

# EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DOS HORMÔNIOS CONTRARREGULADORES SOBRE O PERFIL GLICÊMICO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À HIPOGLICEMIA INDUZIDA POR INSULINA

EFFECT OF ADMINISTRATION OF HORMONES AGAINST REGULATORS ON THE PROFILE OF MICE UNDERGOING GLYCEMIC INSULIN-INDUCED HYPOGLYCEMIA

RODRIGO PLATH KWIATKOWSKI<sup>1</sup>, MATEUS DIAS ANTUNES<sup>2</sup>, MARIA MONTSERRAT DIAZ PEDROSA<sup>3</sup>

1. Biomédico pela Faculdade União das Américas (UNIAMÉRICA) e Especialista em Fisiologia Humana pela Universidade Estadual de Maringá (UEM); 2. Fisioterapeuta pelo Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR), Mestrando em Promoção da Saúde (Bolsista CAPES) pelo Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR); 3. Bióloga pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), Mestre e Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular) pela Universidade Estadual de Maringá (UEM).

\*Av. Guedner, 1610 - Jardim Aclimação, Maringá - PR, 87050-900. [mateus\\_antunes03@hotmail.com](mailto:mateus_antunes03@hotmail.com)

Recebido em 02/10/2016. Aceito para publicação em 16/11/2016

## RESUMO

Milhões de pessoas em todo o mundo são diabéticas, sendo grande parte destas, usuárias de terapia insulínica que o fazem buscando o controle dos níveis de glicose no sangue. Quando a dose de insulina é excessiva, a glicemia pode diminuir a valores muito baixos, quadro conhecido como hipoglicemia induzida por insulina (HII). Em um indivíduo normal, a hipoglicemia induz mecanismos que se utilizam de hormônios contrarreguladores para tentar contrabalancear o estado hipoglicêmico do indivíduo, o que não ocorre adequadamente no paciente diabético. Os estudos experimentais sobre a HII são numerosos em ratos normais e diabéticos, porém ainda escassos em camundongos. O objetivo desta investigação foi avaliar como os hormônios contrarreguladores da glicemia contrapõem-se à ação da insulina durante um episódio de HII em camundongos. O perfil glicêmico foi acompanhado durante 300 min após a administração de insulina. Os contrarreguladores foram administrados 15 min após a insulina. Não houve melhora do perfil glicêmico durante a queda da glicemia e/ou durante a recuperação da glicemia nos grupos tratados com contrarreguladores quando comparados com o grupo tratado com insulina. Nos grupos tratados com adrenalina e com hormônio do crescimento foi registrada uma recuperação da glicemia significativamente pior. Como vários animais vieram a óbito antes do término do acompanhamento, é provável que as doses de contrarreguladores empregadas em ratos não são adequadas para camundongos. Sugere-se o planejamento de novos experimentos para estabelecer essas doses.

**PALAVRAS-CHAVE:** Contrarregulação; Camundongos; Hipoglicemia; Insulina.

## ABSTRACT

Millions of people worldwide have diabetes, and many of these, insulin therapy users who do attempt to control glucose levels in the blood. When the insulin dose is too high, your blood sugar may decrease to very low values, condition known as insulin-induced hypoglycemia (IHI). In a normal individual, hypoglycemia induced mechanisms that use counterregulatory hormones to try to counteract the hypoglycemic state of the individual, which does not adequately occurs in diabetic patients. Experimental studies on HII are numerous in normal and diabetic rats, but still scarce in mice. The objective of this investigation was to evaluate how counterregulatory hormones glucose up to oppose the action of insulin during an episode of HII in mice. The glycemic profile was monitored for 300 min after insulin administration. The counterregulatory were administered 15 min after insulin. There was no improvement in glycemic profile during the fall of blood glucose and / or during the recovery of glucose in the groups treated with counterregulatory when compared to the insulin-treated group. In the groups treated with adrenaline and growth hormone was reported a recovery of blood glucose significantly worse. How many animals came to death before the end of follow-up, it is likely that counterregulatory doses used in mice are not suitable for mice. It is suggested planning new experiments to establish these doses.

