

ANGELA REGINA NAZÁRIO SABBAG

**AÇÃO DA NICOTINAMIDA E DA ESTREPTOZOTOCINA
NO PROCESSO ESTÍMULO SECREÇÃO DE INSULINA
EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador:
Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

CURITIBA
2000



PARECER

Parecer Conjunto dos Professores Dr. Paulo Cesar Freitas Mathias, Dr.^a Margaret Boguszewski e Dr. João Carlos Domingos Repka sobre a Dissertação de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada pela **Dr.^a Angela Regina Nazário Sabbag**, intitulada “**AÇÃO DA NICOTINAMIDA E DA ESTREPTOZOTOCINA NO PROCESSO ESTÍMULO – SECREÇÃO DE INSULINA EM ILHOTAS**”

A Banca Examinadora considerou que a **Dr.^a Angela Regina Nazário Sabbag**, apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas argüições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe **Conceito “ 17 ”**, correspondente ao **Grau “ 10 ”** sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna** e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das argüições.

Curitiba, 18 de abril de 2000.

Prof. Dr. Paulo Cesar Freitas Mathias

Prof.^a Dr.^a Margaret Boguszewski

Prof. Dr. João Carlos Domingos Repka

Dedicatória

À todas as pessoas que dedicam sua vida à pesquisa, na busca da cura para as doenças, em especial para o diabetes.

Agradecimentos

Ao **Professor Dr. Paulo Cesar de Freitas Mathias**, por ter me recebido e acolhido com tanto carinho em seu laboratório. Por me ouvir, me entender e sobretudo por me estimular na elaboração deste trabalho.

Ao **Professor Dr. João Carlos Domingues Repka**, pelo apoio e orientação durante a realização do trabalho.

À farmacêutica e bioquímica **Gislaine Custódio Piovezan** pela sua dedicação na elaboração dos ensaios para dosagem da insulina.

Ao **Professor Ary Elias Sabbag** pela realização do estudo estatístico.

Às alunas de Pós-graduação da Universidade de Maringá, **Maria Lúcia Bonfleur e Sandra Lucinei Balbo** pela ajuda no isolamento das ilhotas durante a minha estadia em Maringá.

À **Dra Edna de Jesus Litenski Barbosa**, pela ajuda nos passos iniciais na técnica do isolamento das ilhotas.

Ao **Dr Luiz Claudio Bruel de Oliveira** por ter cedido o catéter de polietileno para canalizar o ducto biliar e a tela de náilon para a separação das ilhotas de impurezas.

Aos meus filhos, **Lucas e Leonardo**, por serem crianças saudáveis e compreensivas, o que me ajudou muito nesta caminhada.

Ao meu esposo **Carlos**, que me deu liberdade para trabalhar nas férias, feriados e nos fins de semana, foi companheiro nos momentos críticos e comemorou comigo cada conquista.

À minha mãe do coração, **Janete**, por todo carinho e por me ajudar encontrar forças para não desistir no árduo caminho do conhecimento.

Aos meus pais, **João e Onélia** pelo seu incentivo, pelos bons exemplos e por entenderem a minha ausência.

Aos meus irmãos, **Edjane, Jefferson e Everson Nazário** por estarem sempre comigo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 A CÉLULA BETA PANCREÁTICA	03
2.2 SECREÇÃO DE INSULINA	05
2.3 DIABETES EXPERIMENTAL E STZ	06
2.4 UTILIZAÇÃO DA NICOTINAMIDA NO DIABETES	09
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	15
3.2 ANIMAIS	15
3.3 SOLUÇÕES	16
3.4 PROCEDIMENTOS	17
3.5 DOSAGEM DA INSULINA SECRETADA <i>IN VITRO</i> PELAS ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS	23
4 TRATAMENTO DOS RESULTADOS	25
5 RESULTADOS	26
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES	36
ANEXOS	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA PLACA DE CULTURA DE CÉLULAS TIPO COLSTAR	22
FIGURA 2 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NA SECREÇÃO DE INSULINA	26
FIGURA 3 – EFEITO DA STZ E NCT NA SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR 16,7 mM DE GLICOSE	27
FIGURA 4 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE DURANTE A PRÉ-INCUBAÇÃO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DA STZ	28
TABELA 1 – DEMONSTRATIVO DOS RESULTADOS DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DOS DIFERENTES TRATAMENTOS (PROTOCO EXPERIMENTAL 1)	39
TABELA 2 – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DO USO DAS DROGAS STZ E NCT SOZINHAS OU EM COMBINAÇÃO	40
TABELA 3 – RESULTADOS DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3	41

