

Este exemplar corresponde a redação
final da Tese defendida pela candidata
Mara Aparecida de Lucio e aprovada pela
comissão julgadora.

MARA APARECIDA DE LUCIO

Dir. d. E. 11

30.09.86.

EFEITO DE UM QUELANTE DE FERRO, 1,10-FENANTROLINA, SOBRE A

AÇÃO DIABETOGENICA DA ALOXANA E ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de MESTRE
em Biologia na área de Fisiologia e Biofísica.

Orientador: Prof. Dr. DÉCIO LAKS EIZIRIK.

CAMPINAS

-1986-

UNICAMP

"Podemos subtrair-nos à ignorância ,
podemos encontrar-nos como criaturas
excelentes, inteligentes e hábeis. Podemos
ser livres. Podemos aprender a
voar!"

Richard Bach.

A meu pai Sylvio,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Décio Laks Eizirik pelo estímulo, ensinamentos e orientação constante e precisa durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero pela orientação e execução dos experimentos com radioisótopo.

Ao Prof. Dr. Benedito Honório Machado pela realização dos experimentos de medidas de pressão arterial.

À Prof. Dr^a Maria Edwirges Hoffmann pelo fornecimento de 1,10-fenantrolina, e pela orientação a respeito da utilização dessa droga.

Aos amigos Andrea de Castro Perez, Angelo Luís - Cortellazzo, Fernanda Maria Pereira Freire e Walter Barrella pela amizade e apoio em todos os momentos.

Ao Everardo Carneiro e Lécio Roberto pelo apoio, ajuda e amizade durante a execução dos experimentos.

Aos colegas do departamento de Fisiologia e Biofísica pelo bom relacionamento durante o período de pós-graduação.

À Lourdes Ap. Costa de Lucio pelo trabalho de datilografia.

A meus irmãos, cunhada e sobrinhos.

À CAPES, FABESP, CNPq, pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	
1. Experimentos "in vivo"	9
1.1 Animais e seu tratamento	9
2. Experimento "in vitro"	12
2.1 Animais	12
2.2 Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato ..	12
2.3 Efluxo de ^{86}Rb	13
3. Métodos de análise química	14
4. Reagentes e radioisótopos	15
5. Análise estatística	15
RESULTADOS	
1. Estudo dos efeitos da injeção de 1,10-fenantrolina sobre ratos controles	16
2. Efeito da administração de 1,10-fenantrolina sobre a ação diabetogênica da estreptozotocina.....	24
3. Efeito da administração de 1,10-fenantrolina sobre a ação diabetogênica de aloxana	29
4. Efeito de aloxana, estreptozotocina e 1,10-fenan- trolina sobre o efluxo de ^{86}Rb	36
DISCUSSÃO	45
RESUMO E CONCLUSÕES	55
SUMMARY	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

INTRODUÇÃO

O diabetes mēlito engloba um grupo de alteraçōes metabōlicas que tēm como denominador comum a presença de hiperglicemia.

No ser humano ocorrem pelo menos dois tipos de diabetes mēlito: diabetes mēlito tipo I, ou dependente de insulina, caracterizado por severa deficiēncia de insulina, devido a destruiçāo das cēlulas B, e o diabetes tipo II ou independente de insulina, com deficiēncia relativa de insulina, muitas vezes por problemas a nīvel de receptores perifēricos (National Diabetes Data Group, 1979).

Nos ūltimos anos tem havido um renovado interesse na busca de uma melhor compreensāo da etiologia do diabetes tipo I e de formas de proteçāo às cēlulas B, destruidas nas fases iniciais do diabetes (Eizirik & Migliorini, 1983). No entanto, aspectos práticos e ēticos limitam em muito, estudos deste tipo em seres humanos. Esse fato tem levado à busca sistemática de modelos experimentais de diabetes, especialmente em ratos e camundongos (Rossini e cols, 1984).

Entre as vantagens de induzir diabetes experimental estāo o controle genético dos animais e a anālise da interaçāo da hereditariedade com fatores ambientais como dietas, drogas e agentes infecciosos. Esse objetivo ē facilitado pelo fato desses animais terem um tempo de vida que permite o seguimento de vārias geraçōes (Mordes & Rossini, 1981).

Dentre os modelos utilizados o uso, de agentes quī-

micos diabetogênicos permite-nos estudos detalhados de eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos durante e ap^os a indução do diabetes, além de permitir o teste de eventuais fatores de proteção contra a lesão da célula B.

As drogas mais utilizadas na indução do diabetes são aloxana e estreptozotocina. Embora o efeito diabetogênico de ambas seja conhecido há muitos anos (Rerup, 1970), s^o recentemente seus mecanismos de ação começaram a ser melhor compreen-didos.

A aloxana, mesoxialilurêia derivada do ácido úrico, (Rerup, 1970), exerce um efeito citotóxico preferencial nas células B das ilhotas de Langerhans do pâncreas.

Existem muitas controv^{er}sias a respeito do mecanismo de ação molecular dessa droga, a começar pelo sítio inicial da lesão: membrana celular, mitocôndria ou núcleo das células beta.

A membrana da célula B pode ser um importante sítio de ação de aloxana (Cooperstein & Watkins, 1978). Em ilhotas de camundongos, a aloxana produz despolarização da membrana das células B (Dean & Matthews, 1972) e inibição da bomba cation univalente (Idahl e cols, 1977), sendo sugerido que a destruição celular ocorre por danos à membrana, através da reação com grupos sulfidril (SH), próximos ou acoplados ao sítio de ligação de glicose, ou por interação com grupos tiol ligados à membrana (Watkins & Cooperstein, 1977).

A administração prévia de glicose protege as células dos danos provocados por aloxana (Rerup, 1970), sendo postulado por Scheynius e Taljedal, (1977) que esse carboidrato atuaria por evitar a ligação da aloxana ao receptor específico de glicose, envolvido na secreção de insulina.

Por outro lado, Malaisse-Lagae e cols, (1983) de

monstraram, em estudos realizados com 3-O-metil D-Glicose e D-Glicose, que a ação protetora de diferentes hexoses não pode ser considerada como prova da existência de glicoreceptores de membrana como local de interações entre hexoses protetoras e aloxana. Mais ainda, outros estudos comprovaram que a ação de aloxana não deve ser restrita a um glicoreceptor de membrana (Henquim e cols, 1979), ocorrendo possivelmente a nível intracelular, via transporte de hexose (Rossini e cols, 1975). Estudos de captação de $[^{14}\text{C}]$ aloxana em ratos mostram sua entrada nas células endócrinas do pâncreas (Weaver e cols, 1978), com maior concentração a nível das células B (Hammarstrom & Ulberg, 1966). O efeito citotóxico preferencial de aloxana nas células beta seria possivelmente pela rápida captação celular da droga e pela baixa atividade da enzima GSH - peroxidase, que catalisa a redução de peróxidos, nessas células (Malaisse e cols, 1982).

Além de uma possível ação a nível de membrana, existem dados sugerindo que a ação de aloxana ocorre a nível da utilização mitocondrial de substratos exógenos, pois a droga, passando através da membrana plasmática, afeta as funções mitocondriais essenciais, danificando e desintegrando essas organelas celulares (Nelson & Boquist, 1982; Sandler e cols, 1984).

Apesar dos dados acima, a maioria dos autores acredita ser o núcleo das células beta o alvo principal da ação citotóxica da aloxana (Uchigata e cols, 1982; Yamamoto e cols, 1981). O mecanismo de lesões envolveria a geração de espécies ativas de oxigênio no interior da célula (Cohen & Heikkila, 1974; Heikkila & Cabbat, 1978; Grankvist e cols, 1979 e Fischer & Hamburger, 1980).

O ácido dialúrico, forma reduzida de aloxana, na sua auto-oxidação origina radicais altamente reativos, como anions superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$) (Heikkila e cols, 1974). O radical hidroxila é o mais reativo, sendo gerado na reação entre H_2O_2 e O_2^- , catalizada pelo ferro (Cohen & Heikkila, 1974 e Czapski & Ilan, 1978). A possibilidade destes radicais estarem envolvidos no efeito diabetogênico de aloxana é reforçado pelo fato de etanol, metanol, n-propanol e n-butanol, alcoois de cadeia curta e varredores desses radicais protegerem as células beta contra a ação dessa droga (Heikkila, e cols, 1976).

Além disso, pré-tratamento de ilhotas de ratos com superóxido dismutase e catalase, enzimas do mecanismo de defesa contra espécies ativas de oxigênio respectivamente de O_2^- e H_2O_2 , também impedem que aloxana danifique as células beta - (Fischer & Hamburger, 1980 e Uchigata e cols, 1982).

Grankvist e cols (1979), utilizando efluxo de Rb^+ e exclusão de Tripan blue para avaliar a viabilidade de ilhotas de camundongos, também mostraram que superóxido dismutase, benzoato e manitol, protegem contra aloxana. Vitamina E, um anti-oxidante e sequestrador de espécies ativas de oxigênio (Tappel, 1972), protegeu contra a ação diabetogênica de aloxana em ratos (Slonim, 1983), "in vivo".

Por fim, outros sequestradores de radicais hidroxila como dimetil uréia (Fischer & Hamburger, 1980) e ONO-3144 (Fuji e cols 1985), também atenuaram a ação diabetogênica de aloxana "in vitro".

Esses radicais induzem quebras simples e duplas nas cadeias de DNA, resultando na ativação da enzima poliadenosina-difosforibose-sintetase (Yamamoto e cols, 1981). Esse pro

cesso de ativação da enzima nuclear resulta em uma significativa depleção do conteúdo intracelular de NAD, consumido no processo de síntese de poli-ADP-ribose (Okamoto, 1981 e Yamamoto, 1981), afetando severamente as funções celulares, como a produção de ATP, síntese de proteínas, levando a célula à morte.

O pré-tratamento de ilhotas com inibidores da enzima-poli-(ADP-ribose)-sintetase: picolinamida, benzamida, 3-aminobenzamida, teofilina e nicotinamida protegeram contra a diminuição da biossíntese de pró-insulina provocada por aloxana (Uchigata e cols, 1982; Wilson e cols, 1984).

Outra droga muito utilizada na indução de diabetes, a estreptozotocina (STZ), é uma substância isolada do fungo Streptomyces acromagenes, com ação cancerígena e altamente diabetogênica (Rerup, 1970).

A estreptozotocina é um derivado nitroso da glucosamina, consistindo de 1-metil-1 nitrosouréia (Schein & Loftus, 1968 e Schein e cols, 1973). A deoxiglicose, uma substância que impede a entrada de glicose na célula beta, protegeu contra a ação diabetogênica da estreptozotocina (Dulin & Wyse, 1969).

O mecanismo pelo qual a nitrosouréia lesa a célula beta ainda não está claro, sendo sugerido na literatura dois mecanismos básicos: a geração de espécies ativas de oxigênio e/ou inibição de enzimas do mecanismo de defesa contra espécies ativas de oxigênio e uma ação alquilante direta da droga.

Estudos de Croush e cols (1981) mostraram diminuição dos níveis de superóxido dismutase em células betas expos

tas ã estreptozotocina, possibilitando o acúmulo intracelular de radicais livres tóxicos (Robbins e cols, 1980). Além disso, o Cu II (3,5) diisopropilsalicilato, um sequestrador de espécies ativas de oxigênio (Gandy e cols, 1983), protegeu as células beta contra a ação diabetogênica de STZ, o mesmo ocorrendo com a dimetil uréia, sequestradora de radicais hidroxila (Sandler & Anderson, 1982).

No entanto, outros autores, utilizando modelos "in vivo" (Gold e cols, 1981) e "in vitro" (Uchigata e cols, 1982 e Wilson e cols, 1984) não conseguiram comprovar nenhum efeito protetor de superóxido dismutase ou outros sequestradores de espécies ativas de oxigênio contra o efeito beta citotóxico de STZ.

As nitrosouréias em geral, entre elas a estreptozotocina, têm a propriedade de provocar metilação nas bases do DNA nuclear (Bennet & Pegg, 1981), sugerindo a possibilidade dessa droga induzir quebra do DNA por processo de alquilação (Uchigata e cols, 1981; Mossman e cols, 1986). O pré-tratamento com nicotinamida diminui a alquilação do DNA, possivelmente por ser uma acceptora do grupo metil, reduzindo as chances de DNA e outros componentes celulares serem metilados (Bennet & Pegg, 1981).

Por acúmulo de radicais livres (Sandler & Swenne, 1979) ou por ação alquilante direta da droga (Uchigata e cols, 1981; Bennet & Pegg, 1981) a estreptozotocina induz quebra no DNA nuclear, com ativação da enzima poliadenosina-difosforibose-sintetase (Yamamoto e cols, 1981a; Okamoto e cols, 1981b e Uchigata e cols, 1983). Essa enzima utiliza NAD como substrato, diminuindo seu nível intracelular, de maneira similar ao descrito para a aloxana.

Com a queda dos níveis de NAD, há diminuição acentuada da respiração celular e como a produção de ATP por fosforilação oxidativa, se dá acoplada a cadeia respiratória, há depleção de ATP intracelular. Com os níveis de ATP baixos, cessa a biossíntese de proteínas, há perda do balanço iônico normal das células beta (Sandler e cols, 1983).

Picolinamida, ácido piridinacarboxílico-amida (Yamamoto & Okamoto, 1980), 3-aminobenzamida e teofilina (Uchigata e cols, 1983; Sandler & Swenne, 1983; Sandler e cols, 1983; Wilson e cols, 1984 e Masiello e cols, 1985), inibidores da enzima poli-(ADP-ribose)-sintetase, incubados com ilhotas pancreáticas, protegeram contra a diminuição da biossíntese de pró-insulina e redução do conteúdo de NAD induzido pela estreptozotocina (Yamamoto & Okamoto, 1980; Yamamoto e cols, 1981; Akpan e cols, 1982).

O pré-tratamento com nicotinamida, outro inibidor da enzima poli-(ADP-ribose)-sintetase (Uchigata e cols, 1982), também evitou a necrose das células B (Lazarus & Shapiro, 1973).

Curiosamente, a administração de nicotinamida logo após a exposição à estreptozotocina ainda preservou parcialmente o NAD das ilhotas (Ho e Hashim, 1972), e protege-as contra a diminuição da síntese de pró-insulina (Uchigata e cols, 1983).

Nucleotídeos de piridina como o NAD, NADPH, NADP retardam o aparecimento de necrose nas células beta, mas não evitam a ação de estreptozotocina (Lazarus & Shapiro, 1973), possivelmente por serem incapazes de entrar nas células (Watkins e cols, 1968 e Dulin & Wyse, 1969).

A 1,10-fenantrolina, um forte quelante de ferro, protegeu fibroblastos em cultura contra a ação tóxica de peróxido de hidrogênio, composto capaz de induzir quebras no DNA nuclear (Mello-Filho e cols, 1984).

A toxicidade de peróxido de hidrogênio está relacionada com a formação de radicais hidroxila através da reação de H_2O_2 com íons ferro (Meneghini & Hoffmann, 1980). A formação desses radicais livres é inibida pela complexação de 1,10-fenantrolina com ferro, evitando a lesão celular. Como o ferro também é citado como provável catalisador da reação de Fenton, geradora de radicais livres após exposição de células beta a aloxana (Fischer & Harman, 1982), outros quelantes de ferro como DETAPAC e desferrioxamina, foram testados como possíveis agentes anti-diabetogênicos, com resultados contraditórios.

O ácido dietilenotriaminapentacético (DETAPAC) protegeu "in vivo" (Cabbat & Heikkila, 1981; Grankvist & Marklund, 1983), e "in vitro" (Fischer & Hamburger, 1980), contra a ação de aloxana em camundongos, mas essa proteção não foi observada com outro quelante de ferro, a desferrioxamina (Grankvist & Marklund, 1983).

Em relação a estreptozotocina, inexistem referências prévias na literatura envolvendo tentativas de proteção com quelantes de ferro contra essa droga.

