

UNICAMP
BIBLIOTECA CENT.
SEÇÃO CIRCULANT

Universidade Estadual de Campinas

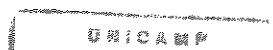
Francisco José Andreotti Prada

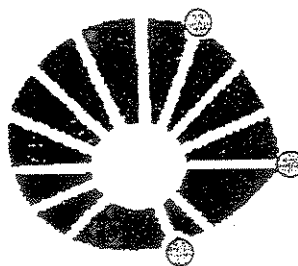
EFEITO DIABETOGENICO DA ALOXANA EM RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA

Tese submetida ao Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

CAMPINAS – SÃO PAULO

2000





UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Universidade Estadual de Campinas
Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
Campinas - SP

EFEITO DIABETOGENICO DA ALOXANA EM RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA

Francisco José Andreotti Prada

Orientador: Maria Alice Rostom de Mello

10000551

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a)
<i>Francisco José Andreotti Prada</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.

04/10/2000 *mar*

Tese submetida ao Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, como parte dos requisitos do curso de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia

CAMPINAS – SÃO PAULO
2000

UNIDADE	02
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	P881e
V.	Ex.
TOMBO BC/	40590
PRD.	2 F8100
C	☐
D	☒
PREÇO	811,00
DATA	18/03/00
N.º CPD	

CM-00137026-9

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

Prada, Francisco José Andreotti
P881e Efeito diabetogênico da aloxana em ratos submetidos à
 desnutrição protéica/Francisco José Andreotti Prada. --
 Campinas, SP: [s.n.], 2000.
 94f: ilus.

Orientadora: Maria Alice Rostom de Mello
 Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Diabetes. 2. Insulina-teste de tolerância. 3. Desnutrição
 protéica. I. Mello, Maria Alice Rostom de. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 04/01/2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Banca Examinadora:

Titulares:

Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello (orientador)



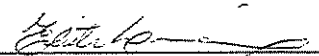
assinatura

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro



assinatura

Profa. Dra. Eliete Luiciano



assinatura

Suplente:

Prof. Dr. José Roberto Moreira de Azevedo



assinatura

Agradecimentos

Aos Prof(as). Dr.(as). Maria Alice Rostom de Mello e Everardo Magalhães Carneiro pelo apoio, orientação e confiança que depositaram em mim.

À Profa. Alba de Souza Brito pelo incentivo e pelo apoio dado durante o curso.

Aos professores Dr. Antônio Carlos Boschero, Dra. Helena Coutinho de Oliveira, Dr. José Roberto Moreira de Azevedo, Dr. Miguel Arcanjo Areas, Dr. Franchesco Langone, pela amizade, auxílio e sabedoria que transmitiram durante todo o curso e desenvolvimento do trabalho.

Ao Léscio, Sônia, Eduardo Custódio e José Roberto R. da Silva pela amizade, sinceridade e indispensável apoio técnico nas análises bioquímicas e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À Clarice Yoshiko Sibuya pelos ensinamentos, valioso auxílio e interesse pelo bom andamento de todo trabalho agradeço, e à estagiária Mirian pela ajuda dada aos tratamento dos animais.

À Profa., orientadora e, sobretudo amiga, Maria Alice Rostom de Mello, pela confiança, companheirismo e amizade, e claro pela cumplicidade em todo o trabalho.

Aos meus pais, meus genitores, por proporcionarem as condições fundamentais para que eu adquirisse o conhecimento acadêmico através da minha educação, ao mesmo tempo em que, pelo exemplo, possibilitaram que eu conquistasse algo: a audácia.

E a todos os amigos do Mestrado pelo companheirismo e cumplicidade em especial à Jairo, Alexandre, Carol, Claudinha e Davi. E a todos os colegas de

laboratório, e fora dele, Wagner, Juliano, Roberto, Ismael, Fabrício, Viviane, Esméria, Adriana e Andréa.

À todos que, de uma forma ou de outra, colaboram para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

***"Dedico à minha filha Marianna e à minha querida e amada esposa Adriana,
pela compreensão e amor dedicados durante o presente trabalho"***

RESUMO

A desnutrição infantil pode predispor ao diabetes em adultos, pois afeta a secreção de insulina e o metabolismo de carboidratos. Por outro lado estudos com ratos mostram que a desnutrição protéica pode atenuar a manifestação do diabetes aloxânico. O presente estudo tem como objetivo ampliar o conhecimento sobre os efeitos da ingestão crônica precoce da dieta hipoprotéica sobre a ação diabetogênica da aloxana, em modelo experimental. Foram utilizados ratos Wistar (21 dias), separados em 2 grupos, de acordo com a dieta recebida: controle (C)- dieta normo (17%) e desnutridos (D)- dieta hipo (6%) protéica, por 60 dias. Ao final, parte dos animais recebeu injeção de aloxana (40mg/kg,i.v.) para indução do diabetes. Foram avaliados *in vivo*: ganho de peso corporal, glicemia basal, insulinemia basal, ingestão hídrica, ingestão alimentar, incidência de diabetes (glicemia > 13,75 mM), área sob a curva de glicose (AG) e insulina (AI), taxa de remoção da glicose (KITT), insulina do soro e do pâncreas. Em ilhotas isoladas tratadas *in vitro* com aloxana verificamos: secreção de insulina estimulada por glicose e por arginina e oxidação de glicose. O ganho de peso foi maior nos animais D ($1,49 \pm 0,42$) do que nos C ($-0,57 \pm 0,72$ g). A glicemia basal foi menor nos D ($106,6 \pm 5,86$) que nos C ($351,6 \pm 49,7$ mg/dl) e a insulinemia semelhante nos 2 grupos (C= $0,80 \pm 0,10$; D= $1,05 \pm 0,12$ ng/ml). A ingestão hídrica foi maior no grupo C ($116,6 \pm 44,7$) do que no D ($81,9 \pm 14,7$ ml/kg), assim como a ingestão alimentar neste grupo (C= $95,4 \pm 44,1$; D= $47,2 \pm 16,9$ g/kg). A incidência de diabetes foi maior no C(84,6%) do que no D(25%). A insulina do pâncreas foi maior no grupo D ($36,52 \pm 11,88$) do que no grupo C ($12,05 \pm 4,65$ ng/mL). A AG após administração de aloxana foi maior no grupo C($41889,9 \pm 9264$) do que no grupo D($17858,2 \pm 2974,5$ mmol/L/120 min.), não havendo diferença significativa entre os AI de ambos os grupos (C = $83,3 \pm 13,6$ e D = $78,4 \pm 19,1$ mmol/L/120 min.). O tratamento com aloxana *in vitro* reduziu: (1) a liberação de insulina pelas ilhotas C (78%) e D (47%), estimuladas por glicose 22.0 mM; (2) a oxidação de glicose pelas ilhotas C

(53%) e D (33%) na presença de glicose 16.7 mM e (3) a liberação de insulina pelas ilhotas C (53%) e D (33%) estimuladas por arginina (20.0 mM). Este resultados sugerem que a restrição protéica precoce atenuou a severidade do diabetes manifestado pelos animais em consequência de adaptações tanto no processo secretório de insulina pelas ilhotas pancreáticas quanto na ação periférica do hormônio.

ABSTRACT

In the present study we examined the effect of protein dietary level on pancreatic function evaluated by measurements, of serum glucose levels in the fed state, serum glucose and insulin levels during an oral glucose tolerance test, and serum glucose levels during a subcutaneous insulin tolerance test performed after administration of a single endovenous, dose of alloxan to rats fed a low (6%) or a normo (17%) protein. In a separate set of experiments, we examined insulin release in response to glucose and arginine and glucose oxidation rates in pancreatic islets treated "in vitro" with alloxan, isolated from rats fed the low and the normo protein diets. After alloxan administration the incidence of mild hyperglycemia in the fed state (diabetes) was higher among rats fed normo protein diet than among those fed low protein diet. After glucose load the area under serum glucose curve (AG) was lower in low protein rats than in normal protein rats, while there were no differences between the two groups in the area under serum insulin curve (AI). In addition, after an insulin load, the serum glucose disappearance rate (KITT) was higher in lower protein than in normal protein rats. Alloxan induced significant decrease in glucose oxidation and in glucose induced and arginine induced insulin release by islets isolated from normal and low protein rats. The decrease in both insulin release and glucose oxidation was greater in normo than in low protein rat islets. In summary, alloxan was less effective in producing hyperglycemia (diabetes) in rats fed low protein diet than normo protein diet. This protection was associated to an increased peripheral sensibility to insulin action and a better preservation of glucose oxidation and glucose induced insulin release by pancreatic islets exposed to alloxan in protein restricted than in normal protein rats.

1. INTRODUÇÃO

O quadro de diabetes mellitus insulino dependente (DMID) é caracterizado basicamente por uma resposta secretória deficiente de insulina acompanhada de hiperglicemia. No diabetes mellitus não insulino dependente (DMNID), a intolerância à glicose ocorre devido a uma alteração primária na secreção de insulina, a qual é retardada e/ou insuficiente em relação a sobrecarga de glicose ou reside na incapacidade dos tecidos periféricos de responderem à insulina, isto é, uma resistência à insulina (RASMUSSEN et al., 1990).

Estudos indicam que a desnutrição protéico-calórica (DPC) pode induzir ao desenvolvimento do diabetes mellitus em adultos. A desnutrição afeta o metabolismo de carboidratos produzindo uma intolerância à glicose associada a uma menor secreção de insulina em resposta ao estímulo glicêmico (DAHRI, 1991; SNOECK, 1990).

Paradoxalmente, constatou-se que ratos adaptados a dietas contendo teor protéico baixo mostraram resistência à ação diabetogênica a uma dose única de aloxana, apresentando melhor tolerância à glicose em comparação a ratos mantidos com dieta normoprotéica. As razões que determinam tal “proteção” contra os efeitos tóxicos da aloxana não são conhecidos (DIXIT, 1985).

Estudos com ilhotas pancreáticas isoladas de roedores indicam que as mesmas podem desencadear mecanismos de defesa eficientes em repostas a injúrias não letais (EIZIRIK et al., 1993). Uma das indicações para a presença de mecanismo de reparo nas células B foi a observação de que ratos injetados com streptozotocina e alimentados posteriormente com dieta hiperprotéica por 14 dias apresentaram um aumento de 20 vezes no conteúdo pancreático de insulina, recuperação da morfologia normal das ilhotas e recuperação mais rápida do estado diabético (EIRIZIK & MIGLIORINI, 1984). Baseados nessas informações, os autores sugeriram que “alterações metabólicas induzidas pela dieta hiperprotéica sobre as células B de alguma forma ativam mecanismos de reparo celular”. Achados subsequentes em estudos “in vitro” mostraram que células B dispersas (PIPELEERS, 1986) ou ilhotas pancreáticas (EIRIZIK, 1989) eram capazes de recuperarem-se e recobram sua função após diferentes tipos de lesões. Além disso ilhotas isoladas de camundongos NOD (roedores

usados como modelo, de diabetes insulino dependente), no período pré-diabético apresentam secreção de insulina normal quando postas em cultura (STRANDELL et al., 1990). Tais respostas a injúrias não letais parecem estar associadas a aumento de "proteína de choque térmico 70" (HSP70) e heme oxidase. Aumento da expressão de HSP70 e heme oxidase são respostas ao estresse bem caracterizadas em células eucariontes (WELCH, 1992). HSP70 é uma proteína de choque térmico altamente prevalente, que pode ser induzida em ilhotas pancreáticas por estresse térmico (WELSH et al., 1988), streptozotocina (EIRIZIK et al., 1990) e interleucina 1- β (IL-1 β) (EIRIZIK et al., 1990).

Dados anteriores de nosso laboratório mostraram que ratos desnutridos por ingestão de dieta hipoprotéica apresentam comprometimento da secreção de insulina induzida por glicose, associada a redução do influxo de cálcio nas mesmas, (CARNEIRO et al., 1995), sugerindo injúria às células β . Por outro lado esses ratos adaptados à dieta hipoprotéica mostram proteção parcial contra os efeitos diabetogênicos da aloxana "in vivo", indicada por menor índice de indução de diabetes pela administração de aloxana e valores glicêmicos basais e durante o teste de tolerância à glicose, mais baixos em relação a animais mantidos com dieta balanceada (MELLO & LUCIANO, 1995).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desnutrição protéica e metabolismo glicídico

Níveis glicêmicos baixos são constantemente observados em seres humanos e em animais de laboratório desnutridos (WHITEHEAD & HARLAND, 1966; TRINDADE et al., 1986; VITERI & CHEW, 1994; RAO, 1995a,b).

Para explicar os baixos níveis glicêmicos, tanto a absorção inadequada quanto a deficiência no processo de glicogenólise podem ser citadas (TRINDADE et al., 1986; VITERI & CHEW, 1994). Em modelo animal de restrição calórica (60%), RAO (1995(a)), constatou hipoglicemia, atribuindo estes resultados a uma secreção de glucagon diminuída.

Em testes de tolerância oral à glicose, observa-se no kwashiorkor e no marasmo, curva glicêmica achatada e prolongada, ou seja, níveis glicêmicos mais baixos e tempo bastante prolongado em que esse nível se mantém acima dos níveis de jejum. Esse comportamento sugere deficiência de absorção de glicose por via oral, redução na quantidade de insulina liberada pelo pâncreas, ou ainda, resistência à ação periférica de insulina (TRINDADE et al., 1986). Por outro lado, em ratos mantidos com dieta hipoprotéica constatou-se aumento da sensibilidade à insulina, em consequência de aumento do processo de sinalização celular do hormônio (REIS et al., 1997; LATORRACA et al., 1998).

Outra anormalidade no metabolismo dos carboidratos em trabalhos realizados com porcos alimentados com dieta hipoprotéica, foi encontrada por HEARD (1977); TRINDADE et al. (1986) e HEARD (1978), que evidenciaram acúmulo de glicogênio hepático, atribuído à menor atividade da enzima glicose-6-fosfatase.

OKITOLONDA, et al. (1987); CLAEYSSSENS, et al. (1990); CARNEIRO, et al. (1995), em estudo realizados com ratos mantidos com dieta pobre em proteína, constataram concentrações elevadas de glicogênio hepático. Resultados semelhantes foram relatados anteriormente em crianças portadoras de kwashiorkor (ALLEYNE & SCULLARD, 1969; TRINDADE et al., 1986); CLAEYSSSENS et al., 1990). Os diversos

autores atribuíram tal resultado, pelo menos em parte , à ingestão de dieta com alto teor de carboidratos.

Em contrapartida, o glicogênio muscular no desnutrido encontra-se baixo, correlacionando-se com a baixa concentração de potássio. Na recuperação nutricional, os níveis de glicogênio muscular aumentam, normalizando-se em pacientes totalmente recuperados (ALLEYNE & SCULARD, 1969; TRINDADE et al., 1986).

2.2. Desnutrição protéica e secreção de insulina

A secreção de insulina pelas células B das ilhotas pancreáticas é modulada por nutrientes, neuro-transmissores e hormônios peptídicos (HADESKOV, 1980).

A glicose, principal estimulante fisiológico da secreção de insulina é transportada para dentro das células B através do transportador GLUT-2, é fosforilada pela glicoquinase e sofre oxidação (THORENS et al., 1988; MEGLASSON & MATSCHINSKY, 1984). Isto leva ao aumento da razão ATP/ADP citosólica, o que bloqueia canais de K⁺ ATP-sensíveis na membrana plasmática (COOK & HALES, 1984; BOSCHERO, 1996), que por sua vez, promove a abertura de canais de Ca²⁺ voltagem dependentes (VALDEOMILLOS et al., 1992; BOSCHERO, 1996). Como consequência, ocorre influxo de Ca²⁺, aumento do Ca²⁺ citosólico e ativação do mecanismo celular composto por microtúbulos, miofilamentos e membrana plasmática, desencadeando a extrusão dos grânulos contendo insulina para o líquido intersticial (SOMERS, 1979; BOSCHERO, 1996).

A desnutrição em seres humanos e outros mamíferos encontra-se associada à redução da secreção de insulina (MILNER, 1971; CARNEIRO, 1995). Em ilhotas pancreáticas de ratos submetidos à desnutrição protéica durante a fase de crescimento, observou-se redução severa da secreção de insulina em resposta à glicose e outros secretagogos (CARNEIRO et al., 1995; OKITOLONDA et al., 1987; REIS et al., 1997; LATORRACA et al., 1998) e comprometimento na homeostase do íon cálcio (CARNEIRO et al., 1995; LATORRACA et al. 1998).

2.3. Desnutrição protéica e Diabetes Experimental

De acordo com a literatura, a aloxana é pouco eficiente em induzir diabetes em ratos com deficiência protéica. DIXIT & KAUNG (1985) sugeriram que glicose e aloxana competem por um sítio comum ou adjacente na membrana da célula beta. Isso porque, quando a glicose é administrada anteriormente ao tratamento com aloxana, os animais apresentam uma proteção contra a droga (MALAISSE et al., 1981), por outro lado, SCHEYNIUS & TÄLJEDAL, (1971) em estudo realizado com camundongos para avaliar os efeitos moderadores de alguns carboidratos sobre a diabetogenicidade da aloxana, concluíram que, aloxana e glicose não competem por um sítio comum na membrana da célula beta. Sugeriram que a proteção contra a toxicidade da aloxana poderia ser o resultado de uma mudança conformacional nas proteínas de membrana induzida pela glicose, ou por seu transportador ou, ainda, pelo seu metabolismo.

Diferentes estudos com ratos alimentados com dietas pobres em proteínas foram realizados para avaliar a secreção de insulina pelas células beta do pâncreas e o efeito da aloxana nos mesmos. Em um desses estudos (DIXIT & KAUNG, 1985) foi utilizado um protocolo com dietas contendo concentrações crescentes de proteína. Os resultados indicam que, conforme a concentração de proteína aumenta de 4% até 20%, a eficiência da aloxana em induzir diabetes nos animais aumenta de 0% até 100%. Assim, diversos autores (DIXIT & KAUNG, 1985; YOUNG & DIXIT, 1980; YOUNOSZAI & DIXIT, 1980) concluíram que a DPC causa alterações na membrana da célula beta, bem como mudanças metabólicas que protegem contra a ação da aloxana. MELLO & LUCIANO (1995), contudo, concluíram que ratos alimentados com dieta contendo 6% de proteína tiveram proteção somente parcial contra a toxicidade da aloxana, uma vez que, os ratos desnutridos apresentaram intolerância à sobrecarga oral de glicose.

3. OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo ampliar o conhecimento sobre os efeitos da ingestão crônica prévia de dieta hipoprotéica sobre a redução da ação tóxica da aloxana às ilhotas pancreáticas "in vivo" e "in vitro", em modelo experimental utilizando ratos. Para atingir esse objetivo foram efetuados, "in vivo", testes de tolerância à glicose e à insulina em animais tratados com aloxana e "in vitro" foram avaliadas a secreção de insulina induzida por glicose e arginina e taxa de oxidação de glicose por ilhotas pancreáticas isoladas incubadas na presença de aloxana.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais e dietas

Foram utilizados ratos recém-desmamados (21 dias de idade) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - Botucatu/SP. Os ratos foram mantidos em gaiolas de polietileno medindo 37,0 x 31,0 x 16,0 cm (5 animais por gaiola), sob condições controladas de umidade, temperatura, ciclo claro/escuro (12h/12h), tendo livre acesso à água e as respectivas dietas durante todo o experimento.

As dietas, cujas composições encontram-se descritas nos quadros 1, 2 e 3 foram preparadas no Laboratório de Biodinâmica, Departamento de Educação Física de Instituto de Biociências da Unesp, Campus de Rio Claro - SP. A composição das misturas de sais e vitaminas utilizadas nessas dietas encontram-se nos quadros 2 e 3.

Quadro 1 – composição das dietas

Componentes	Normo protéica**	Hipoprotéica***
	(17% proteína) (g/Kg)	(6% proteína) (g/Kg)
Caseína (84% proteína)*	202	71,5
Amido de Milho	397	480
Dextrina de Milho	130,5	159
Sacarose	100	121
L-Cistina	3	1
Óleo de Soja	70	70
Mistura de Sais	35	35
Mistura de Vitaminas	10	10
Microcelulose	50	50
Cloridrato de colina	2,5	2,5

* Valores corrigidos em função do conteúdo de proteína na caseína.

** Dieta para fase de crescimento, gravidez e lactação de roedores – AIN – 93G (REEVES, 1993).

***Dieta para indução de quadro de desnutrição. (LATORRACA et al., 1998)

Quadro 2 - Composição da Mistura de Vitaminas*

Componentes	g /Kg
Vitamina A + D2(500,000 UI A/50.000 UI D2	0,60
Vitamina E (500 UI/g)	20,00
Vitamina K	0,50
Tiamina HCl	1,00
Riboflavina	2,00
Niacina	5,00
Vitamina C	2,00
Piridoxina	1,02
Ác. p – aminobenzóico	10,00
Biotina	0,5
Pantotenato de Cálcio	0,20
Inositol	20,00
Vitamina B 12	0,005
Sacarose qsp	1 Kg

* De acordo com AIN – 93G (REEVES, 1993).

Quadro 3 – Composição da Mistura de Sais*

Componente	g/kg
Carbonato de Cálcio	357
Fosfato de Potássio	196
Citrato de Potássio	70,78
Cloreto de Sódio	74
Ácido Bórico	0,0815
Carbonato de Níquel	0,0318
Floreto de Sódio	0,0635
Citrato de Ferro	6,23
Sulfato de Cobre	1,52
Cloreto de Zinco	0,20
Sulfato de Manganês Monoidratado	1,21
Iodeto de Potássio	0,005
Molibdato de amônio Tetraidratado	0,015
Selenito de Sódio pentaidratado	0,015

* De acordo com AIN – 93G (REEVES, 1993).

4.2. Procedimentos experimentais

Os animais foram, inicialmente, separados em 2 grupos experimentais, de acordo com a dieta recebida:

- controle - animais alimentados com dieta normoprotéica por 60 dias;
- desnutrido - animais alimentados com dieta hipoprotéica por 60 dias.

