

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Wilton Marlindo Santana Nunes

**TUNGSTATO DE SÓDIO REDUZ A RESISTÊNCIA À
INSULINA INDUZIDA POR DEXAMETASONA EM RATOS**

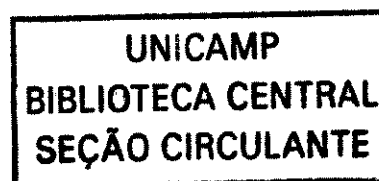
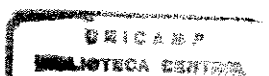
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) <u>Wilton Marlindo Santana Nunes</u> _____ e aprovada pela Comissão Julgadora.
--



Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do título
de Mestre em Biologia Funcional e
Molecular na área de Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

Campinas
2001



UNIDADE	B.2
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	N 922t
V.	Ex.
TOMBO BC/	96905
PROC.	16-892/01
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/11/01
N.º CPD	

CM00161042-0

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

Nunes, Wilton Marlindo Santana

N922t Tungstato de sódio reduz a resistência à insulina induzida por dexametasona em ratos/Wilton Marlindo Santana Nunes. - -
Campinas, SP:[s.n.], 2001
65f.:ilus.

Orientador: Antonio Carlos Boschero

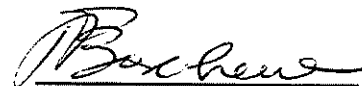
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Glicose. 2. Insulina. 3. Tungstato de sódio. I. Boschero, Antonio Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

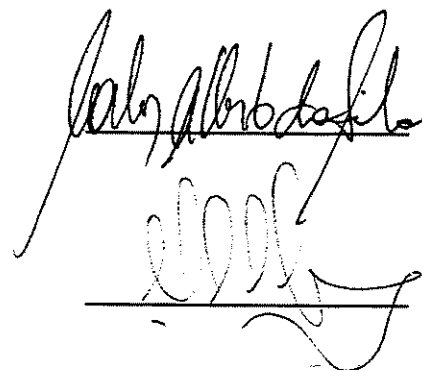
Data da Defesa: 25/07/2001.

BANCA EXAMINADORA:

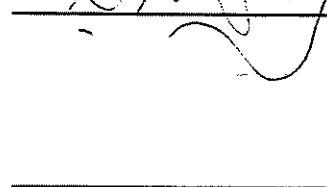
Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero (Orientador)



Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva



Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas



Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro



"Pelo conhecimento se encherão as câmaras de todas as substâncias preciosas e deleitáveis." Prov. 24:4.

**Principalmente a minha mãe, meus irmãos, minha esposa e filha pelo amor,
carinho e compreensão constante.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu grande amor e proteção.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, pela sua dedicação e amizade no meu aprendizado científico.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, pela grande amizade e incentivo no cumprimento desta etapa.

A Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), por ter cedido o laboratório de fisiologia para que pudesse realizar parte do protocolo experimental.

A amiga Prof. Clarisse pela amizade e execução do protocolo experimental.

Aos técnicos de laboratório da UNESP, Rio Claro, pela ajuda na execução dos experimentos.

A Funcionaria da FUNCAMP/PRONEX, Miriam Gonçalves de Chaves, pela grande ajuda nos experimentos.

Aos Professores do departamento de Fisiologia e Biofísica pela amizade e contribuição em minha formação acadêmica.

A todos colegas da pós-graduação pela amizade e ajuda.

A todos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica pela amizade, simpatia e carinho que tiveram para comigo.

Ao técnico do laboratório Lecio, pela amizade e presteza na ajuda dos experimentos realizados no laboratório de pâncreas endócrino do IB.

Ao programa de bolsa do CNPq pelo auxílio financeiro proporcionado.

A minha mãe Maria Cassimira Santana Nunes pelo amor e carinho e educação cristã que me orientou nos caminhos desta vida.

A minha esposa Silvana pelo amor que me tem dedicado.

A minha filha Larissa.

Aos meus irmãos e cunhados Welington, Rosane, Hermam e Vânia pelo carinho e incentivos constantes.

Obrigado.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (SP).

RESUMO

Dentre os vários compostos inorgânicos que mimetizam as ações da insulina os derivados do vanadato são, sem dúvida, os mais estudados. No presente trabalho, analisamos os efeitos de um desses derivados, o tungstato de sódio, sobre a homeostasia da glicose e a secreção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas de ratos tornados resistentes à insulina pela dexametasona. Quinze dias antes dos experimentos, ratos machos adultos da linhagem Wistar foram distribuídos casualmente em quatro grupos, a saber: controle, dexametasona, tungstato e dexametasona + tungstato. Durante os quinze dias, os ratos dos grupos controle e dexametasona tiveram livre acesso à água e ração. Os ratos dos grupos tungstato e dexametasona + tungstato receberam tungstato de sódio (2mg/ml), dissolvido na água de beber. Nos últimos 5 dias que precederam os experimentos, os ratos dos grupos dexametasona e dexametasona + tungstato receberam, via intraperitoneal, doses diárias de dexametasona (1 mg/kg^{-1}). Nos ratos tornados resistentes à insulina pela dexametasona, o tratamento com tungstato normalizou a glicemia enquanto a insulinemia e a trigliceridemia permaneceram mais elevadas que o observado nos ratos controle. A velocidade de decaimento da glicose plasmática, medida através de um teste intravenoso de tolerância a insulina, bem como a captação de glicose pelo músculo sóleo dos ratos resistentes à insulina foram menores que os valores verificados para os ratos controle. Esses parâmetros também foram normalizados nos ratos resistentes à insulina tratados com tungstato. A curva de secreção de insulina, frente a concentrações crescentes de glicose (5,6 a 27,7 mM), por ilhotas isoladas de ratos tratados com dexametasona, foi desviada para a esquerda em relação à curva

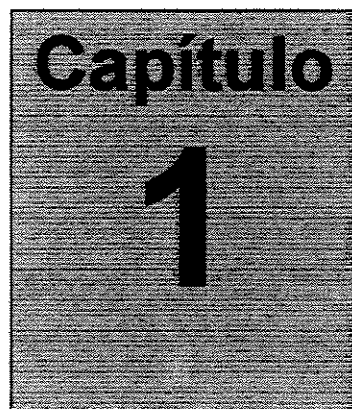
controle, indicando maior sensibilidade à glicose. Tungstato normalizou a curva dose-resposta à glicose nos ratos tratados com dexametasona. Os EC_{50} para as curvas dose-resposta foram de 13,7, 7,9, 15,7 e 11,8 para as ilhotas de ratos controle, dexametasona, tungstato e dexametasona + tungstato, respectivamente. Concluindo, a normalização das concentrações plasmáticas da glicose, induzida por tungstato, nos ratos tratados com dexametasona parece ser, pelo menos em parte, dependente do aumento da captação de glicose pelas células musculares desses ratos.

ABSTRACT

Among the several inorganic compounds that mimic the effect of insulin vanadium derivatives are the most widely studied. In the present work we have analyzed the effects of tungstate on glucose homeostasis and insulin secretion in healthy and in insulin resistant rats by dexamethasone. Fifteen days before the experiments the rats were randomly distributed in four groups: control, dexamethasone, tungstate and dexamethasone + tungstate. Control and dexamethasone groups had free access to water. Tungstate and dexamethasone + tungstate groups received tungstate dissolved in the drink water (2mg/ml). The dexamethasone and dexamethasone + tungstate groups received during the last 5 days daily doses of 1 mg/Kg⁻¹ of dexamethasone, intraperitoneally. In insulin resistant rats, tungstate-treatment normalized plasma glucose whereas plasma insulin and triglycerides remained significantly higher than controls. The glucose disappearance rate after an *i*MTT and the glucose uptake by *soleus* muscle of insulin resistant rats were lower compared to control rats and was normalized by tungstate. The dose-response curve of insulin secretion (5.6 to 27.7 mM glucose) in isolated islets from dexamethasone-treated rats was shifted to the left compared to control islets. Administration of tungstate to these animals induced a dose-response curve closer to control islets. The EC₅₀ for the dose-response curves were 13.7, 7.9, 15.7 and 11.8 mM glucose for control, dexamethasone, tungstate and dexamethasone + tungstate-treated rats, respectively. In conclusion, tungstate-induced plasma glucose normalization seems to be, at least in part, dependent on the restoration of glucose uptake by muscle cells of insulin resistant rats.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	2
1. APRESENTAÇÃO	3
OBJETIVOS	8
MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 ANIMAIS	11
3.2 TRATAMENTO	11
3.3 SOLUÇÕES	12
3.4 ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	14
3.5 SECREÇÃO DE INSULINA EM CONDIÇÃO ESTÁTICA	15
3.6 RADIOIMUNOENSAIO DE INSULINA (RIE)	15
3.7 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA	17
3.8 DETERMINAÇÃO DE TRIGLICÉRIDES	18
3.9 DETERMINAÇÃO DE GLICOGÊNIO: MUSCULAR E HEPÁTICO	18
3.10 CAPTAÇÃO MUSCULAR DE 2-DEOXYGLICOSE (2-DG)	19
3.10.1 PREPARAÇÃO DO MÚSCULO SÓLEO	19
3.10.2 INCUBAÇÃO DAS FATIAS DO MÚSCULO	19
3.10.3 MEIOS DE PRÉ-INCUBAÇÃO E INCUBAÇÃO	20
3.10.4 AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE 2-DEOXYGLICOSE	20
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
RESULTADOS	22
4. RESULTADOS	23
4.1 TABELA	25
4.2 FIGURA 1	26
4.3 FIGURA 2	27
4.4 FIGURA 3	28
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
APÊNDICE	53



INTRODUÇÃO

1. APRESENTAÇÃO

A importância dos estudos da ação da insulina está fundamentada na prevalência de altos índices de indivíduos insulino resistentes e sua associação com a patogênese de diversas doenças, incluindo obesidade, diabetes mellitus, hipertensão e dislipidemias, dentre outras.

A ação da insulina se inicia através da sua ligação ao receptor na membrana plasmática, o qual se apresenta em concentrações variadas de acordo com o tecido estudado. Este receptor é constituído por um conjunto de 4 sub-unidades protéicas, 2 denominadas α (inteiramente extracelular) e 2 β transmembranares, responsáveis pela transdução dos sinais (FREYCHET *et al.*, 1971; EBINA, *et al.*, 1985; ULLRICH, *et al.*, 1985; KASUGA, *et al.*, 1983).

