

CARLOS ALBERTO DA SILVA

ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DOS ERITRÓCITOS NA
REGULAÇÃO DA GLICEMIA : ARMAZENAMENTO E
MOBILIZAÇÃO DE GLICOGÊNIO EM ERITRÓCITOS DE RATOS
NORMAIS E DIABÉTICOS E SUAS RELAÇÕES COM O
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO FÍGADO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Carlos Alberto da Silva
Dr. Dr. A. A. Gonçalves
e aprovada pela Comissão Julgadora.

13/06/97

Tese submetida ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, na área de Fisiologia e Biofísica.

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO ARI GONÇALVES

CAMPINAS - SÃO PAULO

1997

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Silva, Carlos Alberto da

Si38e Estudo sobre a participação dos eritrócitos na regulação da glicemia: armazenamento e mobilização de glicogênio em eritrócitos de ratos normais e diabéticos e suas relações com o metabolismo de carboidratos no fígado/Carlos Alberto da Silva. -- Campinas, SP:[s.n.], 1997. 136f: ilus.

Orientador: Antonio Ari Gonçalves

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Eritrócitos. 2. Glicogênio. 3. Glicemia. I. Gonçalves,
Antonio Ari. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

CARLOS ALBERTO DA SILVA

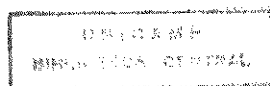
**ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DOS ERITRÓCITOS NA
REGULAÇÃO DA GLICEMIA : ARMAZENAMENTO E
MOBILIZAÇÃO DE GLICOGÊNIO EM ERITRÓCITOS DE RATOS
NORMAIS E DIABÉTICOS E SUAS RELAÇÕES COM O
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO FÍGADO**

Tese submetida ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, na área de Fisiologia e Biofísica.

ORIENTADOR: PROF. DR ANTONIO ARI GONÇALVES

CAMPINAS - SÃO PAULO

1997



Campinas, 13 de junho de 1997

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

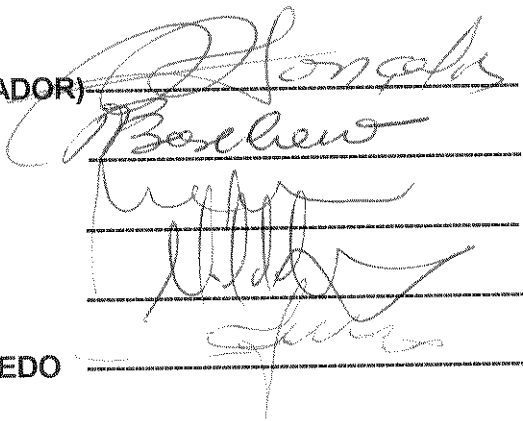
Prof. Dr. ANTONIO ARI GONÇALVES (ORIENTADOR)

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS BOSCHERO

Profa. Dra. NILCE CORREA MEIRELLES

Prof. Dr. MIGUEL ARCANJO AREAS

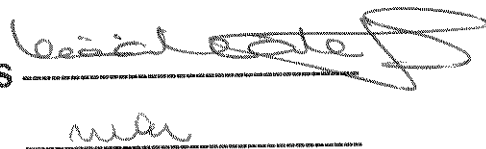
Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO MOREIRA DE AZEVEDO

Handwritten signatures of the Titulares: Antonio Ari Gonçalves, Antonio Carlos Boschero, Nilce Correa Meirelles, Miguel Arcanjo Areas, and José Roberto Moreira de Azevedo.

SUPLENTES:

Profa. Dra. MARIA CRISTINA CINTRA GOMES MARCONDES

Profa. Dra. MARIA ALICE ROSTON DE MELLO

Handwritten signatures of the Suplentes: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes and Maria Alice Roston de Mello.

A minha esposa **Valéria**, minha companheira de todos os momentos, que fez renascer um novo sentido à minha vida e ao nosso filho **Bruno** recém chegado, luz dos nossos dias. Pessoas amadas de quem este trabalho roubou dias de agradável convívio

Dedico

**Aos meus queridos pais Arnaldo e Idalina, pessoas que
sempre acreditaram nos valores fundamentais da vida**

Ao meu irmão Paulo e família

**Pela amizade, incentivo constante e participação na minha vida,
mesmo estando distante da minha rotina**

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Doutor Antonio Ari Gonçalves, pelos ensinamentos, orientação, pela amizade, pela dedicação e participação direta na minha formação acadêmica.

Ao Dr. Antônio Carlos Boschero, pela amizade e pelo grande apoio prestado no decorrer do curso de pós-graduação.

Ao Dr. Jose Roberto Moreira de Azevedo, pelo grande apoio prestado.

Aos Professores Doutores Rui Errerias Maciel e Alba R. Monteiro Souza Brito por toda a colaboração prestada na fase de qualificação.

Ao Professor Doutor Everardo Magalhães Carneiro, pela preciosa colaboração e participação na minha formação.

Aos meus amigos professores Alexandre dos Reis Taveira de Souza e Ricardo Henrique dos Santos Cota pela convivência agradável no laboratório.

A funcionária Aparecida da Silva Geraldo pela paciência diária no laboratório, quando no início de minha vida acadêmica.

A funcionária Josefina Silva Bueno Nogueira pela dedicação diária nas atividades do laboratório.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

As secretárias da Pós-graduação, Maria Elídia dos Santos e Sônia Maria Martins de Oliveira pela cooperação prestada.

Ao Centro de Biotérismo da UNICAMP, pelo fornecimento dos ratos.

A Professora Doutora Míriam Ribeiro Campos, Chefe do Departamento de Ciências Biológicas da UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA, pelo apoio que já vem de longos anos de convivência.

A Professora Maria Luiza O. Polacow pelo companheirismo no ambiente de trabalho na UNIMEP.

A UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA que permitiu a minha qualificação profissional.

As agência Financiadoras : CAPES e CNPq.

Muito Obrigado

SUMÁRIO

Lista de tabelas

Lista de figuras

1) INTRODUÇÃO1

 1.1 - Apresentação2

 1.2 - Capítulo I

 Eritrócitos5

 1.3 - Capítulo II

 Metformina13

 1.4 - Capítulo III

 Fenobarbital 20

2 - OBJETIVOS 22

3 - MATERIAL E MÉTODOS

 3.1 - Animais 23

 3.2 - Procedimentos 24

 3.2.1 - Glicogênio em eritrócitos.

 Amostragem para avaliação *in vivo* 24

 3.2.2 - Amostragem para avaliação *in vitro* 24

 3.3 - Incubação dos eritrócitos 25

 3.4 - Extração e determinação do glicogênio dos eritrócitos 25

 3.5 - Determinação da hemoglobina 26

 3.6 - Determinação da glicemia 26

 3.7 - Determinação do hematócrito 26

 3.8 - Determinação do lactato e piruvato 27

4 - Amostragem para avaliação do glicogênio 28

 4.1 - Fígado 28

 4.2 - Extração e determinação do glicogênio hepático 29

5 - Indução do diabetes mellitus 29

6- Exercício físico	29
7- Tratamento com metformina	30
8- Tratamento com fenobarbital	30
9 - Metabolismo de glicose nos eritrócitos de ratos	30
10 - Análise estatística	31

4 - RESULTADOS

Capítulo I -

A) Concentração de glicogênio em eritrócitos de ratos adultos correlação com a glicemia	33
B) Efeito do jejum e do exercício físico sobre a concentração eritrocitária de glicogênio	36

Capítulo II -

A) Efeito da concentração extracelular de glicose, hormônios hiperglicemiantes e insulina sobre as reservas eritrocitárias de glicogênio	42
B) Estudo <i>in vitro</i> do efeito dos hormônios glicogenolíticos e insulina sobre o conteúdo de glicogênio de eritrócitos incubados em diferentes concentrações de glicose	48

Capítulo III -

A) Concentração de glicogênio em eritrócitos de ratos diabéticos por aloxana	53
B) Efeito da metformina sobre as reservas de glicogênio de eritrócitos e fígado de ratos normais e diabéticos.....	57
C) Tratamento <i>in vitro</i>	57
D) Macrozoneamento do glicogênio em fígado de ratos adultos. Efeito do tratamento de ratos diabéticos com metformina	62

Capítulo IV -

A) Efeito do fenobarbital sobre as reservas de glicogênio dos eritrócitos de ratos normais e diabéticos	65
B) Efeito <i>in vitro</i> do tratamento com fenobarbital sobre as reservas de glicogênio dos eritrócitos de ratos controle ou diabéticos	69

Capítulo V -

Estimativa da concentração de lactato e piruvato em eritrócitos	70
Metabolismo de glicose nos eritrócitos	76

5 - DISCUSSÃO

A) Avaliação das reservas eritrocitárias de glicogênio <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ..	78
B) Avaliação das reservas hepáticas de glicogênio	90
C) Avaliação dos efeitos do fenobarbital <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> sobre as reservas eritrocitárias de glicogênio	94
D) Estimativa da concentração eritrocitária de lactato e piruvato	96

6 - RESUMO	99
7- CONCLUSÕES	102
8 - SUMMARY	106
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
10 - APÊNDICE	139

LISTA DE TABELAS :

Tabela 1- Concentração de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb) e de glicose plasmática (mg.dl^{-1}) no leito vascular de ratos adultos no período pós-prandial.....35

Tabela 2- Efeito do jejum e de exercício sobre a concentração de glicose plasmática (mg.dl^{-1}) de ratos adultos.....38

Tabela 3- Efeito do jejum e do exercício sobre a concentração de glicogênio em eritrócitos ($\mu\text{g. g}^{-1}\text{Hb}$) em ratos adultos..... 41

Tabela 4- Efeito da concentração de glicose sobre a concentração de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{Hb}$) de eritrócitos de ratos adultos *in vitro*..... 44

Tabela 5 - Concentração de glicogênio de eritrócitos ($\mu\text{g. g}^{-1}$ Hb) de ratos controle e diabéticos por aloxana tratados ou não com metformina ($5.6\mu\text{g.ml}^{-1}$) no período pós - prandial.....54

Tabela 6 - Concentração plasmática de glicose (mg.dl^{-1}) no período pós - prandial em ratos controle e diabéticos por aloxana, tratados ou não com metformina 56

Tabela 7 - Concentração de glicogênio lobular hepático ($\text{mg}/100\text{mg}$), de ratos submetidos a diferentes condições experimentais.....64

Tabela 8 - Concentração de glicose em ratos controle e diabéticos por aloxana, tratados ou não com fenobarbital.....67

Tabela 9 - Efeitos do fenobarbital sobre a concentração eritrocitária de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb) de ratos normais ou diabéticos por aloxana.....68

APÊNDICE

Tabela A1 - Concentração de glicogênio, $\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb, de eritrócitos de ratos controle incubados na presença de diferentes concentrações de glicose e hormônios.

Tabela A2 - Concentração de glicogênio, $\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb, de eritrócitos de ratos normais e diabéticos incubados na presença de diferentes concentrações de glicose e metformina (concentração final $5.6 \mu\text{g. ml}^{-1}$), na presença ou ausência de insulina

Tabela A3 - Efeito do fenobarbital *in vitro* sobre o conteúdo de glicogênio de eritrócitos de ratos normais e diabéticos.

LISTA DE FIGURAS :

Figura 1 - Esboço do fígado mostrando a subdivisão dos lóbulos em setores para a retirada das amostras..... 28

Figura 2a - Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb) e a glicemia (mg.dl^{-1}) em eritrócitos de ratos controle incubados na presença de diferentes concentrações de glicose (carga)..... 46

Figura 2b - Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb) e a glicemia (mg.dl^{-1}) em eritrócitos de ratos controle pré-incubados na presença de 240 mg.dl^{-1} de glicose e re-incubados na presença de diferentes concentrações de glicose (descarga)..... 47

Figura 3a - Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb) e a variação da glicemia (mg.dl^{-1}) em eritrócitos de ratos incubados na presença de diferentes concentrações de glicose e hormônios (curva de regressão)..... 51

Figura 3b - Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb) e a variação da glicemia (mg.dl^{-1}) em eritrócitos de ratos incubados na presença de diferentes concentrações de glicose e hormônios (curva de regressão).....52

Figura 4a - Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb) e a glicemia (mg.dl^{-1}) em eritrócitos de ratos controle incubados na presença de diferentes concentrações de glicose insulina e / ou metformina (curva de regressão) 60

Figura 4b - Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb) e a glicemia (mg.dl^{-1}) em eritrócitos de ratos diabéticos incubados na presença de diferentes concentrações de glicose, metformina e metformina + insulina (curva de regressão linear)..... 61

Figura 5 - Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb) e a variação da glicemia (mg.dl^{-1}) em eritrócitos de ratos controle e diabéticos incubados na presença de diferentes concentrações de glicose e/ou fenobarbital (curva de regressão)..... 70

Figura 6 - Concentração eritrocitária de lactato na veia porta e na supra-hepática de ratos controle, diabéticos tratados ou não com metformina e após jejum durante 24 ou 48 h..... 74

Figura 7 - Concentração eritrocitária de piruvato na veia porta e na supra-hepática de ratos controle, diabéticos tratados ou não com metformina e após jejum durante 24 ou 48 h..... 75

1. INTRODUÇÃO

1.1) APRESENTAÇÃO

A glicose sanguínea se mantém relativamente constante graças a ação conjunta de mecanismos de controle neurais e endócrinos. A participação do fígado na manutenção da glicemia, bem como, o seu controle endócrino e autônomo, tem sido estudada em detalhes, demonstrando que o fígado capta ou libera glicose com velocidade proporcional ao grau de aumento ou redução da glicose portal. Deficiências no metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídeos ocorrem no fígado de diabéticos e também em outros tecidos dependentes de insulina para a captação de glicose (ROGNSTAD, 1991; JUNGGERMANN, 1992; LAMAIGUE & ROUSSEAU, 1994). A correção destas deficiências é fundamental para reduzir a glicemia e prevenir o avanço das complicações vasculares e das atividades neurais para melhorar a qualidade de vida do diabético.

Recentemente, foi demonstrado que os eritrócitos absorvem e incorporam glicose aos reservatórios de glicogênio quando a glicose está elevada, liberando-a quando ocorre redução da glicemia (GUARNER & ALVAREZ-BUYLLA, 1989). Como as reservas de glicogênio superam as necessidades metabólicas destas células foi sugerido que contribuam de maneira importante para o controle glicêmico (JACQUEZ, 1984; GUARNER & ALVAREZ-BUYLLA, 1989; 1990). Recentes pesquisas vem reunindo informações a favor desta hipótese em humanos e outros mamíferos, normais e diabéticos. Eritrócitos de humanos diabéticos são deficientes na quantidade e na atividade dos transportadores de glicose (GLUT1) assim como,

na produção de glicose-6-fosfato (G6P) e na atividade da enzima glicogênio sintetase (GARVEY et al., 1987; ABUMRAD et al., 1988; KATO et al., 1990). Estas deficiências comprometem tanto a captação de glicose quanto a síntese de glicogênio e, conseqüentemente, a capacidade dos eritrócitos participarem da distribuição de glicose torna-se pequena ou nula, constituindo um distúrbio adicional que pode complicar o quadro glicêmico no diabetes mellitus (MARSHALL, 1989). De modo semelhante, o fígado de diabéticos também apresenta inibição na atividade da glicogênio sintetase. (RODRIGUEZ-GIL et al., 1989, JUNGEMANN, 1992; LAMAIGUE & ROUSSEAU, 1994).

Alternativas para o tratamento de diabéticos levaram à re-introdução de derivados das guanidinas, as biguanidas. Dentre estas, a metformina, isoladamente ou em conjunto com sulfuniurêias ou insulina, tem promovido melhora no controle da glicemia, do colesterol e de triglicerídios (CAMPBELL, 1988; MATTHEI et al., 1989; RICCIO et al., 1991; BAILEY & PUAH, 1986). Em fígado de ratos diabéticos por aloxana, a metformina promoveu a recuperação das reservas de glicogênio, sugerindo que houve o restabelecimento das funções ligadas a síntese deste produto de reserva (da SILVA & GONÇALVES, 1994).

O indutor enzimático, fenobarbital também tem sido utilizado como coadjuvante para o tratamento do diabetes tipo II. A melhora na glicemia durante o tratamento é provavelmente dependente da ativação das enzimas microssomais as quais se encontravam comprometidas pela patologia (VENKATESAN et al., 1994).

Como a manutenção da normoglicemia depende do suprimento energético adequado e da integridade dos tecidos envolvidos nos ajustes metabólicos é preciso

reavaliar a inter-relação entre os principais reservatórios de glicose, incluindo a reserva eritrocitária em condições de normalidade e quando a homeostasia glicêmica fica comprometida por situações patológicas como no diabetes mellitus.

A apresentação deste trabalho será feita no formato de capítulos parcialmente independentes mostrando, primeiramente, a função armazenadora de glicogênio nos eritrócitos de ratos, *in vivo* e *in vitro*, seguido do estudo dos efeitos de alterações em várias condições funcionais sobre os reservatórios de glicogênio e, finalmente, os efeitos das drogas, metformina e fenobarbital em estimular a síntese de glicogênio em animais diabéticos. Ao final será apresentada uma discussão compreensiva. Em linhas gerais, este trabalho demonstrou que os eritrócitos também participam do mecanismo de regulação da glicemia e que podem ser usados como um dos indicadores precoce do aparecimento do diabetes mellitus.

1.2) CAPÍTULO I

ERITRÓCITOS

As funções eritrocitárias mais estudadas são aquela relacionadas com suas propriedades de transportar gases e de participar do equilíbrio ácido-base do sangue. Porém, ao estudar o metabolismo de glicose em eritrócitos, MURPHY (1960), detectou pequenas reservas de glicogênio, que SIDBURY et al. (1961) consideraram serem uma porção remanescente dos estágios evolutivos destas células e que o metabolismo do glicogênio não seria ativo. Todavia, durante estudos de glicogenoses hepáticas em humanos, MOSES et al (1971) verificaram que os eritrócitos contém as enzimas glicogênio sintetase e glicogênio fosforilase, responsáveis, respectivamente, pela síntese e pela degradação de glicogênio. Nestas doenças as enzimas responsáveis pela degradação das reservas de glicogênio estão inativadas, possibilitando o acúmulo de glicogênio em concentração maior que a observada em eritrócitos de indivíduos normais (MOSES et al, 1972). Anteriormente, HERS et al. (1967) já haviam identificado a amilo-1,6-glucosidase, enzima que possui atividade desramificadora do glicogênio em eritrócitos normais.

No fígado, duas formas da enzima glicogênio sintetase, passíveis de interconversão têm uma implicação direta na regulação da síntese de glicogênio. A forma a possui alta afinidade pela glicose-6-fosfato (G6P) e uridina di-fosfoglicose (UDPG) e a forma b possui baixa afinidade pelo substrato e pelo ativador, sendo ativa somente na presença da G6P (MOSES et al, 1972). Nos eritrócitos, somente

um tipo de glicogênio sintetase está presente, semelhante à forma **b** descrita no fígado, dependente da G6P. Neste sentido, o eritrócito é único, ao contrário dos outros tecidos, nos quais há interconversão entre as duas formas da enzima. A baixa atividade da glicogênio sintetase nos eritrócitos, pode ser devida à concentração intracelular de UDPG (0,03 mM) e de glicose 6-fosfato (0,2 mM), que estão abaixo do K_m e K_a , da enzima. Ao contrário de outros tecidos, o ATP (1,2 mM) e o fosfato inorgânico (1,3 mM) não inibem a glicogênio sintetase dos eritrócitos. Consequentemente, a regulação da síntese de glicogênio nos eritrócitos depende em maior intensidade das mudanças nas concentrações de G6P do que da concentração dos ativadores ou inibidores da enzima (MOSES et al., 1972).

O metabolismo de glicogênio em eritrócitos normais, foi avaliado por MOSES et al. (1972), utilizando como parâmetro a incorporação de glicose radioativa ao reservatório de glicogênio. A taxa de incorporação de glicose para a formação de glicogênio nos eritrócitos atingiu $0,04 \pm 0,01 \mu\text{mol. g Hb}^{-1}.\text{h}$, sendo o valor máximo obtido em pH 7.6. Propuseram que o grau de saturação da hemoglobina pelo oxigênio poderia induzir modificações no pH intracelular e assim regular a atividade das enzimas envolvidas na síntese de glicogênio (MOSES et al., 1972).

A quantidade de glicose captada pelos eritrócitos supera em muito as suas necessidades metabólicas, o que implica em alta velocidade de transporte de glicose e/ou em grande quantidade de transportador na membrana. LIN & SPUDICH (1974), estimaram em média, 3×10^5 transportadores por célula. Estes transportadores constituem 3,5% das proteínas da membrana, superior ao medido

na membrana de adipócitos, correspondente a apenas 0,04% (ZOCCOLI et al., 1978, CARTER-SU et al., 1980).

O transportador de glicose identificado nos eritrócitos é constituído de 492 aminoácidos e foi classificado como GLUT1 (BELL et al., 1990). Ele apresenta um Km para glicose de aproximadamente 2 mM e "in situ" exhibe um padrão assimétrico de transporte, com Km para efluxo aproximadamente 4 vezes maior e V_{máx} comparado ao influxo (BURANT et al., 1991). A atividade do GLUT1 não é regulada por hormônios e ele não é translocado de sítios intra-celulares para a membrana plasmática (SIMPSON & CUSHMAN, 1986).

Sob normoglicemia (5 mM), os eritrócitos humanos utilizam 1 a 2 μ moles de glicose.ml células. h. Aproximadamente 95% da glicose oxidada segue a via de Embden-Mayerhof, produzindo lactato e piruvato e gerando o ATP necessário para a manutenção das condições homeostáticas. A glicose (5-10%) pode ainda ser metabolizada através da via da pentose fosfato, gerando nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADPH), que desempenha papel fundamental na manutenção de componentes intracelulares na forma reduzida (YUNIS & YASHMINEH, 1969 ; ROSE, 1971; HARVEY & KANEKO, 1976).

Diversos estudos do metabolismo eritrocitário da glicose tem demonstrado a grande variação inter-espécie no consumo de glicose, sendo constatado a utilização de 0,27 μ mol de glicose / h / ml de eritrócitos em porcos, 2,85 μ mol de glicose / h / ml de eritrócitos em camundongos, 2,26 μ mol de glicose / h / ml de eritrócitos em μ mol de glicose / h / ml de eritrócitos em coelhos e 2,38 μ mol de glicose / h / ml de

eritrócitos em ratos (KANEKO, 1974; HARVEY & KANEKO, 1976; MAGNANI et al, 1980).

AGOSTINO (1992), estudou as relações entre o metabolismo hepático e os eritrócitos e sugeriu que os eritrócitos podem ser os responsáveis pela produção de compostos de 3 carbonos como lactato e piruvato os quais por sua vez, podem suprir o fígado com lactato necessário para síntese de glicogênio.

Diversos estudos utilizando inibidores específicos dos transportadores de lactato caracterizaram o transporte de monocarboxilatos em eritrócitos humanos (OPIE & MANSFORD, 1971; HALESTRAP, 1976; DUBINSKY & RACKER, 1978; DEUTICKE et al., 1982).

Os transportadores de lactato na membrana de eritrócitos de ratos correspondem a 5% das proteínas de membrana, e transportam mais eficientemente o L-lactato que o D-lactato (DEUTICKE et al., 1978).

As determinações da capacidade e velocidade do transporte de monocarboxilatos dos eritrócitos de humanos, mostraram que o transportador de L-lactato tem $K_m = 46,3 \text{ mM}$ e $V_{m\acute{a}x} = 3,9 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml células}$, enquanto o transportador do piruvato tem o $K_m = 1,3 \text{ mM}$ e $V_{max} = 0,67 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml células}$. Nos eritrócitos de ratos, o transportador de L-lactato tem K_m aproximadamente 300 mM e $V_{max} = 2,51 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml células}$, enquanto o transportador de piruvato apresenta o $K_m = 0,48 \text{ mM}$ e $V_{max} = 2,13 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml células}$ (POOLE & HALESTRAP, 1992).

DEUTICKE et al (1982), demonstraram substanciais diferenças inter-espécies entre o K_m e V_{max} dos transportadores de lactato e piruvato, as quais podem estar

relacionadas às diferenças na constituição lipídica das membranas ou ainda, quanto ao nível de colesterol que estas possuem. Esta hipótese foi recentemente reforçada nos estudos de POOLE & HALESTRAP (1992).

Os hepatócitos, de maneira similar ao observado nos eritrócitos, também possuem uma grande quantidade de transportadores de lactato e piruvato com propriedades mais seletivas ao L-lactato que ao D-lactato (EDLUND & HALESTRAP, 1988; FAFOURNOUX et al., 1985; MONSON et al., 1982).

Nos hepatócitos, o K_m do transportador de lactato situa-se entre 1,8 - 2,4 mM enquanto para o piruvato o $K_m = 1,2$ mM (POOLE & HALESTRAP, 1992). Valores similares já foram observados em eritrócitos de ratos, mostrando similaridades entre estas células e sugerindo que os eritrócitos poderiam fornecer monocarboxilatos ao fígado durante sua passagem pelo parênquima hepático (EDLUND & HALESTRAP, 1988).

A identificação de reservas de glicogênio nos eritrócitos, estimulou o interesse em avaliar a função destes depósitos de glicose. JACQUEZ (1984), usando como referência o estudo de RAPOPORT (1968), que avaliou a glicólise em eritrócitos humanos em $1,1 \text{ mmol. l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. l células, a 37°C , propôs que os eritrócitos seriam importantes para manter o suprimento de glicose cerebral devido ao seu alto número na corrente sangüínea, associado à habilidade de transportar 40% da glicose plasmática. Sob normoglicemia, (aproximadamente 5 mM) a concentração de glicogênio dos eritrócitos humanos equivale a doze mil vezes o requerido pelo seu metabolismo.

GUARNER & ALVAREZ-BUYLLA (1989) constataram uma diferença artério-venosa no teor de glicogênio eritrocitário em ratos, e sugeriram que os eritrócitos estariam distribuindo glicose aos tecidos, participando da regulação glicêmica. Esta sugestão havia sido antecipada por FERRANNINI & BJORKMAN (1986) em estudos em eritrócitos humanos. GUARNER & ALVAREZ-BUYLLA (1989), também verificaram que a captação de glicose pelos eritrócitos depende da concentração de glicose no meio a que estão expostos, “in vivo” e “in vitro”, ocorrendo incorporação de glicose aos reservatórios de glicogênio durante a elevação da glicemia e, por outro lado, redução nas reservas quando diminui a glicemia. A estação de captação de glicose seria o fígado, ao qual forneceria em troca, o lactato (DEUTICKE et al., 1982; POOLE & HALESTRAP, 1992).

A reserva de glicogênio está sujeita à ação de hormônios e, portanto, está sujeita aos eventos que determinam a flutuação em suas concentrações no plasma. A adrenalina pode mobilizar as reservas de glicogênio da mesma maneira que o faz nos hepatócitos, através de receptores β 2-adrenérgicos e o efeito se manifesta inclusive durante a hiperglicemia (BECKMAN & HOLLENBERG, 1979; SMUROVA, 1994). Além disso, aumenta o metabolismo da glicose nos eritrócitos porque inibe os últimos passos da glicólise, diminuindo a produção de ATP e, ao mesmo tempo, induzindo aumento na síntese de 2,3 bi-fosfoglicerato possibilitando maior liberação de oxigênio (MAIRBAURL & HUMPELER, 1981).