**KEYWORDS:** Counterregulation; Mice; Hypoglycemia; Insulin.

## 1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus é uma doença crônica grave que acomete milhares de pessoas em todo o mundo, portanto, se faz necessário um tratamento intensivo e uma orien-

tação médica adequada<sup>1</sup>. Grande parte dos pacientes diabéticos faz uso da insulinoterapia para diminuir e controlar os níveis de glicose no sangue. O objetivo de reduzir as complicações crônicas do Diabetes é geralmente atingido com planos de tratamento intensivo utilizando insulina de longa e curta duração. Porém, à medida que o controle da glicemia melhora, o risco de hipoglicemia aumenta e isso pode se tornar uma dificuldade na utilização de planos terapêuticos que buscam atingir um controle rigoroso da glicemia<sup>2,3</sup>.

Quando um paciente diabético é tratado com insulina em doses excessivas, a glicemia pode diminuir a valores extremamente baixos, pois o excesso de insulina pode fazer com que a glicose sanguínea seja transportada rapidamente para o interior de células não-neuronais, insulino-sensíveis, em todo o corpo<sup>4</sup>. A terapia insulínica, essencial para os pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e alguns daqueles com diabetes tipo 2, tem na hipoglicemia, isto é, na queda anormal da glicose sanguínea, seu principal efeito adverso<sup>5</sup>. A hipoglicemia induzida por insulina (HII) ocorre em cerca de 90% dos pacientes com diabetes tipo 1<sup>6</sup> e pode desencadear alterações neurológicas, coma e morte<sup>7,8</sup>.

Em um indivíduo normal, a hipoglicemia dispara mecanismos contrarreguladores que diminuem a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, e estimulam a liberação de glucagon pelas células alfa pancreáticas, de adrenalina pela medula adrenal, de cortisol pelo córtex adrenal, de hormônio do crescimento pela hipófise e de noradrenalina pelos neurônios simpáticos pós-ganglionares. Os hormônios contrarreguladores determinam um efeito hiperglicemiante em um indivíduo<sup>9,10</sup>. Os dois principais efeitos do glucagon no metabolismo da glicose são: degradação do glicogênio hepático (glicogenólise) e aumento da produção de glicose a partir de substratos não-carboidratos (gliconeogênese), aumentando a disponibilidade de glicose na corrente sanguínea. O glucagon tem um papel primário e fundamental no combate à hipoglicemia<sup>9,4,11</sup>.

Quando o indivíduo se encontra hipoglicêmico, o efeito dos baixos níveis de glicemia sobre o hipotálamo estimula o sistema nervoso simpático. Uma das funções do sistema nervoso simpático é aumentar a disponibilidade de glicose: a adrenalina estimula maior liberação de glicose pelo fígado, aumentando a glicemia. Além disso, as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) diminuem a captação periférica de glicose, estimulam a gliconeogênese e induzem a lipólise. Em conjunto, essas ações aumentam a glicemia e disponibilizam outros substratos energéticos para os tecidos<sup>9,4,11,12</sup>.

O hormônio do crescimento também exerce efeitos sobre o metabolismo da glicose; ele diminui a captação de glicose pelas células e atua na redução da utilização de glicose para produção de energia, aumentando assim a glicemia<sup>4</sup>. O cortisol também contribui para o controle do

metabolismo dos carboidratos. O efeito metabólico mais bem conhecido do cortisol e de outros glicocorticoides consiste na sua capacidade de estimular a gliconeogênese pelo fígado, aumentando quase sempre a velocidade da gliconeogênese por até 6 a 10 vezes, além de mobilizar substratos gliconeogênicos a partir de outros tecidos, contribuindo assim para o aumento dos níveis de glicemia<sup>4</sup>.

Em indivíduos diabéticos tipo 1 tratados não ocorre diminuição da concentração plasmática de insulina, pois isso depende da metabolização da insulina administrada e não da inibição da secreção endógena, que é inexistente ou inexpressiva; há também um comprometimento da secreção e ação dos hormônios contrarreguladores<sup>2,4,6</sup>.