Embora os mecanismos exatos da ação da insulina ainda sejam desconhecidos, é sabido que diferentes sistemas são ativados após a ligação ao receptor desencadeando várias cascatas de reações citosólicas e nucleares que culminam com as diferentes ações da insulina. A atividade tirosina-quinase do receptor de insulina é, sem dúvida, primordial para que as ações do hormônio se efetivem. Em algumas células, com mutações no receptor e conseqüente inibição de sua atividade tirosina-quinase, as ações da insulina também são inibidas, mesmo com formação adequada do complexo hormônio-receptor (KADOWAKI, *et al.*, 1988; YOSHIMASA, *et al.*, 1988).

Ainda não é completamente entendido como a estimulação da atividade quinase do receptor transmite o sinal até os efeitos biológicos finais da insulina. A maioria das investigações têm focalizado um modelo no qual há a fosforilação do receptor seguido

da ativação de seus substratos citosólicos (WHITE *et al.*, 1988; BERNIER *et al.*, 1987, SUN *et al.*, 1991).

Têm sido descritos vários substratos endógenos ligados aos receptores de insulina os quais são rápida e diretamente fosforilados em tirosina através da ativação do receptor. Estas proteínas fazem parte de mecanismos que, quando acionados, desencadeiam uma série de resposta citosólicas culminando na ação da insulina. Dentre estes substratos endógenos, o substrato do receptor da insulina (IRS) faz parte de uma família de proteínas cujos membros são fosforilado através da ativação do receptor pela insulina. Até a presente data, nove membros desta família foram identificados. Dentre estes, os mais importantes são os substratos do receptor de insulina 1,2,3 e 4 (IRS-1,IRS-2, IRS-3 e IRS-4)(ROTHENBERG, *et al.*, 1991; SUN *et al.*, 1995; LAVAN *et al.*, 1997,1997; LEE , 1993).

Outra estrutura de suma importância é a fosfatidilinositol 3- quinase (PI3-quinase), uma enzima com característica regulatória, responsável pela ligação do IRS a uma sub-unidade catalítica responsável pela fosforilação de fosfatidilinositol pertencentes a membrana celular (KAHN *et al.*,1999). E pelo menos duas outras proteínas adaptadoras com porções SH2; Nck e Grb-2 (LEE,1993; LOWENSTEIN, 1992).

Variações nos níveis e (ou) graus de fosforilação do IR, IRS-1 e a atividade da PI3-quinase foram observados em animais submetidos a diferentes tratamentos e/ou situações experimentais como; administração crônica de dexametasona, obesidade, jejum prolongado, diabetes por estreptozotocina, tratamento agudo com adrenalina, tratamento agudo com glucagon e envelhecimento, sugerindo que estes substratos

desempenham funções importantes no mecanismo molecular de resistência à insulina (ASANO, 2000; SAAD, 1994).

A década de 90 foi marcada pela constante busca de tratamentos alternativos visando oferecer uma melhora na qualidade de vida do paciente diabético. O intuito principal foi o de propiciar ao paciente a manutenção da normoglicemia. Nesta época, foram iniciados os estudos sobre ação de elementos quimicamente ativos, ou seja, compostos inorgânicos que auxiliassem na melhora do metabolismo tecidual da glicose. Dentre uma infinidade de tratamentos ressalta-se a prescrição do vanadato, molibdato, pervanadato e tungstato utilizados na endocrinologia e na medicina ortomolecular (MATSUMOTO, 1994). No que tange ao Vanadato, é sabido que a sua ação está fundamentada na capacidade de ativar o transporte de glicose e sua posterior utilização em vários tecidos isolados, fatos relevantes para a normalização da glicemia em indivíduos diabéticos (TAMURA, *et al.*, 1984). Segundo GUINOVART *et al.* (1988), NEWSHOLME *et al.*, (1987) e GIL *et al.*, (1988), vanadato restaura o conteúdo de glicogênio, da frutose 2,6- bifosfato e da glicose-6-fosfato hepático em ratos tornados diabéticos por streptozotocina. Tungstato e molibdato tem características físico-químicas semelhantes ao vanadato. Possuem a mesma configuração eletrônica, são iso ou heteropoliânios e exercem efeitos sobre o metabolismo da glicose similares ao vanadato (COTTON, *et al.*, 1988).

A administração de vanadato também normaliza a atividade de enzimas hepáticas como: a glicogênio sintase, fosforilase, glicoquinase e as enzimas bifuncionais 6-fosfofrutose-2-quinase/frutose-2,6-bifosfatas (GUINOVART *et al.*, 1988, GIL *et al.*, 1988, MIRALPEX *et al.*, 1992). Além disso, vanadato normalizou as concentrações de mRNA das enzimas 6-fosfofrutoquinase-2/frutose-2,6-bifosfatase e

L-piruvato quinase em hepatócitos de ratos diabéticos bem como em culturas de células hepáticas isoladas (MIRALPEX *et al.*, 1992; VALERA *et al.*, 1993).

Interessante que, a administração oral de vanadato a ratos diabéticos corrigiu a glicemia (MEYEROVITCH *et al.*, 1987; BENDAYAN *et al.*, 1989). A administração oral de vanadato favorece o transporte de glicose em músculo resistente à insulina. Isto se deve a ação do vanadato em inibir fosfatases podendo assim aumentar o estado de fosforilação dos diferentes proteínas envolvidas no transporte de glicose (CAREY *et al.*, 1995).

Por outro lado, o tratamento com Tungstato promoveu aumento na concentração de frutose 2,6-bifosfato em hepatócitos isolados de ratos diabéticos. Este efeito foi associado à mudanças nas concentrações de várias enzimas chave do metabolismo da glicose dos hepatócitos (GUINOVART, *et al.*, 1992). Mais recentemente, FOSTER *et al.*, (1998), observaram que o tungstato aumentou a concentração de glicose-6-fosfatase, uma enzima chave, responsável pelo passo terminal na gliconeogênese hepática e na glicogenólise. Este efeito reduz a produção de glicose e sua consequente liberação para o sistema circulatório.

O transporte deficiente de glicose na musculatura esquelética é um dos primeiros eventos observados na instalação da resistência à insulina. Esta resistência pode estar relacionada a um ou mais defeitos nas várias etapas da sinalização do hormônio tais como; no acoplamento da insulina ao seu receptor, na fluidez do sinal no interior das células alvo e, na translocação dos transportadores de glicose (GLUT4) para a membrana plasmática (SAAD, 1994).

A resistência periférica à insulina também pode ser causada por vários hormônios dentre os quais o hormônio de crescimento e os glicocorticóides

(AMATRUDA, 1985). Dexametasona, é um glicocorticóide sintético, largamente utilizado como agente terapêutico em várias patologias, haja visto, que a resistência à insulina está aumentada em indivíduos com acromegalia e Síndrome de Cushing (MEACHAM *et al.*, 1997). Podemos observar ainda, uma diminuição da captação de aminoácidos pelo músculo e diminuição da lipogênese em adipócitos causada pela dexametasona que é uma das características deste quadro de resistência (OLEFSKY, 1975; CARO *et al.*, 1982; AMATRUDA *et al.*, 1985). Os mecanismos pelos quais os glicocorticoides exercem estes efeitos não são totalmente conhecidos. Dexametasona (1mg/kg/dia por 5 dias) não altera a quantidade de receptor de insulina na membrana das células alvo mas, reduz a autofosforilação de IR, a fosforilação do IRS-1 e diminui drasticamente a associação do IRS-1 com a PI-3 quinase (80% no fígado e 41% no músculo). As alterações destes três componentes da cascata de eventos intracelulares, induzidos pela insulina, certamente contribui para a instalação da resistência a esse hormônio (SAAD *et al.*, 1993). Assim sendo, o tratamento crônico com dexametasona favorece a redução da captação de glicose na musculatura esquelética e é aceito como um modelo adequado de resistência à insulina.

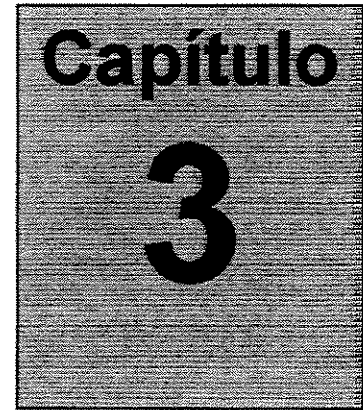
A rectangular box with a dark, textured background. The word "Capítulo" is written in a bold, sans-serif font at the top, and the number "2" is written in a large, bold, sans-serif font below it.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Neste trabalho, pretendemos estudar as possíveis interferências do tratamento crônico com tungstato de sódio sobre a captação de glicose no músculo e sobre a secreção de insulina em ratos tornados resistentes à insulina pela administração de dexametasona.



MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, machos, de três a cinco meses de idade, procedentes do biotério da UNICAMP. Até à utilização, os animais foram adaptados em gaiolas coletivas (por no mínimo dez dias) no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica/IB, a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob iluminação provida exclusivamente por lâmpadas fluorescentes, ligadas e desligadas automaticamente às 06:00 e 18:00 hs (07:00 e 19:00 hs no horário de verão, respectivamente). Forneceu-se ração balanceada e água *ad libitum*.

3.2 TRATAMENTO

Os animais foram divididos em quatro grupos denominados; controle, dexametasona, tungstato e tungstato com dexametasona. Os ratos do grupo controle receberam durante quinze dias ração balanceada e água *ad libitum*. Os ratos do grupo dexametasona foram tratados, por igual período, com ração balanceada e água *ad libitum*. Contudo, entre o décimo e decimo quinto dia de tratamento receberam dexametasona na dose de 1 mg/kg^{-1} via intraperitoneal. Os ratos do grupo tungstato receberam, por quinze dias, tungstato de sódio o qual foi dissolvido na água de beber (2mg/mL). Os ratos do grupo tungstato com dexametasona receberam tungstato de

sódio durante igual período, e dexametasona (1mg/kg^{-1}) a partir do décimo dia. A partir do décimo sexto dia de tratamento os ratos foram submetidos aos teste experimentais.

3.3 SOLUÇÕES

A solução para isolamento de ilhotas pancreáticas (solução de HANKS) foi preparada de acordo com HANKS & WALLACE (1949), apresentando a seguinte composição (g/L).

NaCl	8,000
KCl	0,400
CaCl ₂ anidro	0,140
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,200
Na ₂ HPO ₄ anidro	0,048
KH ₂ PO ₄	0,060
NaHco3	0,350
H ₂ O deionizada (q.s.p.)	1.000 mL

Quando da utilização desta solução, foi adicionado glicose para atingir uma concentração de 5,6 mM e albumina a 3%.

A solução-tampão bicarbonato de KREBS-RINGER (solução de KREBS), para incubação de ilhotas , bem com para o radioimunoensaio (RIE), tem a seguinte composição (g/L):

NaCl	26,886
NaHCO ₃	8,065
KCl	1,491
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,813
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,588
H ₂ O deionizada (q.s.p.)	1.000 mL

No momento do uso, foi adicionada albumina bovina (3mg/mL). O pH 7,4 foi ajustado após equilíbrio com carbogênio (O₂ 95%/CO₂ 5%).

