

EFEITOS DO ANOREXÍGENO SIBUTRAMINA NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM CÉLULAS HEPÁTICAS

REZENDE, Maicon Soares de¹
PIVATO, Leandro Silva²
SCHUBERT, Amanda Caroline³
CONSTANTIN, Jorgete⁴
PEREIRA, Maria Izabel⁵

RESUMO

A sibutramina é um anorexígeno que inibe a recaptação de serotonina e noradrenalina no sistema nervoso central. É metabolizada no fígado pelo sistema citocromo P450. Os dois metabólitos resultantes são mais ativos que a própria sibutramina. Sendo o fígado um órgão central do metabolismo em mamíferos, há uma grande possibilidade de que esta deaminação da sibutramina cause interferências no metabolismo dos carboidratos e possa apresentar efeitos hepatotóxicos. O objetivo do trabalho foi analisar dados referentes a experimentos que investigam o efeito da sibutramina sobre o metabolismo de carboidratos em células de fígado de ratos machos albinos da linhagem Wistar. Os experimentos foram realizados com perfusão monovascular isolada no modo não-recirculante e livre de hemoglobina. O método emprega líquido de perfusão tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato, com pH 7,4. A dosagem dos metabólitos foi feita pelo método espectrofotométrico. A concentração venosa de oxigênio foi medida polarograficamente através de um eletrodo de platina e platina. O tratamento estatístico foi feito por meio do teste de *Newman-Keuls*, e os resultados foram discutidos e comparados aos dados já existentes na literatura. Os dados mostram que a sibutramina inibe a gliconeogênese em animais em jejum, mas não inibe a via glicolítica e a glicogenólise em animais alimentados. É provável que a sibutramina cause uma diminuição na razão NADH/NAD⁺, depletando a força redutora necessária para a gliconeogênese. O aumento no consumo de oxigênio nos experimentos é devido à diminuição da razão ATP/ADP, que leva ao aumento do consumo de oxigênio no catabolismo.

PALAVRAS-CHAVE: Metabolismo. Células hepáticas. Sibutramina. Fenobarbital. Carboidratos.

EFFECTS OF SIBUTRAMINE IN CARBOHYDRATE METABOLISM IN RAT LIVER

ABSTRACT

Sibutramine is an anorectic that inhibits the serotonin and noradrenaline reuptake in the central nervous system. It is metabolized in the liver by the cytochrome P450 system. The two resulting metabolites are more active than sibutramine itself. Since the liver is a central organ of metabolism in mammals, there is a strong possibility that this deamination of sibutramine will interfere with carbohydrate metabolism and may have hepatotoxic effects. The objective of this work was to analyze data concerning experiments investigating the effect of sibutramine on the metabolism of carbohydrates in liver cells of male Wistar albino rats. The experiments were performed with monovascular infusion isolated in non-recirculating and hemoglobin-free mode. The method employs Krebs/Henseleit-bicarbonate buffer perfusion liquid, pH 7.4. The spectrophotometric method measured the metabolites. The venous oxygen concentration was measured polarographically through a platinum and platinum electrode. Statistical treatment was done using the Newman-Keuls test, and the results were discussed and compared to data already available in the literature. The data show that sibutramine inhibits gluconeogenesis in fasted animals, but doesn't inhibit the glycolytic pathway and glycogenolysis in fed animals. It is likely that sibutramine causes a decrease in the NADH/NAD⁺ ratio, depleting the reducing force required for gluconeogenesis. The increase in oxygen consumption in the experiments is due to the decrease in ATP/ADP ratio, which leads to increased oxygen consumption in catabolism.

KEYWORDS: Metabolism. Hepatic cels. Sibutramine. Phenobarbital. Carbohydrates.

¹ Acadêmico do Curso de Graduação em Medicina do Centro Universitário da Fundação Assis Gurgacz – Cascavel-PR; Enfermeiro pela Universidade Paranaense (UNIPAR) – Campus Toledo-PR. E-mail: maicon.rezende@outlook.com

² Acadêmico do Curso de Graduação em Medicina do Centro Universitário da Fundação Assis Gurgacz – Cascavel-PR; Biólogo pela Universidade Estadual de Maringá-PR; Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Estadual de Maringá-PR. E-mail: le.pivato@outlook.com

³ Bióloga pela Faculdade Ingá – UNINGÁ – Maringá-PR; Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Estadual de Maringá-PR. E-mail: amanda_schubert@hotmail.com

⁴ Professora titular do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá-PR. E-mail: jconstantin@uem.br

⁵ Professora adjunta no Curso de Graduação em Medicina do Centro Universitário da Fundação Assis Gurgacz – Cascavel-PR. E-mail: mipmattos@fag.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma patologia crônica causada pelo suprimento excessivo de energia em relação a seu consumo, ou seja, para ocorrer aumento do peso corporal, o organismo precisa receber energia, na forma de alimento, em quantidades maiores do que as consumidas. Podem surgir em função de hábitos alimentares incorretos, alterações neuroendócrinas, faltam de exercícios físicos, medicamentos como glicocorticoides e antidepressivos tricíclicos, e até mutações gênicas (NACCARATO e LAGO, 2014).

É importante observar que a obesidade aumenta em proporções alarmantes em países desenvolvidos e também em países em desenvolvimento e o panorama da obesidade no Brasil segue a tendência mundial. Alguns estudos regionais mostram prevalências diferentes nas diversas regiões brasileiras. As taxas variam de 4,4% a 8,5% nas regiões menos desenvolvidas do Norte e Nordeste e taxas de 10,5% a 18% nas regiões do Sudeste. As taxas atuais de obesidade são reconhecidas como um problema de saúde pública (FRANCO, COMINATO e DAMIANI, 2014).

Além disso, há que se considerar que a obesidade está intimamente relacionada às diversas doenças da sociedade contemporânea, como as cardiovasculares (hipertensão, doenças coronarianas e trombose), respiratórias, ortopédicas, complicações na gravidez, dentre outras. (FRANCISCHI *et al*, 2000).

Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), são consideradas obesas as pessoas que possuem Índice de Massa Corporal (IMC) igual ou superior a 30 kg/m^2 , o qual indica o estado nutricional da pessoa, e é obtido através da divisão da massa corporal (em quilogramas) pela estatura (em metros ao quadrado). O IMC não é uma estimativa direta da adiposidade, pois não leva em consideração que algumas pessoas possuem um elevado IMC por possuírem uma grande massa muscular. Assim, determina-se que uma pessoa é obesa utilizando como parâmetro a porcentagem de gordura corporal total, na qual um homem obeso possui 25% ou mais de gordura corporal total, e uma mulher obesa possui 35% ou mais de gordura corporal total (BARROS *et al*, 1997; GUYTON e HALL, 2011).

Visto que a obesidade se caracteriza como um problema de saúde pública, deve ser tratada como tal. Atualmente diversos esquemas terapêuticos vêm sendo empregados para o tratamento da obesidade. Dentre eles, destacam-se a realização de dietas, modificações comportamentais e a prática de exercícios físicos, mas os mesmos, com frequência, falham em promover perda de peso consistente e mantida, e o tratamento farmacológico pode aumentar a motivação do paciente e a aderência ao tratamento, sendo algumas vezes considerada uma estratégia necessária (BEYRUTI *et al*, 2000).