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a ação da estreptozotocina (STZ) e da nicotinamida (NCT) no processo estímulo secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos Wistar. Para isolamento das ilhotas pancreáticas utilizou-se a técnica de injeção intraductal de colagenase e digestão estacionária durante 15 minutos. Seguindo-se ao isolamento, as ilhotas foram distribuídas em grupos de 4, em placa de cultura tipo Colstar com 24 pocinhos, nos diferentes meios como segue abaixo: atmosfera com O₂ 95% e CO₂ 5%, e banho a 37°C durante 60 minutos para pré-incubação e incubação. Pré-incubação: placa A (n=24) meio contendo apenas glicose a 16,7 mM; placa B e C meio contendo glicose a 16,7mM em todos os grupos e STZ 1,8mM sozinha (n=12), STZ 1,8mM e NCT 20mM (n=12), NCT 20mM sozinha (n=12) e controle (n=12); a placa D tinha concentrações diferentes de glicose a partir de 0mM (n=6), 5,6mM (n=6), 11,1mM (n=6) e 16,7mM (n=6) e a placa E mesmas concentrações de glicose da placa D acrescidas de STZ 1,8mM (n=24). Na incubação, a placa A recebeu concentrações de glicose de 0mM (n=6), 5,6mM (n=6), 11,1mM (n=6) e 16,7mM (n=6); as placas B e C receberam o mesmo tratamento da pré-incubação; a placa D (n=24) recebeu glicose a 16,7mM em todos os grupos e finalmente a placa E (n=24) recebeu glicose a 16,7mM e STZ 1,8mM em todos os grupos. No grupo A, demonstrou-se que o aumento na concentração da glicose foi acompanhado de aumento na liberação de insulina. B e C, obteve-se inibição de 87,84%(p<0,0001) na liberação de insulina na presença da STZ. A NCT inibiu os efeitos da STZ quando foi acrescentada ao meio(p<0,0001). No grupo D, observou-se que quanto menor a concentração de glicose na pré-incubação menor a amplitude da liberação de insulina quando exposta a 16,7mM na incubação. No grupo E, houve bloqueio na liberação de insulina de 77,47%(p<0,0013) e 55,85%(p<0,0001) nas ilhotas tratadas com 11,1 e 16,7mM na presença de STZ.. Frente a esses resultados, concluímos que a pré-incubação com glicose influencia a amplitude da resposta secretória da célula beta na incubação. A concentração da glicose pode interferir na ação da STZ no processo estímulo-secreção da célula beta. A NCT protege a célula beta da toxicidade oferecida pela STZ e isto reforça sua potencial utilidade como agente terapêutico no diabetes Tipo 1.

ABSTRACT

Enhancement of glucose concentration stimulates insulin secretion *in vivo* and *in vitro*. It has been shown that insulin stimulus-secretion coupling is linked to the pancreatic B-cell metabolism activation. Streptozotocin (STZ), a diabetogenic drug acutely inhibits the insulin secretion stimulated by glucose, however nicotinamide (NCT) can attenuate the STZ effect. The present study was prepared to observe the insulin secretory response to high glucose in rat pancreatic islets, which were pretreated with different glucose concentrations in the absence or in the presence of STZ and/or NCT. It was used collagenase digestion technique to isolate pancreatic islets from adult Wistar rats (250±30 g). Using 24 well Costar plates, sets of 4 islets were incubated with 0.5 ml of Krebs-Ringer (K-R) solution/well for 60 min at 37°C and under constant atmosphere of a gas mixture (O₂-95% and CO₂-5%). The (K-R) solution contained different glucose concentrations in the presence or in the absence of 1.8 mM of STZ and/or 20 mM of NCT. After two washes, the islets were again incubated for 60 min in the same conditions as run the previous incubation. After the last treatment aliquots from the supernatant were used to measure the insulin secretion by radioimmunoassay. Results are indicated as mean±SEM. In all protocols were recorded 6-19 observations to each result. In a dose-dependent manner, glucose stimulated insulin release (0 mM 7,09±1,47; 5.6 mM 7,02±1,27; 11.1 mM 56,99±6,39; 16.7 mM 83,05±5,61 μU/islet/ml/60 min) in islets previously incubated with 16.7 mM of glucose. STZ inhibited 87,84% (p<0,0001) the insulin released by glucose 16.7 mM, however NCT was able to block the STZ effect (p<0,0001). NCT alone has no effect on insulin secretion response to 16.7 mM of glucose. In other protocol pretreatment with 0, 5.6, 11.1 and 16.7 mM of glucose dose-dependent-induced insulin release on islets incubated with glucose 16.7 mM (17,31±3,21; 17,16±2,18; 36,74±7,23; 69,34±8,73 μU/islet/ml/60 min; respectively). STZ inhibited 77,47% (p<0,0013) and 55,85% (p<0,0001) the hormone release observed to islets pretreated with 11.1 and 16.7 mM of glucose. At 0 and 5.6 mM of glucose the drug has no effect.