3.4 ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

As ilhotas foram isolada seguindo-se técnica originalmente descrita por MOSKALEWSKI (1965), aplicada a pâncreas murino por LACY & KOSTIANOVSKY (1967), com as modificações introduzidas por BOSCHERO, DELATRE & SANTOS (1980) e SUTTON *et al.*, (1986). Em cada experimento, um a três ratos foram sacrificados por concussão cerebral e decapitados para sangria. Após laparotomia e localização do ducto biliar comum, esse foi ocluído no extremo distal, junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático, onde se introduziu uma cânula de polietileno no sentido da desembocadura. Cerca de 8 mL da solução de HANKS (HANKS *et al.*, 1949), contendo 8 mg de collagenase, foram injetados via cânula, provocando, por fluxo retrógrado, a divulsão do tecido acinoso. Procedeu-se, então a ablação do pâncreas, que foi transferido para tubo de ensaio de vidro (12 × 2 cm) e incubado por cerca de 18 min a 37 °C.

Em seguida, ainda a 37°C, o conteúdo foi agitado suavemente por um minuto e vertido em béquer. Após mistura com HANKS (ca. 80 mL), foi lentamente aspirado e ejetado com seringa (3x ca 50 mL) e, decantado durante 3 min. O sobrenadante foi então descartado, e o sedimento ressuspenso em HANKS (ca. 80 mL). Após repetir essa operação por quatro vezes, o produto final foi transferido para placa de Petri, de onde, sob lupa, as ilhotas foram coletadas por aspiração com auxílio de pipeta de vidro de ponta afilada.

3.5 SECREÇÃO DE INSULINA EM CONDIÇÃO ESTÁTICA

As ilhotas isoladas de ratos, pertencentes aos quatros grupos experimentais, foram coletadas alternadamente (grupo de quatro) em placa de polietileno com 24 poços contendo, em cada poço, 0,5 mL da solução-tampão de KREBS-RINGER suplementada com albumina bovina, à qual adicionou-se glicose (5,6 mM). Após incubação por 45 min (pré-incubação), a 37⁰C em atmosfera de carbôgenio pH 7,4, a solução de KREBS foi substituída por 1,0 mL do mesmo tampão, contendo diferentes concentrações de glicose; 5,6 (G5,6), 8,3 (G 8,3); 11,1 (G 11,1); 16,7 (G 16,7),22,2 (G22,2), 28,7(G28,7) mmol/L. Procedeu-se uma nova incubação , por 90 min, nas condições referidas acima. Após este período, as placas foram colocadas em freezer (-20) por 10 min e, o sobrenadante, de cada poço, transferido para tubos de polietileno e conservados a -20 ⁰C, até o momento da dosagem da insulina secretada.

3.6 RADIOIMUNOENSAIO DE INSULINA (RIE)

A insulina plasmática e a secretada durante o período de incubação por ilhotas isoladas foram avaliadas de acordo com o método descrito por (HERBERT, 1965), modificado por (SCOTT *et al.*,1981). Foram feitas as diluições necessárias das diferentes amostras para possibilitar a extrapolação de valores desconhecidos, a partir de uma curva padrão. O quadro a seguir descreve os componentes do ensaio:

	Insulina (μ l)	125 I-Insulina (μ l)	Anticorpo anti-insulina (μ l)
Amostra	100 (desconhecido)	100	100
Totais		200	
NSB		200	
Referência		100	100
S ₁ (0,020 ng/ml)	100	100	100
S ₂ (0,039 ng/ml)	100	100	100
S ₃ (0,078 ng/ml)	100	100	100
S ₄ (0,160 ng/ml)	100	100	100
S ₅ (0,310 ng/ml)	100	100	100
S ₆ (0,630 ng/ml)	100	100	100
S ₇ (1,250 ng/ml)	100	100	100
S ₈ (2,500 ng/ml)	100	100	100
S ₉ (5,000 ng/ml)	100	100	100

As amostras (desconhecidos) foram preparadas em duplicata, e os outros componentes do ensaio (pontos pertencentes a curva de referência), em triplicata.

Utilizou-se tampão fosfato (pH 7,4) para o preparo de todas as soluções; diluições das amostras, anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina radioativa. Além disto, os tubos correspondentes ao NSB e referência receberam 100 μ l adicionais de tampão fosfato.

A função de cada componente do ensaio é:

Totais: determinação da radioatividade máxima,

NSB (ligação inespecífica): determinação de possíveis interferências por componentes do tampão,

Referência: constituição do zero de insulina conhecida da curva padrão,

S₁ a S₉: amostras da curva padrão de insulina.

Realizadas todas as pipetagem, os tubos foram agitados em vortex e mantidos durante 48 horas, a 4°C. Após o período de incubação, com exceção dos totais, todas as condições receberam 200 µl de uma solução contendo 2,5% de carvão (Norit A), 0,5% de albumina e 0,25% de dextran T 70. Os tubos foram mantidos durante 20 min, a 4°C e a seguir centrifugados durante 20 min, a 2800 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade das amostras foi medida em contador γ (BECKMAN GAMMA 5500). Por intermédio dos valores obtidos nos tubos contendo concentrações fixas de insulina, elaborou-se uma curva padrão que possibilitou o conhecimento dos valores de insulina contida nas amostras.

3.7 TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA (ITT)

Para o ITT, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg) e, após 40 min, foi feita uma incisão próximo a veia femoral onde coletou-se 0,25mL de amostras de sangue. Após a primeira coleta foi injetado, via veia peniana, insulina regular Biobrás na dose de 1 U/kg (1U/mL). Novas amostras de sangue foram coletadas

nos tempos 2.5, 5, 10 e 20 min após administração da insulina. A glicose plasmática foi avaliada pelo método da glicose oxidase (TRINDER, 1969).

3.8 DETERMINAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS

A concentração do triglicérides foi determinado pelo método de (McGOWAN, 1983) através de "Kit" laboratorial Labtest®.

3.9 DETERMINAÇÃO DE GLICOGÊNIO: MUSCULAR E HEPÁTICO

Após decaptação e sangria dos ratos, alíquotas de tecido hepático e muscular foram transferidos para tubos de centrifuga (15 mL) e, a seguir, digeridos com KOH 30% em banho fervente. Decorrido a digestão, adicionou-se 0,2 e 0,1 mL da solução de sulfato de sódio saturada no tecido hepático e muscular, respectivamente. Em seguida adicionou-se 7 mL de etanol no tubo contendo o tecido hepático e 3,5 mL no tubo do tecido muscular. Os tubos foram agitados e, a seguir, centrifugados a 2500 rpm durante 5 min. Ao término da centrifugação, retirou-se o sobrenadante e resuspendeu-se o conteúdo restante com água destilada para procedimento de avaliação do glicogênio por colorimetria com fenol e ácido sulfúrico (SIU LO *et al.*, 1970).

3.10 CAPTAÇÃO MUSCULAR DE 2-DEOXYGLICOSE (2-DG)

3.10.1 PREPARAÇÃO DO MÚSCULO SÓLEO

A retirada do músculo sóleo, assim como a pré-incubação dos mesmos foram realizado segundo descrito por (KOKUBUN, 1990).

Após sacrifício, as patas traseiras dos ratos foram removidas, sendo o músculo sóleo exposto. Os tendões, distal e proximal, do músculo foram liberados e um corte longitudinal na linha mediana do músculo foi executada com auxílio de um bisturi. Após a separação, as fatias foram pesadas elegendo-se para experimentação aquelas com peso entre 25 a 35 mg. O período de tempo entre o sacrifício do animal e o início da incubação foi de , no máximo, 5 min.

3.10.2 INCUBAÇÃO DAS FATIAS DO MÚSCULO

As fatias do músculo foram colocadas em Erlenmeyers siliconizados, de 25 ml contendo 3,5 ml de tampão Krebs-Ringer bicarbonato. Os frascos foram selados com tampas de borracha e submetidos a pré-incubação sob agitação em banho tipo Dubinoff a 60 rpm e contínuo gaseamento com carbogênio por 30 min a 37°C. Após esse período, os músculos foram transferidos para outro frasco contendo 3,5 ml de meio e incubados durante 1 h, com gaseamento durante os primeiros 15 min, nas mesmas condições da pré-incubação. Frascos controle, contendo somente o meio de

incubação, foram processados em paralelo. Após o período de incubação, os músculos foram mergulhados em frasco contendo solução fisiológica a 0,9 % (para retirada do excesso de solução incubadora), secos em papel de filtro e, mergulhados em tubo de ensaio contendo 1 ml de KOH a 30 % para digestão e posterior dosagem da 2 deoxiglicose . A temperatura na pré-incubação e incubação foi de 37°C.

3.10.3 MEIOS DE PRÉ-INCUBAÇÃO E INCUBAÇÃO

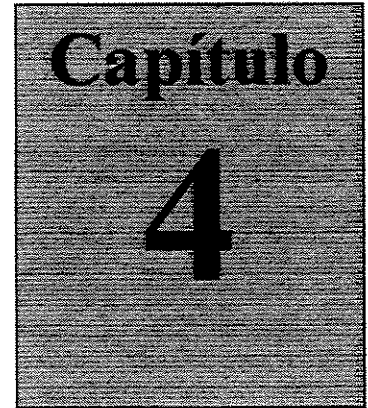
O tampão Krebs-Ringer foi preparado para concentração final de: NaCl 0,6%, HEPES 6,64 mM, KCl 0,032 %, CaCl_2 1,14 mM, KH_2PO_4 0,015 %, NaHCO_3 0,19 %, Mg.SO_4 0,03 %. A seguir, foi gaseada durante 20 a 30 min com carbogênio e pH ajustado a 7,4. À esta solução acrescentou-se albumina bovina livre de gordura. Foram adicionados, ainda, glicose (5,5 mM), ^3H 2-deoxiglicose (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$) e insulina (100 $\mu\text{UI/ml}$). A seguir, o pH foi ajustado a 7,25 e a solução transferida para os frascos que foram selados e equilibrados no banho a 37° C sob gaseamento com carbogênio.