Os fármacos utilizados no tratamento da obesidade podem ser divididos em três classes ou grupos: os medicamentos anorexígenos de ação central, que levam ao aumento do tônus noradrenérgico e/ou dopaminérgico, como a sibutramina; os medicamentos termogênicos que conduzem ao aumento da perda de peso por estimulação adrenérgica e ao aumento da lipólise, como os fármacos efedrina, metilxantinas, fenilpropanolamina e triiodotironina; e por último estão os medicamentos que afetam a absorção de nutrientes, como o orlistat que inibe as lipases, atuando em nível gastrointestinal, promovendo a diminuição da absorção de gordura (HALPERN e MANCINI, 2000; RANG *et al*, 2015; CLARK *et al*, 2013).

O tratamento farmacológico da obesidade é indicado para indivíduos com IMC maior que 30 kg/m²; para pessoas com doenças associadas ao excesso de peso com IMC superior a 25 kg/m² quando não respondem a outras alternativas (HALPERN e MANCINI, 2002).

A farmacologia da obesidade está em constante desenvolvimento, porém, sofreu críticas por muito tempo, devido à generalização da prescrição de medicamentos, desvalorização da atividade física e dieta, uso irracional dos fármacos disponíveis, dentre outros fatores (NACCARATO e LAGO, 2014).

Para os autores supracitados, ao tratar de um obeso, o objetivo tem de ser melhorar sua qualidade de vida e sua saúde, visando a diminuição do risco de doenças e morte. Assim, a farmacoterapia deve ser um coadjuvante à terapêutica básica de reeducação alimentar, mudanças de hábitos de vida e prática de atividade física regular, uma vez que os medicamentos são eficazes no controle do peso apenas enquanto estão sendo administrados e, assim, pode-se esperar ganho de peso após suspender o uso.

Dentre os diversos medicamentos anorexígenos utilizados contra a obesidade, destaca-se a sibutramina e seus metabólitos, pois estes agem no hipotálamo, inibindo a recaptação da serotonina e noradrenalina, sem influenciar na atividade de liberação dos mesmos, além de não inibir a recaptação e nem aumentar a liberação da dopamina. Doses acima das recomendadas podem romper com essa característica e provocar aumento na liberação e no bloqueio de recaptação da serotonina, noradrenalina e dopamina, o que poderá acarretar aumento da tensão arterial. (BEYRUTI *et al*, 2000; HALPERN e MANCINI, 2000; SUCAR, SOUGEY e BRANDÃO NETO, 2002).

Segundo Giordano *et al* (2002) e Gonzaga e cols. (2015) a sibutramina tem demonstrado perda de peso em humanos e em ratos, pelo aumento da saciedade, ou seja, reduzindo a ingestão de alimentos, mas também se acredita que a redução do peso corpóreo está ligada ao aumento do gasto energético em mamíferos, devido ao fato de aumentar a taxa metabólica via receptor adrenérgico β_3 , levando à perda de peso. Vários estudos revelaram que esta droga promoveu redução do peso de

forma significativa, bem como da concentração de colesterol total, triglicerídeos, LDL-colesterol e hemoglobina glicada de pacientes obesos diabéticos ou não obesos.

É uma substância com boa tolerabilidade, porém, como afeta o sistema nervoso simpático e o sistema nervoso central, é contraindicada em algumas situações especiais, como doença arterial coronariana, angina, infarto do miocárdio anterior e hipertensão controlada inadequadamente (KASTRUP, 2013).

Trabalhos realizados por Berkowitz e cols. (2006) e Godoy-Matos e cols. (2005) e outros grupos de estudo *apud* Franco, Cominato e Damiani (2014) mostraram que a sibutramina é efetiva e promove perda significativa de peso com poucos efeitos colaterais em adolescentes, favorecendo o seu uso na prática clínica, porém em pacientes com mais de 55 anos, houve um aumento relativo de eventos cardiovasculares em 16% dos pacientes, razão pela qual a droga foi suspensa em 2010 na Europa e nos Estados Unidos.

Segundo Gonzaga e cols. (2015), pelo fato deste fármaco atuar sobre o sistema nervoso central (SNC), é classificado como psicotrópico e deve ser utilizado exclusivamente sob a prescrição e acompanhamento médico. No Brasil, o comércio de medicamentos psicotrópicos é regulado pela Portaria nº 344/1998 da ANVISA, que estabelece que os medicamentos sujeitos a controle especial, incluindo anorexígenos, pertencem à Lista B2 e devem ser dispensados mediante apresentação de notificação de receita B.

Além disso, venda da sibutramina é realizada com receita e preenchimento de um questionário que ficam retidos na Farmácia, conforme preconiza a RDC 52/2011 (DUTRA, 2013).

Estudos recentes realizados por Franco, Cominato e Damiani (2014) em crianças e adolescentes, revelaram que os efeitos colaterais do tratamento, como aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, são compensados pela perda de peso e redução do índice de massa corpórea. Os efeitos colaterais com significância estatística observados neste estudo foram constipação, boca seca, alteração de humor e insônia. Não houve efeitos colaterais graves nem elevação dos níveis de pressão arterial, diferente do que foi observado nos estudos com pacientes idosos.

Gonzaga e cols. (2015) em seus estudos, demonstraram que, em relação ao consumo da sibutramina, há predominância de pacientes do sexo feminino, sendo a maioria na faixa etária entre 31 e 35 anos. Com relação à especialidade do prescritor, foi constatado que há predominância de clínico geral, seguido de endocrinologista, e em 15% dos receituários, foram observados médicos de outras especialidades. Dentre as justificativas para a prescrição da droga, predominou casos de obesidade graus 1 e 2, seguido de sobrepeso e alguns casos a prescrição foi feita sem justificativa.

Na conclusão dos autores supracitados, o uso de sibutramina foi prescrito sem diagnóstico preciso, acarretando problemas de saúde pública, bem como o uso irracional da droga pela população. Assim, tais estudos revelam que é necessária a adoção de medidas educativas aos prescritores, com o objetivo de se evitar o uso indiscriminado a partir de um diagnóstico e prescrição equivocada.

A sibutramina é uma derivada da β -feniletilamina, um precursor da anfetamina, sendo uma amina terciária. Este fármaco inicialmente foi empregado como antidepressivo e, embora seja descrita alguma ação em quadros de depressão maior, não tem sido utilizada para essa finalidade. Alguns efeitos colaterais como inquietação, irritabilidade, aumento da frequência cardíaca, aumento da pressão arterial, boca seca, cefaleia, rinite, faringite, constipação e insônia podem ocorrer (AZEVEDO; MARTINS e VASQUES, 2004; RANG *et al*, 2015; HALPERN e MANCINI, 2002).

A sibutramina é administrada via oral em doses de 10 a 15 mg/dia, com absorção gástrica e intestinal, passando logo em seguida, pelo fígado, onde sofre o metabolismo de primeira passagem, sendo que seu estado de equilíbrio é estabelecido em torno de quatro dias e, apresenta elevada afinidade com as proteínas plasmáticas e com um índice de ligação em torno de 97%, e biodisponibilidade de 77% (SUCAR; SOUGEY e BRANDÃO NETO, 2002; GIORDANO *et al*, 2002; RANG *et al*, 2015).

