



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ISABELE GONÇALVES FRASSON UEMURA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO HEPÁTICA DE GLICOSE EM
MODELO DE RESISTÊNCIA À INSULINA SEM OBESIDADE:
RATOS DIABÉTICOS GOTO-KAKIZAKI**

Londrina
2023

ISABELE GONÇALVES FRASSON UEMURA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO HEPÁTICA DE GLICOSE EM
MODELO DE RESISTÊNCIA À INSULINA SEM OBESIDADE:
RATOS DIABÉTICOS GOTO-KAKIZAKI**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gisele Lopes Bertolini

Londrina - Paraná
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

U22a Uemura, Isabele Gonçalves Frasson.
Avaliação da produção hepática de glicose em modelo de resistência à insulina sem obesidade : ratos diabéticos Goto-Kakizaki / Isabele Gonçalves Frasson Uemura. - Londrina, 2023.
73 f. : il.

Orientador: Gisele Lopes Bertolini.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Diabetes mellitus tipo 2 - Tese. 2. Glicogenólise - Tese. 3. Neoglicogênese - Tese. 4. Perfusão de fígado - Tese. I. Bertolini, Gisele Lopes . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

ISABELE GONÇALVES FRASSON UEMURA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO HEPÁTICA DE GLICOSE EM
MODELO DE RESISTÊNCIA À INSULINA SEM OBESIDADE:
RATOS DIABÉTICOS GOTO-KAKIZAKI**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Gisele Lopes Bertolini
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr^a. Renata Gorjão
Universidade Cruzeiro do Sul

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte
Universidade Estadual de Maringá

Londrina, 15 de março de 2023.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que iluminou meu caminho durante esta caminhada, ao meu esposo Paulo Enrique, sempre presente, me incentivando e apoiando, ao maior presente da minha vida, minha filha Marina, e aos meus pais, pelo incentivo e dedicação em toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus acima de tudo.

À minha família, especialmente ao meu esposo, Paulo Enrique, por estar sempre presente, me incentivando a percorrer este caminho, por compartilhar angústias e dúvidas, estendendo sua mão amiga em momentos difíceis. À minha filha Marina, que trouxe luz à minha vida, que amo incondicionalmente, espero doravante compensá-la pelas horas de atenção e brincadeira que lhe devo. Foi ela o meu grande estímulo nesta caminhada.

Aos meus pais, Luiz e Carolina, por sempre me apoiarem.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Gisele Lopes Bertolini, pela oportunidade e por acreditar que eu seria capaz. Agradeço pela orientação, paciência, compreensão e aprendizado repassado ao longo desses anos.

À Prof^a Dr^a Priscila Cassolla, por me acompanhar e me ensinar tanto, por acreditar em mim e por sempre me incentivar. Obrigada também pela ajuda em meus experimentos, pelas conversas, conhecimento e cafés compartilhados!

À Prof^a Dr^a Helenir Medri de Souza, pela oportunidade e por acreditar que eu seria capaz. Um exemplo de profissional e pessoa com um coração que transborda humildade.

Às amigas e parceiras do Laboratório de Fisiologia Metabólica, Daniele e Giuliana, pela ajuda, apoio, empatia e momentos de descontração que tornaram mais agradáveis as horas de trabalho.

Aos alunos de iniciação científica, especialmente à minha sobrinha Lunna, que iniciou o projeto comigo e me auxiliou nos experimentos e cuidado dos animais.

Ao Prof. Rui Curi, pelo convite para participar do projeto GK e auxílio na sua execução.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas, pelo apoio estrutural, e a todos os funcionários, sempre dispostos a ajudar.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e que não foram citados. Muito obrigada.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” **Theodore Roosevelt**

Frasson-Uemura, Isabele Gonçalves. **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO HEPÁTICA DE GLICOSE EM MODELO DE RESISTÊNCIA À INSULINA SEM OBESIDADE: RATOS DIABÉTICOS GOTO-KAKIZAKI**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, 2023.

RESUMO

Embora o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) esteja geralmente associado à obesidade, alguns indivíduos com DM2 têm um índice de massa corporal baixo ou normal. O rato Goto-Kakizaki (GK) é uma linhagem isogênica de DM2 que apresenta resistência à insulina sem obesidade. Como estudos indicam que a hiperglicemia em ratos GK é devida, pelo menos em parte, ao aumento da produção hepática de glicose, torna-se relevante avaliar, em ratos diabéticos GK, a contribuição da glicogenólise e da neoglicogênese na gênese da hiperglicemia, assim como a responsividade hepática à insulina, ao glucagon e aos agonistas adrenérgicos, e sua possível contribuição para a gênese da resistência à insulina. Para tanto, parâmetros como ganho de massa corporal e tecidual, ingestão alimentar, tolerância à glicose e à insulina, glicemia, lactatemia, conteúdo hepático de glicogênio e produção hepática de glicose estimulada por agentes glicogenolíticos e a partir de precursores neoglicogênicos, por meio da técnica de perfusão de fígado *in situ*, foram avaliados em ratos GK e controle (ratos Wistar). Ratos GK apresentaram hiperglicemia, tolerância à glicose reduzida, menor resposta periférica à insulina, menor ganho de massa corporal, de tecido adiposo epididimal, dos músculos sóleo, extensor digital longo e gastrocnêmio e do fígado e semelhante índice de Lee e ingestão alimentar quando comparados aos ratos controle, confirmando, assim, o modelo experimental. O conteúdo de glicogênio hepático foi maior em ratos GK do que em ratos controle, enquanto a lactatemia, a glicogenólise hepática estimulada por glucagon 1 nM, fenilefrina 2 μ M, isoproterenol 20 μ M ou AMPc 7 μ M e a produção hepática de glicose a partir de L-lactato 2 mM, piruvato 5 mM ou L-alanina 2,5 mM não diferiram entre os grupos. Entretanto, a produção hepática de glicose a partir de glicerol 2 mM foi maior no grupo GK no terço final do tempo de infusão deste precursor neoglicogênico do que no grupo controle. Além disso, o efeito supressor da insulina (50 μ UI/mL) sobre a produção hepática de glicose

e a glicogenólise estimulada por AMPc 7 μ M foi abolido em ratos GK, demonstrando que esses animais apresentam resistência hepática à insulina. Esta menor resposta do fígado à insulina pode ter contribuído para a resistência insulínica observada em ratos diabéticos GK.

Palavras chaves: diabetes mellitus tipo 2; glicogenólise; neoglicogênese; perfusão de fígado; resposta hepática à insulina.

Frasson-Uemura, Isabele Gonçalves. **ASSESSMENT OF HEPATIC GLUCOSE PRODUCTION IN A MODEL OF INSULIN RESISTANCE WITHOUT OBESITY: GOTO-KAKIZAKI DIABETIC RATS.** Doctoral thesis presented to the Graduate Program in Physiological Sciences at the State University of Londrina, 2023.

ABSTRACT

Although type 2 diabetes mellitus (T2DM) is generally associated with obesity, some individuals with T2DM have a low or normal body mass index. The Goto-Kakizaki (GK) rat is an isogenic T2DM strain that exhibits insulin resistance without obesity. As studies indicate that hyperglycemia in GK rats is due, at least in part, to increased hepatic glucose production, it becomes relevant to evaluate, in diabetic GK rats, the contribution of glycogenolysis and gluconeogenesis in the genesis of hyperglycemia, as well as hepatic responsiveness to insulin, glucagon and adrenergic agonists, and their possible contribution to the genesis of insulin resistance. Therefore, parameters such as body and tissue mass gain, food intake, glucose and insulin tolerance, blood glucose, lactatemia, hepatic glycogen content and hepatic glucose production stimulated by glycogenolytic agents and from gluconeogenic precursors, using the technique of liver perfusion *in situ*, were evaluated in GK and control rats (Wistar rats). GK rats showed hyperglycemia, reduced glucose tolerance, lower peripheral response to insulin, lower gain in body mass, epididymal adipose tissue, soleus, long digital extensor and gastrocnemius muscles and liver, and a similar Lee index and food intake when compared to control rats, thus confirming the experimental model. Liver glycogen content was higher in GK rats than in control rats, whereas lactatemia, hepatic glycogenolysis stimulated by 1 nM glucagon, 2 μ M phenylephrine, 20 μ M isoproterenol or 7 μ M cAMP and hepatic glucose production from 2 mM L-lactate, 5 mM pyruvate or 2.5 mM L-alanine did not differ between groups. However, hepatic production of glucose from 2 mM glycerol was higher in the GK group in the final third of the infusion time of this gluconeogenic precursor than in the control group. Furthermore, the suppressive effect of insulin (50 μ UI/mL) on hepatic glucose production and glycogenolysis stimulated by 7 μ M cAMP was abolished in GK rats, demonstrating that these animals have hepatic resistance to insulin. This lower liver response to insulin may have contributed to the insulin resistance observed in GK diabetic rats.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; glycogenolysis; gluconeogenesis; liver perfusion; hepatic response to insulin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1. Vias de sinalização do glucagon e da adrenalina no metabolismo hepático da glicose..... | 20 |
| Figura 2. Fígado canulado na veia porta e veia cava caudal. | 32 |
| Figura 3. Conteúdo de glicogênio hepático de ratos controle e GK..... | 38 |
| Figura 4. Curva glicêmica durante o teste de tolerância à glicose (GTT) e área sob a curva (AUC) do GTT de ratos controle e GK. | 39 |
| Figura 5. Curva glicêmica durante o teste de tolerância à insulina (ITT) e constante de decaimento do ITT (kITT) de ratos controle e GK..... | 40 |
| Figura 6. Produção de glicose e glicogenólise a partir de AMPc 3 μ M em fígados perfundidos de ratos controle e GK..... | 42 |
| Figura 7. Produção de glicose e glicogenólise a partir de AMPc 5 μ M em fígados perfundidos de ratos controle e GK..... | 43 |
| Figura 8. Produção de glicose e glicogenólise a partir de AMPc 7 μ M em fígados perfundidos de ratos controle e GK..... | 44 |
| Figura 9. Efeito da insulina sobre a produção de glicose estimulada por AMPc 7 μ M e sua respectiva área sob a curva (AUC) em fígados perfundidos de ratos controle e GK. | 46 |
| Figura 10. Efeito da insulina sobre a glicogenólise estimulada por AMPc 7 μ M e sua respectiva área sob a curva (AUC) em fígados perfundidos de ratos controle e GK. | 47 |
| Figura 11. Efeito da infusão de glucagon 1 nM sobre a produção de glicose, glicogenólise e glicólise em fígados perfundidos de ratos controle e GK. | 49 |
| Figura 12. Efeito da infusão de fenilefrina 2 μ M sobre a produção de glicose, glicogenólise e glicólise em fígados perfundidos de ratos controle e GK..... | 50 |
| Figura 13. Efeito da infusão de isoproterenol 20 μ M sobre a produção de glicose, glicogenólise e glicólise em fígados perfundidos de ratos controle e GK..... | 51 |
| Figura 14. Produção de glicose a partir de L-lactato 2 mM em fígados perfundidos de ratos controle e GK..... | 52 |
| Figura 15. Produção de glicose a partir de piruvato 5 mM em fígados perfundidos de ratos controle e GK..... | 53 |
| Figura 16. Produção de glicose a partir de glicerol 2 mM em fígados perfundidos de ratos controle e GK. | 53 |
| Figura 17. Produção de glicose a partir de L-alanina 2,5 mM em fígados perfundidos de ratos controle e GK..... | 54 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Primeiro grupo de protocolos experimentais | 29 |
| Tabela 2. Caracterização do modelo experimental de ratos diabéticos sem obesidade: ratos Goto-Kakizaki..... | 37 |

ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------|---|
| AC | Adenilato ciclase |
| AGL | Ácidos graxos livres |
| AMPc | Adenosina monofosfato cíclico |
| AUC | Área sob a curva |
| CAM | Calmodulina |
| CAMK | Proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina |
| DAG | Diacilglicerol |
| DM | Diabetes mellitus |
| DM1 | Diabetes mellitus tipo 1 |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| FBPase1 | Frutose-1,6-bifosfatase |
| FBPase2 | Frutose-2,6-bifosfatase |
| FOXO1 | Forkhead Box 01 |
| G6Pase | Glicose-6-fosfatase |
| GH | Hormônio do crescimento |
| GK | Goto-Kakizaki |
| GLUT 4 | Transportador de glicose |
| GSK-3 | Glicogênio-sintase quinase 3 |
| GTT | Teste de tolerância à glicose |
| ITT | Teste de tolerância à insulina |
| IL | Interleucina |
| IL- β | Interleucina 1 β |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IP3 | Inositol-1,4,5-trifosfato |
| IR | Receptor de insulina tirosina quinase |
| IRS | Substrato receptor de insulina |
| IRS1 | Substrato receptor de insulina 1 |
| IRS2 | Substrato receptor de insulina 2 |
| kITT | Taxa de decaimento da glicemia |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| PC | Piruvato carboxilase |
| PDK1 | Proteína quinase-1 dependente de 3-fosfoinositídeo |

| | |
|---------------|--|
| PEPCK | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase |
| PFK1 | Fosfofrutoquinase 1 |
| PFK2 | Fosfofrutoquinase 2 |
| PGC1 α | Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3-OH quinase |
| PIP2 | Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato |
| PK | Piruvato quinase |
| PKA | Proteína quinase dependente de AMPc |
| PKB / Akt | Proteína quinase B |
| PKC | Proteína quinase C |
| PLC | Fosfolipase C |
| PTPase | Proteína tirosina fosfatase |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral α |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Homeostase glicêmica..... | 15 |
| 1.2 Regulação hormonal da homeostase glicêmica..... | 16 |
| 1.3 Diabetes mellitus tipo 2..... | 21 |
| 1.4 Resistência à insulina..... | 22 |
| 1.5 Modelo genético de resistência à insulina sem obesidade: ratos Goto-Kakizaki..... | 25 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 26 |
| 3 OBJETIVOS | 27 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 27 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 27 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 Químicos..... | 28 |
| 4.2 Animais..... | 28 |
| 4.3 Avaliação do peso corporal e da ingestão alimentar..... | 29 |
| 4.4 Ensaio Metabólicos..... | 30 |
| 4.4.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)..... | 30 |
| 4.4.2 Teste de tolerância à insulina (ITT)..... | 30 |
| 4.5 Coleta de sangue e remoção de tecidos..... | 31 |
| 4.6 Dosagem de glicogênio hepático..... | 31 |
| 4.7 Perfusão de fígado para avaliação da glicogenólise, glicólise e neoglicogênese..... | 31 |
| 4.8 Determinações bioquímicas..... | 34 |
| 4.8.1 Determinação da concentração de glicose sérica e no perfusato..... | 34 |
| 4.8.2 Determinação da concentração de L-lactato sérico e no perfusato..... | 34 |
| 4.8.3 Determinação da concentração de piruvato no perfusato..... | 35 |
| 4.8.4 Determinação da concentração de ureia no perfusato..... | 35 |
| 4.9 Análise estatística..... | 35 |
| 5 RESULTADOS | 37 |
| 5.1 Caracterização do modelo experimental de ratos diabéticos sem obesidade: Goto Kakizaki (GK)..... | 37 |
| 5.2 Determinação da menor concentração de AMPc capaz de estimular a produção de glicose e a glicogenólise em fígado de ratos GK..... | 41 |
| 5.3 Avaliação do efeito supressivo da insulina sobre a produção de glicose e glicogenólise estimuladas por AMPc em fígado de ratos GK..... | 45 |

| | |
|--|-----------|
| 5.4 Avaliação da produção de glicose, glicogenólise e glicólise em fígado de ratos GK..... | 48 |
| 5.5 Avaliação da neoglicogênese em fígado de ratos GK..... | 52 |
| 6 DISCUSSÃO | 55 |
| 7 CONCLUSÃO | 62 |
| 8 REFERÊNCIA | 63 |
| ANEXO | 69 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Homeostase glicêmica

A homeostase glicêmica é rigidamente regulada para atender aos requisitos de energia dos órgãos vitais e manter a saúde de um indivíduo. A integração precisa na cinética da glicose é efetuada por complexos mecanismos envolvendo, entre outros, fatores neurais, autorregulatórios e hormonais, os quais, em conjunto, são denominados de fatores glicorregulatórios. O fígado é crucial para a manutenção da homeostase glicêmica, uma vez que controla várias vias do metabolismo da glicose, incluindo glicogênese, glicogenólise, glicólise e neoglicogênese (HAN et al., 2016), as quais são reguladas por mecanismos independentes (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017). A produção hepática de glicose é a soma do fluxo dessas vias metabólicas, e é regulada pelo fornecimento de substratos; por controle alostérico exercido por metabólitos; por hormônios, como insulina, glucagon, adrenalina, cortisol e hormônio do crescimento (GH); e pelo estado redox da célula (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017; RUI, 2014).

A glicólise é fundamental para o catabolismo da glicose na maioria das células, sendo essencial para gerar energia (HAN et al., 2016). No estado alimentado, a glicólise é a via metabólica dominante, devido à grande disponibilidade de glicose. Esta via é controlada por enzimas limitantes, incluindo a glicoquinase, que converte glicose em glicose-6-fosfato; a fosfofrutoquinase 1 (PFK1), a qual converte frutose-6-fosfato em frutose 1,6-bifosfato; e piruvato quinase (PK), a qual converte fosfoenolpiruvato em piruvato. Essas enzimas são reguladas por mediadores alostéricos, os quais geralmente promovem o catabolismo da glicose na célula; pelos hormônios glucagon, adrenalina e insulina e por variações na expressão de genes de várias enzimas glicolíticas (HAN et al., 2016; RUI, 2014).

No estado alimentado, o aumento da concentração de insulina plasmática e o aumento da concentração de glicose no fígado são fatores responsáveis pelo aumento da taxa de glicogênese, resultando em aumento dos estoques de glicogênio. O aumento da sinalização de insulina resulta em ativação da glicogênio sintase, enzima responsável pela produção de glicogênio, e inativação da glicogênio fosforilase, a enzima chave da glicogenólise (quebra de glicogênio). Sob condição de jejum, os

hormônios glucagon e adrenalina ativam a enzima glicogênio fosforilase, e inativam a glicogênio sintase, inibindo assim a glicogênese e ativando a glicogenólise (HAN et al., 2016).

Entre as refeições e durante longos períodos de jejum, ou após exercício físico rigoroso, o estoque de glicogênio é depletado e o fígado intensifica a produção de glicose pela neoglicogênese, usando como precursores lactato, piruvato, glicerol e aminoácidos (RUI, 2014). As principais enzimas reguladoras nessa via incluem a glicose-6-fosfatase (G6Pase), frutose-1,6-bifosfatase (FBPase1), piruvato carboxilase (PC) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), as quais são intensificadas em condições de jejum para aumentar o fluxo gliconeogênico nesse cenário (HAN et al., 2016).

As diversas vias metabólicas relacionam-se entre si de maneira complexa, de forma a permitir uma regulação adequada. Este relacionamento envolve a regulação enzimática de cada uma das vias, o perfil metabólico característico de cada órgão e o controle hormonal (HAN et al., 2016).

1.2 Regulação hormonal da homeostase glicêmica

Como mencionado, a homeostase glicêmica é mantida por mecanismos complexos, dentre eles, mecanismos hormonais afinados que buscam alcançar as necessidades metabólicas de um indivíduo. Entre os hormônios glicorregulatórios destacam-se insulina, glucagon, adrenalina, cortisol e GH.

A insulina é um hormônio peptídico, produzido e secretado pelas células β -pancreáticas em resposta à concentração circulante de glicose, que regula a captação de glicose plasmática pelo fígado (de forma indireta), músculo esquelético e tecido adiposo. Esse hormônio também regula diversos processos celulares, essenciais para a manutenção da homeostase glicêmica, incluindo a síntese e degradação de glicogênio, as vias glicolítica e neoglicogênica, o metabolismo lipídico e proteico, a síntese de DNA e a transcrição gênica (LI et al., 2022; RAHMAN et al., 2021). Sob condições fisiológicas, o aumento da concentração plasmática de glicose aumenta a secreção e circulação de insulina, a qual age estimulando a captação de glicose por tecidos periféricos e inibindo a produção hepática de glicose, o que impede a elevação da glicemia (LI et al., 2022)

As funções intracelulares e a atividade metabólica de insulina são mediadas pelo receptor de insulina tirosina quinase (IR) presente na membrana plasmática de células-alvo. Após a ligação da insulina em seu receptor, ocorre o recrutamento/fosforilação de proteínas que incluem principalmente o substrato do receptor de insulina (IRS) e a ativação de duas vias de sinalização, a via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (PKB/Akt), a qual é amplamente conservada entre os tecidos-alvo de insulina e inicia a resposta intracelular da insulina (LI et al., 2022), e a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que atua no controle da expressão gênica para mediação dos efeitos da insulina sobre o crescimento e a diferenciação celular (RAHMAN et al., 2021).