Os estudos desenvolvidos sobre a HII têm sido conduzidos em grande parte em ratos, tanto normais quanto diabéticos<sup>11,13,14,15,16,17,18,19</sup>. Em ratos normais, os mecanismos contrarreguladores podem sobrepujar os efeitos da insulina sobre a gliconeogênese hepática, promovendo recuperação da glicemia<sup>20</sup>. Contudo, considerando as vantagens do uso do camundongo como modelo experimental (menor peso corporal, menos espaço para alojamento, possibilidade de emprego de linhagens geneticamente modificadas, menor ingestão alimentar, custos reduzidos com material de consumo), é importante continuar as investigações nessa espécie<sup>20,21,22</sup>.

O objetivo desta investigação foi avaliar se as doses dos hormônios contrarreguladores da glicemia – glucagon, adrenalina, hormônio do crescimento, cortisol – utilizadas em ratos contrapõem-se à ação da insulina durante um episódio de hipoglicemia induzida por insulina (HII) em camundongos albinos da linhagem Swiss.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Camundongos Albinos Swiss machos foram transferidos do Biotério Central da UEM para o biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, onde foram mantidos sob condições controladas de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e temperatura ( $22 \pm 20$  C), com suprimento à vontade de água e ração (Nuvilab CR1®). Os animais foram utilizados nos protocolos experimentais quando alcançaram peso corporal de 25-30 gramas. Os experimentos foram realizados sempre pela manhã e os camundongos estavam em jejum de 14-16 horas. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso dos animais da Universidade Estadual de Maringá (UEM) com o protocolo 090/2012 e parecer 016/2013.

### Hipoglicemia Induzida por Insulina (HII)

Os camundongos receberam injeção i.p. de insulina (1 U/kg de peso corporal; Novolin®) para os experimentos

de hipoglicemia (SANTIAGO et al., 2013). Amostras de sangue foram coletadas por uma incisão na extremidade da cauda, nos tempos 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min, sendo o tempo 0 min o momento imediatamente anterior à administração da insulina (grupo I).

Outros grupos de camundongos foram submetidos à HII, cada grupo recebendo por injeção i.p. um dos hormônios contrarreguladores 15 min após a administração de insulina (1 U/kg). Os grupos foram: glucagon (grupo I+G, 0,02 mg/kg), cortisol (grupo I+C, 20 mg/kg), adrenalina (grupo I+A, 1 mg/kg), e hormônio do crescimento (grupo I+S, 20 mg/kg)<sup>11</sup>. Amostras de sangue foram coletadas por uma incisão na extremidade da cauda, nos tempos 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min, sendo o tempo 0 min o momento imediatamente anterior à administração da insulina e o tempo 15 min o momento imediatamente anterior à administração do hormônio contrarregulador.

### Determinação da Glicemia

A glicose plasmática foi dosada no sangue caudal utilizando-se tiras-teste de glicose e glicosímetro (Optium®; Abbott, São Paulo, Brasil) e as concentrações foram expressas em mg/dL.

### Análise dos Dados

A partir dos valores registrados, foram calculados os seguintes parâmetros:

- queda da glicemia (em mg/dL): diferença entre a glicemia aos 60 min e aos 0 min da HII;
- recuperação da glicemia (em mg/dL): diferença entre a glicemia aos 300 min e aos 120 min da HII;
- porcentagem de queda da glicemia inicial aos 60 min da HII;
- porcentagem de recuperação da glicemia inicial aos 300 min da HII;
- velocidade de instalação da hipoglicemia (em mg/dL/min) durante os primeiros 60 min da HII;
- velocidade de recuperação da glicemia (em mg/dL/min) dos 120 aos 300 min da HII;