Esse trabalho consiste na tentativa de utilização de 1,10-fenantrolina, "in vivo" e "in vitro", como um possível agente protetor contra a ação das drogas diabetogênicas aloxana e estreptozotocina.

MATERIAL E MÉTODOS

1. EXPERIMENTOS "IN VIVO"

1.1 Animais e seu tratamento

Foram utilizados ratos Wistar machos, procedentes - do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas, com peso entre 180-200 gramos.

Antes do início dos experimentos os animais passa ram por um período de adaptação de 1 a 2 dias, em gaiolas individuais, recebendo dieta geral de biotério (Purina) e água "ad libitum", em sala com ciclos luz-escuro de 12 horas.

Após este período inicial de adaptação, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 10 a 24 horas, recebendo a seguir injeções de estreptozotocina (10 hs de jejum) ou aloxana (24 hs de jejum). Após as injeções os animais tiveram livre acesso à alimentação e água, continuando nas mesmas condições descritas para o período de adaptação.

O sacrifício dos animais foi feito sempre pela manhã, entre 8:30 e 10:00 horas. O sacrifício era realizado por decapitação, com coleta de sangue em tubos heparinizados, para posterior extração de plasma e determinação da glicemia. Além disso, no momento do sacrifício foram retiradas as gorduras - epididimal e retroperitoneal para posterior pesagem em balança de torção.

1.2 Estudo dos efeitos da injeção de 1,10-fenantrolina sobre ratos controle (não diabéticos).

Foram feitos testes iniciais para a determinação da dose de 1,10-fenantrolina a ser empregada nos experimentos - subsequentes.

Em um grupo de 4 animais injetou-se doses i.p. cre

centes de 1,10-fenantrolina (13 a 30 mg/kg), dissolvida em salina 0.9%, sendo realizada monitorização da frequência cardíaca e pressão arterial destes animais. A partir destes experimentos, decidiu-se trabalhar com uma dose de 13 mg/kg de 1,10-fenantrolina.

A seguir foram feitos experimentos em que grupos de animais recebiam, após 24 horas de jejum, injeções i.p. de 1,10-fenantrolina (13 mg/kg - grupo FEN) ou solução salina - (grupo SAL).

Cinco animais dos grupos FEN e SAL foram sacrificados 20 minutos após a injeção i.p. para medidas dos níveis glicêmicos.

Os demais foram seguidos por 6 dias, sendo avaliados a cada dois dias o ganho ponderal e a ingestão hídrica e, no momento do sacrifício, glicemia e reservas de gordura.

Esse procedimento experimental pode ser visualizado pelo seguinte esquema:

SAL (ip) <u>6 dias</u>	Sacrifício
FEN (ip) <u>6 dias</u>	Sacrifício
(13 mg/kg)	

1.3 Efeito da administração de 1,10-fenantrolina sobre a ação diabetogênica da estreptozotocina

Nestes experimentos os animais foram submetidos a 10 horas de jejum prévio, voltando a ter livre acesso à alimentação após a injeção de estreptozotocina.

Os animais foram divididos em dois grupos, grupo SAL-STZ e o grupo FEN-STZ.

Os grupos FEN-STZ recebeu injeção ip de 1,10-fenan-

trolina e, vinte minutos apōs, injeção endovenosa de estrepto_zotocina.

A estreptozotocina (40 mg/kg) foi dissolvida em tampão citrato 0.01 molar, pH 4.5 e injetada até 5 min apōs a dissolução. A via de injeção a veia dorsal do pēnis, com volume total injetado nunca ultrapassando 0.4 ml.

Os animais foram seguidos por 6 dias, sendo a cada 2 dias avaliados ganho ponderal e ingestão hídrica e, no momento do sacrifício, glicemia e reservas de gorduras.

Esquema experimental

SAL (ip) 20 min. STZ (iv) (40 mg/kg) 6 dias sacrifício

FEN (ip) 20 min. STZ (iv) (40 mg/kg) 6 dias sacrifício
(13 mg/kg)

1.4 Efeito da administração de 1,10-fenantrolina sobre a ação diabetogênica da aloxana

Nestes experimentos os animais foram submetidos a 24 hs de jejum prēvio voltando a ter livre acesso à alimentação apōs a injeção de aloxana.

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo - SAL-ALOX e grupo FEN-ALOX.

O grupo SAL-ALOX recebeu injeção ip de salina e, vinte minutos apōs, injeção endovenosa de aloxana.

O grupo FEN-ALOX recebeu injeção ip 1,10-fenantrolina e, vinte minutos apōs, injeção endovenosa de aloxana.

A aloxana monohidratada (40 mg/kg) foi dissolvida - em tampão citrato 0.01 molar, pH 4.5 e injetada até 7 minutos apōs a dissolução. A via de injeção foi a veia dorsal do pē-

nis, com o volume total injetado nunca ultrapassando 0.4 ml.

A 1,10-fenantrolina foi injetada conforme descrição do item 1.3.

Os animais foram seguidos por 6 dias, sendo a cada 2 dias avaliados ganho de peso e ingestão hídrica e, no momento do sacrifício, glicemia e reservas de gorduras.

Esquema experimental

SAL (ip) 20 min. ALOX (iv) (40 mg/kg) 6 dias sacrifício

FEN (ip) 20 min. ALOX (iv) (40mg/kg) 6 dias sacrifício
(13 mg/kg)

2. EXPERIMENTOS "IN VITRO"

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 200-220 g, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas. Esses animais foram mantidos em condições similares às descritas no item 1.1.

2.2 Isolamento de ilhotas de Langerhans de ratos

Utilizou-se a técnica descrita por Moskalewsky (1965) e Lacy & Kostianovsky (1967), ligeiramente modificada por Boschero e cols (1980).

Para cada experimento foram sacrificados por decapitação 3 a 4 ratos. Após a laparotomia canulou-se o ducto biliar comum, próximo ao hilo do fígado, e obstruiu-se sua porção distal, adjacente ao duodeno.

A divulsão do tecido acinoso foi feita com injeção de 15 ml de solução de Hanks enriquecida com glicose (2,8mM), através de uma cânula, fluindo pelos dutos pancreáticos em direção retrógrada.

Retirou-se o pâncreas o qual livre de tecido adiposo, foi reduzindo, com auxílio de uma tesoura, a pequenos fragmentos que foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 20 mg de colagenase.

A seguir fragmentos de pâncreas foram incubados a 37°C durante 15 min.. Nos 8 min. iniciais esses fragmentos foram gaseados com 95% O₂ e 5% CO₂ e o restante do tempo mantidos sob agitação manual constante.

Em seguida o material foi lavado 3 vezes para retirada da colagenase e de grande parte do tecido exócrino. Entre uma lavagem e outra o material sofreu decantação de 1-2 min.

O material restante foi transferido para placa de Petri onde as ilhotas foram coletadas sob lupa, com pipeta Pasteur siliconizada e estirada previamente em bico de Bunsen.

2.3 Efluxo de ⁸⁶Rb

As ilhotas coletadas, foram distribuídas em 2 grupos com cerca de 100-150 ilhotas cada, em solução de Krebs.

Após a coleta, o sobrenadante foi descartado, acrescentando-se a seguir solução de Krebs com ⁸⁶Rb (10 μ Ci/ml) - (37-296 MBq/mg) e 16.7mM de glicose. As ilhotas foram incubadas durante 90 min., a 37°C, sendo o pH ajustado para 7.4 através da passagem de carbogênio nos 10 min. iniciais.

Após a incubação as ilhotas foram lavadas 3 vezes -

com solução de Krebs não radioativa e transferidas para a câmara de perfusão forrada com filtro de acetato de celulose, com poros de 5 μ m de diâmetro, sendo essa câmara ligada a dois recipientes contendo soluções nutritivas (Krebs), mantidas a 37°C e com gaseamento constante de carbogênio.

A perfusão foi iniciada logo a seguir com um fluxo de 0.8 ml/min., com duração de 60 min.

Foram feitos os seguintes grupos experimentais: - ALOX, ALOX-FEN, STZ e STZ-FEN. A 1,10-fenantrolina (0.1 mM) - quando presente foi adicionada desde o primeiro minuto de perfusão.

O líquido perfusor até o 30º min. procedeu do 1º recipiente com 65 ml de solução nutritiva mais 0,65 ml de tampão citrato e a partir desse momento e até o final da perfusão, do 2º recipiente com 55 ml de solução nutritiva mais - 0,55 ml de aloxana ou estreptozotocina.

As drogas aloxana (5 mM) e estreptozotocina (1 mM) foram adicionadas no 2º recipiente no 30º min., imediatamente após serem dissolvidas em tampão citrato 0.01 molar, pH 4.5.

As amostras foram coletadas a partir do 12º min., a cada 2 min. de perfusão, em frascos de contagem de cintilação.

A radioatividade de cada frasco foi avaliada em um contador de cintilação líquida, utilizando-se o efeito Cerenkov, que dispensa o uso de líquido de cintilação.

Em cada experimento o efluxo de ^{86}Rb (cpm/min) foi expresso como taxa fracional de efluxo.

3. MÉTODOS DE ANÁLISE QUÍMICA

A dosagem plasmática de glicose foi realizada pelo

método de Orto-Toluidina (Dubowski, 1962), padronizado no Glucose kit A/900, Doles, Brasil.

4. REAGENTES E RADIOISÓTOPOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS "IN VIVO" E "IN VITRO"

Os sais, glicose e substâncias adicionadas tanto ao meio de incubação como de isolamento, possuíam grau analítico de pureza.

Os reagentes utilizados têm a seguinte procedência: Albumina bovina fração V e Aloxana monohidrata da Sigma Chemical CO (St. Louis, Mo); Colagenase da Boehringer Mannheim GmbH (Germany); ^{86}Rb da Amersham Internacional (Buckinghamshire, England), Frascos de polietileno para contagem de radiação da New England Nuclear Corp. (Boston, Mo); Filtro Millipore Corp. (Bedford, Mass), Bomba peristáltica: Holter pump S-900 Extracorporeal Med Spec. Inc. (King Prussia, PA); Estreptozotocina da Upjohn Co Lot nº 1180 k-u 9889 (Kalamazoo, Mich); 1,10-fenantrolina da Merck Co (Germany).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise dos resultados foi aplicado o teste T de Student. O nível de significância adotado foi de 5%.

Em todas as tabelas e figuras os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média.

A normalização aplicada nos experimentos "in vitro" foi feita tomando-se como base 100% o valor do efluxo no 31º minuto de perfusão.

RESULTADOS

1. ESTUDO DOS EFEITOS DA INJEÇÃO DE 1,10-FENANTROLINA SOBRE RATOS CONTROLES (NÃO DIABÉTICOS)

Antes de iniciarmos o estudo sobre os efeitos de 1,10-fenantrolina (FEN) sobre as ações diabetogênicas de Alo-xana (Alox) e Estreptozotocina (STZ), tratamos inicialmente de caracterizar os efeitos da injeção isolada de FEN sobre ratos controles.

Nesses experimentos os animais receberam, após 24 horas de jejum, injeções intraperitoneais (ip) de FEN ou de solução salina (SAL). Alguns animais de ambos os grupos foram sacrificados vinte minutos após as injeções, para determinação de glicemias, sendo os demais ratos seguidos por seis dias com avaliação do ganho ponderal, ingestão hídrica e, no momento do sacrifício, glicemias e reservas de gorduras.

1.1 Glicemia e estado geral dos animais vinte minutos após injeção de FEN.

Os testes iniciais, feitos com doses de 30 mg/kg de FEN, injetadas por via ip, induziram severa prostração nos animais.

Experimentos com medida de pressão arterial mostraram a existência de hipotensão prolongada (queda média de 40 mmHg) nestes animais. O uso de uma dose menor de FEN (13 mg / kg) induziu hipotensão mais leve (queda média de 29 mmHg) e transitória, com retorno da pressão aos valores normais vinte minutos após injeção da droga. Desta maneira, em todas os experimentos seguintes desse trabalho, a dose empregada foi de 13 mg/kg de FEN.

Vinte minutos após a injeção ip de FEN (13 mg/kg) (Tab. 1) os níveis glicêmicos foram iguais aos de ratos que receberam apenas injeção do veículo (solução salina).

1.2 Ganho Ponderal

A tab. 2 e fig. 1 mostram que os animais tratados com FEN e os injetados com salina, partindo de valores ponderais iniciais semelhantes, apresentaram ganho de peso similar durante o período experimental, indicando que essa droga não altera a evolução ponderal dos animais.

1.3 Ingestão Hídrica

Com relação a ingestão hídrica, a tab. 3 e a fig. 2 mostram que não houve diferença significativa no consumo de água entre os animais injetados com FEN e SAL.

Nos dois grupos a ingestão hídrica manteve-se estável ao longo dos seis dias de seguimento.

1.4 Glicemia, Pesos das gorduras epididimal e retroperitoneal

A tab. 4 mostra que os níveis glicêmicos de animais tratados com FEN e SAL não foram diferentes entre os dois grupos, seis dias após as injeções.

Os pesos de gorduras epididimal e retroperitoneal - (tab. 4) também não foram afetados pela injeção de FEN ou SAL.

Tabela 1 - Glicemia (mg/dl), 20 min. após injeção de 1,10 - fe
nantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou salina em ratos con
trole.

TRATAMENTO	GLICEMIA (mg/ml)
SAL	109 \pm 7 (5)
FEN	99 \pm 6 (5)

- Resultados expressos como média \pm erro padrão da média.

() Número de animais.

Tabela 2 - Variação de peso (g) de ratos controle tratados -
com 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou salina.

TRATAMENTO	DIAS APÓS INJEÇÃO		
	2	4	6
SAL	18 \pm 1.0 (7)	23 \pm 1.0 (7)	32 \pm 3.5 (7)
FEN	16 \pm 1.0 (8)	24 \pm 2.5 (8)	28 \pm 3.0 (8)

- Resultados expressos como média \pm erro padrão da média.

() Número de animais.

Peso corporal no dia 0 (g, $\bar{X} \pm$ E.P.M.) SAL: 193 \pm 3 (7) ,
FEN: 192 \pm 7 (8).