Os papéis reguladores da insulina na função celular e no metabolismo energético são amplamente mediados pela via PI3K/Akt. Uma vez ativada pelo IRS, a PI3K fosforila o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato para produzir fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, o qual fosforila e, portanto, ativa a proteína quinase-1 dependente de 3-fosfoinosítido (PDK1). PDK1, então, ativa Akt, que medeia múltiplas funções celulares, modulando o metabolismo da glicose e de lipídios (RAHMAN et al., 2021).

No músculo esquelético e no tecido adiposo, a sinalização insulínica promove a captação de glicose via translocação do transportador de glicose GLUT4 das vesículas intracelulares para a membrana plasmática. Além disso, a ativação da Akt estimula a síntese de glicogênio no músculo a partir da inibição da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) e da inativação da enzima glicogênio fosforilase. A insulina também ativa a proteína fosfatase 1 (PP1), por um processo dependente da PI3K, que desfosforila e ativa a glicogênio sintase diretamente (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). A insulina, no fígado, também reduz a produção de glicose por inibir a neoglicogênese a partir da supressão da FOXO1, prevenindo a ativação de enzimas-chaves da neoglicogênese, como a G6Pase e a PEPCK. Além disso, assim como no músculo esquelético, a ativação da Akt estimula a síntese de glicogênio hepático a partir da inibição da enzima GSK-3, inativação da enzima glicogênio fosforilase e ativação da PP1. No tecido adiposo, a ação mais importante da insulina é suprimir a lipólise e estimular o transporte de glicose para o tecido adiposo, favorecendo a lipogênese e a adipogênese (LEE; PARK; CHOI, 2022).

Para a prevenção da hipoglicemia e manutenção da homeostase glicêmica, passos-chave na resposta glicorregulatória, ativam mecanismos que atuam

basicamente em três pontos do metabolismo: a) na supressão da secreção endógena de insulina; b) no estímulo à produção de glicose; c) na limitação da utilização de glicose por tecidos periféricos. Os hormônios que exercem esse papel são chamados de hormônios contrarregulatórios, dentre eles o glucagon e a adrenalina (SNELL, 1991).

O glucagon, secretado pelas células alfa das ilhotas pancreáticas para a circulação portal, estimula a produção hepática de glicose, inicialmente por estimular a glicogenólise e posteriormente por ativar a neoglicogênese. Sob a maioria das condições fisiológicas, o glucagon atua exclusivamente no fígado não afetando diretamente o metabolismo periférico de glicose. Entretanto, por estimular a secreção de insulina, o glucagon pode indiretamente aumentar a utilização da glicose (LOPES et al., 1998).

Os mecanismos dos efeitos hiperglicêmicos da adrenalina, hormônio adrenomedular, são mais complexos. Estes envolvem estimulação da produção de glicose e limitação da sua utilização. São mediados através de receptores α e β -adrenérgicos e incluem ações diretas e indiretas. Importantes ações indiretas da adrenalina compreendem: inibição α -adrenérgica da secreção de insulina, estimulação β -adrenérgica da secreção de glucagon e da lipólise e aumento da disponibilidade de precursores neoglicogênicos (LOPES et al., 1998).

Os efeitos do glucagon e da adrenalina no metabolismo hepático da glicose (glicogenólise, neoglicogênese e glicólise) ocorrem por duas vias de sinalização, como esquematizado na Figura 1 e descrito abaixo:

1) Via adenilato-ciclase (AC)/adenosina monofosfato cíclico (AMPc)/proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (via AC/AMPc/PKA). Nesta via, o glucagon (via receptores GR2) e a adrenalina (via receptores β) ativam a AC, a enzima que converte o ATP em AMPc. O AMPc gerado ativa a PKA, a qual, por fosforilação-dependente de ATP, ativa enzimas da glicogenólise (fosforilase-b quinase, que fosforila e ativa a glicogênio fosforilase), inibe enzimas da glicólise (PK) e ativa a enzima bifuncional (fosfofrutoquinase 2 (PFK2)/frutose-2,6-bisfosfatase (FBPase2)). A enzima bifuncional ativa (fosforilada) diminui os níveis de frutose-2,6-bisfosfato (inibidor da FBPase1 e ativador da PFK1), ativando a enzima-chave da neoglicogênese (FBPase1) e inibindo a enzima-chave da glicólise (PFK1). A ativação da FBPase1 e a inibição da PFK1

diminui os níveis de frutose-1,6-bisfosfato e assim o seu efeito estimulatório sobre a PK, diminuindo a atividade desta enzima. Isto amplifica o efeito inibitório do glucagon na glicólise e seu efeito estimulatório na neoglicogênese (EXTON, 1987; MILLER; BIRNBAUM, 2016; RAMNANAN et al., 2011; SHARABI et al., 2015).

2) Via fosfolipase C (PLC)/Ca²⁺/proteína quinase dependente de Ca²⁺ e calmodulina (via PLC/Ca²⁺/CAMK). Nesta via, o glucagon (via receptores GR1) e a adrenalina (via receptores α) ativam a PLC, a enzima que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), gerando Inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), o qual libera íon cálcio (Ca²⁺) do retículo endoplasmático (JIANG; ZHANG, 2003). O Ca²⁺ liberado se liga à calmodulina (CAM) e o complexo cálcio-calmodulina (Ca²⁺CAM) estimula a PK-Ca²⁺CAM, a qual, por meio de fosforilação dependente de ATP, inibe a PK, diminuindo a glicólise e aumentando a neoglicogênese (RODGERS, 2012). O complexo Ca²⁺CAM também ativa alostericamente a fosforilase-b quinase, a qual, por fosforilação dependente de ATP, ativa a glicogênio fosforilase, estimulando a glicogenólise (EXTON, 1987; PILKIS; GRANNER, 1992; RAMNANAN et al., 2011). Foi mostrado que o glucagon, via Ca²⁺, estimula a glicogenólise (EXTON, 1987) e a neoglicogênese (KELMER-BRACHT et al., 2002) e inibe a glicólise (CONSTANTIN et al., 1995).

Portanto, a insulina, o glucagon e a adrenalina apresentam papéis fundamentais na manutenção da homeostase glicêmica, e a alteração da síntese, secreção e/ou ação destes hormônios pode comprometer a manutenção da homeostase glicêmica.

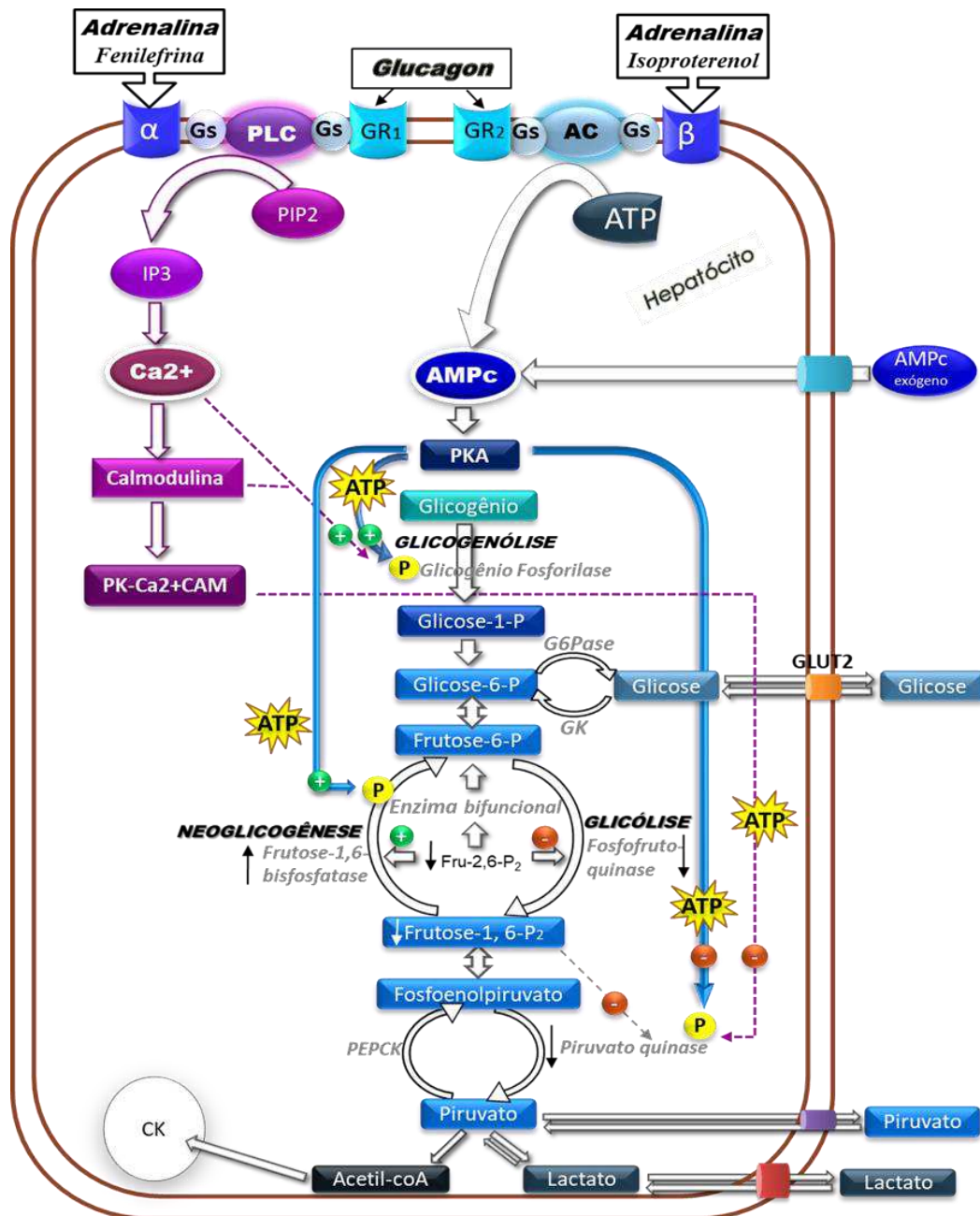


Figura 1. Vias de sinalização do glucagon e da adrenalina no Metabolismo hepático da glicose: 1) Via AC/AMPc/PKA e 2) Via PLC/Ca²⁺/PK-Ca²⁺CAM. Adenilato ciclase (AC); adenosina monofosfato cíclica (AMPc); adenosina trifosfato (ATP); cálcio (Ca²⁺); ciclo de Krebs (CK); fosfolipase C (PLC); fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2); fosfoenolpiruvocarboxiquinase (PEPCK); frutose-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂); glicoquinase (GK); glicose-6-fosfatase (G6Pase); Inositol-1,4,5-trifosfato (IP3); proteínas G mediando efeitos dependentes de AMPc (Gs) e de Ca²⁺ (Gq); proteína quinase A dependente de AMPc (PKA); proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina (PK-Ca²⁺CAM); receptores para adrenalina (α e β); receptores para glucagon (GR1 e GR2); transportador de glicose (GLUT2); estimulação (+); inibição (-). Fonte: Biazi et al., 2018.

1.3 Diabetes mellitus tipo 2

Dentre os distúrbios que podem comprometer a manutenção da homeostase glicêmica destaca-se o diabetes mellitus, doença caracterizada por hiperglicemia associada a alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, que podem ser causadas por insuficiência absoluta ou relativa na secreção de insulina e/ou por resistência à ação da insulina (GALICIA-GARCIA et al., 2020; CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017; PEARSON, 2019). A hiperglicemia observada nos pacientes diabéticos pode ser decorrente do aumento da produção hepática de glicose e/ou da redução da captação de glicose pelos tecidos periféricos (PETERSEN; SHULMAN, 2018).

Segundo a Federação Internacional de Diabetes, em 2021, o Brasil ocupou o 6º lugar entre os 10 países do mundo e o 1º lugar entre os países da América do Sul com o maior número de indivíduos adultos (20 a 79 anos) acometidos por DM, contando com aproximadamente 15,7 milhões de pessoas diagnosticadas. O Brasil ainda se encontra na 3ª posição entre os países com o maior gasto total em saúde devido ao DM, perdendo somente para Estados Unidos e China (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021).

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), os dois principais tipos de diabetes são: Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), que ocorre pela deficiência de insulina provocada pela destruição autoimune das células β no pâncreas ou por natureza idiopática, surge principalmente na infância e leva à deficiência sistêmica da insulina (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017; COPPIETERS; BOETTLER; VON HERRATH, 2012; GALICIA-GARCIA et al., 2020; PEARSON, 2019; PRINCIPI et al., 2017) e Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), caracterizado pela perda progressiva de função e secreção da insulina combinada com resistência à insulina em órgãos sensíveis ao hormônio, como o fígado, o músculo esquelético e o tecido adiposo (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017). O DM2 é caracterizado por hiperglicemia decorrente da secreção insuficiente de insulina, sem a produção compensatória do hormônio e/ou da resistência à insulina. A interação entre a predisposição genética e fatores de risco ambientais e comportamentais (como o aumento do consumo de dietas de alto valor calórico e o menor gasto energético devido ao sedentarismo) também é um fator que pode ocasionar menor resposta tecidual à insulina (GALICIA-GARCIA et al., 2020).

O DM2 corresponde a 90 a 95% de todos os casos de DM e demanda elevados gastos públicos no seu tratamento (ROSA et al., 2018; SBD, 2022). O intervalo de tempo entre o surgimento da resistência insulínica até a instalação do DM2 varia entre os indivíduos, passando por estágios caracterizados por hiperglicemia, redução da tolerância à glicose e aumento da secreção de insulina (SBD, 2022). O quadro de resistência à insulina pode permanecer por um longo período antes da instalação do DM2, uma vez que, inicialmente, a secreção de insulina pelas células β aumenta de maneira compensatória. Porém, quando esta compensação não é mais capaz de sustentar o grau da resistência insulínica, começa a deficiência na produção e/ou liberação hormonal, causando uma hiperglicemia constante (GALICIA-GARCIA et al., 2020; PEARSON, 2019). A resistência à insulina nos tecidos periféricos pode ocorrer por baixa sinalização da insulina pela interferência do receptor de insulina (IR) nos tecidos alvos ou pela interferência da cascata de sinalização intracelular desencadeada pela ligação da insulina ao seu receptor (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017; GALICIA-GARCIA et al., 2020; PEARSON, 2019).

O DM2 está geralmente associado à obesidade, onde a maioria dos indivíduos diagnosticados são obesos ou estão com sobrepeso. Entretanto, alguns estudos mostram que há grupos de indivíduos com DM2 que apresentam índice de massa corporal baixo ($<18,5 \text{ kg/m}^2$) ou normal ($>18,5$ e $<25 \text{ kg/m}^2$). Na Ásia Oriental, foram reportados casos de pacientes diabéticos tipo 2 magros que apresentam resistência à insulina, porém em menor grau do que a observada em diabéticos tipo 2 obesos, e fazem uso de insulina, indicando que há rápida falha das células β pancreáticas nesses pacientes com DM2 sem obesidade (CHEN; MAGLIANO; ZIMMET, 2012; HARTMANN et al., 2017).

Dessa forma, considerando o crescimento global do quadro de DM2, é fundamental compreender os mecanismos que estão envolvidos nesse distúrbio metabólico.

1.4 Resistência à insulina

No DM2, a resistência à insulina é a principal responsável pela hiperglicemia. A resistência à insulina é caracterizada por uma resposta diminuída a ação da insulina, resultando na falha dos tecidos-alvo em utilizar adequadamente a glicose sanguínea, reduzir a lipólise, aumentar a síntese de glicogênio e reduzir a produção hepática de

glicose. Como uma resposta compensatória, a secreção de insulina aumenta, levando à hiperinsulinemia (PETERSEN; SHULMAN, 2018). Além do DM2, outras doenças são clinicamente associadas à resistência à insulina, como obesidade, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e câncer (LI et al., 2022).

Como mencionado, a resistência à insulina, na maioria dessas patologias, se caracteriza por alterações em diversos pontos da via de transmissão do sinal insulínico, com redução da concentração e da atividade quinase do IR, da concentração e da fosforilação dos IRS, da atividade da PI3K, da translocação de GLUT4 e da atividade das enzimas intracelulares (LI et al., 2022).

No músculo esquelético, a resistência à insulina é manifestada pela diminuição da captação de glicose estimulada pela insulina e resulta da sinalização prejudicada do hormônio e de múltiplos defeitos intracelulares pós-receptores, incluindo redução do transporte da glicose, da fosforilação e oxidação da glicose e da síntese de glicogênio (ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010). Estudos em humanos sugerem que falha na ativação da cascata de sinalização do IR e na consequente translocação do GLUT4 é a principal causa da resistência à insulina no músculo esquelético (GARVEY et al., 1998). Defeitos nos níveis mais proximais da sinalização da insulina, como redução da atividade do IR, IRS-1, PI3K e Akt, têm sido descritos como responsáveis pela resistência à insulina no músculo esquelético (PETERSEN; SHULMAN, 2018), resultando em uma diminuição na captação de glicose estimulada pela insulina (DA SILVA ROSA et al., 2020).

O tecido adiposo, a insulina estimula o armazenamento de triglicerídeos por estimular a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, inibir a lipólise e aumentar a captação de ácidos graxos e glicose (DA SILVA ROSA et al., 2020; PERRY et al., 2015). O excesso de armazenamento de energia leva à hipertrofia dos adipócitos, aumentando a secreção de várias adipocinas, principalmente das adipocinas pró-inflamatórias (SKURK et al., 2007). Além disso, a hipertrofia de adipócitos leva a um aumento no infiltrado de macrófagos no tecido adiposo, aumentando a liberação de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). Ademais, foi demonstrado que o TNF- α induz a fosforilação em serina do IRS-1, diminuindo assim sua associação com a PI3K e impedindo a sinalização da insulina. Adicionalmente, os

mediadores inflamatórios $TNF\alpha$ ou $IL-1\beta$ aumentam a lipólise e inibem o IR, prejudicando a sinalização da insulina neste tecido (RUI et al., 2001). A resistência à insulina no tecido adiposo causa diminuição na fosforilação de Akt2, resultando em ativação sustentada da lipólise (MORIGNY et al., 2016). Como resultado, aumenta a produção e circulação de ácidos graxos, os quais são captados pelo fígado e músculo, contribuindo para a deposição ectópica de lipídios, resultando em resistência à insulina nesses tecidos (DA SILVA ROSA et al., 2020).

O fígado é o principal órgão de ação da insulina. Entre as muitas funções importantes deste hormônio, a síntese de glicogênio a partir da glicose e a conversão do excesso de glicose em ácidos graxos e triglicerídeos são as mais cruciais. A insulina regula positivamente a utilização de glicose via ativação da glicólise e glicogênese, e regula negativamente a produção de glicose, suprimindo a produção líquida de glicose a partir da supressão da neoglicogênese e da glicogenólise (RAHMAN et al., 2021).

No fígado, a resistência à insulina aumenta a produção de glicose, porém, a lipogênese é mantida no fígado, resultando em hiperglicemia e hiperlipidemia (LEE; PARK; CHOI, 2022). Uma das hipóteses descritas na literatura para a possível causa da resistência hepática à insulina se relaciona com o aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL) derivado da lipólise no tecido adiposo branco com resistência à insulina, que culmina em deposição ectópica de AGL no fígado. O acúmulo de AGL no fígado resulta em maior conteúdo intracelular de diacilglicerol (DAG), o qual, por sua vez, leva à ativação de uma proteína quinase C (PKC). A PKC induz a resistência à insulina inibindo a fosforilação estimulada pela insulina das proteínas IRS. Além disso, o excesso de AGL ativa a sinalização inflamatória por *toll-like receptors* (TLR), que eleva a síntese *de novo* de ceramidas (BAZOTTE; SILVA; SCHIAVON, 2014). Assim, o acúmulo de ceramidas no fígado leva, por sua vez, a resistência hepática à insulina, com redução da fosforilação da Akt, a qual deixará de fosforilar e inativar o fator de transcrição Forkhead Box 01 (FOXO1), induzindo a transcrição de enzimas chave da neoglicogênese, aumentando a taxa de produção hepática de glicose (ZHANG et al., 2006).

Além disso, estudos recentes sugerem que a resistência hepática à insulina pode estar relacionada à baixa concentração do coativador-1 alfa do receptor ativado

por proliferadores de peroxissoma gama ($PGC1\alpha$), que resulta na inibição da expressão de proteínas IRS1 e IRS2, prejudicando a via de sinalização da insulina, afetando a homeostase glicêmica (DA SILVA ROSA et al., 2020).