Durante este período foram registrados duas vezes por semana peso corporal e quantidade de alimentos e água ingeridos. Ao final, metade dos animais recebeu injeção de aloxana visando indução do diabetes, passando a compor 4 grupos:

- ◆ Controle: animais alimentados com dieta normoprotéica que não receberam aloxana;
- ◆ Desnutrido: animais alimentados com dieta hipoprotéica que não receberam aloxana;
- ◆ Controle Aloxana: animais alimentados com dieta normoprotéica injetados com aloxana;
- ◆ Desnutrido Aloxana: animais alimentados com dieta hipoprotéica injetados com aloxana.

Decorrida uma semana, parte dos animais foi submetida a provas de função do pâncreas endócrino (testes de tolerância à glicose oral e teste de tolerância à insulina). Três dias após os testes os animais foram sacrificados para determinação de parâmetros bioquímicos visando avaliar a severidade do diabetes induzido pela aloxana. Animais que não receberam aloxana, dos grupos controle e desnutrido tiveram suas ilhotas pancreáticas isoladas e submetidas ao tratamento com a droga “in vitro”, sendo avaliadas, em seguida, secreção de insulina frente a concentrações crescentes de glicose e a arginina, bem como a taxa de oxidação da glicose pelas mesmas.

4.3. Avaliações “in vivo”

4.3.1. Avaliação do estado nutricional

A avaliação do estado nutricional dos animais foi efetuada com base no ganho de peso no período experimental que antecedeu à administração de aloxana bem como na determinação dos teores séricos de, ácidos graxos livres, proteínas totais e albumina, no estado alimentado, efetuada em amostras de sangue (400 µL) coletadas, através de corte na extremidade distal da cauda, no dia anterior à administração da aloxana.

4.3.2. Tratamento com aloxana

Para obtenção do diabetes experimental, os ratos depois de permanecerem 24 horas em jejum, foram anestesiados moderadamente por inalação com éter etílico para receberem aloxana (40 mg/Kg de peso corporal), dissolvida em tampão citrato 0,01 M, pH 4,5 e injetada na veia dorsal do pênis.

A comprovação do diabetes foi realizada 48 horas após a administração de aloxana, através de determinação dos níveis glicêmicos.

4.3.3. Avaliação da severidade do diabetes

Foi registrada a proporção de animais injetados com aloxana que se tornaram diabéticos em cada grupo. Foram considerados diabéticos aqueles que apresentaram glicemia basal no estado alimentado $\geq 13,75$ mM (LUCIANO, 1996; LUCIANO et al., 1997). A severidade do diabetes induzido foi avaliado pelas seguintes determinações: glicemia no estado alimentado, insulinemia no estado alimentado, teores de insulina no pâncreas, ingestão hídrica, ingestão alimentar, e provas de função do pâncreas endócrino.

4.3.4. Provas de função do pâncreas endócrino

4.3.4.1. Testes de tolerância à glicose (GTT)

Foi realizado após cerca de 15 horas de jejum. Os ratos foram moderadamente anestesiados com éter etílico e a primeira coleta de sangue da cauda foi realizada correspondendo ao tempo zero (0). Em seguida, uma sonda gástrica de polietileno foi introduzida até o estômago por via oral e uma solução de glicose a 20% (2 g/kg de peso corporal) foi administrada. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 30, 90 e 120 minutos, após a administração de glicose, em capilares heparinizados e calibrados para determinação da glicemia (25 μ L) e da insulinemia (75 μ L). As respostas glicêmicas e insulinêmicas durante o GTT foram calculadas através de estimativa da área total sob a curva de glicose (AG) e da insulina (AI), respectivamente, pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990).

4.3.4.2. Teste de tolerância à insulina (ITT)

Foi realizado utilizando-se o mesmo procedimento adotado no teste de tolerância à glicose oral quanto ao tempo de jejum, anestesia, e quanto ao local da coleta de sangue.

Foi injetada na região dorsal via subcutânea, insulina mista regular purificada na concentração de 30 mU/100g de peso corporal. Amostras de sangue (25 μ L) foram obtidas nos tempos 0, 30, 60, 120 e 180 minutos para determinação da glicemia. A taxa de remoção da glicose sérica (KITT) foi calculada usando a fórmula $0,693/T^{1/2}$. A análise dos mínimos quadrados das concentrações de glicose sérica obtidos 0 - 60 minutos após a administração da insulina, quando as referidas concentrações decaíram linearmente (LUNDBAEK, 1962).

4.3.5. Conteúdo pancreático de insulina

Os animais foram sacrificados por decapitação e o pâncreas retirado imediatamente e colocado em 10 ml de solução extratora (15 ml de HCL e 985 ml de

etanol a 75%). Logo após, os pâncreas foram homogeneizados em gelo e centrifugados a 0°C durante 15 min. O sobrenadante foi coletado e seu pH corrigido para 8,5. Centrifugou-se novamente e armazenou-se o sobrenadante a -20 °C para posterior dosagem de insulina.

4.4. Experimentos “in vitro”

4.4.1. Isolamento das ilhotas pancreáticas

Foi utilizada a técnica da colagenase, descrita por MOSKALEWIKI (1965), modificada por LACY & KOSTIANOVSKY (1967), e, adaptada posteriormente por BOSCHERO et al., (1980).

Os animais foram sacrificados por decapitação e laparomizados. O pâncreas foi retirado e os nódulos linfáticos e a gordura foi extraído. O tecido pancreático foi transferido para um Becker de 5 ml e fragmentado com o auxílio de uma tesoura.

Os fragmentos de pâncreas foram transferidos para um tubo de ensaio contendo cerca de 3 ml de solução de Hanks (ver quadro 4) enriquecida com glicose e 7 mg de colagenase, sendo incubados em banho-maria a 37° C por 15 minutos. Após a incubação conteúdo foi agitado intensamente (agitação manual) por cerca de 1 minuto.

Em seguida, o material foi lavado sucessivamente com solução de Hanks para diluir a solução enzimática e paralisar a digestão. Com as decantações entre as lavagens foi possível eliminar grande parte do tecido exócrino e facilitar a coleta das ilhotas. O material foi transferido para placa de Petri, e as ilhotas coletadas sob lupa, com o auxílio de uma pipeta Pasteur siliconizada e previamente estirada em bico de Bunsen.

4.4.2. Secreção de Insulina estimulada por glicose e arginina

Após o isolamento, grupos de 200-300 ilhotas foram transferidos para placas de PETRI e pré-incubadas na presença de glicose 5,6 mM, em meio Krebs-Ringer-Bicarbonato, por 60 minutos, na presença ou ausência de aloxana (0,5 mM) a 37°C. Decorrido esse período, o meio de incubação foi descartado, grupos de 5 ilhotas foram transferidos para placas de WELLS, adicionando às ilhotas nova solução de Krebs contendo glicose (2,8 ou 22,0 mM) ou glicose mais arginina (2,8 e 20,0 mM, respectivamente) e as ilhotas foram incubadas por mais 60 minutos. Ao final, alíquotas do meio de incubação foram coletadas para a determinação do teor de insulina.

4.4.3. Oxidação da glicose

Após isolamento, grupo de 15 ilhotas foram transferidos para ependorffs e submetidos à incubação com 5,6 mM de glicose em meio Krebs-Ringer-Bicarbonato por 60 minutos, na ausência ou presença de aloxana (0,5 mM), a 37°C. Em seguida, o meio de incubação foi descartado e adicionou-se às ilhotas, nova solução de Krebs com glicose na concentração de 16,7 mM, contendo traços de [U¹⁴C] glicose. Os ependorffs foram colocados dentro de frascos de cintilação de vidro bem vedados com tampa de borracha. Adicionou-se mistura gasosa contendo 95% - O₂ e 5% CO₂ ao sistema e as ilhotas foram incubadas por mais 120 minutos. Em seguida, acrescentou-se 250 µL de hyamina no frasco de cintilação (sem abri-lo) e 100 µL de HCl 0,1 N nos ependorffs contendo as ilhotas. Após incubação por mais 60 minutos sob agitação, os frascos de cintilação foram abertos, e foram retirados os ependorffs com as ilhotas. Aos frascos de cintilação foram adicionados 6 ml de líquido de cintilação e foi efetuada a contagem da radioatividade em contador de partículas Beta (CARNEIRO, 1995).

4.5. Dosagens Bioquímicas

4.5.1. Glicose Sérica

Foi determinada imediatamente após a obtenção do soro pelo método enzimático da glicose oxidase-peroxidase. A 500 μ L de reativo contendo fenol 2,5 mM, 4 (p-benzoquinona monoimino) fenazona 1,14 mM, tampão Tris 0,04 mM, glicose-oxidase 2,7 U/ml e peroxidase 0,33 U/ml foram adicionados 20 μ L de soro diluído. Após 15 minutos de incubação em banho a 37° C, a absorbância das amostras e do padrão foi lida em espectrofotômetro a 505 nm (NOGUEIRA et al.,1990).

4.5.2. Proteínas séricas totais

Foi determinada pelo método do reagente de biureto (sulfato de cobre a 10%), que utiliza a presença de íons cobre em meio alcalino reagindo com as ligações peptídicas das proteínas, dando origem a um complexo de cor violeta, portanto, proporcional ao teor de proteínas. Os valores das amostras foram obtidos adicionando 100 μ L de soro diluído, 500 μ L de reagente biureto. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 550 nm, e as concentrações foram obtidas contra curva de calibração de proteínas totais (HENRY, 1974).

4.5.3. Albumina sérica

Foi determinada pelo método colorimétrico do verde de bromocresol. Foi adicionado 50 μ L de soro diluído, 200 μ L de reagente de cor e 1000 μ L de água destilada. As absorbâncias das amostras foram lidas a 610 nm, e as concentrações determinadas contra curva de calibração de albumina (DOUMAS et al.,1971).

4.5.4. Ácidos Graxos Livres (AGL) Séricos

Para determinação deste substrato, foram adicionados em 0,3 ml de soro, 7 ml da mistura solvente clorofórmio, heptano e metanol, na proporção de 28:21:1, seguida

de forte agitação e centrifugação a 700 xg por um período de 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e a ele adicionado uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 M, trietanolamina 0,10 M, NaOH 0,035 N e NaCl 35% a pH 8,1, seguido de nova agitação e centrifugação. A 3,0 ml de sobrenadante foi adicionado 0,5 ml de solução de dietilditiocarbamato de sódio (1 mg/ml de butanol secundário). A concentração de A.G.L. foi medida a 435 nm contra curva de calibração de ácido palmítico (REGOW et al., 1986).

4.5.5. Insulina sérica, pancreática e no meio de incubação

A concentração sérica e o conteúdo pancreático e nos meios de incubação de insulina, foi determinado por radioimunoensaio (HERBERT et al., 1965). Para tanto se usou 0,1 ml das amostras desconhecidas de insulina (em duplicata) as quais receberam a seguir 0,2 ml de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com ^{125}I (traçador) em tampão fosfato pH 7.4 acrescido de NaCl 0,9% e albumina 0,5%. Em seguida foi preparado o seguinte controle:

- a) 3 tubos (Totais) que recebeu somente 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I para averiguação da radiação máxima.
- b) 3 tubos (Ligação não específica) contendo 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e 0,1 ml de tampão fosfato, para determinação de possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão.
- c) 3 tubos (REF) contendo 0,2 ml de solução do tampão fosfato contendo insulina marcada com (^{125}I) e anticorpo anti-insulina e 0,1 ml de tampão fosfato constituindo assim o zero de insulina conhecida da curva padrão.

Em seguida preparamos, também em triplicata, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0,1 ml de insulina conhecida nas seguintes concentrações: 0,02, 0,039, 0,078, 0,16, 0,31, 0,63, 1,25, 2,5 e 5 ng/ml. Cada tubo dessa série acima, recebeu também 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e anticorpo anti-insulina. Finda a preparação dos tubos (amostras, controle e curva padrão), os tubos foram agitados em vortex e estocados em baixa temperatura (4°C) durante 48 horas.

Após este período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, todos os outros tubos receberam 0,2 ml de uma solução contendo 2,5% de carvão (Norit A) e 0,5% de albumina e 0,25% de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso durante 30 min e a seguir, centrifugados durante 20 min a 2800 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo avaliada em contador de radiação gama.

4.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão e analisados através de teste t-Student ou análise de variância (ANOVA) de uma entrada, seguida por teste de Bonferroni, onde apropriado. Os resultados referentes à incidência de diabetes foram expressos em porcentagem do número total de animais tratados com aloxana e analisados através de teste de comparação de duas proporções. Em todos os casos, o nível de significância foi pré-fixado em 5%.

5 – RESULTADOS

1. Avaliações "in vivo"

A Tabela 1 mostra os valores encontrados para, proteínas totais, albumina e ácidos graxos livres dos animais dos grupos controle e desnutridos, antes da administração de aloxana. Os animais desnutridos mostraram teores de proteínas totais e albumina inferiores e de ácidos graxos livres superiores aos dos controle.

Tabela 1 – Teores Séricos de ácidos graxos livres (AGLs $\mu\text{Eq/L}$), proteínas totais (g/L), albumina (g/L) no soro dos ratos controle e desnutrido, no estado alimentado, antes da administração da aloxana.

Grupos	AGL	Proteínas Totais	Albumina
Controle	$580,0 \pm 15,0$	$0,62 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,01$
Desnutrido	$650,4 \pm 17,0$ *	$0,43 \pm 0,02$ *	$0,21 \pm 0,01$ *

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 25 animais por grupo.

(*) Diferença significativa ($P < 0,05$, test-t) em relação ao controle.

Os resultados referentes ao ganho de peso dos animais durante o experimento encontram-se na Figura 1. Antes da administração da aloxana, o ganho de peso dos animais desnutridos foi menor que aquele dos controles. Após administração da aloxana os ratos do grupo controle mostraram perda de peso, ao passo que os do grupo desnutridos ao contrário, ganharam peso de maneira significativa.

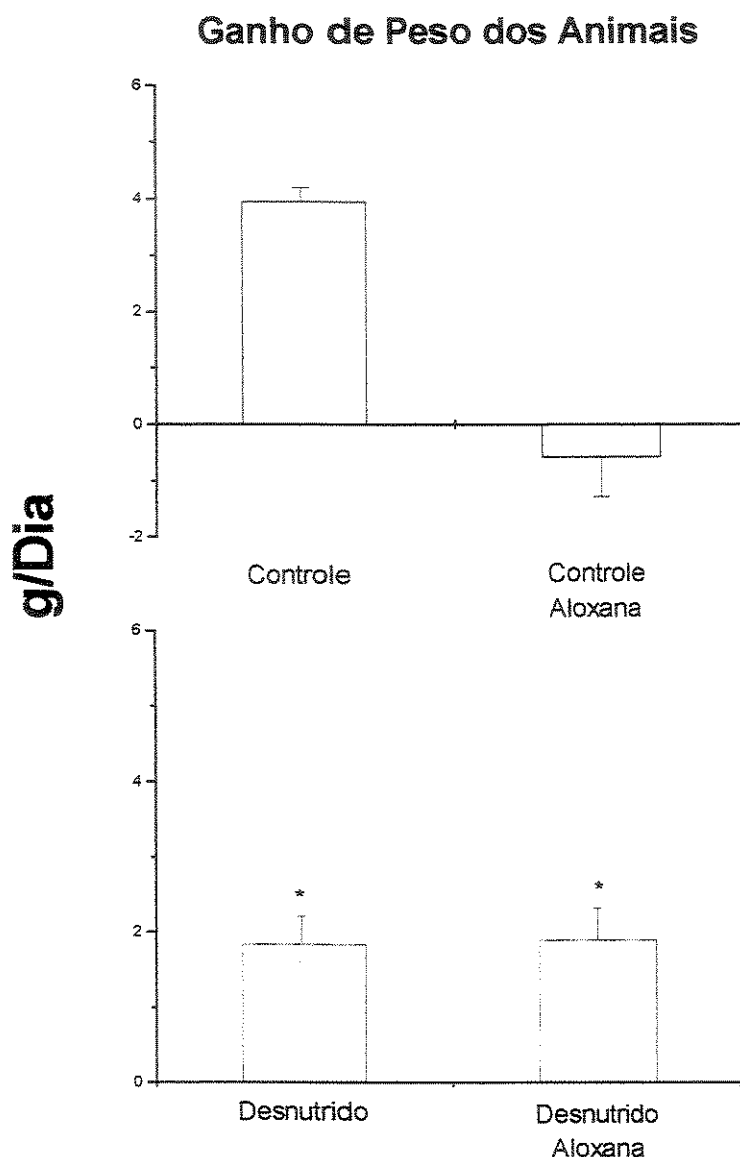


Figura 1 – Ganho de Peso dos animais antes e depois da administração da aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 25 animais por grupo. (*) diferença significativa ($P < 0,05$, teste-t) em relação ao controle correspondente. Os resultados utilizados para a confecção do gráfico encontram-se na Tabela 1 do Apêndice 1.

Antes da administração de aloxana os animais desnutridos ingeriam maior quantidade de alimento que os controles (Figura 2) enquanto que após a administração da aloxana os ratos controle aumentaram a ingestão e os desnutridos, diminuíram-na (Figura 2). A ingestão hídrica dos animais controles e desnutridos foi semelhante antes da administração da aloxana, e somente os controle tiveram aumento significativo desse parâmetro após administração de aloxana (Figura 3).

Ingestão Alimentar

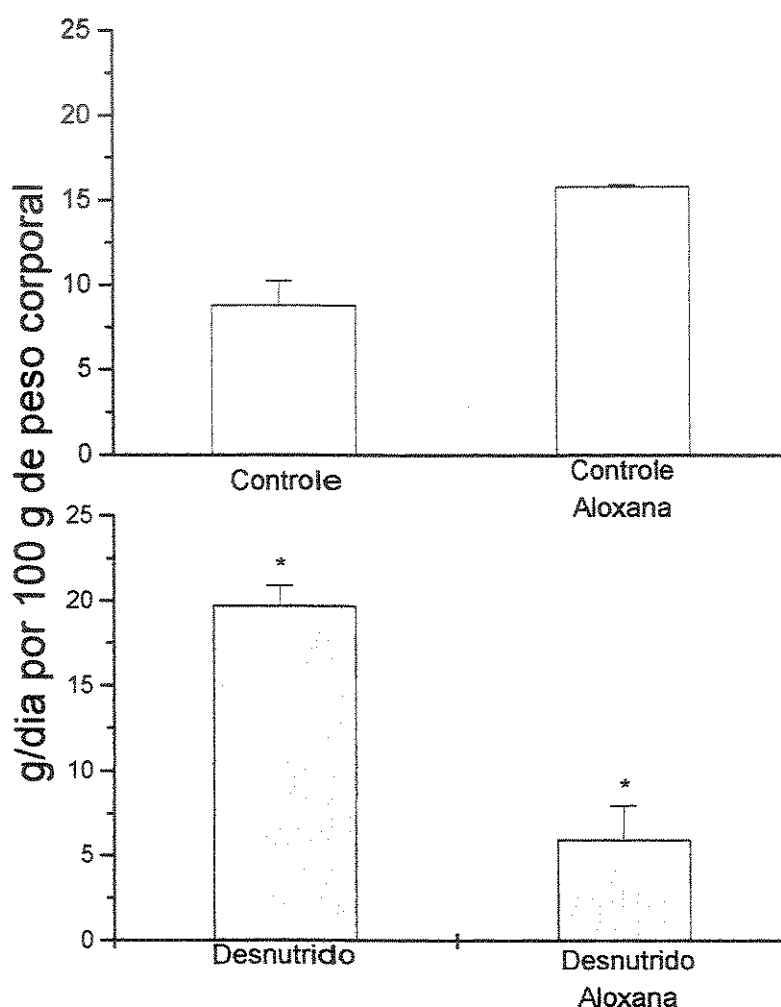


Figura 2 - Ingestão Alimentar dos animais antes e depois da administração da aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 25 animais por grupo. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, test-t) em relação ao controle correspondente. Os resultados utilizados para a confecção do gráfico encontram-se na Tabela 2 do Apêndice 1.

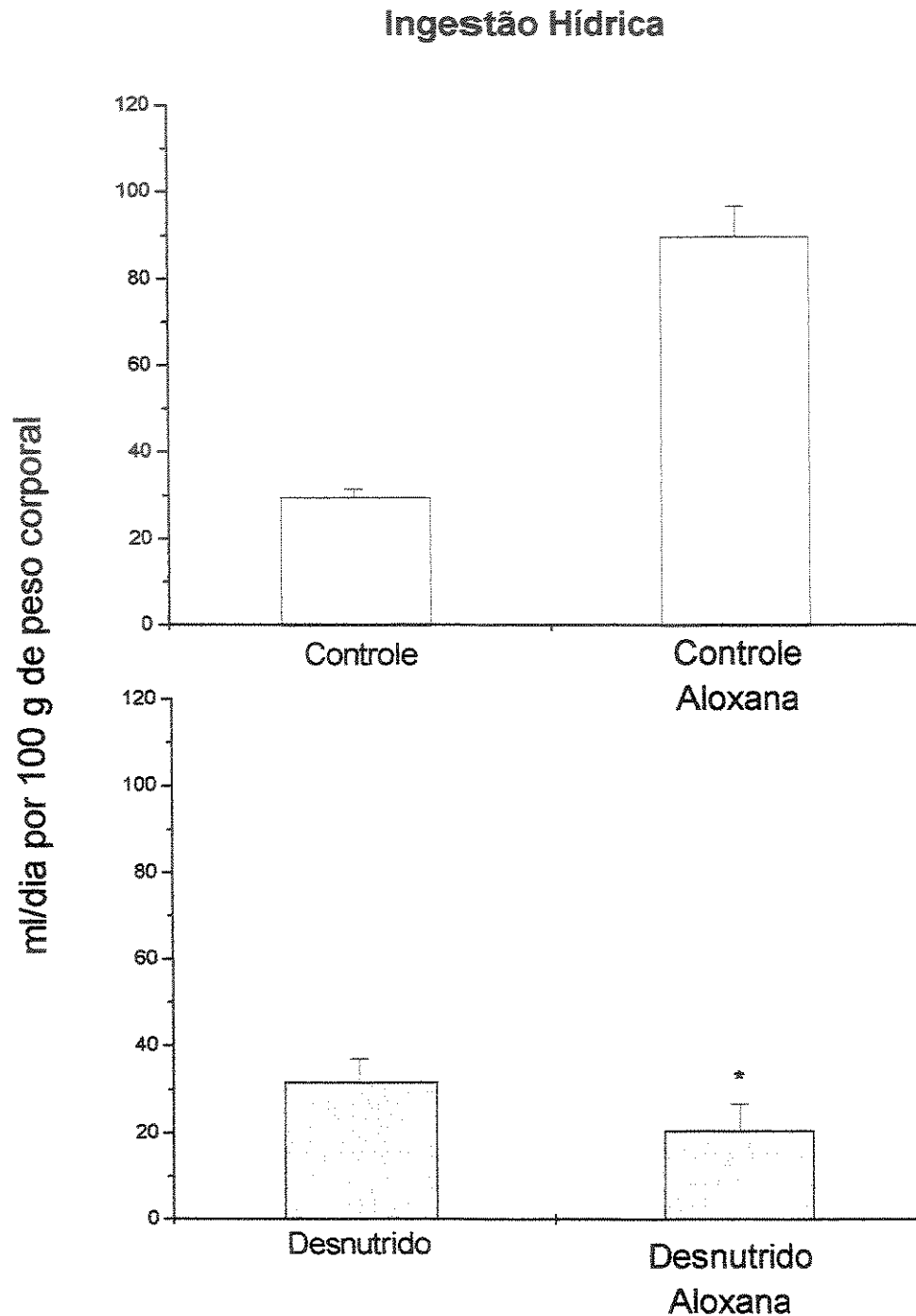


Figura 3 - Ingestão Hídrica dos animais antes e depois da administração de aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 25 animais por grupo. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, test-t) em relação ao controle correspondente. Os resultados utilizados para a confecção do gráfico encontram-se na Tabela 3 do Apêndice 1.