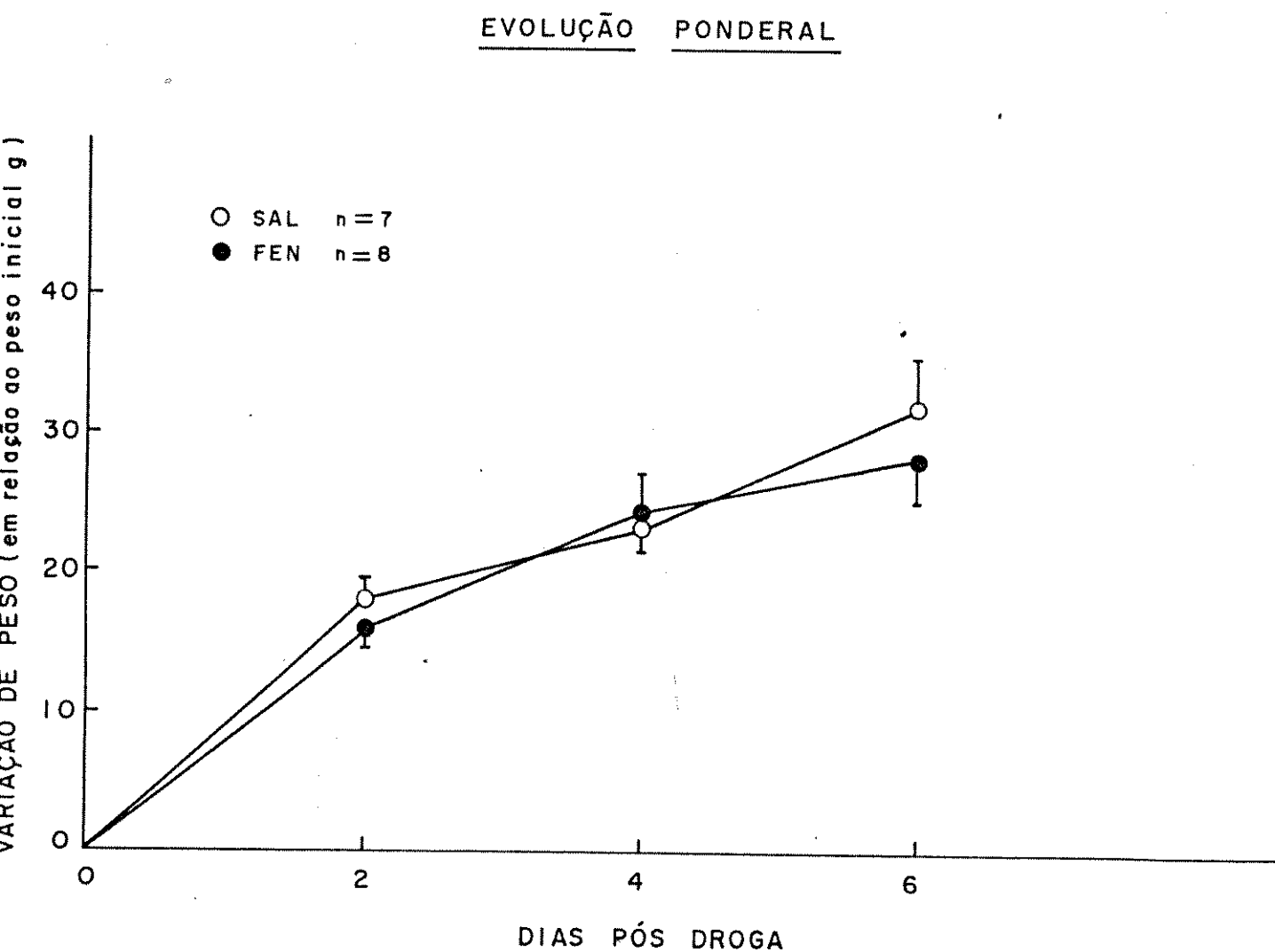


FIGURA 1 - Efeito da administração de 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou solução salina (SAL) sobre o ganho ponderal de ratos controle. Os pontos e barras verticais são respectivamente média e erro padrão da média. Peso corporal (g, $\bar{X} \pm$ E.P.M.) dia 0: SAL = 193 ± 3 e FEN = 192 ± 7 .

Tabela 3 - Ingestão hídrica (ml/24 hs) de ratos controle tratados com 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou salina.

TRATAMENTO	DIAS APÓS INJEÇÃO			
	1	2	4	6
SAL	31 ± 2 (7)	28 ± 2 (7)	28 ± 2. (7)	25 ± 1 (7)
FEN	31 ± 1 (8)	29 ± 1 (8)	30 ± 1 (8)	25 ± 1 (8)

- Resultados expressos como média ± erro padrão da média.

() Número de animais.

INGESTÃO HÍDRICA

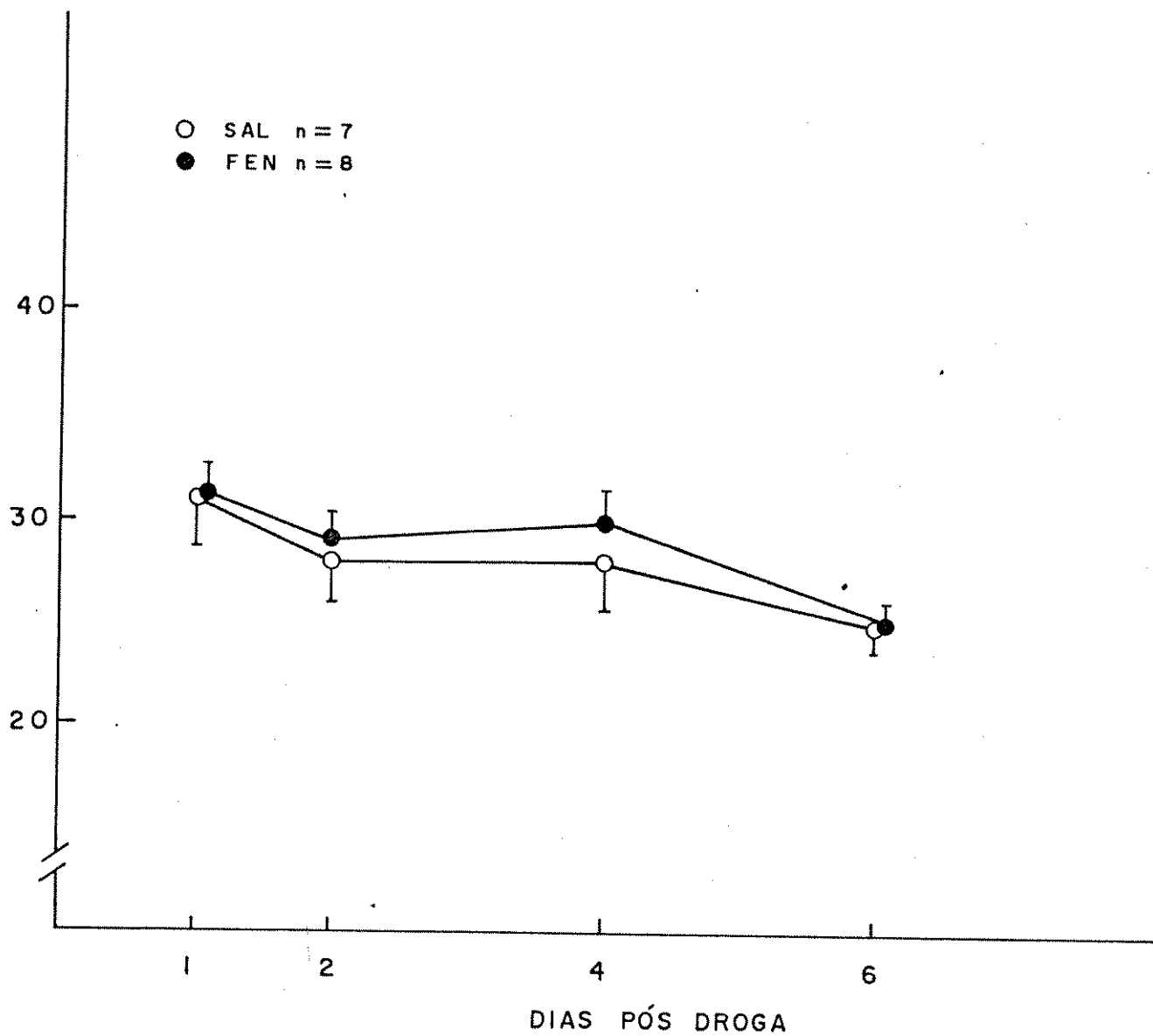


FIGURA 2 - Efeito da administração de 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou solução salina (SAL) sobre a ingestão hídrica de ratos controle. Os pontos e barras verticais são respectivamente média e erro padrão da média.

Tabela 4 - Glicemia (mg/dl), pesos de gordura epididimal e retroperitoneal de ratos controle 6 dias após injeção de 1,10-fenantrolina (13 mg/kg) ou salina.

TRATAMENTO	GLICEMIA (mg/dl)	GORDURA EPIDIDIMAL		GORDURA RETROPERITONEAL	
		Total (g)	g/100gp. corporal	Total (g)	g/100gp. corpora]
SAL	115 ± 2 (7)	1610 ± 126 (7)	717 ± 55 (7)	1262 ± 128 (7)	563 ± 59 (7)
FEN	119 ± 6 (8)	1509 ± 93 (8)	688 ± 35 (8)	1405 ± 192 (8)	638 ± 81 (8)

- Resultados expressos como média ± erro padrão da média
() Número de animais.

2. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE 1,10-FENANTROLINA SOBRE A AÇÃO DIABETOGENICA DA ESTREPTOZOTOCINA

Nestes experimentos os animais foram submetidos a 10 horas de jejum prévio. O grupo SAL-STZ recebeu a seguir injeção ip de salina e, vinte minutos após, injeção endovenosa de estreptozotocina. O grupo FEN-STZ recebeu injeção ip de 1,10-fenantrolina, vinte minutos antes da injeção endovenosa de estreptozotocina.

Os animais foram seguidos por seis dias até serem sacrificados. Neste período foram avaliados evolução ponderal, ingestão hídrica e, no momento da sacrifício, reservas de gorduras epididimal e retroperitoneal e níveis glicêmicos.

2.1 Ganho Ponderal

A tab. 5 e a fig. 3 mostram que os animais tratados com SAL-STZ ou FEN-STZ, partindo de valores ponderais iniciais semelhantes, apresentaram discreta perda de peso durante o período experimental. O grupo FEN-STZ apresentou queda maior de peso, sem que essa diferença atingisse níveis significativos.

2.2 Ingestão Hídrica

Com relação a ingestão hídrica, a tab. 6 e a fig. 4 mostram que os grupos SAL-STZ e FEN-STZ apresentaram aumento progressivo de ingestão hídrica, chegando a ingerir quase 10 vezes mais água que animais controle (tab. 3).

Tabela 5 - Variação de peso (g) durante o período experimental (6 dias) de ratos tratados com estreptozotocina (STZ) (40 mg/kg) 20 minutos após a injeção de 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou salina.

TRATAMENTO	DIAS APÓS INJEÇÃO		
	2	4	6
SAL + STZ	-2.7 ± 1.5 (20)	-2.2 ± 2.0 (20)	-1.0 ± 2.5 (20)
FEN + STZ	-6.0 ± 1.5 (23)	-8.0 ± 2.0 (23)	-5.0 ± 3.0 (23)

- Resultados expressos como média ± erro padrão da média.

() Número de animais

Peso corporal no dia 0 (g, \bar{X} ± E.P.M.) SAL + STZ:

204 ± 3.5 (20), FEN + STZ 203 ± 3.5 (23).

EVOLUÇÃO PONDERAL

○ SAL + STZ n = 20
● FEN + STZ n = 23

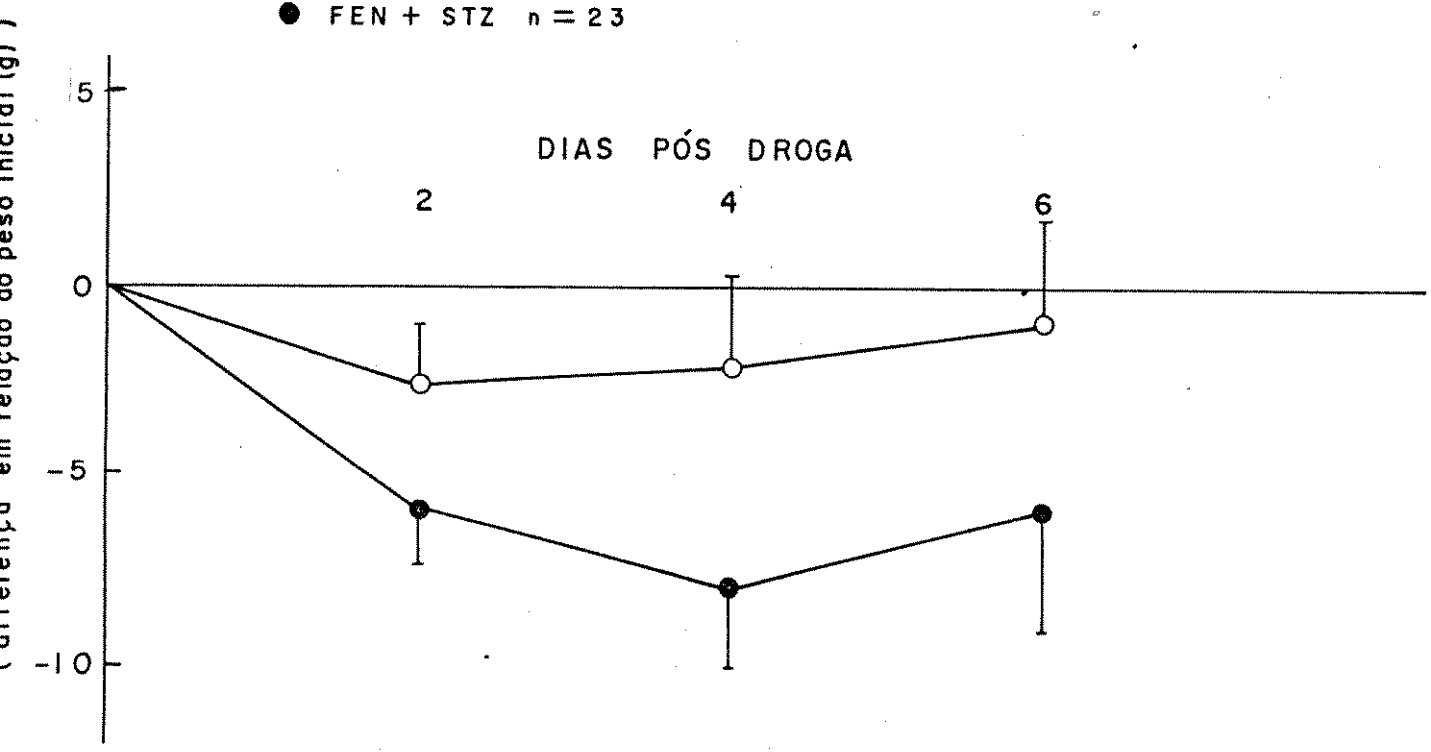


FIGURA 3 - Efeito da administração de estreptozotocina (STZ) (40 mg/kg) sobre o ganho ponderal de ratos previamente injetados com 1,10-fenantrolina (FEN) - (13 mg/kg) ou solução salina (SAL). Os pontos e barras verticais são respectivamente a média e erro padrão da média. Peso corporal (g, $\bar{X} \pm$ E.P.M.) dia 0: SAL-STZ = 204 ± 3.5 e FEN-STZ = 203 ± 3.5 .

Tabela 6 - Ingestão hídrica (ml/24 hs) durante o período experimental (6 dias) de ratos tratados com estreptozotocina (STZ) (40 mg/kg) 20 minutos após injeção de 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou salina.

TRATAMENTO	DIAS APÓS INJEÇÃO			
	1	2	4	6
SAL + STZ	57 ± 3 (20)	85 ± 4 (20)	103 ± 5 (20)	125 ± 5 (20)
FEN + STZ	47 ± 3 (23)	75 ± 3 (23)	90 ± 4 (23)	112 ± 5 (23)

- Resultados expressos como média ± erro padrão da média.

() Número de animais.