1.5 Modelo genético de resistência à insulina sem obesidade: ratos Goto-Kakizaki

No presente estudo, ratos Goto-Kakizaki (GK) foram utilizados como modelo genético de resistência à insulina sem obesidade, desenvolvidos por meio de reproduções seletivas de ratos Wistar intolerantes à glicose (GOTO; KAKIZAKI; MASAKI, 1975; KITAHARA et al., 1978).

Além da resistência à insulina sem obesidade, os animais GK apresentam alteração na resposta das células β à glicose, porém com preservação da resposta das células β a outros secretagogos, e diminuição do número de células β (GIRAULT et al., 2019; PORTHA et al., 2012; XIANG et al., 2015). Por apresentar uma cronologia da doença muito semelhante à do ser humano e por desenvolverem o DM de forma espontânea e sem manipulação genética, esses animais são considerados um excelente modelo para estudo das alterações metabólicas relacionadas ao DM2.

Os ratos GK apresentam várias alterações metabólicas específicas no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo dependentes da idade do animal, que surgem entre 6 a 8 semanas e acentuam-se com seu envelhecimento. Os animais GK desenvolvem hiperglicemia moderada, intolerância à glicose, resistência à insulina, dislipidemia, inflamação e estresse oxidativo (MATAFOME et al., 2011).

Alguns autores atribuem a hiperglicemia de jejum de ratos GK ao aumento da produção hepática de glicose (BEDDOW; SAMUEL, 2012; KITAHARA et al., 1978; SENA et al., 2007) e a alta taxa neoglicogênica seria responsável por esse aumento da glicemia de jejum observado em ratos GK (BEDDOW; SAMUEL, 2012; SENA et al., 2007; YOSHIDA et al., 2009).

A neoglicogênese é uma das maiores vias de produção endógena de glicose, a qual resulta na produção de glicose a partir de piruvato, L-lactato, glicerol e aminoácidos, como a L-alanina (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017). Outra via de produção endógena de glicose é a glicogenólise. Ambas as vias são reguladas por hormônios como insulina, glucagon e adrenalina (RUI, 2014). Uma resposta alterada para estes hormônios, os quais desempenham efeitos metabólicos importantes no

fígado (ALBRECHTSEN, 2021; LUNDQVIST et al., 2021), também pode estar relacionada às anormalidades no metabolismo hepático da glicose.

Conforme mencionado, o glucagon e a adrenalina são hormônios contrarreguladores que aumentam a glicemia por estimularem a glicogenólise e a neoglicogênese hepática. Além disso, o glucagon inibe a glicólise, um efeito que contribui para o aumento da liberação de glicose pelo fígado (PILKIS; GRANNER, 1992). Os efeitos do glucagon e da adrenalina (via receptores β -adrenérgicos) no fígado são mediados pelo mensageiro intracelular AMPc. O AMPc gerado ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), a qual fosforila muitas enzimas intracelulares envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio, da neoglicogênese e da glicólise (PILKIS; GRANNER, 1992). Entretanto, até o momento, a produção de glicose a partir de diferentes precursores neoglicogênicos, assim como a glicogenólise estimulada por agentes glicogenolíticos, como AMPc, fenilefrina (agonista de receptores α -adrenérgicos) e isoproterenol (agonista de receptores β -adrenérgicos), não foram avaliadas em fígados perfundidos de ratos GK.

Portanto, sabendo que os animais GK apresentam hiperglicemia e resistência insulínica, e que a alteração da produção hepática de glicose pode contribuir para esse quadro, o nosso trabalho avaliou o efeito supressivo da insulina sobre a produção hepática de glicose e glicogenólise estimuladas por AMPc; o efeito do glucagon, da fenilefrina e do isoproterenol sobre a glicogenólise e a glicólise; e a produção de glicose a partir de diferentes precursores neoglicogênicos (L-lactato, piruvato, glicerol e L-alanina), em experimentos de perfusão de fígado *in situ*, com o intuito de verificar a contribuição destas vias na gênese da hiperglicemia e da resistência à insulina em ratos GK.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que alguns indivíduos com DM2 apresentam resistência à insulina sem obesidade, torna-se relevante investigar, em ratos diabéticos GK, um modelo experimental de resistência à insulina sem obesidade, a contribuição das vias do metabolismo hepático da glicose na gênese da hiperglicemia, assim como o efeito da insulina, do glucagon e de agonistas adrenérgicos sobre a produção hepática de glicose, com o objetivo de avaliar a responsividade hepática a estes hormônios e sua possível contribuição para a gênese da resistência à insulina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a produção hepática de glicose em ratos Goto-Kakizaki, um modelo animal de resistência à insulina sem obesidade.

3.2 Objetivos específicos

- Implantar, no Laboratório de Fisiologia Metabólica, o modelo experimental de DM2 em ratos GK, por meio da avaliação do(a): ganho de peso corporal, ingestão alimentar, tolerância à glicose e à insulina, concentrações plasmáticas de glicose e lactato, massa de tecido adiposo branco, músculo e fígado, e conteúdo de glicogênio hepático.
- Determinar a menor concentração de AMPc capaz de estimular a produção de glicose e a glicogenólise em fígado perfundido de ratos GK;
- Avaliar o efeito supressivo da insulina sobre a produção de glicose e a glicogenólise estimuladas por AMPc, em perfusão de fígado *in situ*;
- Avaliar o efeito do glucagon 1 nM, da fenilefrina 2 μ M e do isoproterenol 20 μ M sobre a produção de glicose, glicogenólise e glicólise, em perfusão de fígado *in situ*;
- Avaliar a neoglicogênese a partir de lactato 2 mM, piruvato 5 mM, glicerol 2 mM e alanina 2,5 mM, em perfusão de fígado *in situ*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Químicos

A insulina lispro (Humalog®) foi adquirida da Brasil Eli Lilly (São Paulo/SP, Brasil), glucagon (glucagen®) da Novo Nordisk (Brasil) e isoproterenol, fenilefrina e AMPc da Sigma (St Louis, MO). Os sais do líquido de perfusão, precursores gliconeogênicos e outros produtos químicos foram obtidos da Sigma (St Louis, EUA), Merck (Darmstad, Alemanha), Reagen (Rio de Janeiro, Brasil), Gold Analisa (Belo Horizonte, Brasil) ou Vida Biotecnologia (Belo Horizonte, Brasil).

4.2 Animais

Foram utilizados ratos machos GK provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil) e ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (Londrina, Brasil). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL) em gaiolas coletivas (4-5 ratos/gaiola) com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com ração padrão para roedores (Nuvilab CR-1; Nuvital, Colombo, Brasil). Água e alimento foram fornecidos à vontade, exceto durante os períodos de jejum que precederam os experimentos. Os experimentos foram sempre iniciados no mesmo horário (período matutino), para minimizar variações circadianas. Os protocolos dos experimentos foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), registro nº 062.2021 (ANEXO). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Metabólica do CIF/UEL.

Os animais foram divididos nos grupos GK (ratos GK) e controle (ratos Wistar) e submetidos aos seguintes protocolos experimentais:

- Primeiro grupo de protocolos experimentais:

Animais a partir de 8 semanas de idade foram submetidos a avaliação do ganho de peso corporal, da ingestão alimentar, da tolerância à glicose (GTT), da tolerância à insulina (ITT), das concentrações plasmáticas de glicose e lactato, da massa de tecido adiposo branco, músculo e fígado e do conteúdo de glicogênio hepático, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Primeiro grupo de protocolos experimentais.

| Dia | 1º | 2º | 3º | 4º | 5º | 6º | 7º | 8º | 9º | 10º | 11º | 12º | 13º | 14º |
|-----------|----|----------|-----------|----|----|----------|-----------|----|----|----------|-----|-----|-----|----------------|
| Protocolo | PC | PC IA | PC GTT | | | PC IA | PC ITT | | | PC IA | | | | PC IA CA |

PC = avaliação do peso corporal; IA = avaliação da ingestão alimentar; GTT = teste de tolerância à glicose; ITT = teste de tolerância à insulina; CA = coleta de amostras de tecidos e sangue para dosagens plasmáticas.

Segundo grupo de protocolos experimentais:

Animais com 9 a 11 semanas de idade foram submetidos aos seguintes protocolos:

- Determinação da menor concentração de AMPc capaz de estimular a produção de glicose e a glicogenólise em fígado perfundido de ratos GK;
- Avaliação do efeito supressivo da insulina sobre a produção de glicose e glicogenólise estimuladas por AMPc, em perfusão de fígado *in situ*;
- Avaliação da glicogenólise e glicólise a partir de glucagon 1 nM, fenilefrina 2 µM e isoproterenol 20 µM, em perfusão de fígado *in situ*;
- Avaliação da neoglicogênese a partir de L- lactato 2 mM, piruvato 5 mM, glicerol 2 mM e L-alanina 2,5 mM, em perfusão de fígado *in situ*.

4.3 Avaliação do peso corporal e da ingestão alimentar

A avaliação do peso corporal e da ingestão alimentar foi realizada com animais entre 8 e 9 semanas de idade. Os animais foram pesados a cada quatro dias durante 13 dias e o ganho de peso corporal foi determinado pela diferença de peso entre o dia 1 e o dia 13. Para avaliação do consumo alimentar, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais e a diferença entre a quantidade de ração ofertada e a ração restante em um período de 24 horas foi avaliada no 2º, 6º, 10º e 14º dias. Para calcular a quantidade diária ingerida por 100 gramas de peso corporal (g%), os animais foram pesados e foi utilizada a seguinte equação $ia(g\%) = \frac{ia}{mc} \times 100$, onde: ia = ingestão alimentar em gramas; e mc = massa corporal do animal em gramas.

Para a predição do excesso de peso, o índice de Lee foi calculado a partir da relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento do nariz à cauda do animal: $\sqrt[3]{\text{Peso corporal (g)}} / \text{Comprimento naso-anal (cm)}$.

4.4 Ensaios Metabólicos

4.4.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Após privação alimentar de 12 horas, os animais com 8 semanas de idade foram submetidos ao teste de tolerância à glicose. Para a realização do teste, foi coletada uma gota de sangue da cauda dos animais para determinação da glicemia com o auxílio de uma tira reagente e um aparelho G-TECH Lite (Accumed-Glicomed, Brasil). Após a contenção manual cuidadosa do animal, foi realizado um corte mínimo da cauda com tesoura afiada desinfetada para a coleta de uma gota de sangue, que foi colocada diretamente na fita glicêmica adaptada ao glicosímetro. A primeira coleta representou a glicemia basal e imediatamente após foi administrada glicose 25% por via oral (gavagem) na dose de 1,0 g/kg do peso corporal do animal. A partir desse momento, as medidas de glicemia foram realizadas com a tira teste aos 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração da glicose. Ao final do experimento, a ração foi retornada às caixas dos animais (SOUZA, 2018). Os resultados obtidos foram avaliados pela área sob a curva (AUC) construída entre glicemia e períodos avaliados para cada animal submetido ao teste.

4.4.2 Teste de tolerância à insulina (ITT)

Após privação alimentar de 12 horas, animais com 9 semanas de idade foram submetidos ao teste de tolerância à insulina. Para a realização do teste, foi coletada uma gota de sangue da cauda dos animais (mesmo método de coleta de sangue da cauda descrito no item 4.4.1) para determinação da glicemia com o auxílio de uma tira reagente e um aparelho G-TECH Lite (Accumed-Glicomed, Brasil). A primeira coleta representou a glicemia basal e imediatamente após foi administrada injeção intraperitoneal de 0,75 UI de insulina lispro (Humalog®, Lilly) por kg de peso corporal do animal. A partir desse momento, foram realizadas dosagens de glicose sanguínea pela fita teste nos tempos 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após a administração de insulina. Ao final do experimento, a ração foi retornada às caixas dos animais (SOUZA, 2018). Os resultados obtidos foram avaliados pela AUC e pela taxa de decaimento da glicemia durante o teste de tolerância à insulina (KITTT), calculada com base na regressão linear do logaritmo neperiano das glicemias obtidas na fase linear de decaimento durante o teste (BONORA et al., 1989)

4.5 Coleta de sangue e remoção de tecidos

No 14º dia do primeiro grupo de protocolos experimentais, os animais alimentados foram pesados e anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg) por via intraperitoneal. A injeção de tiopental foi precedida (10 minutos) por uma injeção de lidocaína (7 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a indução da anestesia, os animais foram submetidos à laparotomia para coleta de amostra de sangue da veia cava caudal para a realização das dosagens plasmáticas. Em seguida, o tórax foi aberto paraesternalmente para indução da eutanásia e retirada de tecidos. Imediatamente após a coleta, o sangue foi colocado em tubos heparinizados, centrifugado a 2.500 rpm a 4°C por 20 minutos, e o plasma foi separado em alíquotas para dosagem de glicose e lactato. Em seguida, os tecidos adiposos mesentérico e epididimal, os músculos gastrocnêmio, extensor digital longo (EDL) e sóleo foram cuidadosamente removidos e pesados. O peso dos músculos foi corrigido para o comprimento da tíbia (g/cm) e o peso do tecido adiposo branco foi corrigido para o comprimento naso-anal (g/cm).

4.6 Dosagem de glicogênio hepático

No 14º dia do primeiro grupo de protocolos experimentais, para determinação do conteúdo de glicogênio hepático, os animais alimentados foram pesados e anestesiados com tiopental sódico (40 mg/Kg) pela via intraperitoneal, precedido (10 minutos) por uma injeção de lidocaína (7 mg/kg) por via intraperitoneal. Após indução da anestesia, os animais foram submetidos à laparotomia para a coleta de amostra de sangue (conforme subitem 4.5) e a exposição do fígado. Em seguida, o tórax foi aberto paraesternalmente para a indução de eutanásia e o fígado foi imediatamente retirado e congelado para posterior extração e quantificação do conteúdo de glicogênio pelo método da antrona (HASSID; ABRAHAM, 1957).

4.7 Perfusão de fígado para avaliação da glicogenólise, glicólise e neoglicogênese

Ratos com 9 a 11 semanas de idade foram anestesiados (40 mg/kg de tiopental sódico por via intraperitoneal precedido de 7 mg/kg de lidocaína por via intraperitoneal) e submetidos à perfusão de fígado *in situ* conforme descrito anteriormente (FRASSON-UEMURA et al., 2019). Após indução da anestesia, os animais foram laparotomizados para a coleta de amostra de sangue da veia cava caudal e, em seguida, foi feita a canulação da veia porta, através da qual entra o líquido de perfusão

no fígado. Logo após a introdução da cânula, os vasos abdominais abaixo do fígado foram seccionados para que houvesse o completo dessangramento deste órgão. A veia cava caudal, acima do diafragma, foi ocluída para desviar o líquido, que deixa o fígado através da veia hepática, para a veia cava caudal, abaixo do fígado. Posteriormente, a veia cava caudal (porção infra-hepática) foi canulada. Logo após, o fluxo através do fígado foi ajustado para valores que permitissem sua oxigenação adequada (aproximadamente $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de fígado). Este fluxo está muito acima dos valores fisiológicos ($0,15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e visa compensar a ausência de eritrócitos no líquido de perfusão. O fluido de perfusão, tampão Krebs-Henseleit (KHB), pH 7,4, a 37°C e saturado com uma mistura 95%:5% O_2 : CO_2 , foi introduzido (4 mL/min por grama de fígado) através da cânula inserida na veia porta. A composição do tampão KHB foi: NaCl 115 mM, NaHCO_3 25 mM, KCl 5,8 mM, Na_2SO_4 1,2 mM, MgCl_2 1,18 mM, NaH_2PO_4 1,2 mM e CaCl_2 2,5 mM. Os fígados foram perfundidos durante 10 minutos iniciais com o tampão KH para estabilização do consumo de oxigênio (DE MORAIS et al., 2012; DE SOUZA et al., 2015).

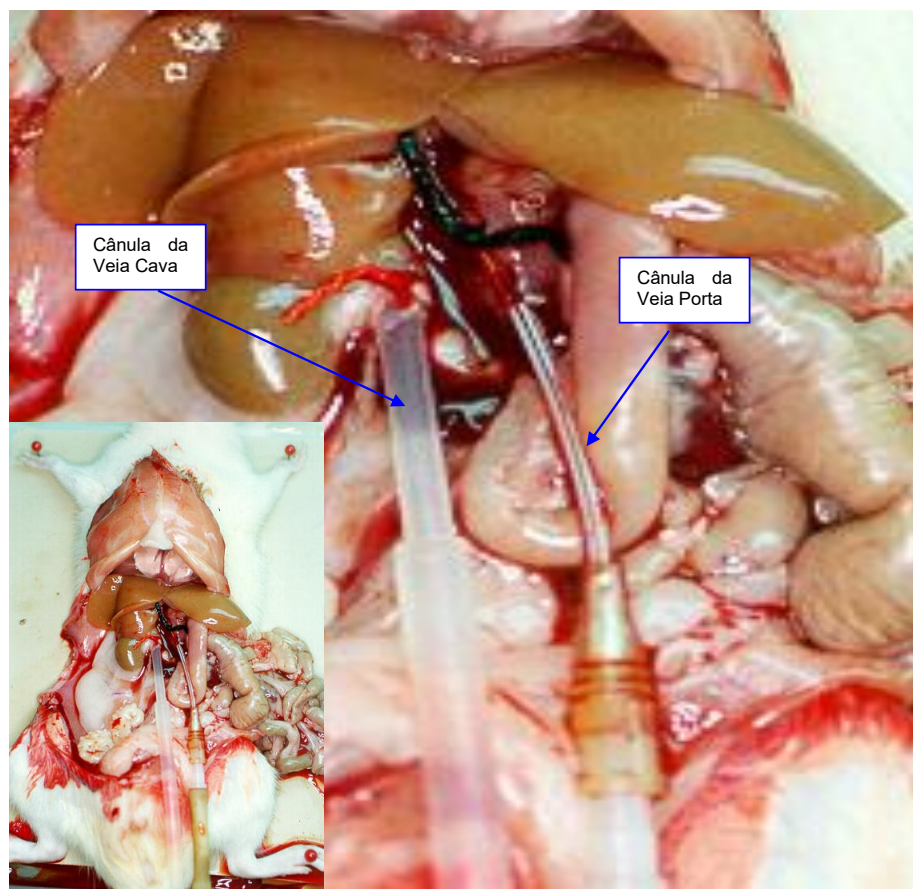


Figura 2. Fígado canulado na veia porta e veia cava caudal.

Para a determinação da concentração de AMPc capaz de estimular a produção de glicose em ratos GK, os fígados dos ratos alimentados foram submetidos ao seguinte protocolo de perfusão:

| 0 – 10 min | 10 – 50 min |
|------------|---|
| KH | KH + AMPc 3 μ M, 5 μ M ou 7 μ M |

Para a avaliação da resposta hepática à insulina, os fígados dos ratos alimentados foram submetidos ao seguinte protocolo de perfusão:

| 0 – 10 min | 10 – 24 min | 24 – 50 min |
|------------|---------------------|---|
| KH | KH + AMPc 7 μ M | KH + AMPc 7 μ M |
| KH | KH + AMPc 7 μ M | KH + AMPc 7 μ M + Insulina 50 μ UI/mL |

Para avaliação da produção de glicose, glicogenólise e glicólise, os fígados dos ratos alimentados foram submetidos ao seguinte protocolo de perfusão:

| 0 – 10 min | 10 – 30 min | 30 – 40 min |
|------------|-------------------------------|-------------|
| KH | KH + glucagon 1 nM | KH |
| KH | KH + fenilefrina 2 μ M | KH |
| KH | KH + isoproterenol 20 μ M | KH |

Para a avaliação da neoglicogênese, os fígados de ratos em privação alimentar de 24 horas foram submetidos ao seguinte protocolo de perfusão:

| 0 – 10 min | 10 – 40 min | 40 – 60 min |
|------------|-----------------------|-------------|
| KH | KH + L-lactato 2 mM | KH |
| KH | KH + piruvato 5 mM | KH |
| KH | KH + glicerol 2 mM | KH |
| KH | KH + L-alanina 2,5 mM | KH |

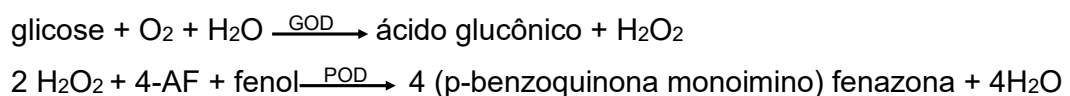
Durante a perfusão, amostras do líquido efluente do fígado foram coletadas, em intervalos de 2 minutos, para determinação das concentrações de glicose, lactato e piruvato. Ao final do experimento, o fígado foi retirado e pesado para quantificação das produções de glicose, lactato e piruvato por grama de fígado e cálculo das taxas

de glicogenólise, glicólise e neoglicogênese. A taxa de glicogenólise foi calculada pela soma da produção de glicose + $\frac{1}{2}$ da soma da produção de piruvato + lactato. A taxa de glicólise foi calculada pela soma da produção hepática de piruvato + lactato. A neoglicogênese correspondeu à glicose produzida e liberada pelo fígado durante a infusão do precursor de glicose (L-alanina, glicerol, L-lactato ou piruvato). Nos experimentos de perfusão com alanina, além da determinação das concentrações de glicose, foram determinadas as concentrações de piruvato e ureia nas amostras do líquido efluente (DE SOUZA et al., 2015). As AUC de produção de glicose, glicogenólise e glicólise foram calculadas para o intervalo em que o agente glicogenolítico ou o precursor neoglicogênico foi infundido.