A influência da insulina sobre a captação de glicose nos eritrócitos pode ser aventada, em decorrência da presença de receptores de insulina em eritrócitos maduros. Eritrócitos normais possuem aproximadamente 2000 receptores de

insulina, distribuídos em 14 sítios por micrômetro quadrado de membrana e com as mesmas propriedades observadas nos receptores de insulina de outros tecidos como fígado, músculo e tecido adiposo (GAMBHIR et al., 1978; BALDINI et al., 1986). Entretanto, em alguns estudos (GUARNER & ALVAREZ BUYLLA, 1989), a insulina não promoveu aumento na captação de glicose, nem a síntese de glicogênio. Todavia, em reticulócitos, que apresentam 8 vezes mais receptores de insulina que os eritrócitos maduros, a captação de glicose e a síntese de glicogênio se elevam na presença de insulina. Possivelmente, estes receptores de insulina são perdidos durante o período de maturação (THOMOPOULOS et al., 1978; LEE & YALOW, 1980). Mas, PETERSON et al (1983), incubaram eritrócitos humanos na presença de insulina durante 3 horas e verificaram uma redução de 70% na população de receptores. Nova incubação destes eritrócitos na ausência de insulina mostrou que a população de receptores foi restabelecida, sugerindo que a insulina promove a internalização dos receptores e assim, baixa a sensibilidade a si própria.

Informações a respeito dos efeitos da diabetes mellitus sobre o metabolismo da glicose em eritrócitos são poucas e esparsas. Recentemente, tem sido constatado que eritrócitos de diabéticos, dependente ou não de insulina, apresentam redução na captação e no metabolismo de glicose e na concentração de G6P (CIARALDI et al., 1982; CIVELEK et al., 1991; KATO et al., 1990; CONGET et al., 1991; DONATELLI et al., 1991; RAPIN et al., 1991).

Apesar de serem raras as informações na literatura a respeito das propriedades dos eritrócitos enquanto transportadores de glicose, faz-se necessário reavaliar a importância destas células para a regulação glicêmica em ratos normais

e diabéticos. Também avaliaremos a capacidade dos eritrócitos em modificar suas reservas de glicogênio frente a diferentes hormônios ou fármacos utilizados no tratamento da diabetes.

1.3) CAPÍTULO II

METFORMINA

As guanidinas tem encontrado ampla utilização: como agente anti-bactericida, anti-viral, anti-inflamatório, hipotensoras, antagonistas de receptores de histamina, indutores de alterações na excitabilidade neuronal ligadas a canais de Na^+ , indutores de alterações na liberação de neurotransmissores, entre outros (SCHAFFER, 1983).

Também foram utilizadas no tratamento do diabetes mellitus devido a sua propriedade anti-hiperglicemiante quando administrada por via oral. Todavia, a sua prescrição foi abandonada devido à ocorrência de muitos casos letais por acidose láctica, sendo substituídas pelas biguanidas, fenformin (β -phenethylbiguanida), buformin (n-butyl biguanida) e metformim (N_1, N_1 -dimethylbiguanida) (ARIEF, 1989; LALAU et al., 1995).

A metformina destacou-se das demais pois, desde que utilizada em condições controladas, o risco de provocar acidose láctica é mínimo (SCHAFER, 1980 ; CAMPBELL et al., 1988). Estudos farmacocinéticos demonstraram, no homem e no rato, que a metformina não se liga a proteínas plasmáticas e não é metabolizada, sendo excretada rapidamente na urina (SCHAFER, 1972; 1974; 1976 a, b; e 1983). As avaliações farmacodinâmicas realizadas em humanos diabéticos revelaram níveis plasmáticos máximos de metformina 1 a 2 horas após a

administração oral, sendo os níveis plasmáticos mantidos durante 4 a 5 horas. A metformina apresenta uma alta taxa de eliminação, com o pico de excreção urinária entre 1 e 3 horas após uma simples dose, e meia vida plasmática entre 1,5 e 4,5 horas (PENTIKAINEN et al., 1979; CASEY et al., 1979; TUCHER et al., 1979). A rápida excreção renal de metformina parece contribuir decisivamente para a ocorrência de poucos casos de acidose durante o tratamento (ROSSETTI, 1990)

Quanto à ação anti-hiperglicemiante exercida pela metformina, tem-se observado que ela induz elevação na captação de glicose pelos tecidos periféricos sem aumentar a secreção de insulina (PERRIELO et al., 1990). Porém, para que o efeito anti-hiperglicemiante se manifeste é preciso que insulina esteja presente. Outra característica importante da metformina é não induzir hipoglicemia, mesmo em indivíduos normoglicêmicos (WOOLEN & BAILEY, 1988; De FRONZO et al., 1991; BAILEY, 1992). Todavia, em altas concentrações, a metformina inibe a secreção de insulina induzida pela glicose em ilhotas de Langerhans isoladas de ratos (SCHATZ et al., 1972). Por outro lado, em ilhotas isoladas de porcos e ratos, o tratamento prévio com metformina exerceu efeito estimulante sobre a secreção de insulina induzida pela arginina (BOBBIONI et al., 1979). Atualmente é consenso entre muitos autores que a metformina em concentrações terapêuticas não estimula a secreção de insulina (SCHAFER, 1983).

A atividade anti-hiperglicemiante da metformina relaciona-se, principalmente à supressão da liberação hepática de glicose, redução da absorção intestinal de glicose, aumento da sensibilidade dos hepatócitos à insulina, e estimulação da captação de glicose por tecidos sensíveis ou não à insulina (PURRELLO et al, 1987;

CAMPBELL et al., 1988; De FRONZO, 1988; WOOLEY & BAILEY, 1988; BAILEY, 1992).

PÉNICAUD et al (1989), demonstraram que o trato digestivo é um dos sítios preferenciais de ação da metformina. Em ratos geneticamente obesos, metformina promoveu aumento da utilização de glicose pelo trato digestivo. Sugeriram que este efeito estaria relacionado à redução da glicemia decorrente do tratamento e, consequentemente, induziria a redução da insulinemia.

O tratamento com metformina também está relacionado com modificações no metabolismo lipídico. Em diabéticos tratados houve redução nas concentrações de colesterol plasmático e redução na incorporação do colesterol à parede aórtica, sugerindo um efeito protetor ao desenvolvimento de aterosclerose (SIRTORI et al., 1977; MARQUIE, 1978; GIACCHI & VATTI, 1981). RICCIO et al (1991) verificaram que o tratamento com metformina promove diminuição da oxidação dos ácidos graxos livres no fígado. Esta diminuição pode exercer menor efeito ativador alostérico das enzimas gliconeogênicas, restringindo a formação de ATP, que direciona a síntese "de novo" de glicose. Nos tecidos periféricos a metformina pode induzir redução na oxidação dos ácidos graxos favorecendo a oxidação da glicose, fato que se reflete na redução dos níveis de triglicerídeos plasmáticos e colesterol, como propuseram WU et al., 1990.

As avaliações da inter-relação entre a metformina e o receptor de insulina mostraram um aumento da afinidade do receptor sem induzir elevação em sua quantidade (HOLLE et al., 1981; COHEN et al., 1980; VIGNERI et al., 1982).

Classicamente se observa em tecidos hepáticos e extra-hepáticos de diabéticos alterações a nível pós-receptor da insulina, favorecendo a hipótese de que a metformina pode ser um coadjuvante no tratamento do diabetes mellitus, porque possivelmente atue sobre os mesmos mecanismos pós-receptor da insulina (OLEFSKY & REAVEN, 1977; KOLTERMAN et al., 1981; FOLEY et al., 1983).

Segundo LORD (1983), eritrócitos de ratos normais e camundongos obesos tratados com metformina apresentam elevação no número dos receptores de insulina. Por outro lado, tem-se verificado que a metformina não exerce efeito mensurável sobre a ligação da insulina ao receptor sugerindo que o principal efeito estaria vinculado a um sítio pós-receptor, sem afetar a ligação da insulina ao receptor (FANTUS & BROUSSEUR 1986; PURRELLO et al., 1988; SANTOS et al., 1995).

Os efeitos *in vitro* da metformina sobre a ligação da insulina ao seu receptor e sua fosforilação foram avaliados no fígado e eritrócitos humanos, revelando que 0,3 - 300 mg/ml de metformina não afeta estes parâmetros. Na concentração de 400 mg/ml verificou-se um aumento de 50% na fosforilação do receptor da insulina e na atividade da quinase ligada ao receptor sem afetar a ligação da insulina, demonstrando que a metformina exerce efeito a nível pós-receptor potencializando o sistema sinalizador da insulina a nível das quinases ou por eventos ligados à cascata de fosforilação iniciada pela insulina (PRAGER et al., 1986; LORD et al., 1985; HOLLE et al., 1981; FANTUS & BROUSSEAU, 1986).

O tratamento de adipócitos isolados de pacientes portadores de resistência a insulina com metformina mostrou aumento no transporte de 3-O-metilglicose

decorrente da potencialização na translocação dos transportadores de microssomas intracelulares sem, contudo, afetar a expressão gênica dos transportadores (MATTHAEI & GRETEN, 1991; YOA et al., 1993).

GALUSKA et al (1991), avaliaram o efeito de 0,1 mM de metformina, que corresponde à dose 10 x maior que a terapêutica, sobre a população de transportadores de glicose em músculo esquelético de diabéticos resistentes a insulina, constatando que a metformina aumenta a captação de glicose pelas fibras musculares, possivelmente alterando a atividade intrínseca dos transportadores ou recrutando mais transportadores de reservatórios citosólicos para a membrana plasmática.

KLIP et al (1992), avaliando o transporte de glicose em células musculares em cultura, demonstraram que metformina estimula a captação de 2-deoxiglicose e 3-O-metilglicose, cujo efeito se mostra tempo-dependente exibindo metade da estimulação máxima entre 5-6 horas e máxima capacidade em 18 horas. Possivelmente a ação da biguanida pode estar vinculada à translocação de transportadores GLUT4 constituindo a base para a redução da glicemia observada em diabéticos tratados.

Recentemente, ROSSETTI et al (1990) observaram, em ratos diabéticos tratados com metformina, elevação na atividade das proteínas quinase ligadas ao receptor da insulina, efeito que contribuiu para a melhoria da ação da insulina em tecidos sensíveis à insulina e pode ser eficiente no controle do desenvolvimento de macroangiopatias diabéticas.

WIDEN et al (1992), estudaram a ação da metformina sobre o metabolismo periférico da glicose em diabéticos, constatando que a metformina inibiu preferencialmente a oxidação da glicose, e pode interferir na fosforilação oxidativa das mitocôndrias, como sugerido por KLIP & LEITER (1990). Possivelmente a metformina também estimula a enzima glicogênio sintetase muscular favorecendo a formação de glicogênio.

Em humanos diabéticos, não dependente de insulina, sob tratamento com metformina, JACKSON et al (1987), verificaram que a metformina promovia uma pequena elevação na concentração plasmática de lactato, principalmente após as refeições, gerando uma pequena acidose pós-refeição. Sugeriram que a metformina estaria induzindo aumento na captação hepática de glicose e a subsequente metabolização até lactato. O remanescente poderia ser utilizado para sintetizar glicogênio através da via indireta proposta por KATZ & McGARRY (1984). Também NOSADINI et al (1987) atribuíram importância a esta via para a diminuição da hiperlactatemia.

Em camundongos diabéticos tratados com doses terapêuticas de metformina, foi demonstrado que ela não altera a oxidação de glicose pelo jejuno de ratos, porém aumenta a produção de lactato (WILCOCK & BAILEY, 1990; PÉNICAUD et al., 1989). O acúmulo máximo de metformina no jejuno é superior a $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, 30 minutos após uma dose de 50 mg/kg (WILCOCK & BAILEY, 1990). O intestino apresenta uma alta propensão ao metabolismo anaeróbico da glicose, podendo, portanto contribuir para o desenvolvimento de hiperlactatemia, particularmente durante o período absorptivo quando o metabolismo de glicose pelo intestino esta

elevado. Entretanto, não verificaram diferença na concentração de lactato na porção artério-venosa periférica, concluindo que o tratamento não induziu elevação na produção de lactato por tecidos periféricos.

Uma vez que a metformina requer a presença de insulina para exercer o seu efeito, sua associação com as sulfoniureias durante o tratamento de diabéticos tipo II tem sido promissora, reduzindo a concentração plasmática de glicose, de colesterol e triglicerídeos, reduzindo a glicosilação da hemoglobina, e contribuindo para diminuir o risco de desenvolvimento de arteriosclerose, além de refletir também na redução da pressão sistólica e diastólica (CAMPBELL , 1988; HAUPT et al., 1991; RICCIO et al., 1991).

A partir da observação de que a ação da metformina se fundamenta em induzir elevação na captação de glicose por tecidos insulina sensíveis, é importante verificar se ela interfere nas reservas eritrocitárias de glicogênio.

1.4) CAPITULO III

FENOBARBITAL

Em diabéticos, deficiências no metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídeos ocorrem nos tecidos que dependem de insulina para a captação de glicose (ROGNSTAD, 1991; JUNGGERMANN, 1992; LAMAIGUE & ROUSSEAU, 1994). É necessário corrigi-las para baixar a glicemia e/ou a insulinemia a níveis próximos do normal e, assim, prevenir o avanço das complicações do diabetes, melhorando a qualidade de vida do diabético.

A hiperglicemia característica do diabetes mellitus é acompanhada pela redução nas reservas hepáticas de glicogênio, seja pela relação glucagon / insulina que se encontra em altas concentrações no plasma, seja por alterações no sistema enzimático responsável pela síntese de glicogênio. RODRIGUEZ-GIL et al (1989), observou que as enzimas responsáveis pela síntese de glicogênio encontram-se inativas no fígado de diabéticos.

Como o metabolismo de drogas e de carboidratos estão associados, o indutor enzimático, fenobarbital, tem sido utilizado como coadjuvante para o tratamento do diabetes juntamente com sulfoniuréias, contribuindo para melhorar a utilização de glicose mediada por insulina (KARVONEN et al., 1989; LAHTELA et al., 1986) em virtude de seu efeito ativador sobre o sistema enzimático microsomal hepático.

O sistema enzimático microsomal está envolvido no metabolismo de uma variedade de drogas, esteróides e outros compostos endógenos e exógenos. Este sistema utiliza a NADPH-citocromo P450 redutase, o citocromo P450, e

fosfolipídeos (KAUFFMAN et al., 1977; CONNEY, 1984). A atividade do sistema microssomal depende de NADPH, fornecido pela atividade da G6PD, 6-fosfogluconato desidrogenase, da via da pentose fosfato, e por enzimas málicas citosólicas (THURMAN & KAUFFMAN, 1980).

As reações hepáticas oxidativas, são reguladas pela concentração de NADPH e uridina difosfato, cuja síntese depende do metabolismo dos carboidratos. Com a elevação na concentração citosólica deste fator, ocorre um aumento no fluxo de glicose pela via da pentose fosfato, aumento na utilização de carboidratos para a síntese de UDP glucoronato, e redução na produção de glicose por influência das enzimas málicas (KAUFFMAN et al., 1977)

O fenobarbital, foi eficiente para restabelecer as condições glicêmicas de humanos diabéticos (CONNEY, 1984; LAHTELA et al., 1984).

LAHTELA et al (1986), verificaram que a associação de fenobarbital e sulfoniluréia no tratamento de diabéticos não dependente de insulina, induziu uma melhora na sensibilidade à insulina e aumento no metabolismo da glicose. Esta melhora seria decorrente do aumento na utilização de glicose por tecidos periféricos e/ou pela redução na liberação hepática de glicose.

O tratamento com fenobarbital aumenta a ação da insulina no fígado e em tecidos periféricos, de ratos diabéticos. Paralelamente à melhora na utilização de glicose por tecidos periféricos, ocorreu também aumento na síntese de glicogênio, (VENKATESAN et al., 1994).

A associação de medicamentos tem sido de grande utilidade no tratamento do diabetes não dependente de insulina. Sulfoniluréias e fenobarbital associados

melhoraram a sensibilidade à insulina e estimularam o metabolismo de glicose (LAHTELA et al, 1986). *Per se*, fenobarbital, que é um indutor enzimático, promoveu a recuperação das reservas de glicogênio, comprometidas pelo diabetes, em fígado de ratos (VENKATESAN et al., 1994)

Considerando que o comprometimento enzimático induzido pelo diabetes, já observado em outros tecidos, também ocorre nos eritrócitos é sugestivo testar a hipótese de que o tratamento com o indutor enzimático fenobarbital pode auxiliar na recuperação das funções glicostáticas eritrocitárias.

2) OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese é estudar a participação dos eritrócitos na regulação da glicemia e suas relações com o metabolismo hepático de glicose em ratos normais e diabéticos.

Dentre estas, estudaremos a habilidade dos eritrócitos em incorporar glicose ou mobilizá-la de seu depósito de glicogênio nas seguintes condições :

- a) frente a variação da concentração extracelular de glicose.
- b) frente aos efeitos de situações indutoras de estresse, como jejum e exercício físico forçado.
- c) frente aos efeitos dos hormônios que participam do controle glicêmico.
- d) frente aos efeitos do tratamento com metformina ou fenobarbital sobre os reservatórios de glicogênio do fígado e dos eritrócitos em ratos normais e a recuperação destes reservatórios em ratos diabéticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS

Utilizamos ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, albinos, Wistar com idade variando de 3 a 4 meses fornecidos pelo Centro de Bioterismo, da UNICAMP. Os animais permaneceram no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica para adaptação, no mínimo duas semanas, sendo alimentados com ração (Purina para roedores) e água “ad libitum” e submetidos a ciclo fotoperiódico de 12 h claro e 12 h escuro (luz acesa às 06:00 h).

Antes de serem distribuídos entre os grupos experimentais, os seguintes parâmetros hematológicos: eritrometria, hematócrito, concentração de hemoglobina e glicemia, foram determinados para avaliar o estado de saúde dos animais. Os valores obtidos estavam de acordo com os estudos de HAWKEY et al. (1991) que desenvolveram um estudo comparativo do número, tamanho, forma e a concentração da hemoglobina dos eritrócitos de mamíferos, aves e répteis.

Os ratos foram selecionados formando grupos experimentais os quais foram mortos sempre no período da manhã, cerca de duas a três horas após a retirada do alimento.

3 . 2 - PROCEDIMENTOS

3.2.1 - GLICOGÊNIO EM ERITRÓCITOS.

AMOSTRAGEM PARA AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO *in vivo*

Após 30 minutos de anestesia (pentobarbital sódico 40 mg/Kg, IP), amostras de sangue foram coletadas da artéria femural, veia femural, ventrículo esquerdo, veia porta-hepática e da veia supra-hepática. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos e o plasma transferido para a determinação da glicemia.

Os eritrócitos foram lavados 2 vezes com solução salina 0,9% descartando-se a camada superficial onde se encontravam os leucócitos, procedimento comparável com os métodos usados para preparar eritrócitos para estudos metabólicos (BEUTER et al., 1976). Uma alíquota de 20 µl dos eritrócitos foi destinada a avaliação da hemoglobina e 200 µl de eritrócitos foram utilizados para a avaliação do teor de glicogênio.

3.2.2 - AMOSTRAGEM PARA AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO EM ERITRÓCITOS *in vitro*

Os ratos foram decapitados e o sangue coletado em um recipiente de 50 ml, sob gelo, contendo anticoagulante, formando um “pool” de células. O sangue coletado foi transferido para um tubo de ensaio e centrifugado durante 10 min a

2500 rpm. Após a centrifugação, uma camada superficial foi descartada para a retirada dos leucócitos, e alíquotas de 0,5 ml foram distribuídas em tubos de ensaio e submetidas a incubação durante 15 min a 37°C, na presença de diferentes concentrações de glicose e hormônios.

3.3 - INCUBAÇÃO DOS ERITRÓCITOS

A incubação foi realizada em banho maria a 37°C durante 15 minutos.

3.4 - EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO DOS ERITRÓCITOS

Foi utilizado o método de FARQUHARSON et al. (1990). Em suma, a uma alíquota de 200 µl de eritrócitos foi acrescentado 600 µl de ácido perclórico gelado e centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação foi adicionado 500 µl de propan-2-ol a 400 µl do sobrenadante para precipitar o glicogênio. O glicogênio precipitado foi posteriormente submetido a tratamento enzimático com amiloglucosidase (EC 3.2.1.3)¹, hexoquinase e G-6-PD (EC 1.1.1.49)¹, para conversão em glicose. Para cada série experimental uma curva padrão foi construída, sendo o glicogênio (Glycogen type IX²), submetido ao mesmo tratamento que as amostras. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 340 nm. Os valores foram expressos em µg. g⁻¹ de hemoglobina. A precisão do método é de 0,1 µg de glicogênio.

Boehringer Mannheim. ² Sigma (St Louis, MO)

3.5 - DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA

A hemoglobina foi avaliada por meio de um teste de aplicação laboratorial ³. Neste teste, o Fe^{++} do grupo heme da hemoglobina é oxidado para o estado férrico pelo ferricianeto, formando metahemoglobina, a qual se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de metahemoglobina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

3.6 - DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA

Para determinar a glicemia utilizamos o método enzimático colorimétrico⁴, segundo TRINDER (1969). Sob a ação da glicose oxidase a glicose é oxidada a ácido glucônico e água oxigenada. Na presença de peroxidase foi produzido um cromógeno vermelho cereja, cuja absorção máxima ocorre a 505 nm.

3.7- DETERMINAÇÃO DO HEMATÓCRITO

O hematócrito foi avaliado segundo a técnica do microhematócrito, após coleta do sangue em tubos capilares heparinizados.

³(LABTEST sistemas para diagnóstico). ⁴(Glicose E-Enzimática, CELM-REACTOCLIN).

3.8 - DETERMINAÇÃO DO LACTATO E PIRUVATO

O lactato e piruvato foram determinados conforme o método proposto por MARBACH & WEIL, (1967), utilizando "kit" para diagnósticos⁵. Após desproteinização do sangue total ou do plasma, pela passagem em ácido tricloroacético (10%), as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, durante 10 min. O sobrenadante foi submetido ao tratamento enzimático e a leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm.

⁵. (Lactato n° 826-UV; Piruvato n° 726-UV, Sigma, St.Louis, MO)

4 - AMOSTRAGEM PARA AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO

4.1 - FÍGADO

Ao final de cada condição experimental os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, 40 mg/Kg de peso corporal (Hypnol, Cristália, Itapira, SP) e o fígado foi removido e colocado em placa de Petri sobre gelo. Amostras de 200 a 500 mg cada foram coletadas 14 setores do fígado, conforme mostrado na figura 1, para estudar a distribuição do glicogênio intra e inter-lobular.

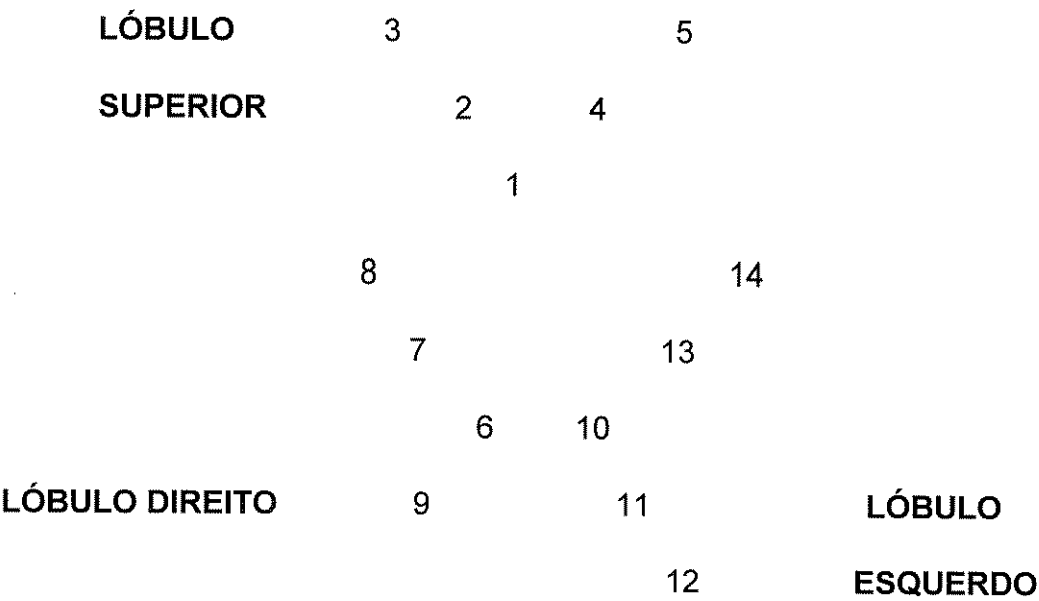


Figura 1 - ESBÔÇO DO FÍGADO MOSTRANDO A SUBDIVISÃO DOS LÓBULOS EM SETORES PARA A RETIRADA DAS AMOSTRAS.

4.2 - EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO

A extração e determinação do glicogênio hepático foi realizada segundo o método de SIU LO et al. (1970). As amostras do fígado foram digeridas em KOH 30%, a quente e o glicogênio foi precipitado após passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos. O glicogênio precipitado, foi submetido a hidrólise ácida na presença de fenol. A leitura foi realizada a 490 nm. Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

5 - INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS

Antes da indução da diabetes mellitus, os ratos foram mantidos em jejum por 24 horas com livre acesso a água. Após anestesia com éter, os ratos receberam uma injeção de aloxana em salina (40 mg/Kg de peso), através da veia peniana e depois foram mantidos em gaiolas individuais. O estabelecimento do diabetes foi verificado através da presença de glicose na urina. Na época da experimentação a glicemia variava de 200 - 300 mg.dl⁻¹.

6 - EXERCÍCIO FÍSICO

Os animais submetidos a natação, realizaram o exercício durante 50 minutos, em um tanque de vidro (100 cm x 80 cm X 50 cm), contendo água a 30°C.

7 - TRATAMENTO COM METFORMINA

Os grupos experimentais tratados com metformina receberam a droga na concentração final de $5,6 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ na água de beber durante 7 dias.

8 - TRATAMENTO COM FENOBARBITAL

Os grupos experimentais tratados com fenobarbital receberam a droga na concentração final de $0,5 \text{mg}.\text{ml}^{-1}$ na água de beber durante 10 dias.

9 - METABOLISMO DE GLICOSE NOS ERITRÓCITOS DE RATOS

A avaliação do metabolismo da glicose nos eritrócitos foi realizada segundo HARVEY & KANEKO (1976). Após decapitação, o sangue foi coletado e centrifugado (2500 rpm; 15 min a 4°C) e a camada superficial contendo leucócitos foi removida. Os eritrócitos remanescentes foram lavados duas vezes com Krebs - Ringer - bicarbonato, pH 7.4 e re-suspensos para hematócrito de 40 - 50%. Alíquotas de 200 μl desta suspensão foram transferidas para tubos hermeticamente fechados juntamente com 3 μl de glicose radioativa (^{14}C -U-Glicose) e incubadas a 37°C durante 90 min. Cada tubo continha uma tira de papel de filtro embebida em KOH a 20% para absorver o CO_2 formado. Ao final do período de incubação, foi adicionado ácido sulfúrico ao meio contendo as células e os tubos foram mantidos fechados sendo agitados manualmente por mais 1h para absorver o CO_2 liberado. Ao final, o papel de filtro foi transferido para um frasco contendo uma solução de cintilação contendo metanol e a radioatividade determinada em contador (Beckman

LS 6000TA, USA). O valor máximo de radiação (Max) foi medido em uma alíquota de 3 μ l de ^{14}C -U-Glicose, diluída em 1 ml de solução tampão após adição do líquido de cintilação. O consumo de glicose pelas ilhotas foi avaliado através da análise do $^{14}\text{CO}_2$ formado.