3.10.4 AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE 2-DEOXYGLICOSE

A medida da captação da 2-DG foi feita avaliando-se a radioatividade emitida pelo 3H da 2-deoxiglicose contida no músculo após digestão utilizando-se contador de partículas Beta. (contador BECKMAN LS 6000TA)

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como media $\pm$ SEM para o número de ratos indicado (n). Em se trabalhando com ilhotas o (n) se refere ao número de experimentos (120 ilhotas por grupo por condição experimental, distribuidos em grupos de quatro ilhotas cada). As comparações foram efetuadas através da análise de variância para dois fatores e teste de Tukey para comparações entre as médias. Valores de $P < 0,05$ são considerados para indicar uma diferença significativa.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

A tabela 1 mostra diferentes parâmetros fisiológicos avaliados em ratos controle, tratados com dexametasona, com tungstato e com tungstato mais dexametasona. Pode-se observar (segunda coluna) que a administração de doses diárias do glicocorticóide sintético induziu aumento significativo da glicemia, insulinemia, trigliceridemia e no conteúdo de glicogênio hepático e conteúdo de glicogênio do músculo sóleo quando comparado aos ratos controles (primeira coluna). Dexametasona não modificou as reservas de glicogênio do músculo gastrocnêmio. Ratos tratados com dexametasona mais tungstato tiveram suas glicemias normalizadas (coluna 4 x coluna 1). Contudo, esses animais ainda apresentaram concentrações plasmáticas de insulina, triglicerídeos e conteúdo de glicogênio hepático e muscular, maiores que os controles. Neste sentido, cabe ressaltar que esses ratos apresentaram conteúdo de glicogênio do gastrocnêmio ligeiramente menor que os ratos controle. A tabela 1 mostra também que o tratamento com tungstato de sódio induziu ligeiro aumento da glicemia sem alteração dos outros parâmetros analisados (coluna 3 x coluna 1).

A seguir (figura 1), avaliamos a velocidade de decaimento da glicose plasmática (Kitt) em ratos submetidos a um teste de tolerância à insulina endovenoso (*iv* ITT) e obtivemos os seguintes valores, a saber: $4,8 \pm 0,35$; $2,6 \pm 0,24$; $4,5 \pm 0,48$ e $4,0 \pm 0,32$ %/min respectivamente para os grupos controle, dexametasona, tungstato e dexametasona mais tungstato ($p < 0,001$ entre dexametasona e os demais grupos).

Estudamos ainda, o efeito da insulina sobre a captação da 2-deoxiglicose triciada por fatias de músculo sóleo isolado de ratos. A figura 2 indica que a captação basal da 2-DG por fatias de sóleo, processada na ausência de insulina foi semelhante nos 4

grupos experimentais. Por outro lado, nos animais tratados com dexametasona essa captação foi significativamente menor que aquela observada para o grupo controle ($p < 0,05$). Tungstato, *per se*, não alterou a captação da 2-DG.

Finalmente, avaliamos a secreção de insulina por ilhotas de Langerhans isoladas de ratos dos 4 diferentes grupos, e incubadas na presença de concentrações crescentes de glicose (figura 3). Ilhotas de ratos controle ou tratados com tungstato apresentaram curvas dose-resposta de forma sigmoidal frente a concentrações crescentes de glicose, como classicamente observado. Por outro lado, a curva dose-resposta à glicose por ilhotas de ratos tratados com dexametasona foi desviada para a esquerda, indicando aumento da sensibilidade à glicose, especialmente em concentrações fisiológicas da hexose (5,6 – 11,1mM). O tratamento com tungstato impediu o desvio para esquerda da curva dose-resposta das ilhotas de animais tratados com dexametasona. Os respectivos EC_{50} (concentração efetiva 50 %) foram de 13,7; 7,9; 15,7 e 11,8 mmol de glicose/L respectivamente para controle, dexametasona, tungstato e dexametasona + tungstato ($p < 0,05$ entre dexametasona e outros grupos). As respectivas secreções basais de insulina, observadas na presença de 5,6 mmol glicose/L atingiram $0,48 \pm 0,04$ ($n = 3$), $1,25 \pm 0,16$ ($n = 3$), $0,2 \pm 0,025$ ($n = 3$) e $0,69 \pm 0,12$ ($n = 3$) ng/ilhota/90 min respectivamente para os grupos controle, dexametasona, tungstato e dexametasona mais tungstato ($p < 0,05$ entre dexametasona e controle e entre dexametasona vs dexametasona mais tungstato). Secreção máxima foi obtida na presença de 16,7 mmol glicose/L para dexametasona e para dexametasona mais tungstato, e em 22,2 mmol glicose/L para controle e tungstato.

4.1 Tabela 1. Concentrações plasmáticas de glicose, insulina e triglicérides e conteúdos de glicogênio hepático e dos músculos, gastrocnêmio e sóleo de ratos Controle, Dexametasona-(Dex), Tungstato de sódio-(Tg) e Dexametasona mais Tungstato de sódio-(DexTg) .

	Controle	Dex	Tg	DexTg
Glicose (mg/dL)	81.0 ± 3.9	112.7 ± 3.7•	104.4 ± 1.5	83.9 ± 3.2
Insulina (ng/mL)	0.24 ± 0.22	2.60 ± 3.9•	0.59 ± 0.07	2.58 ± 0.4•
Triglicérides (mg/dL)	58.7 ± 5.8	112.0 ± 23.4•	65.2 ± 5.0	112.2 ± 8.4•
Glicogênio hepático (mg/100mg)	3.28 ± 0.38	5.41 ± 0.31•	3.33 ± 0.29	5.60 ± 0.53•
Glicogênio do gastrocnêmio (mg/100mg)	2.09 ± 0.27	2.26 ± 0.11	2.05 ± 0.14	1.89 ± 0.08*
Glicogênio do Sóleo (mg/100mg)	1.49 ± 0.08	2.01 ± 0.13•	1.78 ± 0.16	1.85 ± 0.21

Dados são em média ± erro padrão; n = 6 – 8/grupos

* P < 0,05 vs Dexametasona grupo

• P < 0,05 vs Controle grupo

4.2 FIGURA 1

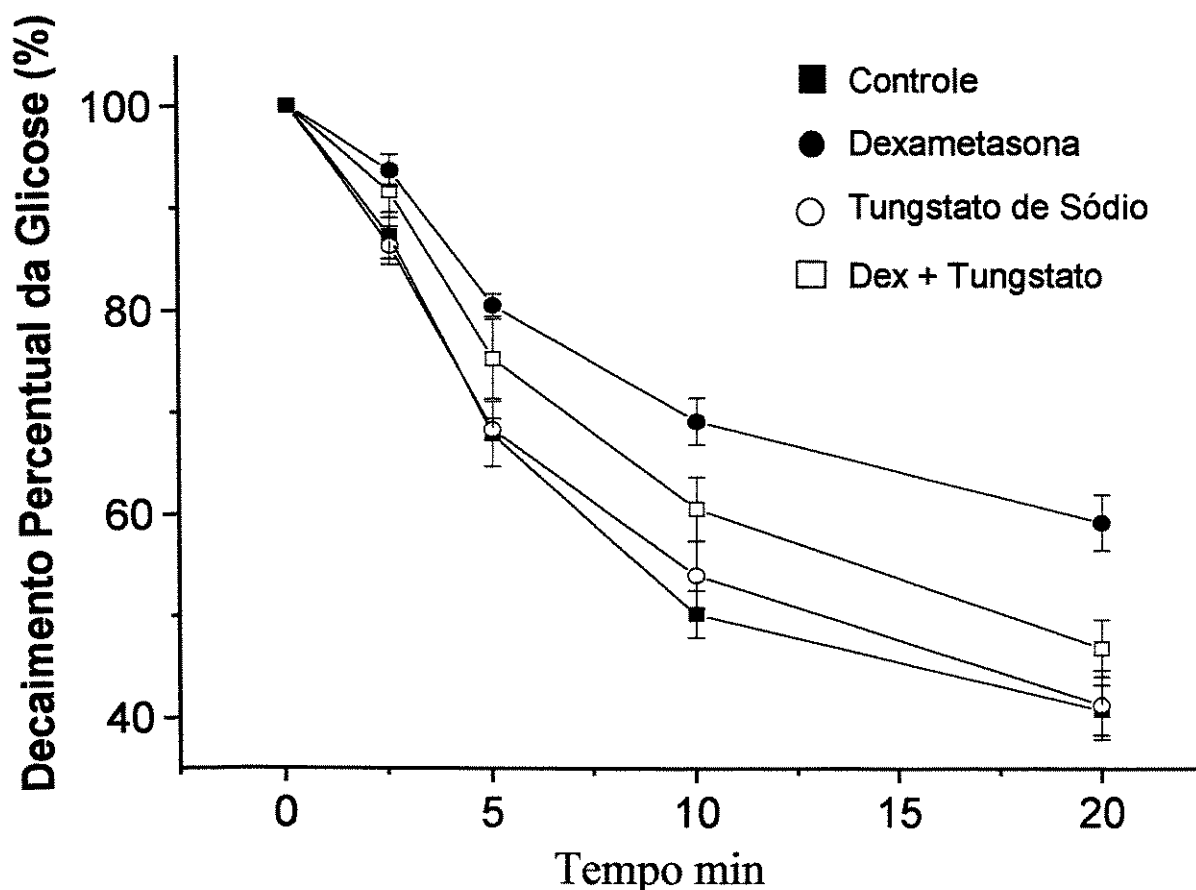


Figura 1 : Teste de tolerância a insulina. Seis a oito ratos de cada grupo foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg Kg^{-1}) e receberam um volume intravenoso de insulina regular (1 Ukg^{-1}). Amostras de sangue foram obtidas da veia femural nos tempos 0, 2,5, 5, 10 e 20 minutos após a injeção de insulina regular para mensurar a glicose. Valores representam a média $\pm$ erro padrão. Os valores da glicose foram expresso em porcentagem, tomando-se como 100% a glicose no tempo 0.