4.8 Determinações bioquímicas

4.8.1 Determinação da concentração de glicose sérica e no perfusado

Empregou-se o método da glicose-oxidase, específico para quantificação de glicose (BERGMEYER; BERNT, 1974). Neste método, a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose-oxidase (GOD) gerando ácido glucônico e água oxigenada (H_2O_2). A H_2O_2 , em presença de peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-amino fenazona (4-AF), dando origem a um cromógeno com máximo de absorção em 505 nm de comprimento de onda. Devem ser consideradas as seguintes reações resumidas:

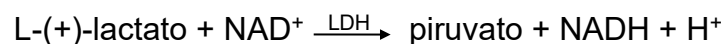


A glicemia foi expressa em mg/dL e a concentração de glicose no perfusado em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

4.8.2 Determinação da concentração de L-lactato sérico e no perfusado

A quantificação de L-lactato no soro e no perfusado foi realizada por meio de um método enzimático, segundo a técnica de Gutmann & Wahlefeld (1974).

Neste método, o L-lactato é oxidado para piruvato por NAD^+ em uma reação catalisada pela lactato desidrogenase (LDH):



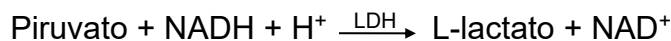
A formação de NADH é medida espectrofotometricamente a 340 nm.

Os valores obtidos foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

4.8.3 Determinação da concentração de piruvato no perfusado

A concentração de piruvato no perfusado foi quantificada por meio de um método enzimático, segundo a técnica de Czok & Lamprecht (1974).

Neste método, o piruvato é convertido enzimaticamente para L-lactato, com a oxidação de quantidades estequiométricas de NADH, em uma reação catalisada pela LDH:

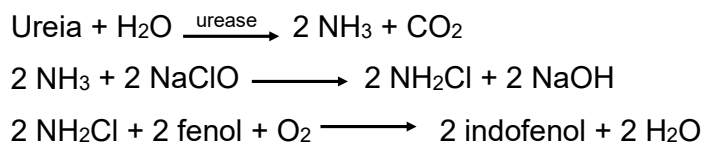


A oxidação de NADH é proporcional à quantidade de substrato convertido e é medida espectrofotometricamente a 340 nm.

Os valores obtidos foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

4.8.4 Determinação da concentração de ureia no perfusado

A concentração de ureia no perfusado foi determinada através de um método enzimático, de acordo com a técnica de Gutmann & Wahlefeld (1974). Neste método, a ureia é hidrolisada pela urease a NH_3 e CO_2 . A amônia reage em pH alcalino com hipoclorito de sódio e fenol, sob ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol, como segue:



A concentração de azul de indofenol é proporcional à concentração de ureia na amostra e é medida espectrofotometricamente a 600 nm. Os valores obtidos foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

4.9 Análise estatística

Os dados foram testados para distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Brown Forsythe) e testes estatísticos apropriados, indicados nas legendas das figuras, foram usados para analisar os resultados. Para os dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, foram conduzidas análises paramétricas. Na ausência de distribuição normal e/ou homogeneidade de variância, as variáveis foram analisadas por testes

não paramétricos. Os efeitos dos agentes glicogenolíticos ou precursores neoglicogênicos sobre o metabolismo hepático foram avaliados através da análise de AUC, expressa em $\mu\text{mol.g}^{-1}$. A regressão linear simples foi utilizada para análise do KITT. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Apenas os dados de GTT e AUC do GTT foram expressos como mediana (1º e 3º intervalos interquartis). As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 9.0, prefixando-se o nível de significância para 95% ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo experimental de ratos diabéticos sem obesidade: Goto Kakizaki (GK)

Ratos GK, com idade entre 8 e 9 semanas, apresentaram menor peso corporal, menor comprimento naso-anal e menor comprimento da tíbia, quando comparados aos ratos Wistar (controle) (Tabela 2). Entretanto, o índice de Lee não diferiu entre os grupos (Tabela 2). O grupo GK também apresentou menor massa dos músculos sóleo, EDL e gastrocnêmio, corrigida pelo comprimento da tíbia, do tecido adiposo epididimal, corrigida pelo comprimento naso-anal, e do fígado em comparação ao grupo controle. A massa do tecido adiposo mesentérico não diferiu entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização do modelo experimental de ratos diabéticos sem obesidade: ratos Goto-Kakizaki

| Parâmetros | Controle | | | GK | | | |
|---|----------|---------|----|--------|---------|----|---------|
| | Média | EPM | n | Média | EPM | n | p |
| Peso corporal (g) | 358,4 | ± 6,096 | 10 | 314,9* | ± 4,012 | 10 | <0,0001 |
| Ingestão alimentar/peso corporal (g/dia.100g) | 10,417 | ± 0,197 | 10 | 10,210 | ± 0,309 | 15 | 0,6114 |
| Índice de Lee (g^{1/3}/cm) | 0,292 | ± 0,007 | 9 | 0,290 | ± 0,020 | 15 | 0,7234 |
| Comprimento naso-anal (cm) | 24,35 | ± 0,299 | 10 | 22,90* | ± 0,163 | 10 | <0,0005 |
| Comprimento da tíbia (cm) | 3,880 | ± 0,061 | 10 | 3,510* | ± 0,054 | 10 | <0,0003 |
| Peso do fígado (g%) | 4,110 | ± 0,115 | 15 | 3,790* | ± 0,048 | 15 | <0,0300 |
| Tecidos musculares / comprimento da tíbia (cm) | | | | | | | |
| Sóleo (g/cm) | 0,045 | ± 0,001 | 10 | 0,036* | ± 0,001 | 10 | <0,0001 |
| EDL (g/cm) | 0,040 | ± 0,004 | 10 | 0,036* | ± 0,001 | 10 | <0,0200 |
| Gastrocnêmio (g/cm) | 0,572 | ± 0,018 | 10 | 0,460* | ± 0,111 | 10 | <0,0001 |
| Tecido adiposo branco / comprimento naso-anal (cm) | | | | | | | |
| Epididimal (g/cm) | 0,149 | ± 0,012 | 10 | 0,095* | ± 0,004 | 10 | <0,0001 |
| Mesentérico (g/cm) | 0,095 | ± 0,007 | 10 | 0,091 | ± 0,003 | 10 | 0,7529 |
| Glicose plasmática (mg/dL) | 102,0 | ± 3,657 | 8 | 168,0* | ± 2,280 | 13 | <0,0001 |
| Lactatemia (mg/dL) | 2,378 | ± 0,293 | 9 | 2,665 | ± 0,145 | 9 | 0,3930 |

EPM = erro padrão da média; n = número de animais. As diferenças entre os grupos controle e GK foram analisadas por teste t não pareado. (*) p<0,05 vs controle.

As concentrações plasmáticas de glicose, após privação alimentar de 24 horas, foram maiores nos ratos GK do que nos ratos controle, enquanto as concentrações plasmáticas de lactato, no mesmo período de privação alimentar, não diferiram entre os grupos (Tabela 2). A ingestão alimentar, avaliada durante duas semanas, não

diferiu entre ratos GK e controle ($p= 0,611$; Tabela 2), enquanto a concentração de glicogênio hepático foi maior no grupo GK do que no grupo controle (Figura 3).

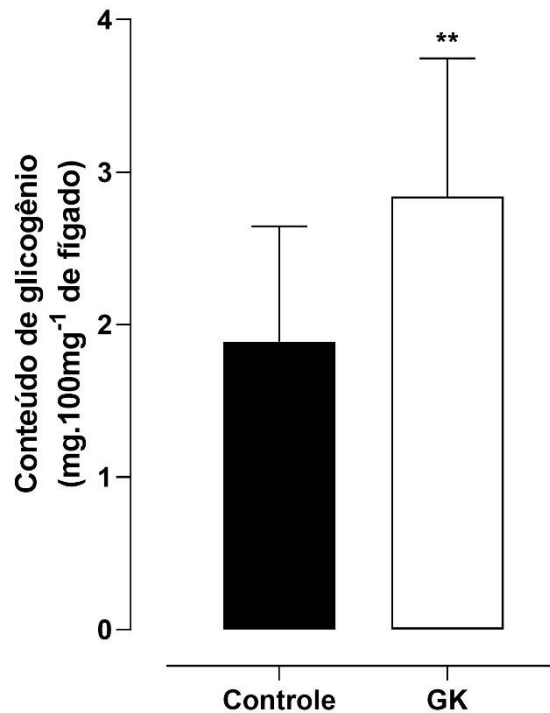


Figura 3 – Conteúdo de glicogênio hepático de ratos controle e GK. Os resultados da figura representam a média \pm EPM de 8 a 15 animais. As diferenças no conteúdo de glicogênio hepático foram analisadas por teste t não pareado. (**) $p<0,01$ vs controle.

Quando submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT), o grupo GK apresentou maior glicemia basal (tempo 0) e após a administração da solução de glicose dos 15 aos 90 minutos do que o grupo controle (Figura 4A), como pode ser observado pela AUC ($p<0,0001$; Figura 4B). Os animais GK apresentaram menor resposta periférica à insulina em relação aos animais controle, como demonstrado pelo teste de tolerância à insulina (Figura 5A) e pelo kITT ($p<0,05$; Figura 5B).

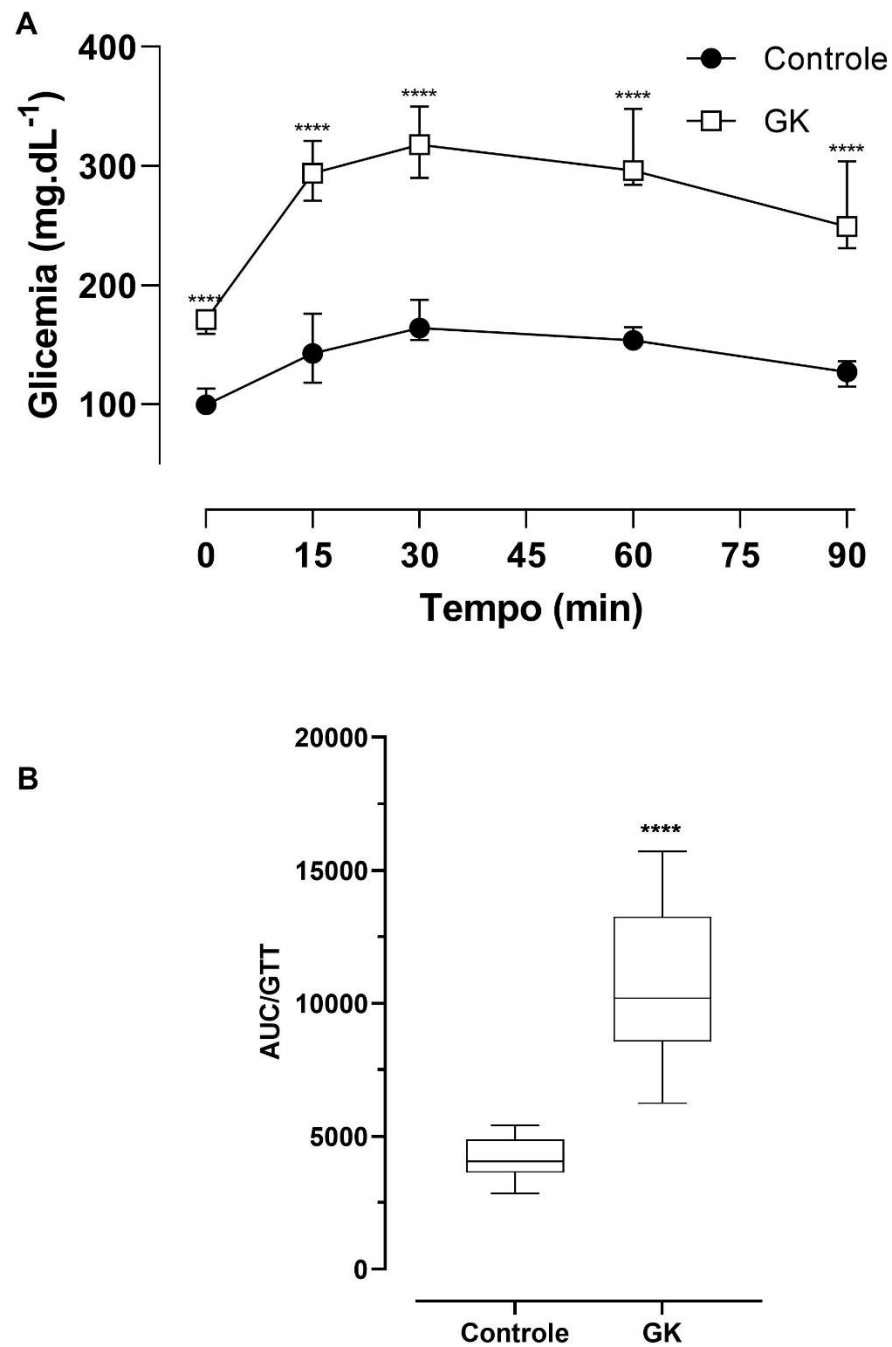


Figura 4 – (A) Curva glicêmica durante o teste de tolerância à glicose (GTT) e (B) área sob a curva (AUC) do GTT de ratos controle e GK. No GTT, a glicemia foi avaliada após a administração de 1,0 g/kg de glicose 25% (gavagem) depois da coleta do tempo 0 (basal). Os resultados das figuras 4A e 4B representam a mediana (1º e 3º intervalos interquartis) de 8 a 15 animais. As diferenças na curva glicêmica do GTT foram analisadas por teste de Kruskal-Wallis. As diferenças nas AUC do GTT foram analisadas por teste de Mann Whitney. (**) $p < 0,0001$ vs controle.**

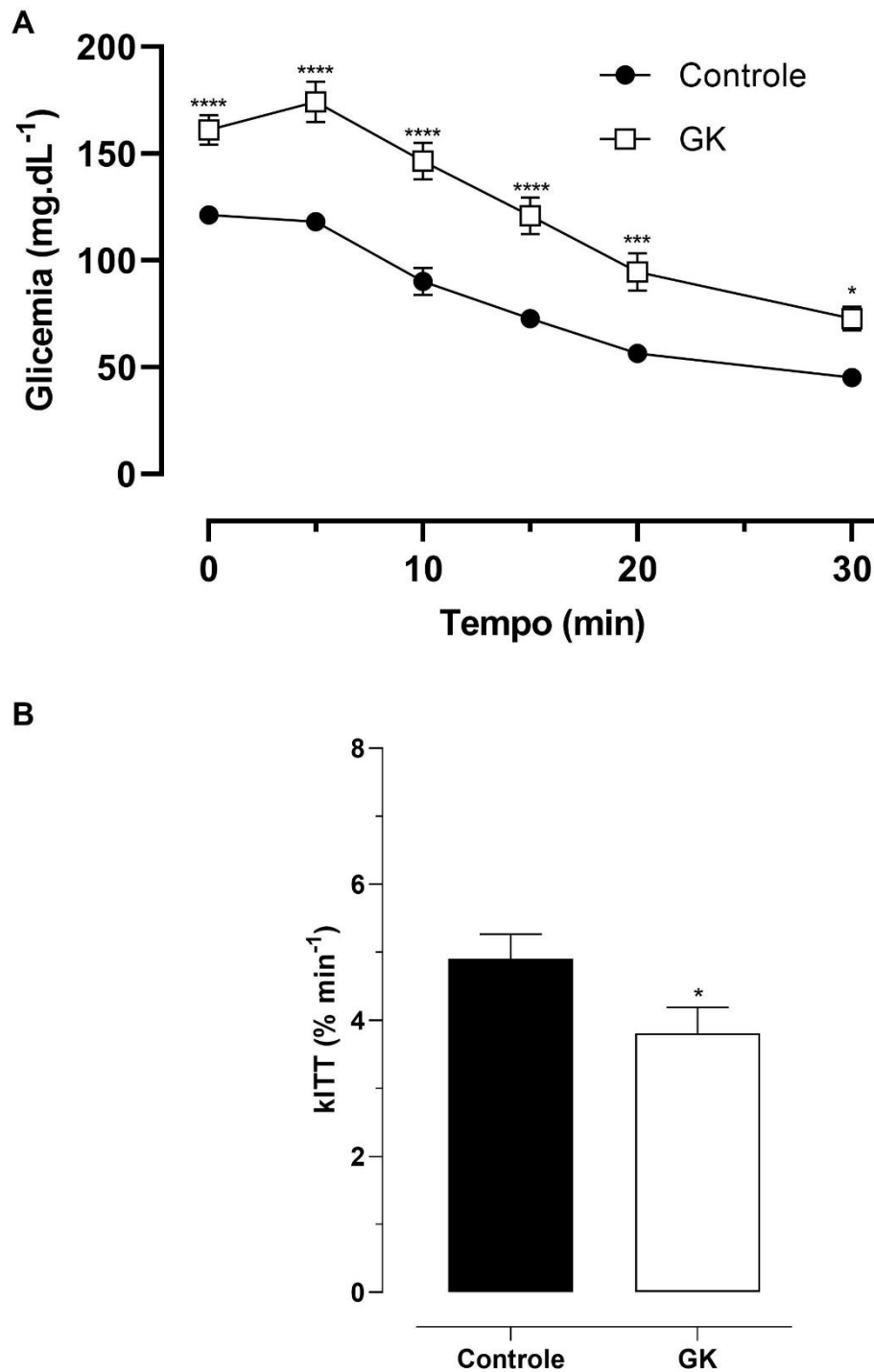


Figura 5 – (A) Curva glicêmica durante o teste de tolerância à insulina (ITT) e (B) constante de decaimento do ITT (kITT) de ratos controle e GK. No ITT, a glicemia foi avaliada após a administração de insulina 0,75 UI/Kg (i.p.) depois da coleta do tempo 0 (basal). Os resultados das figuras 5A e 5B representam a média \pm EPM de 16 a 17 animais. As diferenças na curva glicêmica do ITT foram analisadas por Two-way ANOVA para amostras repetidas seguido por pós-teste de Sidak. As diferenças no kITT foram analisadas por teste t não pareado. (*) $p < 0,05$ vs controle; (*) $p < 0,0005$ vs controle; (****) $p < 0,0001$ vs controle.**

5.2 Determinação da menor concentração de AMPc capaz de estimular a produção de glicose e a glicogenólise em fígado de ratos GK

Para a determinação da menor concentração de AMPc capaz de estimular a produção hepática de glicose em ratos GK, foram realizados experimentos de perfusão de fígado *in situ* com AMPc nas concentrações de 3 μM (Figura 6), 5 μM (Figura 7) e 7 μM (Figura 8). Nas concentrações de 3 e 5 μM , o AMPc estimulou a produção hepática de glicose e a glicogenólise nos animais controle, porém não nos ratos GK, como pode ser observado pelos valores da AUC descritos nas figuras 6 e 7 (Produção hepática de glicose - AMPc 3 μM : $p < 0,05$; AMPc 5 μM : $p < 0,05$; glicogenólise - AMPc 3 μM : $p < 0,05$; AMPc 5 μM : $p < 0,05$). Entretanto, na concentração de 7 μM , o AMPc foi capaz de estimular a produção hepática de glicose (Figura 8A) e a glicogenólise (Figura 8B) em ambos os grupos, conforme demonstrado pelos valores de AUC (Produção hepática de glicose: $p = 0,667$; glicogenólise: $p = 0,396$).