Ao ser administrada em humanos e outros mamíferos, a sibutramina é metabolizada no fígado pelo sistema citocromo P450, principalmente pela isoenzima 3A4, sendo rapidamente deaminada em uma amina secundária (metabólito 1 - desmetilsibutramina) e uma amina primária (metabólito 2 - didesmetilsibutramina), os quais são os maiores responsáveis pela ação farmacológica da droga, sendo que esses metabólitos ativos são posteriormente inativados no fígado (após 14 e 16 horas, respectivamente) e cerca de 85% dos resíduos inativos são excretados na urina e nas fezes (excreção renal e biliar) (SUCAR; SOUGEY e BRANDÃO NETO, 2002; RANG *et al*, 2015).

O sistema enzimático citocromo P-450 consiste num grupo de isoenzimas, onde aproximadamente 50% de todos os medicamentos são substratos do CYP3A4 que estão presentes no fígado e enterócitos do trato gastrointestinal. Assim, o metabolismo parcial começa no fígado. Os medicamentos metabolizados pelas enzimas do citocromo P-450 podem ter um efeito por meio de três processos: por metabolismo, por inibição ou indução de enzimas ou pelos três processos juntos. Os indutores aumentam a produção de enzimas e assim aceleram o metabolismo. Consequentemente, os níveis de substratos no plasma baixam, originando concentrações subterapêuticas (BARCELOS, 2007; CLARK *et al*, 2013).

Silva (2002) diz que muitas drogas e substâncias químicas, podem aumentar a síntese ou a atividade dessas enzimas que metabolizam drogas, constituindo a indução enzimática. Como por

exemplo, podem ser citados os barbitúricos (Fenobarbital), Fenitoína, Rifampicina, Carbamazepina, Etanol, entre outros. Esta indução enzimática altera profundamente a resposta clínica a uma droga, aplicada concomitantemente com outra que seja indutora enzimática.

De acordo com Silva e Hartmann (2006 *apud* BARCELOS, 2007), o Fenobarbital (ácido 5-fenil-5-etilbarbitúrico) é um barbitúrico de ação prolongada, frequentemente utilizado no tratamento dos quadros de convulsões generalizadas e convulsões parciais simples, com sintomas motores, formas de epilepsia focal, bem como na ansiedade e na insônia. O fenobarbital é bem absorvido por via oral e alcança livremente o cérebro. Cerca de 25% são excretados de forma inalterada na urina e os 75% restantes deste fármaco são inativados pelo sistema microsomal hepático.

A administração crônica de barbitúricos aumenta notavelmente o conteúdo de proteínas e lipídios no retículo endoplasmático liso hepático, bem como a atividade da glicuronil transferase e da CYP3A4. A indução dessas enzimas aumenta o metabolismo de um número de fármacos e substâncias endógenas, incluindo a sibutramina (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Segundo Clark e cols. (2013), sendo o fígado um órgão central do metabolismo em mamíferos, a deaminação da sibutramina ocorre em nível hepático e pode haver riscos de efeito hepatotóxico ou interferência no metabolismo normal de diversos combustíveis oxidáveis, particularmente dos carboidratos.

No estado alimentado, os níveis glicêmicos se elevam, o que acarreta em aumento da secreção de insulina pelo pâncreas endócrino, e esta sinaliza a captação de glicose para o interior das células. Este açúcar é fosforilado em seu carbono 6, o que garante sua permanência no interior da célula. Este açúcar pode ser direcionado para várias vias metabólicas, dependendo de uma série de fatores, mas mais comumente será oxidado pela via glicolítica, e, em condições aeróbicas será totalmente oxidada na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Parte desse carboidrato é utilizado para glicogênese, isto é, produção de glicogênio, que se estoca por intervalos curtos de tempo nas células hepáticas (NELSON e COX, 2014; VOET e VOET, 2013).

A neoglicogênese é uma via de síntese de glicose, que está ativa quando a disponibilidade dessa molécula é escassa, como durante o jejum prolongado, exercícios físicos, dieta baixa em carboidratos e após um trauma. Esses eventos são disparados pela influência do hormônio pancreático glucagon. Qualquer comprometimento desta via metabólica leva à uma condição incompatível com a vida, já que a neoglicogênese é essencial para manutenção dos níveis glicêmicos normais. A redução da concentração de glicose plasmática é prejudicial principalmente para o funcionamento do sistema nervoso central, pois o cérebro é responsável por consumir em torno de 80% da glicose presente na corrente sanguínea diariamente (WILLIAMS e PICKUP, 2001).

A síntese de glicose no fígado ocorre a partir de moléculas precursoras não glicídicas incluindo lactato, piruvato, glicerol e muitos aminoácidos, sendo este órgão o principal responsável pela neoglicogênese (VOET e VOET, 2013). Contudo, os rins tornam-se locais importantes para essa atividade, durante o processo de jejum (PILKIS e EL-MAGHRABI, 1988).

Ao contrário, num jejum inicial, para manter os níveis glicêmicos normais, a primeira via metabólica ativada é a glicogenólise hepática, na qual o glicogênio nas células desse órgão é degradado, liberando glicose para a corrente sanguínea. A quantidade de glicogênio hepático é muito limitada, insuficiente para manter os níveis adequados de glicose por um período de jejum superior a 8 horas. A partir do momento em que os níveis de glicose começam a se esgotar, a neoglicogênese é ativada no intuito de manter os níveis homeostáticos (VOET e VOET, 2013).

Uma das formas de verificar estas possíveis ações, seria avaliando o efeito desta droga sobre a glicólise, glicogenólise e neoglicogênese, vias envolvidas no metabolismo de carboidratos, sendo que algumas delas ocorrem primariamente no fígado (WILLIAMS e PICKUP, 2001; VOET e VOET, 2013).

Sendo o fígado o órgão primário onde ocorre o metabolismo tanto dos carboidratos, quanto das drogas administradas por via oral, e considerando que o fenobarbital potencializa o efeito da droga, tratar o animal com o barbitúrico previamente à investigação dos efeitos metabólicos da sibutramina, pode revelar resultados mais concisos. O modelo experimental utilizado, o sistema de perfusão de fígado, permite realizar experimentos, nos quais a estrutura do órgão permanece intacta, garantindo a comunicação celular por meio dos mediadores biológicos, e a manutenção da atividade metabólica e respiratória do mesmo, durante todo o tempo do experimento. Assim, as dosagens de metabólitos e a posterior análise e comparação dos resultados obtidos, que podem evidenciar se a presença da droga está ou não interferindo no metabolismo normal, pode trazer novas informações, tanto à comunidade científica, quanto à população, o que se torna particularmente importante, diante das restrições da venda de tal fármaco e mesmo de sua proibição em alguns países, devido aos efeitos adversos que pode provocar. Assim, considera-se relevante investigar uma provável interferência metabólica, pois novos riscos, benefícios e efeitos adversos podem ser descobertos e informados à população em geral.

2. METODOLOGIA

Todos os experimentos foram realizados em parceria com a Universidade Estadual de Maringá, por intermédio do Prof. Dr. Adelar Bracht, no laboratório de Metabolismo Hepático, do departamento de Bioquímica.