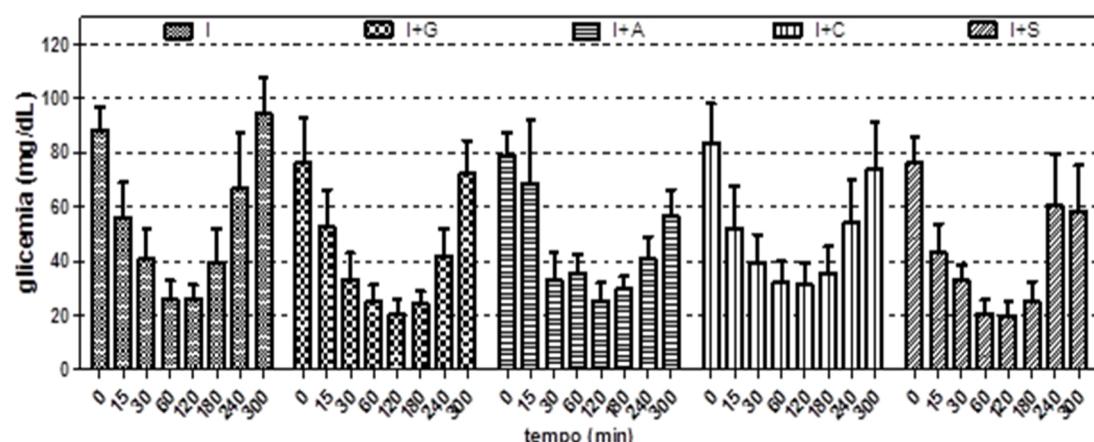
Atribuiu-se os primeiros 60 min como sendo o período de instalação da hipoglicemia e o intervalo dos 120 aos 300 min como sendo o período de recuperação da glicemia com base no perfil glicêmico dos camundongos do grupo I (Figura 1 – Resultados).

### Análise Estatística

As médias e desvios padrões (DP) dos conjuntos de dados foram tratados estatisticamente usando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os grupos tratados com insulina e contrarreguladores (I+G, I+A, I+C e I+S) foram comparados ao grupo tratado apenas com insulina (I). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes. As análises estatísticas e os gráficos ilustrativos foram feitos usando o programa Prism v5. Os dados são mostrados como média ± DP.

### 3. RESULTADOS

A Figura 1 mostra o perfil da glicemia de todos os grupos durante os 300 min de acompanhamento do episódio de HII. Todos os perfis foram qualitativamente semelhantes, isto é, exibiram queda da glicemia durante os primeiros 60 min seguida por recuperação da glicemia até os 300 min.



**Figura 1.** Perfil da glicemia de camundongos albinos Swiss machos submetidos a hipoglicemia induzida por insulina (HII, 1U/kg de peso corporal, i.p., no tempo 0 min) durante 300 minutos. O grupo I recebeu apenas insulina. Os demais grupos receberam insulina e injeção i.p. de hormônios contrarreguladores no tempo 15 min: I+G glucagon 0,02 mg/kg; I+A adrenalina 1 mg/kg; I+C cortisol 20 mg/kg; I+S hormônio do crescimento 20 mg/kg. n=5-14 por grupo.

A Tabela 1 mostra a glicemia basal (0 min), aos 60 min e aos 300 min do período de HII. A glicemia basal, isto é, imediatamente antes da injeção de insulina, não foi diferente entre os grupos ( $p>0,05$ ). Aos 60 min, o grupo I+A mostrou glicemia significativamente maior do que o grupo I, enquanto que aos 300 min a glicemia de todos os grupos foi significativamente menor do que a do grupo I.

**Tabela 1** – Glicemia basal (0 min), aos 60 min e aos 300 min, de camundongos albinos Swiss machos submetidos a hipoglicemia induzida por insulina (HII).

| Glicemia | Grupo I<br>(n=8-13) | Grupo I+G<br>(n=6-14) | Grupo I+A<br>(n=4-6) | Grupo I+C<br>(n=8-13) | Grupo I+S<br>(n=7-14) |
|----------|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0 min    | 88,13±8,86          | 76,13±16,81           | 78,75±8,66           | 83,67±14,42           | 76,00±9,45            |
| 60 min   | 26,15±6,54          | 25,21±6,18            | 35,40±6,99*          | 31,00±7,31            | 20,43±5,52            |
| 300 min  | 94,55±13,24         | 72,17±12,40*          | 56,50±9,96*          | 74,00±17,03*          | 58,29±17,20*          |

Valores marcados com asterisco (\*) foram significativamente diferentes ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo I; ANOVA com pós-teste de Bonferroni. I: insulina 1U/kg no tempo 0 min; I+G glucagon 0,02 mg/kg; I+A adrenalina 1 mg/kg; I+C cortisol 20 mg/kg; I+S hormônio do crescimento 20 mg/kg no tempo 15 min.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos cálculos nos diferentes grupos experimentais. Não houve diferença entre os grupos quanto à queda da glicemia nos primeiros 60 min de HII, tanto em valores absolutos quanto em termos percentuais ( $p>0,05$ ). A velocidade de instalação da hipoglicemia também não foi diferente ( $p>0,05$ ) entre os grupos que receberam contrarreguladores (I+G, I+A, I+C e I+S) e o grupo que recebeu insulina (I).