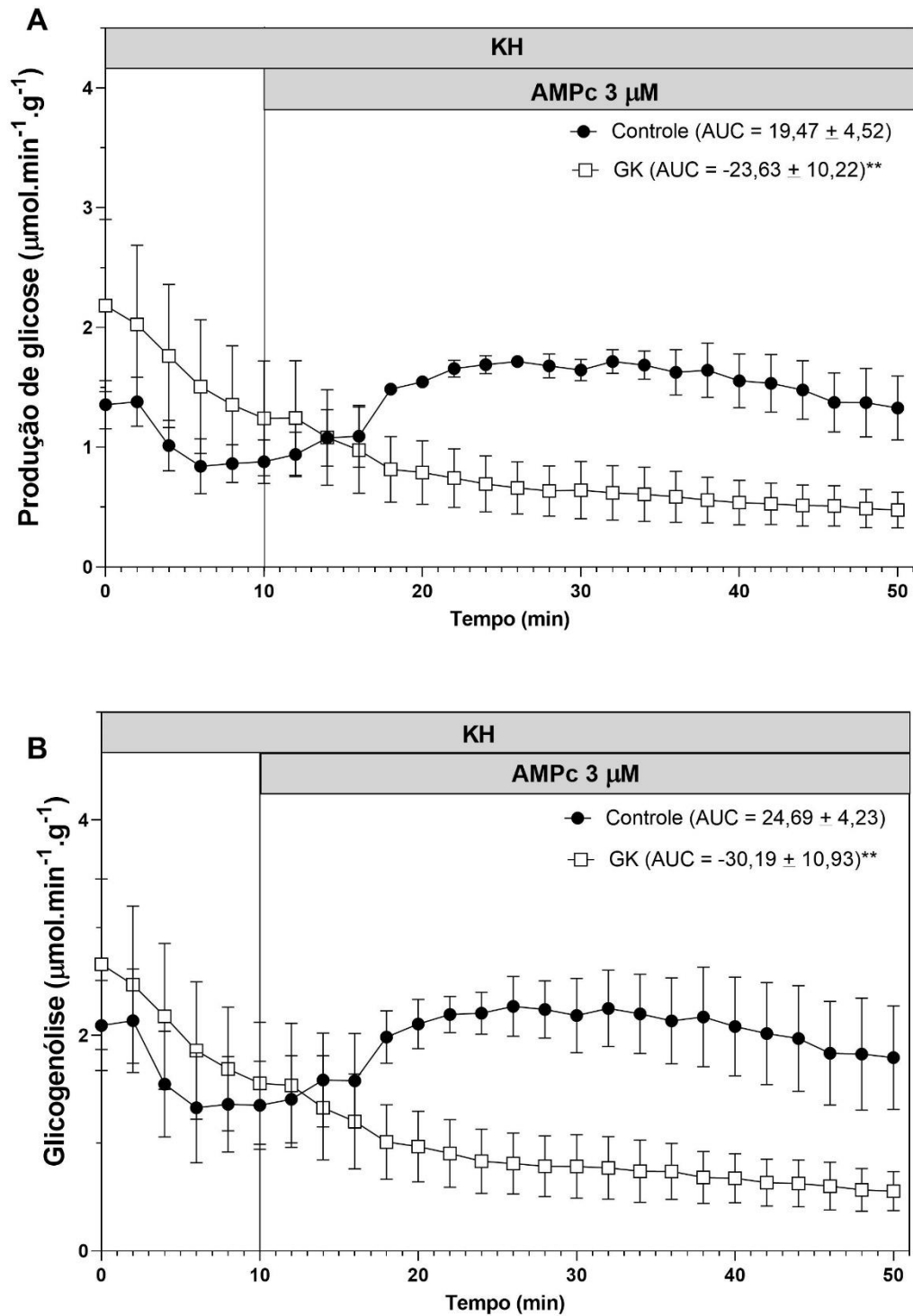


Figura 6 – (A) Produção de glicose e (B) glicogenólise a partir de AMPc 3 μM em fígados perfundidos de ratos controle e GK. Os dados representam a média \pm EPM de 4 a 6 animais. As diferenças nas áreas sob a curva (AUC) foram avaliadas por teste t não pareado. () $p < 0,01$ vs controle.**

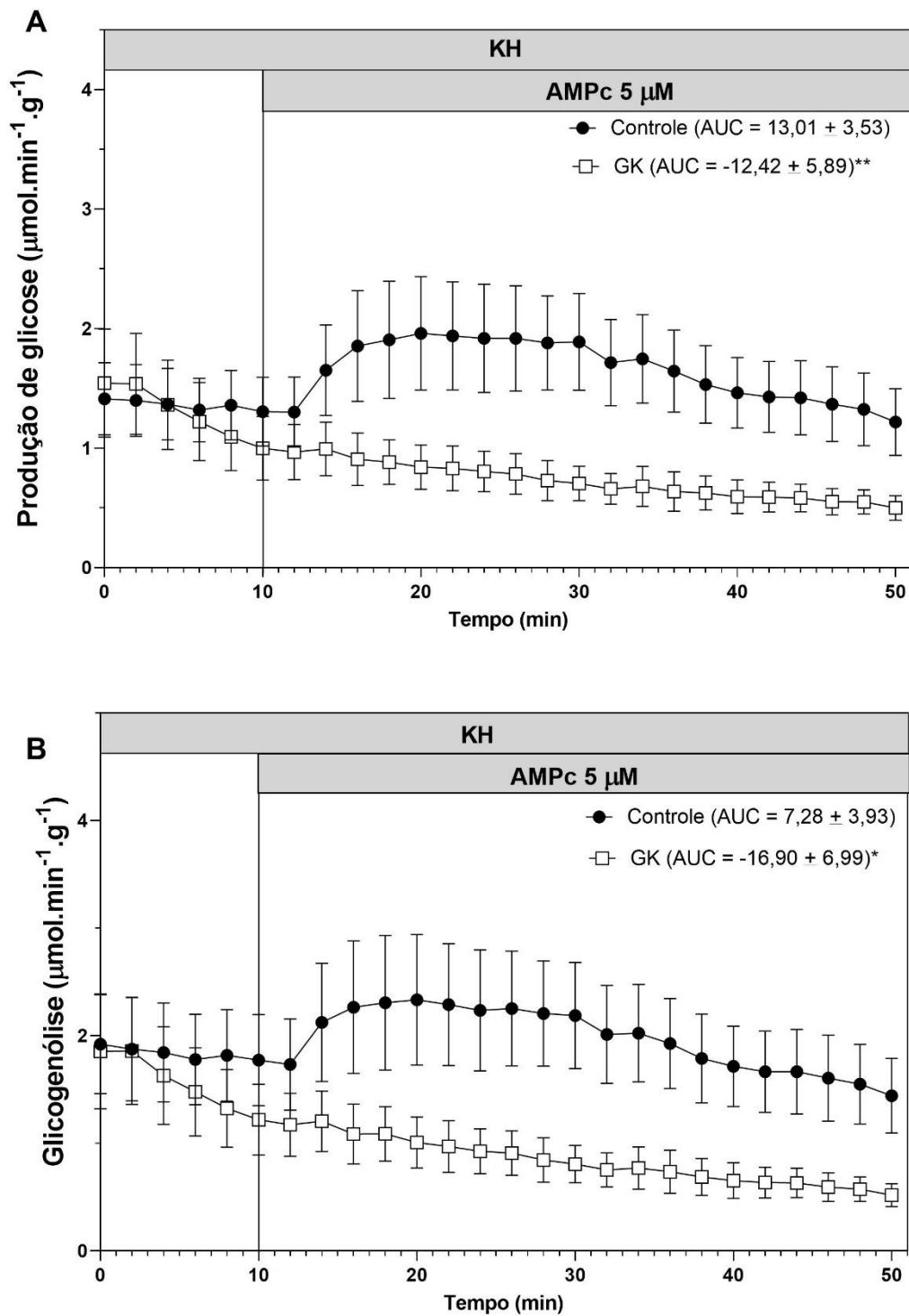


Figura 7 – (A) Produção de glicose e (B) glicogenólise a partir de AMPc 5 μM em fígados perfundidos de ratos controle e GK. Os dados representam a média \pm EPM de 4 a 6 animais. As diferenças nas áreas sob a curva (AUC) foram avaliadas por teste t não pareado. (*) $p < 0,05$ vs controle; () $p < 0,01$ vs controle.**

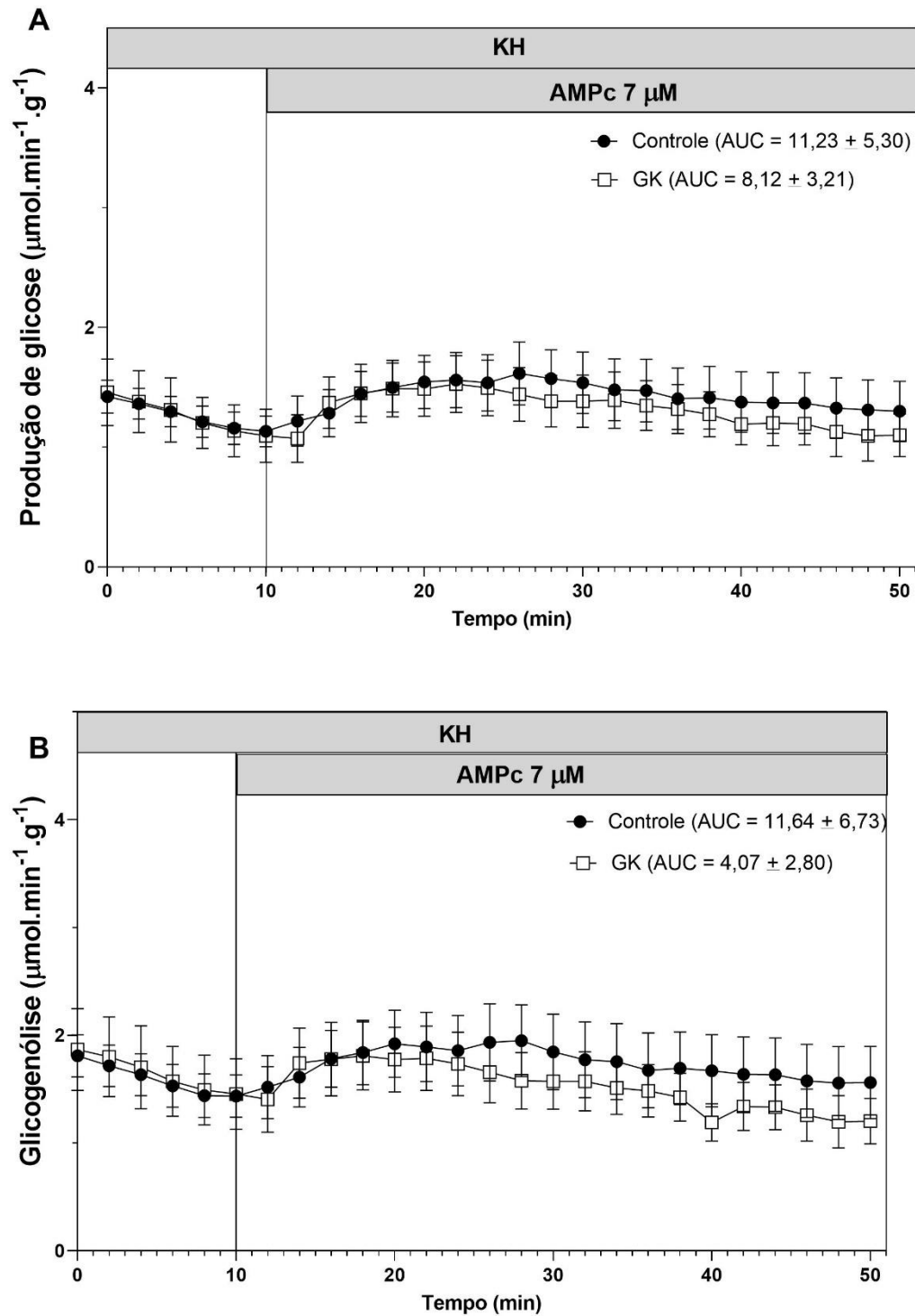


Figura 8 – (A) Produção de glicose e (B) glicogenólise a partir de AMPc 7 μM em fígados perfundidos de ratos controle e GK. Os dados representam a média \pm EPM de 4 a 6 animais. As diferenças nas áreas sob a curva (AUC) foram avaliadas por teste t não pareado. As diferenças nas curvas de produção de glicose e glicogenólise foram avaliadas por Two-way ANOVA para amostras repetidas seguido por pós-teste de Sidak.

5.3 Avaliação do efeito supressivo da insulina sobre a produção de glicose e glicogenólise estimuladas por AMPc em fígado de ratos GK

As taxas basais de produção de glicose e glicogenólise nos primeiros 10 minutos de perfusão, antes da infusão de AMPc (Figuras 9A e 10A), foram semelhantes ($p > 0,05$) nos ratos controle e GK. Ratos GK e controle apresentaram aumento da produção hepática de glicose e glicogenólise após a infusão de AMPc 7 μM , de 10 a 50 minutos, e não houve diferença entre os grupos, conforme observado anteriormente (Figuras 8A-8B). Entretanto, animais controle apresentaram menor produção hepática de glicose ($p < 0,0004$) e glicogenólise ($p < 0,0004$) após a infusão de AMPc 7 μM e insulina 50 $\mu\text{UI/mL}$, de 24 a 50 minutos, em comparação com os animais controle infundidos somente com AMPc 7 μM neste mesmo intervalo de tempo. Diferente do grupo controle, a produção hepática de glicose e glicogenólise do grupo GK, após a infusão de AMPc 7 μM e insulina 50 $\mu\text{UI/mL}$, de 24 a 50 minutos, não diferiram daquelas observadas nos grupos controle e GK infundidos somente com AMPc 7 μM neste mesmo intervalo de tempo (Figuras 9-10).

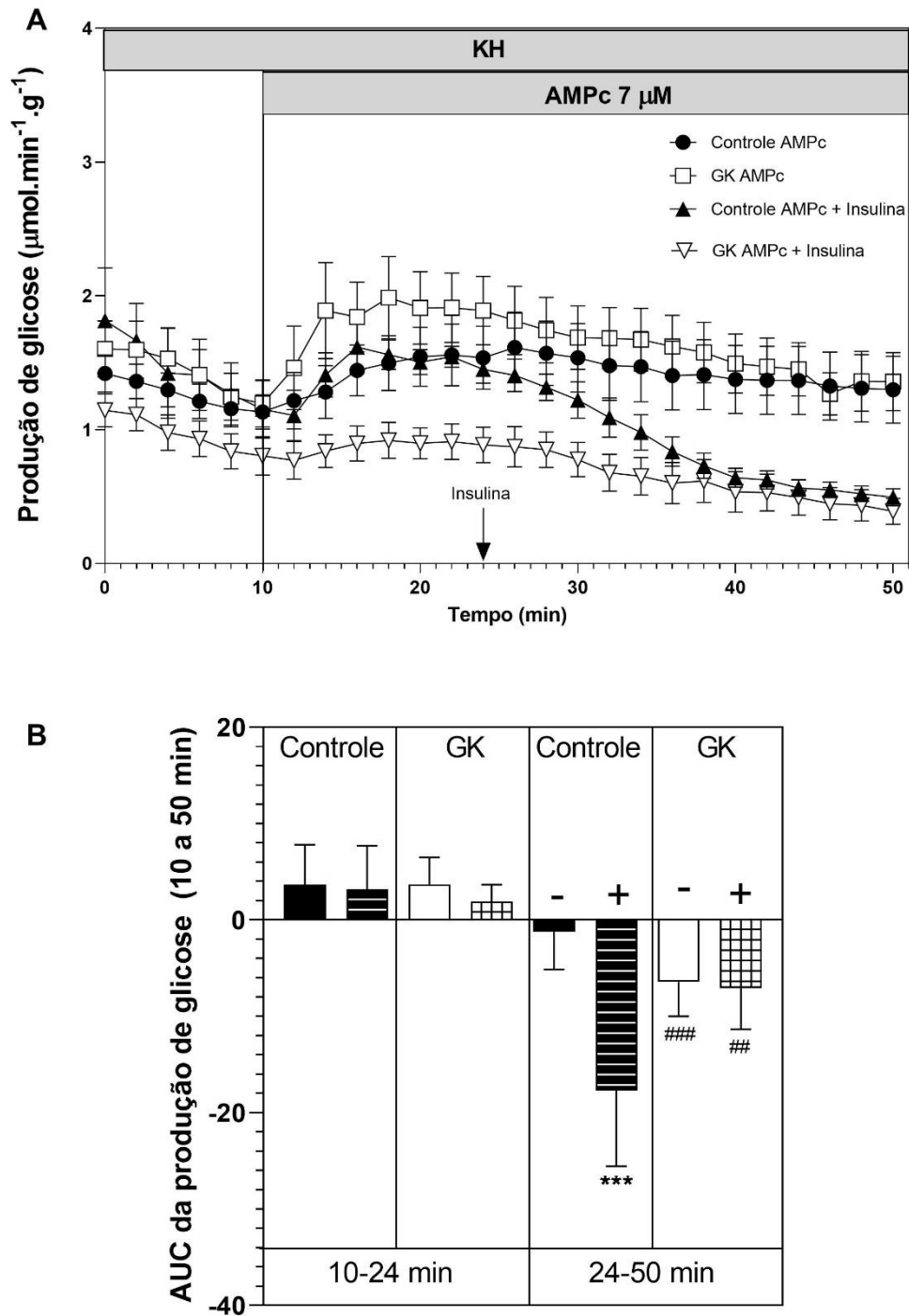


Figura 9 - (A) Efeito da insulina sobre a produção de glicose estimulada por AMPc 7 μ M e sua respectiva (B) área sob a curva (AUC) em fígados perfundidos de ratos controle e GK. De 10 a 24 minutos, o AMPc foi infundido isoladamente em todos os grupos e, de 24 a 50 minutos, o AMPc foi infundido na ausência (-) ou presença (+) de insulina 50 μ UI/mL. Os dados representam a média \pm EPM de 6 a 7 animais. As diferenças nas AUC foram analisadas por One-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. (*) $p < 0,001$ vs controle AMPc; (##) $p < 0,005$ vs controle AMPc + insulina; (###) $p < 0,001$ vs controle AMPc + insulina.**

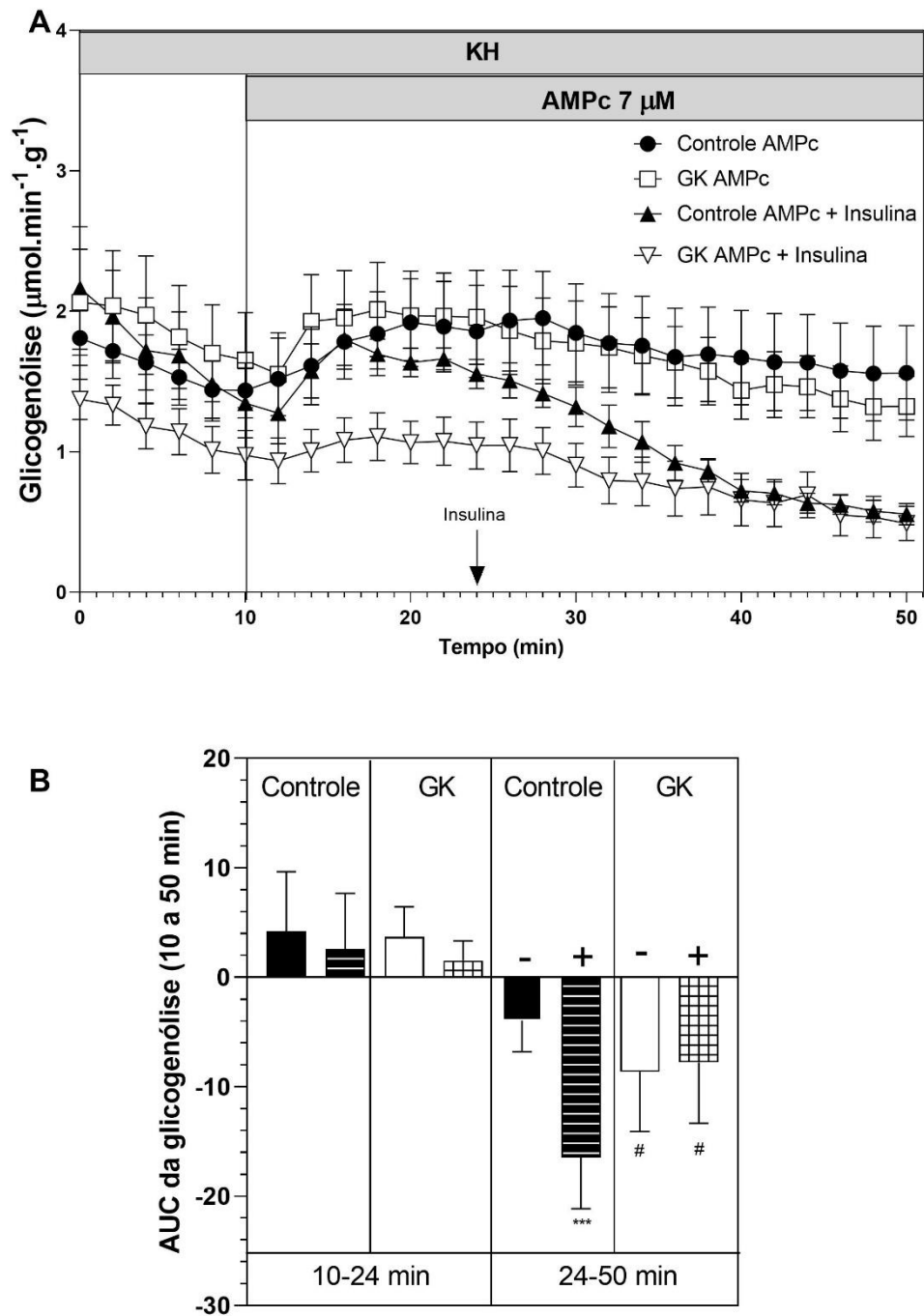


Figura 10 – (A) Efeito da insulina sobre a glicogenólise estimulada por AMPc 7 μ M e sua respectiva (B) área sob a curva (AUC) em fígados perfundidos de ratos controle e GK. De 10 a 24 minutos, o AMPc foi infundido isoladamente em todos os grupos e, de 24 a 50 minutos, o AMPc foi infundido na ausência (-) ou presença (+) de insulina 50 μ UI/mL. Os dados representam a média \pm EPM de 6 a 7 animais. As diferenças nas AUC foram analisadas por One-way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. (*) $p < 0,001$ vs controle AMPc; (#) $p < 0,05$ vs controle AMPc + insulina.**

5.4 Avaliação da produção de glicose, glicogenólise e glicólise em fígado de ratos GK

As taxas basais da produção de glicose nos primeiros 10 minutos de perfusão, antes da infusão de glucagon (Figura 11A), fenilefrina (Figura 12A) ou isoproterenol (Figura 13A) no fígado, foram semelhantes ($p > 0,05$) nos ratos controle e GK. A infusão de glucagon 1 nM (Figura 11A), fenilefrina 2 μ M (Figura 12A) ou isoproterenol 20 μ M (Figura 13A) aumentou a produção de glicose em ratos controle e GK e não diferiu entre os grupos, como pode ser observado pelos valores da AUC (glucagon: $p = 0,358$; fenilefrina: $p = 0,364$; isoproterenol: $p = 0,435$).