O fator F foi obtido pela seguinte equação :

$$F = \frac{\text{concentração do tampão}}{\text{n}^\circ \text{ de eritrócitos} \times \text{MAX}}$$

Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}^{-1} \cdot \text{ml}$ de eritrócitos.

Para determinar o consumo de glicose, eritrócitos foram incubados durante 1 h e 30 min a 37°C em Krebs - Ringer - bicarbonato, pH 7.4, sendo posteriormente determinada a concentração de glicose remanescente no meio. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ml}$ de eritrócitos.

10) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar as diferenças artério-venosa e veias porta supra-hepática foi utilizado o teste "t" de Student pareado, enquanto para determinar a diferença entre os grupos experimentais foi utilizado ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico de 5% ($p < 0,05$).

As relações entre o conteúdo eritrocitário de glicogênio e as variações da glicemia foram avaliadas através da correlação.

Nos estudos *in vitro*, o conteúdo de glicogênio nos eritrócitos foi avaliado em função da variação da concentração de glicose. A correlação (R) e a regressão linear foram determinadas pelo método dos mínimos quadrados na forma

$Y = a + b X$, onde Y = é a concentração de glicogênio; X = é a concentração de glicose; a = é a interseção com a ordenada e b = corresponde à inclinação da curva.

A significância da diferença entre dois coeficientes de correlação ou de regressão foi realizado conforme especificado no Documenta Geigy Scientific Tables.

4. RESULTADOS

RESULTADOS

CAPÍTULO I:

CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO EM ERITRÓCITOS E CORRELAÇÃO COM A GLICEMIA DE RATOS ADULTOS

A) GLICOGÊNIO EM ERITRÓCITOS E GLICEMIA EM SETORES DO LEITO VASCULAR

A tabela I mostra os valores da glicemia e da concentração de glicogênio eritrocitário em cinco setores do leito vascular: artéria e veia femural, veias porta e supra-hepática e ventrículo esquerdo de ratos adultos durante o período pós-prandial.

A glicemia medida nas femurais mostra uma diferença artério-venosa de 25,4%, sendo maiores os valores obtidos no ramo arterial. Esta diferença correspondeu à utilização de glicose no membro posterior esquerdo do rato. Também, como esperado, houve diferença entre as glicemias da veia porta e da supra-hepática, sendo maior a concentração na veia supra-hepática em virtude da liberação de glicose pelo fígado. No ventrículo a glicemia não diferiu da supra-hepática e nem da artéria femural ($P > 0,1$).

Para avaliar se os eritrócitos participam na homeostasia da glicose, como armazenador e transportador de glicose, o conteúdo de glicogênio em eritrócitos foi quantificado no sangue coletado nos quatro setores do leito vascular e no ventrículo esquerdo.

As reservas eritrocitárias de glicogênio variaram conforme a região de coleta registrando-se diferença de 16,7% ($P < 0,01$) entre a artéria e a veia femural e de 28% entre a veia supra-hepática e a veia porta ($P < 0,01$). A diferença artério-venosa observada poderia estar relacionada à mobilização do glicogênio dos eritrócitos em condições em que a glicemia diminuiu (veia femural). Esta correspondeu à diferença glicêmica entre as femurais de 25,4%. O conteúdo de glicogênio, que na veia porta não diferiu da veia femural, aumentou 28 % após a passagem do sangue pelo fígado, indicando ter havido carga de glicose e síntese de glicogênio nos eritrócitos neste interim. Esta recuperação do conteúdo de glicogênio ocorreu no período em que o fígado liberou glicose, uma vez que a concentração plasmática de glicose na veia supra-hepática foi 56,3% maior que na veia porta ($P < 0,01$). A concentração de glicogênio medida nos cinco setores do leito vascular mostrou alta correlação com a glicemia ($r = 0,794$). O conteúdo de glicogênio dos eritrócitos coletados no ventrículo esquerdo não diferiu daquele observado na supra-hepática, mesmo considerando que há uma mistura com o sangue que provém da cabeça e dos membros superiores.

Tabela I: Concentração de glicogênio eritrocitário ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{ Hb}$) e de glicose plasmática (mg.dl^{-1}) no leito vascular de ratos adultos no período pós-prandial.

Os valores representam médias $\pm$ E.P.M, $n = 4$. A significância estatística entre os pares artéria e veia femurais e entre veias porta e supra-hepática foi estimada através de teste “t” pareado. *, $P < 0,05$ na comparação entre as femurais artéria e veia e #, $P < 0,05$ na comparação entre a veia porta e a supra-hepática.

SETORES	GLICOGÊNIO ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{ Hb}$)	GLICOSE (mg.dl^{-1})
VENTRÍCULO ESQUERDO	44,62 $\pm$ 0,8	96,42 $\pm$ 5,8
ARTÉRIA FEMURAL	44,23 $\pm$ 0,1	97,42 $\pm$ 1,2
VEIA FEMURAL	36,82 $\pm$ 1,0 *	72,62 $\pm$ 3,4 *
VEIA PORTA	38,10 $\pm$ 0,9	71,11 $\pm$ 4,3
VEIA SUPRA-HEPÁTICA	48,96 $\pm$ 1,4 #	111,21 $\pm$ 4,3 #

B) EFEITO DO JEJUM E DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO EM ERITRÓCITOS E SUA CORRELAÇÃO COM A GLICEMIA EM QUATRO SETORES DO LEITO VASCULAR

B 1 - JEJUM

Uma vez que o conteúdo de glicogênio eritrocitário e de glicose plasmática nos setores estudados estavam altamente correlacionados, estudamos os efeitos causados sobre estes parâmetros pelo jejum (24 e 48 h) e pela atividade física forçada (natação durante 50 min, uma única vez), condições estressoras que induzem alterações no metabolismo de carboidratos (tabelas II e III).

Como é conhecido, o jejum é uma condição de intensa mobilização das reservas energéticas, em especial, as de glicose. A mobilização destas reservas é ainda mais acentuada durante o exercício físico forçado.

Após 24 h de jejum, não há diferença na concentração de glicose entre artéria e veia femural ($P > 0,1$). Porém, a concentração de glicose na veia supra-hepática foi 61% maior que na veia porta ($P < 0,05$). Durante o jejum de 48 h observamos uma diferença da glicemia artério-venosa de 39,2%, ($P < 0,01$). Por outro lado, a glicemia da supra-hepática foi 43% maior que na veia porta ($P < 0,01$).

B 2 - EXERCÍCIO FÍSICO

No grupo de ratos submetidos à atividade física forçada a glicemia foi maior que a do grupo controle ($P < 0,01$), não sendo mostrada diferença entre as femurais. Porém, a glicemia da veia supra-hepática foi 50,7% maior que na veia porta, típica de uma condição mobilizadora das reservas hepáticas de glicose ($P < 0,01$).

Tabela II - Efeito do jejum e de exercício sobre a concentração de glicose plasmática (mg.dl⁻¹) de ratos adultos.

Os dados do grupo controle são os mesmos da tabela I. Os valores representam as médias $\pm$ E.P.M, n = 4.

A significância estatística da diferença entre os grupos foi estimada através da análise de variância seguida pelo teste de Tukey. A significância entre os pares artéria e veia femurais e entre veias porta e supra-hepática foi estimada através de teste "t" pareado. O limite de significância foi de 5% para todos os testes. (*) P < 0,05 = diferença entre as femurais (artéria e veia), (#) P < 0,05 = diferença entre a veia porta e a supra-hepática, (a) P < 0,05 = diferença em relação ao grupo controle.

SETORES	CONTROLE	JEJUM 24h	JEJUM 48h	NATAÇÃO
ARTÉRIA FEMURAL	97,42 $\pm$ 1,2	102,71 $\pm$ 3,6	94,75 $\pm$ 10	277,92 $\pm$ 32 ^a
VEIA FEMURAL	72,62 $\pm$ 3,4 *	86,48 $\pm$ 9,4	57,59 $\pm$ 2,6 * ^a	241,43 $\pm$ 27 ^a
VEIA PORTA	71,11 $\pm$ 4,3	65,45 $\pm$ 0,9	73,62 $\pm$ 6,2	224,53 $\pm$ 17 ^a
V. SUPRA-HEPÁTICA	111,21 $\pm$ 4,3 [#]	105,60 $\pm$ 13 [#]	105,32 $\pm$ 1,5 [#]	338,38 $\pm$ 14 ^{#a}

O jejum de 24 h e a natação provocaram intensa depleção no conteúdo de glicogênio eritrocitário. No jejum de 48 h houve recuperação parcial deste conteúdo.

Durante o jejum de 24 h o conteúdo de glicogênio eritrocitário foi reduzido a 93,2% e 96,6% nas femurais, artéria e veia, respectivamente e 94,2% e 82,3% nas veias porta e supra-hepática, respectivamente ($P < 0,01$). Todavia, ainda persistiu diferença entre os pares de vasos sanguíneos, sendo 59% entre artéria e a veia femural e 294,5% entre a veia porta e a supra-hepática ($P < 0,01$). Nos ratos em jejum durante 24 h não houve correlação entre a concentração de glicose plasmática e as reservas de glicogênio ($r = 0,07$).

Em ratos submetidos a jejum de 48 h, as reservas de glicogênio eritrocitárias foram menores que as observadas no controle ($P < 0,01$), porém, maiores que as observadas em jejum de 24 h ($P < 0,01$). Esta recuperação foi paralela à ocorrida no fígado, tal como mostrado na tabela VII e está de acordo com observações de outros autores (GOLDSTEIN & CURNOW, 1978). Nossos resultados mostraram similaridade entre as funções dos eritrócitos e hepatócitos quanto à capacidade de sintetizar e depletar as reservas de glicogênio. Após 48 h de jejum o conteúdo de glicogênio dos eritrócitos na artéria femural foi 43,6% maior que na veia femural, enquanto aqueles

colhidos na veia supra-hepática apresentaram reservas 54,3% maiores que os coletados na veia porta. Devido à recuperação parcial das reservas hepáticas de glicogênio, houve boa correlação ($r = 0,691$) entre a concentração de glicogênio eritrocitário e a glicemia nos setores estudados.

O estresse por atividade física forçada depletou as reservas de glicogênio dos eritrócitos de maneira tão intensa quanto o jejum de 24 horas, desaparecendo a diferença entre os setores analisados que fora constatada em ratos controle. Como consequência, a concentração de glicogênio eritrocitário e a glicemia apresentaram correlação muito baixa ($r = 0,202$).

Tabela III - Efeito do jejum e do exercício sobre a concentração de glicogênio em eritrócitos ($\mu\text{g. g}^{-1}\text{Hb}$) em ratos adultos.

Os dados do grupo controle são os mesmos da tabela I e os valores representam as médias $\pm$ E.P.M, $n = 4$. A significância estatística da diferença entre os grupos experimentais foi estimada através da análise de variância seguida pelo teste de Tukey, (a) $P < 0,05$ na comparação dos grupos experimentais com o controle. A significância entre os pares artéria e veia femurais e entre veias porta e supra-hepática foi estimada através de teste “t” de Student pareado.

(*) $P < 0,05$ na diferença entre as femurais (artéria x veia), (#) $P < 0,05$ na comparação entre a veia porta e a veia supra-hepática, após teste “t”.

GRUPOS	CONTROLE	JEJUM 24h	JEJUM 48h	NATAÇÃO
ARTÉRIA FEMURAL	44,23 $\pm$ 0,1	2,98 $\pm$ 0,4 ^{a a}	18,88 $\pm$ 2,8 ^a	1,92 $\pm$ 0,3 ^a
VEIA FEMURAL	36,82 $\pm$ 1,0 *	1,22 $\pm$ 0,1 * ^a	10,64 $\pm$ 1,6 * ^a	1,58 $\pm$ 0,1 ^a
VEIA PORTA	38,10 $\pm$ 0,9	2,19 $\pm$ 0,03 ^a	8,92 $\pm$ 1,9 ^a	2,16 $\pm$ 0,1 ^a
V. SUPRA-HEPÁTICA	48,96 $\pm$ 1,4 #	8,64 $\pm$ 2,0 # ^a	19,52 $\pm$ 3,0 # ^a	1,77 $\pm$ 0,2 ^a

CAPÍTULO II:

EFEITO DAS VARIAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, DE HORMÔNIOS HIPERGLICEMIANTES E DE INSULINA SOBRE AS RESERVAS ERITROCITÁRIAS DE GLICOGÊNIO *IN VITRO*.

A) EFEITO DA CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR DE GLICOSE SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO EM ERITRÓCITOS DE RATOS ADULTOS *IN VITRO*

Os estudos realizados *in vivo* mostraram haver correlação entre a glicemia e o conteúdo de glicogênio nos eritrócitos em ratos normais, sugerindo que podem armazenar e liberar glicose enquanto circulam no organismo. Ademais, alterações induzidas no metabolismo, como no jejum e atividade física forçada, também afetaram sua capacidade armazenadora, provavelmente mobilizando seu glicogênio quando baixou a glicemia ou sob efeito de hormônios hiperglicemiantes.

Para demonstrar que os eritrócitos participam da homeostasia glicêmica é necessário demonstrar que são capazes de acumular glicogênio quando a glicemia se eleva acima dos níveis normoglicêmicos e depletá-lo quando em hipoglicemia.

Para os estudos de carga (isto é, capacidade de síntese de glicogênio) foram utilizados eritrócitos de ratos adultos que continham $16,56 \pm 2,4 \mu\text{g. g}^{-1}$ Hb de glicogênio em concentração de glicose plasmática de $89,11 \pm 6,7 \text{ mg.dl}^{-1}$. Na ausência de glicose ou na presença de 40 mg.dl^{-1} os eritrócitos reduziram suas reservas de glicogênio em 96,4% e 33,7% respectivamente ($P < 0,05$). Por outro lado, os eritrócitos incubados em salina contendo de 120 a 240 mg.dl^{-1} de glicose apresentaram elevação no conteúdo de glicogênio variando de 30,6% até 138,11% ($P < 0,05$) (tabela IV).

A capacidade de descarga (mobilização) das reservas eritrocitárias de glicogênio foi estudada em eritrócitos de ratos controle (glicemia $80,96 \pm 1,5 \text{ mg.dl}^{-1}$) cuja reserva original de glicogênio era $18,90 \pm 0,5 \mu\text{g. g}^{-1}$ Hb. Após incubação durante 15 minutos a 37°C na presença de 240 mg.dl^{-1} de glicose o conteúdo de glicogênio aumentou 57% ($P < 0,05$). Naqueles eritrócitos re-incubados em concentrações de glicose igual a 160 mg.dl^{-1} ou menor, houve progressiva redução no conteúdo de glicogênio em 50,7%, 45,9%, 58,2%, 94,9%, 98,1%, quando comparado a condição 240 mg.dl^{-1} ($P < 0,05$).

Tabela IV: Efeito da concentração de glicose sobre a concentração de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{Hb}$) de eritrócitos de ratos adultos *in vitro*.

Glicogênio (médias $\pm$ E.P.M, $n = 4$) foi determinado em eritrócitos após incubação em solução salina (NaCl 0,9%) durante 15 min a 37°C. No grupo descarga, os eritrócitos foram inicialmente incubados em salina contendo 240 mg.dl^{-1} de glicose nas condições descritas acima e a seguir re-incubados em soluções contendo outras concentrações de glicose. A análise estatística foi feita através da análise da curva de regressão linear contidas nas figuras 2a e 2b.

CARGA		DESCARGA	
GLICOSE mg.dl^{-1}	GLICOGÊNIO $\mu\text{g.g}^{-1}\text{Hb}$	GLICOSE mg.dl^{-1}	GLICOGÊNIO $\mu\text{g.g}^{-1}\text{Hb}$
NIHIL	0,52 $\pm$ 0,05	240	29,77 $\pm$ 5,8
40	9,72 $\pm$ 3,5	200	22,60 $\pm$ 5,5
80	13,72 $\pm$ 0,7	160	12,61 $\pm$ 2,1
120	21,52 $\pm$ 0,3	120	9,10 $\pm$ 2,2
160	21,75 $\pm$ 1,4	80	7,35 $\pm$ 1,0
200	24,64 $\pm$ 0,8	40	1,49 $\pm$ 0,2
240	34,67 $\pm$ 0,8	NIHIL	0,55 $\pm$ 0,2

A dependência do conteúdo de glicogênio dos eritrócitos em relação à concentração de glicose do meio extracelular pode ser melhor representada na figura 2a, pelas curvas de regressão linear calculadas a partir dos valores mostrados na tabela IV. A curva de regressão linear que descreve a carga de glicogênio nas condições estudadas pode ser descrita pela equação: $Y = 3,04 + 0,125 X$; onde, Y corresponde à concentração de glicogênio eritrocitário e X corresponde à concentração de glicose do meio de incubação, com elevada correlação, $r = 0,942$. Forte correlação, $r = 0,835$, também foi observada no experimento de descarga, sendo a curva de regressão descrita pela equação: $Y = 2,497 - 0,121 X$ (figura 2b). A comparação entre a inclinação das curvas de regressão obtidas no estudo de carga e na descarga não mostrou diferença ($t=0,48$).

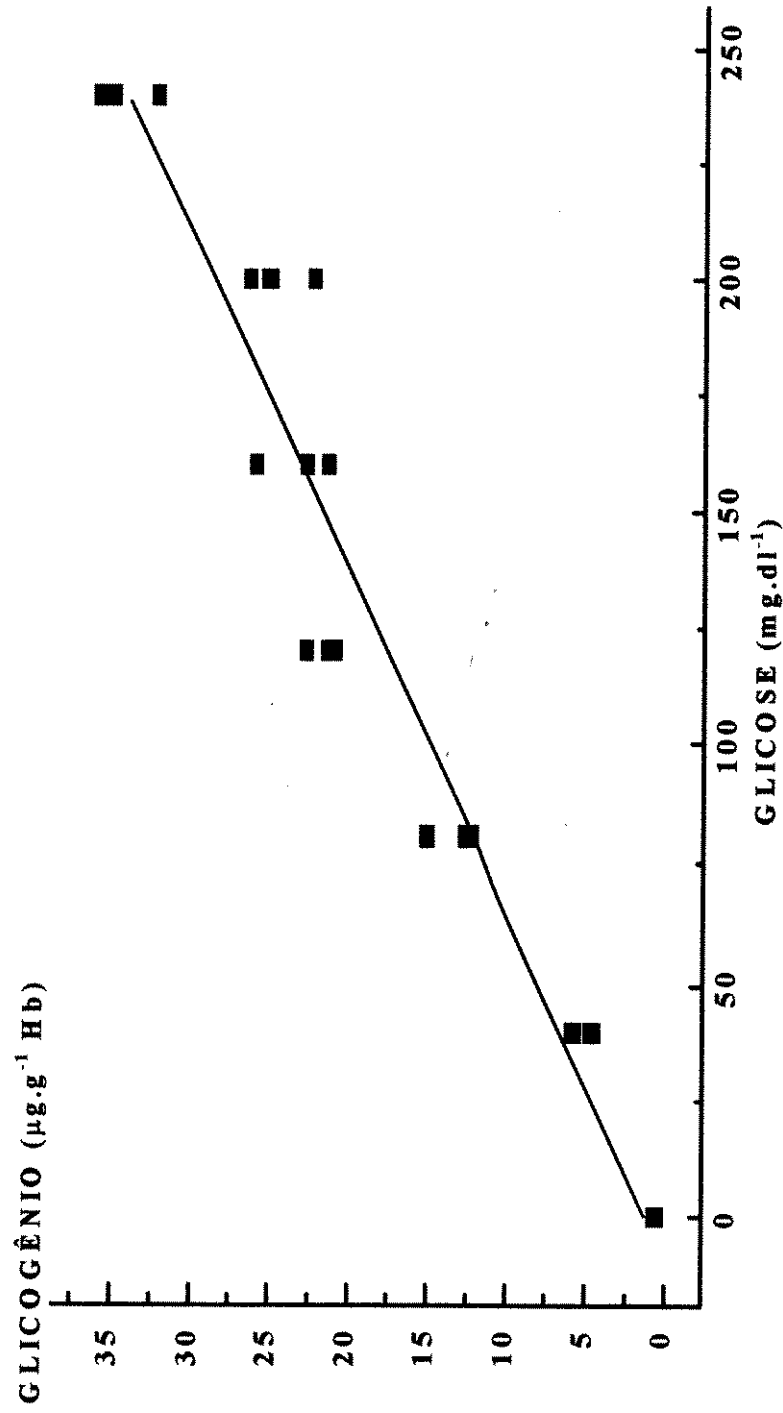


Figura 2a : Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{Hb}$) em eritrócitos de ratos incubados na presença de diferentes concentrações de glicose (mg.dl^{-1}). A curva foi construída a partir dos valores contidos na tabela IV (carga).

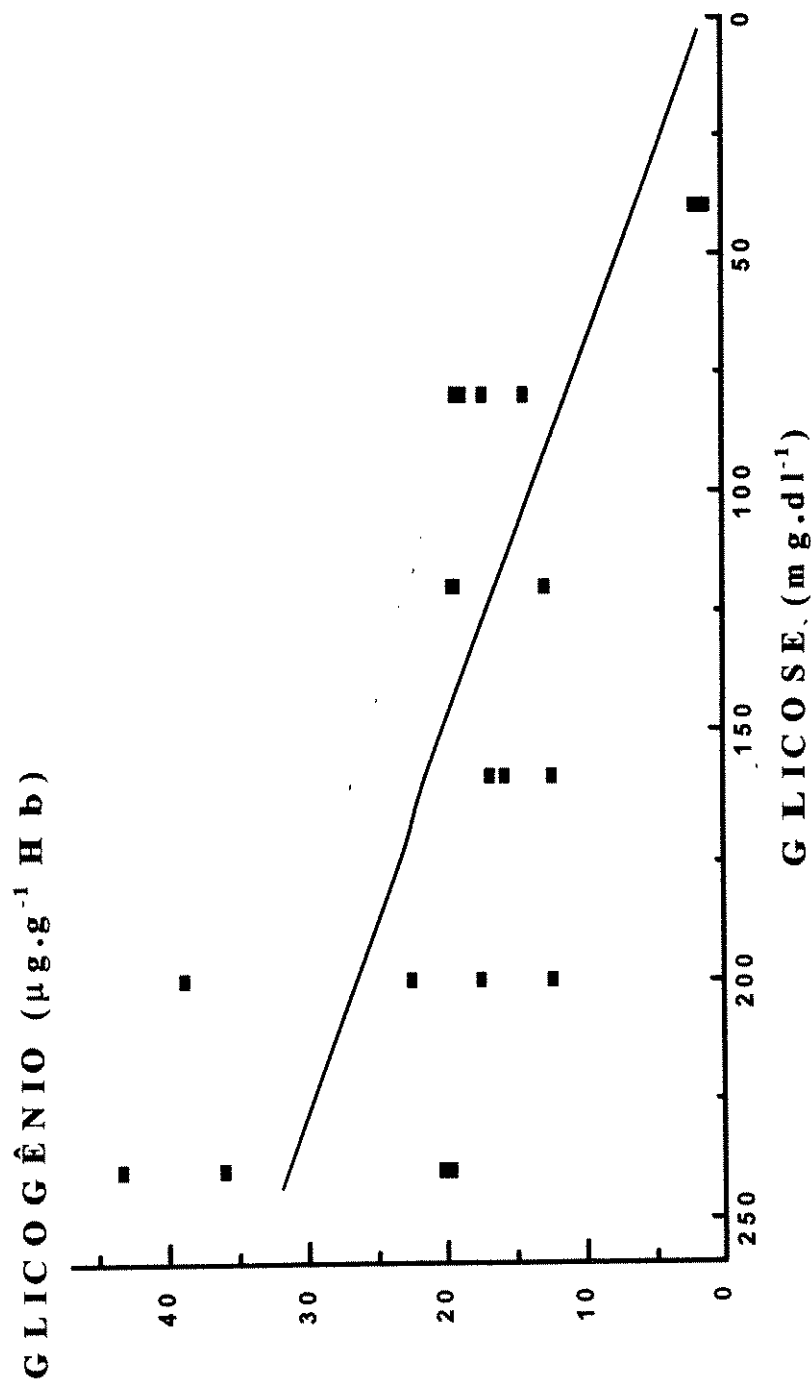


Figura 2b : Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{ Hb}$) em eritrócitos de ratos controle pré-incubados na presença de 240 mg.dl^{-1} de glicose e re-incubados na presença de diferentes concentrações de glicose (descarga). Curva de regressão construída a partir dos valores contidos na tabela IV.

B) ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO DA AÇÃO DE HORMÔNIOS GLICOGENOLÍTICOS E INSULINA SOBRE A MOBILIZAÇÃO DAS RESERVAS DE GLICOGÊNIO DE ERITRÓCITOS DE RATOS NORMAIS INCUBADOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE.

Durante o jejum e exercício físico, aumenta a secreção dos hormônios: noradrenalina, adrenalina, glucagon e corticosteróides os quais promovem a mobilização das reservas energéticas e instituem um novo padrão metabólico nos tecidos (SOTSKY et al, 1989). Por isso, avaliamos, *in vitro*, os efeitos destes hormônios sobre os eritrócitos.

A tabela A1(anexo) e as figuras 3a e 3b mostram os efeitos, *in vitro*, dos hormônios glicogenolíticos e de insulina sobre as reservas eritrocitárias de glicogênio em células incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose.

Eritrócitos incubados na presença de adrenalina (200 ng.ml^{-1}) apresentaram depleção das reservas de glicogênio, de forma independente da concentração de glicose do meio. A curva de regressão (figura 3a) para os dados da tabela 5 : $Y = 0,871 + 0,002 X$, mostra uma correlação muito baixa ($r = 0,20$) entre a concentração eritrocitária de glicogênio e de glicose no meio de incubação. Esta curva de regressão difere significativamente da curva de regressão controle ($t = 13,7$; $P < 0,01$).

O mesmo efeito foi observado nos eritrócitos incubados na presença de noradrenalina (200 ng.ml^{-1}) que apresentaram correlação muito baixa, $r = 0,062$, entre a concentração de glicogênio e de glicose no meio de incubação. A curva de regressão, $Y = 0,634 + 0,008 X$ representa a distribuição dos valores obtidos diferindo significativamente da curva controle ($t = 10,5$; $P < 0,01$).

A membrana de eritrócitos possui receptores β_2 -adrenérgicos que estão associados com a mobilização de glicogênio do eritrócito, à semelhança de hepatócitos (BECKMAN & HOLLEMBERG, 1979). *In vitro*, propranolol (200 ng.ml^{-1}) não inibiu o efeito da adrenalina. No entanto, 400 ng.ml^{-1} de propranolol inibiu parcialmente o efeito da adrenalina. O efeito remanescente da adrenalina é descrito pela equação $Y = 5,25 + 0,058 X$; mostrando aumento da correlação ($r = 0,733$) entre a concentração de glicogênio e de glicose do meio (figura 3a), todavia ainda diferindo da curva controle ($t = 5,00$; $P < 0,01$).

Depleção das reservas de glicogênio também foi observada nos eritrócitos incubados na presença de corticosterona e de glucagon. Corticosterona ($22 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$) provocou depleção de 95%, independente da concentração de glicose do meio ($r = 0,008$). A curva de regressão: $Y = 0,923$

+ 0,0001 X descreve a relação entre estes parâmetros (figura 3b), diferindo do controle ($t=14,2$; $P < 0,01$).

Apesar dos eritrócitos incubados na presença de glucagon (tabela A1 em anexo e figura 3b) também terem apresentado depleção das reservas de glicogênio, a redução de 53,3% a 78,6% foi menor que a ocorrida em presença dos outros hormônios glicogenolíticos estudados. A equação: $Y = 4,4 + 0,006 X$ que descreve este efeito esta representada na figura 2b e mostra também a baixa correlação ($r = 0,158$) entre a concentração de glicose do meio extracelular e o conteúdo de glicogênio dos eritrócitos. A curva de regressão observada na presença de glucagon é diferente da curva de regressão controle ($t=10,57$; $P < 0,01$).