INGESTÃO HÍDRICA

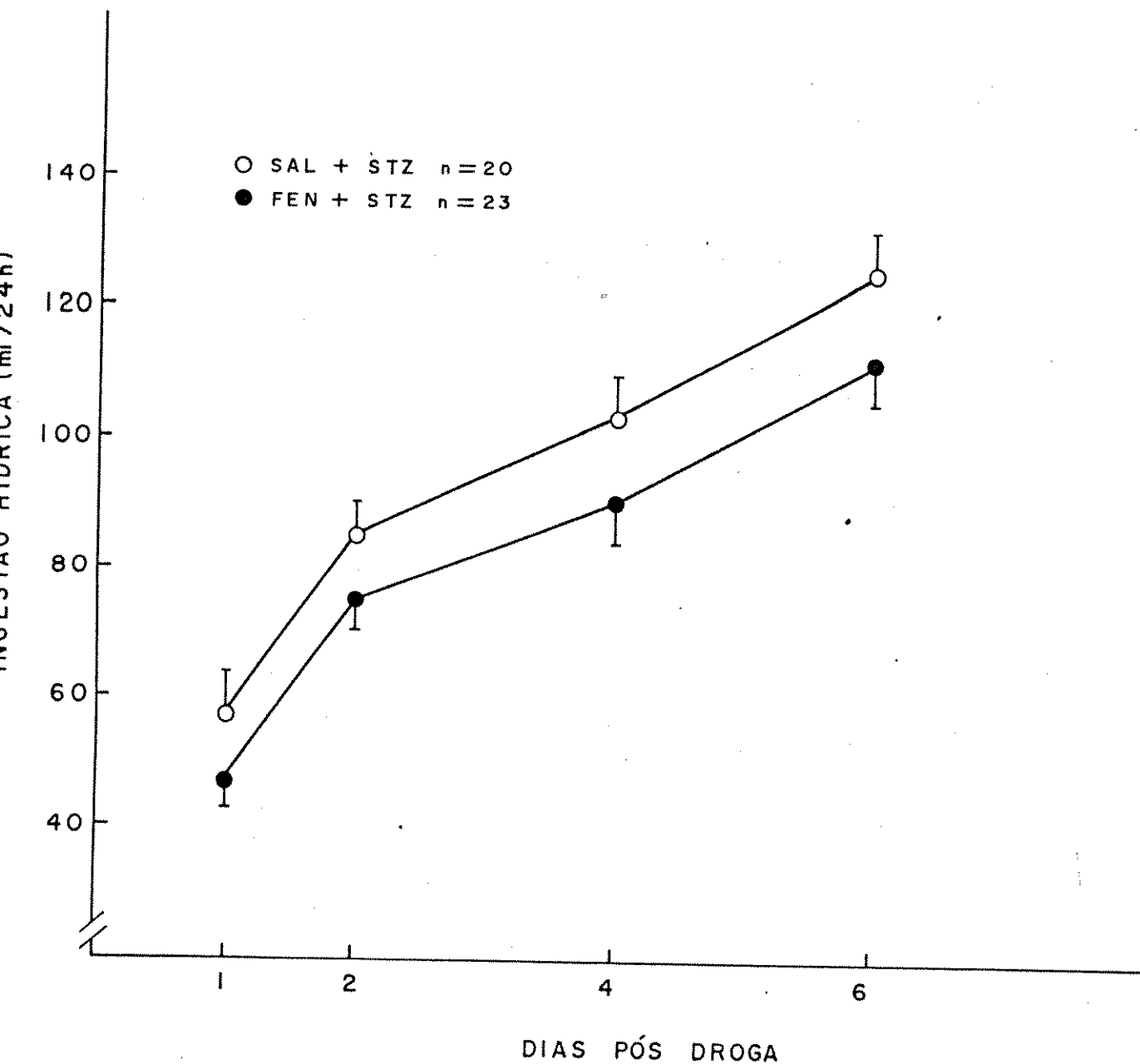


FIGURA 4 - Efeito da administração de estreptozotocina (STZ) (40 mg/kg) sobre a ingestão hídrica de ratos previamente injetados com 1,10-fenantrolina (FEN)(13 mg/kg) ou solução salina (SAL). Os pontos e barras verticais são respectivamente média e erro padrão da média.

Embora houvesse tendência a maior ingestão hídrica no grupo SAL-STZ, essa diferença não foi significativa.

2.3 Glicemia, Peso das gorduras epididimal e retroperitoneal

A tab. 7 mostra marcada elevação nas glicemias dos animais tratados com FEN-STZ e SAL-STZ em comparação com os animais controle (tab. 4). Não houve diferença entre os valores glicêmicos de animais FEN-STZ e SAL-STZ.

Os níveis de gorduras epididimal e retroperitoneal (tab. 7), especialmente esta última, também diminuíram em relação aos ratos controle (tab. 4). Novamente não foi observada diferença entre os animais SAL-STZ e FEN-STZ.

3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE 1,10-FENANTROLINA SOBRE A AÇÃO DIABETOGÊNICA DE ALOXANA

Nestes experimentos os animais foram submetidos a 24 horas de jejum prévio. O grupo SAL-ALOX recebeu a seguir injeção de salina e, vinte minutos após, injeção endovenosa de aloxana. O grupo FEN-ALOX recebeu injeção ip de 1,10-fenantrolina e, vinte minutos após, aloxana endovenosa.

3.1 Ganho Ponderal

A tab. 8 e a fig. 5 mostram a evolução ponderal de animais tratados com SAL-ALOX e FEN-ALOX, com ambos os grupos partindo de valores ponderais iniciais semelhantes.

O grupo FEN-ALOX apresentou ganho de peso constante

Tabela 7 - Glicemia (mg/dl), pesos de gordura epididimal e retroperitoneal, 6 dias após injeção de estreptozotocina (STZ) (40 mg/kg) em ratos previamente injetados com 1,10-fenantrolina (13 mg/kg) ou salina.

TRATAMENTO	GLICEMIA (mg/dl)	GORDURA EPIDIDIMAL		GORDURA RETROPERITONEAL	
		Total (g)	g/100g p. corporal	Total(g)	g/100g p. corporal
SAL + STZ	529 ± 12 (20)	1046 ± 74 (20)	506 ± 33 (20)	633 ± 63 (20)	308 ± 31 (20)
FEN + STZ	525 ± 20 (23)	967 ± 93 (23)	484 ± 44 (23)	561 ± 88 (23)	293 ± 42 (23)

- Resultados expressos como média ± erro padrão da média

() Número de animais.

a partir do 29 dia do período experimental. O grupo SAL-ALOX praticamente não apresentou ganho de peso ao longo dos 6 dias.

Comparando-se o ganho ponderal destes dois grupos de animais com o de ratos controle não diabéticos, injetados com FEN ou SAL (tab. 2) ficou evidente que o grupo FEN-ALOX apresentou um ganho de peso maior desde o 29 dia pós aloxana em relação ao grupo SAL-ALOX, embora com valores de ganho ponderal menores que os apresentados pelo grupo de ratos controle.

3.2 Ingestão Hídrica

Com relação a ingestão hídrica, a tab. 9 e a fig. 6 mostram que o grupo SAL-ALOX apresentou um maior consumo hídrico a partir do 19 dia pós injeção de aloxana, com uma elevação progressiva desse consumo durante todo período experimental, enquanto o grupo FEN-ALOX mostrou estabilização do seu consumo hídrico a partir do 49 dia.

A ingestão hídrica do grupo FEN-ALOX apesar de significativamente menor que do grupo SAL-ALOX ($p < 0.01$) foi maior que a dos animais não injetados com aloxana (tab. 3).

3.3 Glicemia e Mortalidade

A tab. 10 mostra que os níveis glicêmicos no grupo FEN-ALOX foram mais baixos que os do grupo SAL-ALOX.

Foi colhido sangue dos 5 animais moribundos do grupo SAL-ALOX e a glicemias incluídas nos dados da tab. 10. Mesmo - considerando apenas a glicemia dos 12 ratos sobreviventes do grupo SAL-ALOX (mg/dl, 517 ± 34) a diferença ainda é significativa em relação ao grupo FEN-ALOX ($p < 0.05$).

EVOLUÇÃO PONDERAL

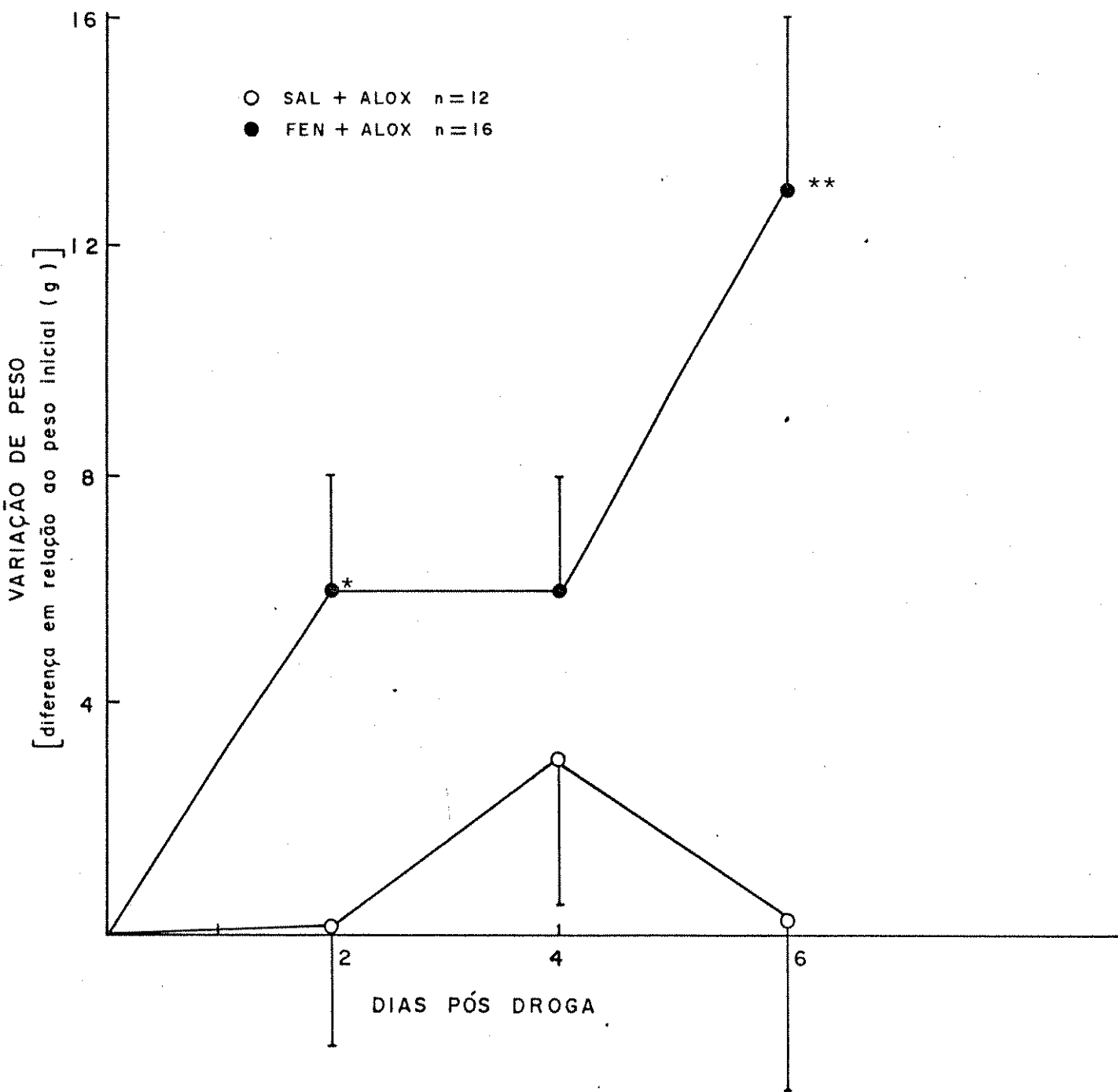


FIGURA 5 - Efeito da administração de aloxana (ALOX) (40 mg/kg) sobre o ganho ponderal de ratos previamente injetados com 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou solução salina. Os pontos e barras verticais são respectivamente média e erro padrão da média. Peso corporal - (g, $\bar{X} \pm$ E.P.M.) dia 0: SAL-ALOX = 203 ± 4 e FEN-ALOX = 190 ± 4 .

Tabela 8 - Variação de peso (g) durante o período experimental (6 dias) de ratos tratados com aloxana (ALOX) (40 mg/kg) 20 minutos após injeção de 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou salina.

TRATAMENTO	DIAS APÓS INJEÇÃO		
	2	4	6
SAL + ALOX	0.1 ± 2.0 (16)	3.0 ± 2.5 (12)	0.2 ± 3.5 (12)
FEN + ALOX	6.0 ± 2.0* (16)	6.0 ± 2.0 (16)	13.0 ± 3.0** (16)

- Resultados expressos como média ± erro padrão da média.

- * $p < 0.05$ entre os animais SAL e FEN submetidos a doses iguais de aloxana.

- ** $p < 0.01$ entre os animais SAL e FEN submetidos a doses iguais de aloxana.

- () Número de animais.

- Peso corporal no dia 0 (g, $\bar{x} \pm$ E.P.M.) SAL + ALOX: 203 ± 4 (17); FEN + ALOX: 190 ± 4 (16).

Tabela 9 - Ingestão hídrica (ml/24 hs) durante o período experimental (6 dias) de ratos tratados com (ALOX) (40mg/kg) 20 minutos após injeção de 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou salina.

TRATAMENTO	DIAS APÓS INJEÇÃO			
	1	2	4	6
SAL + ALOX	56 ± 3 (17)	82 ± 4 (15)	105 ± 4 (12)	121 ± 7 (12)
FEN + ALOX	43 ± 3 ** (16)	58 ± 6** (16)	82 ± 9 (16)	83 ± 10** (16)

- Resultados expressos como média ± erro padrão da média.
- ** $p < 0.01$ entre os animais SAL e FEN submetidos a doses iguais de aloxana.
- () Número de animais.

INGESTÃO HÍDRICA

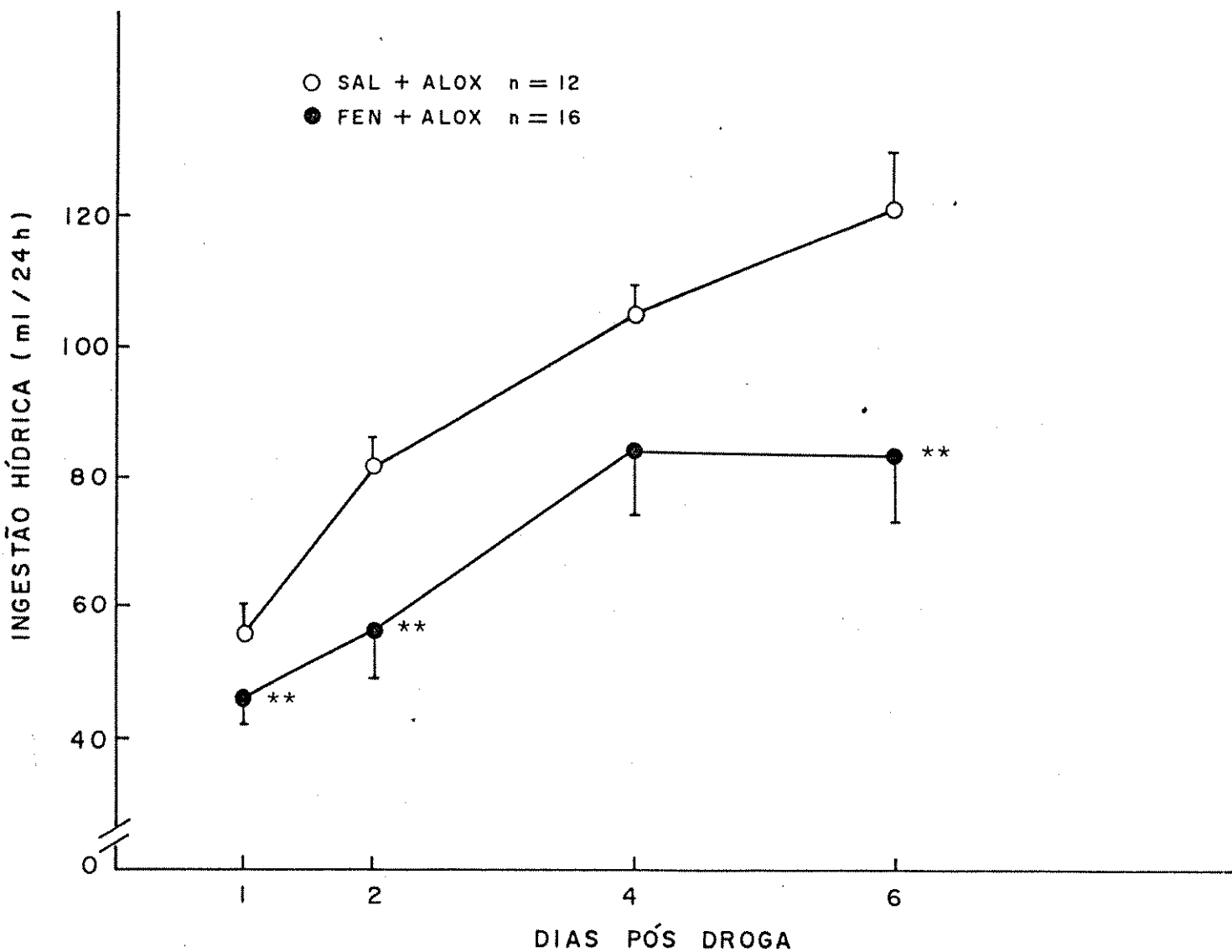


FIGURA 6 - Efeito da administração de aloxana (ALOX) (40 mg/kg) sobre a ingestão hídrica de ratos previamente injetados com 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou solução salina. Os pontos e barras verticais são respectivamente média e erro padrão da média.