As taxas basais de glicogenólise nos primeiros 10 minutos de perfusão, antes da infusão de glucagon (Figura 11B), fenilefrina (Figura 12B) ou isoproterenol (Figura 13B) no fígado, foram semelhantes ($p > 0,05$) nos ratos controle e GK. A infusão de glucagon 1 nM (Figura 11B), fenilefrina 2 μ M (Figura 12B) ou isoproterenol 20 μ M (Figura 13B) aumentou a glicogenólise em ratos controle e GK e não diferiu entre os grupos, como pode ser observado pelos valores da AUC (glucagon: $p = 0,488$; fenilefrina: $p = 0,514$; isoproterenol: $p = 0,177$).

As taxas basais de glicólise nos primeiros 10 minutos de perfusão, antes da infusão de glucagon (Figura 11C), fenilefrina (Figura 12C) ou isoproterenol (Figura 13C) no fígado, foram similares ($p > 0,05$) entre os ratos controle e GK. A infusão de glucagon (Figura 11C) diminuiu a glicólise, enquanto a infusão de fenilefrina (Figura 12C) ou isoproterenol (Figura 13C) aumentou a glicólise em ratos controle e GK, porém não foi diferente entre os grupos, conforme demonstrado pelos valores de AUC (glucagon: $p = 0,448$; fenilefrina: $p = 0,856$; isoproterenol: $p = 0,478$).

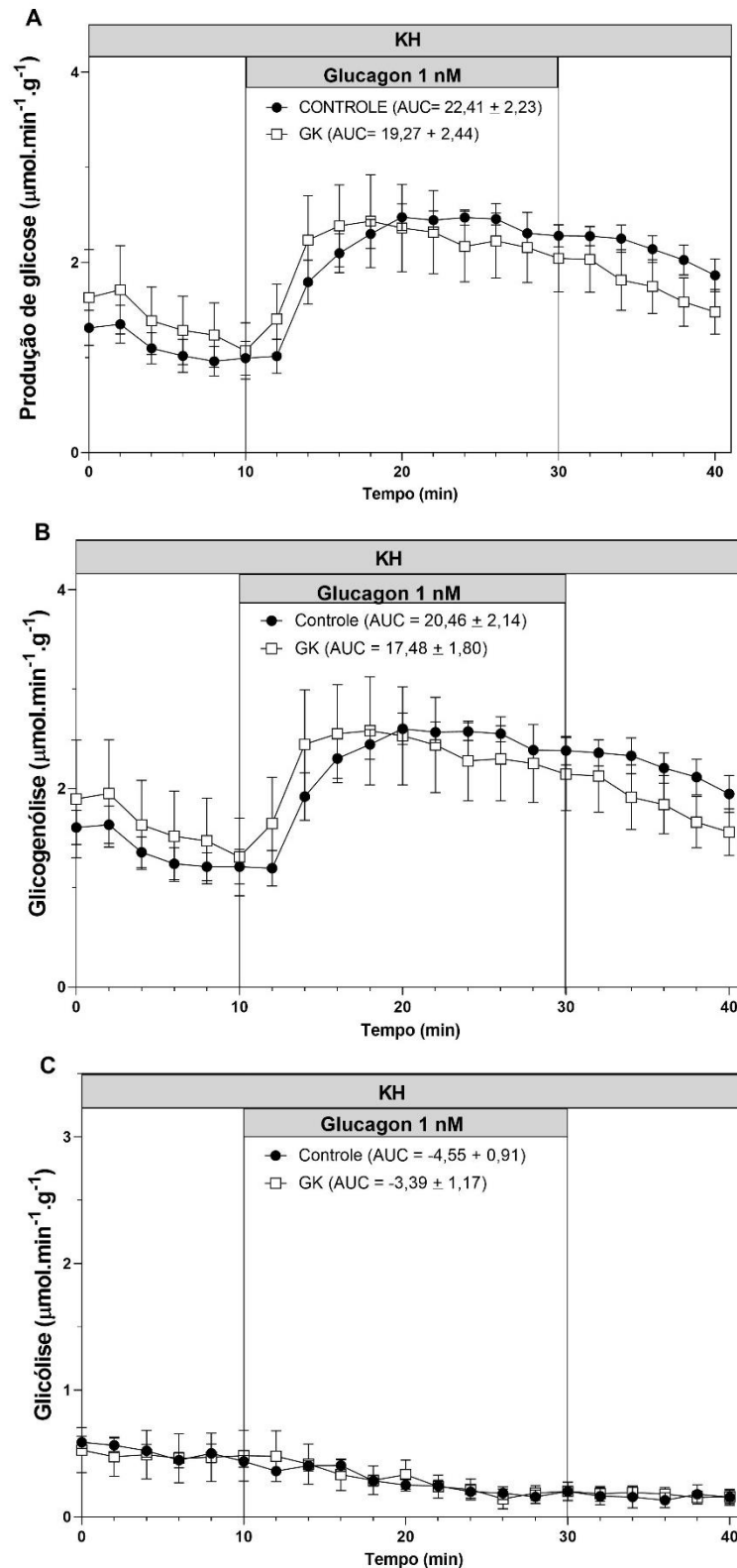


Figura 11 – Efeito da infusão de glucagon 1 nM sobre a (A) produção de glicose, (B) glicogenólise e (C) glicólise em fígados perfundidos de ratos controle e GK. Os dados representam a média \pm EPM de 10 a 12 animais. As diferenças nas áreas sob a curva (AUC) foram avaliadas por teste t não pareado. As diferenças nas curvas de produção de glicose, glicogenólise e glicólise foram avaliadas por Two-way ANOVA para amostras repetidas seguido por pós-teste de Sidak.

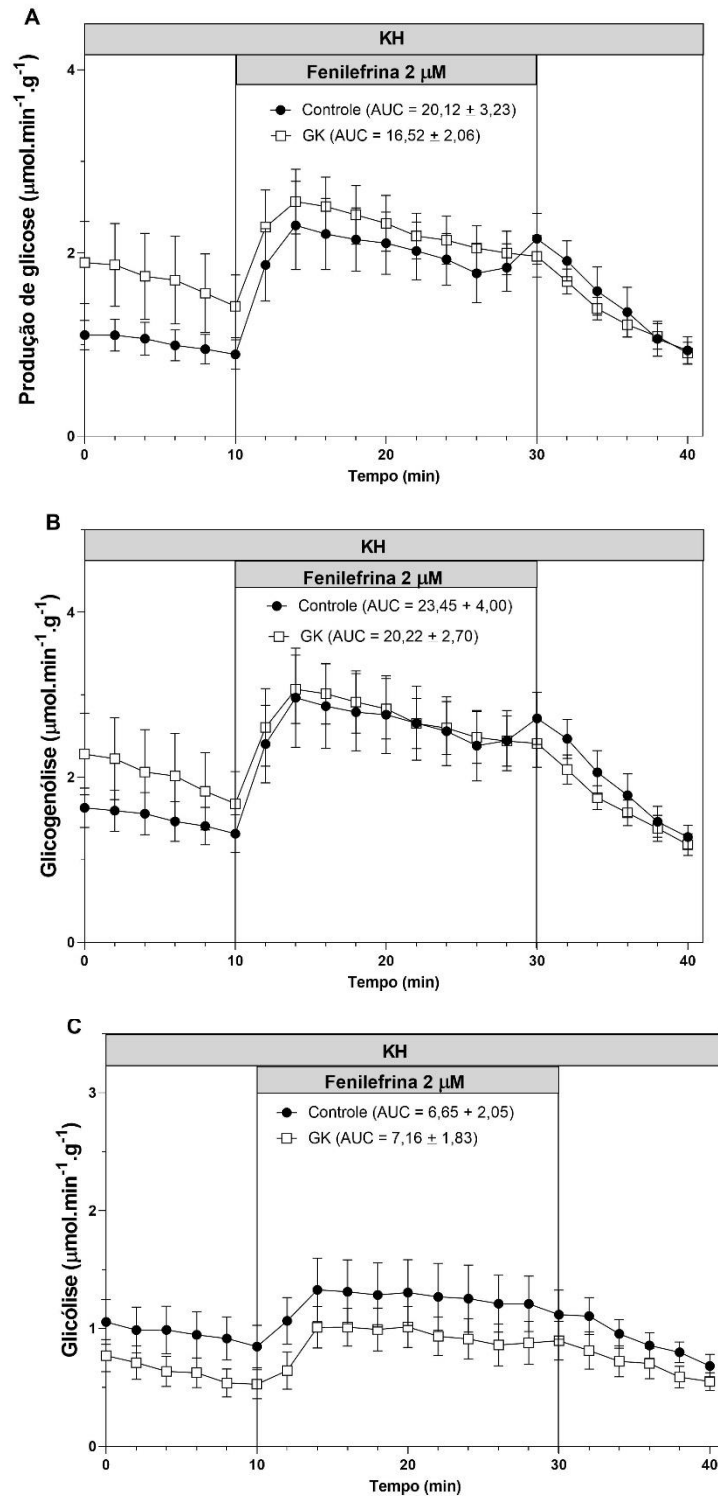


Figura 12 – Efeito da infusão de fenilefrina 2 μM sobre a (A) produção de glicose, (B) glicogenólise e (C) glicólise em fígados perfundidos de ratos controle e GK. Os dados representam a média \pm EPM de 10 a 12 animais. As diferenças nas áreas sob a curva (AUC) foram avaliadas por teste t não pareado. As diferenças nas curvas de produção de glicose, glicogenólise e glicólise foram avaliadas por Two-way ANOVA para amostras repetidas seguido por pós-teste de Sidak.

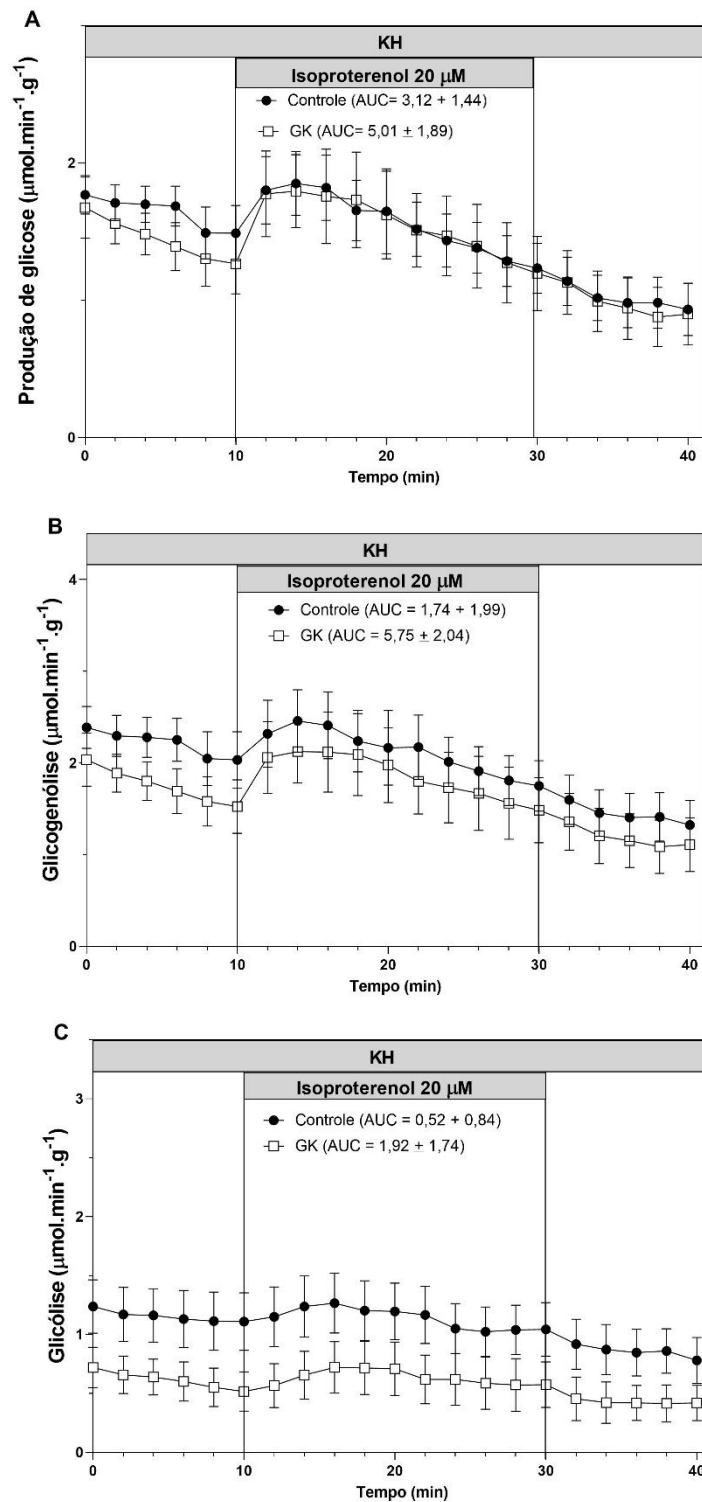


Figura 13 – Efeito da infusão de isoproterenol 20 μM sobre a (A) produção de glicose, (B) glicogenólise e (C) glicólise em fígados perfundidos de ratos controle e GK. Os dados representam a média \pm EPM de 10 a 12 animais. As diferenças nas áreas sob a curva (AUC) foram avaliadas por teste t não pareado. As diferenças nas curvas de produção de glicose, glicogenólise e glicólise foram avaliadas por Two-way ANOVA para amostras repetidas seguido por pós-teste de Sidak.

5.5 Avaliação da neoglicogênese em fígado de ratos GK

As taxas basais de produção de glicose nos primeiros 10 minutos de perfusão, antes da infusão dos precursores neoglicogênicos (Figuras 14-17) no fígado, foram similares ($p > 0,05$) entre os ratos controle e GK. A infusão de L-lactato 2 mM (Figura 14), piruvato 5 mM (Figura 15), glicerol 2 mM (Figura 16) ou L-alanina 2,5 mM (Figura 17) estimulou a neoglicogênese em ratos controle e GK, porém não houve diferença entre os grupos, como pode ser observado pelos valores da AUC (L-lactato: $p = 0,901$; piruvato: $p = 0,055$; glicerol: $p = 0,091$; L-alanina: $p = 0,700$). De maneira semelhante, a infusão de L-alanina aumentou a produção de ureia nos grupos controle e GK e não foi diferente entre ambos ($AUC_C = 3,25 \pm 1,57$; $AUC_{GK} = 3,49 \pm 1,04$; $p = 0,887$). No entanto, a produção de glicose a partir de glicerol no intervalo de 30 a 40 minutos de perfusão foi maior no fígado de ratos GK do que de ratos Wistar ($p < 0,05$).

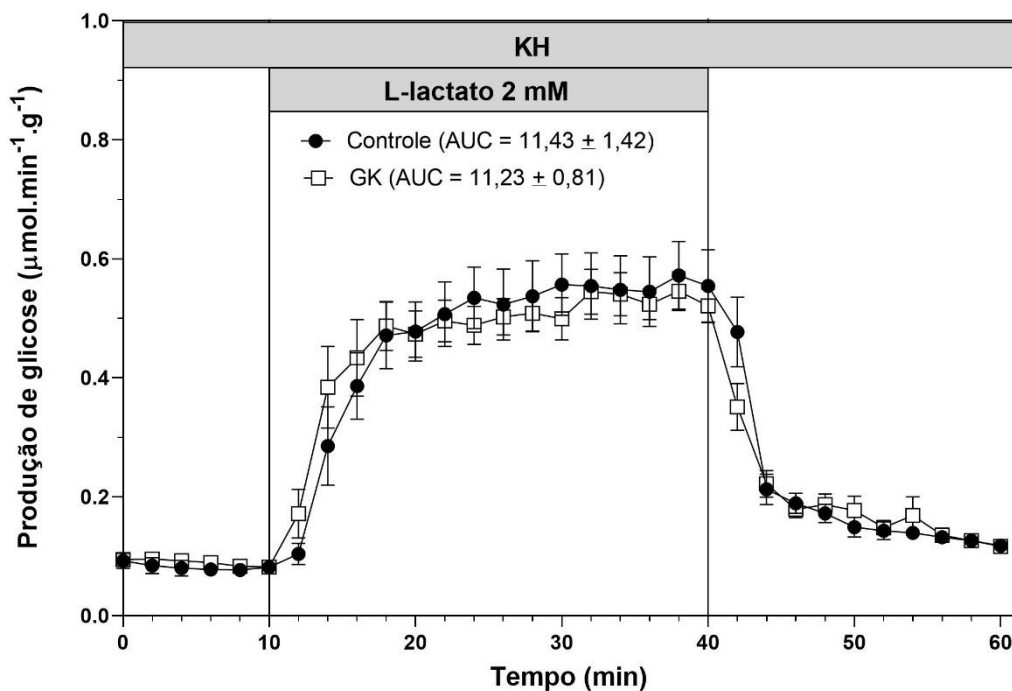


Figura 14 – Produção de glicose a partir de L-lactato 2 mM em fígados perfundidos de ratos controle e GK. Os dados representam a média \pm EPM de 7 a 8 animais. As diferenças nas áreas sob a curva (AUC) foram avaliadas por teste t não pareado. As diferenças na curva de produção de glicose foram avaliadas por Two-way ANOVA para amostras repetidas seguido por pós-teste de Sidak.