Em oposição aos hormônios glicogenolíticos, a insulina não influencia na capacidade dos eritrócitos em reservar glicogênio (tabela A1 em anexo). Os eritrócitos incubados na presença de diferentes concentrações de glicose e insulina manifestaram mudanças nas reservas de glicogênio, similares as observadas na ausência da insulina. A correlação entre a concentração de glicogênio e a glicose do meio é alta ($r = 0,927$) e a curva de regressão descrita pela equação: $Y = 1,799 + 0,179 X$; não difere dos resultados obtidos na ausência de insulina (figura 3b ; $t=1,47$, $P>0,1$).

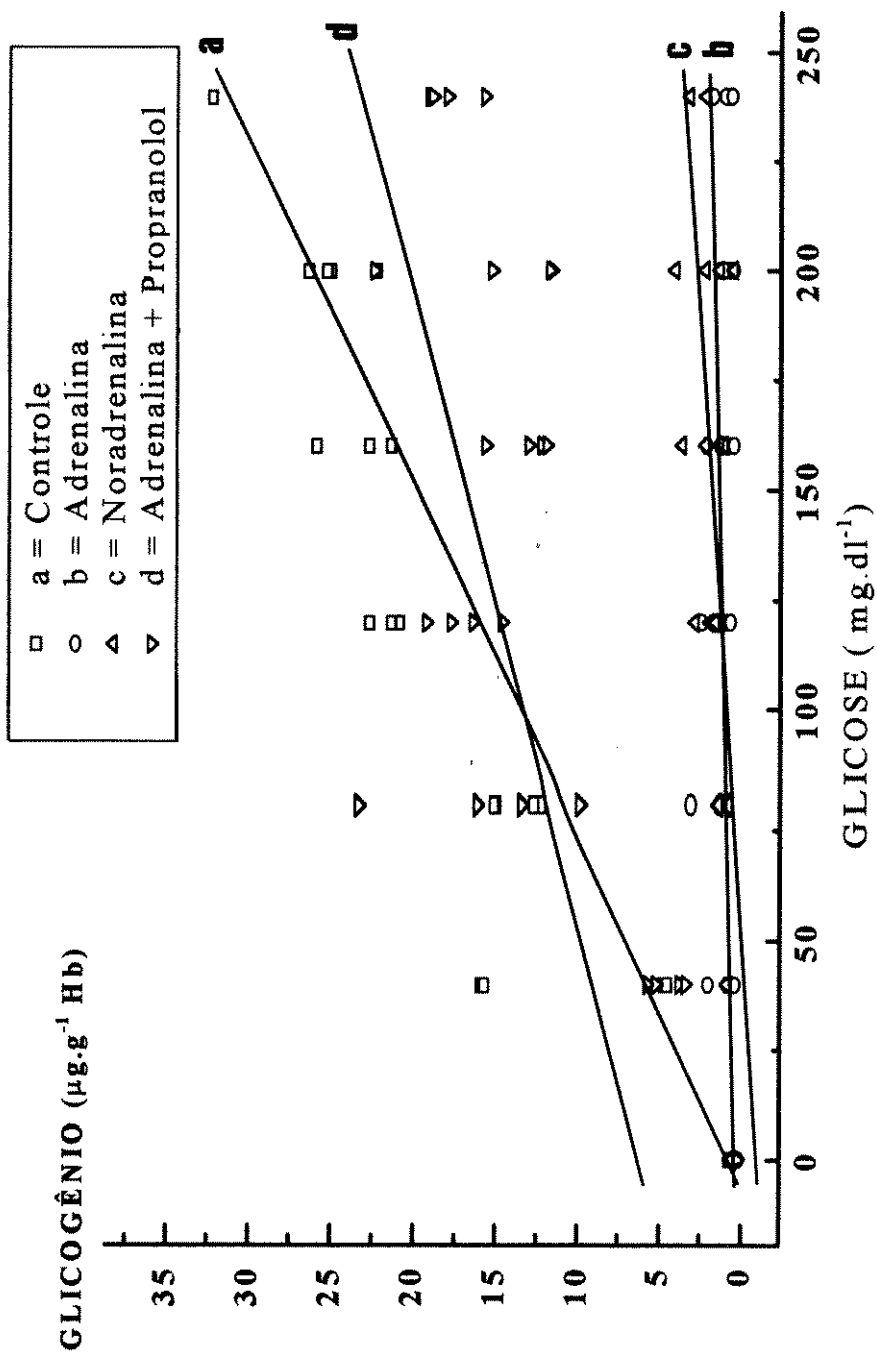


Figura 3a : Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb) em eritrócitos de ratos e a variação da concentração de glicose (mg.dl^{-1}) na presença de diferentes hormônios. A curva de regressão foi construída a partir da tabela A1 (anexo).

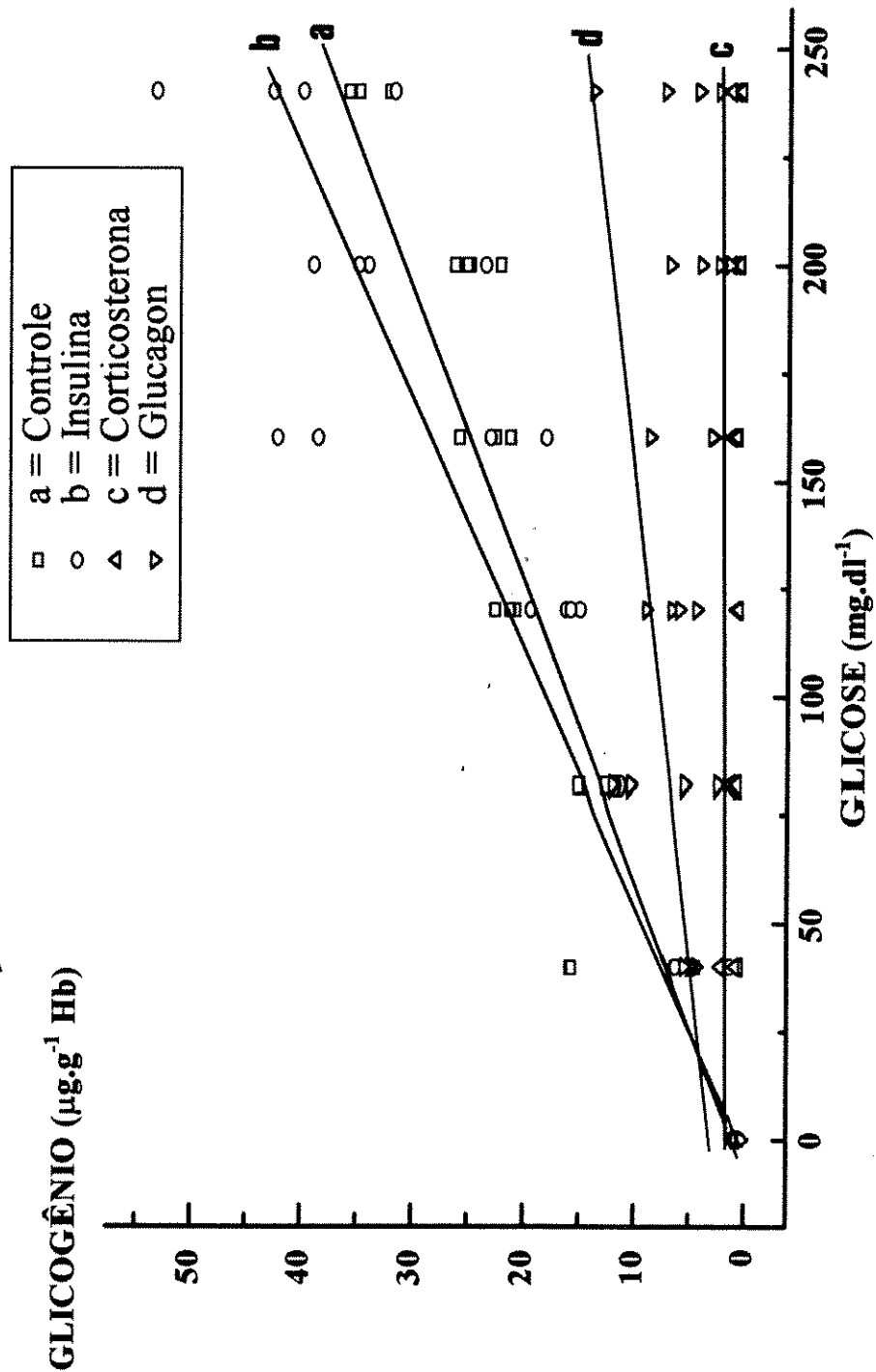


Figura 3b : Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1} \text{Hb}$) em eritrócitos de ratos e a variação da concentração de glicose (mg.dl^{-1}) na presença de diferentes hormônios. A curva de regressão foi construída a partir da tabela A1 (anexo).

CAPÍTULO III:

A) CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO EM ERITRÓCITOS DE RATOS DIABÉTICOS POR ALOXANA.

Observamos que em situações de estresse ocorreram alterações importantes nas reservas eritrocitárias de glicogênio e simultaneamente desapareceu a correlação entre esta reserva e a concentração de glicose plasmática. No diabetes mellitus, a glicemia de jejum e a pós-absortiva permanecem elevadas como consequência das alterações metabólicas decorrentes da redução ou falta de insulina e/ou resistência à ação da insulina. Por isso, estudamos os efeitos do diabetes provocado por aloxana sobre o conteúdo de glicogênio em eritrócitos de ratos.

A tabela V, mostra que os eritrócitos de ratos diabéticos por aloxana, apresentaram um comprometimento na capacidade de sintetizar glicogênio ($P < 0,01$). A capacidade dos eritrócitos armazenarem glicogênio em presença de alta concentração de glicose plasmática ($r = 0,006$) foi perdida em decorrência do diabetes.

Tabela V - Concentração de glicogênio de eritrócitos ($\mu\text{g. g}^{-1}$ Hb) de ratos controle e diabéticos por aloxana tratados ou não com metformina ($5.6\mu\text{g.ml}^{-1}$) no período pós - prandial.

Os dados do grupo controle são os mesmos da tabela I. Os Valores representam as médias $\pm$ E.P.M, $n = 4$. A significância estatística da diferença entre os grupos foi estimada através da análise de variância seguida pelo teste de Tukey, (a) $P < 0,05$ = na comparação com o grupo controle; (b) $P < 0,05$ = na comparação entre os grupos diabéticos. A significância entre os pares artéria e veia femurais e entre as veias porta e supra-hepática foi estimada através de teste "t" de Student pareado, (*) $P < 0,05$ = diferença entre a artéria e a veia femural; (#) $P < 0,05$ = diferença entre a veia porta e a veia supra-hepática.

GRUPOS SETORES	CONTROLE	CONTROLE TRATADO	DIABÉTICO	DIABÉTICO TRATADO
ARTÉRIA FEMURAL	$44,23 \pm 0,1$	$50,55 \pm 4,3$	$10,36 \pm 0,1^a$	$36,05 \pm 1,7^{ab}$
VEIA FEMURAL	$36,82 \pm 1,0^*$	$40,27 \pm 3,3$	$9,18 \pm 2,0^a$	$10,56 \pm 1,7^{*a}$
VEIA PORTA	$38,10 \pm 0,9$	$42,81 \pm 0,5$	$11,53 \pm 2,2^a$	$11,50 \pm 2,4^a$
V.SUPRA- HEPÁTICA	$48,96 \pm 1,4^\#$	$51,74 \pm 2,3$	$10,92 \pm 1,0^a$	$32,85 \pm 3,6^{\#ab}$

B) EFEITOS DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOBRE AS RESERVAS DE GLICOGÊNIO DE ERITRÓCITOS E FÍGADO EM RATOS NORMAIS E DIABÉTICOS.

Tendo em vista que os eritrócitos de ratos diabéticos tiveram sua capacidade de sintetizar glicogênio comprometida, examinamos os efeitos do tratamento com metformina, uma substância anti-hiperglicemiante, sobre a glicemia e o glicogênio eritrocitário de ratos normais e diabéticos (tabela V e VI). O tratamento de ratos controle com metformina não promoveu modificações no conteúdo eritrocitário de glicogênio, exceto na veia porta. Todavia, provocou aumento de 18% e 35% ($P < 0,05$) da glicemia na veia femural e na veia porta no grupo controle tratado (tabela VI).

Em ratos diabéticos por aloxana, o tratamento com metformina (tabela V), restabeleceu parcialmente a capacidade dos eritrócitos acumularem glicogênio ($P < 0,01$). Tanto a captação de glicose pelos eritrócitos ao passar pelo parênquima hepático, quanto a capacidade de distribuir glicose aos tecidos foram restabelecidas pelo tratamento. Foram restabelecidas as diferenças entre as femurais (241%, $P < 0,01$), e entre as veias porta e supra-hepática (185%, $P < 0,01$). Por sua vez, a glicemia também foi reduzida no grupo diabético tratado com metformina, retornando as diferenças entre os

pares de vasos estudados ($r = 0,95$, $P < 0,05$) (tabela VI), embora permanecendo acima dos valores do grupo controle.

Tabela VI - Efeito da metformina sobre a concentração plasmática de glicose (mg.dl^{-1}) no período pós - prandial em ratos controle e diabéticos por aloxana.

Os dados do grupo controle são os mesmos da tabela I. Os valores representam as médias $\pm$ E.P.M, $n = 4$. Metformina (concentração final, $5.6 \mu\text{g.ml}^{-1}$) foi administrada na água de beber. A significância estatística da diferença entre os grupos foi estimada através da análise de variância seguida pelo teste de Tukey, (a) $P < 0,05$ = diferença em relação ao grupo controle; (b) $P < 0,05$ = diferença entre os grupos diabéticos. A significância entre os pares artéria e veia femurais e entre as veias porta e supra-hepática foi estimada através de teste "t" pareado, com limite de significância de 5%. * $P < 0,05$ = diferença entre as femurais, # $P < 0,05$ = diferença entre veia porta ea supra-hepática

GRUPOS	CONTROLE	CONTROLE TRATADO	DIABÉTICO	DIABÉTICO TRATADO
ARTÉRIA FEMURAL	97,42 $\pm$ 1,2	90,16 $\pm$ 3,9	344,64 $\pm$ 23 ^{a b}	303,73 $\pm$ 1,5 ^a
VEIA FEMURAL	72,62 $\pm$ 3,4*	85,77 $\pm$ 3,8 *	320,07 $\pm$ 11 ^a	218,66 $\pm$ 20 ^{*a b}
VEIA PORTA	71,11 $\pm$ 4,3	96,08 $\pm$ 3,9 ^a	341,21 $\pm$ 26 ^a	207,54 $\pm$ 3,5 ^{a b}
V.SUPRA- HEPÁTICA	111, 21 $\pm$ 4,3 #	108,72 $\pm$ 4,6	361,73 $\pm$ 15 ^a	315,40 $\pm$ 0,9 ^{#a b}

C) EFEITOS DA METFORMINA SOBRE AS RESERVAS DE GLICOGÊNIO EM ERITRÓCITOS DE RATOS NORMAIS E DIABÉTICOS “IN VITRO”.

O tratamento com metformina promoveu a recuperação parcial da capacidade dos eritrócitos de ratos diabéticos acumularem glicogênio. Para verificar se esta recuperação representou um efeito direto da metformina sobre os eritrócitos e não foi um efeito somente relacionado com a recuperação das reservas do fígado, estudamos *in vitro* os efeitos da metformina sobre o conteúdo de glicogênio em eritrócitos de ratos normais e diabéticos, incubados sob várias concentrações de glicose (tabela A2 em anexo e figura 4).

Metformina não alterou a capacidade dos eritrócitos de ratos normais sintetizarem ou mobilizarem suas reservas de glicogênio. Foi demonstrada alta correlação, $r = 0,916$, entre a concentração de glicogênio e a de glicose no meio de incubação. A dependência entre estes parâmetros foi descrita pela curva de regressão: $Y = 3,82 + 0,115 X$, representada na figura 4a, a qual não difere da curva controle ($t=0,53$).

Tem sido referido que o efeito da metformina *in vivo* e *in vitro* depende da presença da insulina (FANTUS & BROUSSEAU, 1986). Por isso avaliamos se o seu efeito nos eritrócitos também requer insulina. Na ausência de insulina, o conteúdo de glicogênio nos eritrócitos de ratos normais não

diferiram se incubados na presença ou na ausência da metformina (tabela A2 em anexo). Entretanto, na presença de insulina, metformina promoveu a elevação das reservas ($P < 0,01$), tendo sido demonstrada alta correlação entre a concentração de glicogênio e a de glicose do meio (curva de regressão: $Y = 21,8 + 0,15 X$; $r = 0,688$) (figura 4a).

Em virtude dos resultados acima obtidos, avaliamos os efeitos da metformina sobre o conteúdo de glicogênio em eritrócitos de ratos diabéticos. Eritrócitos de ratos diabéticos incubados em concentrações crescentes de glicose acumulam pouco glicogênio (Tabela A2 em anexo), sendo baixa a correlação entre a concentração de glicogênio e a de glicose extracelular ($r = 0,313$). A figura 4b mostra a curva de regressão, construída a partir dos valores da tabela A2 que é descrita pela equação: $Y = 0,76 + 0,01 X$, e difere da curva controle ($t = 14,08$, $P < 0,01$). Tal como demonstrado *in vivo*, a capacidade de sintetizar glicogênio permaneceu alterada nos eritrócitos de ratos diabéticos.

Quando incubados na presença de metformina ($5,6 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) em concentrações crescentes de glicose (figura 4b), houve uma tendência ao aumento no conteúdo eritrocitário de glicogênio. No entanto, a curva de regressão obtida ($Y = 44,3 + 130 X$, $r = 0,504$) não difere da curva de regressão dos diabéticos ($t = 1,38$; $P > 0,1$). Por outro lado, o efeito da

metformina na presença de insulina foi maior que a observada na sua ausência, recuperando a capacidade dos eritrócitos de diabéticos sintetizarem glicogênio (curva de regressão: $Y = 1.30 + 0.09 X$, $r = 0.95$) (figura 4b). A curva de regressão obtida na presença de metformina e insulina difere da curva obtida nos eritrócitos de diabéticos não tratados ($t = 7.63$, $P > 0.05$). Este experimento comprova as observações realizadas *in vivo*, onde a capacidade dos eritrócitos de ratos diabéticos sintetizarem glicogênio foi restabelecida parcialmente pelo tratamento com metformina ($t = 4.60$; $P < 0.01$).

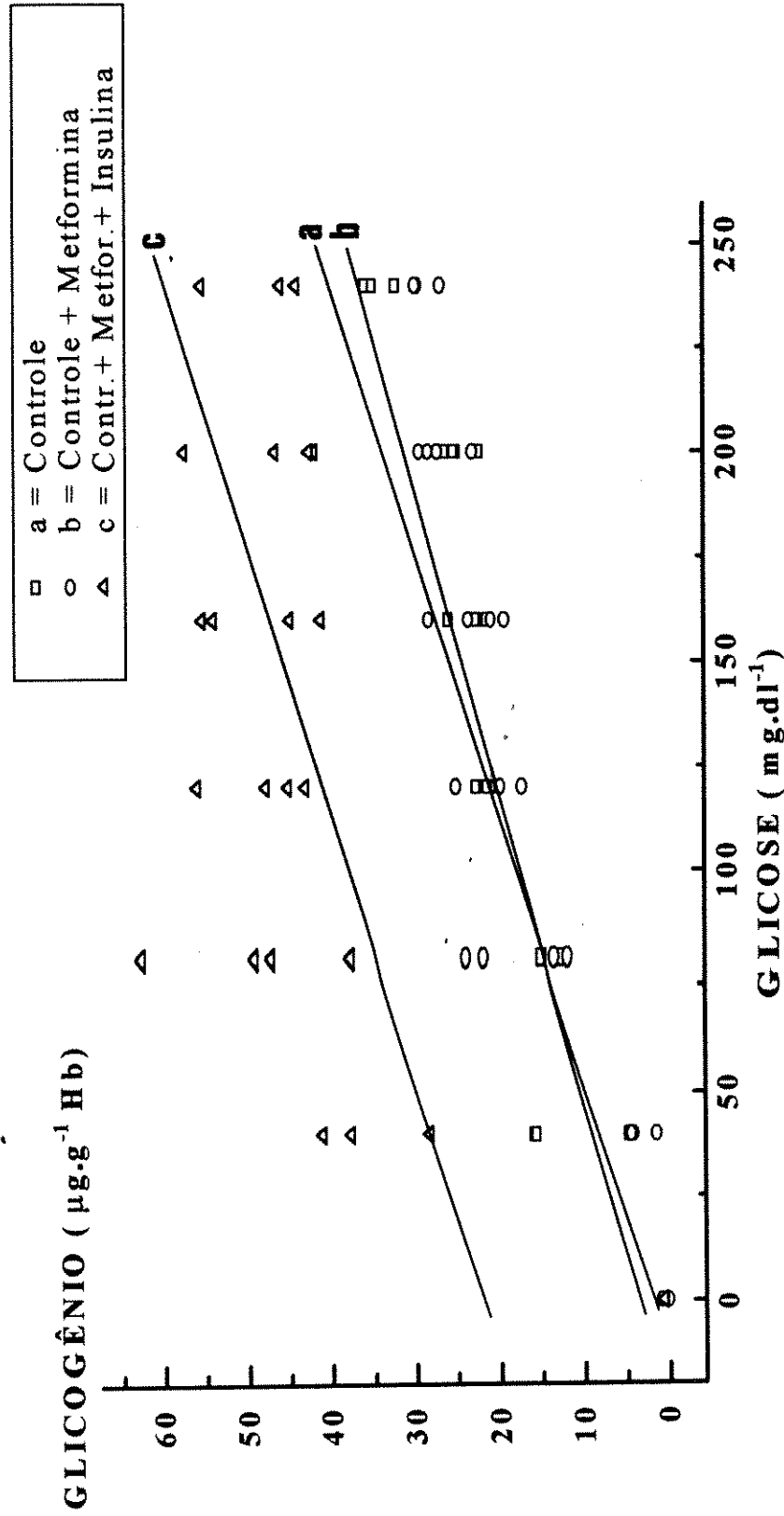


Figura 4a : Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{Hb}$) em eritrócitos de ratos controle e a concentração de glicose do meio de incubação (mg.dl^{-1}), na presença de insulina e/ou metformina. A curva de regressão foi construída a partir da tabela A2 (anexo).

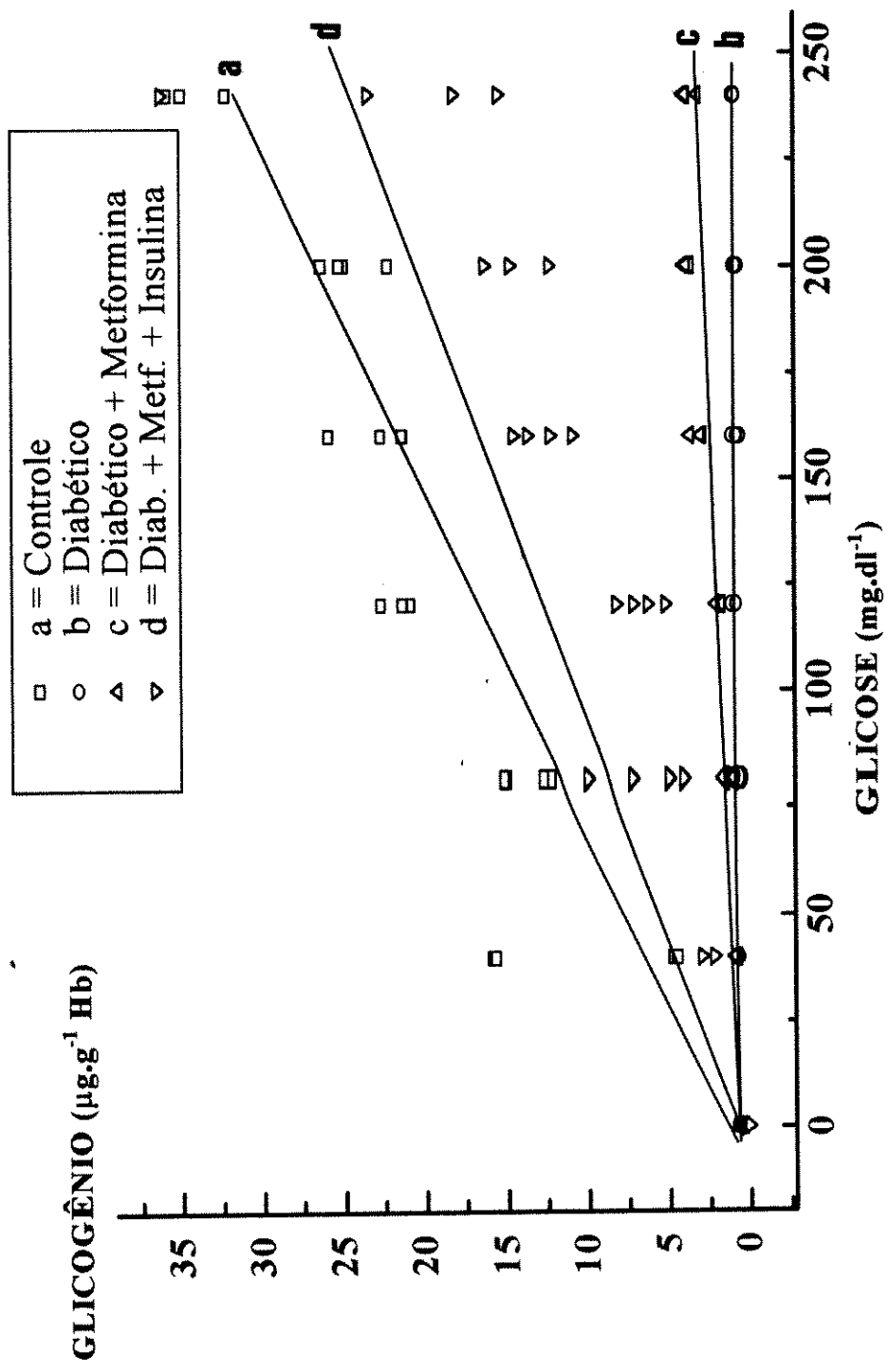


Figura 4b : Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ Hb}$) em eritrócitos de ratos diabéticos e a concentração de glicose do meio de incubação ($\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$) na presença de metformina e metformina + insulina. A curva de regressão foi construída a partir da tabela A2 (anexo).

D) MACROZONEAMENTO DO GLICOGÊNIO EM FÍGADO DE RATOS ADULTOS NORMAIS E MOBILIZAÇÃO DAS RESERVAS. EFEITOS DO TRATAMENTO DE RATOS DIABÉTICOS POR ALOXANA COM METFORMINA.

Demonstramos, em várias ocasiões, que os eritrócitos armazenam e mobilizam glicogênio de forma semelhante ao fígado. Nesta secção, estudamos a distribuição hepática de glicogênio nas diferentes condições experimentais em que avaliamos os eritrócitos

Iniciamos por um estudo de macrozoneamento, mostrando a distribuição de glicogênio por lóbulo (da SILVA & GONÇALVES, 1994).

A tabela VII mostra a concentração de glicogênio nos lóbulos hepáticos de ratos onde se pode verificar que o lóbulo superior possui o maior conteúdo de glicogênio ($p < 0,05$) entre os três lóbulos. Entretanto esta forma de amostragem não possibilitou a detecção das diferenças entre os setores do mesmo lóbulo ($p > 0,05$), como foi demonstrado a nível microscópico entre os hepatócitos perivenosos e periportais (JUNGERMANN & THURMAN, 1992).