2.1 ANIMAIS

Ratos machos albinos da linhagem Wistar, pesando entre 180 a 220 g foram utilizados nos experimentos. Estes foram fornecidos pelo Biotério Central da UEM e mantidos no Biotério de Metabolismo Hepático da mesma IES sob temperatura controlada de 22°C. Os animais foram submetidos a jejum prévio de 24 horas, para determinados protocolos, e receberão água *ad libitum*. Em outros grupos experimentais, os animais receberam ração balanceada e água a vontade.

Dentre animais alimentados e em jejum, grupos experimentais foram tratados com uma injeção intraperitoneal diária de fenobarbital, na dose de 90 mg por quilo de peso corporal, durante três dias. Outros grupos não receberam as injeções do barbitúrico.

O projeto foi desenvolvido em parceria com a Unidade de Ensino Superior Ingá – Uningá, que financiou os custos com materiais de consumo do mesmo. O projeto original foi intitulado “Efeitos da sibutramina na gliconeogênese em fígados de ratos em jejum tratados com fenobarbital”, desenvolvido no período de setembro de 2009 a setembro de 2010, totalizando carga horária de 2112 horas, tendo sido aprovado sob protocolo número 93-1/2009.

2.2 O SISTEMA DE PERFUSÃO

Os experimentos deste trabalho foram realizados com o fígado de rato em perfusão monovascular isolada no modo não-recirculante e livre de hemoglobina, de acordo com o procedimento originalmente descrito por Scholz e Bücher (1965). O método emprega líquido de perfusão tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (Krebs-Henseleit, 1932), cujo pH é igual a 7,4 quando saturado com uma mistura de oxigênio e dióxido de carbono nas proporções 95:5 através de um oxigenador de membrana. O líquido contém também albumina bovina numa concentração igual a 25 mg%. A composição salina do tampão é NaCl 115 mM; NaHCO₃ 25 mM; KCl 5,8 mM; Na₂SO₄ 1,2 mM; MgCl₂ 1,18 mM; NaH₂PO₄ 1,2 mM e CaCl₂ 2,5 mM.

O equipamento de perfusão de fígado de rato é composto basicamente por uma bomba peristáltica, reservatório para o líquido de perfusão, oxigenador de membrana, sistemas de captação de bolhas, suporte para o eletrodo de oxigênio, polarógrafo, registrador potenciométrico, banho termostatizado com bomba de circulação externa e um cilindro, contendo a mistura carbogênica. O fluido de perfusão é bombeado pela bomba peristáltica do reservatório em direção ao oxigenador, onde ocorre a oxigenação (concentração final de oxigênio = 0.86 mM) e o aquecimento a 37°C. Isto ocorre graças a uma troca passiva com a atmosfera de 95% de oxigênio, que está em contato com um sistema de tubos de borracha de silicone de parede muito delgada (0,25 mm), por onde circula o líquido (tempo de permanência: 1 min.). Simultaneamente, este líquido é aquecido a 37°C graças à água que circula internamente. A dissolução do CO₂ diminui o pH de 7,6 para 7,4. O líquido segue para a câmara do fígado, entra no órgão pela veia porta e deixa-o pela veia hepática, sendo coletado pela cânula inserida na veia cava. Após a passagem pelo eletrodo de prata/platina e coleta das amostras, o líquido remanescente será descartado. Substratos e drogas serão dissolvidos no líquido de perfusão e infundidos no fígado através da bomba peristáltica. A substituição dos reservatórios contendo o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato, se dará mediante a utilização de uma torneira previamente adaptada na cânula de infusão (Kelmer-Bracht *et al*, 1984).

Para o procedimento cirúrgico os ratos foram anestesiados através da injeção intraperitoneal de Thionembutal® (50 mg/kg de peso corporal). A perfusão monovascular se deu pela via anterógrada (entrada pela veia porta e saída pela veia hepática).

Após canular a veia porta e a veia cava, o fígado é posicionado na plataforma de acrílico. O fluxo através do órgão é mantido constante por meio de uma bomba peristáltica e ajustado entre 30 e 35 mL.min⁻¹, dependendo do peso do fígado (Kelmer-Bracht *et al*, 1984).

Nos experimentos de gliconeogênese, após a estabilização do consumo de oxigênio pelo fígado, foi infundido o substrato a fim de realizar a estimulação da síntese de glicose. Posteriormente, o cloridrato de sibutramina, previamente solubilizado no tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato foi infundido pela veia porta para a avaliação da atividade deste extrato sobre esta via metabólica a partir do substrato utilizado neste procedimento. Após percorrer o órgão, alíquotas do perfusado são coletadas, as quais são utilizadas para quantificar os metabólitos ali presentes, que poderão revelar interferência da droga, ao comparar com o perfusado antes e depois da infusão da droga.

Para os experimentos de glicólise e glicogenólise a droga foi infundida nos tempos determinados pelos protocolos experimentais.

2.3 ANALÍTICA

Dosagens enzimáticas são utilizadas para quantificar glicose, lactato e piruvato, e, em alguns protocolos, amônia e ureia. Estas dosagens são realizadas através da lactato desidrogenase (Gutmann e Wahlefeld, 1974; Czok e Lamprecht, 1974). O método utilizado é espectrofotométrico (enzimático), com medidas de variações na concentração de NADH a um comprimento de onda de 340 nm. A glicose é dosada utilizando a técnica da glicose oxidase (Bergmeyer e Bernt, 1974), um método enzimático colorimétrico, cujas variações nas concentrações serão avaliadas espectrofotometricamente, a um comprimento de onda de 505 nm. Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de alto grau analítico.

2.4 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

A concentração venosa de oxigênio será medida polarograficamente através de um eletrodo de platina combinado com um eletrodo de prata/cloreto (Kelmer-Bracht *et al*, 1984). As variações na concentração venosa de oxigênio serão registradas e a velocidade de consumo (V_{O_2}) será calculada pela seguinte fórmula:

$$V_{O_2} = \frac{(Ca - Cv) F}{P}$$

Onde Cv é a concentração venosa de oxigênio ($\mu\text{mol/ml}$) e Ca é a concentração arterial. Esta última é constante e igual a $0,86 \mu\text{mol/ml}$ a 37°C para a concentração salina do tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. F é o fluxo através do órgão, em ml/min , e P o peso úmido do fígado, em gramas. Calculado desta forma, o consumo de oxigênio fica expresso em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ (grama de peso úmido do fígado)⁻¹.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos dados, a fim de avaliar a significância dos efeitos da referida droga, foi feito por meio do teste de *Newman-Keuls*, com $p < 0,05$, com auxílio do programa

Graphpad Prism®, versão 6, de 2013. Gráficos foram gerados a partir do mesmo programa. Os dados estatisticamente significativos foram discutidos e comparados aos dados já existentes na literatura.

