDERMOTT, M. T. **Segredos Endocrinologia: Respostas para as questões mais comuns do dia a dia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap. 5, p. 47-64.

BARROS, R. P. et al. Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. **Mol Cell Endocrinol**, v. 295, n.1-2, p. 24-31, 2008.

BAZOTTE, R. B.; BERTOLINI, G. L. Aspectos fisiológicos do hormônio insulina. In: BAZOTTE, R. B. **Paciente Diabético: cuidados farmacêuticos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2010. cap. 4, p. 35-47.

BAZOTTE, R. B.; FELISBERTO JUNIOR, A. M. Aspectos fisiopatológicos da deficiência de insulina. In: BAZOTTE, R. B. **Paciente Diabético: cuidados farmacêuticos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2010. cap. 5, p. 49-55.

BAZOTTE, R. B; et al. Insulina e Antidiabéticos. In: DeLUCIA, R., et al. (org.). **Farmacologia Integrada**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. cap. 61, p. 603-615.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H. U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. New York: Verlag Chemie-Academic Press, 1974. p. 1205-15.

BUENO J. R., GOUVÊA C.M.C.P. Cortisol e exercício: efeitos, secreção e metabolismo. **Rev Bras Fisiol Exercício**, v.10, p. 178-80, 2011.

CAMPS, M. et al. Insulin resistance of skeletal muscle during pregnancy is not a consequence of intrinsic modifications of insulin receptor binding or kinase activities. **Endocrinology**, v. 127, n.5, p.2561-2570,1990.

CATALANO, P.M. Obesity, Insulin resistance, and pregnancy outcome. **Reproduction**, v.140, p. 365-371, 2010.

CATALANO, P.M. et al. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. **Am J Physiol**, v. 264, p. E60-E67, 1993.

CONNOLLY, C. C. et al. Hepatic and muscle insulin action during late pregnancy in the dog. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, p. 447-452, 2007.

CRUZAT, V. F. et al. Hormônio do crescimento e exercício físico: considerações atuais. **Rev Bras Cien Farm**, v. 44, p. 549-562, 2008.

DAVIDSON, M. B. Insulin resistance of late pregnancy does not include the liver. **Metabolism**, v. 33, n. 6, p.532-537, 1984.

FERRADA, C. et al. Relación entre diabetes gestacional y síndrome metabólico. **Rev Med Chile**, v. 135, p. 1539-45, 2007.

GAZOLA, V.A.F.G. 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 hypoglycaemia. **Cell Biochem Funct**, v. 25 p. 211-216, 2007.

GILBERT, M. et al. Role of free fatty acids in hepatic insulin resistance during late pregnancy in conscious rabbits. **Am J Physiol**, v.260, p. E938–E945, 1991.

GOLBERT, A., CAMPOS, M.A.A. Diabetes Melito tipo 1 e gestação. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, p. 307-14, 2008.

GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12 ed. São Paulo: Ed. Saunders Elsevier, 2011.

HERRERA E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**, v. 19, p. 43-55, 2002.

HERRERA E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. **Eur J Clin Nutr**, v. 54, p.47-51, 2000.

HERRERA E. et al. Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, p. 2499-2519, 1994.

HERRERA, E. and ORTEGA-SENOVILLA, H. Disturbances in lipid metabolism in diabetic pregnancy – are these the cause of the problem? **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 24, n. 4, p. 515-525, 2010.

HOD, M. and YOGEV, Y. Goals of Metabolic Management of Gestational Diabetes, **Diabetes Care**, v. 30, p.180-187, 2007.

HOLEMANS, K. et al. Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. **Am J Obstet Gynecol**, v. 190, n. 3, p. 858-865, 2004.

JOHNSON, C.A. Glucose homeostasis during canine pregnancy: Insulin resistance, ketosis, and hypoglycemia. **Theriogenology**, v. 70, p. 1418-1423, 2008.