O índice de mortalidade no grupo SAL-ALOX foi de 30%. As mortes foram por cetoacidose, com os animais apresentando prostração, cetonúria fortemente positiva e glicemias maiores que 900 mg/dl. As mortes ocorreram no 1º, 2º, e 4º dias após aloxana.

No grupo FEN-ALOX não houve nenhuma morte.

3.4 Pesos das gorduras epididimal e retroperitoneal

Os níveis de gorduras epididimal e retroperitoneal nos grupos FEN-ALOX e SAL-ALOX não apresentaram diferenças significativas (tab. 11).

Comparando-se esses dois grupos com os ratos não diabéticos injetados com SAL ou FEN (tab. 7) verificou-se que houve uma maior lipomobilização, principalmente de gordura retroperitoneal, nos animais injetados com SAL-ALOX.

4. EFEITO DE ALOXANA, ESTREPTOZOTOCINA E 1,10-FENANTROLINA SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb

As fig. 7,8,9,10 ilustram o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas previamente marcadas com o referido isótopo e perfundidas durante 60 minutos em presença de 3.0 mM de glicose.

Na ausência de aloxana e 1,10-fenantrolina (fig. 7) o efluxo do ^{86}Rb avaliado entre o 13º e o 31º min de perfusão atingiu a média de $5.44 \pm 1.7\%$ (n=40) por min. Com a introdução de aloxana no meio perfusor, a partir do 31º min., após um período de latência de 8 min., ocorreu um aumento significativo e duradouro do efluxo de ^{86}Rb , nas ilhotas não incubadas com FEN o qual atingiu os valores máximos entre os minutos 41 e 51 do período de perfusão.

Tabela 10 - Glicemia (mg/dl) e mortalidade 6 dias após injeção de aloxana (ALOX) (40 mg/kg) em animais previamente injetados com 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou salina.

TRATAMENTO	GLICEMIA (mg/dl)	MORTALIDADE ^a
SAL + ALOX	662 \pm 70 (17)	5/17
FEN + ALOX	398 \pm 42** (16)	0/16*

- Resultados expressos como média \pm erro padrão da média.
- * $p < 0.05$ entre os animais SAL e FEN submetidos a doses iguais de aloxana.
- ** $p < 0.01$ entre os animais SAL e FEN submetidos a doses iguais de aloxana.
- () Números de animais.
- a todas as mortes ocorreram 1 a 4 dias após injeção de aloxana.

Tabela 11 - Peso de gorduras epididimal e retroperitoneal 6 dias após injeção de aloxana (ALOX) (40 mg/kg) em animais previamente injetados com 1,10-fenantrolina (FEN) (13 mg/kg) ou salina.

TRATAMENTO	GORDURA EPIDIDIMAL		GORDURA RETROPERITONEAL	
	Total (g)	g/100g p. corp.	Total	g/100g p. corp.
SAL + ALOX	920 ± 33 (12)	414 ± 41 (12)	458 ± 73 (12)	227 ± 37 (12)
FEN + ALOX	928 ± 71 (16)	436 ± 40 (16)	606 ± 81 (16)	261 ± 33 (16)

- Resultados expressos como média ± erro padrão da média

- () Número de animais.

A mesma fig. 7 mostra ainda o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na presença de 1,10-fenantrolina presente durante todo o período de perfusão. Nesta situação experimental a média do efluxo do ^{86}Rb avaliada entre os min. 13 e 31 atingiu $6.73 \pm 1.1\%$ (n=40) por min., sendo significativamente maior que a observada para o mesmo período de perfusão na ausência de 1,10-fenantrolina ($5.44 \pm 1.7\%$ (40) ($p < 0.01$)). Com a introdução de aloxana no meio o efluxo de ^{86}Rb continuou decaindo normalmente, atingindo valores de efluxo/min. significativamente menores (5.04 ± 1.5 (n=40)) que os observados nas ilhotas expostas a aloxana sem 1,10-fenantrolina no meio de perfusão ($5.84 \pm 1,4\%$ n=40) por min. ($p < 0.02$).

A fig. 8 evidênciam com maior propriedade o efeito protetor de 1,10-fenantrolina em relação a ação de aloxana sobre o efluxo do radioisótopo das células B. Neste gráfico os valores de efluxo foram normalizados, tomando-se como base (100%) o valor do efluxo observado no 31º min. de perfusão, o qual precedeu a introdução de aloxana no meio.

A fig. 9 mostra o efeito de estreptozotocina sobre o efluxo de ^{86}Rb na presença ou na ausência de 1,10-fenantrolina.

A presença de 1,10-fenantrolina desde o 1º minuto de perfusão induziu um significativo aumento de efluxo do ^{86}Rb em relação a situação controle. ($p < 0.01$).

Os valores observados entre o 13º e 31º min. atingiram $4.55 \pm 1.8\%$ (n=40) por min. e $5.94 \pm 2.5\%$ (n=40), respectivamente na ausência e na presença de FEN ($p < 0.01$).

A introdução de estreptozotocina no meio perfusor na ausência de 1,10-fenantrolina induziu um rápido, significativo e duradouro aumento do efluxo de ^{86}Rb ($5.0 \pm 1,2\%$ (n=40)) por min. Os valores máximos foram registrados entre o 6º e 10º min.

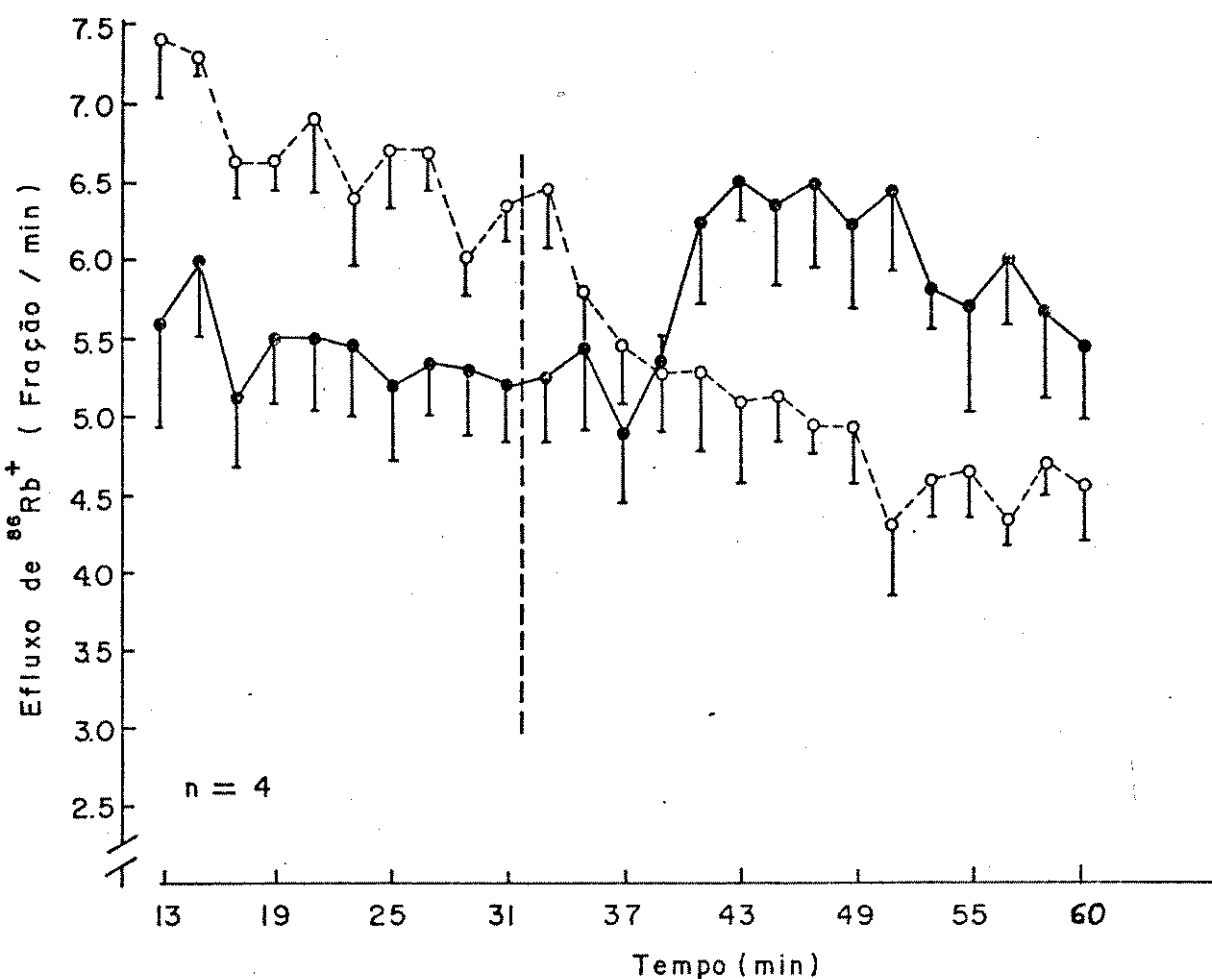


FIGURA 7 - Efeito da adição de aloxana (5mM) (●—●) e de 1,10-fenantrolina (0.1 mM) mais aloxana (o---o) sobre o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas isoladas e perfundidas na presença de 3.0 mM de glicose. O efluxo do ^{86}Rb é expresso em termos de taxa fracional do efluxo entre o 13^o e 60^o min. de perfusão. Valores das médias \pm erro padrão são mostrados para cada grupo de experimento (n). A linha vertical tracejada indica o momento de introdução da aloxana no meio perfusor. Quando presente, FEN foi adicionada desde o 19 min. de perfusão.

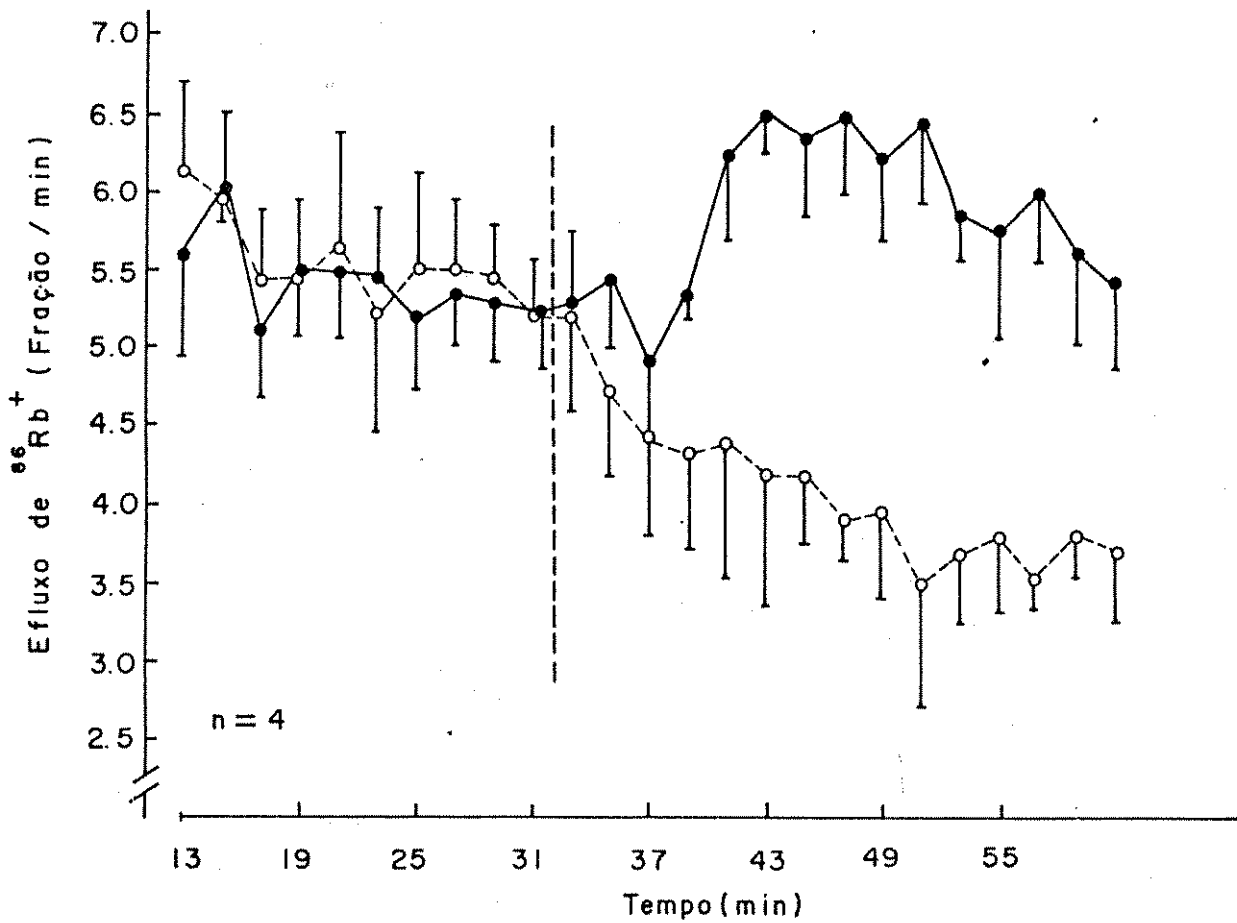


FIGURA 8 - Efeito da adição de aloxana (5 mM) (●—●) e de 1,10-fenantrolina (0.1 mM) mais aloxana (○---○) sobre o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas isoladas e perfundidas com 3.0 mM de glicose. Neste gráfico os valores foram normalizados tomando-se como base (100%) o valor do efluxo registrado no 31º min. de perfusão o qual precede a introdução de aloxana no meio. Valores das médias \pm erro padrão são mostradas para cada grupo de experimentos (n). A linha tracejada indica o momento de introdução da aloxana no meio perfusor. Quando presente FEN foi adicionada desde o 19 min. de perfusão.