Nos ratos submetidos a natação e ao jejum 24 h e 48 h, assim como nos diabéticos, as reservas de glicogênio foram depletadas em 86,2%, 80%, 60,4% e 55,3%, ($P < 0,05$). Diferença significativa entre os lóbulos não foram observadas. Embora em ratos normais o conteúdo de glicogênio seja maior

no lóbulo hepático superior, a depleção ocorreu de forma homogênea no fígado de diabéticos por aloxana, após natação forçada ou após jejum de 24 h. Também foi observado que a mobilização das reservas hepáticas de glicogênio durante o jejum, tem o mesmo comportamento observado nos eritrócitos, ou seja, são depletadas nas primeiras 24 h e parcialmente reconstituídas após 48 h.

Nos grupos que foram tratados com metformina (concentração final $5,6 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), observamos elevação nas reservas de glicogênio de 20% no grupo controle e 147% no diabético ($P < 0,05$), quando comparados aos respectivos grupos não tratados. Metformina induziu acúmulo de glicogênio no fígado de ratos controle ($P < 0,05$) e também promoveu a recuperação das reservas hepáticas que estavam comprometidas pelo diabetes mellitus ($P < 0,01$).

TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO LOBULAR HEPÁTICO (mg/100mg), EM RATOS . EFEITOS DO JEJUM, NATAÇÃO, DIABETES E TRATAMENTO COM METFORMINA

Os valores representam as médias ± E.P.M, n=4. A significância estatística foi estimada através de ANOVA seguido do teste de Tukey,

LÓBULOS	CONTROLE	CONTROLETR	JEJUM 24H	JEJUM 48H	NATAÇÃO	DIABÉTICO	DIABÉTICO
		ATADO COM				TRATADO	COM
		METFORMINA					METFORMINA
SUPERIOR	4,13 ± 0,1	5,07 ± 0,2	0,70 ± 0,09	1,50 ± 0,08	0,50 ± 0,05	1,72 ± 0,1	4,33 ± 0,2
DIREITO	3,58 ± 0,2	4,43 ± 0,3	0,68 ± 0,05	1,38 ± 0,1	0,48 ± 0,03	1,80 ± 0,1	4,21 ± 0,1
ESQUERDO	3,46 ± 0,2	3,96 ± 0,2	0,80 ± 0,07	1,53 ± 0,1	0,55 ± 0,01	1,46 ± 0,1	3,67 ± 0,2
MÉDIA ± EPM	3,72 ± 0,2	4,48 ± 0,3 *	0,73 ± 0,03*	1,47 ± 0,04*	0,51 ± 0,02*	1,66 ± 0,1*	4,10 ± 0,2

* P< 0,01 = diferença do grupo controle.

CAPÍTULO IV:

EFEITO DO FENOBARBITAL SOBRE AS RESERVAS DE GLICOGÊNIO DOS ERITRÓCITOS DE RATOS NORMAIS OU DIABÉTICOS.

A) EFEITO DO TRATAMENTO COM FENOBARBITAL SOBRE A GLICEMIA E SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO DOS ERITRÓCITOS

Fenobarbital é um indutor enzimático que atua sobre enzimas microsossomais hepáticas, tendo sido utilizado como coadjuvante no tratamento do diabetes (VENKATESAN et al.,1994). Porisso decidimos investigar se os efeitos do fenobarbital também afetam a fisiologia dos eritrócitos.

As tabelas VIII e IX mostram que houve melhora nas condições glicêmicas dos ratos diabéticos tratados com fenobarbital em paralelo à recuperação das reservas de glicogênio eritrocitário (tabelas VIII e IX).

No grupo controle (tabela VIII) houve diferença na glicemia artério-venosa periférica de 25% ($P < 0,05$) e de 15% entre a veia porta e supra-hepática ($P < 0,05$). O tratamento com fenobarbital não induziu alterações na glicemia dos ratos-controle. Todavia, nos ratos diabéticos por aloxana, que apresentaram glicemia até 3 vezes maiores que os do grupo controle, o

fenobarbital promoveu a redução da glicemia de 33% na artéria femural; 42% na veia femural; 13% na veia porta e 50,2% na supra-hepática ($P < 0,05$) mostrando relação com a melhora da glicemia.

A tabela IX mostra uma diferença artério-venosa periférica nas reservas de glicogênio eritrocitárias, 14% maior na artéria femural. De modo semelhante, também diferiram as concentrações de glicogênio entre as veias porta e supra-hepática, sendo maior na última. O tratamento de ratos diabéticos, promoveu restabelecimento parcial ($P < 0,05$) das reservas de glicogênio em eritrócitos de ratos diabéticos, sem, entretanto, alterar as do grupo controle.

Tabela VIII : Efeito do fenobarbital sobre a concentração de glicose em ratos controle e diabéticos por aloxana.

Os ratos tratados receberam fenobarbital (0,5 mg.ml⁻¹) na água de beber, durante 10 dias. Os valores (mg.dl⁻¹) são média ± E.P.M., para n=6, exceto para o grupo diabético tratado (n = 4). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi estimada através de análise de variância seguido pelo teste de Tukey, (a) P < 0,05 = diferença em relação ao grupo controle, (b) P < 0,05 = diferença entre os grupos diabéticos. As diferenças artério-venosa e porta - supra-hepática foram estimadas pelo teste “ t “ de Student, * P < 0,05 = diferença entre as femurais, # P < 0,05 = diferença entre a veia porta e a supra-hepática

GRUPOS	CONTROLE	CONTROLE TRATADO	DIABÉTICO	DIABÉTICO TRATADO
ARTÉRIA FEMURAL	97,42 ± 12	96,85 ± 2,9	304,64 ± 18 ^a	203,58 ± 45 ^a
VEIA FEMURAL	72,62 ± 3,4 *	88,71 ± 4,1	300,07 ± 11 ^a	173,87 ± 48 ^{a b}
VEIA PORTA	96,42 ± 5,8	86,61 ± 2,9	300,27 ± 19 ^a	260,89 ± 46 ^a
VEIA SUPRA HEPÁTICA	111,21 ± 4,3 #	96,39 ± 3,1	350,23 ± 10 ^a	174,09 ± 42 # ^{a b}

Tabela IX: Efeitos do fenobarbital sobre a concentração eritrocitária de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb) de ratos normais ou diabéticos por aloxana.

Os ratos tratados receberam fenobarbital ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) na água de beber, durante 10 dias. Os valores (mg.dl^{-1}) são média $\pm$ E.P.M., para $n=6$, exceto para o grupo diabético tratado ($n = 4$). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi estimada através de análise de variância seguido pelo teste de Tukey, a) $P < 0,05$ = diferença em relação ao grupo controle, b) $P < 0,05$ = diferença entre os diabéticos. As diferenças artério-venosa e porta - supra-hepática foram estimadas pelo teste “ t ” de Student, * $P < 0,05$ = diferença entre as femurais, # $P < 0,05$ = diferença entre a veia porta e a supra-hepática

SETORES GRUPOS	ARTÉRIA FEMURAL	VEIA FEMURAL	VEIA PORTA	SUPRA HEPÁTICA
CONTROLE	$45,45 \pm 1,1$	$39,07 \pm 0,8$ *	$37,87 \pm 1,1$	$47,51 \pm 0,9$ #
CONTROLE TRATADO	$44,72 \pm 2,6$	$38,88 \pm 3,2$	$37,01 \pm 5,7$	$46,76 \pm 1,4$
DIABÉTICO	$9,67 \pm 0,1$ ^a	$7,14 \pm 0,7$ * ^a	$10,03 \pm 0,7$ ^a	$10,67 \pm 0,5$ ^a
DIABÉTICO TRATADO	$20,72 \pm 3,8$ ^{a b}	$9,26 \pm 2,8$ * ^a	$12,56 \pm 2,7$ ^a	$30,97 \pm 0,9$ # ^{a b}

B) EFEITO DO FENOBARBITAL SOBRE AS RESERVAS DE GLICOGÊNIO DOS ERITRÓCITOS DE RATOS CONTROLE OU DIABÉTICOS “IN VITRO”.

Eritrócitos de ratos controle (figura 2a) aumentaram seu conteúdo de glicogênio de acordo com a elevação da concentração de glicose no meio ($r = 0,86$). A adição de fenobarbital à solução de incubação dos eritrócitos, (tabela A3- anexo), promoveu aumento no conteúdo de glicogênio com boa correlação com a glicemia tanto no grupo controle ($r = 0,804$) quanto no diabético ($r = 0,688$). A curva de regressão dos eritrócitos do grupo controle comparada com a do grupo controle tratado com fenobarbital, mostrou que elas são diferentes ($t = 11,02$; $P < 0,05$).

Eritrócitos de ratos diabéticos por aloxana não responderam da mesma maneira que os controle ao aumento de glicose extracelular ($P > 0,05$ comparação entre os coeficientes de regressão b), sendo baixa a correlação entre eles ($r = 0,312$, $P > 0,05$). Porém, o tratamento com fenobarbital promoveu a recuperação das reservas, as quais atingiram valores próximos aos observados no grupo controle tratado com correlação (R) de $0,688$, $P < 0,05$, mostrando a recuperação da capacidade eritrocitária de sintetizar glicogênio.

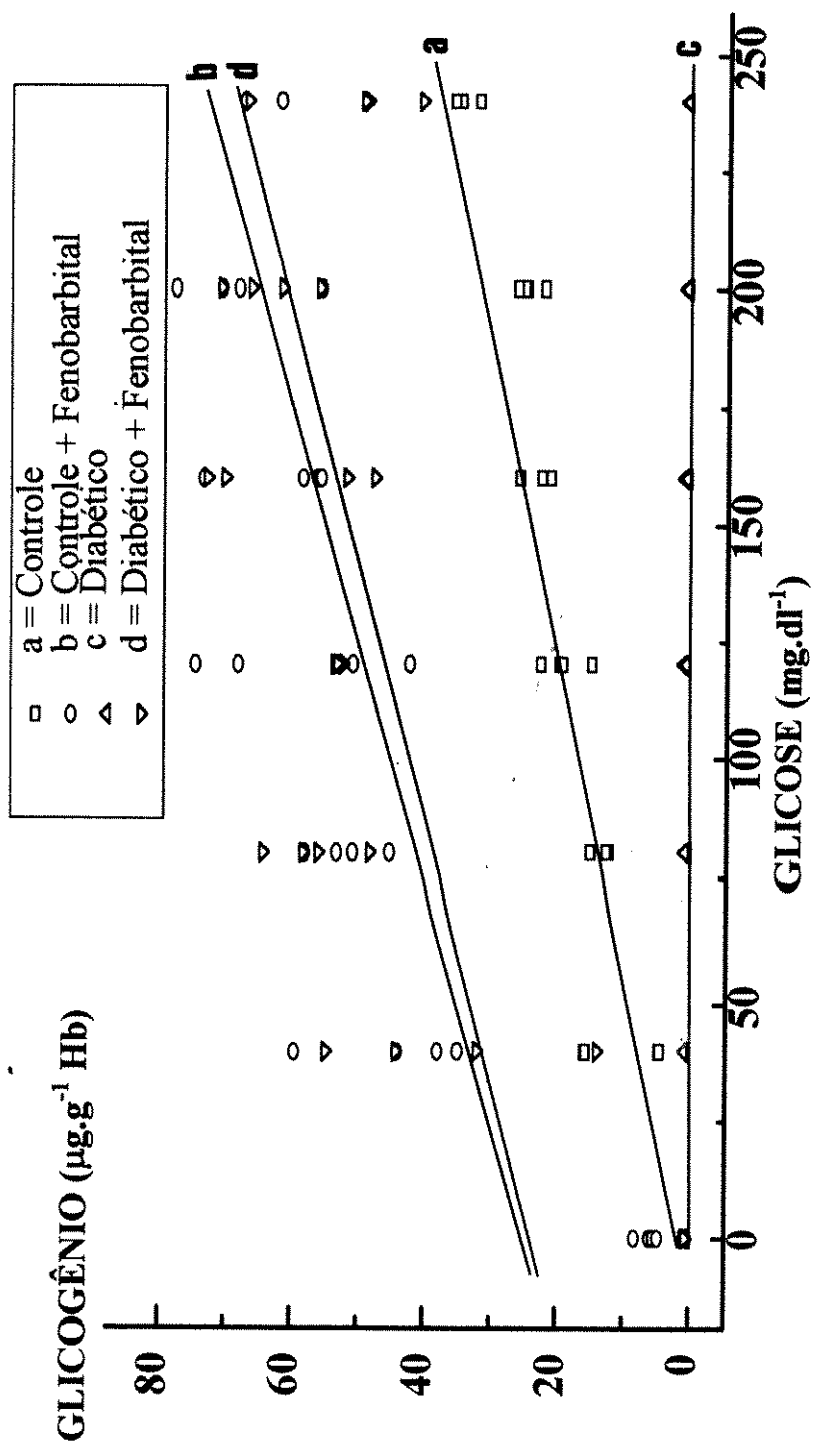


Figura 5 : Relação entre o conteúdo de glicogênio ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{Hb}$) em eritrócitos de ratos controle e diabéticos e a variação da concentração de glicose (mg.dl^{-1}) na presença de fenobarbital. A curva de regressão foi construída a partir da tabela A3 em anexo .

CAPÍTULO VI :

ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO E PIRUVATO NOS ERITRÓCITOS.

O propósito deste capítulo foi mostrar a contribuição dos eritrócitos no transporte dos monocarboxilatos, lactato e piruvato, e a sua relação com o metabolismo hepático.

As concentrações destes metabólitos foram medidas em sangue total e no plasma colhidos das veias porta e supra-hepática. Em ratos alimentados, a concentração de lactato diminuiu 34,1% ($P < 0,01$), no sangue e 19,2 % ($P < 0,01$) no plasma (tabela A4 Anexo), após a passagem do sangue pelo fígado.

A partir dos valores medidos no sangue total e no plasma foram estimadas as concentrações de lactato presente nos corpúsculos sanguíneos, constituídos principalmente por eritrócitos. A distribuição do lactato sangüíneo mostrou a seguinte distribuição : na veia porta, 65,9 % estava no plasma e cerca de 34,1% nos corpúsculos, enquanto na veia supra-hepática 79.7% estava no plasma e cerca de 20.3% nos eritrócitos.

Esta estimativa revela que os eritrócitos forneceram cerca de 60,9% ($P < 0,01$) de seu conteúdo de lactato durante a passagem pelo fígado.

Nos ratos submetidos a jejum durante 24 h a concentração de lactato aumentou ($P < 0,05$). Na veia porta 71% do lactato estava no plasma e 29% nos eritrócitos, enquanto na veia supra-hepática 80% estava no plasma e 20% nos eritrócitos. A diferença entre os vasos foi de 55% e não diferiu daquela observada nos ratos alimentados (tabela A4 em anexo). O conteúdo eritrocitário de lactato aumentou em ambos os vasos, não sendo observado diferença entre eles (figura 6).

Após 48 h de jejum, as concentrações totais e plasmáticas de lactato foram muito menores que em ratos normais ($P < 0,05$), porém, ainda houve uma redução de 44,8% ($P < 0,05$), no conteúdo plasmático de lactato após passar pelo fígado. O conteúdo eritrocitário de lactato foi menor que o observado nos ratos alimentados ($P < 0,05$), e não houve diferença entre as concentrações da veia porta e supra-hepática.

Ratos diabéticos por aloxana apresentaram concentrações plasmáticas de lactato menores que o controle, no entanto, ainda persistiu uma diferença de 43,4% ($P < 0,01$), entre o conteúdo plasmático da veia porta e da veia supra-hepática. Os eritrócitos de diabéticos também apresentaram redução no conteúdo de lactato, porém foi mantida a diferença entre o conteúdo da veia porta e supra-hepática (37,5%, $P < 0,05$).

O tratamento de ratos diabéticos com metformina promoveu elevação na concentração de lactato plasmático na veia porta e nos

eritrócitos (tabela A4 e figura 6). O conteúdo plasmático foi 15% maior que o conteúdo do mesmo vaso no rato diabético não tratado. Por sua vez, o conteúdo eritrocitário de lactato na veia porta é 33% ($P < 0,01$) maior que nos diabéticos não tratados. A diferença entre veia porta e supra-hepática no conteúdo eritrocitário de lactato também foi maior que nos diabéticos não tratados (50%, $P < 0,05$).

Os ratos normais tratados com metformina, não diferiram do controle (tabela A4 e figura 6).

Quanto ao piruvato, somente o grupo controle tratado com metformina diferiu do controle por apresentar elevação no conteúdo plasmático de piruvato ($P < 0,05$; tabela A5 e figura 7), sem qualquer alteração à nível do conteúdo eritrocitário.

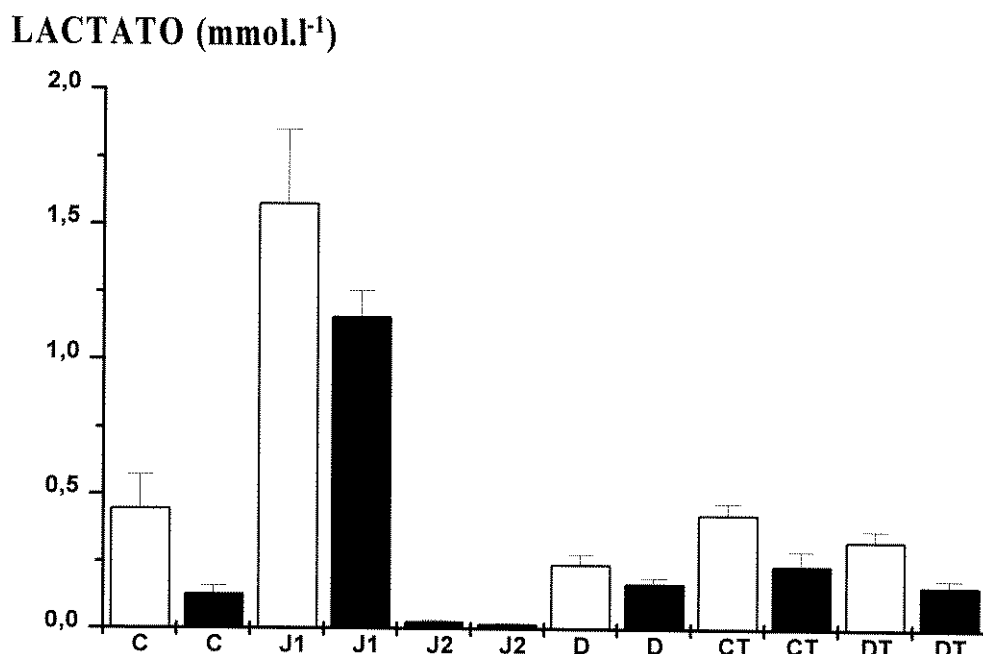


Figura 6) Concentração eritrocitária de lactato (mmol.l⁻¹) na veia porta (colunas brancas) e na supra-hepática (colunas pretas).

As colunas representam as médias $\pm$ E.P.M, n=6, estando assim representadas: C = controle; J1 = jejum 24 h; J2= jejum 48 h; D = diabéticos; CT = controle tratados com metformina; DT = diabéticos tratados com metformina.

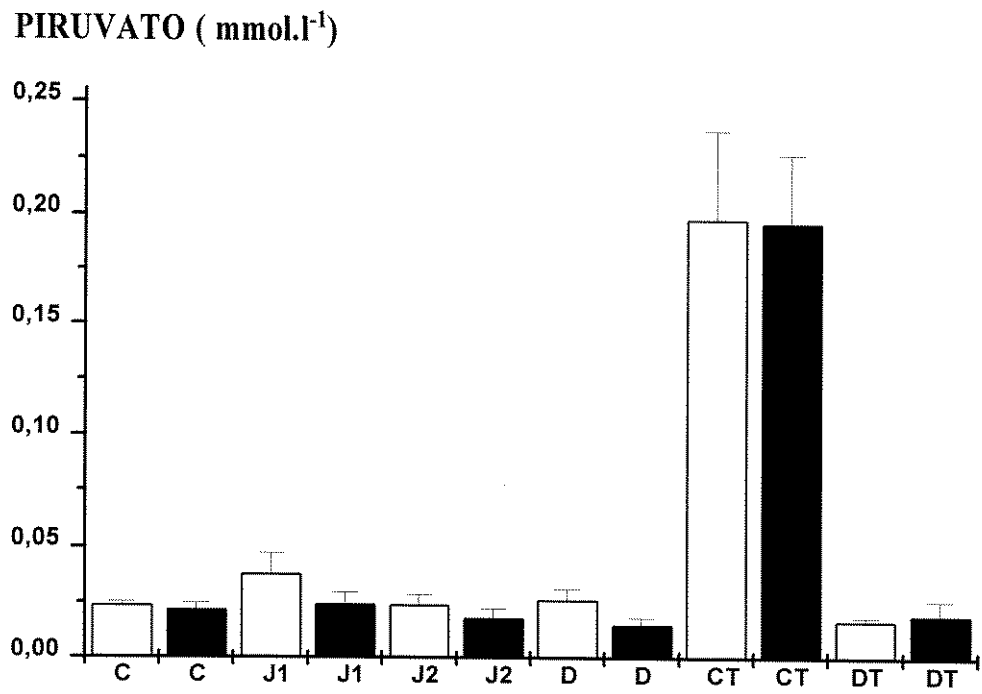


Figura 7) Concentração eritrocitária de piruvato (mmol.l⁻¹) na veia porta (colunas brancas) e na supra-hepática (colunas pretas).

As colunas representam as médias ± E.P.M, n=6, estando assim representadas: C = controle; J1 = jejum 24 h; J2= jejum 48 h; D = diabéticos; CT = controle tratados com metformina; DT = diabéticos tratados com metformina.

CAPÍTULO VII: METABOLISMO DE GLICOSE

O consumo de glicose pelos eritrócitos é muito baixo em relação aos outros tecidos.

O metabolismo eritrocitário de glicose foi avaliado utilizando-se glicose marcada no carbono 1 (^{14}C -U-Glicose). Sabendo-se que a via das pentoses fosfato é a única fonte de CO_2 em eritrócitos normais e o átomo de carbono do CO_2 é derivado do primeiro carbono da glicose, a medida da produção de $^{14}\text{CO}_2$ quando se utiliza ^{14}C -1-Glicose representa a glicose metabolizada através desta via. Eritrócitos de ratos normais incubados a 37°C durante 90 minutos metabolizaram $0,05 \mu\text{M}$ de ^{14}C -U-Glicose / ml de células / min.

A medida do consumo total de glicose em eritrócitos normais foi feita através da diferença da concentração de glicose no meio de incubação após 60 min sob nossas condições de incubação, onde constatamos o consumo de $3 \mu\text{mol}$ de glicose / h / ml de eritrócitos.

5. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A manutenção da normoglicemia depende da integridade dos sistemas nervoso e endócrino, que regulam a dinâmica de mobilização e armazenamento das reservas hepáticas de glicogênio (YAMAGUCHI, 1992). Diversos estudos tem demonstrado nos eritrócitos, a presença das enzimas glicogênio sintetase, amiloglicosidase e fosforilase, que contribuem para a formação do reservatório de glicogênio (MOSES et al., 1971; 1972) e sua utilização (VAN HOOFF, 1967; HERS et al., 1967).

O interesse pela compreensão dos mecanismos que contribuem para a manutenção de níveis normoglicêmicos levou-nos a estudar a participação dos eritrócitos, considerando que seus reservatórios de glicogênio poderiam desempenhar importante função na distribuição de glicose, conforme sugerido por JACQUES (1984) e GUARNER & ALVAREZ-BUYLLA (1989). Esta função dos eritrócitos tem sido relegada a um plano secundário em virtude do grande reservatório de glicogênio do fígado e a rapidez com que ele é mobilizado e reconstituído em indivíduos normais. Todavia, este estudo mostrou diversas semelhanças entre os eritrócitos e os hepatócitos quanto ao armazenamento e liberação de glicose em diversas situações funcionais que envolvem rápidas mudanças no metabolismo. Além disso, os eritrócitos são um reservatório de

glicogênio de fácil acesso, permitindo várias amostragens em estudos de longa duração, sem provocar grande estresse para os animais ou sujeitos experimentais.

I) AVALIAÇÃO DAS RESERVAS ERITROCITÁRIAS

DE GLICOGÊNIO *IN VIVO* e *IN VITRO*

Os primeiros estudos sobre o armazenamento de glicogênio em eritrócitos (HASSID & ABRAHANS, 1957), mostraram baixas concentrações devido à inadequação das técnicas para a extração do glicogênio da amostra e à baixa sensibilidade dos métodos de medida utilizados. Em nosso estudo utilizamos uma técnica desenvolvida para melhorar a extração e um tratamento enzimático para o rompimento das ramificações da molécula de glicogênio, liberando as unidades de glicose, e consequentemente, melhorando sua quantificação, com sensibilidade para detectar até 0,1 µg de glicogênio (FARQUHARSON et al., 1990).

Com o intuito de avaliar as reservas eritrocitárias de glicogênio, estudamos eritrócitos de diversos setores do leito vascular (tabela I). Há uma diferença de 16,7% entre a concentração de glicogênio dos eritrócitos coletados na artéria femural e veia femural, sendo significativamente maior no ramo arterial ($P < 0,01$). A diferença artério-venosa periférica sugere que os

eritrócitos poderiam estar liberando glicose durante o trânsito pelos capilares. Esta diferença, embora menor, é simultânea à observada na concentração de glicose plasmática, 25,4% maior na artéria que na veia femural ($P < 0,05$).

Após os eritrócitos passarem pelo interior do fígado a concentração de glicogênio aumentou 28,5% ($P < 0,05$), sugerindo que tenham captado glicose no interior do fígado. Esta diferença também é paralela à diferença quanto à glicemia, sendo as concentrações de glicose plasmática na veia supra-hepática 56,3% maiores que na veia porta ($P < 0,05$). As observações acima estão de acordo com os estudos de GUARNER & ALVAREZ-BUYLLA (1989), em que demonstraram que independentemente da ação da insulina, quando a glicemia se eleva, os eritrócitos captam glicose, estocando-a na forma de glicogênio e a liberam quando a glicemia é reduzida.

Em 1984, JACQUEZ verificou que o conteúdo de glicose intra eritrocitário supera as necessidades metabólicas em 12.000 vezes, sugerindo que estes transportam glicose pela corrente sanguínea.

Nossa avaliação do metabolismo de glicose pelos eritrócitos de ratos normais, mostrou um baixo consumo, similar ao observado por outros autores os quais constataram que o consumo de glicose nos eritrócitos de ratos esta entre 2.38 e 5.60 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{ml}$ de células (KANEKO, 1974; MAGNANI et al.1980).

Na tabela I, pode-se verificar que a diferença na concentração eritrocitária de glicogênio nas femurais (artéria e veia) foi de $7.41 \mu\text{g.g}^{-1} \text{Hb}$. Considerando-se o baixo consumo de glicose pelos eritrócitos, a diferença no conteúdo eritrocitário de glicogênio sugere que houve liberação de glicose e não a utilização desta pelos eritrócitos.

As diferenças artério-venosa e entre as veias porta e supra-hepática também estão de acordo com a proposta de envolvimento dos eritrócitos na distribuição de glicose (JACQUEZ, 1984; FERRANNINI & BJORKMAN, 1986; GUARNER & ALVAREZ-BUYLLA, 1989 e 1990).