KIRWAN, J.P. et al. TNF- α is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. **Diabetes**, v. 51, 2207-2212, 2002.

LAIN, K.Y., CATALANO, P.M. Metabolic Changes in Pregnancy. **Clin Obstet Gynecol**, v. 50, p.938-48, 2007.

LANOUE, L., LIU, X.J., KOSKI, K.G. Postnatal profiles of glycogenolysis and gluconeogenesis are modified in rat pups by maternal dietary glucose restriction. **J Nutr**, v. 129, p. 820-7, 1999.

LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, p. 897-898, 2002.

MELCZER, Z.S. et al. Role of tumor necrosis factor- α in insulin resistance during normal pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.105, p. 7-10, 2002.

MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. Controle neuroendócrino do metabolismo energético. In: RODRIGUES, J. A., MOREIRA, A. C., ELIAS, L. L. K., CASTRO, M. (org). **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 7, p. 52-63.

MOLINA, P. E. **Fisiologia Endócrina**. 2.ed. São Paulo: Mc Graw Hill, p. 158-171, 2007.

MUNILLA, M.A., HERRERA, E. Maternal hypertriglyceridemia during late pregnancy does not affect the increase in circulating triglycerides caused by the long-term consumption of a sucrose-rich diet by rats. **J Nutr**, v. 130, p. 2883- 2000.

NAISMITH, D.J. and MORGAN, B.L.G. The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat. **Br J Nutr**, v. 36, p. 563-566, 1976.

NASCIMENTO, K. F. et al. Contribution of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in the defense against short-term insulin induced hypoglycemia in rats. **Life Scien**, v.82, p. 1018-1022, 2008.

OLIVEIRA-YAMASHITA, F. et al. Evidence that L-glutamine is better than L-alanine as gluconeogenic substrate in perfused liver of weaned fasted rats submitted to short-term insulin-induced hypoglycaemia. **Cell Biochem Funct**, v. 27, p. 30-34, 2009.

RADAELLI, T. et al. Estimates of Insulin Sensitivity Using Glucose and C- peptide From the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Glucose Tolerance Test. **Diabetes Care**, v. 33, p. 490-494, 2010.

RANG, H. P., DALE, M. M. et al. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

SAITO, F.H. et al. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. **Diabetol Metab Syndr**, v. 2, n. 1, p. 26, 2010.

SHIMAZU, T. Reciprocal innervation of the liver: its significance in metabolic control. In: LEVINE, R. & LUFF, R. **Adv. Metabol. Dis. (CNS Regulation of Carbohydrate Metabolism)**, 10. ed. New York: Ed. Szabo, A. J. Academic Press, p. 355-384, 1983.

STUMPEL, F., KUCERA, R., BAZOTTE, R. B, PUSCHELL, G. P. Loss of regulation by sympathetic hepatic nerves of liver metabolism and haemodynamics in chronically streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v. 39, p. 161-165, 1996.

WADA, T., et al. Progesterone inhibits glucose uptake by affecting diverse steps of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, p. E881–E888, 2010.

9. PUBLICAÇÕES

9.1 ARTIGO

Marcia Aparecida Carrara, Márcia Regina Batista, Tiago Ribeiro Saruhashi, Antonio Machado Felisberto-Júnior, Marcio Guilhermetti, Roberto Barbosa Bazotte. **Coexistence**

of insulin resistance and increased glucose tolerance in pregnant rats: a physiological mechanism for glucose maintenance. *Life Sciences*, v.90, p.831-37, 2012 (ver ANEXO).

9.2 CAPÍTULO DE LIVRO

Marcia Aparecida Carrara e Roberto Barbosa Bazotte. **Situações Especiais em Diabetes Mellitus.** In: Roberto B. Bazotte. *Paciente Diabético: Cuidados Farmacêuticos*. 1. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2010. cap. 15, p. 157-166 (ver ANEXO).