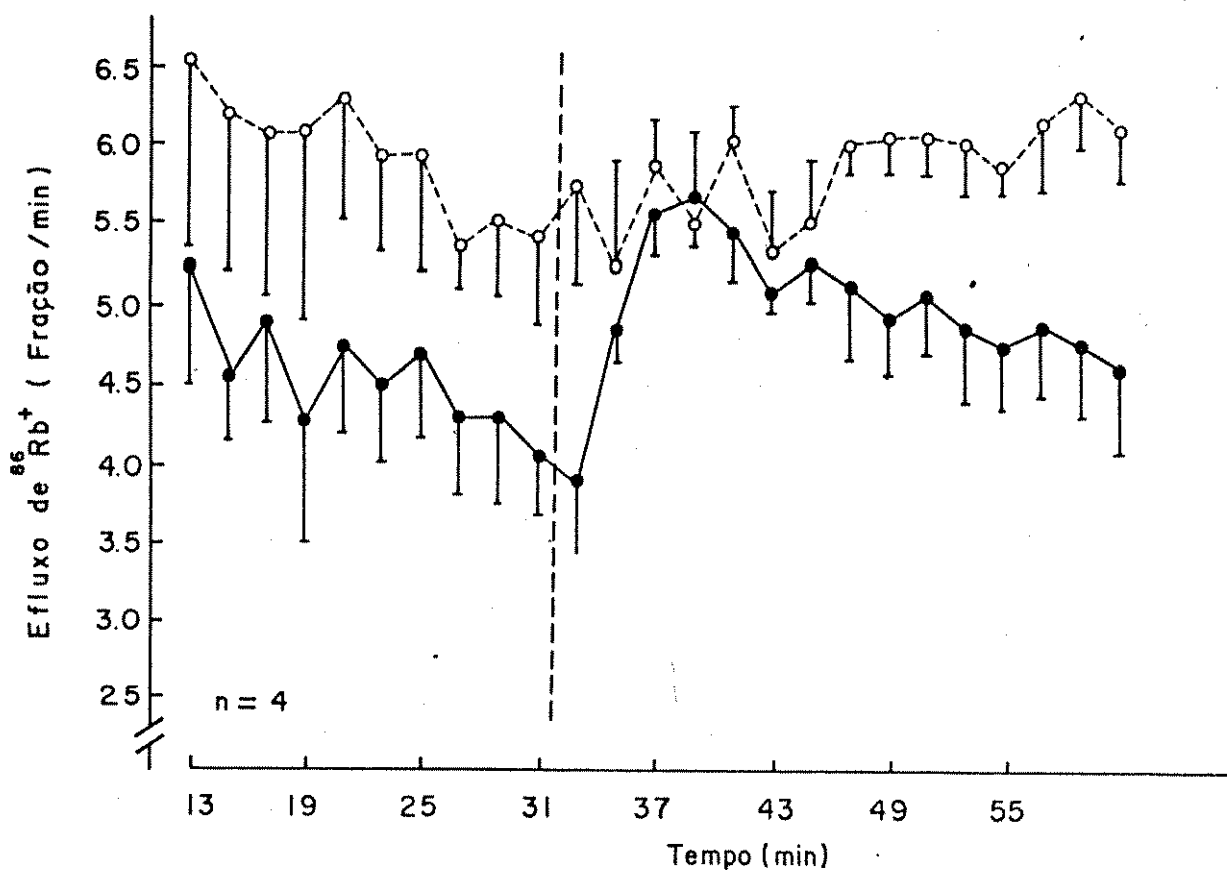


FIGURA 9 - Efeito da adição de estreptozotocina (1 mM) (●—●) e de 1,10-fenantrolina (0.1 mM) mais estreptozotocina (○---○) sobre o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas isoladas e perfundidas na presença de 3.0 mM de glicose. O efluxo de ^{86}Rb é expresso em termos de taxa fracional do efluxo entre 130 e 600 min. de perfusão. Valores das médias \pm erro padrão são mostrados para cada grupo de experimento (n). A linha vertical tracejada indica o momento de introdução da estreptozotocina no meio perfusor. Quando presente FEN foi adicionada desde o 10 min. de perfusão.

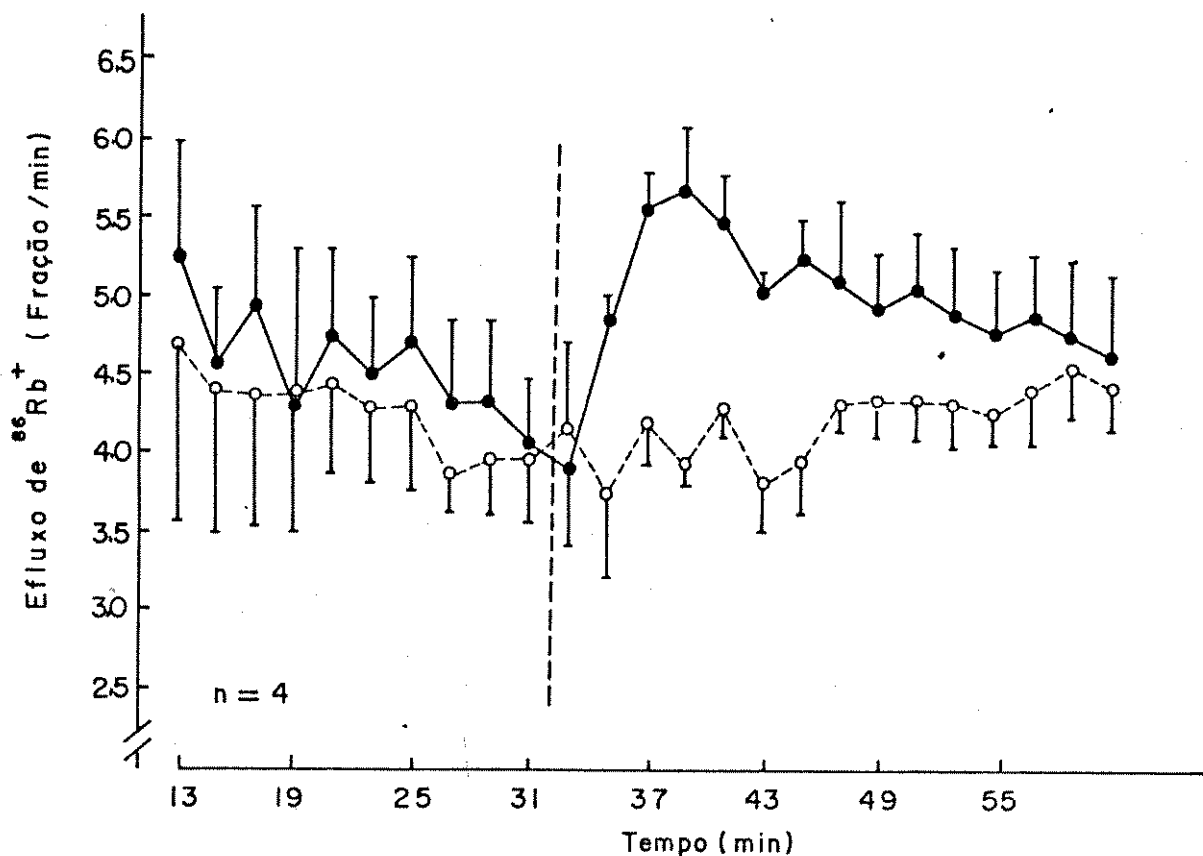


FIGURA 10 - Efeito da adição de estreptozotocina (1 mM) (●—●) e de 1,10-fenantrolina (0.1mM) mais estreptozotocina (○---○) sobre o efluxo de ^{86}Rb em ilhotas isoladas e perfundidas em glicose 3.0 mM. Neste gráfico os valores foram normalizados tomando-se como base (100%) o valor do efluxo registrado no 31o min. de perfusão o qual precede a introdução de estreptozotocina no meio. Valores das médias \pm erro padrão são mostradas para cada grupo de experimentos (n). A linha vertical tracejada indica o momento de introdução de estreptozotocina no meio perfusor. Quando presente FEN foi adicionada desde o 19 min. de perfusão.

após introdução da droga no meio perfusor.

Mesmo na presença de 1,10- fenantrolina a estreptozotocina inibiu a queda progressiva do efluxo de ^{86}Rb , como o observado na fig. 7, fazendo com que os valores do efluxo se mantivessem iguais e a partir do 439 min., novamente maiores ($p < 0.01$) que os observados nas ilhotas expostas a estreptozotocina, sem fenantrolina no meio de perfusão.

A normalização dos dados (fig. 10) reforça o observado na fig. 9: há um aumento do efluxo de ^{86}Rb nas ilhotas expostas a estreptozotocina sem 1,10-fenantrolina no meio e no grupo com fenantrolina a estreptozotocina inibe a queda progressiva do efluxo do isótopo, normalmente observada.

DISCUSSÃO

Iniciaremos discutindo nossos resultados com a caracterização dos efeitos da injeção isolada de 1,10-fenantrolina sobre ratos controles.

O fato do quelante de ferro 1,10-fenantrolina não ter sido empregado "in vivo", mas somente em cultura de células (Mello-Filho e cols, 1984), levou-nos a estudar inicialmente os possíveis efeitos dessa droga em animais não diabéticos, antes de analisarmos seu efeito sobre ações diabetogênicas "in vivo".

Medidas de pressão arterial mostraram que as doses mais elevadas testadas (20-30 mg/kg) dessa droga provocavam hipotensão nos ratos, forçando-nos a utilizar uma dose menor (13 mg/kg). Essa dose induziu hipotensão leve e transitória, com retorno da pressão ao normal em vinte minutos. Como a injeção das drogas diabetogênicas era sempre realizada 20 minutos após a injeção de FEN, os animais, ao receberem aloxana e estreptozotocina, já estavam com níveis normais de pressão arterial.

Os níveis glicêmicos dos animais, vinte minutos após injeção de 1,10-fenantrolina, não apresentaram alterações em relação ao grupo injetado com salina. Como a hiperglicemia pode alterar a sensibilidade de ratos à aloxana (Rerup, 1970; Weaver 1978), o fato de FEN não induzir elevação dos níveis glicêmicos permitiu-nos realizar os experimentos com injeção de FEN previamente à injeção de aloxana.

Os animais tratados com o quelante de ferro ou salina, seguidos por seis dias, não apresentaram diferenças em relação a evolução ponderal, consumo hídrico, níveis glicêmicos e pesos de gorduras epididimal e retroperitoneal, sugerindo que essa droga nas concentrações de 13 mg/kg não apresenta efeitos sobre o metabolismo e condições orgânicas gerais dos animais capazes, de provocar alterações nos resultados dos experimentos com animais diabéticos.

Os animais que receberam as drogas diabetogênicas se encontravam, no momento das injeções, sempre com pesos similares. Essa condição é importante, pois animais com diferentes idades e pesos podem apresentar diferentes sensibilidades às drogas diabetogênicas (Masiello e cols, 1975; Masiello e cols, 1979).

A dose de 40 mg/kg de estreptozotocina por nós utilizada causa diabetes moderado na maioria dos animais (Eizirik, 1982).

Os ratos tratados com estreptozotocina apresentaram reduzida perda de peso durante o período experimental, sem que houvesse diferença entre os grupos SAL-STZ e FEN-STZ.

Com a indução do diabetes, a ingestão hídrica dos grupos FEN-STZ e SAL-STZ chegou a ser dez vezes maior em relação aos controles. Esse aumento progressivo do consumo hídrico está diretamente relacionado com os níveis elevados de glicosúria e poliúria nesses animais, com piora gradativa no diabetes por estreptozotocina (Hoftiezer & Carpenter, 1973). Não houve diferença na ingestão hídrica entre os grupos FEN-STZ e SAL-STZ.

Os valores glicêmicos dos grupos FEN-STZ e SAL-STZ também não apresentaram diferença entre si, com a glicemia

desses animais estando elevada em comparação com os não diabéticos, no momento do sacrifício. Junod (1969) e Rerup (1970) descreveram a resposta trifásica da glicose no sangue após a injeção de estreptozotocina. As altas glicemias desses grupos são características da terceira fase, estabelecida 24 horas após a injeção da droga, devido as lesões que culminam na morte das células beta neste período.

O grau da lipólise nestes ratos foi avaliada de forma indireta, através do peso das gorduras epididimal e retroperitoneal. Não houve diferença entre os dois grupos, mas os níveis dessas gorduras, principalmente da retroperitoneal, diminuíram em relação aos controles.

A maior mobilização da gordura retroperitoneal em relação à epididimal sugere que diferentes tecidos adiposos podem apresentar diferentes graus de resposta metabólica a situações endócrinas similares. Essa maior lipólise após a injeção de STZ e aloxana decorre basicamente da falta de insulina, hormônio que evita esse processo na célula adiposa (Tepperman, 1977). Schein e cols (1971) mostraram que após a injeção de estreptozotocina havia um aumento de ácidos graxos livres e corpos cetônicos, elementos resultantes da lipólise em paralelo a queda dos níveis de insulina sérica.

A aloxana, a outra droga diabetogênica utilizada neste estudo, teve sua dose de 40 mg/kg estabelecida de acordo com dados prévios da literatura, indicando-a como dose ideal para indução de diabetes em ratos (Rerup, 1970; Houssay, 1946).

Após a injeção de aloxana, o ganho ponderal foi sempre maior no grupo injetado previamente com fenantrolina. O grupo SAL-ALOX não ganhou peso neste período, tendo evolução ponderal similar a descrita por Hoftiezer e Carpenter (1973)

em ratos injetados com dose igual de aloxana. Esse primeiro dado já sugere uma possível interferência da 1,10-fenantrolina sobre a ação diabetogênica da aloxana.

A ingestão hídrica do grupo FEN-ALOX se estabilizou a partir do 4º dia, com valores menores que no grupo SAL-ALOX. No grupo SAL-ALOX o consumo aumentou progressivamente, sendo esse aumento possivelmente devido a elevação da glicosúria e consequente poliúria (Hoftiezer & Carpenter, 1973). Esta possibilidade é corroborada pelo achado de níveis glicêmicos significativamente maiores no grupo SAL-ALOX, em comparação ao grupo FEN-ALOX (tabela 10).

Os níveis glicêmicos dos animais do grupo FEN-ALOX foram similares aos observados por Cabbat & Heikkila (1981) e Grankvist & Marklund (1983), injetando DETAPAC, um quelante de metais, antes da injeção de aloxana.

O grupo SAL-ALOX apresentou um índice de 30% de mortes, contra nenhuma morte do grupo FEN-ALOX.

As mortes eram precedidas de prostração, cetonúria, perda de peso, anorexia, diminuição da ingestão hídrica e elevadas glicemias (acima de 900), configurando a cetoacidose diabética como a causa da morte destes animais.

A análise dos pesos de gorduras epididimal e retroperitoneal mostrou uma tendência, não significativa, a maiores reservas no grupo FEN-ALOX em comparação aos animais SAL-ALOX. Essa ausência de significância pode em parte ser explicada pela elevada mortalidade no grupo SAL-ALOX, retirando do estudo os animais com diabetes mais severo. Ambos os grupos apresentaram reservas de gordura significativamente menores que as observadas nos animais controle (tabela 4). A exemplo do ocorrido após a injeção de estreptozotocina, observou-se também uma

maior lipomobilização da gordura retroperitoneal após a injeção de aloxana.

Desta forma, os experimentos "in vivo" até agora discutidos mostram que a 1,10-fenantrolina diminui a ação diabético-gênica de aloxana. Esta conclusão é baseada no fato do grupo FEN-ALOX em comparação com o grupo SAL-ALOX apresentar maior ganho de peso, menor ingestão hídrica, menores glicemias e índice de mortalidade zero. Tal efeito protetor não foi observado em relação a outra droga diabetogênica, estreptozotocina.

Apesar dos experimentos com os animais controles terem sugerido que a injeção "in vivo" de FEN não induzia modificações sistêmicas capazes de interferir com nossos estudos, a necessidade de comprovar que a ação protetora da FEN contra a aloxana dependia realmente de um efeito direto, a nível das ilhotas Langerhans, levou-nos a realizar uma série de experimentos com medidas do efluxo do ^{86}Rb de ilhotas isoladas e expostas a ALOX e STZ, na presença ou ausência de FEN.

O uso do efluxo de ^{86}Rb como parâmetro do grau de lesão das células B foi baseado no fato de que a retenção de K^+ , ser um passo importante no mecanismo da secreção de insulina provocando despolarização da membrana celular, passo fundamental na sequência dos eventos que culminam com a extrusão de grânulos de insulina para o líquido extracelular (Atwater, 1980; Henquim & Lambert, 1974; Milner & Hales, 1976; Boschero e cols, 1984). Assim, a capacidade da célula B em reter K^+ é um parâmetro utilizado para o estudo da viabilidade dessas células, já que as células B intactas são capazes de concentrar grandes quantidades de Rb^+ através da bomba cation univalente (Sehlin & Taljedal, 1974).

Pelo menos qualitativamente, o Rb^+ é um substituto a

dequado para o ^{42}K , isótopo de difícil manejo por apresentar uma meia vida de apenas 12,5 horas (Boschero e cols, 1977). Essa substituição de isótopos tem sido empregada em ilhotas por vários autores (Sehlin & Taljedal, 1974; Idal e cols, 1976 ; Boschero & Malaisse, 1977; Grankvist e cols, 1978; Henquin , 1979).