4.3 FIGURA 2

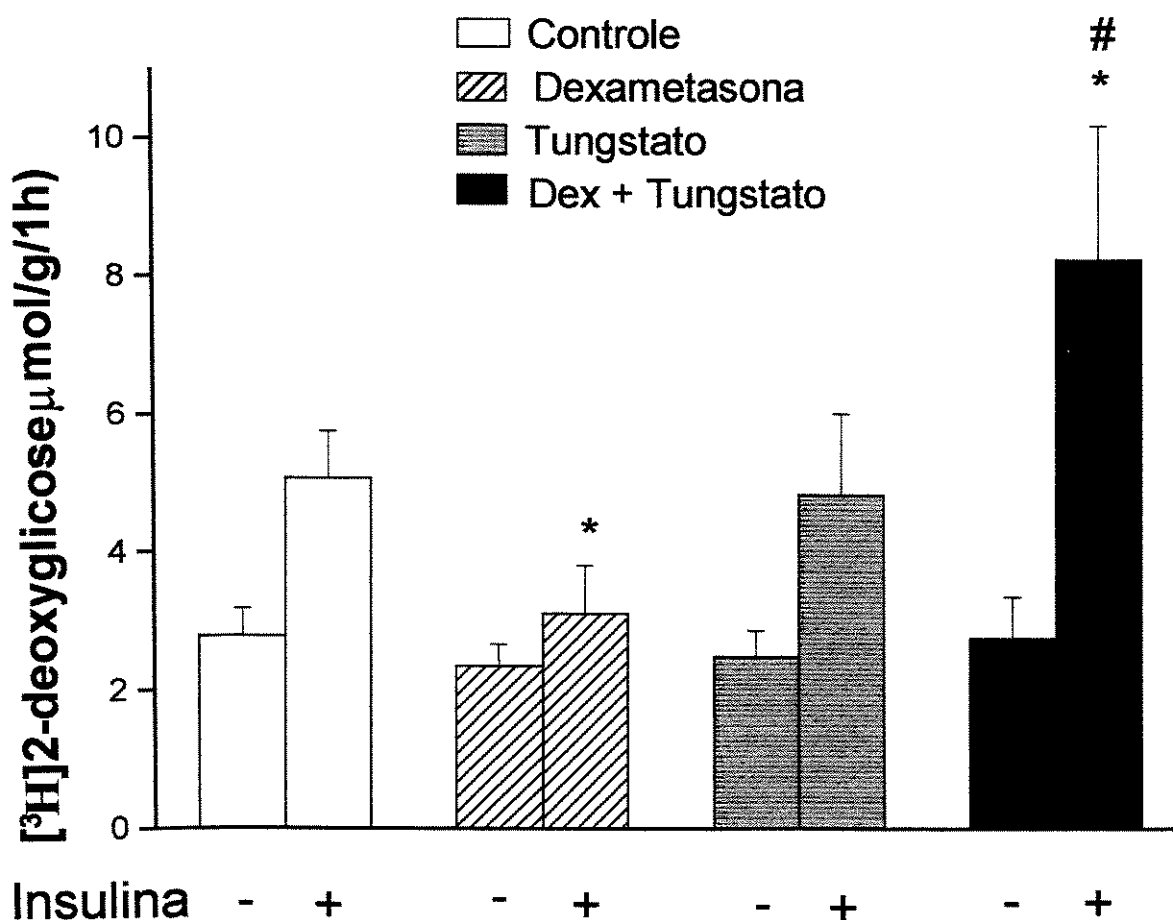


Figura 2: Captação de 2-deoxiglicose pelo músculo sóleo. Fatias de músculo sóleo foram pré-incubadas durante 30 min a 37°C. Depois disso, transferidas para frascos siliconizados com tampão Krebs-Ringer contendo 5,6 mmol de glicose/L, 10 U/mL de insulina (quando requerido) e 0,4 μCi/mL de 2-Deoxi-D-[1-³H]glicose e incubado durante 1 hora. Os valores são expressos em média ± erro padrão de 6-15 experimentos. *P < 0,05 em relação ao controle e # P < 0,05 em relação aos ratos tratados com dexametasona.

4.4 FIGURA 3

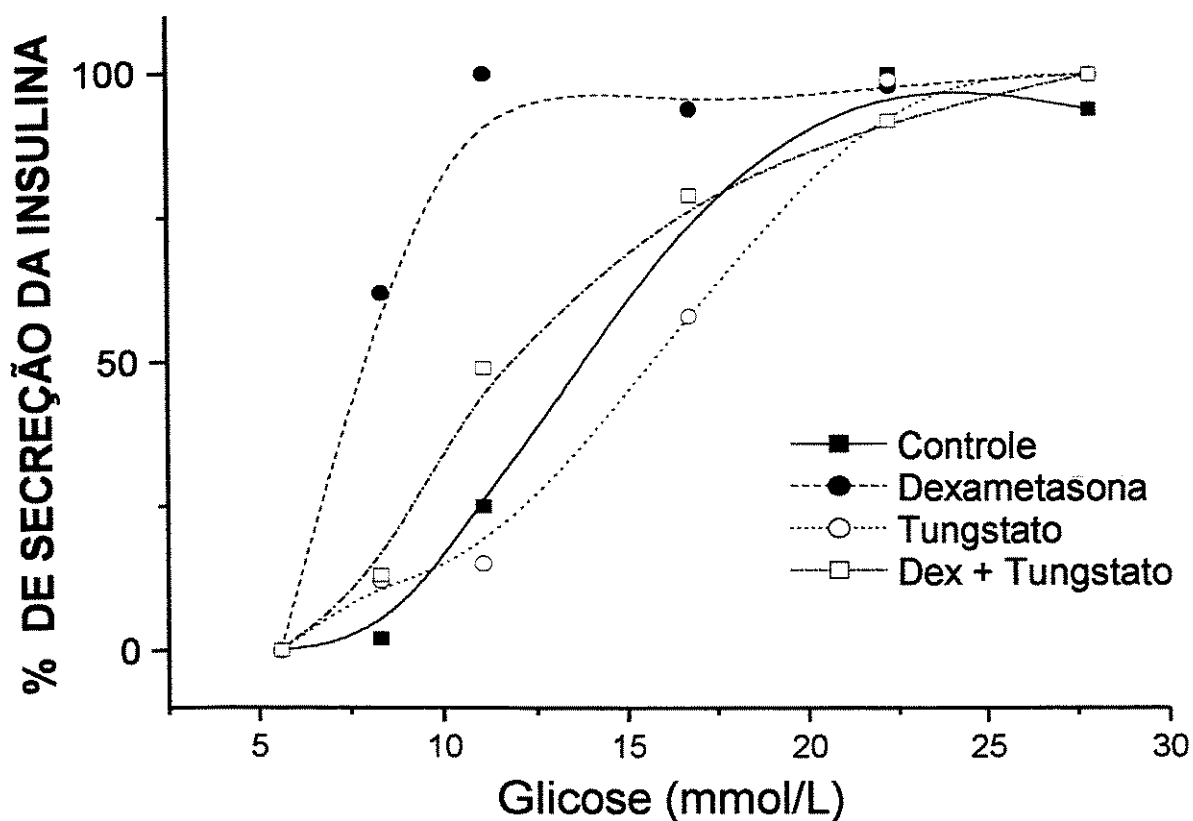
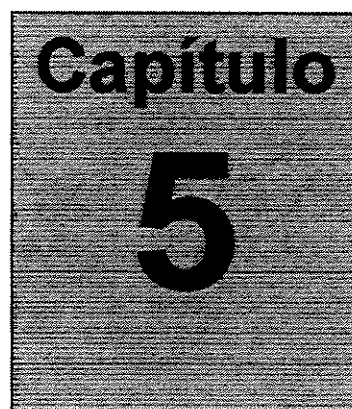


Figura 3: Curva dose-resposta. Antes da aplicação de diferentes concentrações de glicose, ilhotas foram pre-incubadas por 45 min a 37°C. Após pré-incubação a solução de Krebs foi substituída por uma nova, contendo concentrações aumentadas de glicose. Os pontos representam a secreção cumulativa (90 min.) de insulina nas concentrações aumentadas de glicose. Cada ponto representa a média ($n = 14 - 18$).



DISCUSSÃO

5. Discussão

Na atualidade, tem-se como certo que a instalação do diabetes tipo 2, síndrome que acomete cerca de 6-8% dos indivíduos com mais de 40 anos de idade, depende da associação entre resistência aumentada à insulina e incapacidade do pâncreas endócrino em produzir e secretar quantidades crescentes do hormônio para fazer frente ao referido aumento de resistência.

A resistência à insulina, por sua vez, pode ser provocada por alterações nos receptores da insulina ou nas enzimas envolvidas nas vias internas de sinalização. Essas alterações foram verificadas em situações tais como: envelhecimento; uso de fármacos e frente a um ocasional excesso de hormônios (GH, catecolaminas e glicocorticóides).

Glicocorticóide induz um estado de resistência à insulina quando administrado em humanos e em animais de experimentação (NEWSHOLME *et al.*, 1987). Dentre os glicocorticóides, a dexametasona tem sido usada no tratamento de inúmeras doenças desencadeando efeitos colaterais tais como: resistência à insulina hepática e muscular sendo, portanto, um agente potencial na instalação do diabetes do tipo 2 (AMATRUDA *et al.*, 1985; HABER *et al.*, 1992). Neste trabalho e, de acordo com os dados da literatura, observamos que ratos tratados com dexametasona apresentaram menor captação de 2-DG pelo músculo sóleo, na presença de doses estimulatórias de insulina (figura 02). É possível que a dexametasona atue diretamente em tecidos periféricos resultando na resistência à insulina ou, alternativamente, através de mudanças na concentração plasmática de glicose e de ácidos graxos, como observado durante o excesso de glicocorticoide (TAPPY *et al.*, 1994). O aumento da resistência à insulina,

provocado por dexametasona, se refletiu, ainda no aumento significativo das concentrações plasmáticas de insulina, associada à ligeira hiperglicemia e hiperlipidemia (Tabela 1). Essas modificações são conseqüências das alterações no metabolismo da glicose no tecido muscular, tecido adiposo e no tecido hepático (GUILLAUME-GENTIL *et al.*, 1993). Dados da literatura indicam um aumento da proteólise, conseqüentemente uma diminuição na captação de aminoácidos pelo músculo, e aumento da lipólise em detrimento da diminuição da lipogênese em adipócitos (GUILLAUME-GENTIL *et al.*, 1993; SIMMONS, P., *et al.*, 1984). Os mecanismos pelos quais os glicocorticóides exercem esses efeitos não são, totalmente, conhecidos. A administração crônica de dexametasona em animais de experimentação (1 mg/kg/dia durante 5 dias) não alterou as concentrações de receptores de insulina na membrana de células do tecido hepático, mas reduziu os efeitos da insulina sobre a autofosforilação do IR, a fosforilação do IRS-1 e a associação entre IRS-1 e a PI3-kinase (SAAD *et al.*, 1993). A resistência à insulina causado pelo excesso de glicocorticoide tem sido caracterizada por um defeito pós-receptor o qual altera a ação da insulina tanto no fígado como no músculo. Células musculares L6 tratada com dexametasona apresentaram aumento de proteínas GLUT1 e de GLUT4. Por outro lado, o excesso de dexametasona diminuiu a quantidade de fosforilação do IRS-1 e PI3-kinase e a autofosforilação do receptor no tecido hepático e muscular (EWART, *et al.* 1998).