**Tabela 2.** Queda e recuperação da glicemia e taxa de instalação e de recuperação da glicemia de camundongos albinos Swiss machos submetidos a hipoglicemia induzida por insulina (HII).

|  | Grupo I<br>(n=10-13) | Grupo I+G<br>(n=9-13) | Grupo I+A<br>(n=5-7) | Grupo I+C<br>(n=9-12) | Grupo I+S<br>(n=9-13) |
|--|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Queda da glicemia                                    |                      |                       |                      |                       |                       |
| (mg/dL) dos 0 aos 60 min                             | 63,46±15,91          | 53,23±19,85           | 56,20±19,60          | 59,54±10,31           | 52,67±5,88            |
| Queda da glicemia aos 60 min (% da inicial)          | 67,5                 | 67,5                  | 66,7                 | 69,5                  | 72,1                  |
| Velocidade de instalação da hipoglicemia (mg/dL/min) | 1,09±0,28            | 0,88±0,28             | 1,15±0,45            | 0,99±0,17             | 0,90±0,13             |
| Recuperação da glicemia (mg/dL) dos 120 aos 300 min  | 65,00±16,74          | 56,44±21,83           | 30,50±6,62*          | 46,22±11,69           | 42,31±18,54           |
| Recuperação da glicemia aos 300 min (% da inicial)   | 99,6                 | 97,3                  | 60,8*                | 87,3                  | 88,7                  |
| Velocidade de recuperação da glicemia (mg/dL/min)    | 0,34±0,16            | 0,32±0,16             | 0,18±0,04            | 0,25±0,07             | 0,24±0,10             |

Valores marcados com asterisco (\*) foram significativamente diferentes ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo I; ANOVA com pós-teste de Bonferroni. I: insulina 1U/kg no tempo 0 min; I+G glucagon 0,02 mg/kg; I+A adrenalina 1 mg/kg; I+C cortisol 20 mg/kg; I+S hormônio do crescimento 20 mg/kg no tempo 15 min.

No grupo que recebeu insulina + adrenalina (I+A), a recuperação do quadro hipoglicêmico foi significativamente menos completa se comparada ao grupo insulina (I), recuperando apenas 60% dos valores iniciais de glicemia aos 300 min (recuperação de 30 mg/dL entre os 120 e 300 min), o que também está ilustrado na Figura 1 e na Tabela 1.

No grupo que recebeu insulina + hormônio do crescimento (I+S), a recuperação do quadro hipoglicêmico, em termos absolutos, também ocorreu de forma significativamente menos acentuada se comparado ao grupo insulina (I). Assim como o grupo I+A, o grupo I+S também não retornou aos valores iniciais de glicemia até o final do experimento (300 min), sendo também ilustrado na Figura 1 e na Tabela 1.

Os demais grupos não diferiram estatisticamente do grupo I quanto aos parâmetros descritos na Tabela 2 ( $p>0,05$ ). No entanto, a velocidade de recuperação da glicemia tendeu a valores menores no grupo I+A.

Vários animais (n=16) morreram durante o período de HII, a maioria depois dos primeiros 60 min. A maior parte dos animais que vieram a óbito pertencia ao grupo que recebeu insulina e adrenalina (grupo I+A, n=8).

## 4. DISCUSSÃO

A hipoglicemia estimula uma resposta neuroendócrina orgânica que se manifesta com a liberação dos hormônios contrarreguladores da hipoglicemia. Glucagon, adrenalina, cortisol e hormônio do crescimento também são liberados sob outras condições de estresse além da hipoglicemia. Esses hormônios têm efeitos antagônicos aos da insulina tanto no fígado quanto em outros tecidos periféricos. O glucagon é o primeiro a ser liberado, seguido das catecolaminas, e posteriormente ocorre aumento da secreção do GH e do cortisol<sup>9,12</sup>.