Não foi encontrada diferença significativa para a glicose sérica no estado alimentado entre animais controle e desnutridos antes da administração da aloxana (Figura 4). Após da administração da aloxana, a glicose sérica mostrou valores altos apenas no grupo controle (Figura 4). Quanto à incidência de diabetes após administração de aloxana, considerando-se diabéticos todos os animais com glicose sérica no estado alimentado igual ou superior a 13.75 mM, o grupo desnutrido apresentou incidência significativamente inferior à do controle (Figura 5).

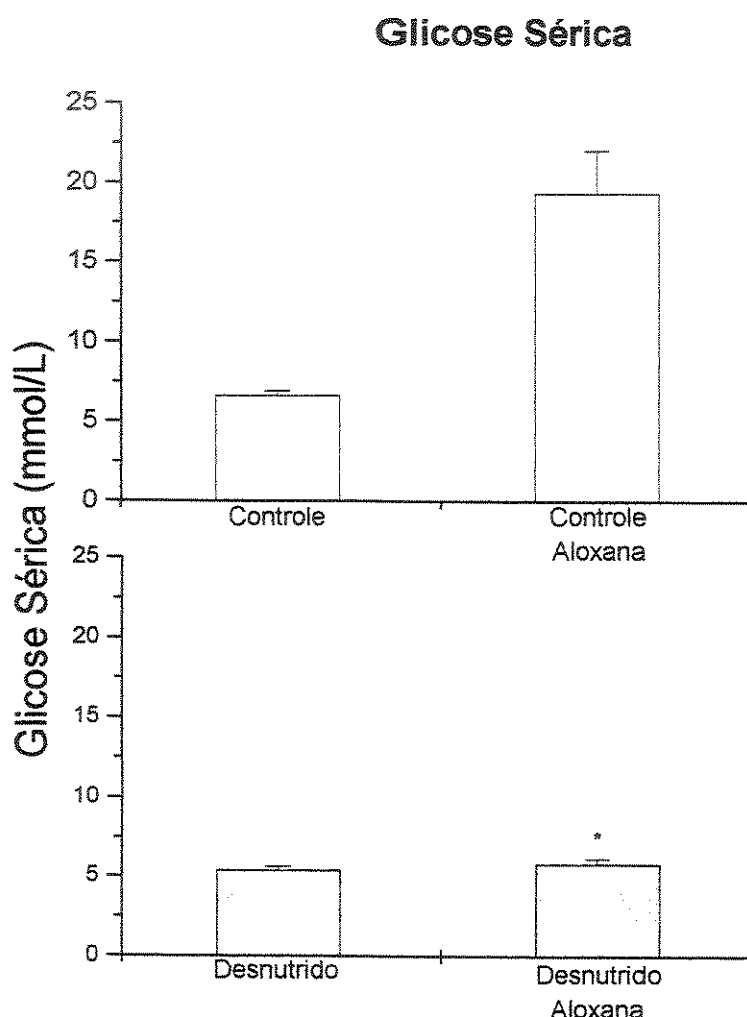


Figura 4 - Glicose no soro (mmol/L) dos animais controle e desnutrido antes e após a administração de aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 25 animais por grupo. (*) diferença significativa ($P < 0,05$, teste-t) em relação ao controle correspondente. Os resultados utilizados para a confecção do gráfico encontram-se na Tabela 4 do Apêndice 1.

Incidência de Diabetes

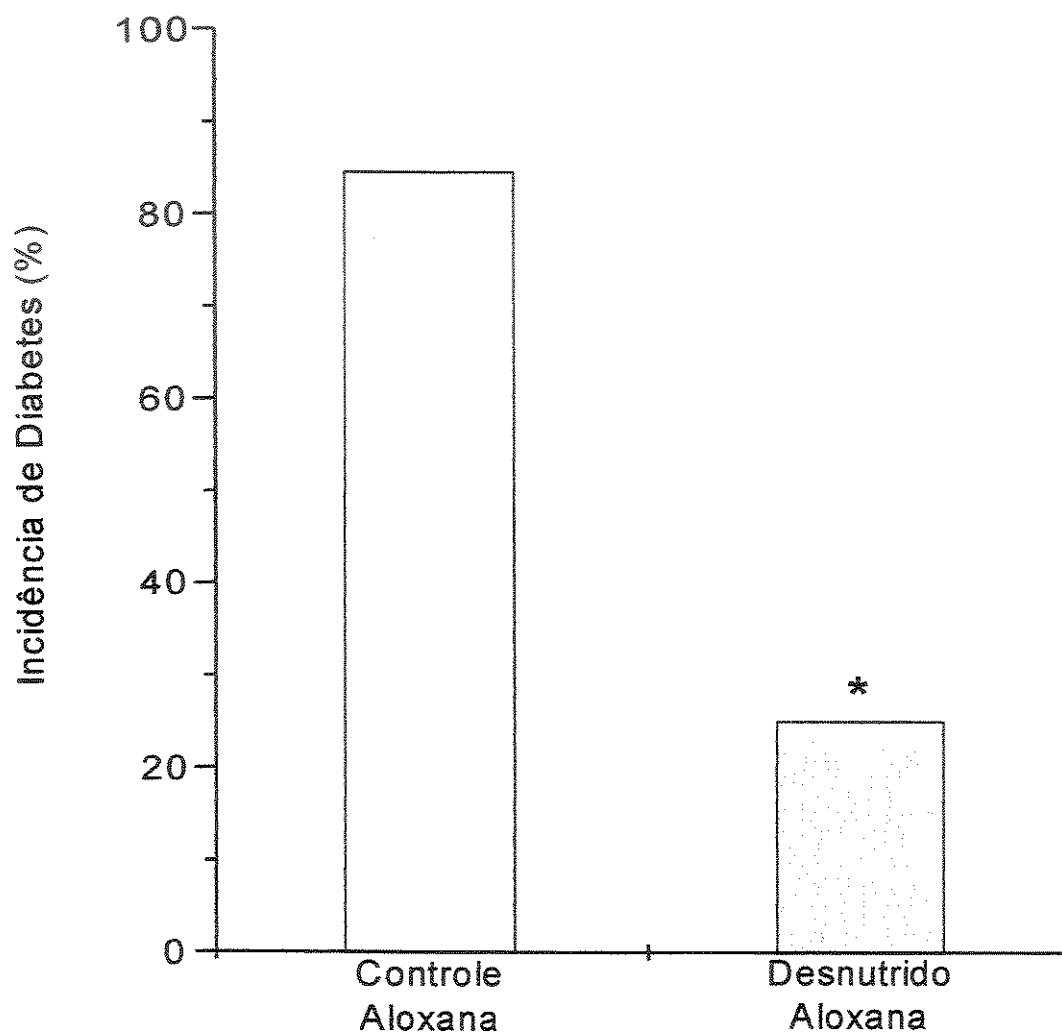


Figura 5 – Incidência de Diabetes (Glicemia $\geq 13,75$ mmol/L) nos animais controle e desnutrido após administração de aloxana. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, teste de comparação entre duas proporções) em relação ao controle. Os resultados utilizados para a confecção do gráfico encontra-se na Tabela 5 do Apêndice 1.

A área sob a curva de glicose sérica durante o teste de tolerância à glicose realizado após a administração da aloxana foi significativamente menor nos ratos desnutridos do que nos controles (Figura 6). O aumento da insulina sérica após administração de sobrecarga de glicose mostrou-se semelhante para os dois grupos (Figura 6).

Após a administração subcutânea de insulina exógena, a taxa de remoção da glicose sérica (KITT) foi maior para os ratos desnutridos que para os controle (Figura 7).

Área sob a curva de Glicose e Insulina no GTT

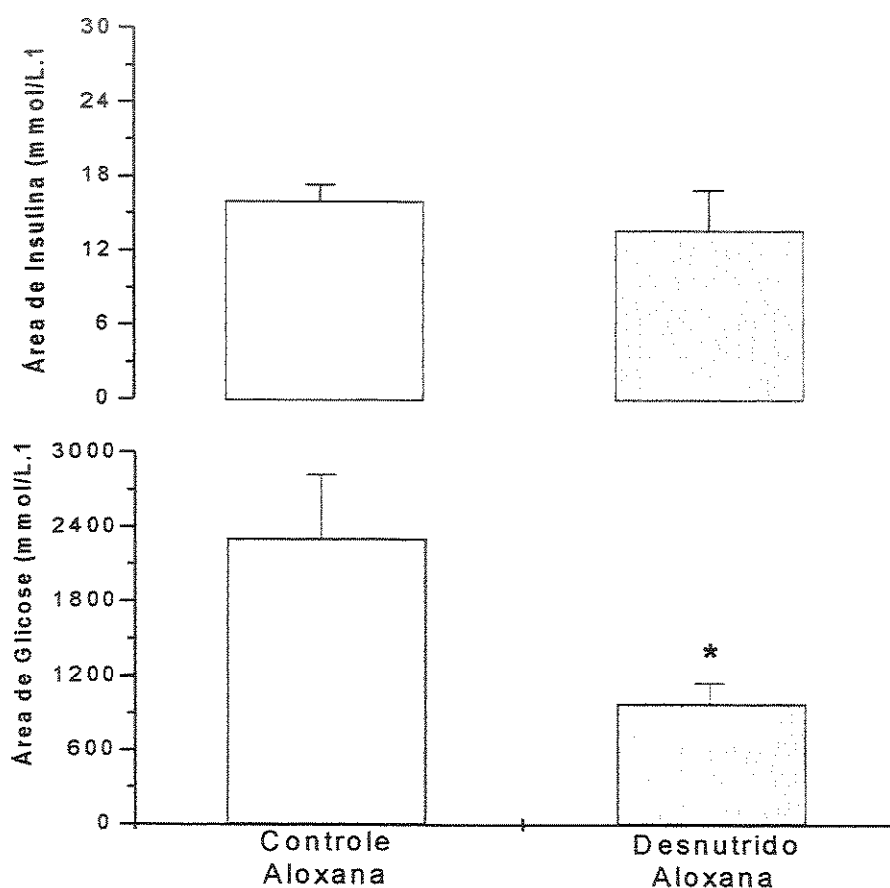


Figura 6 - Área sob as curvas de glicose e insulina durante teste de tolerância à glicose dos animais controle e desnutrido após administração de aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 7 animais por grupo. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, teste-t) em relação ao controle. Os resultados utilizados para a confecção do gráfico encontram-se na Tabela 6 do Apêndice 1.

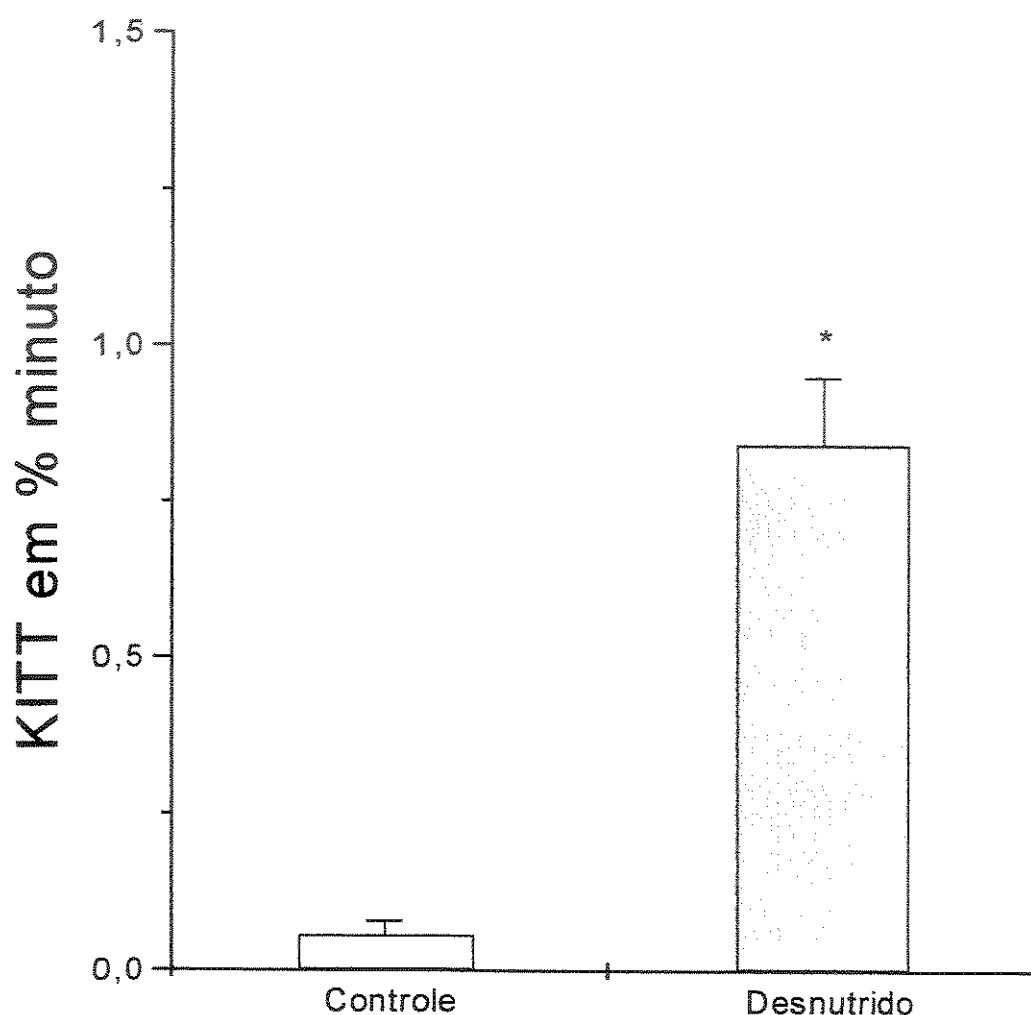
Taxa de Remoção da Glicose (KITT)

Figura 7 - Taxa de remoção da glicose sérica (KITT, em % minutos) durante o teste de tolerância à insulina, calculada utilizando-se amostra de sangue coletadas 0 - 60 minutos após a administração da insulina exógena dos animais controles e desnutridos, após administração de aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 3 - 6 animais por grupo. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, test-t) em relação aos controles. Os resultados utilizados para a confecção do gráfico encontram-se na Tabela 7 do Apêndice 1.

Os teores séricos de insulina no estado alimentado foi semelhante para os ratos controle e desnutrido (Tabela 2) enquanto que os teores de insulina presentes no pâncreas dos animais desnutridos após a administração da aloxana foi significativamente superior ao dos controles (Tabela 2).

Tabela 2 - Teor de Insulina no Soro (nmol/L) e no Pâncreas (ng/g) dos animais controles e desnutridos após administração de aloxana.

Grupos	Soro	Pâncreas
Controle	0,13 ± 0,017	12,05 ± 4,65
Desnutrido	0,18 ± 0,020	36,52 ± 11,88 *

Resultados expressos como média ± erro padrão de 5 animais por grupo.

(*) Diferença significativa ($P < 0,05$, teste-t) em relação ao controle.

2. Avaliações "in vitro"

A Figura 8 mostra a secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas dos ratos controles e desnutridos estimulados por glicose pré-incubadas na presença ou ausência de aloxana. A secreção de insulina pelas ilhotas de ambos os grupos foi semelhante na presença de concentrações basais de glicose (2,8 mM). Quando estimuladas por concentrações elevadas de glicose (22,0 mM) ilhotas controle e desnutridas mostraram aumento significativo na secreção de insulina sendo este menos acentuado nos desnutridos.

Quando estimuladas com concentrações elevadas de glicose pré-incubadas na presença de aloxana, tanto ilhotas controles quanto desnutridas apresentaram menor secreção de insulina do que quando tratadas com a alta concentração de glicose na ausência da aloxana. O comprometimento foi menos acentuado nas ilhotas desnutridas.

A Figura 9 mostra os resultados referentes à secreção de insulina por ilhotas isoladas dos ratos controle e desnutridos quando estimuladas por arginina, pré-incubadas na presença ou ausência de aloxana. Em presença de arginina (20,0 mM + glicose 2,8 mM) houve aumento significativo da secreção de insulina em relação aos valores basais (glicose 2,8 mM) pelas ilhotas controle e desnutridas. O aumento foi menor nas desnutridas do que no controle. A pré-incubação com aloxana, estimulada com arginina foi menos eficaz em provocar aumento na secreção de insulina pelas ilhotas controles e desnutridas. O comprometimento foi menos acentuado nas desnutridas.

A Figura 10 mostra a taxa de oxidação de glicose por ilhotas isoladas de ratos controles e desnutridos pré-incubadas na presença ou ausência de aloxana. Na ausência da pré-incubação com aloxana a oxidação de glicose pelas ilhotas desnutridas foi significativamente inferior à dos controles. Na pré-incubação com aloxana, as ilhotas controles mostraram maior redução na taxa de oxidação de glicose, que as desnutridas.

Secreção de insulina estimulada por glicose

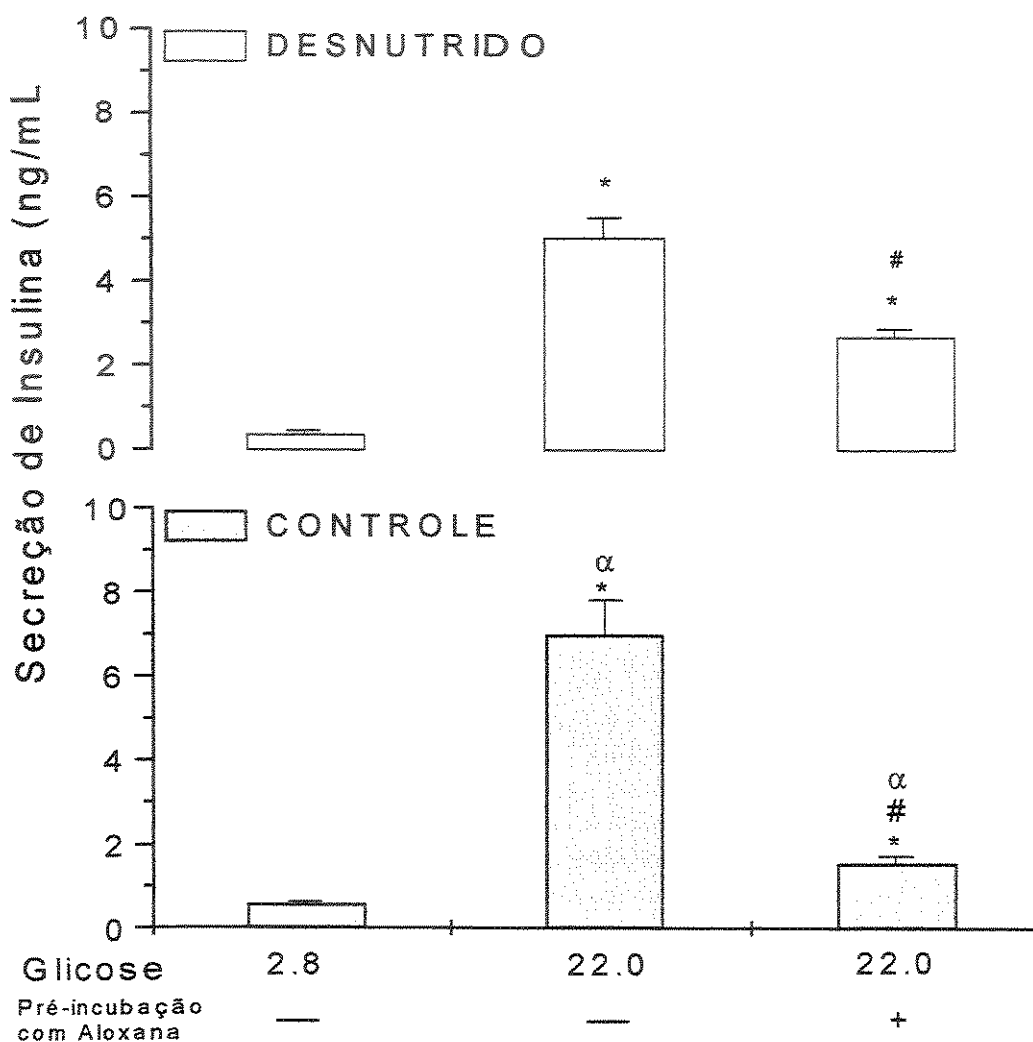


Figura 8 - Secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas dos animais controles e desnutridos, pré-incubadas por 60 minutos em meio contendo glicose (5.6 mMol/L) na ausência ou na presença de aloxana (0.5 mMol/L) e posteriormente incubadas por mais 60 minutos na presença de glicose (2.8 e 22.0 mMol/L). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 12 experimentos. (*) diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação à glicose 2.8 mMol/L. (#) diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação à glicose 22.0 mMol/L. (α) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao controle. Os resultados utilizados para a confecção do gráfico encontram-se na Tabela 8 do Apêndice 1.