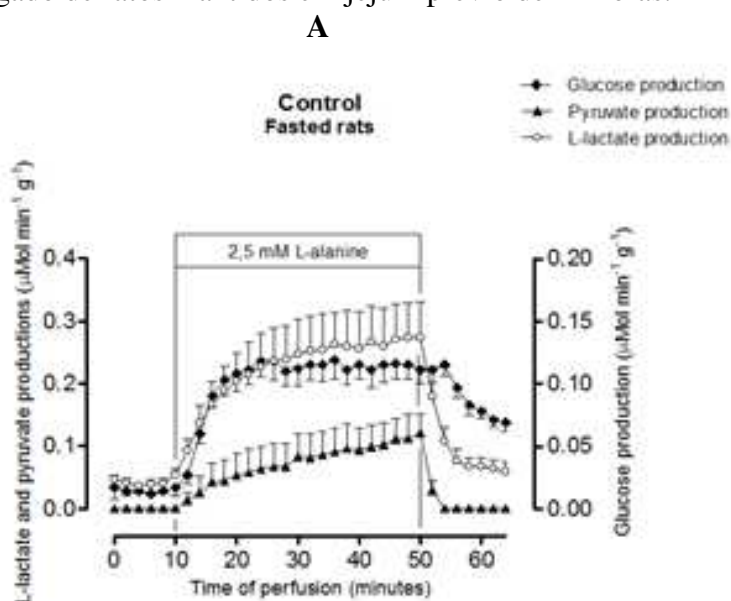
3. ANÁLISES E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

3.1 EFEITOS DA SIBUTRAMINA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO E NEOGLICOGÊNESE EM RATOS EM JEJUM (24 HORAS)

Na figura 2A observa-se que, na presença da sibutramina (100 μM), a produção de glicose diminuiu em aproximadamente 50%. As alterações na produção de piruvato e de lactato foram insignificantes, quando comparados com o controle (figura 1A). Empregando-se a mesma concentração da droga e o mesmo substrato, a figura 1B mostra que a partir da infusão de sibutramina, houve um aumento no consumo do oxigênio em 11%, e a produção de amônia e ureia se mostraram irrelevantes.

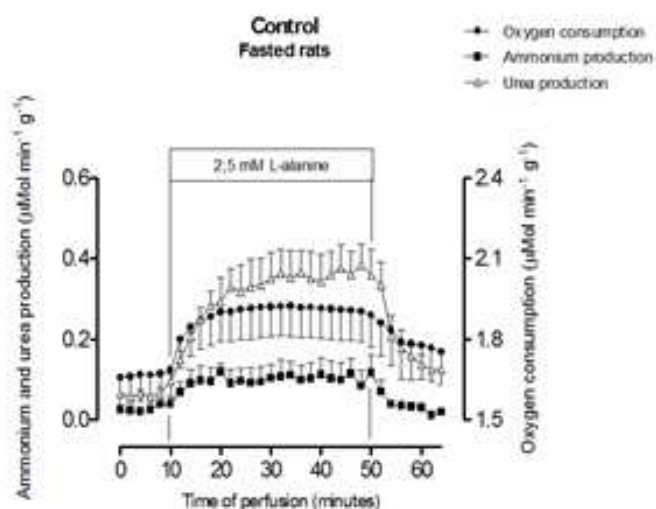
Figura 1 (A e B) – Experimentos controle de gliconeogênese a partir de alanina realizados com fígado de ratos mantidos em jejum prévio de 24 horas.

Figura 1 (A e B) – Experimentos controle de gliconeogênese a partir de alanina realizados com fígado de ratos mantidos em jejum prévio de 24 horas.



Fonte: Os autores.

B

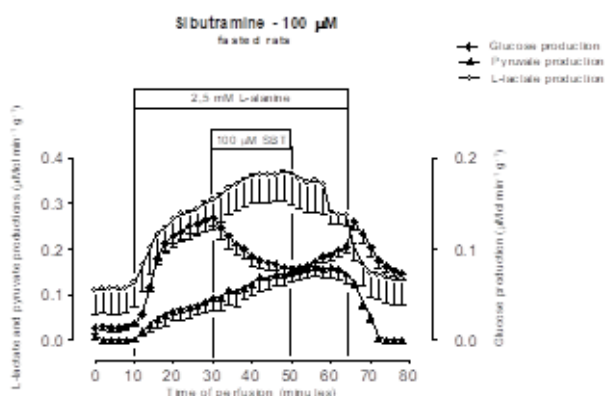


Fonte: Os autores.

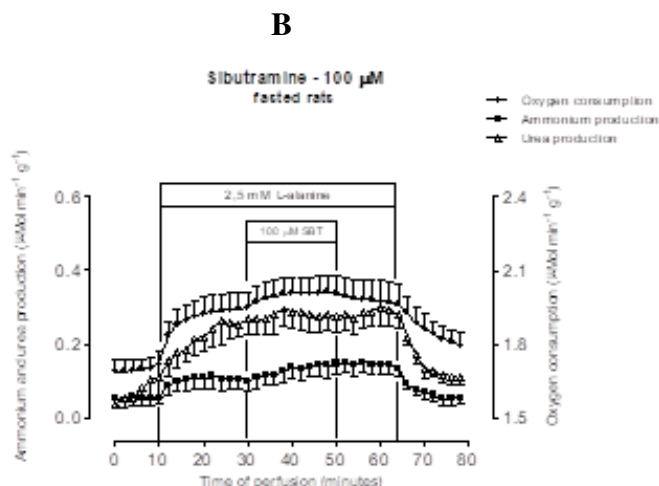
O fígado foi perfundido com tampão Krebs-Henseleit-Bicarbonato (KH) (pH 7,4) durante 60 minutos. Os primeiros dez minutos de perfusão foram realizados com tampão KH puro. Do minuto 10 ao minuto 50, foi perfundido o tampão KH acrescido do substrato gliconeogênico alanina na concentração de 2,5 mM. Após o minuto 50 o fígado voltou a ser perfundido com solução tampão KH pura até o final do experimento. O gráfico A indica a produção de glicose (escala à direita) e produção de piruvato e lactato (escala à esquerda) e o gráfico B indica o consumo de oxigênio (escala à direita) e a produção de amônia e ureia (escala à esquerda) em $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$. As alíquotas foram coletadas de 02 em 02 minutos e as dosagens enzimáticas e polarográficas realizadas com todas as alíquotas coletadas. Os dados indicam a média \pm erro padrão ($n=4$). (SBT = sibutramina).

Figura 2 (A e B) – Experimentos de gliconeogênese a partir de alanina realizados com fígado de ratos mantidos em jejum prévio de 24 horas.

A



Fonte: Os autores.

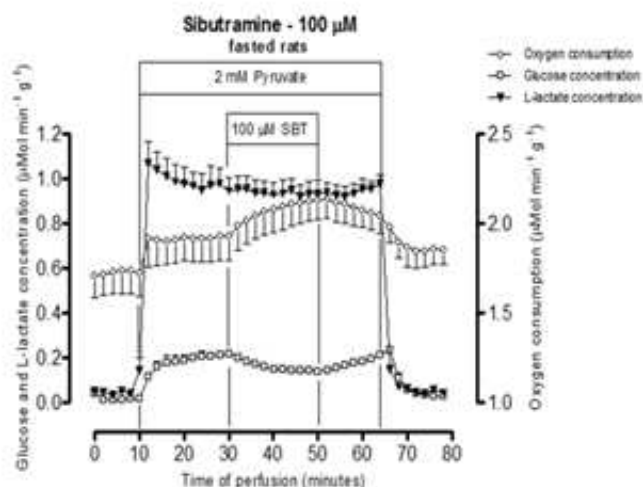


Fonte: Os autores.