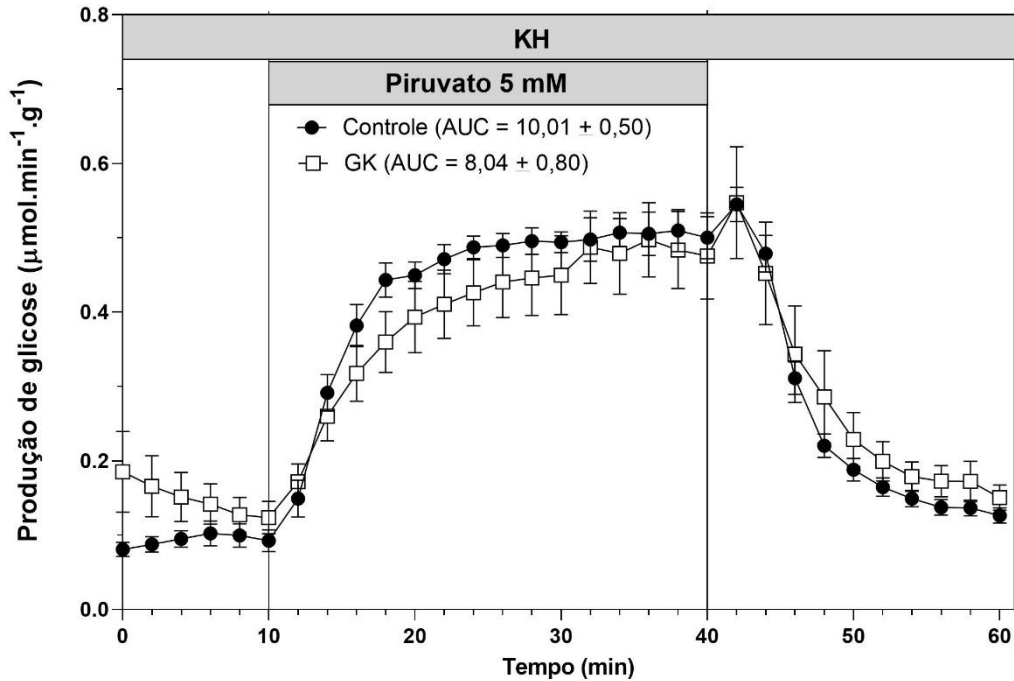


Figura 15 – Produção de glicose a partir de piruvato 5 mM em fígados perfundidos de ratos controle e GK. Os dados representam a média \pm EPM de 7 a 8 animais. As diferenças nas áreas sob a curva (AUC) foram avaliadas por teste t não pareado. As diferenças na curva de produção de glicose foram avaliadas por Two-way ANOVA para amostras repetidas seguido por pós-teste de Sidak.

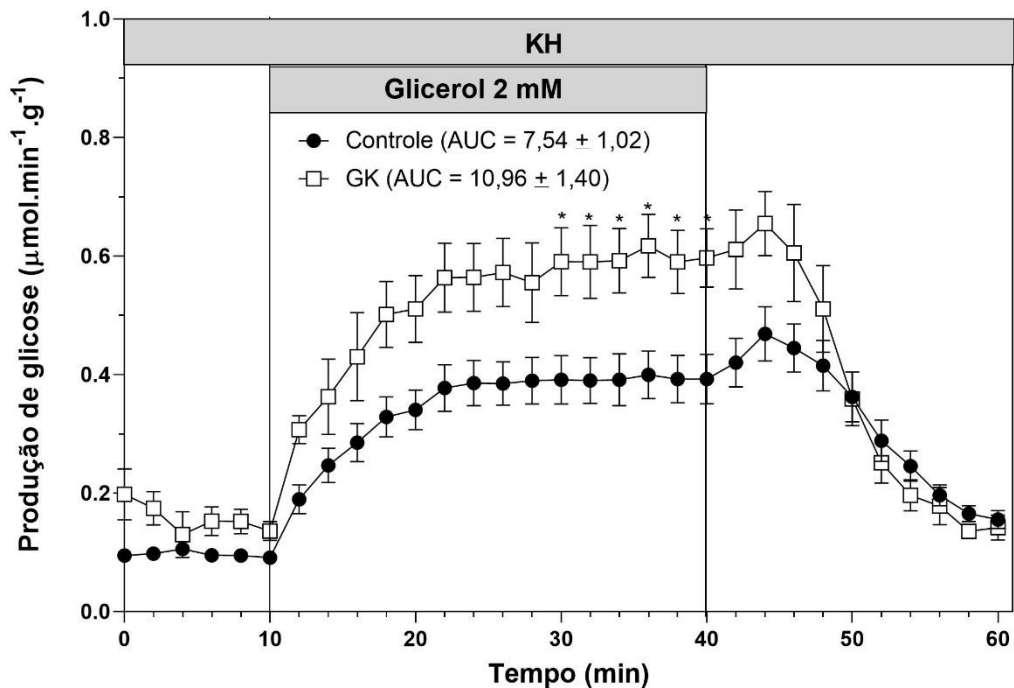


Figura 16 – Produção de glicose a partir de glicerol 2 mM em fígados perfundidos de ratos controle e GK. Os dados representam a média \pm EPM de 7 a 8 animais. As diferenças nas áreas sob a curva (AUC) foram avaliadas por teste t não pareado. As diferenças na curva de produção de glicose foram avaliadas por Two-way ANOVA para amostras repetidas seguido por pós-teste de Sidak. (*) $p < 0,05$ vs controle.

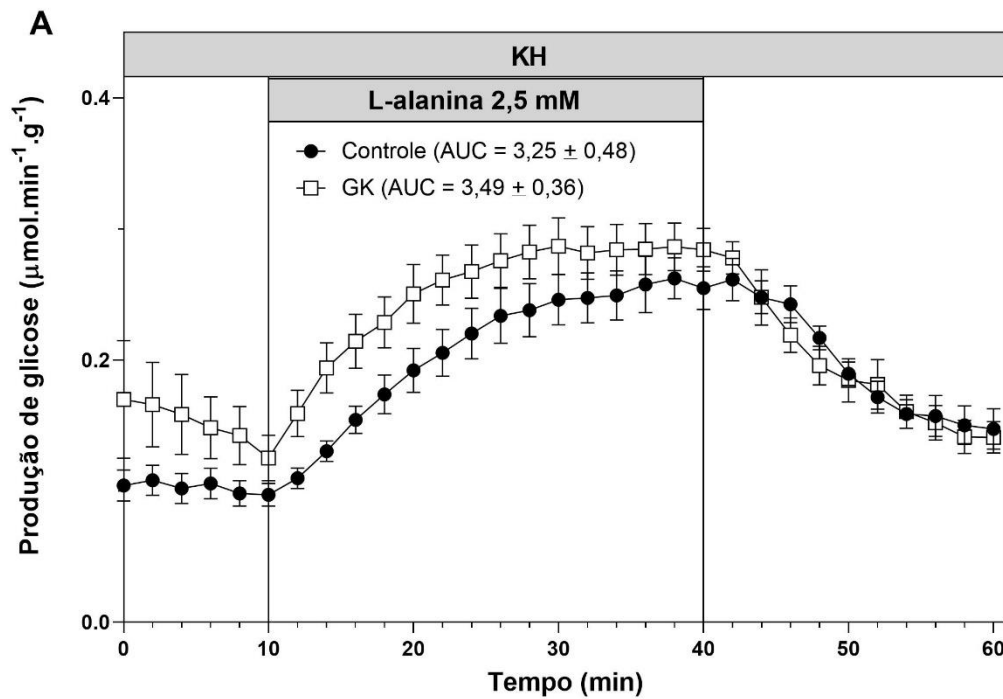


Figura 17 – Produção de glicose a partir de L-alanina 2,5 mM em fígados perfundidos de ratos controle e GK. Os dados representam a média \pm EPM de 7 a 8 animais. As diferenças nas áreas sob a curva (AUC) foram avaliadas por teste t não pareado. As diferenças na curva de produção de glicose foram avaliadas por Two-way ANOVA para amostras repetidas seguido por pós-teste de Sidak.

6 DISCUSSÃO

Em concordância com dados da literatura (KUWABARA et al., 2017; SERDAN et al., 2021; XUE et al., 2011), os ratos GK apresentaram menor resposta periférica à insulina (Figuras 5A e 5B), além de maior glicemia de jejum (Tabela 2), tolerância à glicose reduzida (Figuras 4A e 4B) e índice de Lee (Tabela 2) semelhante ao dos ratos Wistar (controle), caracterizando assim esse modelo experimental de animais diabéticos tipo 2 sem obesidade. Ademais, ratos GK apresentaram menor ganho de peso corporal, menor comprimento naso-anal e comprimento da tibia, menor massa de tecido adiposo branco epididimal, de músculo (sóleo, EDL e gastrocnêmio) e de tecido hepático (Tabela 2) do que os ratos controle, corroborando resultados descritos por outros autores (KUWABARA et al., 2017; SERDAN et al., 2021). De acordo com Almon e colaboradores (2009), o fígado de ratos GK apresenta menor expressão da proteína PFTAIRE quinase 1 (Pftk 1), enzima chave da regulação do ciclo celular, o que sugere que a redução da proliferação celular poderia ser uma possível causa do menor peso deste tecido em ratos GK. Apesar do menor peso corporal observado nos ratos GK, não houve diferença na ingestão alimentar entre os grupos controle e GK com 8 a 10 semanas de idade (Tabela 2), tal como observado por Serdan e colaboradores (2021). Entretanto, Kuwabara e colaboradores (2017) observaram aumento da ingestão alimentar ao avaliarem este parâmetro em ratos GK entre 8 e 16 semanas de idade. Essa diferença pode ser devido ao tempo de avaliação e à idade dos animais nos quais este parâmetro foi avaliado.

O conteúdo de glicogênio hepático foi maior em ratos GK do que em ratos controle (Figura 3). Apesar da secreção de insulina estimulada por glicose estar reduzida em ratos GK (PANVELOSKI-COSTA et al., 2020), estes animais apresentam maior insulinemia do que ratos Wistar (ALMON et al., 2009; BEDDOW & SAMUEL, 2012; BITAR et al., 2005; MOVASSAT et al., 2008). Por exemplo, ratos GK com idade entre 8 e 16 semanas apresentam maiores concentrações plasmáticas de insulina do que ratos Wistar (ALMON et al., 2009). Por outro lado, as concentrações plasmáticas de glucagon são semelhantes entre ratos Wistar e GK (BEDDOW & SAMUEL, 2012). As concentrações plasmáticas relatadas para estes hormônios e a hiperglicemia (por si só) poderiam justificar o maior conteúdo de glicogênio detectado em fígado de ratos GK no presente estudo. Tem sido relatado que a atividade da enzima glicolítica glicoquinase é maior no fígado de ratos GK do que de ratos Wistar (KITAHARA et al., 1978), o que favoreceria a síntese de glicogênio (DOI et al., 2001). Outro fator que

pode ter contribuído para o maior conteúdo de glicogênio hepático e para hiperglicemia dos ratos GK são as concentrações plasmáticas de corticosterona aproximadamente três vezes maiores nestes animais do que em ratos Wistar (BEDDOW & SAMUEL, 2012). Ademais, Kuwabara e colaboradores (2017), após análise histológica do fígado, identificaram que ratos GK possuem maior conteúdo de glicogênio hepático do que ratos Wistar. Em contrapartida, Doi e colaboradores não identificaram diferença no conteúdo de glicogênio hepático entre ratos GK e Wistar, porém admitem que o conteúdo tendeu a ser maior em fígado de ratos GK. Ainda, demonstraram que, enquanto em hepatócitos de ratos GK os grânulos de glicogênio estão localizados principalmente perto da membrana plasmática, estes grânulos estão distribuídos de forma homogênea nos hepatócitos de ratos Wistar.

A resistência à insulina observada em ratos GK tem sido descrita por alguns autores (ALMON et al., 2009; BISBIS et al., 1993; DOI et al., 2001; GOTO et al., 1988; KUWABARA et al., 2017; PORTHA et al., 2010; SENA et al., 2007) e caracterizada por alterações na via de sinalização da insulina. Em situação não patológica, a insulina se liga ao receptor que, ao ser ativado, recruta e fosforila em tirosina substratos intracelulares para iniciar a transdução do sinal (LI et al., 2022; RAHMAN et al., 2021). Em ratos GK, a fosforilação em tirosina do IRS-1 induzida por insulina e a ativação subsequente da PI3K estão prejudicadas, resultando em translocação diminuída dos transportadores de glicose GLUT4 e consequente diminuição da captação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo (BEGUM; RAGOLIA, 1998; KANOHO et al., 2000; KROOK et al., 1997; SONG et al., 1999). Defeitos na atividade da Akt/PKB também parecem contribuir para a redução do transporte de glicose neste tecido (KROOK et al., 1997). A redução da translocação de GLUT4 e a consequente redução da captação de glicose no tecido adiposo também foi descrita em adipócitos isolados de ratos GK, tendo sido causada por defeito na fosforilação e ativação da proteína quinase C (PKC) (KANOHO et al., 2000). A resistência à insulina também foi relacionada à maior atividade da proteína tirosina fosfatase (PTPase) no músculo esquelético de ratos GK, o que causa uma menor fosforilação em tirosina de IR e de IRS-1 (DADKE et al., 2000) e resulta em um defeito na transdução do sinal insulínico. Além disso, a resistência à insulina também tem sido relacionada ao aumento das concentrações circulantes de TNF- α , IL-1 e IL-6 (UCHIYAMA et al., 2013) e maior expressão destas mesmas citocinas no fígado (SZKUDELKA; OKULICZ; SZKUDELSKI, 2020a) de ratos GK com idade entre 16 e 34 semanas. Ademais, a

expressão de genes pró-inflamatórios está aumentada em fígado de ratos GK (ALMON et al., 2009).

Além da diminuição da captação periférica de glicose no músculo e no tecido adiposo (BEGUM; RAGOLIA, 1998; KANOH et al., 2000; KROOK et al., 1997; SONG et al., 1999), o aumento da produção hepática de glicose também contribui para a hiperglicemia em animais (BEDDOW & SAMUEL, 2012; BITAR et al., 2005; MOVASSAT et al., 2008; SENA et al., 2007) e humanos (DEFRONZO; BONADONNA; FERRANNINI, 1992; RIZZA, 2010) diabéticos e pode ser causada pela resistência à insulina no fígado (PETERSEN; SHULMAN, 2018).

A sinalização insulínica no fígado de ratos GK também tem sido avaliada (BISBIS et al., 1993; KUWABARA et al., 2017; SZKUDELSKA et al., 2021). Redução na expressão do receptor de insulina tem sido identificada como um dos fatores da resistência hepática à insulina nesses animais (SZKUDELSKA; OKULICZ; SZKUDELSKI, 2020b). Bibis e colaboradores (1993) identificaram uma possível redução na quantidade, assim como menor afinidade dos IR no fígado de ratos GK com 8 semanas de idade. No entanto, há discordância sobre as alterações na via de sinalização da insulina em fígados de ratos GK, pois há trabalhos que mostram redução da expressão da PI3K (ALMON et al., 2009) e inalteração da pAKT, AKT total e razão pAKT/AKT total (KUWABARA et al., 2017).

Uma vez que ratos GK apresentaram hiperglicemia de jejum (Tabela 2), tolerância reduzida à glicose (Figura 4) e resistência periférica à insulina (Figura 5), avaliamos a resposta hepática à insulina e sua possível contribuição para o estabelecimento da resistência à insulina nesse modelo experimental de DM2, através da técnica de perfusão de fígado *in situ*.

O principal achado de nossos estudos foi que o efeito supressivo da insulina (50 μ UI/mL) sobre a produção hepática de glicose e glicogenólise estimuladas por AMPc (7 μ M) foi abolido em ratos GK (Figuras 9-10), demonstrando que esses animais apresentam resistência hepática à insulina. Este resultado pode ter contribuído, pelo menos em parte, para a menor resposta periférica à insulina observada em ratos GK, em comparação aos ratos controle (Figuras 4-5). Vale ressaltar que a dose de insulina perfundida no fígado de ratos GK corresponde de um terço à metade da concentração plasmática deste hormônio descrita para estes animais na idade estudada (ALMON et al., 2009; BEDDOW & SAMUEL, 2012). De forma semelhante, Doi e colaboradores demonstraram que o efeito supressivo da insulina sobre a produção hepática de

glicose estimulada por glucagon está reduzido em ratos GK com 8 semanas de idade, em experimentos de perfusão de fígado. Além disso, o aumento da produção de AMPc induzida por glucagon foi inibido pela insulina em ratos Wistar, e essa ação inibitória da insulina foi atenuada em ratos GK, uma vez que a infusão desse hormônio não reduziu o conteúdo de AMPc induzido por glucagon (DOI et al., 2001).

Como a resposta hepática à insulina mostrou-se reduzida em ratos GK, tornou-se relevante avaliar a glicogenólise e a neoglicogênese nesses animais. No presente estudo, demonstramos, até onde sabemos, pela primeira vez, o efeito da infusão de fenilefrina e isoproterenol sobre a glicogenólise e glicólise, assim como o efeito da infusão de diferentes precursores neoglicogênicos (L-lactato, piruvato, glicerol e L-alanina) sobre a produção de glicose em fígado de ratos GK submetidos a perfusão *in situ*.

A produção hepática de glicose (Figuras 11A, 12A e 13A) e a glicogenólise (Figuras 11B, 12B e 13B) estimuladas por glucagon 1nM, fenilefrina 2 μ M (agonista de receptores α -adrenérgicos) ou isoproterenol 20 μ M (agonista de receptores β -adrenérgicos) aumentaram em ratos controle e GK e não diferiram entre os grupos, o que indica que a glicogenólise também não está alterada em ratos GK de 9 a 11 semanas de idade, nas concentrações empregadas desses agentes glicogenolíticos. Corroborando nossos resultados, a produção de glicose a partir do glicogênio hepático em estudos *in vivo* não diferiu entre ratos Wistar e GK com 14 a 16 semanas de idade (SENA et al., 2007), assim como a produção de glicose estimulada por glucagon em fígados perfundidos de ratos Wistar e GK não foi diferente em animais com 8 semanas de idade (DOI et al., 2001). Segundo os autores, a infusão de glucagon nas concentrações de 0,06, 0,2 e 1 nM aumenta gradativamente a produção de glicose em fígados perfundidos de ratos Wistar e GK, promovendo aumento máximo na concentração de 1 nM e de forma semelhante em ambos os grupos (DOI et al., 2001).

Por sua vez, a glicólise foi inibida pela infusão de glucagon 1 nM (Figura 11C) e estimulada pela infusão de fenilefrina 2 μ M (Figura 12C) e isoproterenol 20 μ M (Figura 13C) nos grupos controle e GK e não diferiu entre eles, o que indica que a glicólise também não está alterada em ratos GK nas condições estudadas. Em concordância, Kitahara e colaboradores (1978) demonstraram que a atividade das enzimas glicolíticas fosfofrutoquinase e piruvato quinase não diferiu entre ratos Wistar de 3 a 6 meses de idade e ratos GK de 4 a 5 meses de idade.

Apesar da resposta hepática à fenilefrina 2 μM e ao isoproterenol 20 μM não ter diferido entre os ratos controle e GK, novos estudos, para avaliar a relação dose-resposta aos agonistas adrenérgicos, precisariam ser realizados para afirmar se há ou não diferença na responsividade a estes agentes glicogenolíticos e glicolíticos em fígado de ratos GK.

Além disso, cabe ressaltar que a produção hepática de glicose e a glicogenólise estimuladas por AMPc em ratos controle aumentou a partir da infusão de AMPc 3 μM , enquanto, em ratos GK, aumentou somente a partir da infusão de AMPc 7 μM (Figura 8), o que indica uma menor responsividade destes animais a este segundo mensageiro. Entretanto, a responsividade do grupo GK ao glucagon (Figuras 11A e 11B) e ao isoproterenol (Figuras 13A e 13B), ambos geradores de AMPc como segundo mensageiro (BIAZI et al., 2018), não se mostrou alterada no fígado. Esta resposta diminuída ao AMPc não foi devida ao menor conteúdo de glicogênio hepático (Figura 3) em ratos GK, mas poderia ser devida a menor captação de AMPc pelos hepatócitos, uma vez que sua captação é mediada por difusão facilitada (VICENTINI et al., 2000). Entretanto, o mecanismo envolvido na redução da resposta hepática ao AMPc nos ratos GK é desconhecido.