A observação dos resultados referentes à queda da glicemia nos primeiros 60 min da HII (Tabela 2) revela que os grupos que receberam contrarreguladores (I+G, I+A, I+C e I+S) não diferiram do grupo que recebeu apenas insulina (I). A taxa de instalação da hipoglicemia também não foi diferente (Tabela 2). Ao menos para o glucagon (grupo I+G) e para a adrenalina (grupo I+A), esperava-se que esses parâmetros fossem melhorados, considerando que esses hormônios, assim como a ativação simpática neural, são a primeira linha de defesa no combate à hipoglicemia inicial<sup>9,10</sup>.

Todos os grupos mostraram glicemia final inferior à do grupo I (Tabela 1). A recuperação da glicemia, em termos de elevação da glicemia dos 120 aos 300 min (Tabela 2) foi especialmente debilitada nos grupos que receberam adrenalina e GH (grupos I+A e I+S, respectivamente). Com relação à adrenalina (grupo I+A), deve-se acrescentar ainda que foi surpreendente a alta taxa de mortalidade (8 de 19 animais) e a debilitada recuperação da glicemia, que ficou no patamar de 60% da glicemia inicial, enquanto nos demais grupos os percentuais ficaram entre 87% e 99% (Tabela 2).

Cortisol e GH são tidos como hormônios com ação contrarreguladora significativa na hipoglicemia tardia, por limitarem a utilização de glicose e estimularem a gliconeogênese hepática. Seus efeitos são detectáveis após 2-3 horas de hipoglicemia<sup>9,12</sup>. Neste estudo, entretanto, o efeito desses hormônios na recuperação da glicemia (período entre 120 e 300 min) não foi observado.

De um modo geral, portanto, o perfil glicêmico dos grupos que receberam hormônios contrarreguladores 15 min após a administração de insulina não foi melhorado, e em alguns casos foi até agravado. As doses utilizadas foram aquelas descritas<sup>11</sup> em ratos. Naquele estudo, uma hora após a administração de insulina (30 min após a administração de um ou mais contrarreguladores), a elevação da glicemia foi da ordem de 40 mg/dL, constatando-se assim a ação hiperglicemiante desses hormônios. É possível que a dose do hormônio contrarregulador para esses efeitos no camundongo seja diferente daquela utilizada em ratos.

Com a preocupação de padronizar a HII em camundongos, em um estudo<sup>20</sup> testaram diferentes doses de insulina (entre 0,1 e 2 U/kg) e estabeleceram a dose de 1 U/kg de peso corporal como sendo adequada para produzir um perfil glicêmico com hipoglicemia e recuperação da glicemia, sem convulsões ou morte dos animais. Esta escolha, adicionalmente, facilita a comparação com os dados obtidos em ratos. Tendo em vista os resultados obtidos com os contrarreguladores neste estudo em contraste com aqueles obtidos em ratos<sup>11</sup>, é necessário planejar novas investigações que avaliem as doses de contrarreguladores necessárias para reduzir a queda da glicemia e/ou acentuar a recuperação da glicemia em camundongos.

## 5. CONCLUSÃO

A administração dos hormônios contrarreguladores glucagon, adrenalina, cortisol e hormônio do crescimento, a camundongos submetidos a hipoglicemia induzida por insulina (HII) não teve efeitos atenuadores sobre a queda da glicemia e prejudicou a recuperação da glicemia.

Para a adrenalina, houve um comprometimento ainda mais significativo da recuperação da glicemia, com registro de elevado número de mortes no grupo. É neces-

sário estabelecer as doses de hormônios contrarreguladores eficientes para redução da queda da glicemia e para melhor recuperação da glicemia em camundongos Swiss submetidos a HII.