Uma vez de posse de um modelo de resistência à insulina confiável, passamos a estudar os efeitos do tratamento crônico (administração oral por 15 dias) de tungstato de sódio. A escolha do tungstato deveu-se a sua menor toxicidade quando comparado ao vanadato, até o momento mais estudado. Vanadato foi o primeiro composto descrito

capaz de normalizar a glicemia de ratos deficientes de insulina (HEYLIGER *et al.*, 1985) bem como de modelos de animais resistentes à esse hormônio (BRICHARD *et al.*, 1989). No entanto, o tratamento com vanadato promoveu efeitos colaterais significativos, incluindo distúrbios intestinais, podendo assim explicar a sua baixa biodisponibilidade, entre 10 a 20%. Por outro lado, tungstato de sódio corrigiu a hiperglicemia de modelos de ratos diabéticos insulino e não insulino dependentes quando administrado em doses de 169 a 418 mg/kg/dia na água de beber por 15 dias, com baixa toxicidade (BARBERA *et al.*, 1994, 1997). A concentração de tungstato de sódio utilizada neste trabalho está dentro dos valores utilizados por BARBERA *et al.*, (1994, 1997). De fato, os valores de alanina aminotransferase (ALT/TGP) e aspartato aminotransferase (AST/TGO), dos grupos tungstato e dexametasona mais tungstato, estão dentro dos valores normais (dados do nosso laboratório) confirmando a baixa toxicidade do tungstato de sódio. Ao contrario do vanadato, o tungstato, após sua administração oral, é absorvido em até 2 horas, com a taxa máxima de transporte ocorrendo no baixo íleo, apresentando biodisponibilidade média de 92%. Desta maneira, a alta biodisponibilidade do tungstato de sódio junto com a baixa toxicidade oferecem vantagens no seu uso clínico (LAMER *et al.*, 2000). Sendo assim, o tungstato de sódio é um composto, dentre a sua família, que proporciona um tratamento eficaz no metabolismo da hexose do tecido muscular com baixa toxicidade (NUNES *et al.*, 2001).

A administração de tungstato de sódio normalizou as concentrações plasmáticas de glicose em ratos tratados com dexametasona sem, contudo, modificar os níveis aumentados de insulina e de triglicérides plasmáticos bem como, do conteúdo aumentado do glicogênio hepático (tabela 1). Ou seja, a normalização da glicemia não foi acompanhada pela redução dos níveis circulantes de insulina e nem da melhora da

dislipidemia, como esperado. O diabetes melitus não dependente de insulina (DMNDI) é frequentemente associado com obesidade e/ou elevação de ácido graxo livre no plasma (REAVEN *et al.*, 1988; McGARRY *et al.*, 1992). O tratamento crônico com dexametasona, também promoveu o aumento da concentração plasmática de ácido graxo livre (dado não mostrado), perfazendo um quadro semelhante ao DMNDI. RANDLE (1998) demonstrou que ácido graxo livre efetivamente compete com glicose pela oxidação do substrato no músculo isolado de ratos, especulando que o aumento da oxidação pode causar uma resistência à insulina. Segundo este mecanismo o aumento da oxidação do ácido graxo livre causa a elevação intramitocôndrial de acetil-CoA/CoA e NADH/NAD⁺ razão pela qual ocorre inativação da piruvato desidrogenase. Com isso, provocando um aumento da concentração de citrato o qual inibe a fosfofrutoquinase e subsequentemente o acúmulo da glicose-6-fosfato (G-6-P). Finalmente, o aumento da concentração da G-6-P pode inibir a hexoquinase II resultando na diminuição da captação de glicose (RANDLE *et al.*, 1963; RANDLE *et al.*, 1965; RANDLE, 1998).

A melhora dos níveis glicêmicos dos animais tratados com tungstato de sódio é coerente com a maior velocidade de captação da glicose, verificada pelo teste de tolerância à insulina (figura 1) e pela captação aumentada da 2DG no músculo sóleo (figura 2). 2DG é um análogo da glicose, não metabolizável, que é transportado através da membrana para o interior do tecido alvo utilizando os mesmos transportadores, no caso, do músculo, o GLUT4.

Nesse sentido, dados da literatura indicam que o tratamento *in vitro* de células 3T3L1 com vanadato, um inibidor da tirosina fosfatase, aumentou a fosforilação das proteínas citosólicas responsáveis pela translocação de transportadores de glicose

(GLUT4) no tecido muscular, portanto, aumentando a captação de glicose (KAWASHIMA *et al.*, 1996). Por pertencer a mesma família do vanadato, acredita-se que o tungstato aumentou a captação de glicose nas células musculares através de mecanismos semelhantes (BARBERA *et al.*, 1994). FANTUS *et al.*, (1998), postularam que vanadato estimula a captação da glicose pela translocação de GLUT4, mas por um mecanismo independente da PI3quinase. Conclui-se que, no momento, não se tem claro o exato mecanismo de ação do tungstato sobre o transporte de glicose no músculo.

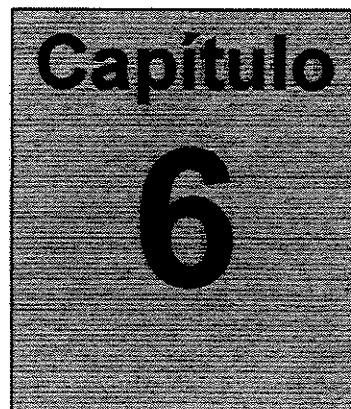
Nas ilhotas de Langerhans, administração crônica de dexametasona provocou aumento da massa das mesmas (dados do nosso laboratório, não mostrado). Ao mesmo tempo, observou-se desvio para a esquerda da curva-dose resposta à glicose, indicando aumento da sensibilidade ao secretagogo (figura 3). Provavelmente, essa maior sensibilidade à glicose é consequência da resistência periférica aumentada à insulina. Portanto, o aumento de, aproximadamente, 10 vezes na concentração plasmática de insulina nos animais tratados com dexametasona é necessário para compensar a resistência à insulina provocada pelo glicocorticóide, refletindo-se numa quase normoglicemia. Nas ilhotas provenientes de animais tratados com dexametasona mais tungstato de sódio, a curva dose-resposta à glicose tendeu para a direita em sentido da normalização. Isto indica que o tratamento com tungstato, de alguma forma, aumentou a eficiência da insulina nesses animais. A resistência à insulina induzida por dexametasona está também associada ao aumento das concentrações plasmáticas da mesma. Este é um fato controverso na literatura onde resultados complexos têm sido produzidos em estudos com ratos e camundongos tratados com dexametasona, principalmente no que se refere à secreção de insulina *in vitro*. O aumento (MALAISSE

et al., 1967; KAWAI *et al.*, 1977; OGAWA *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1994), a não alteração (KALHAN *et al.*, 1975; DINNEEN *et al.*, 1993) e a diminuição (FISCHER *et al.*, 1990; PLAT *et al.*, 1996; LONGANO *et al.*, 1983) da secreção de insulina, têm sido relatados.

Estas diferenças não são facilmente explicadas, mas parece depender da dose do glicocorticoide, da duração do tratamento, da propensão do animal em desenvolver o diabetes e da estimulação usada *in vitro* (HENQUIN *et al.*, 1997). Neste experimento, verificamos que ratos tratados com 1mg por dia de glicocorticoide, durante cinco dias, apresentaram secreção de insulina aumentada frente a diferentes concentrações de glicose, (5,6 - 27,8mM), quando comparadas à secreção por ilhotas controle (figura 3).

Em perfusão de pâncreas isolado de ratos não diabéticos, tratados com dexametasona, a linha basal da secreção de insulina foi 20 vezes maior do que a de rato controle (O'BRIEN *et al.*, 1991). Estes resultados estão de acordo com os verificados neste trabalho, onde os valores de insulina dos ratos tratados com dexametasona foram cerca de 10 a 12 vezes maiores que no rato controle (Tabela 01).

Considerando-se que o tratamento com tungstato de sódio aumentou a velocidade do desaparecimento da glicose do plasma (Figura 1) e a captação da glicose estimulada por insulina no músculo (Figura 2), os resultados referentes à secreção de insulina *in vitro*, frente a concentrações crescentes de glicose, passam a ser coerentes. Contudo, a permanência de níveis aumentados de insulina e triglicérides no plasma indica que o tratamento crônico com tungstato não foi suficiente para reversão completa do quadro de resistência aumentada à insulina, induzido por dexametasona.

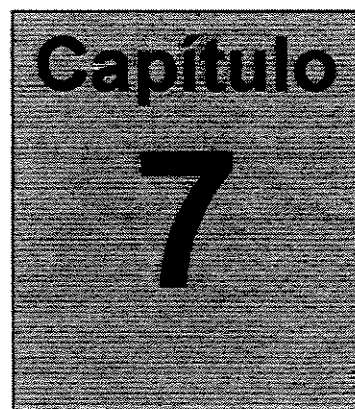


CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- 1- O tratamento com dexametasona promoveu o aumento da insulinemia, glicemia e trigliceridemia dos ratos.
- 2- Dexametasona aumentou a secreção de insulina, induzida por glicose em ilhotas isoladas.
- 3- Dexametasona aumentou a resistência periférica à insulina verificada, indiretamente, por redução do desaparecimento da glicose plasmática (*ivITT*) e da captação de glicose pelo músculo sóleo.
- 4- Tungstato de sódio melhorou a captação de glicose muscular, induzida por insulina.
- 5- Tungstato de sódio induziu normalização da glicose plasmática em ratos tratados com dexametasona.

Esses resultados indicam que, a normalização da glicemia de ratos resistentes á insulina pelo tratamento com tungstato deveu-se, pelo menos em parte, à maior captação de glicose pelo músculo.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Bibliografia

AMATRUDA, J.M., LIVINGSTON, J.N. & LOCKWOOD, D.H.. Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance: Human obesity, glucocorticoid excess and chronic renal failure. **Diabetes and Metabolism Review**, 3: 293 – 317, 1985.

ASANO T. *et al.*: Dexamethasone-Induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. **Diabetes** , 49: 1700 - 1708, 2000.

BARBERA, A. FERNANDEZ-ALVAREZ, J. TRUC, A. GOMIS, R. AND GUINOVART, J.J.. Effects of tungstate in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats: Mecanism leading to normalization of glycaemia. **Diabetologia** 40: 143 – 149, 1997.

BARBERA, A., RODRIGUEZ-GIL, J.E. AND GUINOVART, J.J.. Insulin-Like actions of tungstate in diabetic rats: Normalization of hepatic glucose metabolism. **J. Biol. Chem.** 269: 20047 – 20053, 1994.

BERNIER, M., LAIRD, D. M., LAME M.D.. Insulin-activated tyrosine phosphorylation of a 15-kilodalton protein in intact 3T3-L1 adipocytes. **Proc. Natl Acad Sci.** 84(7):1844 – 1848, 1987

BENDAYAN, M., AND GINGRAS, D.Effect of vanadate administration on blood glucose and insulin levels as well as on the exocrine pancreatic function in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia** 32: 561 – 567, 1989.

BOSCHERO, A.C., DELATTRE, E. & SANTOS, M.L. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA**, 12. Anais ... Ribeirão Preto, Soc. Bras. Fisiologia, p.117, 1980.