Secreção de Insulina estimulada por Arginina

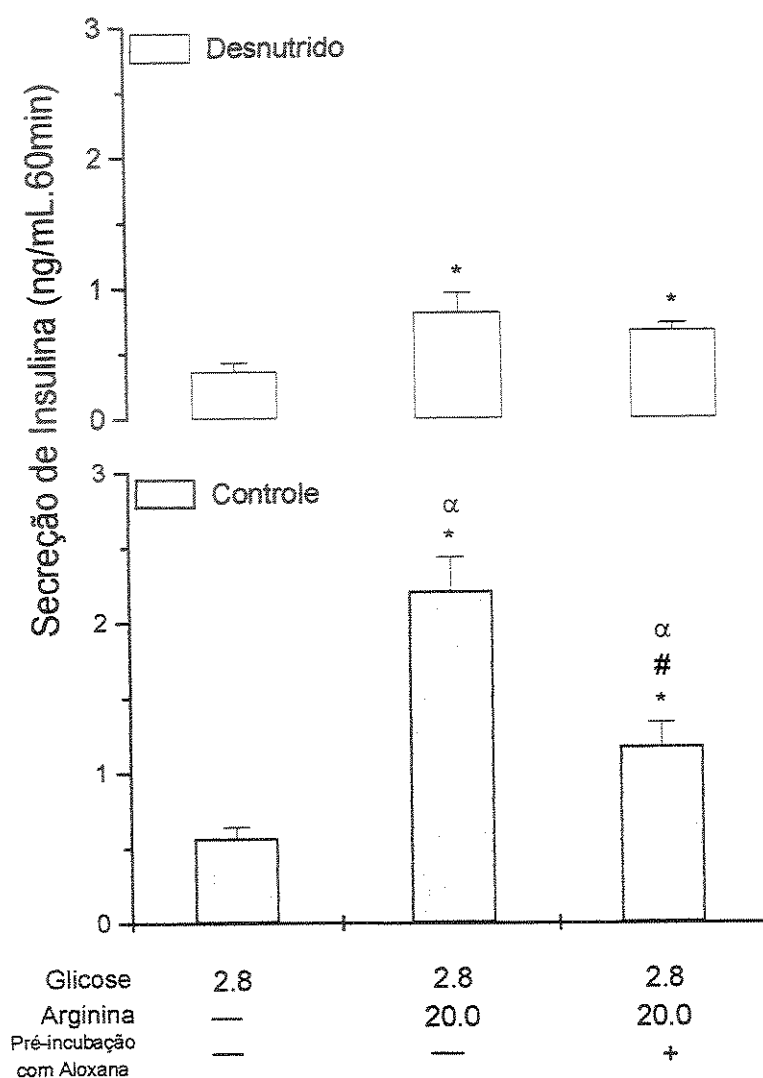


Figura 9 - Secreção de Insulina por ilhotas isoladas de animais controles e desnutridos, pré-incubadas por 60 em meio contendo glicose (5,6 mMol/L) na ausência ou presença de aloxana (0,5 mMol/L) e depois incubadas por mais 60 minutos na presença de glicose (2,8 mMol/L) ou de glicose (2,8 mMol/L) + arginina (20,0 mMol/L). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 12 experimentos. (*) diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação à glicose 2,8 mMol/L. (#) diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação à glicose 2,8 mMol/L + arginina 20,0 mMol/L. (α) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao controle. Os resultados utilizados para a confecção do gráfico encontram-se na Tabela 9 do Apêndice 1.

Oxidação de Glicose

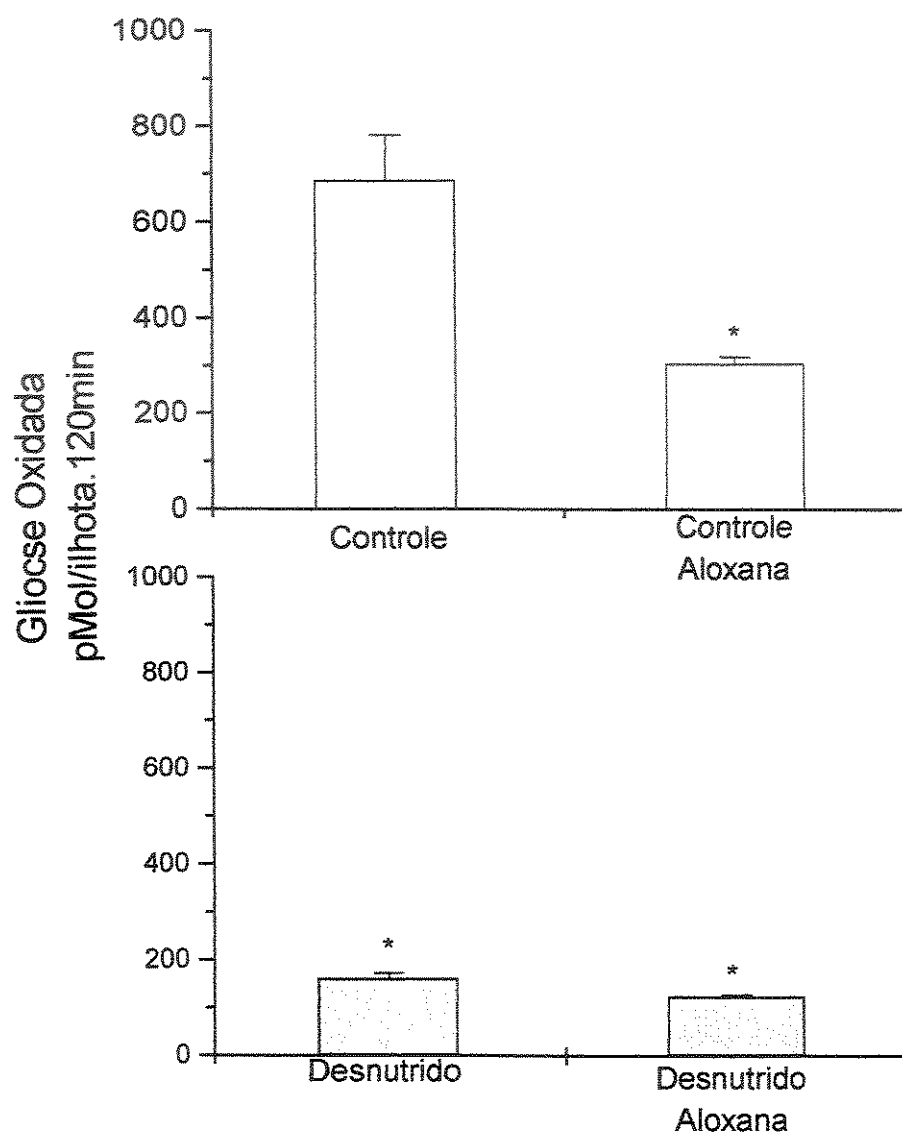


Figura 10 – Glicose Oxidada por ilhotas pancreáticas isoladas de animais controle e desnutrido. Inicialmente, as ilhotas foram pré-incubadas por 60 min na presença de glicose 5,6 mMol/L, e na presença ou ausência de aloxana 0,5 mMol/L. Em seguida foram incubadas na presença de glicose 16,7 mMol/L contendo traços de $[U^{14}G]$ glicose por 120 min. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 20 experimentos. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) e relação ao controle. Os resultados utilizados para a confecção do gráfico encontram-se na Tabela 8 do Apêndice 1.

6 - Discussão

Há várias décadas demonstrou-se que a aloxana é um composto adequado para a indução do diabetes experimental em animais. Animais "diabéticos aloxânicos" apresentam sintomas presentes no diabetes mellitus humano, tais como perda de peso corporal, polidipsia, polifagia, poliúria, glicosúria, cetonemia, hiperglicemia e cetonúria (LENZEN & PENTEN, 1988). Os danos causados pela aloxana ao tecido das ilhotas são restritos a células B secretoras de insulina, através de efeito direto (MALAISSE, 1981).

Os resultados do presente experimento mostrando que os ratos controles após a administração da aloxana apresentaram perda de peso corporal (Figura 1), ingestão alimentar e hídrica (Figura 2 e 3) e glicemia (Figura 4) elevada, indicam que a droga foi eficaz em induzir quadro de diabetes nos animais nas condições do presente experimento. Na verdade, empregando-se o critério utilizado por LUCIANO (1996 e 1997), que considera como diabéticos os animais com glicemia igual ou superior a 13,75 mM, a aloxana tornou diabéticos 85% dos animais injetados (Figura 5).

No presente estudo, a alimentação dos animais com a dieta hipoprotéica do desmame a idade adulta (antes da administração da aloxana) determinou menor peso corporal em comparação aos animais alimentados com a dieta normoprotéica (Figura 1). Esses dados estão de acordo com observações prévias de que dietas deficientes em proteína não suportam o crescimento corporal normal em ratos (OKITOLONGA et al., 1987; MELLO et al., 1989; LATORRACA et al., 1998).

Além da redução do ritmo de ganho de peso, os ratos alimentados com a dieta hipoprotéica desenvolveram muitas características comumente encontradas na desnutrição infantil tipo Kwashiorkor, tais como hipoproteïnemia, hipoalbuminemia, e aumento das concentrações circulantes de ácido graxos livres (TORUN & CHEW, 1994), conforme mostra Tabela 1.

Tomados em conjunto esses resultados sugerem que o protocolo de alimentação com dieta hipoprotéica empregado foi eficaz em induzir quadro de desnutrição nos animais. Uma característica marcante do kwashiorkor que não foi encontrada nos animais do presente estudo é o edema generalizado (TORUN & CHEW, 1994). A

ausência de edema nesses animais não surpreende uma vez que outros pesquisadores anteriormente já relataram dificuldades em produzir edema em animais desnutridos experimentalmente (RAMALINGASWANI & DEO, 1968; MELLO & CURY, 1989).

Os resultados referentes ao ganho de peso, ingestão alimentar (Figura 1, 2 e 3) e glicemia (Figura 4) dos animais desnutridos após a administração de aloxana, indicam que os efeitos da aloxana foram menos acentuados nestes do que no controle. Enquanto os animais controle apresentaram perda de peso após receberem aloxana, os desnutridos tiveram ganho. Os controles apresentaram a ingestão alimentar alta e os desnutridos, não. Além disso, a glicemia basal no estado alimentado dos desnutridos pouco se afastou dos valores normais com a aloxana. Assim sendo, a eficácia da aloxana em induzir diabetes avaliada através dos níveis glicêmicos, no estado alimentado (Figura 5) foi maior nos animais controle do que nos desnutridos. Este achado é concordante com relatos prévios da literatura (DIXIT & KAUNG, 1985; YOUNG & DIXIT, 1980; MELLO & LUCIANO, 1995). Segundo DIXIT & KAUNG (1985), com o aumento progressivo do teor protéico da dieta, ratos mostram aumento proporcional na susceptibilidade a aloxana.

Para EIRIZIK et al. (1986) e MELLO & LUCIANO (1995) ganho de peso corporal, teores séricos de glicose, ingestão hídrica e ingestão alimentar são índices fidedignos da severidade do diabetes induzido por drogas em ratos, independentemente do tipo de dieta utilizada. Dessa forma, também usando os critérios, ganho de peso corporal, ingestão hídrica e ingestão alimentar (Figura 1, 2 e 3), diabetes mais severo instalou-se nos animais controle do que nos desnutridos.

Testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT) são empregados na clínica para o diagnóstico do diabetes. No presente estudo utilizamos as medidas dos teores séricos de glicose e insulina durante o GTT e dos teores séricos de glicose durante o ITT como mais uma ferramenta para avaliar a severidade das alterações do metabolismo glicídico causadas pela aloxana nos animais controles e desnutridos.

Durante o GTT, a área sob a curva de glicose sérica foi menor para os ratos desnutridos do que para os controles (Figura 6) após administração da aloxana, em presença de área similar sob a curva de insulina (Figura 6). Além disso, a taxa de remoção da glicose sérica (KITT) durante o ITT foi maior entre os animais desnutridos

do que nos controle (Figura 7) indicando maior sensibilidade periférica à insulina nos primeiros.

Em ratos desnutridos, foi demonstrado aumento da sensibilidade à insulina no músculo esquelético e no fígado, através de diferentes protocolos experimentais (CRACE et al., 1990; ESCRIVA et al., 1991; LATORRACA et al., 1998; REIS et al., 1997). REIS et al. (1997) e LATORRACA et al. (1998) relataram aumento em várias etapas do sistema de sinalização celular da insulina como aumento da fosforilação do receptor de insulina (IR) aumento da fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) e aumento da associação entre IRS-1 e a enzima fosfatidil inositol 3-quinase (IP 3-quinase).

A insulina aumenta a captação de glicose para as células através da translocação do transportador de glicose insulino-sensível GLUT-4 do compartimento intracelular para a membrana plasmática no músculo e no tecido adiposo (STEPHEN & PILCH, 1995). Existem várias evidências experimentais de que a PI 3-quinase é necessária para a translocação do GLUT-4 induzido pela insulina (SANCHEZ & MARGALET et al., 1994). Portanto aumento, na sensibilidade periférica à insulina nos animais desnutridos pode ter um papel importante na proteção contra os efeitos hiperglicemiantes da aloxana promovidos pela alimentação com dieta hipoprotéica.

Com a finalidade de investigar os efeitos da restrição protéica sobre a ação tóxica da aloxana sobre o tecido pancreático secretor de insulina, verificamos se a ingestão de dieta hipoprotéica poderia atenuar os efeitos supressivos da aloxana sobre a oxidação de glicose e secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas.

A ingestão da dieta hipoprotéica atenuou significativamente os efeitos da exposição breve a aloxana, conforme demonstrado pelo fato de que a aloxana reduziu a secreção de insulina induzida pela glicose em 78%, a secreção de insulina induzida pela arginina em 47%, e a oxidação de glicose em 56% nas ilhotas dos ratos controle enquanto que as ilhotas isoladas dos ratos desnutridos tiveram somente redução de 47% na secreção de insulina induzida pela glicose, 17% na secreção de insulina induzida pela arginina e 23% na oxidação de glicose (Figuras 8 e 9).

Para explicar o efeito inibitório da aloxana sobre a secreção de insulina induzida pela glicose, SCHEYNIUS & THALJEDAL (1971) sugeriram que a glicose e a aloxana

atuariam no mesmo sítio ou em sítios próximos na membrana plasmática da célula B para provocar seus efeitos secretórios e necrótico, respectivamente. Contudo, embora haja alguma evidência que as células B tenham glicoreceptores na membrana plasmática sua existência ainda não foi comprovada experimentalmente (MALAISSE, 1981). Por outro lado, resultados de diversos experimentos, indicam que a glicoquinase é a enzima pancreática mais sensível à inibição pela aloxana (LENZEM & PANTEN, 1988). A glicoquinase funciona como um sinal de reconhecimento enzimático nas células B, que acopla concentração sangüínea de glicose com o processo secretório de insulina e provavelmente seja o alvo primário para a aloxana nas células B responsável pela inibição da secreção de insulina induzido pela glicose (LENZEN & PANTEN, 1988).

Existem relatos na literatura de que a atividade e o conteúdo da enzima glicoquinase nas ilhotas pancreáticas de ratos são reduzidos pela restrição alimentar (GASA et al., 1995). Esses achados sugerem que as alterações metabólicas e secretórias em resposta à glicose encontradas tanto em ilhotas desnutridas quanto naquelas expostas a aloxana podem ser atribuídas, pelo menos em parte, a uma via comum: depressão da enzima glicoquinase. Se essa suposição for correta, a atenuação dos efeitos tóxicos da aloxana sobre as células B oferecida pela restrição protéica poderia ser consequência de uma falha da aloxana em provocar redução maior na atividade da glicoquinase já deprimida pela desnutrição em si. Contudo, o fato de a secreção de insulina induzida pela arginina na presença de aloxana ter sido preservada nas ilhotas desnutridas, sugere que outros mecanismos estejam também envolvidos na gênese da atenuação, pois a arginina penetra nas células B através do transportador de aminoácidos catiônico (SMITH et al., 1997), acumula-se no interior da célula, despolarizando-a e estimula a secreção de insulina independentemente da via glicolítica e do ciclo de Krebs (BLICHER et al., 1989).

Além de reduzir a glicoquinase, a aloxana pode danificar as células B pela geração de radicais livres (MALAISSE, 1981). Sabe-se que as células B são capazes de se recuperar após injúrias não letais "in vitro" (EIRIZIK et al., 1993). As ilhotas pancreáticas podem responder ao estresse aumentado a expressão de certos genes, responsivos ao estresse (EIRIZIK et al., 1993), de proteína de choque térmico (Heat

Shock Proteins) (EIRIZIK et al., 1990) e da enzima antioxidante superóxido desmutase (BORG et al., 1992).

Por outro lado, existem evidências de que algumas alterações observadas nas ilhotas pancreáticas na desnutrição protéico calórica possam ser devidas a danos provocados pela geração de radicais livres (BROOKS et al., 1993). Portanto, é possível que em resposta à privação protéica crônica as ilhotas pancreáticas possam desenvolver mecanismos compensatórios ao estresse oxidativo aumentado, tornando a aloxana menos eficiente.

Claramente, mais estudos são necessários para que se possa desvendar os mecanismos através dos quais a restrição protéica alimentar atenua os efeitos tóxicos da aloxana a ilhotas pancreáticas.

7 - Conclusões

A alimentação com a dieta hipoprotéica atenuou os efeitos diabetogênicos da aloxana, uma vez que os ratos desnutridos não manifestaram perda de peso, hiperglicemia, polidipsia e polifagia e a incidência de diabetes foi inferior à observada no controle. Esta atenuação promovida pela alimentação com a dieta hipoprotéica pode ser atribuída, pelo menos em parte, a:

- Aumento da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina
- Aumento nas reservas pancreáticas de insulina;
- Menor comprometimento da oxidação da glicose pelas ilhotas pancreáticas;
- Menor comprometimento da secreção de insulina induzida pela glicose e pela arginina pelas ilhotas pancreáticas observadas nos animais desnutridos.

8. Referências Bibliográficas

- ALLEYNE, G.A. O. & SCULLARD, G. H. Alterations in carbohydrate metabolism in Jamaican children with severe malnutrition. **Clin. Sci.**, **37**: 631-642, 1969.
- BLICHER, F.; MOURIADA, A.; SENER, A.; MALAISSE, W.J. Stimulus secretion coupling of arginine induced insulin release. Uptake of metabolized and non metabolized cafeionil amino/acids by pancreatic islets. **Endocrinology.**, **4**, **124**:134-141, 1989.
- BORG, L.A.H., CAGLIERO, E., SANDLER, S., WELSH, N., EIRIZIKD.L. Interleukin-1 β increases the activity of superoxide dismutase in rat pancreatic islets. **Endocrinology**, **130**:2851-2857, 1992.
- BOSCHERO, A. C.; DELATTRE, E. & SANTOS, M. L. Isolamento de Ilhotas de Langerhans de rato. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FISILOGIA, 12, 1980, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: 1980, p. 117.
- BOSQUERO, A.C. Acoplamento estimulação-secreção de insulina pelas células B pancreáticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, **40**:149-155, 1996.
- BROOKS, S.E.H., GOLDEN, M.H.N., PAYNE-ROBINSON, H.M. Ultrastructure of the islets of langerhans in protein-energy malnutrition. **West. Ind. Med. J.**, **42**:101-6, 1993.
- CARNEIRO, E. M.; MELLO, M. A. R.; GOBATTO, C. A. ; BOSCHERO, A. C. Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and ⁴⁵Ca uptake by pancreatic rat islets. **J. Nutr. Biochem.**, **6**: 314-318, 1995.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLAEYSSSENS, S.; LAVOINNE, A.; FRESEL-RAGOT, M.; BOIS-JOYEUX, B.; CHANEZ, M. & PERET, J. Metabolic changes in rats fed a low protein diet during post-weaning growth. **Metabolism.**, **39**:933-938, 1990.
- COOK, D.L. and HALES, C.N. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. **Nature.**, **311**:271-273, 1984.
- CRACE, C.S., SWENNE, I., KHON, P.G., STRAIN, A.J., MILNER, R.D.G. Protein energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. **Diabete Metabolism.**, **16**:484-491, 1995.
- DIXIT, P. K., KAUNG, M. L. C. Rat pancreatic β -cells in protein deficiency: a study involving morphometric analysis and alloxan effect. **Journal of Nutrition, Philadelphia**, **115**:375-381, 1985.
- DOUMAS, B. T.; WATSON, W. A. & BIGGS, H. G. Albumin standars and the measuremants of serum albumin bromcresol green. **Clin. Chim. Acta**, **31**:87-96, 1971.
- DUNN, J.S., SHEEHAN, J.L., McLETCHIE, N.G.B. **Lancet**, **1**:484, 1943.
- EIRIZIK, D. L., MIGLIORINI, R. H. Reduced diabetogenic effect of streptozotocin in rats previously adapted to a high-protein carbohydrate-free diet. **Diabetes.**, **33**:383-388, 1984.
- EIRIZIK, D. L., SANDLER, S. Function and metabolism of pancreatic β -cell maintained in culture following experimentally induced damage. **Pharmacol. Toxicol.**, **65**:163-168, 1989.
-