O fígado foi perfundido com tampão Krebs-Henseleit-Bicarbonato (KH) (pH 7,4) durante 78 minutos. Os primeiros dez minutos de perfusão foram realizados com tampão KH puro. Do minuto 10 ao minuto 30, foi perfundido o tampão KH acrescido do substrato gliconeogênico alanina na concentração de 2,5 mM. Do minuto 30 ao minuto 50, o órgão foi perfundido por tampão KH + alanina acrescido de sibutramina na concentração de 100 micromolar. Após o minuto 50 o fígado voltou a ser perfundido com solução tampão KH + piruvato e, finalmente, após o minuto 64, o órgão voltou a ser perfundido com solução tampão pura, até o final do experimento. O gráfico A indica a produção de glicose (escala à direita) e produção de piruvato e lactato (escala à esquerda) e o gráfico B indica o consumo de oxigênio (escala à direita) e a produção de amônia e ureia (escala à esquerda) em $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$. As alíquotas foram coletadas de 02 em 02 minutos e as dosagens enzimáticas e polarográficas realizadas com todas as alíquotas coletadas. Os dados indicam a média \pm erro padrão (n= 4). (SBT = sibutramina).

Empregando-se como substrato gliconeogênico o piruvato, a sibutramina (100 μM) causou um aumento de 20% no consumo de oxigênio. A produção de glicose diminuiu em aproximadamente 60% e a produção de lactato diminuiu em 4%. (Figura 2A e 2B).

Figura 3 – Experimentos de gliconeogênese a partir de piruvato realizados com fígado de ratos mantidos em jejum prévio de 24 horas.

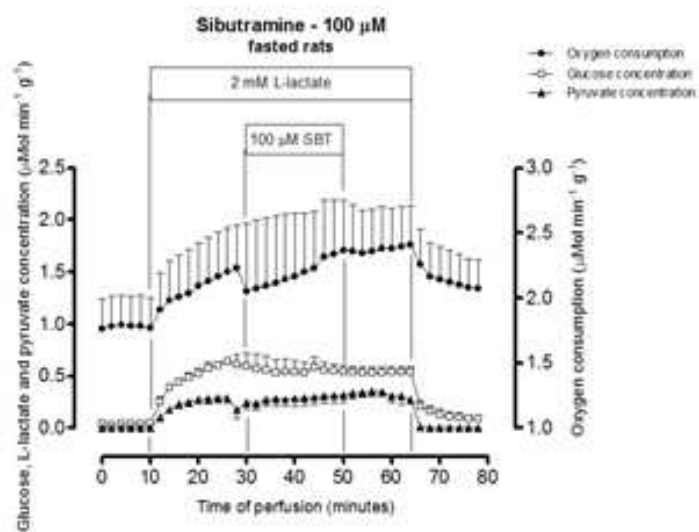


Fonte: Os autores.

O fígado foi perfundido com tampão Krebs-Henseleit-Bicarbonato (KH) (pH 7,4) durante 78 minutos. Os primeiros dez minutos de perfusão foram realizados com tampão KH puro. Do minuto 10 ao minuto 30, foi perfundido o tampão KH acrescido do substrato gliconeogênico piruvato na concentração de 2 mM. Do minuto 30 ao minuto 50, o órgão foi perfundido por tampão KH + piruvato acrescido de sibutramina na concentração de 100 micromolar. Após o minuto 50 o fígado voltou a ser perfundido com solução tampão KH + piruvato e, finalmente, após o minuto 64, o órgão voltou a ser perfundido com solução tampão pura, até o final do experimento. O gráfico indica o consumo de oxigênio (escala à direita) e produção de glicose e lactato (escala à esquerda) em μ Mol min⁻¹ g⁻¹. As alíquotas foram coletadas de 02 em 02 minutos e as dosagens enzimáticas e polarográficas realizadas com todas as alíquotas coletadas. Os dados indicam a média \pm erro padrão (n= 3). (SBT = sibutramina).

Nos experimentos de neoglicogênese nos quais se utilizou o substrato lactato na concentração de 2 mM (figura 04), observou-se que o consumo de oxigênio, aumentou em aproximadamente 30%, enquanto a produção de glicose foi inibida em apenas 6,1% e a produção de piruvato aumentou em 57%, em presença de sibutramina (100 μ M).

Figura 4 – Experimentos de gliconeogênese a partir de lactato realizados com fígado de ratos mantidos em jejum prévio de 24 horas.



Fonte: Os autores.

O fígado foi perfundido com tampão Krebs-Henseleit-Bicarbonato (KH) (pH 7,4) durante 78 minutos. Os primeiros dez minutos de perfusão foram realizados com tampão KH puro. Do minuto 10 ao minuto 30, foi perfundido o tampão KH acrescido do substrato gliconeogênico lactato na concentração de 2 mM. Do minuto 30 ao minuto 50, o órgão foi perfundido por tampão KH + lactato acrescido de sibutramina na concentração de 100 micromolar. Após o minuto 50 o fígado voltou a ser perfundido com solução tampão KH + lactato e, finalmente, após o minuto 64, o órgão voltou a ser perfundido com solução tampão pura, até o final do experimento. O gráfico indica o consumo de oxigênio (escala à direita) e produção de glicose e piruvato (escala à esquerda) em μ Mol min⁻¹ g⁻¹. As alíquotas foram coletadas de 02 em 02 minutos e as dosagens enzimáticas e polarográficas realizadas com todas as alíquotas coletadas. Os dados indicam a média \pm erro padrão (n= 3). (SBT = sibutramina).

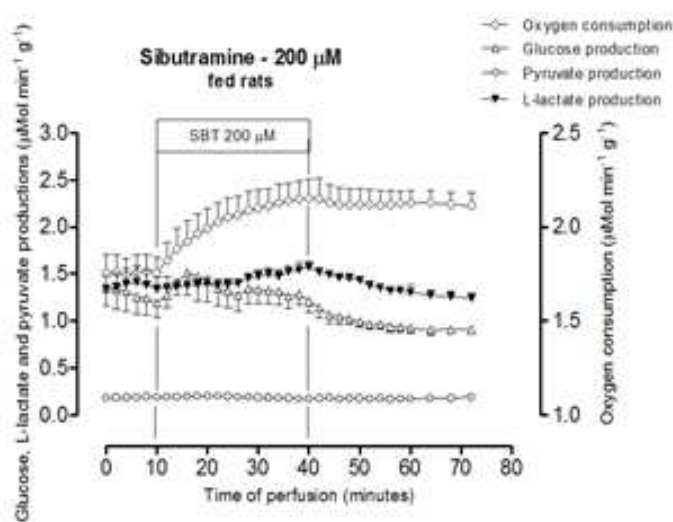
Utilizando-se Frutose (5 mM) como substrato para a neoglicogênese, em presença de sibutramina (100 μ M) o consumo de oxigênio aumentou em 19%, a produção de piruvato aumentou 10%, a produção de lactato aumentou em 27%, e a produção de glicose diminuiu em apenas 4%, o que não é representativo, não possuindo divergências quando comparado ao experimento controle.

Em experimentos de neoglicogênese a partir de Glutamina na concentração de 2,5 mM, na presença da sibutramina (100 μ M), o consumo de oxigênio seguiu seu padrão normal, assim como a produção de glicose, piruvato e lactato não sofreram alterações, não havendo divergências com o experimento controle.