As figuras 7,8,9,10 indicam que tanto a estreptozotocina quanto aloxana induziram aumento do efluxo do ^{86}Rb de ilhotas isoladas.

Esses resultados confirmam dados prévios de Henquin (1979) que observou aumento do efluxo do ^{86}Rb em presença de aloxana. Segundo esse autor a explicação para tal fato seria a redução drástica do metabolismo celular e/ou bloqueio da bomba de Na^+/K^+ . O bloqueio do transporte ativo de Na^+/K^+ levaria a despolarização celular e consequente ativação das vias de permeabilidade ao K^+ voltagem sensíveis (Henquin, 1979).

A redução do metabolismo diminuiria os níveis de ATP e NAD (P) H celulares, também importantes para a retenção intra-celular de K^+ (Cook & Hales, 1984). A aloxana é reduzida por NADH e NADPH (Grankvist e cols, 1979) e a diminuição nos níveis desses nucleotídeos de piridina permite uma atuação mais intensa da aloxana.

O fato das ilhotas incubadas com 1,10-fenantrolina apresentarem efluxo de ^{86}Rb aumentado, previamente à exposição as drogas diabetogênicas (figuras 7 e 9), dificultou parcialmente a interpretação dos dados. O mecanismo envolvido neste aumento de efluxo não está claro, embora não se possa excluir uma ação direta da 1,10-fenantrolina na dose empregada a nível do núcleo celular (Que e cols, 1980). Com a normalização dos resultados (fig. 8) fica evidente que a FEN evitou o aumento do efluxo de ^{86}Rb em presença da aloxana. Em relação à STZ (fi

guras 9 e 10), a normalização não tornou clara esta diferença. A análise da figura 9 sugere que as ilhotas incubadas previamente com FEN, embora não apresentando o pico de liberação de ^{86}Rb após a exposição à STZ, seguem sempre com valores mais elevados de efluxo que ilhotas incubadas apenas com STZ, sugerindo a ausência de proteção do quelante contra a STZ "in vitro".

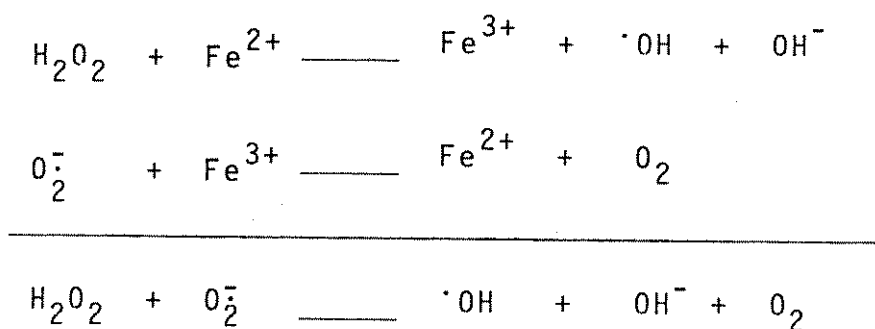
Os dados "in vitro" confirmam as observações "in vivo", mostrando a ausência de proteção da FEN contra a STZ e sugerindo que o efeito protetor deste quelante contra a aloxana ocorre realmente a nível das células beta das ilhotas de Langerhans.

Mais ainda, estes dados "in vivo" e "in vitro" sugerem que aloxana e estreptozotocina lesam as células beta por mecanismos distintos.

O efeito protetor da FEN contra a aloxana sugere que a atuação desta droga, se dê, pelo menos parcialmente através da geração de espécies ativas de oxigênio.

Os radicais superóxido (O_2^-) participam nos processos tóxicos e de hidroxilação na maioria dos sistemas biológicos, originando radicais $\cdot\text{OH}$ que podem lesar o DNA (Van Hemmer & Meuling, 1975).

Cohen e Heikkila (1974) mostraram que na autooxidação do ácido dialúrico, forma reduzida da aloxana, houve formação de radicais altamente reativos, entre eles o radical $\cdot\text{OH}$. O processo químico que gera esses radicais $\cdot\text{OH}$ depende do ferro como catalizador das reações (Heikkila e cols, 1974; Fischer & Harman, 1982) e possivelmente pode ser explicado pela reação de Haber-Weiss (Czapski e Ilan, 1978):



Fischer & Hamburger (1980a), em ilhotas de ratos e Grankvist & Marklund (1983), em camundongos "in vivo", obtiveram proteção contra a ação de aloxana utilizando DETAPAC. Esse quelante de ferro protegeu as ilhotas também contra a ação de diidroxifumarato, um produtor de anions superóxidos e radicais hidroxila. (Fischer & Hamburger, 1979).

Essas similaridades sustentam a idéia da aloxana atuar através da geração de radicais $\cdot\text{OH}$, em uma reação catalizada pelo ferro.

Outras evidências obtidas com superóxido dismutase e catalase (Grankvist e cols, 1979; Fischer & Hamburger, 1980a) e 1,1 dimetil uréia (Heikkila & Cabbat, 1978 e Fischer & Hamburger, 1980b), que protegeram contra a ação da aloxana, corroboram a hipótese de que as reações dos radicais hidroxila com constituintes celulares, especialmente DNA contribuiriam para a ação citotóxica da aloxana.

A ineficiência do quelante de metal desferrioxamina (Grankvist & Marklund, 1983) em proteger contra aloxana poderia ser explicada pela incapacidade desse metal alcançar concentração apropriada nos sítios de ação intracelular da droga (Osheroff e cols, 1985).

O quelante de ferro 1,10-fenantrolina, em experimentos "in vitro", penetra facilmente no interior das células, quelando o ferro da cromatina nuclear e impedindo desta forma

sua utilização nas reações que originam radicais lesivos ao núcleo celular (Mello-Filho e cols, 1984).

O fato da proteção induzida "in vivo" pela 1,10-fenantrolina contra a ação tóxica da aloxana ter sido apenas parcial merece menção. Uma primeira explicação poderia ser, a exemplo do ocorrido em nível mais intenso com a desferrioxamina, uma dificuldade da droga, "in vivo", de atingir concentrações protetoras adequadas nas células beta. No entanto, estudos preliminares com observação do crescimento celular de fibroblastos humanos, após a exposição a aloxana, com ou sem fenantrolina no meio de cultura, também demonstraram uma proteção apenas parcial da FEN, em altas concentrações, contra a citotoxicidade da aloxana (Hoffmann & Eizirik, comunicação pessoal). Essas evidências sugerem que a aloxana possa lesar a célula beta por outros mecanismos, além da geração de radicais $\cdot\text{OH}$ com catálise pelo ferro.

Ao contrário do ocorrido com a aloxana, o efeito protetor da FEN não foi observado em relação a estreptozotocina.

A observação de que doses de 1,10-fenantrolina, capazes de proteger totalmente contra a ação do peróxido de hidrogênio, "in vitro", (Mello-Filho e cols, 1984), e parcialmente contra os efeitos da aloxana "in vivo" e "in vitro", não mostrarem nenhuma proteção contra estreptozotocina, vai contra a hipótese do mecanismo de ação desta droga ocorrer através da geração de espécies ativas de oxigênio (Croush e cols, 1978 ; Robbins e cols, 1980; Sandler e Anderson, 1982).

O fato de ter sido mostrado efeito protetor da dimetil uréia, um sequestrador de radicais $\cdot\text{OH}$ contra a ação tóxica de STZ (Sandler e Anderson, 1982) se deve provavelmente a que a dimetil uréia atua também como inibidora da enzima poli

(ADP-ribose)-sintetase (Wilson e cols, 1984), impedindo desta forma o consumo de NAD e conseqüente morte celular (Okamoto , 1981 e Yamamoto, 1981).

Nossos dados estão de acordo com estudos realizados com superóxido dismutase (Gold e cols, 1981; Uchigata e cols , 1982) e catalase (Uchigata e cols, 1982), "in vivo" e "in vitro", que também não conseguiram evidenciar nenhum efeito protetor dessas drogas contra a ação de estreptozotocina. Desta forma, ganha maior relevo a hipótese de Uchigata e cols,(1981) e Bennet & Pegg (1981) que essa droga não atuaria através da geração de espécies ativas de oxigênio e sim por processos de alquilação direta das bases do DNA nuclear, induzindo a partir daí todas as alterações celulares que provocariam a morte das células B.

RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da 1,10-fenantrolina (FEN), um quelante de ferro, sobre a ação diabetogênica das drogas aloxana e estreptozotocína.

Para isso foram realizados experimentos "in vivo" e "in vitro".

Nos experimentos "in vivo" foram utilizados ratos - Wistar machos (180-200 g), que receberam doses IV de estreptozotocina (STZ, 40 mg/kg) ou aloxana (ALOX, 40 mg/kg). Prêviamente a injeção das drogas diabetogênicas os animais recebiam, por via IP, injeção de 1-10 fenantrolina (13 mg/kg) ou salina (SAL).

Esses animais foram seguidos por 6 dias e durante esse período foram avaliados, a cada 2 dias, peso corporal e ingestão hídrica e, no momento do sacrifício, peso das gorduras epididimal e retroperitoneal e glicemia.

Os experimentos "in vitro" foram realizados com - ilhotas de ratos Wistar machos (200-220 g) e consistiam da análise do efluxo de ^{86}Rb em ilhotas prêviamente marcadas - com esse isótopo (substituto do ^{42}K) e perfundidas durante - 60 min em diferentes condições experimentais.

Os resultados "in vivo" mostraram que os animais injetados com SAL-STZ ou FEN-STZ apresentaram perda de peso , aumento progressivo de ingestão hídrica e, no momento do sau

crifício, glicemias elevadas e diminuição das reservas de gordura. Não houve diferença entre estes parâmetros de severidade do diabetes nos 2 grupos.

Com relação aos animais que receberam aloxana, o grupo FEN-ALOX, em comparação ao grupo SAL-ALOX, reduziu o índice de mortalidade por cetoacidose diabética a zero, apresentou maior ganho ponderal, menor ingestão hídrica e, no momento do sacrifício, menores níveis de glicemia.

Os experimentos com ^{86}Rb em ilhotas isoladas e perfundidas foram feitos sob as seguintes condições: STZ (1mM), STZ (1mM) + FEN (0.1 mM), ALOX (5.0 mM), ALOX (5.0 mM) + FEN (0.1mM). A adição das drogas diabetogênicas se faz aos 30 min. de perfusão sendo que FEN, quando utilizada, esteve presente desde o início da perfusão.

O aloxana aumentou o efluxo do ^{86}Rb das ilhotas isoladas, sendo esse efeito significativamente reduzido na presença de 1,10-fenantrolina.

O aumento do efluxo de ^{86}Rb provocado por STZ não foi alterado pela FEN, embora a interpretação destes dados fique dificultada pelo fato da FEN, isoladamente, induzir aumento no efluxo de ^{86}Rb .

Os resultados "in vivo" e "in vitro" mostram que a 1,10-fenantrolina apresenta efeito protetor parcial contra a ação diabetogênica da aloxana. Este efeito não é reproduzido contra a estreptozotocina. Estes dados, sugerem que o efeito tóxico da aloxana, mas não da STZ, parece depender, pelo menos parcialmente, da geração de radicais hidroxila em uma reação catalizada pelo ferro.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present study was designed to investigate the effect of previous administration of 1,10-phenantroline (PHEN), a metal chelator, on the diabetogenic actions of streptozotocin (STZ) and alloxan (ALOX) in rats.

Twenty minutes before IV injection with alloxan (40 mg/kg) or STZ (40 mg/kg), male Wistar rats were injected intraperitoneally with Phen, 13 mg/kg (groups PHEN-ALOX and PHEN-STZ) or with an equal volume of normal saline (groups SAL-ALOX and SAL-STZ).

After 6 days, the PHEN-ALOX group, compared with SAL-ALOX animals, showed reduced mortality, lower water intake, greater increment in body weight gain and lower plasma glucose levels. The PHEN-STZ group, compared with SAL-STZ animals, did not show any improvement in body weight gain, water intake or plasma glucose levels.

In an effort to reduce the variables inherent to "in vivo" systems, we utilized isolated rat pancreatic islets to investigate whether Phen could protect against the "in vitro" cytotoxicity of alloxan and STZ.

Isolated rat islets were prelabeled with ^{86}Rb (utilized as a K^+ - tracer) and then exposed to STZ (1.0mM) or alloxan (5.0 mM) with or without Phen (0.1 mM) in the perfusion system. The ^{86}Rb efflux rate was markedly increased by alloxan as well as by STZ exposition. Phen did not protect against the ^{86}Rb efflux rate induced by STZ. However, Phen did significant-

tly avoid the alloxan induced increase in ^{86}Rb efflux. Incubation with 0.1 mM Phen alone slightly increased the basal ^{86}Rb efflux rate.

The data show that Phen exposition reduced the diabetogenic action of alloxan. These protective effects were not observed against the diabetogenic action of STZ. These results are consistent with the idea that hydroxyl radicals, generated via iron dependent reactions, are related with alloxan but not streptozotocin diabetogenic effects.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKPAN, J.O.; WRIGHT, P.H & DULIN, W.E. Effect of diabetogenic nitrosourea on the activity of the pentose phosphate shunt - in isolated islets. Acta Diabet Lat 19:37 - 47, 1982.
- ATWATER, I. Control mechanisms for glucose induced changes in membrane potential of mouse pancreatic B-cell. Cienc. Biol., 5:299 - 314, 1980.
- BENNET, R.A. & PEGG, A.E. Alkylation of DNA in rat tissues - following administration of Streptozotocin. Cancer Res.41: 2786 - 2790, 1981.
- BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E. & GONÇALVES, A.A. Mecanismo da secreção de insulina. Ciênc. e Cult. 36 : 1742-1749,1984.
- BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E. & SANTOS, M.L. Isolamento de íhotas de Langerhans de rato. Anais do 12º Congresso Brasileiro de Fisiologia, Ribeirão Preto.
- BOSCHERO, A.C.; KAWAZER, S.; DUNCAN, G. & MALAISSE, W.J. Effect of glucose on K⁺ handling by pancreatic islets. Febs Letters 83: 151 - 154, 1977.
- COHEN, G. & HEIKKILA, R.E. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6 hydroxydopamine, dialuric acid and related cytotoxic agents. J. Biol. Chem. 249: 2447 - 2452, 1974.
- COOK, D.L. & HALES, N.C. Intracelular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. Nature 311:271 - 273,1984.

COOPERSTEIN, S.J. & WATKINS, D. Effect of alloxan on islet - tissue permeability: protection and reversal by NADPH. Biochem. Biophys Res. Commun. 79: 756-762, 1977.

COOPERSTEIN, S.J. & WATKINS, D. Effect of sulphhydryl - binding reagents on islet tissue permeability: protection and reversal by D-glucose and phorizin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 204:230 - 239, 1978.

CROUSH, R.K; GANDY, S.E.; KIMSEY G; GALBRAITH, R.A; GALBRAITH, G.M.P. & BUSE, M.G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. Diabetes 30:235 - 241, 1981.

CZAPSKI, G. & ILAN, A.Y. On the generation of the hydroxylation agent from superoxide radical. Can the Haber - Weiss reaction be the source of $\cdot\text{OH}$ radicals? Photochem. Photobiol. 28: 651-653, 1978.

DEAN, P.M.; MATTHEWS, E.K. The bioelectrical properties of pancreatic islet cells: effect of diabetogenic agents. Diabetologia 8: 173 - 178, 1972.

DUBOWSKI, K.M. An O-Toluidine method for body fluid glucose - determination. Clin. Chem. 8: 215 - 235, 1982.

DULIN, W.E. & WYSE, B.M. Studies on the ability of compounds to block the diabetogenic activity of Streptozotocin. Diabetes 18: 459 - 466, 1969.