Para constituir importante fontes de glicose, os eritrócitos devem armazenar glicogênio em função das variações da glicemia. Forte correlação entre a glicemia e a concentração de glicogênio eritrocitária ($r=0,794$) encontrada nos diferentes setores vasculares, sugeriu que o conteúdo de glicogênio nos eritrócitos dependesse da concentração plasmática de glicose. Esta sugestão foi confirmada experimentalmente "in vitro" (tabela IV, figura 2a). *In vitro*, em concentrações crescentes de glicose os eritrócitos aumentaram, de maneira diretamente proporcional, as suas reservas de glicogênio, com correlação elevada ($r= 0,94$). Todavia, foi também necessário demonstrar que os eritrócitos liberavam glicose à medida que a concentração de glicose do meio se reduzia (tabela IV e figura 2b). Eritrócitos, inicialmente incubados na presença 240 mg.dl^{-1} de glicose, acumularam glicogênio e,

posteriormente reduziram o seu conteúdo ao serem novamente incubados em concentrações mais baixas de glicose (correlação, $r = 0,83$).

Para verificar se os eritrócitos contribuem para a regulação da glicemia, estudamos a capacidade dos eritrócitos variarem seu conteúdo de glicogênio em várias situações onde o metabolismo de carboidratos, entre outros, é afetado, requerendo a utilização das reservas em função de ajustes metabólicos.

Escolhemos para isso as situações de jejum de curto prazo, correspondendo ao período de 24 h, e o prolongado de 48h como proposto por CAHILL (1970), além do estresse produzido pela intensa atividade física (natação forçada durante 50 min) conforme OSTMAN-SMITH (1979).

O jejum é um quadro que se caracteriza pela elevada mobilização de substratos energéticos devido à ação dos hormônios contra-reguladores da insulina, cujas concentrações se elevam no plasma (FELIG, 1979). O quadro metabólico adaptativo do jejum caracteriza-se por alterações hormonais vinculadas à redução da insulinemia e concomitante elevação dos níveis séricos de glucagon, hormônio adrenocorticotrófico, hormônios da tireóide, hormônio de crescimento e catecolaminas, que induzem a depleção do glicogênio hepático (DE GROOT, 1994)

No jejum breve as células utilizam glicose fornecida pelo fígado como substrato energético preferencial (CAHILL, 1970). Sob esta condição os

eritrócitos apresentaram baixa concentração de glicogênio em comparação ao grupo controle. Todavia, ainda persistiu a diferença glicêmica artério-venosa de 59%, indicativo da distribuição de glicose aos tecidos periféricos ($P < 0,05$), maior do que aquela observada nos animais com livre acesso ao alimento (tabela II). Igualmente foi possível verificar a carga dos eritrócitos (aumento de 294%) ao passarem pelo fígado, sujeito a intensa atividade glicogenolítica devido à ação dos hormônios contra-reguladores.

A glicemia durante o jejum 24 h (tabela II), como classicamente reconhecida é normal, e mostra uma diferença artério-venosa periférica de 15,8% ($P < 0,05$). Diferença glicêmica também é observada entre a veia porta e a veia supra-hepática, caracterizada por valores 61,3% maiores no ramo supra-hepático que na veia porta ($P < 0,05$). Neste período não se observa correlação entre a glicose plasmática e o conteúdo de glicogênio dos eritrócitos ($r = 0,07$).

A manutenção da restrição alimentar durante 48 horas, caracteriza o quadro de jejum prolongado (CAHILL, 1970). Os ratos submetidos a esta condição mostraram (tabela III) recuperação parcial do glicogênio eritrocitário, diferindo do constatado após 24 horas de restrição. Semelhante recuperação parcial das reservas de glicogênio após 48 horas de restrição alimentar foi descrita no fígado, sendo que neste período os hepatócitos utilizam o glicerol proveniente da lipólise para a síntese de glicogênio (GOLDSTEIN &

CURNOW, 1978). Neste trabalho mostramos, pela primeira vez, as similaridades entre eritrócitos e hepatócitos, no que se refere ao armazenamento e mobilização das reservas de glicogênio durante o jejum. A recuperação parcial do conteúdo de glicogênio dos eritrócitos está, possivelmente, relacionada ao restabelecimento das reservas hepáticas de glicogênio (tabela VII), que é a “estação” onde os eritrócitos captam glicose. Após 48 h de restrição alimentar observamos uma forte correlação entre a glicemia e a concentração eritrocitária de glicogênio ($r=0,827$).

Outra situação que determina intensa mobilização de substratos energéticos é a atividade física por natação, a qual, realizada uma única vez, é caracterizada como indutora de estresse (OSTMAN-SMITH, 1979). Durante a fase inicial do exercício, o glicogênio tecidual constitui a principal fonte energética consumida. No entanto, com a continuidade do esforço físico, outras fontes energéticas desempenham um importante papel, tais como: ácidos graxos livres, aminoácidos de cadeia ramificada, e lactato. A elevação na disponibilidade plasmática destes substratos, advém da mobilização de reservatórios hepáticos e/ou de tecido adiposo (FELIG et al., 1969; EATON, 1972).

Durante a realização desta forma de esforço físico aumenta a secreção dos mesmos hormônios glicogenolíticos envolvidos nas respostas ao jejum de 24 h (SOTSKY et al., 1989; VAN DIJK et al., 1994). De maneira similar ao que

se verificou no fígado (tabela VII) as reservas de glicogênio dos eritrócitos também foram mobilizadas durante o estresse causado por atividade física contínua (tabela III). Provavelmente, a redução do conteúdo de glicogênio foi devida ao efeito direto dos hormônios hiperglicemiantes, liberados neste período pois, as reservas foram depletadas mesmo quando a glicemia foi mantida elevada (correlação = 0,194). Nesta condição a incorporação de glicose aos reservatórios de glicogênio deveria ter aumentado conforme nossas observações (tabela IV) e as de FERRANNINI & BJORKMAN (1986), GUARNER & ALVAREZ-BUYLLA (1989).

Os efeitos dos hormônios glicogenolíticos sobre as reservas hepáticas de glicogênio são conhecidos (VAN DICK et al., 1991). Considerando os efeitos do jejum e do estresse por exercício físico sobre as reservas de glicogênio em eritrócitos e as aparentes semelhanças entre fígado e eritrócitos quanto ao metabolismo de carboidratos, avaliamos as reservas de glicogênio em eritrócitos de ratos controle, incubados na presença de hormônios glicogenolíticos e de glicose.

Adrenalina (200 ng.ml^{-1}), noradrenalina (200 ng.ml^{-1}), corticosterona ($22 \text{ } \mu\text{g. ml}^{-1}$) e glucagon (1 U.ml^{-1}) (tabela A1 anexo, figura 2a e 2b), induziram depleção das reservas de glicogênio, mesmo em presença de elevada concentração de glicose. Os efeitos por nós observados confirmaram as observações de GUARNER & ALVAREZ-BUYLLA (1989) sobre os efeitos da

adrenalina. Na membrana dos eritrócitos as catecolaminas ligam-se aos receptores β 2-adrenérgicos promovendo a glicogenólise, à semelhança do que fazem nos hepatócitos (BECKMAN & HOLLEMBERG, 1979). A ação β -adrenérgica nos eritrócitos foi parcialmente bloqueada, 400 ng.ml⁻¹, por propranolol. Recentemente foi demonstrado que os receptores β -adrenérgicos dos eritrócitos possuem as mesmas características funcionais e sensibilidade a bloqueio pelo propranolol que os receptores β -adrenérgicos hepáticos (MANUKHIN et al., 1994). À semelhança do observado no fígado por PILKS & GRANNER (1992), glucagon também promoveu a depleção das reservas de glicogênio em eritrócitos. Além disto, este estudo mostrou que a corticosterona, cuja liberação no sangue aumenta durante o estresse causado pelo exercício físico forçado, também depletou as reservas de glicogênio em eritrócitos incubados em alta concentração de glicose.

No diabetes mellitus, o metabolismo da glicose em tecidos dependentes ou não de insulina é comprometido, destacando-se os efeitos iniciais no fígado (RODRIGUEZ-GIL et al., 1989). Particularmente importante, é a inibição da atividade da glicogênio sintetase nos hepatócitos, comprometendo a regulação da glicemia (JUNGGERMANN, 1992; LAMAIGUE & ROUSSEAU, 1994). Até recentemente, raras eram as citações sobre se e como os eritrócitos seriam afetados, principalmente porque a insulina não influi na captação de glicose

pelos eritrócitos , apesar destes possuírem receptores para insulina (GAMBHIR et al., 1978; ALBERT, 1982).

Embora a função dos eritrócitos no metabolismo de carboidratos não tenha sido devidamente considerada, recentemente têm surgido relatos (a maioria, observações preliminares) de sérios comprometimentos na captação e metabolismo da glicose, além de redução na formação de glicose-6-fosfato nos eritrócitos de diabéticos (FERRANNINI & BJORKMAN, 1986; GARVEY et al., 1987; ABUMRAD et al., 1988; KATO et al., 1990; CIVELEK et al., 1991; CONGET et al., 1991; DONATELLI et al., 1991; RAPIN et al., 1991).

Tal como verificado para eritrócitos recém colhidos dos vasos, *in vitro*, eritrócitos de ratos normais armazenam glicogênio em situações em que a glicemia está elevada e reduzem o seu conteúdo, liberando glicose, quando a glicemia diminui (tabela IV). Todavia, em condições em que a glicemia permanece elevada, como no diabetes (*in vivo*, tabela V), o conteúdo de glicogênio cai acentuadamente, indicando deficiências do metabolismo de carboidratos nos eritrócitos, em paralelo ao observado nos hepatócitos. Ratos diabéticos por aloxana (tabela V) possuem baixa concentração eritrocitária de glicogênio, não mantendo correlação com a glicemia ($r = 0,10$). Seus eritrócitos perderam a capacidade de acumular glicogênio, como demonstrado *in vitro* (tabela A2 - anexo) na presença de concentrações crescentes de glicose no meio de incubação ($r = 0,31$). A perda da capacidade em incorporar glicose

como glicogênio, mesmo na presença de altas concentrações de glicose mostra uma deficiência própria dos eritrócitos e não está relacionada às concentrações dos hormônios hiperglicemiantes, pois foi também observada *in vitro*. O comprometimento da capacidade dos eritrócitos sintetizarem glicogênio deve estar vinculado à grande redução na atividade da enzima glicogênio sintetase *b* dos eritrócitos de diabéticos, enzima cuja atividade depende da concentração de glicose-6-fosfato (MOSES et al, 1972). Este produto é significativamente reduzido em eritrócitos de ratos diabéticos (ABUMRAD et al, 1988). RAPIN et al (1991) demonstraram que o mesmo acontece em eritrócitos de diabéticos humanos. Também leucócitos de diabéticos, os quais são sensíveis à insulina, têm o transporte de glicose e a produção de glicose-6-fosfato diminuídos (SEGERS et al., 1990).

Sobre o efeito da insulina sobre os eritrócitos isolados, observamos Insulina (1 U.ml^{-1}) não afeta a depleção das reservas eritrocitárias de glicogênio das células expostas a baixas concentrações de glicose, assim como, não altera a síntese de glicogênio em concentrações de glicose acima de 120 mg. dl^{-1} . Verificamos ainda menor conteúdo de glicogênio nas células expostas a 80 mg. dl^{-1} ($P < 0,02$) e 120 mg. dl^{-1} ($P < 0,003$). A falta de sensibilidade dos eritrócitos à insulina seria devida a sua constante exposição ao hormônio, que induziria redução da população de seus receptores (BALDINI et al, 1986). Todavia, GAMBHIR & AGARWAL (1991),

demonstraram que insulina não interfere na captação de glicose pelos eritrócitos, o que foi confirmado parcialmente neste estudo (tabela A1 - anexo), onde verificamos que o conteúdo eritrocitário de glicogênio não sofre variações na presença de insulina. A correlação entre a concentração eritrocitária de glicogênio e a concentração de glicose foi alta na presença de insulina, não diferindo daquela observada na ausência ($r = 0,927$).

No tratamento do diabetes tem sido utilizada a biguanida metformina em virtude de bons resultados obtidos no controle glicêmico (BAILEY, 1992). Sua ação anti-hiperglicemiante tem sido atribuída à combinação da diminuição da absorção intestinal de glicose, redução da gliconeogênese e elevação na captação de glicose por tecidos periféricos como os músculos e tecido adiposo (PERRIELLO et al., 1994; STUMVOLL et al., 1995; DeFRONZO et al., 1995).

Em ratos controle sob tratamento, (tabela V), metformina não induziu aumento significativo no conteúdo eritrocitário de glicogênio. Por outro lado, os ratos diabéticos por aloxana tratados com metformina durante 7 dias, recuperaram parcialmente o conteúdo de glicogênio.

O restabelecimento observado, possivelmente decorreu da ação da metformina sobre a hexoquinase promovendo o aumento na formação de G6P e concomitante ativação da enzima glicogênio sintetase, cuja atividade dependente da G6P (MOSES et al., 1972), se encontrava comprometida pelo

diabetes (PERRIELLO et al., 1990; De FRONZO et al., 1991; SARABIA et al., 1992).

Após ter observado que, "*in vivo*" a metformina recuperou a capacidade de síntese eritrocitária de glicogênio em ratos diabéticos, passamos a avaliar seu efeito "*in vitro*".

O conteúdo de glicogênio de eritrócitos de ratos normais incubados na presença de diferentes concentrações de glicose e metformina (concentração final $5.6\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) (tabela A2 - anexo e figura 4a) não diferiram do observado na ausência da biguanida. Na presença da metformina a correlação entre a concentração eritrocitária de glicogênio e a concentração de glicose não diferiu daquela observada na ausência (curva de regressão: $Y=3,82 + 0,11X$; $r= 0,92$). Porém, em presença de glicose igual ou acima de $160 \text{ mg}.\text{dl}^{-1}$ metformina induziu aumento na concentração de glicogênio ($P<0,05$)

Tem-se demonstrado que os efeitos da metformina em diversos tecidos depende da presença de insulina (WILCOCK & BAILEY, 1990). Também nos eritrócitos isto aconteceu. Na presença de insulina (1U ml) e metformina ($5.6\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), eritrócitos de ratos normais acumulam glicogênio, saturando seus reservatórios em concentração tão baixa de glicose como $40 \text{ mg}.\text{dl}^{-1}$ (tabela A2 - anexo e figura 4a), sugerindo que a metformina favoreça os processos de síntese de glicogênio dos eritrócitos, tal como o faz em outros tecidos (GALUSKA et al., 1991; JOHNSON et al., 1993).

Eritrócitos de ratos diabéticos incubados em diferentes concentrações de glicose e metformina, não apresentaram modificações no conteúdo de glicogênio (curva de regressão $Y = 4,43 + 0,130 X$, $r = 0.504$), no entanto, na presença de metformina e insulina houve aumento das reservas de glicogênio, restabelecendo seu conteúdo ($P < 0,05$). Alta correlação entre o conteúdo de glicogênio e a glicose do meio (curva de regressão $Y = 1,30 + 0.09X$, $r = 0.84$) foi observada. Este experimento mostra que a metformina associada a insulina promove o restabelecimento da capacidade de sintetizar glicogênio que estava comprometida pelo diabetes, similar ao observado no estudo *in vivo*.

II) AVALIAÇÃO DAS RESERVAS HEPÁTICAS DE GLICOGÊNIO

Os hepatócitos compreendem 92% da massa celular do fígado, por isso, o parênquima hepático foi classificado com um tecido funcionalmente homogêneo. Entretanto, recentes estudos da microestrutura do fígado mostraram diferenças estruturais e funcionais entre as células do parênquima hepático conforme a posição do hepatócito, ou seja, na região perivenosa ou periportal (MATSUMOTO & KAWAKAMI, 1982; YAMAGUCHI, 1992).

Na região periportal predominam as enzimas que regulam a síntese de glicogênio (como por exemplo a succinato desidrogenase, glicose 6- fosfatase, hexoquinase, piruvato quinase, isoenzima M2, frutose 1-6 bifosfatase e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase). Na porção perivenosa foram detectadas predominantemente as enzimas chaves da glicólise e lipogênese (como por exemplo a glicoquinase, piruvato quinase, citrato liase, acetil Co-A carboxylase e a isoenzima L. (AGUIS & TOSH,1990; JUNGGERMANN,1992). A constatação destas diferenças entre os hepatócitos levou à formulação do modelo do zoneamento metabólico do fígado, o qual propõe que os hepatócitos periportais e perivenosos exercem funções metabólicas diferentes, fato que facilitaria o controle do metabolismo (JUNGGERMANN, 1992).

Conforme BARTELS et al. (1988), a síntese hepática de glicogênio na porção periportal ocorre a partir de lactato, piruvato e glutamina, enquanto na porção perivenosa a síntese ocorre diretamente a partir de glicose. Portanto, durante a fase absorptiva os hepatócitos perivenosos captariam glicose, a qual poderia ser incorporada aos estoques de glicogênio ou degradada até lactato. Este é liberado na circulação sendo captado pelas células periportais onde participariam da síntese de glicogênio. No período pós-absortivo as células periportais liberam glicose enquanto as perivenosas liberam lactato (JUNGGERMANN,1992). Por se tratar de um órgão importante no controle glicêmico, decidimos compará-lo aos eritrócitos.

Inicialmente, estabelecemos um macro-zoneamento do parênquima e avaliamos a distribuição do glicogênio em zonas intra e inter-lobular, próximas e distantes da entrada principal dos grandes vasos sanguíneos (figura 1)

A análise dos resultados setoriais (intra-lobular) não revelou diferenças no conteúdo de glicogênio, quanto ao zoneamento. Porém, a análise inter-lobular mostrou que o lóbulo superior, que não é o maior, armazenou maior quantidade de glicogênio que os demais lóbulos (tabela VII, $P < 0,05$ e da SILVA & GONÇALVES, 1994). O lóbulo superior corresponde a 33% da massa hepática e contém 36% da reserva de glicogênio, enquanto o lóbulo direito possui 26% da massa e 32% da reserva de glicogênio, enquanto o lóbulo esquerdo possui 41% da massa e 32% da reserva de glicogênio.

As reservas de glicogênio também foram avaliadas em condições que induzem a mobilização. Após exercício forçado (natação durante 50 min), e jejum 24 h observamos que a depleção ocorreu de forma homogênea, influenciada pela ação neuroendócrina, que induz a liberação de glucagon, hormônio de crescimento, hormônio adrenocorticotrófico, catecolaminas, prolactina e peptídeos opióides (NATHELSON et al., 1981, HALTER et al., 1984, SONNE & GALBO, 1985; YAMAGUCHI, 1992, FLUXE et al., 1993). Por outro lado, após 48 h de jejum verificamos a recuperação parcial das reservas

hepáticas, devido a utilização do glicerol proveniente da lipólise, na re-síntese de glicogênio (SOTSKY et al., 1989; LAVOIE & VAN DE WERNE, 1991).

A utilização da metformina, em monoterapia promove a redução de 20% na glicemia, e quando combinada com sulfoniluréia promove uma redução adicional de 25% (DE FRONZO et al., 1991, CAPRETTI et al., 1982). A avaliação da distribuição de glicogênio no fígado de ratos diabéticos por aloxana tratados com metformina (tabela VII), mostrou que as reservas foram restabelecidas. A possível recuperação das reservas hepáticas se deve à capacidade da metformina em suprimir a gliconeogênese hepática (PERRIELLO et al., 1994), e potencializar a formação de segundo mensageiros ou atuar em alguma etapa do sistema sinalizador da insulina a nível pós-receptor (SADOUL et al., 1986; BLAKE et al., 1987; CARO et al., 1986; OLEFSKY et al., 1988; KAHN & WHITE, 1988).

Todos estes efeitos sugerem que a metformina preservou a sensibilidade dos hepatócitos à insulina (tabela VIII e da SILVA & GONÇALVES, 1994) que segundo MELIN et al.(1990), regularia a atividade da tirosina quinase ligada ao receptor recuperando a capacidade de sintetizar glicogênio.

III) AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO FENOBARBITAL *IN VIVO* E *IN VITRO* SOBRE AS RESERVAS ERITROCITÁRIAS DE GLICOGÊNIO.

Fenobarbital é um barbitúrico que conhecidamente atua como indutor enzimático sobre diferentes sistemas, principalmente sobre as oxidases, e o citocromo P450, não modificando a glicemia durante o jejum e melhorando a glicemia de diabéticos tipo II (LAHTELA et al., 1986).

Considerando que os hepatócitos e os eritrócitos participam da homeostasia da glicose partilhando de algumas propriedades ligadas ao transporte de glicose e formação de reservatórios de glicogênio, estudamos *in vivo* os efeitos do tratamento com fenobarbital sobre a glicemia e a concentração eritrocitária de glicogênio. O fenobarbital não induziu modificações na concentração plasmática de glicose (tabela VIII) e não modificou o conteúdo eritrocitário de glicogênio de animais controle (tabela IX). Porém, nos ratos diabéticos tratados com fenobarbital (tabela IX), o fenobarbital promoveu recuperação parcial das reservas eritrocitárias de glicogênio sendo acompanhada pela redução na glicemia (tabela VIII, $P < 0,05$).

Para avaliar se o tratamento com fenobarbital influencia a síntese eritrocitária de glicogênio, incubamos eritrócitos de ratos controle e diabéticos em salina contendo diferentes concentrações de glicose e fenobarbital

(concentração final $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) (tabela A3 - anexo). Neste experimento observamos que o fenobarbital não induziu modificações na síntese de glicogênio em eritrócitos normais. Por outro lado, os eritrócitos de ratos diabéticos por aloxana incubados nas mesmas condições, apresentaram uma recuperação nas reservas de glicogênio, retomando a capacidade de incorporar ou liberar glicose de acordo com a variação da glicemia. A recuperação das reservas, possivelmente se deve a ação do fenobarbital enquanto indutor enzimático, que pode ter ativado a produção de glicose-6-fosfato, substrato ativador da glicogênio sintetase que se encontra inibida pelo diabetes (RAPIN et al., 1991).

IV) ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO ERITROCITÁRIA DE LACTATO E PIRUVATO

A captação e a excreção de monocarboxilatos como o lactato e o piruvato é um processo primordial na regulação do metabolismo energético e no equilíbrio ácido-básico (VOET & VOET, 1990). Os tecidos utilizam glicose produzindo lactato, o qual é liberado no plasma de onde é captado pelo fígado e utilizado na síntese de glicose ou ácidos graxos (KRAUS-FRIEDMANN, 1984; KATZ et al., 1986; KATZ, 1986; 1992).

A interconversão entre lactato e piruvato ocorre tanto nos eritrócitos quanto nos linfócitos, devido à presença da enzima lactato desidrogenase (CURI, 1994). No entanto, as trocas entre os monocarboxilatos sangüíneos e teciduais não refletem apropriadamente a compartimentalização (ROMIJN et al., 1994). Os transportadores de lactato e piruvato dos eritrócitos são idênticos aos encontrados nos hepatócitos e músculos, sendo responsáveis por 70% do fluxo através das membranas (EDLUND & HALESTRAP, 1988; ROTH & BROOKS, 1990). Aliás, tem sido demonstrado haver um desequilíbrio entre o conteúdo plasmático e tecidual de piruvato em virtude da rápida interconversão entre lactato e piruvato (LARGE et al., 1995).

Em nosso trabalho observamos que o conteúdo de lactato dos eritrócitos de ratos normais foi reduzido em 31% ($P<0,01$) ao passar pelo fígado (tabela A4 - anexo e figura 5), sugerindo que o lactato eritrocitário foi cedido aos hepatócitos. Esta proposta encontra apoio nas trabalhos de KATZ et al. (1986) e JUNGGERMANN & THURMAN (1992). As concentrações plasmáticas de lactato determinadas em ratos sedentários foram similares as observados recentemente por AZEVEDO (1994).

Nos ratos sob jejum de 48h, tanto as concentrações plasmáticas quanto as eritrocitárias de lactato foram reduzidas ($P<0,01$). No mesmo período, o conteúdo hepático de glicogênio foi 101% maior que o observado no jejum 24h, sugerindo que neste período os hepatócitos poderiam estar utilizando o lactato plasmático e/ou eritrocitário para a formação de glicose e consequentemente glicogênio, em acordo as propostas de KATZ et al., 1976; 1979; METCALFE et al., 1988; GUARNER & ALVAREZ-BUYLLA, 1989; e LARGE et al., 1995.

Quanto aos eritrócitos de ratos diabéticos, o conteúdo de lactato estava diminuindo, porém ainda persistia uma diferença entre as veias (37,5%, $P<0,05$). Possivelmente a redução nas concentrações de lactato (plasmático e eritrocitário), refletem a maior captação de lactato pelos hepatócitos de diabéticos como sugerido por KRAUS-FRIEDMAN (1984) e METCALFE et al. (1988).

O tratamento de ratos normais e diabéticos com metformina durante 7 dias (tabela A4 - anexo), ativou algum mecanismo compensatório pois, as concentrações de lactato foram idênticas às observadas nos grupos controle, não ocorrendo a formação excessiva de lactato que poderia favorecer o desenvolvimento de acidose láctica classicamente observado com a utilização de outras biguanidas (WILCOCK & BAILEY, 1990).

Quanto ao conteúdo de piruvato (tabela A5 - anexo e figura 6), observamos grandes diferenças entre o conteúdo dos glóbulos e do plasma, em virtude da rápida interconversão tecidual (METCALFE et al., 1986; FELIPE et al., 1991; WOLFE et al., 1995).

ROMIJN et al. (1994) demonstraram que a produção de piruvato pelos eritrócitos é pequena em relação ao conteúdo plasmático, o que também foi observado no nosso estudo. A única diferença a salientar é que nosso estudo mostra que ratos normais tratados com metformina, apresentaram elevação no conteúdo plasmático e eritrocitário de piruvato (tabela XIV e figura 6).

6. RESUMO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* e *in vitro* o conteúdo de glicogênio em eritrócitos de ratos, relacionando este conteúdo com as variações na concentração de glicose e/ou hormônios, tendo em vista a sua possível participação na homeostasia glicêmica. Por isso, estendemos este estudo aos eritrócitos de ratos diabéticos e aos efeitos de substâncias como a metformina e fenobarbital utilizadas no tratamento de diabéticos.

Eritrócitos de ratos normais (*in vivo* e *in vitro*) aumentaram o conteúdo de glicogênio linearmente à elevação da glicemia e depletaram suas reservas durante a hipoglicemia. O conteúdo eritrocitário de glicogênio é maior na veia supra-hepática e nas artérias de que no ramo venoso. Em ratos submetidos a jejum durante 24h, as reservas eritrocitárias de glicogênio foram depletadas, mas recuperam-se parcialmente durante o jejum de 48 h, mostrando um comportamento idêntico ao dos hepatócitos. Em resposta a uma condição indutora de estresse (natação forçada durante 50 min), também houve depleção das reservas hepáticas e eritrocitárias de glicogênio.

“In Vitro” a insulina não modificou o conteúdo de glicogênio dos eritrócitos. No entanto, hormônios glicogenolíticos promoveram intensa

depleção das reservas, mesmo na presença de altas concentrações de glicose.

Eritrócitos de ratos diabéticos, os quais, apresentam redução na captação e no metabolismo de glicose possuem baixo conteúdo de glicogênio e demonstraram baixa capacidade de incorporar glicose às reservas de glicogênio, *in vivo* e *in vitro*. Esta capacidade foi restabelecida parcialmente (*in vivo* e *in vitro*), pelo tratamento com fenobarbital ou com metformina. De maneira semelhante, o conteúdo de glicogênio no fígado de ratos diabéticos foi restabelecido.