- EIRIZIK, D. L., SANDLER, S., PALMER, J. Repair of pancreatic β -cells. A relevant phenomenon in early IDDM?. **Diabetes.**, **42**:1383-1391, 1993.
- EIRIZIK, D.L.; JANSSON, L.; SANDLER, S. High protein diet does not prevent the development of low-dose streptozotocin induced diabetes in mice. **Nutr. Rep. Inter.**, **38**:1193-1197, 1988.
- EIRIZIK, D.L.; LIMA-FILHO, E.C. NAKAMURA, P.H.; MIGLIORINI, R.H. Indices of severity of drug-induced diabetes in the rat: an evaluation by a multiple correlation analysis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **19**:544-A, 1986.
- EIZIRIK D.L., WELSH M., STRANDELL E., WELSH N. and SANDLER S. Interleukin-1 β depletes insulin messenger ribonucleic acid and increases the heat shock protein hps 70 in mouse pancreatic islets without impairing the glucose metabolism. **Endocrinology**, **127**:290-2297, 1990.
- ESCRIVA, R., KERGOAT, M., BAILBE, D., PASCOAL-LEONE, A.M., PORTHA, B. Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. **Diabetologia.**, **34**(8):559-564, 1991.
- GASA, R., SENNER, A., MALAISSE, W.J., GOMES, R. Apparent starvation-induced repressin of pancreatic islet glucokinase. **Biochem. Mol. Med.**, **56**(2):99-103, 1995.
- HADESKOV, C.S. Mechanism of glucose induced insulin secretion. **Physiol. Ver.**, **60**:442-509, 1980.
- HEARD, C. R. C. The effects of protein-energy malnutrition on blood glucose homeostasis. **World Rev. Nutr. Diet.**, **30**:107-147, 1978.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HEARD, C.R.C.; FRANJI, S.M.; WRIGHT, P.M.; MCCARTNEY, P.R. Biochemical characteristics of different forms of protein-energy malnutrition. **British J. Nutr**, **37**:1-21, 1977.
- HENRY, R. J. **Clinical chemistry principles and techniques**. 2nd ed. Hargeston, Harper & How, 1974.
- HERBERT, V.; LAU, K. S.; GOTLIEB, C. W. & BLEICHER, S. T. Coated charcoal immunoassay of insulin. **J. Clin. Endocrinol.**, **25**:1375-1384, 1965.
- LACY, P. E. & KOSTIANOVSKY, M. Method for isolation of the intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, **16**:35, 1967.
- LANZEN, S., PENTEN, V. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, **31**:337-342, 1988.
- LATORRACA, M.Q., CARNEIRO, E.M., MELLO, M.A.R., BOSCHERO, A.C. Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished calcium UPTAKE. **J. Nutr. Biochem**. 1998.
- LUCIANO, E. Atividade física e metabolismo lipídico em ratos diabéticos experimentais. **Ver. Bras. Ativ. Fís. Saúde.**, **1**(4):19-26, 1996.
- LUCIANO, E., LIMA, F.B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Ver. Ciênc. Bioméd.**, **18**:47-60, 1997.
- MALAISSE, W. J. et al. Recognition of insulinotropic stimuli. In: Handbook of Diabetes Mellitus. **Islet cell function/insulin action**. New York, **2**:3-25, 1981.
- MATTEWS, J.N.S., ALTMAN, D.G., CAMPBELL, M.J., ROYSTON, P. Analysis of serial measurements in medical research. **Br. Med. J.**, **27**:230-235, 1990.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MEGLASSON, M.D., MATSCHINSKY, F.M. New perspectives on pancreatic islets glucokinase. **Am. J. Physiol.**, **246**:E1-E13, 1984.
- MELLO, M. A. R., LUCIANO, E. Effects of protein malnutrition on glucose tolerance in rats with alloxan-induced diabetes. **Braz. J. Méd. Biol. Res**, **28**:467-470, 1995.
- MELLO, M.A.R. & CURY, L. Effects of protein-calorie malnutrition on endocrine pancreatic function in young pregnant rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **22**:791-794, 1989.
- MELLO, M.A.R. & CURY, L. Effects of protein-calorie malnutrition on reproductive performance of young and mature rats. **Growth, Devel. Aging**, **53**:141-144, 1989.
- MILNER, R.D.M. Metabolic and hormonal responses to glucose and glucagon in patients with infantile malnutrition. **Pediatric Research.**, **5**:33-39, 1971.
- MOSKOLEWSKY, S. Isolation and culture of the islets of the guinea pig. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 5342-359, 1965.
- NOGUEIRA, D. M., STRUFALDI, B.; HIRATA, M. H.; ABDALLA, D. S. P. & HIRATA, R. D. C. Sangue-parte I: Glicídios. In: NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M. H.; ABDALLA, D. S. & HIRATA, R. D. C. **Métodos de bioquímica clínica.**, p. 153-168, 1990.
- OKITOLONDA, C.O., BRITHARD, S.M., HENKIN, D.C. Repercussions of chronic protein-caloric malnutrition on glucose homeostasis in the rat. **Diabetologia.**, **30**:946-951, 1987.
- PIPELEERS, D., VAN de WINKEL, M. Pancreatic β cells possess defense mechanisms against cell-specific toxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **83**:5267-5271, 1986.

- RAMALINGASWANI, V., DEO, M.G. Experimental protein-calorie malnutrition in the rhesus monkey. In calorie deficiencies and protein deficiencies. **Proceedings of a colloquium**. Cambridge, April, 1967, p265-275. Ed. Marcance, RA; Windowson, E.M., CHURCHILL, London, 1968.
- RAO, H. R. Adaptations in glucose homeostasis during chronic nutritional deprivation in rats: hepatic resistance to both insulin and glucagon. **Metabolism.**, **44**:817-824, 1995 (a).
- RAO, H. R. Fasting glucose homeostasis in the adaptation to chronic deprivation in rats. **Am. J. Physiol.**, **268**:E873-879, 1995 (b).
- REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoe Writing Committee on the Reformulation of AIN-76A. **J. Nutr.**, **123**:1939-1951, 1993.
- REGOW, B. J. M.; CORNELISSEN, P. J. H. C.; HELDER, A. P. & SPIJKERS, J. B. F. and WEEBER, Y. M. M. Specific determination of free fatty acid in plasma. **Clin. Chem. Acta.**, **31**:187-195, 1986.
- REIS, M.A.B., CARNEIRO, E.M., MELLO, M.A.R., BOSQUERO, A.C., SAAD, M.J.A., VELOSO, L.A. Glucose induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein deficient rats. **J. Nutr.**, **127**:403-410, 1997.
- SANCHES-MARGARET. V., GODFINE, I.D., VLAHOS, C.J., SUNG, C.K. Role of phosphatidyl inositol 3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor LY294002. **Biochem. Biophys. Res. Colummun.**, **204**:446-452, 1994.
- SCHEYNEIUS, A., TÄLJEDAL, I. B. On the mechanism of glucose protection against Alloxan Toxicity. **Diabetologia, New York**, **7**:252-255, 1971.

- SMITH, P.A.; SAKURA, H.; COLES, B.; GUMMENSON, N.; PORKS, P.; ASHCROFT, F.M. Electrogenic arginine transport mediate stimulus-recreation coupling in mouse pancreatic B-cells. *J. Physiol.*, **499**:625-635, 1997.
- SOMERS, B., BLONDEL, B., ORCI, L., MALAISSE, W.S. Notice events in pancreatic endocrine cells. *Endocrinology.*, **104**:255-264, 1979.
- STEPHENS, J.M., PILCH, P.H. The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT-4. The major insulin-responsive glucose transporter. *Endocrine Reviews.*, **16**:524-546, 1995.
- STRANDELL, E., EIRIZIK, D. L., SANDLER, S. Reversal of β -cell suppression "in vitro" in pancreatic islets isolated from nonobese diabetic mice during the phase preceding insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, **85**:1944-1950, 1990.
- THORENS, B., SARKAR, H.K., KABACK, H.R., LODISH, H.F. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter in vitro, intestinal kidney and B-pancreatic islets. cells. *Cell. SS.*, **55**:281-290, 1988.
- TORUN, B. & CHEW, F. Protein-energy malnutrition. In Shils, M.; Olson, J.A.; Shike, M. (eds) **Modern Nutrition in Health and Disease**, v. 2, Philadelphia, Lea & Febiger, p. 950-976, 1994. Without impairing glucose metabolism. *Endocrinology*, 127:2290-2297, 1994.
- TRINDADE, C. E. P.; NÓBREGA, F. J. de; & TONETE, S. S. Q. Repercussões metabólicas da desnutrição protéico-calórica. In: **Desnutrição: intra-uterina e pós-natal**. NÓBREGA, F. J. de. (Ed.). Panamed Editorial, São Paulo, 1986.
- VALDEOMILLOS, M., NADAL, A., CONTRERAS, D., SORIA, B. The relationship between glucose induced K^+ atp channel closed and the rise in $[CA^{2+}]$ in single mouse pancreatic B cell. *J. Physiol.*, **455**:176-186, 1992.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- VITERI, F.E. & TORUN, B. Influence of exercise on linear exercise. **Eur. J. Clin. Nutr.**, **48**:s186-s190,(SUPPL 1) 1994.
- WELCH, M. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiol. Rev.**, **72**:1063-1081, 1992.
- WELSH, M., EIRIZIK, D. L., STRANDELL, E. Heat shock treatment of mouse pancreatic islets results in partial loss of islets cells but no remaining functional impairment among surviving β -cells. **J. Mol. Endocrinol.**, **1**:27-31, 1988.
- WHITEHEAD, R. G. & HARLAND, P. S. E. G. Blood glucose, lactate and pyruvate in kwashiorkor. **Br. J. Nutr.**, **20**:825-831, 1966.
- YOUNG, J. D., DIXIT, P. K. Lack of diabetogenic effect of alloxan in protein-calorie malnourished rats. **Journal of Nutrition, Philadelphia**, **110**:703-709, 1980.
- YOUNOSZAI, R. & DIXIT, P.K. Decreased insulin secretion by isolated pancreatic islets from rats fed 4% protein diet. **Proced. Soc. Exp. Biol. Med.**, **164**:317-321, 1980.

APÊNDICE 1

Tabelas referentes aos resultados utilizados na confecção das figuras de 1 a 9 apresentadas no corpo do trabalho.

Tabela 1 - Ganho de Peso dos animais (g/dia), antes e depois da administração da aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 25 animais por grupo. (*) diferença significativa ($P < 0,05$, teste-t) em relação ao controle.

GRUPOS	Peso dos Animais g/dia
Controle	3,95 $\pm$ 0,25
Controle aloxana	-0,57 $\pm$ 0,72
Desnutrido	1,84 $\pm$ 0,38 *
Desnutrido aloxana	1,49 $\pm$ 0,42 *

Tabela 2 - Ingestão Alimentar (g/dia.100g peso corporal) dos animais antes e depois da administração da aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 25 animais por grupo. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, teste-t) em relação aos controles.

Grupos	Ingestão Alimentar
Controle	8,76 $\pm$ 1,49
Controle aloxana	15,8 $\pm$ 0,14
Desnutrido	19,74 $\pm$ 1,13 *
Desnutrido aloxana	5,97 $\pm$ 1,98 *

Tabela 3 - Ingestão Hídrica (ml/dia.100g de peso corporal) dos animais antes e depois da administração de aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 25 animais por grupo. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação aos controles.

Grupos	Ingestão Hídrica
Controle	29,38 $\pm$ 2,07
Controle aloxana	89,56 $\pm$ 6,98
Desnutrido	31,61 $\pm$ 5,5
Desnutrido aloxana	20,51 $\pm$ 6,36 *

Tabela 4 - Teor de Glicose no soro (mmol/L) dos animais controle e desnutrido antes e após a administração de aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 25 animais por grupo.

Grupos	Glicose
Controle	6.64 $\pm$ 0.27
Controle aloxana	19.33 $\pm$ 2.73
Desnutrido	5.44 $\pm$ 0.22
Desnutrido aloxana	5.86 $\pm$ 0.32

Tabela 5 - Incidência (%) de Diabetes (Glicemia $\geq 13,75$ mmol/L) nos animais controle e desnutrido após administração de aloxana. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, teste de comparação de duas proporções) em relação ao controle. (N) Número total de ratos injetados com aloxana.

Grupos	(N)	Incidência
Controle	26	84.6
Desnutrido	25	25.0 *

Tabela 6 - Área sob as curvas de glicose (mMol/L.120 min) e insulina (nMol/L..120 min) durante teste de tolerância à glicose dos animais controles e desnutridos após administração de aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 17 animais por grupo. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, teste-t) em relação ao controle.

Grupos	Área sob a curva de glicose	Área sob a curva de insulina
Controle	2303.9 $\pm$ 509.5	15.9 $\pm$ 1.41
Desnutrido	982.2 $\pm$ 163.6 *	13.6 $\pm$ 3.3

Tabela 7 – Taxa de remoção da glicose sérica (KITT, em %/min) durante o teste de tolerância à insulina, calculado utilizando-se amostra de sangue coletadas 0 - 60 minutos após a administração da insulina exógena dos animais controles e desnutridos, após administração de aloxana. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 3 - 6- animais por grupo. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, test-t) em relação aos controles.

Grupos	Glicose
Controle	0,056 $\pm$ 0,022
Desnutrido	0,841 $\pm$ 0,108 *

Tabela 8 – Efeitos da aloxana sobre a oxidação de glicose (pmol/ilhota em 120 min de incubação) por ilhotas isoladas dos ratos mantidos com as dietas normo (NP) e hipo (HP) protéicas.

Grupo/ condição	Glicose (mMol/L)	Aloxana (mMol/L)	Oxidação de glicose	Redução na Oxidação
NP				
1	16,7	-	686 $\pm$ 97	
2	16,7	0,5	304 $\pm$ 15 * ^b	55,7 (vs. 1)
HP				
3	16,7	-	159 $\pm$ 12 * ^a	
4	16,7	0,5	123 $\pm$ 4 * ^{ac}	16,4 (vs. 3)

Ilhotas isoladas foram pré-incubadas por 60 min em tampão krebs-Ringer bicarbonato contendo glicose (5,6 mMol/L), em ausência ou presença de aloxana (0,5 mMol/L) e depois incubadas por 120 min em tampão Krebs-ringer bicarbonato contendo D (U¹⁴C)-glicose e glicose não radioativa numa concentração final de 16,7 mMol/L. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão de 20 experimentos. * diferença significativa ($P < 0,05$, test-t) em relação a: a) condição NP correspondente; b) condição 1 e c) condição 3.

Tabela 9 – Efeitos da aloxana sobre a secreção de insulina (ng/ilhota em 60 min de incubação) por ilhotas isoladas dos ratos mantidos com as dietas normo (NP) e hipo (HP) protéicas.

Grupo/ Condição	Glicose (mMol/L)	Arginina (mMol/L)	Aloxana (mMol/L)	Secreção de Insulina	Redução na Secreção
NP					
1	2,8	-	-	0,36 ± 0,07	
2	22,0	-	-	7,25 ± 0,84 ^{*a}	
3	22,0	-	0,5	1,56 ± 0,18 ^{*ab}	78,5 (vs.2)
4	2,8	20,0	-	2,20 ± 0,22 ^{*a}	
5	2,8	20,0	0,5	1,17 ± 0,15 ^{*ac}	46,8 (vs. 4)
HP					
6	2,8	-	-	0,35 ± 0,06	
7	22,0	-	-	5,01 ± 0,04 ^{*dg}	
8	22,0	-	0,5	2,64 ± 0,19 ^{*deg}	47,3 (vs. 7)
9	2,8	20,0	-	0,81 ± 0,14 ^{*dg}	
10	2,8	20,0	0,5	0,67 ± 0,05 ^{*dfg}	17,2 (vs. 9)

Ilhotas isoladas foram pré-incubadas por 60 min em tampão krebs-Ringer Bicarbonato contendo glicose (5,6 mMol/L) em ausência ou presença de aloxana (0,5 mMol/L) e depois incubadas por 60 min em tampão Krebs-Ringer Bicarbonato contendo glicose (2,8 ou 20,0 mMol/L) ou arginina (20,0 mMol/L) + glicose (2,8 mMol/L). Resultados expressos como média ± erro padrão de 12 experimentos. * diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação a: a) condição 1; b) condição 2; c) condição 4; d) condição 6; e) condição 7; f) condição 9 e g) condição NP correspondente.

APÊNDICE 2

Trabalho a ser submetido à publicação no periódico Journal of Nutrition

1 **Early Protein Deficiency Attenuates The Effects Of Alloxan On Glucose Metabolism in Adult Rats¹**

2
3 Francisco José A. Prada*; Eliete Luciano**; Everardo M. Carneiro*; A. Carlos Boschero* and Maria Alice R.
4 Mello**²

5
6 *Department de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP,
7 Campinas, SP, 13083-970, Brasil; **Departamento de Educação Física, Instituto de Biciências, Univesidade Estadual
8 Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, 13506-900, Brasil.

9
10 Address correspondence to:

11 Maria Alice Rostom de Mello

12 Departamento de Educação Física

13 IB/UNESP, Av. 24-A, 1515

14 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil

15 Tel. 019 5340244 (*ramal* 161)

16 FAX 019 5340009

17
18 Shortened form of the title: Protein deficiency, alloxan and glucose metabolism

¹ Supported by the Brazilian foundations FAPESP, CNPq and FINEP/PRONEX

² To whom correspondence should be addressed

ABSTRACT: Protein-calorie malnutrition is known to produce reduced glucose-induced insulin release and perturbations of glucose homeostasis. On the other hand, rats adapted to low-protein diets show an increased resistance to the diabetogenic effects of a single dose of alloxan. To examine the effects of protein dietary restriction on pancreatic function, we measured serum glucose and insulin levels during oral glucose tolerance test (GTT), serum glucose levels during subcutaneous insulin tolerance test (ITT) after a single dose of alloxan (40 mg/g body weight) administered to rats fed a low (LP=6%) or a normal (NP=17%) protein diet from weaning (21 days) to adult age (90days). In a separated set of experiments, we examined insulin release in response to glucose (2.8 or 22.0 mmol/L) and arginine (20.0 mmol/L) and glucose oxidation rates by pancreatic islets treated in vitro with alloxan (0.05 mmol/L) or not, isolated from NP and LP rats. The area under serum glucose (AG) curve during the GTT was lower in LP (57%) rats than in NP alloxan injected rats, while there were no differences between the two groups in the area under the insulin (AI) curve. The serum glucose disappearance rate (Kitt) during the ITT was higher in LP (50%) than in NP rats. Alloxan reduced glucose-induced insulin release in 78%, arginine-induced insulin release in 56% and glucose oxidation in 56% in NP islets. In LP islets, the observed reductions were, respectively, of 47, 17 and 23%. In summary, alloxan was less effective in producing hyperglycemia in rats fed low protein than normal protein diet. This effect was associated to an increased peripheral sensitivity to insulin in addition to a better preservation of glucose oxidation and glucose-induced and arginine-induced insulin release by pancreatic islets exposed to alloxan in LP than in NP rats.

KEY-WORDS: Low protein diet • alloxan diabetes • glucose tolerance test • insulin tolerance test • glucose oxidation • glucose-induced insulin release • rat islets

Early protein malnutrition can lead to the development of diabetes mellitus in adults (James and Coore, 1970). Epidemiological studies reporting high prevalence of diabetes in undernourished populations support this statement (Rao 1984, Poulsen et al. 1997). Malnutrition in man and experimental animals is associated with impaired insulin secretion and alterations in glucose homeostasis (Smith et al. 1975, Carneiro et al. 1995, Latorraca et al 1998). In rats submitted to protein malnutrition during the growing period a severe reduction in insulin release in response to glucose and other secretagogues has been observed (Okitolonda et al. 1987, Carneiro et al. 1995; Latorraca et al. 1998). Glucose intolerance was found only in the first weeks of protein deprivation (Okitolonda et al. 1987, Swenne et al. 1987). In prolonged protein malnutrition, increased sensitivity to insulin has been reported (Latorraca et al. 1998, Reis et al. 1997). On the other hand, rats adapted either to high (Eizirik et al, 1988) or low (Young and Dixit 1980, Dixit and Kaung 1985, Mello and Luciano 1995) protein diets present increase resistance to the diabetogenic effects of a single dose of streptozotocin or alloxan.

In the present study, we examined the effect of the dietary protein diet on pancreatic function determined by measurement of serum glucose and insulin levels in the fed state and during glucose and insulin tolerance tests, performed after the administration of a single dose of alloxan to rats fed chronically a normal (17%) or a low (6%) protein diet. In a separated set of experiments, we examined insulin release in response to glucose and arginine and glucose oxidation rates by pancreatic islets treated *in vitro* with alloxan, isolated from rats fed normal and low protein diets.

MATERIAL AND METHODS

Materials: P Collagenase was from Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN, USA). Antiserum against insulin was kindly provided by Dr Leclercq-Meyer (Faculty of Medicine, Brussels Free University, Brussels, Belgium). Standard insulin was from Novo-Nordisk (Copenhagen, Denmark), Bovine serum albumin (fraction V), alloxan and other chemicals were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). D [U14C]-Glucose (306 mCi/mmol) was obtained from Amersham International (Amersham, United Kingdom).

Animals and diets: All animal experiments were approved by Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP Ethics Committee. Young male (21 days) wistar rats were obtained from de Universidade Estadual Paulista- UNESP (Botucatu, SP, Brasil) animal facilities, separated at random and maintained on an isocaloric 6% protein (low protein) or 17% protein (normal protein) diet until the adult age (90 days). Diet composition was previously described (Reis et al., 1997). During the experiment, the animals had free access to their respective diets and water. They were kept on standard lighting conditions (12 h light/dark) at a room temperature of 24°C. The food intake was monitored and body weight was registered once a week. At the 80th day of life, blood samples were collected, in the fed state, from a cut at the tip of the tail for serum glucose, total protein, albumin, free fatty acids (NOGUEIRA et al, 1990) determinations.

Alloxan administration: At the 90Th day of life, the animals were food deprived for 15 h and weighed. A freshly prepared solution of alloxan (40 mg/kg body weight) in 10 mmol/L sodium citrate buffer, pH 4.5, was injected through the dorsal vein of the penis. The animals were kept in their diets for one additional week and then submitted to glucose and insulin tolerance test. The animals were considered “hyperglycemic” or “diabetic” if basal serum glucose in the fed state was > 13.75 mmol/L (Mello and Luciano 1995)

Glucose tolerance test (GTT): An oral glucose tolerance test was performed in the rats at the end of experimental period. After an overnight food deprivation, glucose (200g/l) was administered into stomach of the rats through a gastric catheter, at the final dose of 2g/kg body weight. Blood samples were obtained from cut tip tail at 0, 30, 60 and 120 min for serum glucose and insulin (Scott et al. 1981) determinations. The insulin and glucose responses during the glucose tolerance test were evaluated by estimation of the total area under glucose curve (AG) and the total area under insulin curve (AI), using the trapezoidal method (Mathews et al. 1990).