EIZIRIK, D.L. Efeito de uma dieta hiperproteica sobre a açao diabetogênica da estreptozotocina em ratos. Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1982.

EIZIRIK, D.L. & MIGLIORINI, R.H. New trends in diabetes research. The search for an etiologically oriented treatments for type I diabetes mellitus. Braz. J. Med. Biol. Res 16: 381 - 383, 1983.

FISCHER, L.J. & HAMBURGER, S.A. Inhibition of insulin secretion from isolated pancreatic islets treated with dihydroxyfumarate. Fed. Proc 38: 528 - , 1979.

FISCHER, L.J. & HAMBURGER, S.A. Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxido dismutase, catalase and a metal chelator. Diabetes 29: 213 - 216, 1980a.

FISCHER, L.J. & HAMBURGER, S.A. Dimethyl ureia: A radical scavenger that protects isolated pancreatic islets from the effects of alloxan and D-hydroxyfumarate exposure. Life Sciences 26: 1405 - 1409, 1980 b.

FISCHER, L.J. & HARMAN, A.W. Oxygen free radicals and the diabetogenic action of alloxan. In "Pathology of Oxygen", Autor, A.P., Academic Press, New York, 1982, 261 - 273.

FUJII, S.; YAMAMOTO, A.; HAYAKAWA, M; KOH, H; NISHIOEDA, Y ; TSUSHIMA, M; NAMBU, S. & IKEDA, M. Effects of a new free radical scavenger, 2-animomethyl-4-tert - butyl -6-propio

mylphenol (ONO-3144), in two diabetic models. Biochem. Research. 6: 335 - 338, 1985.

GANDY, S.E.; BUSE, M.G.; SORENSON, J.R. J. & CROUSH, R.K.
Attenuation of streptozotocin diabetes with SOD-Like Copper
II (3,5-diisopropylsalicylate)₂ in rat. Diabetologia 24 :
437 - 440, 1983.

GOLD, G.; MANNING M.; HELDT A.; NOWLAIN, R; PETIT, J.R. & GRO
DSKY, G. Diabetes induced with multiple subdiabetogenic do
ses of streptozotocin. Lack of protection by exogenous su-
peroxide dismutase. Diabetes 30: 634 - 638, 1981.

GRANKVIST, K. & MARKLUND, S. Opposite effects of two metal -
chelator on alloxan - induced diabetes in mice. Life Sci-
ence 33: 2535 - 2540, 1983.

GRANKVIST, K.; MARKLUND, S.; SEHLIN, J. & TALJEDAL, I.B. Su-
peroxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl ra
dical protect against the toxic action of alloxan on pan-
creatic islet cell in vitro. Biochem. J. 182: 17 - 25, -
1979.

GRANKVIST, K.; MARKLUND, S. & TALJEDAL, I.B. Superoxide dis-
mutase is a prophylatic against alloxan diabetes. Nature
294: 158 - 160, 1981.

HARMMARSTROM, L. & ULBERG, S. Specific uptake of labelled al
loxan in the pancreatic islets. Nature 212: 708 - 709 ,
1966.

- HAYAISHI, O. & UEDA, K. Poly-(ADP - ribose) and ADP - ribosylation of proteins. Ann. Rev. Biochem. 46: 95 - 116, 1977.
- HEIKKILA, R.E. & CABBAT, F.S. Protection against alloxan-induced diabetes in mice by the hydroxyl radical scavenger dimethylurea. Europ. J. Pharmacol 52: 57-60, 1978.
- HEIKKILA, R.E. & CABBAT, F.S. Prevention of alloxan - induced diabetes in mice by the iron chelating agent DETAPAC. Fed. Proc 40: 741 - 1981.
- HEIKKILA, R.E.; CABBAT, F.S. & COHEN, G. In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate, J. Biol. Chem 251: 2182 - 2185, 1976.
- HEIKKILA, R.E.; WINSTON, B. & COHEN, G. Alloxan - induced diabetes. Evidence for hydroxyl radical as a cytotoxic intermediate. Biochem Pharmacol 25: 1085 - 1092, 1976.
- HENQUIM, J. C. & LAMBERT, A.E. Cationic environment and dynamics of insulin secretion II. Effect of high concentration of potassium. Diabetes 23: 933 - 942, 1974.
- HENQUIM, J.C.; MALVAUX, P. & LAMBERT, A.E. Alloxan - induced alteration of insulin release, rubidium efflux and glucose metabolism in rats islets stimulated by various secretagogues. Diabetologia 16: 253 - 260, 1979.
- HERR, R.R.; JAHNKE, H.K. & ARGOUDELIS, A.D. The structure of streptozotocin. J. Am. Chem. Soc. 89: 4808 - 4809, 1967.

- HAYAISHI, O. & UEDA, K. Poly-(ADP - ribose) and ADP - ribosylation of proteins. Ann. Rev. Biochem. 46: 95 - 116, 1977.
- HEIKKILA, R.E. & CABBAT, F.S. Protection against alloxan-induced diabetes in mice by the hydroxyl radical scavenger dimethylurea. Europ. J. Pharmacol 52: 57-60, 1978.
- HEIKKILA, R.E. & CABBAT, F.S. Prevention of alloxan - induced diabetes in mice by the iron chelating agent DETAPAC. Fed. Proc 40: 741 - 1981.
- HEIKKILA, R.E.; CABBAT, F.S. & COHEN, G. In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate, J. Biol. Chem 251: 2182 - 2185, 1976.
- HEIKKILA, R.E.; WINSTON, B. & COHEN, G. Alloxan - induced - diabetes. Evidence for hydroxyl radical as a cytotoxic intermediate. Biochem Pharmacol 25: 1085 - 1092, 1976.
- HENQUIM, J. C. & LAMBERT, A.E. Cationic environment and dynamics of insulin secretion II. Effect of high concentration of potassium. Diabetes 23: 933 - 942, 1974.
- HENQUIM, J.C.; MALVAUX, P. & LAMBERT, A.E. Alloxan - induced alteration of insulin release, rubidium efflux and glucose metabolism in rats islets stimulated by various secretagogues. Diabetologia 16: 253 - 260, 1979.
- HERR, R.R.; JAHNKE, H.K. & ARGOUDELIS, A.D. The structure of streptozotocin. J. Am. Chem. Soc. 89: 4808 - 4809, 1967.

- HO, C-K. & HASHM, S.A. Pyridine nucleotide depletion in pancreatic islets with streptozotocin - induced diabetes Diabetes 21: 789 - 793, 1972.
- HOFTIEZER, V. & CARPENTER, A.M. Comparasion of streptozotocin and alloxan - induced diabetes in the rat, including - volumetric quantitation of the pancreatic islets. Diabetologia 9: 178 - 184, 1973.
- IDAHL, L.A.; LERNMARK, A.; SEHLIN, J. & TALJEDAL, I.B. Alloxan citotoxicity in vitro: Inhibition of rubidium ion - pumping in pancreatic B-cells. Biochem. J. 162: 9-18, 1977.
- JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; ORCI, L.; PIETET, R; GONET, A.E. & RENOLD, A.E. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126: 201 - 205, 1967.
- LACY, P.E. & KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes 16: 35-39, 1967.
- LAZARUS, S.S. & SHAPIRO, S.H. Influence of nicotinamide and pyridine nucleotides on streptozotocin and alloxan - induced pancreatic B-cell citotoxicity. Diabetes 22: 499-506, 1973.
- MALAISSÉ, W. J.; MALAISSÉ - LAGAE, F.; SENER, A. & PIPELEERS, D.G. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic cell B. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 927 -

930, 1982.

MALAISSSE-LAGAE, F.; SENER, A. & MALAISSSE, W.J. Contrasting - modes of action of D-glucose and 3-O-methyl D-glucose as protectors of the rat pancreatic B-cell against alloxan. Biochem Biophys Acta 762: 36-43, 1983.

MASIELLO, P.; CUBEDDU, T.L.; FROSINA, G. & BERGAMINI, E. Protective effect of 3-aminobenzamide, and inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, against streptozotocin - induced diabetes. Diabetologia 28: 683 - 686, 1985.

MASIELLO, P.; DE PAOLI, A.A. & BERGAMINI, E. Age - dependent changes in the sensitivity of the rat to a diabetogenic agent (streptozotocin). Endocrinology 96 : 787 - 789 , 1975.

MASIELLO, P.; DE PAOLI, A.A. & BERGAMINI, E. Influence of age on the sensitivity of the rat to streptozotocin. Hormone Res. 11: 262 - 274, 1979.

MELLO-FILHO, A.C.; HOFFMANN, M.E. & MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. Biochem. J. 218: 273-275, 1984.

MENEHINI, R. & HOFFMANN, M.E. The damaging action of hydrogen peroxide on DNA of human fibroblasts is mediated by a nondialyzable compound. Biochem. Biophys. Acta. 608 : 167 - 173, 1980.

- MILNER, R.D.G. & HALES, C.N. The stimulation by potassium of insulin secretion from rabbit pancreas in vitro. Biochem. J. 105: 28, 1976.
- MORDES, J.P. & ROSSINI, A.A. Animals models of diabetes Amer. J. Med. 70: 353 - 360, 1981.
- MOSKALEWSKY, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. Gen. Comp. Endocrinol 5: 342 - 353, 1965.
- MOSSMAN, B.T.; IRELAND, C.M.; FILIPAK, M.; LE DOUX, S. AND WILSON, G.L. Comparative interactions of streptozotocin and chlorozotocin with DNA of an insulin - secreting cell line (RINr) Diabetologia 29: 186 - 191, 1986.
- NATIONAL DIABETES DATA GROUP, Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose - intolerance Diabetes 28: 1039 - 1057, 1979.
- NELSON, L. & BOQUIST, L. Effects of alloxan and streptozotocin transport in isolated mouse liver mitochondria. Cell. Calcium. 3: 91, 1982.
- OSHEROFF, M.R.; SCHAICH, K.M.; DREW, R.T. & BORG, D.C. Failure of desferrioxamine to modify the toxicity of paraquat in rats. J. Free Rad. Biol. Med. 1: 71-82 , 1985.
- OKAMOTO, H. Regulation of pro-insulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin - dependent diabetes Moll. Cell. Biochem. 37: 43 - 61, 1981.

- QUE, B.G.; DOWNEY, K.M.; SO, A.G. Degradation of deoxyribonucleic acid by a 1,10-phenantroline - copper complex: the role of hydroxyl radicals Biochem. 19: 5987-5991, 1981.
- RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. Pharmacol Rev. 22: 485 - 518, 1970.
- ROBBINS; M.J.; SHARP, R.A.; SLONIN, A.E.; BURR, I.M. Protection against streptozotocin induced diabetes by superoxide dismutase. Diabetologia 18: 55 - 58, 1980.
- ROSSINI, A.P.; ARCANGELI, M.A. & CAHILL, G.F. Studies of alloxan toxicity on the B cell Diabetes 24: 516 - 522, 1975.
- SANDLER, S. & ANDERSON, A. The partial protective effect of the hydroxyl radical scavenger dimethyl urea on streptozotocin - induced diabetes in the mouse in vivo and in vitro. Diabetologia 23: 374 - 378, 1982.
- SANDLER, S. & SWENNE, I. Streptozotocin but not alloxan induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. Diabetologia 25: 444 - 447, 1983.
- SANDLER, S.; WELSH, M. & ANDERSON, A. STZ - induced impairment of islet B-cell metabolism and its prevention by a hydroxyl radical scavenger and inhibitors of poly-(ADP-ribose)-synthetase. Acta Pharmacol Toxicol 53: 392 - 400, 1983.
- SANDLER, S. WELSH, M. & ANDERSON, A. Nicotinamide does not protect islet B-cell metabolism against alloxan toxicity Diabetes 33: 937 - 943, 1984.

- SCHEIN, P.S.; ALBERTI, K.G.M.M. & WILLIANASON, D.H. Effects - of streptozotocin on carbohydrate and lipid metabolism in the rat Endocrinology 89: 827 - 834, 1971.
- SCHEIN, P.S.; COONEY, D.A.; MC MENAMIN, M.G. & ANDERSSON, T. Streptozotocin - diabetes. Further studies on the mechanism of depression of nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mouse pancreatic islets and liver Biochem Pharmacol. 22: 2625 - 2631, 1973.
- SCHEIN, P.S. & LOFTUS, S. Streptozotocin depression of mouse pyridine nucleotides Cancer Res. 28: 1501 - 1505, 1968.
- SCHEYNIUS, A. & TALJEDAL, I.B. On the mechanism of glucose protection against alloxan toxicity Diabetologia 7: 252 - 255, 1971.
- SEHLIN, J. & TALJEDAL I.B. Transport of rubidium and sodium in pancreatic islets. J. Physiol. 242: 505 - 515, 1974.
- SLONIM, A.E.; SURBER, M.L.; PAGE, D.L.; SHARP, R.A.; BURR, I.M. Modification of chemically induced diabetes in rats by vitamin E. J. Clin. Invest. 71: 1282 - 1288, 1983.
- TAPPEL, A.L. Vitamin E and free radical peroxidation of lipids Ann NY Acad. Sci. 203: 12-38, 1972.
- TEPPERMAN, J. Fisiologia Endócrina e Metabólica. cap. 10 Editora Guanabara Koogan, 1977, 3^a edição pag. 187-222.
- UCHIGATA, Y.; YAMAMOTO, H; KAWAMURA, A. & OKAMOTO, H. Protec-

tion by SOD, catalase, and poly-(ADP - ribose)-synthetase - inhibitors against alloxan and streptozotocin - induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. J. Biol. Chem. 257: 6084 - 6088, 1982.

UCHIGATA, Y.; YAMAMOTO, H; NAGAI, H. & OKAMOTO, H. Effect of poly-(ADP - ribose)-synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islets pro-insulin synthesis. Diabetes 32: 311 - 318, 1983.

VAN HEMMER, J.J. & MEULING, W.J.A. Inactivation of biologically active DNA by γ ray-induced superoxide radicals and their dismutation products singlet molecular oxygen and hydrogen peroxide Biochem Biophys Acta. 402: 133 - 141 , 1975.

WATKINS, D.; COOPERSTEIN, S.J.; DIXTIT, P.K. & LAZAROW, A. Insulin secretion from toadfish islet tissue stimulated by pyridine nucleotides. Science 167: 283 - 284, 1968.

WATKINS, D. & COOPERSTEIN, S.J. Effect of alloxan on islet - tissue permeability protection and reversal by dithiols. J. Pharmacol Exp. Ther 199: 575 - 582, 1976.

WEAVER, D.C.; MC DANIEL, M.L; NABER, S.P.; BARRY, C.D. & LACY, P.E. Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat islets of Langerhans Diabetes 27: 1205 - 1214, 1978.

WHISH, W. J.D.; DAVIES, M.F. & SHALL, S. Stimulation of poly

(ADP-ribose)-polymerase activity by the anti-tumor antibiotic, streptozotocin. Biochem Biophys Res. Commun. 65: 722 - 730, 1975.

WILSON, G.L.; PATTON, N.J.; MC CORD, J.M.; MULLINS, D.W. & -
MOSSMAN, B.T. Mechanisms of streptozotocin and alloxan induced damage in rat B cells Diabetologia 27: 587 - 591 ,
1984.

YAMAMOTO, H. & OKAMOTO, H. Protection by picolinamide a novel inhibitor of poly-(ADP-ribose)-synthetase, against both - streptozotocin - induced depression of pro-insulin synthesis and reduction of NAD content in pancreatic islets. Biochem Biophys Res. Commun 95: 474 - 481, 1980.

YAMAMOTO, H; UCHIGATA, Y. & OKAMOTO, H. DNA strand breaks in - pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin. Biochem Biophys Res. Commum 103: 1014 - 1020, 1981a.

YAMAMOTO, H; UCHIGATA, Y. & OKAMOTO, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly-(ADP-ribose)-synthetase in pancreatic islets. Nature 294: 284 - 286 , 1981b.