3.2 EFEITOS DA SIBUTRAMINA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO, GLICÓLISE E GLICOGENÓLISE EM RATOS ALIMENTADOS

A figura 5 mostra a produção de glicose, piruvato, lactato e o consumo de oxigênio no momento em que estão ocorrendo as vias catabólicas glicólise e glicogenólise, em presença de sibutramina na concentração de 200 μM . A droga não causou alterações relevantes na concentração dos metabólitos, em contrapartida o consumo do oxigênio aumentou em 18%, quando comparados ao controle (figura 6).

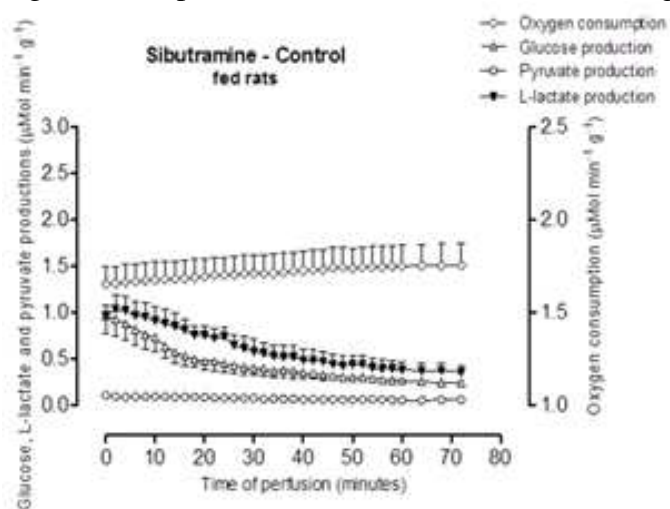
Figura 5 – Experimentos realizados com fígado de ratos alimentados.



Fonte: Os autores.

O fígado foi perfundido com tampão Krebs-Henseleit-Bicarbonato (KH) (pH 7,4) durante 74 minutos. Os primeiros dez minutos de perfusão foram realizados com tampão KH puro. Do minuto 10 ao minuto 40, foi perfundido o tampão KH acrescido de sibutramina na concentração de 200 micromolar. Após o minuto 40 o fígado voltou a ser perfundido com solução tampão pura. O gráfico indica o consumo de oxigênio (escala à direita) e produção de glicose, lactato e piruvato (escala à esquerda) em $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$. As alíquotas foram coletadas de 02 em 02 minutos durante 60 minutos, e posteriormente, de 04 em 04 minutos, até o final do experimento, e as dosagens enzimáticas e polarográficas realizadas com todas as alíquotas coletadas. Os dados indicam a média \pm erro padrão ($n=4$). (SBT = sibutramina).

Figura 6 – Experimentos controle realizados com fígado de ratos alimentados.



Fonte: Os autores.

O fígado foi perfundido com tampão Krebs-Henseleit-Bicarbonato (KH) (pH 7,4) durante 74 minutos. O gráfico indica o consumo de oxigênio (escala à direita) e produção de glicose, lactato e piruvato (escala à esquerda). As alíquotas foram coletadas de 02 em 02 minutos durante 60 minutos, e posteriormente, de 04 em 04 minutos, até o final do experimento, e as dosagens enzimáticas e polarográficas realizadas com todas as alíquotas coletadas. Os dados indicam a média \pm erro padrão (n= 4). (SBT = sibutramina).

A sibutramina promoveu inibição da neoglicogênese a partir do substrato alanina ao passo que aumentou o consumo de oxigênio, embora este último efeito não tenha sido tão acentuado. Sabendo que essa via anabólica é dependente de ATP e de NADH, assim como de enzimas reguladoras e do transporte adequado de metabólitos para o interior da matriz mitocondrial, a droga em questão pode estar atuando em um ou mais desses fatores (VOET e VOET, 2013).

Em primeira instância, a sibutramina poderia afetar a entrada do substrato alanina na mitocôndria, ou mesmo sua conversão a piruvato na matriz mitocondrial pela enzima alanina aminotransferase (ALT), como descrito por Nelson e Cox (2014). Para comprovar esta hipótese, foram realizados experimentos nas mesmas condições, utilizando como substrato o piruvato. Observou-se que com este substrato, a via neoglicogênica também é afetada. Isso mostra que a entrada da alanina na mitocôndria e sua conversão a piruvato podem estar sofrendo ação da droga, mas não é a única causa da inibição da via, podendo esta droga estar agindo de maneira efetiva em etapas subsequentes ou mesmo no transporte de piruvato para dentro da matriz mitocondrial (LIEBERMAN; MARKS e SMITH, 2007).

Sabendo-se que o lactato pode ser convertido a piruvato e o mesmo é transportado para a matriz mitocondrial, servindo como substrato neoglicogênico (VOET; VOET, 2013), foram realizados experimentos a partir de tal substrato para testar a hipótese do bloqueio do transporte de piruvato para a mitocôndria. Tais experimentos evidenciaram que a neoglicogênese não sofre interferência efetiva da sibutramina. Assim, as suposições de que etapas subsequentes da via gliconeogênica estivessem sendo afetadas pela sibutramina, e de que o transporte de piruvato estivesse comprometido, não podem ser aqui consideradas.

Como já mencionado, ausência ou redução dos níveis de ATP e NADH podem interferir na via metabólica em questão. Assim, os efeitos da sibutramina sobre o metabolismo energético mitocondrial devem ser considerados.

De acordo com Hermoso e Pivato (2008), a sibutramina diminui a biossíntese de ATP, principalmente por desacoplar a fosforilação oxidativa e a cadeia transportadora de elétrons, além de causar uma inibição dos complexos I e III desta cadeia. Esses efeitos levam a uma maior oxidação do NADH a NAD^+ , e também um maior consumo de O_2 , visando compensar a produção reduzida de ATP. Assim, pode-se supor que essa droga diminui a quantidade de ATP e NADH disponíveis, podendo ser este um dos fatores que operam para inibir a neoglicogênese e aumentar o consumo de oxigênio, como observado nos experimentos realizados a partir de alanina e piruvato, em presença de sibutramina.

Entretanto, os experimentos com lactato deixam claro que a quantidade reduzida de ATP produzido pela mitocôndria em presença de sibutramina não é o principal fator inibidor da via, visto que nestas condições a via acontece praticamente sem interferência. Assim, resta supor que a principal causa de inibição da neoglicogênese seja a diminuição da força redutora (NADH), importante em algumas etapas dessa via, especialmente na etapa da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (CONSTANTIN, 2009). Nelson e Cox (2014), afirmam que o lactato, ao ser convertido a piruvato, promove redução do NAD^+ , levando à produção, portanto, de NADH, o que provavelmente suplanta a falta dessa força redutora na neoglicogênese.