Insulin tolerance test (ITT): Subcutaneous insulin tolerance test was performed in the rats at the end of the experimental period. The ITT consisted of a bolus injection of regular insulin at the dorsal region (30 mU/100g body weight). Blood samples were obtained from cut tip tail at 0, 30, 60 and 180 min for serum glucose determination. The constant for serum glucose disappearance (Kitt) was calculated from the formula $0.693/t_{1/2}$. The serum glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least square analysis of serum glucose concentration from 0-60 min after insulin injection, when the serum glucose concentrations decreased linearly.

Tissue extraction: All animals were weighed, anesthetized with ether and killed by decapitation. Blood samples were collected for serum glucose and insulin determinations. Samples of the pancreas were taken for insulin determination (Malaisse et al. 1967). Animals fed both diets which were not injected with alloxan had their pancreatic islets isolated and treated *in vitro* with alloxan (or not) for insulin release and glucose oxidation rates evaluations.

Isolated pancreatic islet treatment *in vitro* with alloxan: Pancreatic islets collagenase isolated were incubated for 30 min at 37^o C in Krebs Bicarbonate medium with the following composition (in mmol/L): NaCl 115; KCl 5; CaCl₂ 2.56; Mg Cl₂ 1; NaHCO₃ 24; glucose 5.6, supplemented with BSA (3g/L) and equilibrated with a mixture of 95 % O₂ 5%CO₂, pH 7.4, in the absence or presence of alloxan (0.05 mmol/L). The islets were then collected for insulin release and glucose oxidation rates evaluations.

Insulin release by isolated pancreatic islets: Groups of 5 islets were incubated in fresh Krebs Bicarbonate medium for 60 min containing glucose (2.8 or 22.0 mmol/L) or glucose (2.8 mmol/L) plus arginine (20.0 mmol/L). The insulin content of the medium at the end of the incubation period was measured by radioimmunoassay.

Glucose oxidation by isolated pancreatic islets: Groups of 15 islets were transferred to eppendorfs with Krebs Bicarbonate medium containing D(U-¹⁴C) glucose and nonradioactive glucose to a final concentration of 16.7 mmol/L and a specific radiation of 0.5 mCi/mmol. The eppendorfs were placed into a 20 ml glass scintillation vials, gassed with CO₂:O₂ (5:95%), tightly sealed with a rubber membrane and incubated at 37^o C in slow shaking water bath for 60 min. Then, 100µl of HCl 0.1 Eq/L was injected in the inner eppendorf by a needle perforating the rubber membrane, to stop islet metabolism. In the outer scintillation vial, 0,25 ml of hyamine hydroxide was injected to trap the CO₂ released by the islets and the system was incubated for 120 more minutes. Finally the inner eppendorfs and the rubber membranes were removed and 6ml of scintillation fluid were added to the scintillation vials and the samples were counted in a liquid scintillator.

Statistical analysis: The results were presented as means $\pm$ SEM for the number of rats (n) indicated. When working with islets, n refers to the number of experiments performed. Each experiment was performed with islets from two rats per group. Data were analyzed by non paired t test, by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test or by a test for comparison between two proportions, where appropriated. P values < 0.05 were considered to indicate significant difference.

RESULTS

Characteristics of the rats: There was a significant reduction in body weight gain (Table 2) and in serum total protein and albumin and an increase in serum free fatty acids (Table 1) in low protein (LP) rats in relation to normal protein (NP) rats.

Alloxan administration: After alloxan administration, NP rats presented body weight lost and high food and water intake and serum glucose levels in the fed state (Table 2). LP rats presented body weight gain and lower food and water intake and serum glucose levels (Table 2) when compared to NP rats. The incidence of mild hyperglycemia (diabetes) was higher among NP rats than in LP rats (Table 4). There were no differences between LP and NP rats in serum insulin levels in the fed state but LP rats had higher pancreatic insulin content than NP rats (Table 3).

GTT and ITT: After an oral glucose load the area under serum glucose (AG) curve was lower in LP rats than in NP alloxan injected rats, while there were no differences between the two groups in the area under the insulin (AI) curve (Table 4). In addition, after a subcutaneous insulin load, the serum glucose disappearance rates (Kitt) was higher in LP than in NP rats (Table 4).

Insulin release and glucose oxidation rates by isolated pancreatic islets: Alloxan induced significant decrease in glucose and arginine-stimulated insulin release by the islets isolated from NP and LP rats (Table 5). Alloxan also

significantly decreased glucose oxidation rates by the islets from NP and LP rats (Table 6). The decrease in both insulin release and glucose oxidation was greater in NP than in LP islets.

DISCUSSION

In the present study, we verified that feeding the low protein diet from weaning (21 days) to adult age (90 days) produced significant decrease in the rat body weight. This finding is in accordance with previous observations showing that low protein diets do not support normal growth in rats (Okitolonda et al. 1987, Mello et al. 1987, Desai et al. 1996, Latorraca et al. 1998). Besides reduced body weight gain our rats fed the low protein diet presented other characteristics commonly found in infantile protein malnutrition, as hypoproteinemia, hypoalbuminemia, and high serum free fatty acids levels (Torun and Chew 1994).

Alloxan has been known for decades to induce diabetes mellitus in animals by causing a rather selective damage to the pancreatic insulin-producing B cells (Lanzen and Panten 1988), through a direct effect (Malaisse 1982). The "alloxan diabetes" in animals presented like diabetes mellitus in man, with the typical symptoms such as body weight loss, polydipsia, polyuria, glycosuria and hyperglycemia (Lanzen and Panten 1988). The normal protein rats of the present study injected with alloxan showed body weight loss, polyfagia, polydipsia and hyperglycemia, indicating the effectiveness of the compound in inducing diabetes in our conditions.

The effectiveness of alloxan in producing diabetes, evaluated by serum glucose in the fed state, was greater in normal protein than in low protein rats. This observation is in agreement with previous reports in the literature (Dixit and Kaung 1985, Young and Dixit 1980, Mello and Luciano 1995). According to Dixit and Kaung (1985), with a progressive increase in dietary protein, the animals show a proportional increase in susceptibility to alloxan.

In the present experiment, in addition to serum glucose levels in the fed state, food intake, water intake and body weight gain, we used serum insulin levels in the fed state, serum glucose and insulin levels during the GTT and serum glucose during the ITT to evaluate the effectiveness of alloxan.

According to Eizirik et al. (1986) and Mello and Luciano (1995), body weight increase, serum glucose levels, water intake and epididymal fat weight are reliable indices of severity of drug-induced diabetes, independently of the diet administered. Thus, the body weight gain, food intake and water intake of our low protein rats injected with alloxan when compared to their normal protein counterparts, further support the idea of resistance to the diabetogenic effects of a single dose of alloxan induced by the dietary protein restriction.

During the GTT, the area under the serum glucose curve was lower in the low protein rats injected with alloxan than in their equivalent normal protein rats, in the presence of a similar area under the insulin curve. Furthermore, during the first 60 minutes of the ITT the serum glucose disappearance rate was greater in the low protein group than in the normal protein group, indicating higher sensitivity to insulin in the first group.

In protein deficient rats increased insulin sensitivity of liver and skeletal muscle has been demonstrated in vitro (Crace et al. 1990) and in vivo (Escriva et al. 1991, Reis et al. 1997, Latorraca et al. 1998). Reis et al (1997) and Latorraca et al. (1998) reported increase in several steps of the insulin signaling system in skeletal muscle, as increased

phosphorylation of the insulin receptor, increased phosphorylation of the insulin substrate-1 (IRS-1) and increased a association of IRS-1 with the enzyme phosphatidil inositol 3-kinase (PI 3-Kinase).

Insulin increases glucose uptake into cells partially through to the translocation of GLUT 4 from intracellular compartments to plasma membrane in muscle and adipose tissue (Stephens and Pilot 1995). Experimental evidences have led to the conclusion that PI 3-Kinase is necessary for insulin-stimulated GLUT 4 translocation (Sanchez-Margalet 1994). Hence, increased insulin sensivity in peripheral tissue may play an important role in protection against the diabetogenic effects of alloxan showed by the low protein animals

To further investigate the actions of dietary protein restriction against alloxan toxicity, we tested whether low protein diet could attenuate the suppressive effects of alloxan on glucose oxidation and insulin release by isolated islets. Low protein diet attenuated significantly the effects of short term alloxan exposure as demonstrated by the fact that alloxan reduced glucose-induced insulin release in 78%, arginine-induced insulin release in 56% and glucose oxidation in 56% in normal protein rat islets, while low protein rat islets had a reduction of only 47% in glucose-induced insulin release, of 17 % in arginine-induced insulin release and of 23% in glucose oxidation. However, this "attenuating effect" of protein restriction against alloxan must be examined with caution, since glucose-induced insulin release and glucose oxidation rates were significantly depressed by protein restriction itself.

Scheynius and Taljedal (1971) suggested that glucose and alloxan act on the same site of plasma membrane of B cell or at closely located sites to bring about their secretory and necrotic effects, respectively. Although some evidence that B cell have glycoceptors on the plasma membrane the experimental support for their existence is circumstacial (Malaisse, 1982). On the other hand, several studies indicate that glucokinase, that functions as a signal recognition enzyme in the B cell, coupling changes in blood glucose concentration to changes in insulin secretion, is apparently the most sensitive enzyme to inhibition by alloxan and may be the primary target for drug in the B cell responsible by impairment of glucose-induced insulin secretion (Lanzen and Panten 1988).

It has been reported that the activity of glucokinase and the content of this enzyme in pancreatic islets of rats were decreased by food restriction (Gasa et al. 1995). These findings suggest that the altered metabolic and secretory response to glucose found in both malnourished and alloxan-exposed islets may share one common pathway: an apparent repression of glucokinase. If this hypothesis is correct, the attenuation of the toxic effects of alloxan on B cell by dietary protein restriction may be, at least in part, a consequence of the failure of the drug to further depress glucokinase, already depressed by malnutrition itself. The preservation of arginine-induced insulin release by the low protein islets exposed to alloxan, however, indicates that the attenuation probably involve other steps of the stimulus-secretion coupling, or other different mechanisms, since arginine exerts an insulintropic action by its entry via cationic amino acid transporter 2A (Smith et al. 1997) and its accumulation inside B cells, causing membrane depolarization (Blachier et al. 1989), independently of glycolysis and oxidative cycle. Alloxan is apparently also selectively taken up by the GLUT2 glucose transporter in the pancreatic B-cell membrane (Munday et al, 1993). It is known that B-cells with low GLUT2 expression as human B-cells, have slow uptake of alloxan and are resistant its diabetogenic action (de Vos et al. 1995). Malnutrition is a condition associated to general depression of protein synthesis. It is not probably GLUT2 expression is also depressed in this condition. The depression of GLUT2

expression may be an alternative explanation by the attenuation of the deleterious effects of alloxan on malnourished islets.

Besides depressing glucokinase, alloxan is a compound known to damage pancreatic islets by oxygen free radicals generation (Malaisse 1982). Pancreatic B cells are able to repair themselves after some sublethal injuries *in vitro*. It is known the pancreatic islets can respond to stress by increasing the expression of some genes stress-responsive (Eizirik et al. 1993), heat shock proteins (Eizirik et al. 1990) and the free radical scavenger enzyme superoxide dismutase (Borg et al. 1992). On the other hand, there are evidences that some islet cell changes observed in protein malnutrition may be related to free radical damages (Brooks et al. 1993). Therefore, it is possible that in response to chronic protein deprivation pancreatic islets may develop some compensatory mechanism to increased oxidative stress, making alloxan less effective. Further studies are required to sort out the mechanisms involved in protein deprivation attenuating action against the toxic effects of alloxan on pancreatic islets.

In conclusion, alloxan was less effective in producing hyperglycemia in rats fed low protein than normal protein diet. This effect was associated to an increased peripheral sensitivity to insulin in addition to a better preservation of glucose oxidation and glucose-induced and arginine-induced insulin release by pancreatic islets exposed to alloxan in low protein than in normal protein rats.

AKNOWLEDGMENTS

The authors thank Clarice Y. Sibuya, José Roberto R. da Silva, Eduardo Custódio, Léscio D. Teixeira and Miriam G. de Chaves for the technical assistance.

LITERATURE CITED

- Blachier, F., Murtada, A., Sener, A. & Malaisse, W.J. (1989) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Uptake of metabolized and nonmetabolized cationic amino acids by pancreatic islets. *Endocrinology* 124: 134-141.
- Borg, A.H., Cagliero, E., Sandler, S., Eizirik, D.L. Welsh, N & Welsh, M. (1992) Interleukin-1 B increases the activity of superoxide dismutase in rat pancreatic islet. *Endocrinology* 130: 2851-2857.
- Brooks, S.E.H., Patch, F.R., Golden, M.H.N. & Payne-Robinson, H.M. (1993) Ultrastructure of the islets of Langerhans in protein energy malnutrition. *W.I. Med. J.* 42: 101-106.
- Carneiro E.M., Mello M.A.R., Gobatto C.A. & Boschero A.C. (1995) Low protein diet impairs glucose induced insulin release by and ⁴⁵Ca uptake by pancreatic rat islets. *Nutr. Biochem.* 6: 314-318.

- Crace, C.J., Swenne, I., Khon, P.G., Strain, A.J. & Milner, R.D.G. (1990) Protein energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. *Diabetes Metabolisme* 16: 484-491.
- De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D. Schuit, F. (1995) Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J. Clin. Invest.* 96: 2489-2495.
- Desai, M., Crowter, N.J., Lucas, A. & Hales, C.N. (1996) Organ selective growth in the offspring of protein restricted mothers. *Br. J. Nutr.* 76: 591-603.
- Dixit, P.K. & Kaung, K.L.C. (1985) Pancreatic B cell in malnutrition: a study involving morphometric analysis and alloxan effects. *J.Nutr.* 115: 375-381.
- Eizirik, D.L., Lima-Filho, E.C., Nakamura, P.H. & Migliorini, R.H. (1986) Indices of severity of drug induced diabetes mellitus in the rat: an evaluation by the multiple correlation analysis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 19: 544-A.
- Eizirik, D.L., Janson, L. & Sandler, S. (1988) High protein diet does not prevent the development of low-dose streptozotocin induced diabetes in mice. *Nutr. Rep. Int.* 38: 317-321.
- Eizirik, D.L., Bjorklund, A & Cagliero, E. (1989) Genotoxyc agents increase the expression of growth arrest and DNA damage- induced genes gadd 153 and 45 in rat pancreatic islets. *Diabetes* 42: 438-445, 1993.
- Eizirik, D.L., Welsh, M., Strandell, E. Welsh, N., Sandler, S. (1990) Interleukin-1 B depletes insulin messenger RNA and increases heat shock protein Hsp 70 in mouse pancreatic islets
- Escriva, F., Kergoat, M., Bailbé, D.; Pascual-Leone, A.M. & Portha, B. (1991) Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. *Diabetologia* 34: 559-564.
- Gasa, R., Senner, A., Malaisse, W.J. & Gomis, R. (1995) Apparent starvation induced repression of pancreatic islet glucokinase. *Biochem. Mol. Med.* 56: 99-103.
- Latorraca M.Q., Carneiro E.M., Mello M.A.R. & Boschero A.C. (1998) Protein deficiency during pregnancy and lactation impair glucose induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. *Br. J. Nutr.* 80: 291-97.
- Lenzen, S. & Panten, U. (1988) Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* 31: 337-342.
- Malaisse, W.J. (1982) Alloxan toxicity to B cell: A new hypothesis. *Biochem. Pharmacol.* 31: 3527-3534.

-
- 1
2 Malaisse W.J., Malaisse-Lagae F. & Wright, P. (1967) Effect of fasting upon insulin secretion in the rat. *Am. J.*
3 *Physiol.* 213: 843-848.
4
- 5 Mathews J.N.S., Altman D.G., Campbell M.S., Royston P. (1990) Analysis of serial measurements in medical
6 research. *Br. Med. J.* 27: 230-235.
- 7 Mello, M.A.R. & Luciano, E. (1995) Effects of protein malnutrition on glucose tolerance in rats with alloxan induced
8 diabetes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 467-470.
- 9
- 10 Mello, M.A.R., Cury, L., Valle, L.B.S. & Oliveira-Filho, R.M. (1987) Pregnancy in young rats: effects of
11 malnutrition. *Nutr. Rep. Int.* 36: 527-535.
12
- 13 Munday, R., Ludwig, K., Lenzen, S. (1993) The relationship between the physicochemical properties and the
14 biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *J. Endocrinol.* 139: 153-163.
15
- 16 Nogueira, D.M., Strufaldi, B., Hirata, M.H., Abdula, D.S.P. & Hirata, R.D.C. (1990) .Métodos de Bioquímica
17 Clínica. São Paulo, SP, Pancast.
- 18
- 19 Okitolonda, W., Brichard, S.M. & Henquin, J.C. (1987) Repercussion of chronic protein calorie malnutrition on
20 glucose homeostasis in the rat. *Diabetologia* 30: 946-951.
21
- 22 Poulsen, M., Vaag, A.A., Kyvik, K.O., Molle, R., Jansen, D. & Beck-Nielsen, H. (1997) Low birth weight is
23 associated with NIDDM in discordant monozygotic and dizygotic twin pairs. *Diabetologia* 39: 1119-1122.
24
- 25 Rao, R. N.(1984) The role of undernutrition on the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 7: 595.
26
- 27 Reis A.B., Carneiro, E.M., Mello, M.A.R., Boschero A.C., Saad M.J.A. & Velloso, L.A. (1997) Glucose induced
28 insulin secretion is impaired and insulin induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor
29 substrate-1 are increased in protein deficient rats. *J.Nutr.* 127: 403-410.
30
- 31 Sanches-Magalet, V., Goldfine, I.D., Vlahos, C.J. & Sung, C.K. (1994) Role of phosphatidylinositol 3-kinase in
32 insulin receptor signaling: studies with the inhibitor LY 294002. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446-452.
33
-

-
- 1 Scheynius, A. & Taljedal, I.B. (1971) On the mechanism of glucose protection against alloxan toxicity. *Diabetologia*
2 7: 252-255.
- 3 Scott, A.M., Atwater, I. & Rojas, E. (1981) A method for the simultaneous measurement of insulin release and B
4 cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* 21: 470-475.
- 5
- 6 Smith, S.R., Edgar, P.Z., Pozefsky, J., Chetri, M.K. & Pou, T.E. (1975) Insulin secretion and glucose tolerance in
7 adults with protein calorie malnutrition. *Metabolism*. 24: 1073.
- 8
- 9 Smith, P.A., Sakura, H., Coles, B., Gummerson, N., Proks, P. & Aschcroft, F.M. (1997) Electrogenic arginine
10 transport mediates stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic B cells. *J. Physiol.* 499: 625-635.
- 11
- 12 Stephens, J.M. & Pilch, P.F. (1995) The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT 4, the major insulin-
13 responsive glucose transporter. *Endocrine Reviews* 16: 529-546.
- 14
- 15 Torun B. & Chew F. (1994) Protein-energy malnutrition. In Shils, M.; Olson, J.A; Shike, M. (eds) *Modern Nutrition*
16 in health and Disease, v. 2, Philadelphia, Lea & Febiger, p. 950-976. without impairing glucose metabolism.
- 17 *Endocrinology* 127: 2290-2297.
- 18 Young, R. & Dixit, P.K. (1980) Lack of diabetogenic effect of alloxan in protein-calorie malnourished rats. *J.Nutr.*
19 110: 703-709.
- 20
-

Table 1. Serum total protein, albumin and free fatty acids (FFA) of the rats fed the low (LP) and the normal (NP) diets at the 80Th day of life³

Groups	Total protein (g/L)	Albumin (g/L)	FFA (μEq/L)
NP (25)	62±2	27±1	580±15
LP (25)	43±2*	21±1*	650±17

³ Results are mean ± SEM, with the number of rats in parenthesis. * Significantly different (p<0.05, t test) from NP rats

Table 2. Body weight gain, food intake, water intake and serum glucose of the rats fed the low (LP) and the normal (NP) diets before and after alloxan (A) administration⁴

Groups	Body weight gain (g/day)	Food intake ⁻¹ (g.day ⁻¹ .100g ⁻¹)	Water intake ⁻¹ (mL.day ⁻¹ .100g ⁻¹)	Serum glucose (mmol/L)
NP (25) ⁵	3.95±0.25	8.76±1.49	29.38±2.07	6.54±0.27
NP-A (25) ⁶	-0.57±0.72	15.80±0.14	89.56±6.98	19.33±2.73
LP (25) ²	1.84±0.38*	19.78±1.13*	31.61±5.50	5.44±0.22
LP-A (25) ³	1.49±0.42*	5.97±1.98*	20.51±8.36*	5.86±0.32*

⁴ Results are mean ± SEM, with the number of rats in parenthesis. * Significantly different (p<0.05, t test)

⁵ Refer to a 69-days period.

⁶ Refer to a 7-days period.

Table 3. Serum and pancreas insulin concentrations of the rats fed the low (LP) and the normal (NP) diets after alloxan administration⁷

Groups	Serum (nmol/L)	Pancreas (ng/g)
NP (5)	0.13±0.02	12.05±4.65
LP (5)	0.18±0.02	36.50±11.88*

Results are mean ± SEM, with the number of rats in parenthesis. * Significantly different (p<0.05, t test) from NP rats

⁷ Results are mean ± SEM, with the number of rats in parenthesis. * Significantly different (p<0.05, t test) from NP rats

Table 4. Area under glucose (AG) curve and insulin (AI) curve) during the glucose tolerance test, serum glucose disappearance (Kitt) rates and diabetes (serum glucose in the fed state >13.75 mmol/L) incidence in the rats fed the low (LP) and the normal (NP) diets after alloxan administration.

Groups	AG ¹ (mmol/120min)	AI ¹ (nmol/120min)	Kitt ¹ (%/min)	Diabetes incidence ² (%)
NP (7)	2304±509	15.9±1.4	0.56±0.027	84.6
LP (7)	982±194*	13.6±3.3	0.841±0.095	25.0*

¹ Results are mean ± SEM, with the number of rats in parenthesis. * Significantly different (p<0.05, t test) from NP rats.