## REFERÊNCIAS

- [1] Maia Fr, Araujo Lr. Aspectos psicológicos e controle glicêmico de um grupo de pacientes com Diabetes Melitus tipo 1 em Minas Gerais. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 2004;48(2):261-266.
- [2] Cryer PE, Davis SN, Shamoon H. Hypoglycemia In Diabetes. Diabetes Care, 2003;26(1):1902-1912.
- [3] Milech A, Chacra Ar, Kayath M J. Revisão da hiperglicemia pós-prandial e a hipoglicemia no controle do diabetes mellitus: o papel da insulina lispro e suas pré-misturas nos picos e vales. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 2001;45(5):423-432.
- [4] Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- [5] Davis S, Alonso MD. Hypoglycemia as a barrier to glycemic control. Journal of Diabetes and its Complications, 2004;8(1):60-68.
- [6] Nery M. Hipoglicemia como fator complicador no tratamento do Diabetes Melito tipo 1. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 2008;52(2):288-298.
- [7] Agardh CD, Rosén I, Ryding E. Persistent vegetative state with high cerebral blood flow following profound hypoglycemia. Neurology, 1983;14(4):482-486.
- [8] Hershey T, Bhargava N, Sadler M, White NH, Craft S. Conventional versus intensive diabetes therapy in children with type 1 diabetes: effects on memory and motor speed. Diabetes Care, 1999;22(1):1318-1324.
- [9] Cryer PE. Glucose counterregulation: prevention and correction of hypoglycemia in humans. American Journal of Physiology, 1993;264:149-155.
- [10] Hoffman Rp. Sympathetic mechanisms of hypoglycemic counterregulation. Current Diabetes Reviews, 2007;3(1):185-193.
- [11] Souza HM, Hell NS, Lopes G, Bazotte RB. Synergistic effect of counterregulatory hormones during insulin-induced hypoglycemia in rats: participation of lipolysis and gluconeogenesis to hyperglycemia. Acta Pharmacologica Sinica, 1996;17(5):455-459.
- [12] Lager I. The insulin-antagonistic effect of the counterregulatory hormones. Journal of International Medicine, 1991;735(2):41-47.
- [13] Barrena HC, Gazola VA FG, Furlan MMDP, Garcia RF, Souza HM, Bazotte RB. Ketogenesis evaluation in perfused liver of diabetic rats submitted to short-term insulin-induced hypoglycemia. Cell Biochemistry and Function, 2009;27(2):83-387.
- [14] Gazola VA FG, Garcia RF, Barrena HC, Hartmann EM, Barrena HC, Albuquerque GG et al. Glycemia recovery with oral amino acid administration during experimental short-term insulin-induced hypoglycemia. Journal of Diabetes and its Complications, 2007;21(1):320-327.
- [15] Guidotti CM. Efeito do exercício físico agudo e da cafeína na resposta glicêmica de ratos diabéticos tipo 1 submetidos a hipoglicemia induzida por insulina (HII). [Monografia]

- grafia] Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2010.
- [16] Ribeiro RT. Efeito da cafeína e do exercício fisico agudo sobre a glicemia de ratos normais submetidos a hipoglicemia induzida por insulina (HII). [Monografia] Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2010.
- [17] Schiavon FPM, Gazola VAFG, Furlan MMDP, Barrena HC, Bazotte RB. Paradoxical increase in liver ketogenesis during long-term insulin-induced hypoglycemia in diabetic rats. *Experimental Biology and Medicine*, 2011;236(2):227–232.
- [18] Souza HM, Hell NS, Lopes G, Bazotte RB. Effect of combined administration of counterregulatory hormones during insulin induced hypoglycemia in rats: lipolysis mediated by  $\beta$ -adrenergic mechanism contributes to hyperglycemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1994;27(12):2883-2887.
- [19] Vilela VR. Efeitos do exercício fisico e da glutamina dipeptideo na intensidade da hipoglicemia e capacidade de recuperação da glicemia em ratos submetidos a hipoglicemia induzida por insulina regular. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2010.
- [20] Santiago AN, Gazola VAFG, Milani MF, Campos VC, Vilela VR, Pedrosa MMD et al. Oral glutamine is superior than oral glucose to promote glycemia recovery in mice submitted to insulin-induced hypoglycemia. *International Journal of Endocrinology*, 2013;5(13):7-16.
- [21] Oliveira A. Efeito do jejum e do exercicio fisico na resposta glicêmica de camundongos normais submetidos a hipoglicemia induzida por insulina regular. [Monografia] Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2012.
- [22] Suniga AM. Efeito da administração de insulina sobre a resposta glicêmica de camundongos diabéticos tipo I em dois estados nutricionais diferentes: alimentados e sob jejum noturno (15H). [Monografia] Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2012.