BRICHARD S.M.,POTTIER A.M. AND HENQUIN J.C. Long term improvement of glucose homeostasis by vanadate in obese hyperinsulinemic fa/fa rats. **Toxicology Lett** 11:199 – 203, 1989.

CAREY, J.O., AZEVEDO, J.L., MORRIS, P.G., PORIES W.J.,AND DOHM, G.L. Okadaic acid vanadate, and phenylarsine oxide stimulate 2-deoxyglucose transport in insulin-resistant human skeletal muscle. **Diabetes** 44: 682 – 688, 1995.

CARO, J.F. & AMATRUDA, J.M. Glucocorticoid-induced insulin resistance. **Journal Clinical Investigation**, 69: 886 – 875, 1982.

COTTON, F. A. & WILKINSON, G. advanced Inorganic Chemistry, 5th edn.,pp. 668 - 671 and 810 - 818, John Wiley and Sons, New York, 1988.

DINNEEN, S., ALZAID, A., MILES, J., RIZZA, R. Metabolic effects of the nocturnal rise in cortisol on carbohydrate metabolism in normal humans. **J. Clin. Invest.** 92: 2283 – 2290, 1993.

EBINA, Y., ELLIS, L., JARNAGIN, K., GRAF, L., CLAUSTER, E., OU, J.H., MASLARZ, F., KAN, Y.W., GOLDFINE, I.D., ROTH, R.A. & RUTLER, W.J. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone activated transmembrane signalling. **Cell.** 40: 747 – 758, 1985.

EWART, S.H., SOMWAR R., Klip A. Dexamethasone stimulates the expression of GLUT1 and GLUT4 proteins via different pathways in L6 skeletal muscle cells. **FEBS Letters** 425: 179 – 183, 1998.

FANTUS, G.I., NAGY, L., SORISKY, A., BOGDANOVIC, E., TSIANI, E. Tyrosine phosphatase inhibitors, vanadate and pervanadate, stimulate glucose transport and GLUT translocation in muscle cells by a mechanism independent of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C. **Diabetes**, vol 47:1676 – 1686, 1998.

FISCHER, B., RAUSCH, U., WOLLNY, P., WESTPHAL, H., SEITZ, J., AUMÜLLER, G. Immunohistochemical localization of the glucocorticoid receptor in pancreatic B-cell of the rat. **Endocrinology.** 126: 2635 – 2641, 1990.

FOSTER, J. D., YOUNG, S.E., BRANDT, T.D., NORDLIE, R.C.. Tungstate: A potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. **Arch. Of Bio. And Biophysics**. Vol.354: 125 – 132, 1998.

FREYCHET P., ROTH J., AND NEVILLE D.M. JR.. Insulin receptors in the liver: specific binding of (125I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** Aug;68(8):1833 -1837, 1971.

GIL J., MIRALPEIX M., CARRERAS J., AND BASTRONS R.. Insulin-like effects of vanadate on glucokinase activity and fructose 2,6-bisphosphate levels in the liver of diabetic rats. **J. Biol. Chem.** 263: 1868 – 1871, 1988.

GUILLAUME-GENTIL, C. ASSIMACOPOULOS-JEANNAT,F. AND JEANRENAUD, B..Involvement of non-esterified fatty acid oxidation in glucocorticoid-induced peripheral insulin resistance in vivo in rats. **Diabetologia** 36 : 899 – 906, 1993.

GUINOVART, J.J. GÓMEZ-FOIX, A.M., RODRIGUEZ-GIL, J.E., FILLAT, C. &. Vanadate raises fructose 2,6-bisphosphate concentrations and activates glycolysis in rat hepatocytes. **Biochem. J.** 255 : 507 - 512, 1988.

GUINOVART, J., J., RODRIGUEZ-GIL, J.E. AND FILLAT, C.. Molybdate and tungstate act like vanadate on glucose metabolism in isolated hepatocytes. **J. Biochem.** 282: 659 – 663, 1992.

- HABER, R.S. AND WEINSTEIN, P.S..** Role of glucose transporters in glucocorticoid-induced insulin resistance. **Diabetes**, vol. 4: 728 – 735, 1992.
- HANKS, J.H. & WALLACE, R. E.** Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. **Proc. Soc. Exp. Boil.**, 71:196-200, 1949.
- HENQUIN, J.C., GILON, P., LAMBILLOTTE, C..** Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. **J. Clin. Invest.** 3: 414 – 423, 1997.
- HERBERT, V., LAV, K. S., GOTTLIER, C. W. & LEICHER, S. P.** Coated charcoal immunoassay of insulin. **J. Clin. Endocrinol.**, 25: 1375 – 1384, 1965.
- HEYLIGER C.E., TAHILIANI A.G. AND MCNEILL J.H..** Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. **Science** (Wash. DC) 272: 1474 – 1477, 1985.
- KADOWAKI, T., *et al.*** Two mutant alleles of the insulin receptor gene in a patient with extreme insulin resistance. **Science**. 240: 787 – 790, 1988.
- KAHN, C. R.,VIRKAMAKI, A., UEKI K.** Protein-Protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **Jour. Clin. Invert.** 103: 7931 – 943, 1999.

KALHAN, S.C. & ADAM, P.A.J.. Inhibitory effect of prednisone on insulin secretion in man: model for duplication of blood glucose concentration. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 41: 600 – 610, 1975.

KASUGA, M., FUJITA-YAMAGUCHI, Y. BLITHE, D.L., AND KAHN, C.R. Tyrosine-specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor. **Proc Natl. Acad. Sci. USA.**80:2137 – 2141, 1983.

KAWAI, A. & KUZUYA, N.. On the role of glucocorticoid in glucose-induced insulin secretion. **Horm. Metab. Res.** 9: 361 – 365, 1977.

KAWASHIMA, H., HASHIMOTO S., IMAIA, K. AND IDA, M.. Pervanadate stimulation of wortmannin- sensitive and resistant 2-deoxiglucose transport in adipocytes. **Bioch. Pharmacology**, vol.51: 1061 – 1067, 1996.

KOKUBUN, E.. Interações entre o metabolismo de glicose e ácido graxos livres em músculos esqueléticos. Efeito do exercício e do estado alimentar. **Tese de doutorado- Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo.** 105, 1990.

LACY, P.E. & KOSTIANOVSKY,M.. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, 16:35 – 39, 1967.

LAMER LE, S., POUCHERET, P., CROS, G., RICHETER DE , R.K., BONNET, P., BRESSOLLE, F.. Pharmacokinetics of Sodium Tungstate in Rat and Dog: A Population Approach. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 294: 714 – 721, 2000.

LAVAN, B. E., FANTIN, V.R., CHANG, E.T., LANE, W.S., KELLER, S.R., LIENHARD, G.E.. A novel 160 kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. **J. Biol. Chem.** 272: 21403 – 21407, 1997.

LAVAN, B. E., LANE, W. S. & LIENHARD, G. E.. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. **J. Biol. Chem.** 272: 11439 – 11443, 1997.

LEE, C.H.. Nck associates with the SH2 domain docking proteins IRS-1 in insulin stimulated cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90: 11713 – 11717, 1993.

LOWENSTEIN, E.J., et al. The SH2 and SH3 domain-containing proteins GRB2 links receptor tyrosine kinase to ras signaling. **Cell.** 70: 431 – 442, 1992.

LONGANO, W.J., FLETCHER, H.P.. Insulin release after acute hydrocortisone treatment in mice. **Metab. Clin. Exp.** 32: 603 – 608, 1983.

MALAISSE, W. J., F. MALAISSE-LAGAE, E. F. MC CRAW, AND P.H. WRIGHT.

Insulin secretion in vivo by pancreatic tissue from normal, adrenalectomized, and cortisol-treated rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 124: 924 – 928, 1967.

MATSUMOTO, J.. Vanadate, molybdate and tungstate for orthomolecular medicine.

Med. Hypotheses. 43 (3): 177 – 182, 1994.

MCGARRY, J. D.. What if Minkowski had been ageusic? Na alternative angle on diabetes. **Science** (Wash.DC). 258: 766 – 770, 1992.

McGOWAN, M.W., ARTISS, J.D., STRANDBERGH, D.R. & ZAK, B.. A peroxidase-coupled method for the calorimetric determination of serum triglycerids. **Clin. Chem.** 29: 538, 1983.

MEACHAM, L.R., ABDUL-LATIF, H., SULLIVAN, K.AND CULLER F. L.. Predictor of change in insulin sensitivity during glucocorticoid treatment. **Horm. Metab. Res.** 29: 172 – 175, 1997.

MEYEROVITCH, J., FARFEL, Z., SACK, J., AND SHECHTER, Y.. Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin- treated rats. **J. Biol. Chem.** 262: 6658 – 6662, 1987.

MIRALPEX, M. H., CARBALLO, E., BARTRONS,R., CREPIN,K., HUE,L., AND ROUSSEAU, G.G. Oral administration of vanadate to diabetic rats restores liver 6-phosphofructo-2-kinase content and mRNA. **Diabetologia** 35: 243-248, 1992.

MOSKALEWSKI, S.. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. **Gem. Comp. Endocrinol.**, 5: 342 – 353, 1965.

NEWSHOLME, E.A. CHALLISS, R.A. J., LEIGHTON, B., LOZEMAN, F.J., BUDOHOSKI, L.,. Effects of chronic administration of vanadate to the rat on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis in skeletal muscle to insulin. **Biochem. Pharmacol.** 36: 357 – 361, 1987.

NEWSHOLME, E. A., LOZEMAN, F.J., CHALLISS, R.A.J., LEIGHTON, B.. Effects of dexamethasone treatment on insulin-stimulated rates of glycolisys and glycogen syntesis in isolated incubated skeletal muscles of the rat. **Biochem. J.** 246: 551 – 554, 1987.

NUNES, W.M.S., SIBUYA, C.Y., CARNEIRO, E.M., GOMIS, R., BOSCHERO A.C.. Effecte of tungstate administration on glucose homeostasis and insulin secretion by isoleted islets in dexamethasone treated rats. **Eur. J. Pharm. Science**, vol13 suppl. 1. S71, 2001.

O'BRIEN, T. D., P. WESTERMARK, AND K. H. JOHNSON. Islets amyloid polipeptide and insulin secretion from isolated perfused pancreas of fed'fasted, glucose-treated, and dexametasone-treated rats. **Diabetes**. 40: 1701-1706, 1991.

OGAWA, A., J. H. JOHNSON. M. OHNEDA, C. T. MCALLISTER, L. INMAN, T. ALAN, AND R. H. UNGER. Role of insulin resistance and β -cell dysfunction in dexametasone-induced diabetes. **J. Clin. Invest.** 90: 497 – 504, 1992.