² Expressed as percent of the total number of rats (25) injected with alloxan. * Significantly different (p<0.05, test for comparison between two proportions)

Table 5. Effects of alloxan on insulin release by pancreatic islets isolated from the rats fed the low (LP) and the normal (NP) diets.¹

GROUP / Condition	GLUCOSE (mmol/L)	ARGININE (mmol/L)	ALLOXAN (mmol/L)	INSULIN RELEASASE (ng.mL ⁻¹ .60min ⁻¹)	REDUCTION IN RELEASE (%)
NP /					
1 (12)	2.8	-----	-----	0.36±0.07	
2 (12)	22.0	-----	-----	7.25±0.84*a	
3 (12)	22.0	-----	0.05	1.56±0.18*ab	78.8 (vs. 2)
4 (12)	2.8	20.0	-----	2.20±0.22*a	
5 (12)	2.8	20.0	0.05	1.17±0.15*ac	46.8 (vs. 4)
LP /					
6 (12)	2.8	-----	-----	0.35±0.06	
7 (12)	22.0	-----	-----	5.01±0.47*df	
8 (12)	22.0	-----	0.05	2.64±0.19*def	47.3 (vs. 7)
9 (12)	2.8	20.0	-----	0.81±0.14*df	
10 (12)	2.8	20.0	0.05	0.67±0.05*df	17.2 (vs. 9)

¹ Isolated islets were first incubated for 30 min in Krebs Bicarbonate medium containing glucose (5.6 mmol/L), in absence or presence of alloxan (0.05mmol/L) and then further incubated for 60 min in Krebs Bicarbonate medium containing glucose (2.8 or 22.0 mmol/L) or arginine (20.0 mmol/L) plus glucose (2.8mmol/L). Results are mean ± SEM with the number of experiments in parenthesis. * Significantly different (p<0.05, ANOVA) from: a) condition 1; b) condition 2; c) condition 4; d) condition 6; e) condition 7 and f) corresponding NP condition.

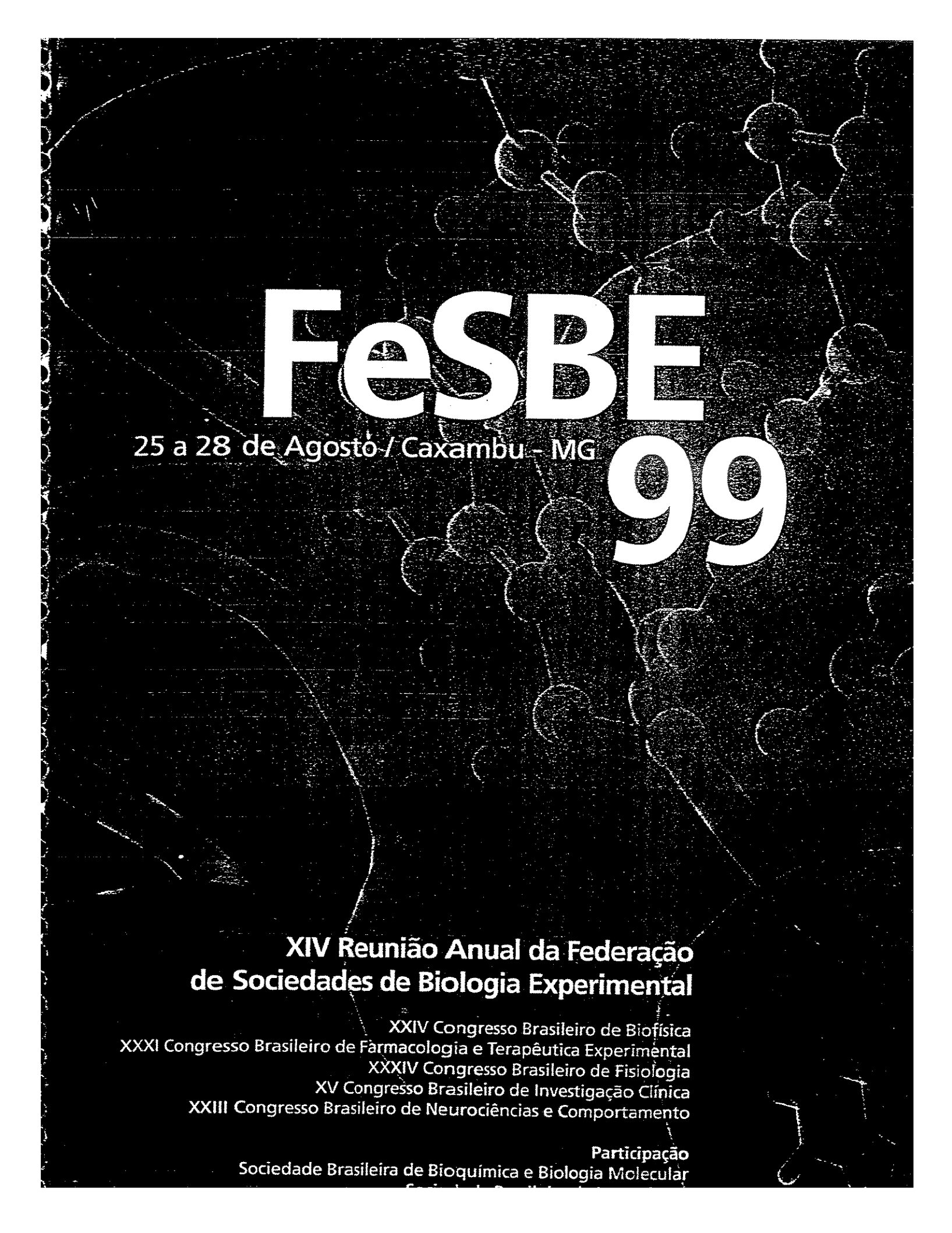
Table 6. Effects of alloxan on glucose oxidation by pancreatic islets isolated from the rats fed the low (LP) and the normal (NP) diets.¹

GROUP / Condition	GLUCOSE (mmol/L)	ALLOXAN (mmol/L)	GLUCOSE OXIDATION (pmol.islet ⁻¹ .60 min ⁻¹)	REDUCTION IN OXIDATION (%)
NP /				
1 (12)	16.7	-----	686±97	
2 (12)	16.7	0.05	304±15*b	55.7 (vs. 1)
LP /				
3 (12)	16.7	-----	159±12*a	
4 (12)	16.7	0.05	123±4*ac	16.4 (vs. 3)

¹ Isolated islets were first incubated for 30 min in Krebs Bicarbonate medium containing glucose (5.6 mmol/L), in absence or presence of alloxan (0.05mmol/L) and then further incubated for 60 min in Krebs Bicarbonate medium containing glucose (2.8 or 22.0 mmol/L) or arginine (20.0 mmol/L) plus glucose (2.8mmol/L). Results are mean ± SEM with the number of experiments in parenthesis. * Significantly different (p<0.05, ANOVA) from: a) condition 1; b) condition 2; c) condition 4; d) condition 6; e) condition 7 and f) corresponding NP condition.

APÊNDICE 3

Resumos publicados em Anais de Congresso contendo dados inseridos na presente Tese.



FESBE

25 a 28 de Agosto / Caxambu - MG

99

XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental

XXIV Congresso Brasileiro de Biofísica
XXXI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental
XXXIV Congresso Brasileiro de Fisiologia
XV Congresso Brasileiro de Investigação Clínica
XXIII Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento

Participação
Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular

Metabolismo

10.021 a 10.038

10.021

EFEITO DA ALOXANA SOBRE A LIBERAÇÃO DE INSULINA POR ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA. Prada, F.J.A.¹, Carneiro, E.M.¹, Luciano, E.², Boscherio, A.C.¹, Mello, J.A.R.¹ ¹Departamento de Fisiologia, I.B., Unicamp, Campinas, SP; ²Departamento de Educação Física, I.B., Unesp, Rio Claro, SP.

Objetivo: A desnutrição protéica associa-se ao hipoinsulínismo e a alterações do metabolismo glicídico. Por outro lado, pode atenuar a manifestação do diabetes experimental em roedores. No presente trabalho avaliamos a liberação de insulina por ilhotas pancreáticas, de ratos deficientes em proteína tratados com aloxana "in vitro".

Métodos: Ratos Wistar (21 dias) alimentados por 60 dias com dieta normo (NP = 17%) ou hipo (HP = 6%) protéica tiveram suas ilhotas isoladas pela colagenase, e estimuladas com glicose (2.8, 5.6 ou 20.0 mM) ou arginina (glicose 2.8 + arginina 20.0 mM), na ausência ou presença de aloxana (0.05 mM). Foram avaliadas liberação de insulina e oxidação de glicose.

Resultados: A aloxana reduziu: (1) a liberação de insulina pelas ilhotas NP (78%) e HP (47%), estimuladas por glicose 20.0 mM; (2) a oxidação de glicose pelas ilhotas NP (53%) e HP (33%) na presença de glicose 5.6 mM e (3) a liberação de insulina pelas ilhotas NP (53%) e HP (33%) estimuladas por arginina (20.0 mM). **Conclusão:** A deficiência protéica atenuou os efeitos da aloxana sobre a liberação de insulina induzida por glicose e arginina. Este efeito pode dever-se, em parte, ao menor comprometimento da oxidação de glicose apresentado pelas ilhotas HP.

Apoio financeiro: FAPESP/CNPq/FINEP-PRONEX/CORN Products Brasil

10.022

EFEITO DA POLPA DE LARANJA/GOMA GUAR (PLG) SOBRE O TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT) EM RATOS WISTAR ADULTOS NORMAIS E DIABÉTICOS. *Magri, L.D.P.; *Gomes Marcondes, M.C.C.; **Reyes, F.G.R.; *Araújo, M.A. ^{*} Depto. Fisiologia e Biofísica, IB; ^{**} FEA, Unicamp, Campinas - S.P.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das fibras alimentares presentes na polpa de laranja associadas à goma guar (PLG) sobre a tolerância à glicose em ratos machos adultos normais e diabéticos. **Material e Métodos:** O diabetes foi induzido com injeção de aloxana (40mg/Kg de peso corpóreo) na veia dorsal do pênis. Posteriormente, ratos normais (N) e diabéticos (D), após jejum de 12 horas, foram submetidos à administração de glicose (0,15g/100g de peso corpóreo) com zero (N e D) e 1,5g/mL da PLG (grupos NF e DF) em volume de 4 mL por sonda orogástrica. Foram coletadas amostras de sangue venoso aos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após a sobrecarga oral de glicose e determinada a glicemia (mg/dL) pelo método glicose-oxidase.

Resultados:

GLICEMIA (mg/dL) / TEMPO (minutos)					
GRUPOS	0	30	60	90	120
N	69.4	199.7	156.3	122.1	72.3
(N)	±17.3	±14.9	±22.8	±14.1	±17.7
DF	74.0	126.3	117.6*	114.2*	87.4
(D)	±15.1	±12.7	±12.5	±10.4	±15.7
D	296.7	437.8	446.7	453.1	373.3
(D)	±35.2	±57.1	±83.1	±99.6	±30.3
DF	301.8	324.6*	336.3*	338.7*	351.6
(D)	±54.3	±47.3	±37.6	±29.3	±36.1

média ± desvio padrão; p < 0,05 = (*) N x NF; (*) D x DF; n = 8

Conclusões: Os resultados indicam que a mistura PLG proporcionou redução da elevação da glicemia pós-prandial podendo contribuir para a melhoria do estado fisiopatológico do diabetes.

Apoio financeiro: Fapesp (nº processo 97/06108-3)

10.023

HOMEOSTASE GLICÊMICA EM RATOS DE 6 MESES E 1 ANO DESNUTRIDOS NO INÍCIO DA LACTAÇÃO. *Caldeira Filho, J. S.¹; *Pinto, A. M. S.¹; *Costa, C. L.¹; *Moura, A. S.² ¹DCFA/BUERJ; ²DNA/NU/BUERJ.

Objetivo: Avaliar a homeostase glicêmica em animais idosos (6 meses e 1 ano) desnutridos no início da lactação. **Métodos e Resultados:** Ratos Wistar com 6 meses e 1 ano foram divididos em dois grupos: grupo controle (GC) com dieta com 25% de proteína e grupo desnutrido (GD) cujas mães, durante os 10 primeiros dias de lactação, receberam dieta com 0% de proteína. Os protocolos experimentais foram divididos em: clameamento euglicêmico (glicose 10 mg/Kg/min); clameamento euglicêmico seguido de hiperinsulinêmico (insulina 1.67 mU/Kg/min), ambos com retirada de amostras de sangue em intervalos regulares de tempo. A glicemia foi obtida através de método enzimático. Aos 6 meses a glicemia de jejum foi de 88.85 ± 3.5 mg/dL (GC) e 99.91 ± 9.37 mg/dL (GD). Após 30 minutos de infusão contínua de glicose (10mg/Kg/min) a glicemia plasmática elevou-se para 211.9 ± 14.2 mg/dL (GC) e 195.78 ± 9.3 (GD), mantendo-se em torno de 227.26 ± 2.65 mg/dL e 191.47 ± 3.5 mg/dL (GC) e (GD) respectivamente. Com a infusão de insulina (1.67mU/Kg/min) 50 minutos após o clameamento euglicêmico a glicemia plasmática, aos 90 minutos, encontrava-se reduzida para 160.96 ± 14.6 mg/dL (GC) e 137.24 ± 11.15 mg/dL (GD). Com 1 ano a glicemia de jejum foi de 113.14 ± 5.7 mg/dL (GC) e 83.8 ± 7.01 mg/dL (GD), elevando-se com a infusão de glicose para 202.19 ± 7.8 mg/dL (GC) e 204.26 ± 23 mg/dL (GD) em 30 minutos, mantendo-se em 198 ± 5.8 mg/dL (GC) e 214.97 ± 5.89 mg/dL (GD). Com infusão de insulina em 50 minutos a glicemia plasmática, aos 90 minutos, reduziu para 195.7 ± 11.4 mg/dL (GC) e (GD) 170.01 ± 5.2 mg/dL. **Conclusão:** A desnutrição no início da lactação determina alteração da homeostase glicêmica através de aumento da sensibilidade à insulina na prole quando adulta.

Apoio financeiro: FAPERJ, CNPq e CNEN.

10.024

SENSIBILIDADE À INSULINA EM RATOS LACTANTES DESNUTRIDOS. Fernandes, P.M.; Pinto, A.M.S.; Guimarães, E.S.; Moura, A.S. (DCFA/BUERJ).

Objetivo: Considerando que o leite de ratas desnutridas no início da lactação induz filhotes com homeostase glicêmica alterada e a ação da insulina está associada à síntese de leite. Neste estudo, avaliamos as alterações da sensibilidade à insulina em ratas desnutridas no início da lactação.

Métodos e Resultados: Estudamos ratas Wistar lactantes divididas em 4 grupos: LC8, alimentadas com dieta 25% de proteína, LD8 com 0% de proteína durante os oito primeiros dias de lactação. LC21 e LD21 respectivamente com dietas 25% e 0% de proteína durante dez dias de lactação. Após a restrição os grupos foram nutridos com dieta 25% de proteína até o 21º dia de lactação. No estudo da glicemia de jejum, do teste de tolerância à glicose intravenoso (TTGV), do clameamento euglicêmico (CE) e o clameamento euglicêmico hiperinsulinêmico (CEH), utilizou-se método enzimático de dosagem de glicose. Como resultados, observou-se diferença significativa na glicemia de jejum no 8º dia (LC8: 103.2 mg/dL ± 11.5 e LD8: 76.3 mg/dL ± 9.3) (n=5) e no 21º dia (LC21: 85.1 mg/dL ± 13.1 e LD21: 102.7 mg/dL ± 6.4) (n=5). Após infusão contínua de solução de glicose na razão de 10 mg/kg/min a glicemia manteve-se elevada (LC8: 217.1 mg/dL ± 3.9 e LD8: 193.8 mg/dL ± 3.1) (n=5) e (LC21: 172.7 mg/dL ± 2.4 e LD21: 162.1 mg/dL ± 3) (n=5). Com a adição de insulina (1,67 mU/kg/min.), aos 50 minutos após o início da infusão, houve redução da glicemia nos grupos controle, indicando maior sensibilidade à insulina: (LC8: 93.9 mg/dL ± 21.3 e LD8: 126.1 mg/dL ± 29) (n=5) e (LC21: 56.4 mg/dL ± 5.4 e LD21: 112.5 mg/dL ± 9.8) (n=5).

Conclusões: Os resultados indicam que a desnutrição no início da lactação induz diminuição da sensibilidade periférica à insulina nas lactantes.

10.025

CARTILAGEM DE TUBARÃO NO PROCESSO DE ESTÍMULO SECREÇÃO DE INSULINA. *Casemiro, J. P.; *Felzenswalb, I. (DB/BUERJ); *Moura, A. S. (DCFA/BUERJ).

Objetivo: Cartilagem de tubarão (CT) é uma substância rica em cálcio, fósforo, minerais e proteínas. Possui efeito anti-inflamatório e tem sido demonstrado efeito positivo no tratamento de doenças tais como: câncer, osteoporose, artrite, psoríase e diabetes mellitus. Neste estudo avaliamos a ação da CT na secreção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas. **Métodos e resultados:** Foram utilizados ratos Wistar machos com 3 meses de idade e aproximadamente 240 gramas. Após a retirada do pâncreas as ilhotas de Langerhans foram isoladas através do método da colagenase. Com ilhotas foram colocadas na câmara de perfusão e perfundidas com solução de Krebs contendo 2.8 mM de glicose durante 30 minutos. Em seguida no grupo de ilhotas perfundidas com 2.8 mM glicose foi adicionado a CT (diluição de 100 mg de CT puro em 4 mL de DMSO-dimetilsulfóxido) durante 30 minutos e após este período, novamente perfundiu-se a solução inicial com 2.8 mM glicose (GCT). A insulina secretada foi coletada no perfusado (1 mL/min.) e posteriormente dosada pelo método de radioimunoensaio por duplo anticorpo. Comparou-se o efeito de CT com ilhotas perfundidas continuamente com 2.8 mM glicose por 90 minutos (GC2.8), assim como, com ilhotas perfundidas com concentrações estimulatórias de 15.6 mM glicose durante 30 minutos (G15.6). Os resultados indicam que no grupo GC2.8 não ocorreu estimulação, havendo estimulação na secreção de insulina no grupo GCT (9.08 ± 1.4 ng/mL/30 min.) comparável a estimulação no grupo G15.6 (11.78 ± 3.4 ng/mL/30 min.).

Conclusão: Os resultados sugerem que a CT possui efeito estimulatório sobre a secreção da insulina.

Apoio financeiro: FAPERJ e CNPq.

10.026

BALANÇO ENERGÉTICO DE RATAS DIABÉTICAS PRE-NHES. Yamada, R.¹; Griggio, M.A.¹; Luz, J. ¹Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de São Paulo.

Objetivos: A gestação altera diversos parâmetros do balanço energético. O diabetes mellitus afeta o metabolismo dos principais nutrientes do organismo animal. O objetivo deste estudo foi o de verificar o efeito do diabetes mellitus no balanço energético de ratas gestantes e não gestantes.

Métodos e Resultados: Foram utilizados 4 grupos de ratas Wistar EPM-1: não gestantes controle (NGC), gestantes controle (GC), não gestantes diabéticas (NGD) e gestantes diabéticas (GD). O diabetes foi induzido por injeção intraperitoneal de streptozotocina (60 mg/kg) em dose única. Nas primeiras 48 horas após a injeção, os animais receberam solução glicosada oferecida nas doses de 2,5% e 5,0%. Após esse período, os animais receberam insulina de forma a manter uma glicemia de no mínimo 250 mg/dL. No décimo quinto dia após a injeção as ratas foram separadas em gestantes e não gestantes. No 21º dia correspondente ao período de gestação, os animais foram sacrificados e suas carcaças, fezes e urina foram preparados para análise energética em calorímetro adiabático. Os valores de gasto energético (GT), ganho de energia (GN) e energia metabolizável (EM) das ratas estão na tabela abaixo como médias ± SEM e o valor de N entre parênteses. Para cada parâmetro, valores com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,05) ANOVA, seguida de teste de Tukey:

	NGC (8)	GC (5)	NGD (9)	GD (4)
GT (kJ)	3537 ± 176*	4194 ± 198*	5236 ± 332*	5277 ± 270*
GN (kJ)	284 ± 65*	1058 ± 127*	-2 ± 78*	170 ± 125*
EM (kJ)	3775 ± 198*	5361 ± 177*	4592 ± 63*	5447 ± 153*

Conclui-se que o diabetes levou a uma redução significativa no ganho de energia em relação aos animais não diabéticos. Essa alteração decorre de uma tendência a um maior gasto energético com o mesmo nível de ingestão alimentar apresentado por esses animais. **Apoio Financeiro:** Universidade de Mogi das Cruzes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

II SIMPÓSIO MIGUEL COVIAN



23 A 25 DE AGOSTO DE 1998

METABOLISMO GLICÍDICO EM RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTÉICA TRATADOS COM ALOXANA. Prada, F. J. A.^{*1}, Luciano, E.^{*2}, Carneiro, E. M.^{*2}, Boschero^{*1}, A. C., Mello, M. A. R.^{*2};

^{*1}Dep. de Fisiologia e Biofísica, IB, UNICAMP, Campinas; ^{*2}Dep. de Ed. Física, IB, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

Objetivo: A desnutrição infantil pode induzir o diabetes em adultos, pois afeta a secreção de insulina consequentemente o metabolismo de carboidratos. Por outro lado estudos com ratos mostraram que a desnutrição protéica pode atenuar a manifestação do diabetes experimental. No presente trabalho estudamos os efeitos da ingestão de dieta hipoprotéica e da administração de aloxana sobre o metabolismo glicídico de ratos.

Métodos: Foram utilizados ratos Wistar (21 dias), separados em 2 grupos, de acordo com a dieta: controles (C)- normoprotéica (17%) e desnutridos (D)- hipoprotéica (6%). Ao final de 60 dias de ingestão da dieta, os animais receberam injeção de aloxana (40mg/kg,i.v.) para indução de diabetes. Foram avaliados glicemia e insulinemia basais, incidência de diabetes (glicemia > 250 mg/dl), insulina do pâncreas e área de Glicose (ΔG) e área de Insulina (ΔI) sob as curvas de glicose e insulina durante teste de tolerância à glicose oral.