Reforçando esta hipótese, os experimentos realizados utilizando-se a frutose como substrato, mostraram que não houve inibição da neoglicogênese, bem como nos experimentos realizados com glutamina. Lieberman, Marks e Smith (2007), relataram que a frutose segue tanto pela via neoglicogênica, como pela via glicolítica, sendo que na última se produz ATP e NADH. Segundo Voet e Voet (2013) a glutamina, ao sofrer degradação, produz seu α -cetoácido correspondente, cujo grupamento amina é transferido para o α -cetoglutarato, formando glutamato, o qual ao sofrer deaminação, libera α -cetoglutarato e produz NADH. Nos dois casos, a produção de NADH

promove um efeito compensatório à produção diminuída deste pelo efeito da sibutramina em nível mitocondrial.

Efeitos similares de inibição da neoglicogênese foi observado por Oliveira et al. (2010) com a droga Tibolona, a qual é uma droga bloqueadora do complexo I, e por Pivato et al. (2006) com a Carbenoxolona, que é um desacoplador da fosforilação oxidativa.

Todos estes resultados apontam para uma inibição da neoglicogênese a partir de alguns substratos, em presença de sibutramina, por diminuição da força redutora, semelhante ao demonstrado por Constantin (2009), em seus experimentos utilizando a droga Fisetina, que inibiu a neoglicogênese, por provocar um déficit de equivalentes redutores.

A sibutramina não teve interferência evidente na glicólise e glicogenólise, e condizendo com Lieberman, Marks e Smith (2007), ambas as vias não necessitam de força redutora. Assim essas vias catabólicas prosseguiram normalmente, como observado na concentração dos metabólitos dosados, que não sofreram alterações relevantes.

Com base nos trabalhos de Hermoso e Pivato (2008), que mostraram que a sibutramina é uma droga desacopladora da fosforilação oxidativa, infere-se que o aumento no consumo de oxigênio uma forma de suplantar a baixa razão ATP/ADP, provocada pela droga.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inibição da neoglicogênese hepática obtida com os presentes experimentos pelo tratamento de fígado de rato em jejum com sibutramina, é resultante da diminuição da razão NADH/ NAD⁺. Assim, como a neoglicogênese é uma via anabólica, onde algumas de suas etapas são estritamente dependentes de força redutora, a mesma não ocorre nestas condições com déficit da respectiva força.

Não houve inibição da glicólise e da glicogenólise hepática nos experimentos em que fígado de ratos alimentados foram expostos a sibutramina. Essas duas vias catabólicas não foram inibidas por não dependerem de força redutora em suas etapas.

O aumento no consumo de oxigênio nos experimentos supramencionados é devido à diminuição da razão ATP/ADP, que leva ao maior consumo de oxigênio no catabolismo, visando compensar a diminuição de ATP.

As doses utilizadas são excessivas, explicando grande parte da hepatotoxicidade, sendo que experimentos com doses terapêuticas são necessários para averiguar possíveis alterações na neoglicogênese e no consumo de oxigênio.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, A. P. de; MARTINS, F. C.; VASQUES, F. Aspectos psiquiátricos do tratamento da obesidade. **Rev. Psiq. Clin.** v.31, n.4, p.195-198, 2004.
- BARCELOS, C.C. **Efeitos neuromusculares do atracúrio e do rocurônio em ratos pré-tratados com carbamazepina e fenobarbital.** Campinas, 2007.
- BARROS, F. C. et al. Prevalência de obesidade em adultos e seus fatores de risco. **Rev. Saúde Pública.** v.31, n.3, 1997.
- BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis.** Verlag Chemie-Academic Press. Inc. Weinheim-London, 1974.
- BEYRUTI, M. et al. Experiência Clínica com o Uso Conjunto de Sibutramina e Orlistat em Pacientes Obesos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** São Paulo, v.44, n.1, p.103-105, fev., 2000.
- CLARK, M. A. et al. **Farmacologia ilustrada.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- CONSTANTIN, R. P. **As ações da fisetina sobre o metabolismo hepático.** Maringá, 2009. 13f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, 2009.
- CZOK, R. & LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenlpyruvate and D-glycerate-2-phosphate, in **Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U.,ed.)**,1446-1451, Academic Press, New York, 1974.
- DUTRA, R.L.; BALDANÇA, C.S.; FRITZEN, M. Perfil de venda de sibutramina. **Revista Eletrônica Estácio Saúde.** v.2, n.1, p.33-37, 2013.
- FRANCISCHI, R. P. P. et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Ver. Nutr.** v.13, n.1, p.17-29, 2000.
- FRANCO, R.R.; COMINATO, L.; DAMIANI, D. O efeito da sibutramina na perda de peso de adolescentes obesos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.58, n.3, p.243-250, 2014.
- GIORDANO, A. et al. Sibutramine-dependent Brown fat activation in rats: an immunohistochemical study. **International Journal of Obesity.** v.26, n.1, p.354-360, 2002.
- GONZAGA, J. B. et al. Análise das prescrições de sibutramina dispensadas em drogarias no município de Cuiabá-MT, Brasil. **Revista Infarma – Ciências Farmacêuticas.** v.27, n.1, p.33-37, 2015.
- GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2012.
- GUTMANN, I. & WAHLEFELD, A. W. Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD⁺. In: BERGMEYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis.** New York: Academic Press, 1974.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HALPERN, A.; MANCINI, M. C. O tratamento da obesidade no paciente portador de hipertensão arterial. **Revis. Bras. Hipertens.** v.7, n.2, 2000.

HALPERN, A.; MANCINI, M. C. Tratamento Farmacológico da Obesidade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.46, n.5, p.497-513, 2002.

HERMOSO, A.P.M.; PIVATO, L.S. **Efeitos da sibutramina sobre o metabolismo energético em mitocôndrias de fígado de rato**. 2008. 40f. Monografia (Curso de Graduação em Ciências Biológicas) – Unidade de Ensino Superior Ingá – UNINGÁ, 2008.

KASTRUP, M.B.W. Sibutramina: indicações, contraindicações e precauções. **Arquivos do CRM-PR**. v.30, n.117, 2013.

KELMER-BRACHT, A.M. et al. Construção de aparelho de perfusão de fígado para estudos de regulação do metabolismo e de mecanismos de ação de drogas. **Arq. Biol. Tecnol.** v.27, n.4, 1984.

KREBS, H. A.; HENSELEIT, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**. v.210, p.33-66, 1932.

LIEBERMAN, M.; MARKS, A. D.; SMITH, C. **Bioquímica médica básica de Marks**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

NACCARATO, M. C.; LAGO, E. M. O. Uso dos anorexígenos anfepramona e sibutramina: benefício ou prejuízo à saúde? **Revista Saúde**. v.8, n.1/2, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed. São Paulo: Sarvier, 2014.

OLIVEIRA, M. C. et al. **Efeitos da tibolona sobre o metabolismo hepático de ratas wistar**. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Maringá. Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2010.

PILKIS, S. J.; EL-MAGHRABI, M. R. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Ann. Rev. Biochem.** V.57, p.755-83, 1988.

PIVATO, L. S. et al. Metabolic effects of carbenoxolone in rat liver. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. v. 20, n. 5, 2006.

RANG, H. P. et al. Obesidade. In: RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SUCAR, D. D.; SOUGEY, E. B.; BRANDÃO NETO, J. Surto psicótico pela possível interação medicamentosa de sibutramina com finasterida. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.24, n.1, p.30-33, 2002.

VOET, Donald; VOET, Judith G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

WILLIAMS, G; PICKUP, J. C. História do diabetes. In: **Manual de Diabetes**, 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 2001.