Os ratos controle e diabéticos tratados com metformina e fenobarbital não apresentaram redução na glicemia mostrando que o tratamento não induz hipoglicemia. Quanto à concentração plasmática de lactato, não observamos hiperlactatemia nos ratos tratados com metformina.

Nossos resultados mostraram que os eritrócitos são importantes reservatórios de glicose, captando-a durante a passagem pelo fígado e distribuindo-a na periferia. Também foi demonstrado que as reservas eritrocitárias de glicogênio são sensíveis a ação dos hormônios glicogenolíticos, à semelhança do que ocorre nos hepatócitos. Esta propriedade dos eritrócitos pode ser importante durante a hipoglicemia.

Este trabalho também mostrou diversas semelhanças entre hepatócitos e eritrócitos no que se refere ao metabolismo de carboidratos de ratos normais e diabéticos.

A avaliação periódica do conteúdo de glicogênio eritrocitário poderia constituir um bom índice de avaliação das alterações metabólicas (particularmente dos carboidratos) em estudos ou tratamentos que requerem frequente retiradas de amostras e naqueles em que tais amostragens são postergadas para épocas de sacrifícios ou após a morte natural do animal ou sujeito.

7. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O objetivo principal do presente trabalho foi demonstrar, sob diversas condições experimentais, que os eritrócitos participam do transporte e distribuição de glicose.

Os estudos *in vivo* demonstraram que:

1- Os eritrócitos possuem reservas de glicogênio maiores no ramo arterial do que no ramo venoso. Na veia porta o conteúdo de glicogênio dos eritrócitos é menor do que na veia supra-hepática. Estas diferenças sugerem que os eritrócitos participam do transporte e distribuição de glicose aos tecidos, captando-a no interior do fígado e liberando-a na periferia.

2 - O consumo eritrocitário de glicose é muito baixo em relação ao seu conteúdo de glicogênio ($0,05\mu\text{mol/ min/ ml}$ de eritrócitos), reforçando a proposta de que os reservatórios de glicose tem a finalidade de distribuição e não consumo.

3 - Quando o rato foi sujeito a uma condição indutora de estresse, as reservas eritrocitárias de glicogênio foram afetadas de modo similar ao observado nos hepatócitos.

a) durante o jejum de 24h houve mobilização das reservas de glicogênio dos eritrócitos

b) durante o jejum de 48h, as reservas de glicogênio dos eritrócitos foram parcialmente recuperadas.

c) durante a natação forçada houve depleção do glicogênio eritrocitário.

4 - Os eritrócitos de ratos diabéticos por aloxana perderam a capacidade de sintetizar glicogênio que foi restabelecida após o tratamento com metformina

5 - O tratamento de ratos diabéticos com o indutor enzimático fenobarbital, restabeleceu parcialmente as reservas eritrocitárias de glicogênio, possivelmente pela ativação da produção de glicose-6-fosfato, essencial para a ativação da glicogênio sintetase que se encontrava inibida no rato diabético.

6 - A concentração eritrocitária de lactato na veia porta é maior que na veia supra-hepática sugerindo que os eritrócitos fornecem lactato aos hepatócitos.

7 - A biguanida anti-hiperglicemiante, metformina, não induziu elevação na formação de lactato e piruvato pelos eritrócitos.

Os estudos *in vitro* demonstraram que:

8 - A incorporação ou liberação de glicose da reserva de glicogênio eritrocitário correlacionou-se fortemente ($r = 0,942$), com a variação da glicose do meio.

9 - Os hormônios glicogenolíticos, adrenalina (200 ng.ml^{-1}), noradrenalina (200 ng.ml^{-1}), corticosterona ($22 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$), e glucagon (1U/ml), promoveram depleção das reservas eritrocitárias de glicogênio. O efeito da adrenalina foi antagonizado parcialmente pelo Propranolol (agente bloqueador β_2 -adrenérgico).

10 - A insulina *per se* não modificou a captação de glicose e nem a formação eritrocitária de glicogênio.

11 - A metformina promoveu a recuperação da capacidade dos eritrócitos em reservar e depletar glicogênio, a qual estava comprometida pelo diabetes mellitus. Seu efeito requer insulina.

12 - O fenobarbital induziu a recuperação da capacidade dos eritrócitos de diabéticos sintetizarem glicogênio.

8. SUMMARY

SUMMARY

The major objective in the development of this work was demonstrate that erythrocytes participates in the glycemic homeostasis.

The following parameters was evalueted in erythrocytes: glucose consumption, glycogen storage, transport and mobilization and transport of lactate/pyruvate. The hepatic storage and mobilization of glycogen in certain condition was studied, too.

In vivo, we showed that erythrocyte glycogen content changed according to glycaemia in vessels. Arteriovenous difference and difference between portal and suprahepatic veins in glycogen content is parallel to glycemia differences. These are evidencies for the occurrence of hydrolysis of glycogen and release to plasma when glycemia falls and that erythrocyte take glucose up and synthetize glycogen when crossing the liver. Also, we presented evidences for an exchange of lactate for glucose between erythrocytes and liver.

In accordance to the results above mentioned, erythrocytes incubated in saline at 37°C increased, linearly, their content of glycogen with increase in extracellular glucose concentration and reduced it when glucose concentration diminished. Both, charge and discharge are well correlated to extracellular glucose concentration ($r = 0.942$), similarly to that measured “in vivo”.

Stressing conditions, as 24h fasting or heavy exercise (50 min swimming) almost deplete the erythrocytes glycogen content. Those conditions also acutely deplete glycogen liver stores. This response is characteristic of erythrocytes because they responded " *in vitro* " to hyperglycemic hormones, glucagon (1U/ml), adrenaline (200 ng.ml⁻¹), noradrenaline (200 ng.ml⁻¹) and corticosterone (22 µg.ml⁻¹), reducing their content of glycogen, even in the presence of high glucose concentration. This resembles the hepatocytes response to the same hormones. On the other hand, insulin do not affect erythrocyte glycogen content.

In contrast to normal, erythrocytes from aloxanized rats showed a pronounced reduction in their ability to store glucose as glycogen. This results suggest that glycogen synthesis is deficient in aloxanized rats, even in the presence of high glucose concentration. Metformin and phenobarbital, substances used as coadjuvant for the treatment of diabetes, also stimulated the accumulation of glycogen in diabetic erythrocytes, *in vivo* and *in vitro*. This is another similarity between liver and erythrocytes since those substances are known to recovery the ability of liver to synthesize and store glycogen. Those data confirm in rats the effects observed in human liver.

Our data demonstrated that glucose metabolism is defective in erythrocyte from diabetic rats, affecting both free and stored glucose

metabolism. As shown in liver and skeletal muscle, this defect is reversed in erythrocytes by treatment with metformin or phenobarbital

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUMRAD, N.A.; BRISCOE, P.; BETH, A.H. & WHITESELI, R. R. Temperature dependence of glucose transport in erythrocytes from normal and alloxan-diabetic rats. **Biochim. Biophys. Acta.** 938: 222 - 230, 1988.
- AGUIS ,L. & TOSH, D. Acinar zonation of cytosolic but not organelle-bound activities of PEPCK and aspartate aminotransferase in guinea pig liver. **Biochem. J.** 271: 387 - 391, 1990.
- AGOSTINO,C. Role of liver in pathophysiology of NIDDM, **Diabetes Care**,15 (3),:430 - 441, 1992.
- ALBERT, S.G. The effect of insulin on glucose transport in rabbit erythrocytes and reticulocytes. **Life Science.** 31: 265 - 271, 1982.
- ARIEFF, A.I. Phathogenesis of lactic acidosis. **Diabetes Metab. Rev.** 5: 637 - 649, 1989.
- AZEVEDO, J. R. M. Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados, durante e após o exercício agudo de natação. UNICAMP, 1994. 175p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, 1994.

BALDINI, P.; INCERPI, S.; PASCALE, E.; RINALDI, C.; VERNA, R. & LULY, P.

Insulin effects on human red blood cells. **Mol. Cell. Endocrinol.** 46: 93 - 102, 1986.

BAILEY, C.J. Biguanide and NIDDM. **Diabetes Care** 15: 755 - 772, 1992.

BAILEY, C.J. & PUAH, J.A. Effect of metformin on glucose metabolism in mouse soleus muscle. **Diabetes Metab.** 12: 212 - 218, 1986.

BALDINI, P., INCERPI, S. PASCALE, E. RINALDI, C. VERNA, R. & LULY, P. Insulin effects on human red blood cells. **Mol. Cell. Endocrinol.** 46: 93 - 102, 1986.

BARTELS, H.; VOGT, B. & HUNGERMANN, K. Glycogen synthesis via the indirect gluconeogenic pathway in the periportal and via the direct glucose-utilization pathway in the perivenous zone. **Histochemistry**, 89 : 253 - 260, 1988.

BECKMAN, B. S. & HOLLEMBERG, M. D. Beta adrenergic receptor and adenylate cyclase activity in rat reticulocytes and mature erythrocytes. **Biochem. Pharmacol.**, 28:239 - 248, 1979.

- BELL, G. I.; KAYANO, T.; BUSE, J.B.; BURANT.C. F.; TAKEDA, J.; LIN, D.; FUKUMOTO, H. & SEINO, S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**, 13 (3): 198 - 208, 1990.
- BEUTER, E.; WEST, C.; & BLUME, K.G. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. **J. Lab. Clin. Med.** 88: 328 - 334, 1976.
- BLAKE, A. D.; HAYES, N.S. & SLATER, E. E. Insulin receptor desensitization correlates with attenuation of tyrosine kinase activity, but not of receptor endocytosis. **Biochem. J.** 245: 357 - 364, 1987.
- BOBBIONI, E.; COSCELLI, C.; ZAVARONI, I. & ALPI, O. The effect of metformin on the insulin response in vitro and in vivo to arginine and glucose in normal rat. **Exc. Med.** 454: 353 - 358, 1979.
- BURANT, C.F.; SIVITZ, W.I.; FUKUMOTO, H.; KAYANO, T.; NAGAMATSU, S.; SEINO, S.; PESSIN, J.E. & BELL, G. Mammalian glucose transporters: Structure and Molecular Regulation. **Recent prog. Horm. Res.** 47: 1 - 42, 1991.
- CAHILL, G.F. Starvation in man. **New Engl. J. Med.** 19: 668 - 674, 1970.

CAMPBELL, P.J.; MANDARINO, L.J. & GERICH, J.E. Quantification of the relative impairment in actions on hepatic production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism** 37: 15 - 21, 1988.

CAPRETTI, L .; BONORA, E.; COSCELLI, C. & BUTTURINI, U. Combined sulphonylurea-biguanide therapy for non-insulin-dependent diabetics: metabolic effects of glibenclamide and metformin or phenphormin in newly diagnosed obese patients. **Curr. Med. Res** 7: 677 - 683, 1982.

CARO, J.F.; ITTOOP, O. & PORIES, W.J. Studies on the mechanism of insulin resistance in the liver from humans with non insulin-dependent diabetes. Insulin action and binding in isolated hepatocytes, insulin receptor structure, and kinase activity. **J. Clin. Invest.** 78: 249 - 258, 1986.

CARTER-SU, C.; PILLION, D.J. & CZECH,P. Reconstituted D-glucose transport from the adipocyte plasma membrane. Chromatographic resolution of transport activity from membrane glycoprotein using immobilized concanavalin A . **Biochemistry** 19: 2374 - 2385, 1980.

CASEY, C.; CONNOR, H.; PHILLIPS, P.; TUCKER, G.T.; WARD, J.D.; & WOODS, H.F. Metformin: absorption and disposition in healthy subjects and in diabetic patients. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 8: 382 - 383, 1979.

CIARALDI, T.P.; KOLTERMAN, G.O.; SCARLET, J.A.; KAO, M.; & OLEFSKY, J.M.

Role of glucose transport in the postreceptor defect of non - insulin - dependent diabetes mellitus. **Diabetes**. 31: 1016 - 1022, 1982.

CIVELEK,V.; YILMAZ,T. & SATMAN,I. Impaired glucose utilization as measured by

$^3\text{H}_2\text{O}$ production in erythrocytes of patients with type I diabetes mellitus.

Diabetes,40 (suppl 1), 60p, 1991.

COHEN, D.; PEZZINO, V. VIGNERI, R.; AROLA, R.; D'AGATA, R. & POLOSA, P.

Phenformin increases insulin binding to human cultured breast cancer cells.

Diabetes 29: 329, 1980.

CONGET, J.I.; SARRI, Y.; GONZALEZ-CLEMENT, J. M.; GOMIS, R. & MALLAISSE,

W. J. Impaired utilization of glucose by insulin-sensitive cells: studies in erythrocytes from normal and diabetic subjects. **Diabetologia** 34 (suppl. 2), 471p, 1991.

CONNEY, A.H. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction.

Pharmacol. Rev. 19: 215 - 226, 1984.

da SILVA, C. A. & GONÇALVES, A. A. Zoneamento hepático e recuperação das reservas de glicogênio em ratos diabéticos tratados com metformina. **IX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1994.**

De FRONZO, R.A. The triunvirate: β -Cell, muscle, liver. **Diabetes**, 37: 667- 687, 1988.

De FRONZO, R.A.; BARZILAI, N.; SIMONSON, D. Mechanism of metformin action in obese and learn non-insulin-dependent diabetic subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 73 : 1294 - 1301, 1991.

De FRONZO, R. A. & GOODMAN, A.M. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **N.Engl. J. Med.** 333: 541 - 549, 1995.

De GROOT, L. J. Endocrinology. (vol 1) 1389 - 1410, 1995. **W.B. Saunders Company.** Phyladelphia, U.S. A

DEUTICKE, B.; RICKERT, I. & BEYER, E. Stereo selective, SH-dependent transfer of lactate in human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta.** 507: 137 - 155, 1978.

- DEUTICKE, B.; BEYER, E. & FORST, B. Discrimination of three parallel pathways of L- lactate transport in the human erythrocyte membrane by inhibitors and kinetic properties. **Biochim. Biophys. Acta.** 684: 96 - 110, 1982.
- DONATELLI, M.; RUSSO, V.; BUCALO, M. L. ; SCARPINATO, A. & IRACI, T. Erythrocyte glucose, ATP, lactate concentrations and their modifications induced by isologous plasma in non insulin dependent diabetes mellitus. **Diabetes Research** 16: 121 - 125, 1991.
- DUBINSKY, W.P. & RACKER, E. The mechanism of lactate transport in human erythrocytes. **J. Membr. Biol.** 44: 25 - 36, 1978.
- EATON, J.H. Gluconeogenesis : progress in endocrinology and metabolism. **Metabolism**, 21; 945 - 990, 1972.
- EDLUND, G. L. & HALESTRAP, A. P. The kinetics of transport of lactate and pyruvate in to rat hepatocytes. **Biochem. J.** 249: 117 - 126, 1988.
- FAFOURNOUX, P.; REMESEY, C. & DEMIGNE, C. Propionate transport in rat liver cells. **Biochim. Biophys. Acta.** 818: 73 - 80, 1985.

FANTUS, I.G. & BROSSEAU, R. Mechanism of action of metformin: insulin receptor and post-receptor effects in vitro and in vivo. **J.Clin.Endocr**, 63 (4), 898 - 905, 1986.

FARQUHARSON, E.J.; JAMIESON, C. MC PHEE, G.B.; & LOGAN, R.W. A new sensitive microassay for the measurement of erythrocyte glycogen. **Clin. Chim. Acta**, 187: 89 - 94, 1990.

FELIG, P.; MARLISS, E.; OWEN, O. E. & CAHILL, G. F. Role of substrate in the regulation of hepatic gluconeogenesis in man. **Adv. Enzim. Regul.**, 7: 41 - 46, 1969.

FELIG, P.; SHEWIN, R. S.; SOMAN, V.; WAHREN, J.; HENDLER, R.; SACCA, L.; EIGLER, N.; GOLDBERG, D.; & WALESKY, M. Hormonal interactions in the regulation of blood glucose. **Recent Progress. Horm. Res.**, 35: 501 - 529, 1979.

FELIPE, A.; REMESAR, X. & PASTOR-ANGLADA, M. L-Lactate uptake by rat liver. Effect of food deprivation and substrate availability. **Biochem. J.** 273: 195 - 198, 1991.

FERRANNINI, E. & BJORKAMN, O. Role of red blood cells in the regulation of blood glucose levels in man. **Diabetes**, 35 (suppl.1), 39p, 1986.

FLUXE, K.; ANDERSON, K.; ENEROTH, P.; SIEGEL, R. A. & AGNATI, L. F.

Immobilization stress- induced changes in discret hypothalamic catecholamine levels and turnover: their modulation by nicotine and relationship to neurocrine function. **Acta physiol. Scand.** 117: 421 - 421, 1993.

FOLEY, J.E.; KASHIWAGI, A.; VERSO, M.A.; REAVEN, G.; & ANDREWS, J.

Improvement in vitro insulin action after one month of insulin therapy in obese noninsulin - dependent diabetics: measurements of glucose transport and metabolism, insulin binding, and lipolysis in isolated adipocytes. **J. Clin. Invest.** 72: 1901, 1983.

GALUSKA, D.; ZIERATH, J.; THORNE, A. SONNENFELD, T. & WALLBERG -

HENRIKSSON, H. Metformin increases insulin - stimulated glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. **Diabete & Metabolism**, 17:159-163, 1991.

GAMBHIR, K. K.; ARCHER, J.A.; & BRADLEY, C.J. Characteristics of human

erythrocyte insulin receptors. **Diabetes**, 27: 701-708, 1978.

GAMBHIR, K. K. & ARGAWAL, V. R. Red blood cell insulin receptors in health and

disease. **Biochem. Med. Metab. Biol.** 45: 133 - 153, 1991.

GAMBHIR, K. K.; NERURKAR, S.G.; DAS, P.D.; ARCHER, J.A.; & HENRY, W.L.

Insulin binding and degradation by human erythrocytes at physiological temperature. **Endocrinology**, 109: 1787 - 1789, 1981.

GARVEY, W.T. ; OLEFSKY, S.; MATTHAEI, S. & MARSHALL, S. Glucose and

insulin co-regulate the glucose transport system in primary cultured adipocytes. a new mechanism of insulin resistance. **J. Biol. Chem.** 262: 189 - 197, 1987.

GIACCHI, M. & VATTI, R. Inhibitor effect of metformin on the development of

cholesterol arteriosclerosis in the rabbit observations on the coronary vessels.

Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 57: 552 - 555, 1981.

GOLDSTEIN, D.E. & CURNOW, R.T. Effect of starvation on hepatic glycogen

metabolism and glucose homeostasis. **Metabolism**, 27: 315 - 323, 1978.

GUARNER, V. & ALVAREZ-BUYLLA, R. Erythrocyte and glucose homeostasis in

rats. **Diabetes**, 38: 410 - 415, 1989.

GUARNER, V. & ALVAREZ-BUYLLA, R. Compensation by fetal erythrocyte of

plasma glucose changes in rats. **Diabetes**, 39: 1197 - 1199, 1990.

HALTER, J. B.; BEARD, J. C. & PORTE, D. Islet function and stress hyperglycemia : plasma glucose and epinephrine interaction. **Am. J. Physiol.** 247: E47 - E52, 1984.

HALESTRAP, A.P. Transport of lactate and pyruvate into human erythrocytes. **Biochem.J.** 156: 193 - 207, 1976.

HARVEY, J. W. & KANEKO, J. J. Glucose metabolism of mammalian erythrocyte. **J. Cell. Biol.** 89: 219 - 224, 1976.

HASSID, W. Z. & ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysys of polysaccharides. **Methods Enzimol.**, 3: 34 - 36, 1957.

HAUPT, E.; KNICK, B.; KOSCHINSKY,T.; LIEBERMEISTER, H.; SCHNEIDER, J. & HIRCHE,H. Oral antidiabetic combination therapy with sulphonylureas and metformin. **Diabete & Metabolism** 17: 224 - 231, 1991.

HAWKEY,C.M.; BENNETT,S.C.G.; HART,M.G.; KIRKWOOD, J.K. Erythrocyte size, number and hemoglobin content in vertebrates. **Britsh.J.Haemat.**, 77: 392 - 397,1991.

HERS, H.G.; VERHUE, W. & VAN HOOFF, F. The determination of amylo - 1,6 - glucosidase. **Eur. J. Biochem.** 2: 256 - 264, 1967.

HOLLE, A.; MANGELS, W. & DREYER, M.; KIRCHNAU, J. & RUDIGER, H.W.

Biguanide treatment increases the number of insulin receptor sites in human erythrocytes. **N. Engl. J. Med.** 305: 563 - 566, 1981.

JACQUEZ, J. A. Red blood cell as glucose carrier: significance for placental and cerebral glucose transfer. **Am. J. Physiol.**, 246: 289 - 298, 1984.

JACKSON, R. A.; HAWA, M.I.; JASPAN, J.V. SIMA. B.M.; DISILVIO, L. FEATHERBE, D. & KURTZ. D. Mechanism of metformin action on non - insulin-dependent diabetes. **Diabetes** 36: 632 - 640, 1987.

JOHNSON, A. B.; WEBSTER, J. M.; & SUM, C.F. The impact of metformin therapy on hepatic glucose production and skeletal muscle glycogen synthase activity in overweight type II diabetic patients. **Metabolism**. 42: 1217 - 1222, 1993.

JUNGERMANN, K. Zonal liver cell heterogeneity. **Enzyme**, 46 : 1 - 32, 1992.

JUNGERMANN, K. & THURMAN, R. G. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. **Enzyme**, 46 : 33-58, 1992

KAHN, C. R. & WHITE, M. F. The insulin receptor and molecular mechanism of insulin action. **J. Clin. Invest.** 82: 1151 - 1156, 1988.

KANEKO, J. J. Comparative erythrocyte metabolism. **Adv. Vet. Comp. Med.** 8, 117 - 153, 1974.

KARVONEN, I.; STENGARD, J.H. & HUUPPONEN, R. Effects of enzyme induction therapy on glucose and drug metabolism in obese mice model of non-insulin dependent diabetes mellitus. **Diabetes Res.** 10: 85 - 92, 1989.

KATO, S.; KAWABE, T.; MIYAMOYO, T.; MASUNAGA, R.; ITO, M.; MUKUNO, T.; SAWAI, Y.; TANABE, E.; KATAOKA, K.; NAKAGAWA, H.; ITO, M.; AONO, T.; & NAGASAKA, A. Glucose uptake by erythrocytes in NIDDM. **Diabetes** 39 (SUPPL.1) 1117, 1990.

KATZ, J. The application of isotopes to the study of lactate metabolism. **Med. Sci. Sports Exercise** 18: 353 - 359, 1986.

KATZ, J. On the determination of turnover in vivo with tracers. **Am. J. Physiol.** 263 (Endocrinol. Metab.26): E417 - E424, 1992.

KATZ, J. & McGARRY, J. D. The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism? **J.Clin. Invest.** 74: 1901 - 1909, 1984.

- KATZ, J.; KUWAJIMA, M.; FOSTER, D. W.; McGARRY, M. J. D. The glucose paradox: new perspectives on hepatic carbohydrate metabolism. **TIBS**. 11: 136 - 140, 1986.
- KATZ, J.; GOLDEN, S. & WALS, P. A. Glycogen synthesis by rat hepatocytes. **Biochem. J.** 180, 389 - 402, 1979.
- KATZ, J.; GOLDEN, S. & WALS, P. A. Stimulation of hepatic glycogen synthesis by amino acids. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 73 (10), 3433 - 3437, 1976.
- KAUFFMAN, F. C.; EVANS, R. K.; & THURMAN, R. G. Alterations in nicotinamide and adenine nucleotide system during mixed-function oxidation of p-nitroanisole in perfused livers from normal and phenobarbital-treated rats. **Biochem. J.** 166: 583 - 592, 1977.
- KLIP, A.; GUMA, A.; RAMLET, T.; BILAN, P. J.; LANN, L. & LEITER, L. A. Stimulation of hexose transport by metformin in L6 muscle cells in culture. **Endocrinology**., 130: 2535 - 2544, 1992.
- KLIP, A. & LEITER, L. A. Cellular mechanism of action of metformin. **Diabetes Care** 13: 696 - 704, 1990.

KOLTERMAN, O. G.; GRAY, R. S.; GRIFFIN, J.; BURSTEIN, P.; INSEL, J. SCARLETT, J. A.; & OLEFSKY, J. M. Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in non insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.** 68: 957, 1981.

KRAUS-FRIEDMANN, N. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. **Physiol. Rev.** 64 (1): 170 - 241, 1984.

LAHTELA, J. T.; ARRANTYO, A. J. & SOTANIEMI, E. A. Enzyme inducers improve insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic subjects. **Diabetes** 34: 911 - 916, 1986.

LAHTELA, J.T.; GACHALYI, B. & EKSZYMA, S. The effect of liver microsomeal enzyme inducing and inhibiting drugs on insulin mediated glucose metabolism in man. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 21: 19 - 26, 1986.

LAHTELA, J. T.; SARKKA, P. & SOTANIEMI, E. A. Phenobarbital treatment enhances insulin mediated glucose metabolism in man. **Res. Commun. Chem. Phatol. Pharmacol.** 44: 215 - 226, 1984.

LAHTELA, J. T.; GACHALYI, B. & EKSZYMA, S. The effect of liver microsomeal enzyme inducing and inhibiting drugs on insulin mediated glucose metabolism in man. **Br. j. Clin. Pharmacol.** 21: 19 - 26, 1986.

LALAU, J. D.; LACROIX, C.; CAGNY, B.; RIGAUD, B.; BLEICHNER, G. CHAVEAU, P.; DULBECCO, P.; GUÉRIN, C.; HAEGY, J. M.; LORAIT, P.; MARCHAND, B.; RAVAUD, Y.; WEYNE, P. & FOURNIER, A. Role of metformin accumulation in metformin- associated lactic acidosis. **Diabetes Care** 18: 779 - 784, 1995.

LAMAIGUE, F. P. & ROUSSEAU, G. Transcriptional controle of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. **Biochem. J.** 303: 1 - 14, 1994.

LARGE, M. V.; SOLOVIEV, H. M.; BRUNENGRABER, H. & BEYLOT, M. Lactate and pyruvate isotopic enrichments in plasma and tissue of postabsortive and starved rats. **Am. J. Physiol.** 268: E880 - E888, 1995.

LAVOIE, L. & VAN DE WERVE, G. Hormone-stimulated glucose production from glycogen in hepatocytes from streptozotocin diabetic rats. **Metabolism**, 40 (10): 1031-1036, 1991.

LEE, E.J. & YALOW, R.S. Influence of age of erythrocytes on their insulin receptors. **Diabetes** 29: 164 - 166, 1980.

LIN, S. & SPUDICH, J.A. Biochemical studies on the mode of action of cytochalasin B binding to red cell membrane in relation to glucose transport. **J. Biol. Chem.** 249: 5778 - 5783, 1974.

LORD, J. ; PUAH, J.A.; ATKINS, T.; BAILEY, C. Postreceptor effect of metformin on insulin action in mice. **J. Pharm. Pharmacol** 37: 821 - 823, 1985.

MAGNANI, M.; PIATTI, E.; DACHÀ, M.; FORNAINI, G. Comparative studies of glucose metabolism on mammals' red blood cells. **Comp. Biochem. Physiol.** 67B: 139 - 342, 1980.

MAGNANI, M.; DACHÀ, M., BOSSÙ, M. & FORNAINI, G. Comparative studies on the red blood cell glucose phosphorylating activities of mammals. **Comp. Biochem. Physiol.** 60B, 323 - 327, 1978.

MAIRBAURL, H. & HUMPELER, E. The influence of adrenaline on the metabolism of erythrocytes in vitro. **Biochem. Soc. Trans.** 9: 99 - 100, 1981.