Resultados: A glicemia foi menor no grupo D ($106,6 \pm 5,86$) que no grupo C ($351,6 \pm 49,7$ mg/dl) e a insulinemia não diferiu entre os grupos (C = $0,80 \pm 0,10$; D = $1,05 \pm 0,12$ ng/ml). A incidência de diabetes foi maior no grupo C (84,6%) do que no grupo D (25%). A insulina do pâncreas foi maior no grupo D ($36,52 \pm 11,88$) do que no grupo C ($12,05 \pm 4,65$ ng/mL). A ΔG após administração de aloxana foi maior no grupo C ($41889,9 \pm 9264$) do que no grupo D ($17858,2 \pm 2974,5$ mmol/L/120 min.), não havendo diferença significativa entre os ΔI de ambos os grupos (C = $83,3 \pm 13,6$ e D = $78,4 \pm 19,1$ mmol/L/120 min.).

Conclusão: Estes resultados sugerem que a desnutrição protéica atenuou os efeitos da aloxana sobre o metabolismo glicídico dos animais.

Apoio Financeiro: FAPESP/CNPq



III CONGRESSO PAULISTA DE DIABETES E METABOLISMO

21 a 24 de Maio de 1998
Ataúba de Jundiaí - SP

Métodos e Resultados: Ratos Wistar machos neonatos tratados com NaCl 0.9%(C) ou aloxana(40mg/Kg p.c.) no 2º (2D) e 5º (5D) dias de vida mediante injeção única i.p. de NaCl ou aloxana após 8 horas de privação alimentar, foram submetidos, na 10ª sem. pós injeção, ao teste de tolerância a glicose (TTG, 50mg/100gp.c) sob anestesia com pentobarbital sódico (50mg/Kg p.c.) i.p. após 6 horas de jejum. As amostras coletadas de sangue venoso jugular para glicemia (G) e insulinemia (I) aos 0,5, 15, 30 e 60 min revelaram um déficit na resposta pancreática à sobrecarga de glicose avaliado pelo índice $\Delta I/\Delta G$ (variação de I sobre a variação de G) no intervalo de 0-5min (0.1 ± 0.01 n=8 para 2D; 0.07 ± 0.02 n=13 para 5D e 0.18 ± 0.04 n=11, para C, $p < 0.05$). A relação I/G das áreas sob a curva do grupo 5D (0.14 ± 0.03 n=13) foi inferior às dos grupos C (0.37 ± 0.06 n=11, $p < 0.01$) e grupo 2D (0.33 ± 0.03 n=8, $p < 0.05$). No sacrifício (12ª sem), coletaram-se amostras de sangue venoso para I, G e triglicérides (T). A relação I/G dos grupos 2D (0.109 ± 0.012 n=13, $p < 0.05$) e 5D (0.092 ± 0.008 n=13, $p < 0.01$) e o teor pancreático de I foram inferiores (2D, 1.14 ± 0.13 mU de I/mg de prot. totais n=14, $p < 0.05$; e 5D, 0.86 ± 0.17 n=8, $p < 0.01$) aos do grupo C (I/G, 0.153 ± 0.022 n=10; I pancr., 1.76 ± 0.2 n=7); e T foi superior (2D, 100.2 ± 9.0 mg/dL, n=6 $p < 0.05$ e 5D, 113.6 ± 6.6 mg/dL n=13, $p < 0.01$) em relação a C (74.7 ± 6 mg/dL n=7). **Conclusões:** A homeostase glicídica foi prejudicada pelo tratamento neonatal com aloxana, com déficit permanente da secreção e do conteúdo pancreático de insulina.

Apoio financeiro: CNPq e FAFESP.

042

AÇÃO DIABETOGENICA DA ALOXANA EM RATOS SUBMETIDOS A DESNUTRIÇÃO PROTÉICA.

Prada, F. J. A.¹, Luciano, E. ², Cameiro, E. M. ², Mello, M. A. R. ²; ¹Dep. de Fisiologia, IB, UNICAMP, Campinas; ²Dep. de Ed. Física, IB, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

A desnutrição infantil pode induzir o diabetes em adultos, pois afeta a secreção de insulina e o metabolismo de carboidratos. Por outro lado estudos com ratos mostraram que a desnutrição protéica pode atenuar a manifestação do diabetes experimental. O presente trabalho visa ampliar o conhecimento sobre os efeitos da ingestão de dieta hipoprotéica sobre a ação diabetogênica da aloxana, em ratos. Foram utilizados ratos Wistar (21 dias), separados em 2 grupos, de acordo com a dieta: controles (C)- normoprotéica (17%) e desnutridos (D)- hipoprotéica (6%). Ao final de 60 dias de ingestão da dieta, os animais receberam injeção de aloxana (40mg/kg, i.v.) para indução do diabetes. Foram avaliados ganho de peso corporal, glicemia e insulinemia basais, ingestão hídrica e alimentar, incidência de diabetes (glicemia > 250 mg/dl), e insulina do pâncreas. Houve ganho de peso no grupo D ($7,21 \pm 2,66$) mas não no grupo C. A glicemia foi menor no grupo D ($106,6 \pm 5,86$) que no grupo C ($351,6 \pm 49,7$ mg/dl) e a insulinemia não diferiu entre os grupos (C= $0,80 \pm 0,10$;

D= $1,05 \pm 0,12$ ng/ml). A ingestão hídrica foi maior no grupo C ($116,6 \pm 44,7$) do que no grupo D ($81,9 \pm 14,7$ ml/kg), assim como a alimentar (C= $95,4 \pm 44,1$; D= $47,2 \pm 16,9$ g/kg). A insulina do pâncreas foi maior no grupo D ($36,52 \pm 11,88$) do que no grupo C ($12,05 \pm 4,65$ ng/ml). A incidência de diabetes foi maior no grupo C (84,6%) do que no grupo D (25%). Estes resultados sugerem que a desnutrição atenuou a severidade do diabetes induzido pela aloxana nos animais.

Apoio Financeiro: FAPESP/CNPq

043

TRANSFERÊNCIA DE ÁCIDOS GRAXOS ENTRE MACRÓFAGOS E ILHOTAS DE LANGERHANS EM CULTURA.

Garcia Jr., J. R., Curi, R., Carpinelli, A. R. Lab. de Secreção de Insulina e Lab. de Fisiologia Celular, Dep. de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

O processo de secreção de insulina, estimulado principalmente pela glicose, pode ser modulado por ácidos graxos originados da circulação e também por outros lípidos sintetizados após a incorporação dos ácidos graxos pelas ilhotas. Outra possibilidade é de que células circulantes como macrófagos e linfócitos transfiram os lípides para as ilhotas, já que tais células apresentam capacidade de incorporação, síntese e exportação de lípidos quando mantidas em cultura. A transferência de lípidos incorporados em macrófagos para linfócitos co-cultivados tem sido observada. Desse modo, o objetivo deste estudo foi verificar a possibilidade de uma fonte alternativa de lípidos para as ilhotas, envolvendo a transferência de ácidos graxos previamente incorporados por macrófagos, para ilhotas de Langerhans co-cultivadas.

Métodos: Foram utilizadas ilhotas de Langerhans e macrófagos peritoneais de ratos albinos adultos. As ilhotas foram obtidas pelo método da colagenase e cultivadas em meio RPMI suplementado com antibióticos e soro bovino de recém nascido. Os macrófagos foram lavados em salina, ressuspensos e cultivados em meio essencial mínimo de Eagle suplementado com antibióticos e soro bovino fetal. Os ácidos [$U-^{14}C$]-palmitico, [$1-^{14}C$]-oleico, [$1-^{14}C$]-linoleico e [$1-^{14}C$]-araquidônico foram adicionados separadamente ao meio de cultivo no qual os macrófagos permaneceram durante 6h. Então, foi retirado o meio radioativo, adicionado o meio RPMI e as ilhotas para períodos de co-cultivo de 3 e 6 horas. Após separação, macrófagos, ilhotas e meio foram submetidos à extração lipídica. Os lípidos foram fracionados usando cromatografia de camada delgada e a radioatividade de cada banda foi contada.

Resultados: Entre os ácidos graxos utilizados, o que proporcionou maior transferência de radioatividade para as ilhotas foi o ácido araquidônico, tanto no período de 3h ($71,27$ pmol/ 10^6 macrófagos/500 ilhotas) como no período de 6h ($36,07$ pmol/ 10^6 macrófagos/500 ilhotas). A radioatividade transferida a partir dos ácidos graxos concentrou-se principalmente nos fosfolípidos, varian-

APÊNDICE 4

Outros resumos publicados em Anais de Congresso durante o Mestrado.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

II SIMPÓSIO MIGUEL COVIAN



23 A 25 DE AGOSTO DE 1998

EFEITO DA ATIVIDADE FÍSICA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE COLESTEROL DA GLÂNDULA ADRENAL DE RATOS TREINADOS E SEDENTÁRIOS.

¹Azevedo, J.R.M.; ¹Cozzani, M.V.; ²Prada, F.J.A.; Santos, J.W.; ¹Sibuya, C.Y.; ¹Depto de Educação Física, I.B., UNESP, Rio Claro, SP; ²Depto. de Fisiologia e Biofísica, I.B., UNICAMP, Campinas, SP.

Este trabalho foi realizado com objetivo de avaliar o efeito da atividade física com sobrecarga sobre o conteúdo de colesterol da adrenal de ratos Wistar, machos, 60 dias no início do experimento. Em função do treinamento (45 dias de natação com água a $32 \pm 1^\circ\text{C}$, 60 min/dia com carga de 8% do p.c), os ratos foram divididos em dois grupos: Treinados - T e Sedentários - S. Em função do exercício agudo, foram redivididos em quatro grupos: treinados-agudo - TA; Treinados-reposo - TR; Sedentários-agudo - SA; Sedentários-reposo - SR. Imediatamente após o sacrifício, foram extraídas as adrenais e o colesterol foi analisado pelo método enzimático (espectrofotometria, $\lambda = 505 \text{ nm}$). Os resultados expressos como média e desvio padrão foram os seguintes: TA [$2,81 \pm 0,41$ (n=8)]; TR [$3,81 \pm 0,59$ (n=9)]; SA [$3,97 \pm 1,08$ (n=10)]; SR [$3,35 \pm 0,54 \text{ mg/100mg}$]. As diferenças significativas observadas entre os grupos ($P < 0,05$, "test t-student"), levou-nos à seguinte conclusão: Depleção de colesterol no grupo TA em relação ao grupo TR, sugerindo, neste estudo, modificações no metabolismo do colesterol em resposta ao exercício agudo, que estariam sendo requeridas, provavelmente, pelo aumento da síntese de hormônios corticais, em resposta ao treinamento.

Apoio financeiro: FUNDUNESP.



II CONGRESSO PAULISTA DE DIABETES METABOLISMO

21 a 24 de Maio de 1999
Aguas de Lindóia - SP

res de tumor em relação aos controles.

Conclusão: Estes resultados iniciais demonstram um aumento do grau de fosforilação da pp185 e do IR, sugerindo que hajam substâncias secretadas pelo tumor que modulam as etapas iniciais da ação insulínica em tecidos alvo.

Apoio financeiro: FAEP

050

CARACTERIZAÇÃO DAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA EM TUMOR DE WALKER 256 INOCULADO EM RATOS.

¹Bortoleto Jr A*, ¹Pelicioni Fg H*, ¹Campanholi MA*, ²Ritori O, ¹Carvalho CRO*, ¹Saad MJA, ¹Brenelli SL. ¹Depto Clínica Médica e ²Depto Tocoginecologia, FMC, UNICAMP, Campinas.

Objetivo: O tumor de Walker 256 se desenvolve bem em ratos Wistar machos levando-os a caquexia e morte. Há várias evidências demonstrando que a insulina induz a involução destes inóculos. Diante disto, o objetivo deste trabalho é avaliar a presença das proteínas responsáveis pelas etapas iniciais da ação insulínica no tecido tumoral inoculado nos ratos.

Métodos e resultados: Amostras do tumor foram retiradas antes e após 2 minutos da infusão de 6µg de insulina na veia porta. Após a homogeneização e centrifugação os sobrenadantes foram imunoprecipitados com anticorpos anti-receptor de insulina e anti-IRS-1, e submetidos a "immunoblotting" com anticorpo antifosfotirosina. Foram observados aumento do grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 após estímulo insulínico.

Conclusão: Estes resultados iniciais demonstram a presença do receptor de insulina e de seu maior substrato, IRS-1, no tecido tumoral, sugerindo que tenham um papel no mecanismo molecular do desenvolvimento deste tumor.

Apoio financeiro: FAEP

051

EFEITO DA UREMIA SOBRE AS ETAPAS INICIAIS DA SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM FÍGADO E MÚSCULO DE RATOS.

S.L. Brenelli, L. Maeda, C.R.O. Carvalho, M.J.A. Saad - Departamento de Clínica Médica, FCM, UNICAMP, Campinas, SP.

A insulina estimula a atividade tirosina quinase do seu receptor, resultando na fosforilação do seu substrato (IRS-1) e da proteína Shc. O IRS-1 fosforilado associa-se e ativa a PI 3-quinase resultando na captação de glicose. Alterações nesses passos estão relacionadas com resistência à insulina. Demonstra-se que a uremia também está associada à resistência à insulina, entre-

tanto os mecanismos moleculares como as alterações são conhecidos. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da uremia sobre a fosforilação de receptor insulina e de seu substrato, da fosforilação da proteína Shc e da associação IRS-1/PI 3-quinase em fígado e músculo de ratos, através da imunoprecipitação, imunoblotting com anti corpo anti receptor de insulina, anti-IRS-1, anti-Shc, anti fosfotirosina e anti-PI 3-quinase.

Nossos resultados mostraram um aumento no nível de receptor de insulina em músculo e fígado dos ratos urêmicos. Após a estimulação com insulina, esses ratos demonstraram aumento na fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1 e da proteína Shc nos dois tecidos. Por sua vez, a associação IRS-1/PI 3-quinase demonstrou-se aumentada em tecido muscular, porém diminuída em tecido hepático. Em conclusão, a resistência insulínica neste modelo animal é associada com um aumento da fosforilação do receptor de insulina, IRS-1 e Shc em ambos os tecidos. No fígado, a diminuição da associação IRS-1/PI 3-quinase pode ter um papel na resistência insulínica de animais, mas em músculos a redução da ação insulínica é provavelmente distal à fosforilação do IRS-1 e do Shc.

052

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ASCORBATO (VITAMINA C) ASSOCIADA AO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO SOBRE O NÍVEL DE LACTATO E CORTISOL PLASMÁTICOS DE COBAIAS.

Prada¹, F.J.A.; Neiva¹, C.M.; Azevedo², J.R.M.; Gallan³, M.C.B.J.; Santos⁴, S. A. ¹Depto. Fisiologia Biofísica, IB, UNICAMP, Campinas, SP; ²Depto. de Física, IB, Rio Claro, SP; ³EMBRAPA, Corurup, MS; ⁴Faculdades de Ciências Médicas (FCM), UNICAMP, Campinas, SP.

Neste trabalho avaliou-se a concentração de cortisol e de lactato plasmáticos de cobaias exercitadas e suplementadas oralmente com ascorbato. (© Redo 50 mg/Kg/p.c.). Cobaias (*Cavia porcellus*) fêmeas jovens, pesando inicialmente 300 ± 42g foram distribuídas em quatro grupos: Hipervitamínicas exercitadas: HE; Hipervitamínicas em repouso: HR; Normais exercitadas: NE; Normais em repouso: NR. O exercício físico (45 de natação, 30 min/dia) foi realizado num tanque de água aquecida a 32 ± 1°C. O cortisol determinado por radioimunoensaio e o lactato pelo método eletroquímico forneceram estes resultados: Cortisol: HE [(n=8) 8,08 ± 3,55]; HR [(n=6) 2,36 ± 1,01]; NE [(n=6) 10,66 ± 2,90]; NR [(n=6) 3,72 ± 1,72] 100mL. Lactato: HE [(n=7) 7,04 ± 2,87]; HR [(n=7) 1,57 ± 1,02]; NE [(n=6) 5,02 ± 2,07]; NR [(n=5) 0,67mM]. A partir das diferenças significativas observadas entre os subgrupos (P<0,05) pôde-se chegar às seguintes conclusões: O aumento da concentração de cortisol parece ter sido influenciado nas pelo exercício físico e o aumento do nível de lactato pelo exercício e suplementação vitamí-

sugerindo a interferência metabólica do ascorbato com relação a este produto energético.

Apoio financeiro: FUNDUNESP

053

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ASCORBATO ASSOCIADA À ATIVIDADE FÍSICA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO EM RATOS EXERCITADOS

¹Hirata, R.; ²Prada, F.J.A.; ³Andreotti, R.; ¹Sibuya, C.Y.; ¹Moraes, M.A.; ¹Azevedo J.R.M. ¹Depto de Educação Física, I.B., UNESP, Rio Claro, SP; ²Depto. de Fisiologia e Biofísica, I.B., UNICAMP, Campinas, SP; ³EMBRAPA, Campo Grande, MS.

Atualmente atletas e esportistas têm usado deliberadamente grandes doses de vitamina C com o intuito de melhorar o rendimento físico. Este trabalho foi realizado com objetivo de avaliar os efeitos dessa vitamina associada à atividade física sobre o conteúdo de glicogênio hepático de ratos Wistar, machos, 60 dias no início do experimento. Em função do treinamento (45 dias de natação com água aquecida a $32 \pm 1^\circ\text{C}$, 60 min/dia com sobrecarga de 8% do p.c.) e da administração da suplementação intragástrica de ascorbato (©Redoxon 50 mg/Kg/p. c.), os animais foram divididos em quatro grupos: treinados-vitaminados - TV; sedentários-vitaminados - SV; treinados-normais - TN; sedentários-normais - SN. Imediatamente após o sacrifício, foram extraídos fragmentos de tecido hepático e o glicogênio foi analisado no espectrofotômetro. Os resultados expressos como média e desvio padrão foram os seguintes: **Glicogênio:** TV [$9,04 \pm 1,54$ (n=10)]; SV [$5,38 \pm 1,11$ (n=10)]; TN [$6,49 \pm 2,36$ (n=10)]; SN [$5,95 \pm 1,33$ mg/100mg (n=10)]. As diferenças significativas observadas entre os grupos ($P < 0,05$, "test t-student") levaram-nos à seguinte conclusão: Houve um considerável aumento do glicogênio hepático no grupo TV em relação aos grupos TN e SV, sugerindo a influência conjugada do treinamento e da suplementação vitamínica sobre o metabolismo deste substrato energético.

Apoio financeiro: FUNDUNESP.

054

ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE RNAs MENSAGEIROS DE COMPONENTES DO SISTEMA PROTEOLÍTICO DEPENDENTE DE ATP E UBIQUITINA EM MÚSCULOS DE COELHOS APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE DEFICIÊNCIA INSULÍNICA.

E. A. Evangelista¹, V. D. Galban², R. H. Migliorini² and I. C. Kettelhut² - ¹Departamento de Ciências Biológicas - ICEB - UFOP, 35400-000 Ouro Preto - MG and ²Departamento de Bioquímica - FMRP-USP, 14049-900 Ribeirão Preto - SP

Verificamos anteriormente que a proteólise dependente de ATP e ubiquitina (Ub) em extratos musculares sofre alterações conforme o tempo decorrido desde a indução do diabetes aloxânico em coelhos machos pesando em torno de 2 kg, sendo mais elevada (até 113%), relativamente aos controles, após 3 e 5 dias desde a administração de aloxana e mais baixa (48%) em relação aos controles, após 15 dias. Neste trabalho, procuramos estudar, em músculo esquelético de coelhos, a expressão dos RNAs mensageiros de três componentes dessa via proteolítica: Ub, a subunidade C2 do proteassoma e a enzima conjugadora de Ub (E2-14 kDa), a fim de verificar se esta sofre alterações com o diabetes e sua duração, como ocorre com a atividade proteolítica.

Métodos: Músculos *psaos* de coelhos controles, diabéticos (por administração intravenosa de aloxana: 115 mg/kg de peso corporal em 4 ml de salina) por 5 e 15 dias, bem como de coelhos diabéticos tratados com injeções subcutâneas diárias de insulina suína (5 UI/kg de peso corporal) foram removidos (após sacrifício dos animais com éter etílico), rapidamente congelados em nitrogênio líquido e homogeneizados com Tri-Reagent (Molecular Res. Center Inc.) para extração de RNA total. Em seguida, foram feitas eletroforeses em géis de agarose a 1%, contendo formaldeído 0,2M. Os RNAs foram então transferidos para membranas de Nylon e hibridizadas a 65°C com sondas de cDNAs (de Ub, C2-proteassoma e E2-14 kDa) marcadas com ³²P, preparadas pelo método "random primer". Após lavagem, as membranas foram expostas a filme X-OMAT para autorradiografia. A quantificação foi feita por densitometria das bandas obtidas.

Resultados: Obtivemos um aumento na expressão dos três RNAs mensageiros (427% para Ub, 171% para C2 e 370% para E2, em relação aos controles) após 5 dias de diabetes e uma redução subsequente na expressão dos três componentes (-27% para Ub, -18% para C2 e 40% para E2, relativamente aos controles). O tratamento dos coelhos com insulina reverteu a expressão dos três RNAs para valores semelhantes aos controles.

Conclusões: Estes resultados se correlacionam com o perfil temporal das atividades proteolíticas, indicando que a atividade dependente de ATP e ubiquitina sofre regulação transcricional, participando de uma resposta adaptativa à situação de deficiência crônica de insulina.

Auxílio financeiro: FAPESP, CAPES (PICDT), CNPq

055

ATIVIDADE DAS ENZIMAS GLICOSE-6-FOSFATO-DESHIDROGENASE, ENZIMA MÁLICA E ATP-CITRATO-LIASE NO TECIDO ADIPOSITO DE RATOS ADAPTADOS À DIETA HIPERPROTÉICA (HP).

Brito, S. M. R. C.^{**}, Moura, M. A.^{**}, Kawashita^{**}, N. H., Garófalo, M. A. R.; Kettelhut, I. C., Migliorini, R. H., Departamento de Bioquímica, FMRP-USP.

Objetivos: Estudos anteriores realizados neste la-