OLEFSKY, J.M.. Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. **Journal of Clinical Investigation**, 56: 1449 – 1508, 1975.

PLAT, L., BYRNE, M.M., STURIS, J., POLONSKY, K.S., MOCKEL, J., FÉRY, F., VAN CAUTER, E.. Effects of morning cortisol elevation on insulin secretion and glucose regulation in humans. **Am. J. Physiol.** 270: E36 – E42, 1996.

RANDLE, P.J., GARLAND, P.B., HALES, C.N., AND NEWSHOLME, E.A.. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**.i: 785 – 789, 1963.

RANDLE, P.J., GARLAND, P.B., NEWSHOLME, E.A. AND HALES, C.N.. The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus. **Ann. NY Acad.Sci.** 131:324 – 333, 1965.

RANDLE, P.J.. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. **Diabetes Metab. Rev.** 14: 263 – 283, 1998.

REAVEN, G.H., HOLLENBECK, C. JENG, C.Y., WU, M.S., AND CHEN, Y-D.. Measurement of plasma glucose free fatty acid, lactate and insulin for 24h patients with NIDDM. **Diabetes** 37: 1020 –1024, 1988.

ROTHENBERG, P.L.. Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of insulin receptor tyrosine kinase. **J. Biol. Chem.** 266: 8302 – 8311, 1991.

SAAD M.J.. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Braz J. Med Biol Res.** 27(4): 941 – 957, 1994.

SAAD, M.J.A., FOLI, F., KAHN, C.R.. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone treated rats. **Journal of Clinical Investigation**, 92: 2065 – 2072, 1993.

SCOTT, A.M., ATWATER, I.& ROJAS, E.. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B-cell membrane potencial in single mouse islets of Langerhans . **Diabetologia**, 21:470 – 475, 1981.

SIMMONS, P.S., MILES, J.M., GERICH, J.E., HAYMOND, M.W. Increased proteolysis. Na effect of increases in plasma cortisol within the physiologic range. **J. Clin. Invest.** 73, 412 – 420, 1984.

SIU LO, J. C. RUSSELL, AND A. W. TAYLOR. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology.** Vol. 28, no.2, 1970.

SUN, X.J., ROTHENBERG, P., KAHN, C.R., BACKER, J.M., ARAKI, E., WILDEN, P.A., CAHILL, D.A., GOLDSTEIN, B.J., WHITE, M.F. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature** 352: 73 – 77, 1991.

SUN, X.J., WANG, L.M., ZHANG, Y., YENUSH, L., MYERS, M.G., GLASHEEN, E., LANE, W.S., PIERCE, J.H., WHITE, M.F. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature** 377: 173 – 177, 1995.

SUTTON, R., PETERS, M., McSHANE, P., GRAY, D.W.R., MORRIS, P.J. Isolation of rat pancreas islets by ductal injection of collagenase. **Transplantation**, 42: 689 – 691, 1986.

TAPPY, L., RANDIN, D., VOLLENWEIDER, P., VOLLENWEIDER, L., PAQUOT, N., SCHERRER, U., SCHENEITER, P., NICOD, P., AND JÉQUIER, E. Mechanisms of dexamethasone-induced insulin resistance in healthy humans. **J. of Clinical Endocrinology and Metabolism** vol.79: 1063 – 1069, 1994.

TAMURA, S., BROWN, T. A., WHIPPLE, J. H., FUJITA-YAMAGUCHI, Y., DUBLER, R.

E., CHENG, K. & LARNER, J.. A novel mechanism for the insulin-like effect of vanadate on glycogen synthase in rat adipocytes. **J. Biol. Chem.** 259: 6650 – 6658, 1984.

TRINDER, R.. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. **Ann.Clin. Biochem.**, 6:24 –27, 1969.

ULLRICH, A., BELL, J.R., CHEN, E.Y., HERRERA, R., PETRUZZELLI, L.M., DULL, T.J., GRAY, A., COUSSENS, L., LIAO, Y.C., TSUBOKAWA, M.. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. **Nature.** 313: 756 - 761, 1985.

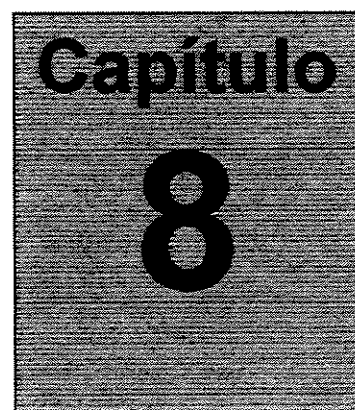
VALERA,A., RODRÍGUES-GIL, J. E., AND BOSCH, F..Vanadate treatment restores the expression of genes for key enzymes in the glucose and ketones bodies metabolism in the liver of diabetic rats. **J. Clin. Invest.** 92: 4 – 11, 1993.

WANG, Z. L., W. M. BENNET,R. M. WANG, M. A. GHATEI, AND S. R. BLOOM.

Evidence of a paracrine role of neuropeptide-Y in the regulation of insulin release from pancreatic islets of normal and dexametasone-treated rats. **Endocrinology.** 135: 200 - 206, 1994.

WHITE, M.F., MARON, R., KAHN, C.R.. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. **Nature** 391: 900 – 904, 1988.

YOSHIMASA,Y.. Insulin-resistant diabetes due to a point mutation that prevents insulin proreceptor processing. **Science** 240: 784 – 787, 1988.



APÊNDICE

Vol. 13 Suppl. 1

April 2001

ISSN 0928-0987 EPSCED 13(Suppl. 1) 81-817B

EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

Official Journal of the European Federation
for Pharmaceutical Sciences



Supplement
Abstracts, 2nd Congress
of Pharmaceutical Sciences
(EFPS 2001)
San Paulo, Brazil, April 9-11 2001

ELSEVIER

Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, E-mail: alepr@fcrp.usp.br; ²Universidade Federal do Mato Grosso, Brasil

The inflammation is a pathophysiological phenomenon caused by several stimulus and it is responsible for the increase in the blood flow, vascular permeability, migration and activation of inflammatory cells such as neutrophils, eosinophils and macrophage. The mechanism responsible for triggering the cells migration in the inflammatory foci is complex and depends on the nature of the stimulus as well as released chemotactic mediators. The anti-inflammatory drugs are widely used for alleviating the symptoms caused by the inflammation and for treatment of several diseases such as arthritis and asthma. The family Lythraceae is composed of species showing anti-inflammatory activity (*Lawsosia inermis* and *Hemia salicifolia*). One of these species *Lafoensia pacari* is a popular alternative medicine used in Mato-Grosso as a systemic and local anti-inflammatory drug. To test the anti-inflammatory activity of *L. pacari*, female mice were chosen as experimental models. One group of animals was i.p. injected with carrageenin and the other group orally infected with *Toxocara canis* eggs (200 eggs/animal). Both groups were daily treated with an aqueous extract of *L. pacari* (200 mg/kg b.w.) p.o. The group injected with carrageenin and orally treated with *L. pacari* showed a considerable inhibition in the recruitment of neutrophils to the peritoneal cavity 24 h after stimulus. On the 18th day after infestation, the group infected with *Toxocara canis* and treated with *L. pacari* showed inhibition of the blood eosinophilia and recruitment of eosinophils into the peritoneal and lung cavities. Further experiments are being conducted to evaluate the role of some cytokines and mediators involved in this process.

P.9.9 EFFECT OF TUNGSTATE ADMINISTRATION ON GLUCOSE HOMEOSTASIS AND INSULIN SECRETION BY ISOLATED ISLETS IN DEXAMETHASONE TREATED RATS

W M S Nunes¹, C Y Sibuya¹, E M Carneiro¹, R Gomis² & A C Boschero¹ – ¹Departamento de Fisiologia e Biofísica, IB/UNICAMP, Campinas, S.P., E-mail: boschero@unicamp.br; ²Hospital Clinic, Universitari de Barcelona, Espanha

Among the several inorganic compounds that mimic the effect of insulin, vanadium derivatives are the most widely studied. In the present work we have analyzed the effects of tungstate on glucose homeostasis and insulin secretion in healthy and in insulin resistant rats by dexamethasone. Fifteen days before the experiments the rats were randomly distributed in four groups: control, dexamethasone, tungstate and dexamethasone+tungstate. Control and dexa-

methasone groups had free access to water. Tungstate and dexamethasone+tungstate groups received tungstate dissolved in the drinking water (2 mg/ml). The dexamethasone and dexamethasone+tungstate groups received during the last 5 days daily doses of 1 mg/Kg⁻¹ of dexamethasone, intraperitoneally. In insulin resistant rats, tungstate-treatment normalized plasma glucose whereas plasma insulin and triglycerides remained significantly higher than controls. The glucose disappearance rate after an ivITT and the glucose uptake by soleus muscle of insulin resistant rats were lower compared to control rats and was normalized by tungstate. The dose-response curve of insulin secretion (5.6 to 27.7 mM glucose) in isolated islets from dexamethasone-treated rats was shifted to the left compared to control islets. Administration of tungstate to these animals induced a dose-response curve closer to control islets. The EC50 for the dose-response curves were 13.7, 7.9, 15.7 and 11.8 mM glucose for control, dexamethasone, tungstate and dexamethasone+tungstate-treated rats, respectively. In conclusion, tungstate-induced plasma glucose normalization seems to be, at least in part, dependent on the restoration of glucose uptake by muscle cells of insulin resistant rats.

Financial support by: CAPES, CNPq, FAPESP and PRONEX

P.9.10 THE EFFECTS ON THE LEVELS OF BLOOD LACTATE IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (COPD)

A B Silva¹, V A Pires¹, L M M Sampaio¹, M Jamami¹, D Costa² & A Demonte³ – ¹Pós-graduandos PPG, UFSCar, E-mail: audrey@process.com.br; ²Laboratório de Espirometria e EMG Dfisio, UFSCar; ³D. Alimentos e Nutrição, UNESP, Brasil

Patients with COPD are usually limited in their exercise tolerance by a limited ventilation. The lactic acidosis induced during physical stress is premature and this clearly shows a reduced aerobic capacity.

The objective of this investigation was to evaluate the lactic acid levels before and after the Pulmonary Rehabilitation Program (PRP).

A group of seven patients with moderate to severe COPD (FEV1<65% of predicted), age 70±7.9 years, assisted in a Special Respiratory Fisioterapy Unit of UFSCar, were selected. An incremental exercise testing was performed on the treadmill (Imbramed), and the subjects were verbally encouraged to exercise as long as possible. In the resting period, two minutes after every sequence, venous blood samples were withdrawn into heparinized capillaries, for measurement of whole blood lactate level (Yellow Springs Ohio Lactimeter), and determination of the anaerobic threshold. The patients were submitted to a PRP with lengths of time of 1 h, 3 times a week and during 6 consecutive weeks.