MANUKHIN, B. NESTEROVA, L.A. & SMUROVA, E.A. Characteristics of kinetics of interaction between beta-adrenoceptors of rat erythrocytes and a specific blocker propanolol. **Biologicheskie Membrany (Moscow)** 11 (5) : 489 - 495, 1994.

MARBACH, E.P. & WEIL, M.H. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. **Clin. Chem.** 13: 314, 1967.

MARQUIE, G. Effect of metformin on lipid metabolism in the rabbit aortic wall.

Atherosclerosis 30: 165 - 175, 1978.

MARSHALL, S. Kinetics of insulin action on protein synthesis in isolated adipocytes.

Ability of glucose to selectively desensitize the glucose transport system without altering insulin stimulation of protein synthesis. **J. Biol. Chem.** 264: 2029 - 2036, 1989.

MATSUMOTO, J. & KAWAKAMI, M. The unit concept of hepatic parenchyma are examination- based on angioarchitectural studies. **Acta Phat. Jpn.** 32, 285-314, 1982.

MATTHAEI, S. & GRETEN, H. Evidence that metformin ameliorates cellular insulin resistance bu potentiating insulin-induced translocation of glucose transporters to plasma membranes. **Diabetes e Metabolism**, 17: 150 - 158, 1991.

MATTHAEI, S.; KLEIN, H.H.; & HAMANN, A. Potential mechanism of metformin action: potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporter rat adipocytes. **Diabetologia** 31: 519p, 1989.

MELIN, B.; CHERQUI, G.; BLIVET, M.J.; CARON, M.; LASCOLS, O.; CAPEAU, J. & PICARD, J. Dual effect of metformin in culture rat hepatocytes: potentiation of

insulin action and prevention of insulin - induced resistance. **Metabolism**, 39 (10): 1089 - 1095, 1990.

METCALFE, H.K.; MONSON, S.G.; WELCH, S.G. & COHEN, R.D. Inhibition of lactate removal by ketone bodies in rat liver. Evidence for a quantitatively important role of the plasma membrane lactate transporter in lactate metabolism. **J. Clin. Invest.** 78: 743 - 747, 1986.

METCALFE, H.K.; MONSON, S.G.; COHEN, R.D. & PADGHAM, C. Enhanced carrier-mediated lactate entry into isolated hepatocytes from starved and diabetic rats. **J. Biol. Chem.** 263 (36): 19505 - 19509, 1988.

MONSON, J. P.; SMITH, J.A.; COHEN, R.D. & ILES, R.A. Evidence for a lactate transporter in the plasma membrane of the rat hepatocyte. **Clin. Sci. Lond.** 62: 411 - 420, 1982.

MOSES, S.W.; BASHAN, N. & GUTMAN, A. Glycogen metabolism in the normal red blood cell. **Blood**, 40 (6): 836 - 843, 1971.

MOSES, S.W.; BASHAN, N. & GUTMAN, A. Properties of glycogen synthetase in erythrocytes. **Eur. J. Biochem.** 30: 205 - 210, 1972.

- MURPHY, J.R. Erythrocyte metabolism. Glucose metabolism and pathways. **J. Lab. Clin. Med.** 55: 286, 1960.
- NALTELSON, B. H.; TAPP, N. N.; ADAMUS, J. E.; MITTLER, J. C. & LEVIN, B. E. Humoral indices of stress in rats. **Physiol. Behav.** 26 (6): 1049 - 1054, 1981.
- NOSADINI, R.; AVOGARRO, A.; TREVISAN, R.; VALERIO, A.; TESSARI, P.; DUNER, E.; TIENGO, M.; VELUSSI, M.; DEL PRATO, S.; KREUTZENBERG, S.; MUGGEO, M. & CREPALDI, G. Effect of metformin on insulin stimulated glucose turnover and insulin binding to receptors in type II diabetes. **Diabetes Care** 10: 62 - 67, 1987.
- OLEFSKY, J.M. & REAVEN, G.M. Insulin binding in diabetes. Relationship with plasma insulin levels and insulin sensitivity. **Diabetes** 26: 680, 1977.
- OLEFSKY, J. M.; GARVEY, W. T. & HENRY, R. R. Cellular mechanism of insulin resistance in non-insulin-dependent (type II) diabetes. **Am. J. Med.** 28 : 86 - 105, 1988.
- OPIE, L. H. & MANSFORD, R.L. The value of lactate and pyruvate measurement in the assessment of the redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm of perfused rat heart. **Eur.J. Clin.Invest.** 1: 295 - 306, 1971.

OSTMAN-SMITH, I. Adaptative changes in the sympathetic nervous system an some effector organs of the rat following long term exercise or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. **Acta Physiol. Scand.** suppl 47: 1 - 40, 1979.

PETERSON, S.W.; MILLER, A.L. KELLEHER, R.S. & MURRAY, E.F. Insulin receptor down regulation in human erythrocytes. **J.Biol. Chem.** 276 (16), 9605 - 9607, 1983.

PÉNICAUD, L.; HITIER, Y.; FERRÉ, P. & GIRARD, J. Hipoglycaemic effect of metformin in genetically obese (fa/fa) rats results from an increase utilization of blood glucose by intestine. **Biochem. J.** 262: 881- 885, 1989.

PENTIKAINEN, P.J.; NEUVONEN, P.J. & PENTTILA, A. Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 16: 195 - 202, 1979.

PERRIELLO, G.; MISERICORDIA, P.; VOLPI, E. SANTUCCI, A.; SANTUCCI, C.;
 FERRANNINI, E.; VENTURA, M.M.; SANTEUSANIO, F.; BRUNETTI, P.; &
 BOLLI, G. Acute antihyperglycemic mechanism of metformin in NIDDM.
Diabetes 43: 920 - 928, 1994.

PERRIELLO, G.; MISERICORDIA, P.; SANTEUSANIO, F.; BRUNETTI, P.; &
 BOLLI, G. The direct antihyperglycemic mechanism of metformin in
 NIDDM. **Diabetes** 39 (suppl 1) : 282 A, 1990.

PILKS, S. J. & GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic
 gluconeogenesis and glycolysis. **Ann. Rev. Physiol.** ,54:885 - 909, 1992.

POOLE, R.C. & HALLESTRAP, A.P. Identification and partial purification of the
 erythrocyte lactate transporter. **Biochem. J.** 283: 855 - 862, 1992.

PRAGER, R.; SCHERNTHANER, G. & GRAF, H. Effect of metformin on peripheral
 insulin sensitivity in non-insulin dependent diabetes mellitus. **Diabetes metab.**
 12: 219 - 224, 1986.

PURELLO, F.; GULLO, D. & BUSCEMA, M.; PEZZINO, V.; VIGNERI, R. &
 GOLDFINE, I. D. Metformin enhances certain insulin actions in cultured rat
 hepatoma cells. **Diabetologia** 31: 385 - 389, 1988.

PURELLO, F.; GULLO, D. & BUSCEMA, M.; PEZZINO, V.; VIGNERI, R.; GOLDFINE, I. D.; ITALIA, S. & VIGNERI, R. Direct effect of biguanides on glucose utilization in vivo. **Metabolism** 36: 774 - 776, 1987.

RAPIN, J. R.; LESPINASSE, C.; YOA, R. & WIERNSPERGER, N. Erythrocyte glucose consumption in insulin-dependent diabetes: effect of metformin in vitro. **Diabete & metabolism**, 17: 164 - 167, 1991.

RAPOPORT, S. The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes. **Essays. Biochem.** 4: 69 - 103, 1968.

RICCIO, A.; DEL PRATO, S.; KREUTZENBERG, S.V. & TIENGO, A. Glucose and lipid metabolism in non-insulin-dependent diabetes. Effect of metformin. **Diabete & metabolisme** 17: 180 - 184, 1991.

RODRIGUEZ-GIL, J. E.; GÓMEZ-FOIX, A. M.; ARINO, J.; GUINOVART, J. J. & BOSCH, F. Control of glycogen synthase and phosphorylase in hepatocytes from diabetic rats. **Diabetes.**, 38: 793 - 98, 1989.

ROGNSTAD, R. Possible futile glycogen cycling in hepatocytes. **Biochem. Arch.** 7: 221 - 226, 1991.

- ROMIJN, J. A.; CHINKES, D. L.; SCHWARZ, J. M. & WOLFE, R. R. Lactate-pyruvate interconversion in blood: implications for in vivo tracer studies. **Am. J. Physiol.** (Endocrinol. Metab. 29): E334 - E340, 1994.
- ROSE, I. A. Regulation of human red cell glycolysis. A review. **Exp. Eye. Res.**, 11: 264 - 272, 1971.
- ROSSETTI, L.; DeFRONZO, R.A.; GHERZI, R.; STEIN, P.; ANDRAGHETTI, G.; FALZETTI, G.; SHULMAN, G. I.; KLEIN-ROBBENHAAR, E. & CORDERA, R. effect of metformin treatment on insulin action in diabetic rats: in vivo and in vitro correlations. **Metabolism** 39 (4): 425 - 435, 1990.
- ROTH, D. A. & BROOKS, G. A. Lactate transport is mediated by a membrane-bound carrier in rat skeletal muscle sarcolemmal vesicle. **Arch. Biochem. Biophys.** 279: 377- 385, 1990.
- SADOUL, J. L.; FREDENRICH, A.; & GAUTIER, N. Modulation de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline par le glibenclamide dans les hépatocytes de rat. **Ann. Endocrinol.** 47: 226, 1986.
- SANTOS, R. F.; NOMIZO, R.; WAJHNBERGER, B. L.; REAVEN, G.M. & AZHAR, S. Changes in insulin receptor tyrosine kinase activity associated with metformin treatment of type 2 diabetes. **Diabete & Metabolism**, 21: 274 - 280, 1995.

SARABIA, V.; LAM, L.; BURDETT, E.; LAITER, L.A.; KLIP, A. Glucose transport in human skeletal muscle cell in culture. **J.Clin. Invest**, 90: 1386 - 1395, 1992.

SCHAFER, G. Guanidines and biguanides. **Pharmacol. Ther.** 8: 275 - 295, 1980.

SCHAFER, G. Interaction of biguanides with mitochondrial and synthetic membranes. The role of phospholipids as natural binding sites. **Eur. J. Biochem.** 45: 57 - 66, 1974.

SCHAFER, G. Biguanides. **Diabete & metabolisme** 9: 148 - 163, 1983.

SCHAFER,G. Some new aspects on the interaction of hypoglycemia-producing biguanides with biological membranes. **Biochem. Pharmacol** 25: 2015 - 2024, 1976.

SCHAFER, G. Interaction of biguanides with mitochondrial and synthetic membranes. **Eur. J. Biochem.** 27: 364 - 375, 1972.

SCHAFER,G. On mechanism of action of hypoglycaemia-producing biguanides. A re-evaluation and a molecular theory. **Biochem. Pharmacol**, 25: 2005-2014,1976.

- SCHATZ, H.; KATSILAMBROS, N.; NIERLE, C. & PFEIFFER, E. E. The effect of biguanides on secretion and biosynthesis of insulin in isolated pancreatic islet of rats. **Diabetologia** 8: 402 - 407, 1972.
- SEGERS, O.; SOMERS, G. SENER, A. & MALLAISSE, W.J. Blood glycogen and metabolic control in diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, 7: 207 - 210, 1990.
- SIDBURY, J.B.; CORNBATH, M.; FISHER, J. & HOUSE, E. Glycogen in erithrocytes of patients with glycogen storage disease. **Pediatrics**, 27: 103 - 111, 1961.
- SIMPSON, I. A. & CUSHMAN, S. W. Hormonal regulation of mammalian glucose transport. **Ann. Rev. Biochem.** 55: 1059 - 1089, 1986.
- SIRTORI, C.R.; CATAPANO, A.; GHISELLI, G.C.; INNOCENTI, A.L.; & RODRIGUEZ, J. Metformin: an antiatherosclerotic agent modifying very low density lipoproteins in rabbits. **Atherosclerosis** 26: 79 - 89, 1977.
- SIU LO; RUSSEAU, J. C. & TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.** 28 (2): 234 - 236, 1970.
- SMUROVA, E. A. Functional characterization of beta-2-adrenoreceptors of membrane preparations and intact erythrocytes of rats. **Ontogenez**. 25 (6): 42 - 46, 1994.

SONNE, B. & GALBO, H. Carbohydrate metabolism during and after exercise in rats: studies with radioglucose. **J. App. Physiol.** 59 (5): 1627 - 1639, 1985.

SOTSKY, M. J.; SHILO, S. & SHAMOON, H. Regulation of counterregulatory hormone secretion in man during exercise and hypoglycemia. **J. Clin. Endocrin. Metab.** 68: 9 - 16, 1989.

STUMVOLL, M.; NURJAHAN, M.D.; PERRIELLO, G.; DAILEY, G. & GERICH, J. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **New Engl. J. Med.** 333: 550 - 554, 1995.

THOMOPOULOS, P. ; BERTHELLIER, M. & LAUDAT, M.H. Loss of insulin receptors on maturation of reticulocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 85: 1460 - 1465, 1978.

TRINDER, R. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem**, 6, 24 - 7, 1969.

TUCHER, C.T; PHILLIPS, P.; CASEY, C.; CONNOR, H.; WARD, J.D. & WOODS, H.F. Pharmacokinetics of metformin in man. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 12: 235 - 246, 1979.

- THURMAN, R.G. & KAUFFMAN, F.C. Factors regulating drug metabolism in intact hepatocytes. **Pharmacol. Rev.** 31: 229 - 251, 1980.
- VAN DIJK, G. ; BALKAN, B. ; LINDEFELDT, J. ; BOUWS, G.; SCHEURINK, A. J. W. ; AHRÉN, B. & STEFFENS, A. B. Contribution of liver nerves, glucagon, and adrenaline to the glycaemic response to exercise in rats. **Acta. Physiol. Scand.** 150: 305-313, 1994.
- VAN HOOFF, F. Amylo-1,6-glucosidase activity and glycogen content of the erythrocytes of normal subjects, patients with glycogen storage diseases and heterozygotes. **Eur. J. Biochem.** 2 :C 271 - 274, 1967.
- VENKATESAN, N.; DAVIDSON, M. B.; SIMSOLO, R.B. & KERN, P. A. Phenobarbital treatment enhances insulin-mediated glucose metabolism and improves lipid metabolism in the diabetic rat. **Metabolism**, 43 (3): 348 - 356, 1994.
- VIGNERI, R.; PEZZINO, V.; WONG, K. Y & GOLDFINE, I.D. Comparison of the in vitro effect of biguanides and sulfonilureas on insulin binding to its receptors in target cells. **J. Cell. Endocrinol. Metab.** 54: 95 - 99, 1982.
- VOET, D. & VOET, J. G. Biochemistry (New York: John wiley and Sons), p.568, 1990.

- WIDEN, E. I. M.; ERIKSSON, J. G. & GROOP, L. C. Metformin normalizes nonoxidative glucose metabolism in insulin-resistant normoglycemic first - degree relatives of patients with NIDDM. **Diabetes** 41: 354 - 358, 1992.
- WILCOCK, C. & BAILEY, C. J. Sites of metformin-stimulated glucose metabolism. **Biochem. Pharmacol**, 39 (11): 1831-1834, 1990.
- WOOLEN, N. & BAILEY, C.J. Inhibition of hepatic glucogenesis by metformin, synergism with insulin. **Biochem. Pharmacol**. 37: 4353 - 4358, 1988.
- WOLFE, R. R.; JAHOR, F. & MIYOSHI, H. Evaluation of the isotopic equilibration between lactate and pyruvate. **Am. J. Physiol**. 254: E532 - E535, 1988.
- WU, M.S.; JOHNSTON, P.; SHEU, W.H.; HOLLENBECK, C.B. JENG, C.Y.; GOLDFINE, I.D.; CHEN, Y. & REAVEN, G.M. Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. **Diabetes Care** 13: 1 - 8, 1990.

YAMAGUCHI, N. Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanism involved the liver, pancreas and adrenal gland. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 70: 167-206, 1992.

YOA, R. G.; RAPIN, J. R.; WIENSPERGER, N. F.; MATINAND, A. & BELLEVILLE, I. Demonstration of defective glucose uptake and storage in erythrocyte from non insulin dependent diabetic patients and effects of metformin. **Clin. Exp. Pharm. Physiol.** 20 :563-567, 1993.

YUNIS, J. J. & YASHMINEH, W.G. Glucose metabolism in human erythrocytes. In **Biochemical Methods in Red Cell Genetics**, pp. 1 - 49. Academic Press, New York.

ZOCCOLI, M. A.; BALDWIN, S. A. & LIENHARD, G.E. Monosaccharide transport system of the human erythrocyte. **Biol. Chem.** 253 : 6923 - 6930, 1978.

10. APÊNDICE

TABELA A1 - Concentração de glicogênio, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Hb, de eritrócitos de ratos controle incubados na presença de diferentes concentrações de glicose e hormônios. Os valores correspondem as médias $\pm$ E.P.M, $n=4$. As comparações entre as curvas de regressão foram analisadas estatisticamente pelo teste “t” de Student para os coeficientes de regressão (b), e a significância da diferença entre dois coeficientes de correlação ou de regressão foi realizado conforme especificado no Documento Geigy Scientific Tables. Dentre as curvas somente a curva com insulina não diferiu do controle ($P>0,05$). Legenda : ADR = Adrenalina; NOR = Noradrenalina; PROP = Propranolol; COR = Corticosterona; GLU = Glucagon; INS = Insulina.

GLICOSE	CONTROLE	ADR	ADR+PROP	NOR	COR	GLU	INS
mg.dl ⁻¹		200 ng/ml	400 ng/ml	200 ng/ml	22 μg / ml	1 U / ml	1U / ml
NIHIL	0,52 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,2	0,55 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,2	0,68 $\pm$ 0,1
40	9,72 $\pm$ 3,5	0,94 $\pm$ 0,3	4,50 $\pm$ 0,5	0,86 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,3	4,93 $\pm$ 0,2	8,36 $\pm$ 1,4
80	13,72 $\pm$ 0,7	1,77 $\pm$ 0,4	15,66 $\pm$ 2,8	1,11 $\pm$ 0,1	0,93 $\pm$ 0,1	7,58 $\pm$ 2,2	11,48 $\pm$ 0,1
120	21,52 $\pm$ 0,3	1,46 $\pm$ 0,4	14,49 $\pm$ 1,0	2,05 $\pm$ 0,2	0,72 $\pm$ 0,05	6,52 $\pm$ 0,9	16,68 $\pm$ 0,9
160	21,75 $\pm$ 1,4	1,20 $\pm$ 0,3	13,42 $\pm$ 0,7	1,58 $\pm$ 0,2	1,00 $\pm$ 0,1	4,47 $\pm$ 1,4	30,53 $\pm$ 5,8
200	24,64 $\pm$ 0,8	0,94 $\pm$ 0,1	15,23 $\pm$ 2,5	1,71 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,2	3,47 $\pm$ 1,5	32,93 $\pm$ 3,2
240	34,67 $\pm$ 0,8	1,06 $\pm$ 0,2	17,85 $\pm$ 0,7	2,41 $\pm$ 0,2	0,94 $\pm$ 0,1	6,53 $\pm$ 2,8	41,93 $\pm$ 4,4

TABELA A2 - Concentração de glicogênio, $\mu\text{g.g}^{-1}$ Hb, de eritrócitos de ratos normais e diabéticos incubados na presença de diferentes concentrações de glicose e metformina (concentração final $5.6 \mu\text{g.dl}^{-1}$), na presença ou ausência de insulina.. Os valores representam as médias $\pm$ E.P.M, $n=4$. As comparações entre as curvas de regressão foram analisadas estatisticamente pelo teste “t” de Student para os coeficientes de regressão (b), e a significância da diferença entre dois coeficientes de correlação ou de regressão foi realizado conforme especificado no Documenta Geigy Scientific Tables. As curvas d , e, f, g diferem do controle,($P<0,05$). Entre os diabéticos, as curvas f e g diferem da curva e ($P<0,05$).

GLICOSE mg.dl^{-1}	CONTROLE (a)	CONTROLE + INSULINA (b)	CONTROLE + METFORMINA (c)	CONTROLE + METFORMINA + INSULINA (d)	DIABÉTICOS (e)	DIABÉTICOS + METFORMINA (f)	DIABÉTICOS + METFORMINA + INSULINA (g)
NIHIL	$0,52 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,1$	$1,35 \pm 0,1$	$0,68 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,06$	$0,48 \pm 0,03$	$2,15 \pm 0,3$
40	$9,72 \pm 3,5$	$3,86 \pm 1,4$	$3,74 \pm 0,7$	$36,26 \pm 2,7$	$0,83 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,04$	$1,59 \pm 0,2$
80	$13,72 \pm 0,7$	$17,86 \pm 2,9$	$11,48 \pm 0,1$	$49,23 \pm 5,1$	$0,78 \pm 0,1$	$1,27 \pm 0,1$	$6,56 \pm 1,3$
120	$21,52 \pm 0,3$	$19,97 \pm 1,8$	$16,68 \pm 0,9$	$47,97 \pm 2,0$	$0,91 \pm 0,04$	$1,87 \pm 0,1$	$6,67 \pm 0,6$
160	$21,75 \pm 1,4$	$23,00 \pm 1,9$	$30,53 \pm 5,8$	$48,80 \pm 3,4$	$0,85 \pm 0,1$	$3,05 \pm 0,1$	$12,78 \pm 0,7$
200	$24,64 \pm 0,8$	$26,95 \pm 1,3$	$32,93 \pm 3,2$	$47,08 \pm 3,5$	$0,83 \pm 0,06$	$3,78 \pm 0,08$	$14,87 \pm 0,9$
240	$34,67 \pm 0,8$	$29,01 \pm 0,7$	$41,93 \pm 4,4$	$47,25 \pm 2,7$	$0,91 \pm 0,04$	$3,69 \pm 0,2$	$23,29 \pm 4,0$

TABELA A3: Efeito do fenobarbital *in vitro* sobre o conteúdo de glicogênio de eritrócitos de ratos normais e diabéticos. os eritrócitos foram incubados em solução salina (0,9%), em concentrações crescentes de glicose onde o fenobarbital (0,5 mg.ml¹) foi adicionado. Os valores representam as médias ± E.P.M., n=6. As comparações entre as curvas de regressão foram analisadas estatisticamente pelo teste “t” de Student para os coeficientes de regressão (b) e a significância da diferença entre dois coeficientes de correlação ou de regressão foi realizado conforme especificado no Documenta Geigy Scientific Tables. As curvas b , c, d, diferem do controle (P<0,05). Entre os diabéticos, a curva d difere da curva c (P<0,05) .

GLICOSE mg.dl ¹	CONTROLE (a)	CONTROLE TRATADO (b)	DIABÉTICO (c)	DIABÉTICO TRATADO (d)
NIHIL	0,52 ± 0,05	0,61 ± 0,7	0,72 ± 0,06	0,60 ± 0,04
40	9,72 ± 3,5	44,15 ± 5,4	0,83 ± 0,05	36,24 ± 8,7
80	13,72 ± 0,7	51,92 ± 2,6	0,78 ± 0,1	56,75 ± 3,3
120	19,02 ± 2,5	59,07 ± 7,4	0,91 ± 0,07	52,94 ± 0,2
160	21,75 ± 1,4	61,09 ± 4,2	0,85 ± 0,01	60,70 ± 6,3
200	24,64 ± 0,8	68,19 ± 4,5	0,83 ± 0,06	63,74 ± 3,1
240	34,67 ± 0,8	68,31 ± 4,6	0,91 ± 0,04	51,55 ± 5,5

TABELA A4) CONCENTRAÇÃO DE LACTATO (mmol.l⁻¹) NO SANGUE TOTAL, NO PLASMA E NOS ERITRÓCITOS DE RATOS.

Os valores foram expressos em mmol.l⁻¹ e correspondem às médias ± E.P.M, N= 6. A concentração de lactato nos eritrócitos foi estimada através da diferença entre a concentração total e plasmática de lactato (Δ). A significância estatística das diferenças entre as médias do conteúdo eritrocitário de lactato nos vasos (veia porta e veia supra-hepática) foi avaliada através de teste “t” de Student pareado, com significância ao nível de *P < 0,05.

GRUPOS	CONTROLE		JEJUM 24h		JEJUM 48h		DIABÉTICOS		C + METF		D + METF	
	VP	VSH	VP	VSH	VP	VSH	VP	VSH	VP	VSH	VP	VSH
SANGUE	1,20 ±	0,79 ±	4,45 ±	2,69 ±	0,15 ±	0,10 ±	0,71 ±	0,40 ±	1,00 ±	0,90 ±	0,83 ±	0,42 ±
TOTAL	0,1	0,04	0,5	0,4	0,03	0,004	0,05	0,2	0,007	0,006	0,01	0,05
PLASMA	0,78 ±	0,63 ±	2,89 ±	0,99 ±	0,12 ±	0,07 ±	0,46 ±	0,26 ±	0,73 ±	0,61 ±	0,39 ±	0,23 ±
	0,08	0,01	0,3	0,2	0,003	0,003	0,003	0,01	0,08	0,02	0,02	0,02
ERITRÓCITOS	0,41 ±	0,16 ±	1,58 ±	1,70 ±	0,020 ±	0,018 ±	0,24 ±	0,15 ±	0,38 ±	0,27 ±	0,45 ±	0,16 ±
Δ	0,1	0,004 *	0,2	0,2	0,003	0,003	0,03	0,02 *	0,02	0,08	0,03	0,02 *

Legenda : C = CONTROLE; METF = METFORMINA ; D = DIABÉTICOS

TABELA A5) CONCENTRAÇÃO DE PIRUVATO (mmol.l⁻¹) NO SANGUE TOTAL, NO PLASMA E NOS ERITRÓCITOS DE RATOS.

Os valores foram expressos em mmol.l⁻¹ e correspondem às médias ± E.P.M, N= 6. A concentração de piruvato nos eritrócitos foi estimada através da diferença entre a concentração total e plasmática de lpiruvato (Δ). A significância estatística das diferenças entre as médias do conteúdo eritrocitário de piruvato nos vasos (veia porta e veia supra-hepática) foi avaliada através de teste “t” de Student pareado, com significância ao nível de *P < 0,05.

GRUPOS	CONTROLE		JEJUM 24h		JEJUM 48h		DIABÉTICOS		C + METF		D. + METF	
	VP	VSH	VP	VSH	VP	VSH	VP	VSH	VP	VSH	VP	VSH
SANGUE	0,064 ±	0,062 ±	0,08 ±	0,09 ±	0,22 ±	0,18 ±	0,058 ±	0,057 ±	0,58 ±	0,53 ±	0,057 ±	0,032 ±
TOTAL	0,003	0,003	0,008	0,006	0,01	0,005	0,008	0,01	0,006	0,07	0,009	0,01
PLASMA	0,044 ±	0,040 ±	0,06 ±	0,05 ±	0,16 ±	0,15 ±	0,032 ±	0,034 ±	0,39 ±	0,33 ±	0,040 ±	0,029 ±
	0,03	0,003	0,006	0,001	0,005	0,01	0,008	0,009	0,04	0,04	0,01	0,006
ERITRÓCITOS	0,020 ±	0,022 ±	0,03 ±	0,02 ±	0,020 ±	0,020 ±	0,014 ±	0,010 ±	0,20 ±	0,20 ±	0,016 ±	0,019 ±
Δ	0,02	0,003	0,008	0,005	0,004	0,004 **	0,001	0,002	0,03	0,03	0,001	0,006

Legenda : C = CONTROLE; METF = METFORMINA ; D = DIABÉTICOS