Na neoglicogênese, os precursores não-glicídicos são convertidos a piruvato ou entram na via, em intermediários posteriores, como oxalacetato (OAA) e diidroxiacetona fosfato (DHAP). Os principais precursores não-glicídicos são L-lactato, L-alanina e glicerol. Ao serem infundidos no hepatócito, L-lactato e L-alanina são convertidos à piruvato por ação da lactato desidrogenase (LDH) e alanina aminotransferase (ALT), respectivamente, e o glicerol entra na via neoglicogênica como DHAP (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

Apesar da neoglicogênese a partir dos precursores que entram nessa via metabólica antes da etapa mitocondrial, ou seja, L-alanina, L-lactato e piruvato, não estar diferente entre os animais (figuras 14, 15 e 17) de 9 a 11 semanas de idade, nas concentrações empregadas desses precursores neoglicogênicos, a neoglicogênese a partir de glicerol (figura 16), que entra na via após a etapa mitocondrial, foi maior no fígado de ratos GK do que de ratos controle no intervalo de 30 a 40 minutos de perfusão. Em concordância, a produção de glicose derivada de fosfoenolpiruvato, quantificada pela infusão de $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glicose e $^2\text{H}_2\text{O}$, foi maior em ratos GK em comparação aos ratos Wistar e, segundo os autores, pode ter sido promovida pelo aumento da expressão do RNAm da PEPCK1, enzima citosólica da via neoglicogênica

(SENA et al., 2007), o que é consistente com achados da literatura (BEDDOW & SAMUEL, 2012; PANVELOSKI-COSTA et al., 2020) que mostram aumento da expressão de PEPCK1 no fígado de ratos GK. Ademais, Kitahara e colaboradores demonstraram que ratos GK apresentam maior atividade das enzimas neoglicogênicas glicose-6-fosfatase e frutose-1,6-bifosfatase do que ratos Wistar (KITAHARA et al., 1978), e Yoshida e colaboradores, em um estudo utilizando CS-917, um potente inibidor da frutose-1,6-bifosfatase, verificaram que a inibição desta enzima resultou na redução da concentração plasmática de glicose em ratos GK (YOSHIDA et al., 2008). Por outro lado, segundo Beddow e Samuel (2012), a expressão da subunidade catalítica da glicose-6-fosfatase e da piruvato carboxilase, enzima chave da neoglicogênese, que converte piruvato à oxalacetato na mitocôndria, está reduzida no fígado de ratos GK com 14 a 16 semanas de idade.

Conforme mencionado anteriormente, ratos GK apresentam maior insulinemia (ALMON et al., 2009; BEDDOW; SAMUEL, 2012; BITAR; AL-SALEH; AL-MULLA, 2005; MOVASSAT et al., 2008) e concentrações plasmáticas semelhantes de glucagon (BEDDOW; SAMUEL, 2012) quando comparados aos ratos Wistar. Essa maior concentração de insulina no plasma de ratos GK pode ter compensado a menor resposta hepática à insulina observada nesses animais em nosso estudo, e mantido as taxas de glicogenólise, glicólise e neoglicogênese semelhantes entre ratos GK e controle, com exceção da produção hepática de glicose a partir de glicerol, que foi maior no grupo GK no terço final do tempo de infusão deste precursor neoglicogênico.

Cabe ressaltar que, ainda que todas as concentrações dos agentes glicogenolíticos e dos precursores neoglicogênicos utilizadas nos experimentos de perfusão de fígado *in situ* tenham sido saturantes para os ratos controle, é possível que elas não tenham sido para os ratos GK. Portanto, mais estudos precisam ser realizados para sanar estas dúvidas, utilizando concentrações hormonais e de precursores neoglicogênicos semelhantes àquelas encontradas no plasma de ratos GK para mimetizar o metabolismo *in vivo*, uma vez que, em estudos *in vivo*, têm sido observado um aumento da produção hepática de glicose nesse modelo experimental (BEDDOW & SAMUEL, 2012; SENA et al., 2007). Portanto, estes diferentes resultados obtidos nos estudos *in vivo* e *in situ* sobre a produção hepática de glicose em ratos GK podem dever-se a multiplicidade de fatores extra-hepáticos que afetam o fígado, como a disponibilidade de ATP e de precursores neoglicogênicos e as

influências hormonais, assim como a diferença na idade dos animais empregados nesses estudos.

Vale lembrar que, no presente estudo, não houve diferença na lactatemia de ratos controle e GK (Tabela 2), o que, a princípio, não contribuiria para uma alteração na produção hepática de glicose a partir deste precursor neoglicogênico no grupo GK.

Por fim, uma vez que a produção hepática de glicose não diferiu entre os grupos, nas condições avaliadas, a hiperglicemia observada em ratos GK em nosso estudo pode ter ocorrido, pelo menos em parte, pela menor captação periférica de glicose no músculo e no tecido adiposo desses animais, em decorrência da resistência à ação da insulina relatada nestes tecidos (BITAR; AL-SALEH; AL-MULLA, 2005; KANOH et al., 2000; KROOK et al., 1997; SONG et al., 1999).

Em conclusão, apesar da produção hepática de glicose a partir de L-lactato, piruvato ou L-alanina e da glicogenólise estimulada por glucagon ou agonistas adrenérgicos não estarem alteradas em ratos GK, nas condições estudadas, estes animais apresentaram maior produção hepática de glicose a partir de glicerol e menor resposta hepática à insulina, uma vez que o efeito supressivo desse hormônio sobre a produção hepática de glicose estimulada por AMPc foi abolido. Esta menor resposta hepática à insulina pode ter contribuído para a resistência à insulina que é característica desse modelo animal de diabetes tipo 2.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho foi pioneiro em demonstrar que o efeito supressivo da insulina sobre a produção hepática de glicose e glicogenólise estimuladas por AMPc foi abolido em ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo animal de resistência à insulina sem obesidade, um indicativo de resistência hepática à insulina. Em virtude deste resultado, a glicogenólise, a glicólise e a neoglicogênese foram investigadas, através da técnica de perfusão de fígado *in situ*, nestes animais, com o objetivo de avaliar suas possíveis contribuições para a hiperglicemia presente em ratos GK. Constatou-se que a produção hepática de glicose estimulada por glucagon, fenilefrina e isoproterenol, assim como a produção hepática de glicose a partir L-lactato, piruvato e L-alanina não apresentaram alterações neste modelo animal, nas condições estudadas, com exceção da produção hepática de glicose a partir de glicerol, que foi maior no grupo GK no terço final do tempo de infusão deste precursor neoglicogênico. Novos estudos precisam ser realizados para dar continuidade à investigação da possível participação destas vias do metabolismo hepático da glicose na gênese da hiperglicemia e da resistência hepática à insulina observadas em ratos GK.

8 REFERÊNCIA

- SOUZA, C. T. DE. Envolvimento da inflamação subclínica e do estresse oxidativo na resistência à insulina associada a obesidade. **HU Revista**, v. 44, n. 2, p. 211–220, maio 2018.
- ABDUL-GHANI, M. A.; DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.
- ALBRECHTSEN, N. J. W. The glucose-mobilizing effect of glucagon at fasting is mediated by cyclic AMP. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 321, n. 4, p. E571–E574, 1 out. 2021.
- ALMON, R. R. et al. Gene expression analysis of hepatic roles in cause and development of diabetes in Goto-Kakizaki rats. **Journal of Endocrinology**, v. 200, n. 3, p. 331–346, 2009.
- BAZOTTE, R. B.; SILVA, L. G.; SCHIAVON, F. P. M. Insulin resistance in the liver: Deficiency or excess of insulin? **Cell Cycle**, v. 13, n. 16, p. 2494–2500, 15 ago. 2014.
- BEDDOW, S. A.; SAMUEL, V. T. Fasting hyperglycemia in the Goto-Kakizaki rat is dependent on corticosterone: A confounding variable in rodent models of type 2 diabetes. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 5, n. 5, p. 681–685, set. 2012.
- BEGUM, N.; RAGOLIA, L. Altered regulation of insulin signaling components in adipocytes of insulin-resistant type ii diabetic Goto-Kakizaki rats. **Metabolism**, v. 47, n. 1, p. 54–62, 1998.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Glucose Can Be Synthesized from Noncarbohydrate Precursors. **Biochemistry**. New York: W H Freeman; 5th edition. Section 16.3, 2002.
- BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. Em: BERGMEYER, H. U. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Academic P ed. New York: [s.n.]. p. 1205–1215.
- BIAZI, G. R. et al. Decreased hepatic response to glucagon, adrenergic agonists, and cAMP in glycogenolysis, gluconeogenesis, and glycolysis in tumor-bearing rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 9, 2018.
- BISBIS, S. et al. Insulin resistance in the GK rat: decreased number but normal kinase activity in liver receptor. **American Physiological Society**, p. E807–E813, 1993.
- BITAR, M. S.; AL-SALEH, E.; AL-MULLA, F. Oxidative stress - Mediated alterations in glucose dynamics in a genetic animal model of type II diabetes. **Life Sciences**, v. 77, n. 20, p. 2552–2573, 30 set. 2005.
- BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: Comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 68, n. 2, p. 374–378, 1989.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.
- CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 389, n. 10085, p. 2239–2251, 3 jun. 2017.

- CHEN, L.; MAGLIANO, D. J.; ZIMMET, P. Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus - Present and future perspectives. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 4, p. 228–236, abr. 2012.
- CONSTANTIN, J. et al. The action of glucagon infused via the hepatic artery in anterograde and retrograde perfusion of the rat liver is not a function of the accessible cellular spaces. **BBA - General Subjects**, v. 1244, n. 1, p. 169–178, 11 maio 1995.
- COPPIETERS, K. T.; BOETTLER, T.; VON HERRATH, M. Virus infections in type 1 diabetes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 1, 2012.
- CZOK, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. Em: BERGMAYER, H. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press, 1974. p. 1446.
- DA SILVA ROSA, S. C. et al. Mechanisms of muscle insulin resistance and the cross-talk with liver and adipose tissue. **Physiological Reports**, v. 8, n. 19, 1 out. 2020.
- DADKE, S. S. et al. Elevated expression and activity of protein-tyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 274, n. 3, p. 583–589, 11 ago. 2000.
- DE MORAIS, H. et al. Decreased response to c AMP in the glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 368, n. 1–2, p. 9–16, set. 2012.
- DE SOUZA, C. O. et al. Effects of celecoxib and ibuprofen on metabolic disorders induced by Walker-256 tumor in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 399, n. 1–2, p. 237–246, 2015.
- DEFRONZO, R. A.; BONADONNA, R. C.; FERRANNINI, E. Pathogenesis of NIDDM: A balanced overview. **Diabetes Care**, v. 15, n. 3, p. 318–368, 1992.
- DOI, Y. et al. Glucagon attenuates the action of insulin on glucose output in the liver of the Goto-Kakizaki rat perfused in situ. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 442, n. 4, p. 537–541, 2001.
- EXTON, J. H. Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. **Diabetes / Metabolism Reviews**, v. 3, n. 1, p. 163–183, 1987.
- FRASSON-UEMURA, I. G. et al. Infusion of high concentration of lactate in perfused liver, simulating in vivo hyperlactatemia, prevents the reduction of gluconeogenesis in Walker-256 tumor-bearing rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 7, p. 11068–11080, 2019.
- GALICIA-GARCIA, U. et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–34, 1 set. 2020.
- GARVEY, W. T. et al. Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 11, p. 2377–2386, 1998.
- GIRAULT, F. M. et al. Alterations of brain energy metabolism in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats measured in vivo by ¹³C magnetic resonance spectroscopy. **Neurotoxicity Research**, v. 36, n. 2, p. 268–278, 15 ago. 2019.
- GOTO, Y. et al. Development of diabetes in the non-obese NIDDM rat (GK rat). **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 29–31, 1988.

GOTO, Y.; KAKIZAKI, M.; MASAKI, N. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal wistar rats. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 51, p. 80–85, 1975.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. Em: BERGMEYER, H. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press, 1974. p. 1464–1472.

HAN, H. S. et al. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 48, n. 3, 4 mar. 2016.

HARTMANN, B. et al. Lean diabetes in middle-aged adults: A joint analysis of the German DIVE and DPV registries. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2017.

HASSID, W. Z.; ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. Em: S. P. COLOWICK, N. D., K. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1957. v. 3p. 34–51.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes Atlas**. Diabetes Atlas. **Anais...**2021. Disponível em: <www.diabetesatlas.org>

JIANG, G.; ZHANG, B. B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 284, n. 4, p. E671–E678, abr. 2003.

KANO, Y. et al. Thiazolidinedione treatment enhances insulin effects on protein kinase C- ζ/λ activation and glucose transport in adipocytes of nondiabetic and Goto-Kakizaki type II diabetic rats. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 22, p. 16690–16696, 2 jun. 2000.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in inflammatory disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 1–31, 1 dez. 2019.

KELMER-BRACHT, A. M. et al. The influence of Ca²⁺ on gluconeogenesis stimulation by glucagon in the liver of arthritic rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 309–315, 2002.

KITAHARA, A. et al. Activities of hepatic enzymes in spontaneous diabetes rats produced by selective breeding of normal wistar rats. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 126, p. 7–11, 1978.

KROOK, A. et al. Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. **Diabetes**, v. 46, p. 2110–2114, 1997.

KUWABARA, W. M. T. et al. Comparison of Goto-Kakizaki rats and high fat diet-induced obese rats: Are they reliable models to study Type 2 Diabetes mellitus? **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2017.

LEE, S. H.; PARK, S. Y.; CHOI, C. S. Insulin Resistance: from mechanisms to therapeutic strategies. **Diabetes and Metabolism Journal**, v. 46, n. 1, p. 15–37, 1 jan. 2022.

LI, M. et al. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 7, n. 1, p. 216, 6 jul. 2022.

LOPES, G. et al. Responsiveness of Glycogen Catabolism to Adrenergic Agonists During Insulin-Induced Hypoglycemia in Rat Livers. **Gen. Pharmac**, v. 30, n. 4, p. 593–599, 1998.

- LUNDQVIST, M. H. et al. Altered hormonal and autonomic nerve responses to hypo- and hyperglycaemia are found in overweight and insulin-resistant individuals and may contribute to the development of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 64, p. 641–655, 16 jun. 2021.
- MATAFOME, P. et al. Metformin and atorvastatin combination further protect the liver in type 2 diabetes with hyperlipidaemia. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 27, n. 1, p. 54–62, jan. 2011.
- MILLER, R. A.; BIRNBAUM, M. J. Glucagon: acute actions on hepatic metabolism. **Diabetologia**, v. 59, n. 7, p. 1367–1371, 26 abr. 2016.
- MORIGNY, P. et al. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. **Biochimie**, v. 125, p. 259–266, 1 jun. 2016.
- MOVASSAT, J. et al. Follow-up of GK rats during prediabetes highlights increased insulin action and fat deposition despite low insulin secretion. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 294, p. 168–175, 2008.
- PANVELOSKI-COSTA, A. C. et al. The insulin resistance is reversed by exogenous 3,5,3'triiodothyronine in type 2 diabetic Goto–Kakizaki rats by an inflammatory-independent pathway. **Endocrine**, v. 68, n. 2, p. 287–295, 1 maio 2020.
- PEARSON, E. R. Type 2 diabetes: a multifaceted disease. **Diabetologia**, v. 62, n. 7, p. 1107–1112, 1 jul. 2019.
- PERRY, R. J. et al. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. **Cell**, v. 160, n. 4, p. 745–758, 12 fev. 2015.
- PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. **Physiol Rev**, v. 98, p. 2133–2223, 2018.
- PETERSEN, M. C.; VATNER, D. F.; SHULMAN, G. I. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 10, p. 572–587, 1 out. 2017.
- PILKIS, S.; GRANNER, D. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annual Review of Physiology**, v. 54, n. 1, p. 885–909, 1 jan. 1992.
- PORTHA, B. et al. Islet structure and function in the GK rat. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 654, p. 479–500, 2010.
- PORTHA, B. et al. The GK rat: A prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes. Em: **Animal Models in Diabetes Research**. [s.l.] Humana Press, 2012. v. 933p. 125–159.
- PRINCIPI, N. et al. Type 1 diabetes and viral infections: What is the relationship? **Journal of Clinical Virology**, v. 96, p. 26–31, 1 nov. 2017.
- RAHMAN, M. S. et al. Role of insulin in health and disease: An update. **International Journal of Molecular Sciences**, 2 jun. 2021.
- RAMNANAN, C. J. et al. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 13, n. SUPPL. 1, p. 118–125, out. 2011.
- RIZZA, R. A. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: Implications for therapy. **Diabetes**, v. 59, n. 11, p. 2697–2707, nov. 2010.
- RODGERS, R. L. Glucagon and Cyclic AMP: Time to Turn the Page? **Current Diabetes Reviews**, v. 8, n. 5, p. 362–381, 30 jul. 2012.

- ROSA, M. Q. M. et al. Disease and economic burden of hospitalizations attributable to diabetes mellitus and its complications: A nationwide study in Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 2, 8 fev. 2018.
- RUI, L. et al. Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 2, p. 181–189, 2001.
- RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 1, p. 177–197, 2014.
- SBD. Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2022.
- SENA, C. M. et al. Sources of endogenous glucose production in the Goto-Kakizaki diabetic rat. **Diabetes and Metabolism**, v. 33, n. 4, p. 296–302, set. 2007.
- SERDAN, T. D. A. et al. Impaired brown adipose tissue is differentially modulated in insulin-resistant obese wistar and type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 142, 1 out. 2021.
- SHARABI, K. et al. Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 46, p. 21–33, 1 dez. 2015.
- SKURK, T. et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 3, p. 1023–1033, 2007.
- SNELL, K. Regulation of hepatic glucose metabolism by insulin and counter-regulatory hormones. **Proceedings of the Nutrition Society**, p. 567–575, 1991.
- SONG, X. M. et al. Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats. **DIABETES**, v. 48, p. 664–670, 1999.
- SZKUDELSKA, K. et al. Resveratrol affects insulin signaling in type 2 diabetic goto-kakizaki rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–15, 1 mar. 2021.
- SZKUDELSKA, K.; OKULICZ, M.; SZKUDELSKI, T. Resveratrol reduces excessive cholesterol accumulation in goto-kakizaki rat, a model with congenital type 2 diabetes. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, n. 4, p. 581–587, 2020a.
- SZKUDELSKA, K.; OKULICZ, M.; SZKUDELSKI, T. Resveratrol reduces excessive cholesterol accumulation in goto-kakizaki rat, a model with congenital type 2 diabetes. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, n. 4, p. 581–587, 2020b.
- UCHIYAMA, Y. et al. Dietary supplementation with a low dose of (-)-Epigallocatechin-3-gallate reduces pro-inflammatory responses in peripheral leukocytes of non-obese type 2 diabetic GK rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 59, p. 541–547, 2013.
- VICENTINI, G. E. et al. Transport of cyclic AMP and synthetic analogs in the perfused rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 1187–1201, 2000.
- XIANG, Q. et al. Insulin resistance-induced hyperglycemia decreased the activation of Akt/CREB in hippocampus neurons: Molecular evidence for mechanism of diabetes-induced cognitive dysfunction. **Neuropeptides**, v. 54, p. 9–15, 1 dez. 2015.

XUE, B. et al. Adipose tissue deficiency and chronic inflammation in diabetic Goto-Kakizaki rats. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

YOSHIDA, T. et al. CS-917, a fructose 1,6-bisphosphatase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia after meal loading in non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 601, n. 1–3, p. 192–197, 28 dez. 2008.

YOSHIDA, T. et al. Metformin primarily decreases plasma glucose not by gluconeogenesis suppression but by activating glucose utilization in a non-obese type 2 diabetes Goto-Kakizaki rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 623, n. 1–3, p. 141–147, 25 nov. 2009.

ZHANG, W. et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 15, p. 10105–10117, 14 abr. 2006.

ANEXO

ANEXO 1. Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 23/2021

Londrina, 08 de abril de 2022.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o **pedido de adendo** referente ao projeto intitulado: "**Avaliação da neoglicogênese hepática em modelo de resistência à insulina sem obesidade: ratos diabéticos Goto-Kakizaki**" protocolo CEUA n° **062.2021** sob a responsabilidade de **Gisele Lopes Bertolini**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL) em reunião do dia **05/04/2022**.

Este projeto tem por objetivo avaliar a produção hepática de glicose e a sinalização insulínica em tecidos periféricos em modelo animal de resistência à insulina sem obesidade (ratos Goto-Kakizaki).

Grau de invasidade: 3.

| | |
|-----------------------------------|---|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa científica |
| Vigência da autorização | 08/04/2022 a 13/02/2025 |
| Espécie/ linhagem/ raça | Rato heterogênico – Wistar Rato isogênico – Goto-Kakizaki |
| Nº de animais | 100 , sendo: 50 Wistar 50 Goto-Kakizaki |
| Peso/ Idade | Wistar: 150-170 g / 5 semanas Goto-Kakizaki: 100-150 g / 5 semanas |
| Sexo | Machos |
| Origem | Ratos GK provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, São Paulo - SP, e ratos Wistar provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. |
| Amostras a serem coletadas | Músculo esquelético (gastrocnêmio, sóleo e extensor digital longo) e tecido adiposo (retroperitoneal, perigonadal e mesentérico). |

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UUEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Prof. Dr.ª Patricia Chimin Perandini
Coordenadora da CEUA/UUEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr (a). Gisele Lopes Bertolini

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/CCB

C/C para Biotério Central da UEL