The results indicate that previous glucose ambience might determine the level of insulin release stimulated by high glucose concentration in adult rat pancreatic islets. STZ needs a high metabolism of B-cell to provoke its acute inhibitory effect on insulin secretory response to glucose. NCT protect the B-cells against the STZ effect.

1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é uma síndrome clínica caracterizada pela elevação da concentração da glicose plasmática que leva a complicações a longo prazo, tais como retinopatia, nefropatia, neuropatia e vasculopatia(RODGER, W.,1991; NATHAN, D., 1993).Estas complicações reduzem a expectativa e a qualidade de vida dos diabéticos.

A doença pode ser classificada em dois tipos, diabetes Tipo 1 e Tipo 2. Estas desordens diferem-se nas suas características genéticas, incidência, e na patologia. Ambas, no entanto, envolvem diminuição na secreção de insulina. No Tipo 1 ocorre uma destruição da célula beta , enquanto no Tipo 2 a habilidade da célula beta em responder à glicose com liberação de insulina está prejudicada. Além disto, no Tipo 2 a sensibilidade à insulina também está reduzida (insulino-resistência) em relação aos tecidos periféricos, principalmente tecido muscular e adiposo.

O diabetes Tipo 1 é geneticamente influenciado e imunologicamente mediado, com fase assintomática, seguida de manifestações de insulinopenia. (MUIR, A.; SCHATZ, D. A.; MACLAREN, N. K., 1992). A incidência da patologia é bastante variável, dependendo das condições ambientais, tais como exposição a agentes químicos, tipo de nutrição e infecções virais superimpostas a fatores genéticos. Varia de 1 a 2 casos/100.000 habitantes/ano no Japão até 43/100.000 habitantes/ano em regiões da Finlândia (ATKINSON, M. A. ; MACLAREN, N. K.; 1994). No Brasil, dados apontam a incidência de 3/100.000 habitantes/ano.(DIB, S. A; RUSSO, E. M. K.; CHACRA, A. R.; 1992).

Em modelos animais a exposição da célula beta à estreptozotocina (STZ) resulta em rápido aparecimento de quebras no ácido desoxirribonucleico (DNA),

subsequente depleção intracelular de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e morte celular após algumas horas. Neste modelo de diabetes Tipo 1, a nicotinamida (NCT) demonstrou proteger a célula beta dos efeitos nocivos da STZ.

O tratamento da doença quando estabelecida é baseado na aplicação de insulina exógena para manter o nível glicêmico o mais próximo do normal. No período prodrômico, antes da doença tornar-se clinicamente aparente, e na presença de marcadores de risco existem pesquisas para evitar ou protelar a destruição das células beta pancreáticas. Existem estudos usando a NCT e a insulina na prevenção do diabetes Tipo 1.

A habilidade da célula beta para recuperar sua competência funcional após injúria tóxica, pode ser a chave na proteção contra o diabetes Tipo 1 .

Este estudo teve como objetivo:

Avaliar a ação do agente tóxico estreptozotocina e da nicotinamida na secreção de insulina estimulada pela glicose em ilhotas de Langerhans isoladas de ratos Wistar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A CÉLULA BETA PANCREÁTICA

As ilhotas pancreáticas foram descritas por PAUL LANGERHANS, em 1869, como “pequenas células, com conteúdo homogêneo e forma poligonal, núcleo com nucléolo redondo, e usualmente dispostas lado a lado aos pares ou em pequenos grupos”. As ilhotas medem de 75 a 225 μm de diâmetro, estão dispersas no tecido pancreático exócrino e compreendem as células beta produtoras de insulina, as células alfa produtoras de glucagon, as células delta produtoras de somatostatina e células PP secretoras de polipeptídeo pancreático.

As células beta representam menos de 2% do volume do pâncreas adulto dos mamíferos [Mc EVOY, R. C.(1981); STEFAN, Y.; ORCI, L.; MALAISSE-LAGAE, F.; PERRELET, A.; PATEL, Y. e UNGER, R. H (1982); RAHIER, J.; GOEBBELS, R. M.; e HENQUIN, J. C. (1983); CHEN, L.; KOMIYA, I.; IMMAN, L.; Mc CORKLE, P.; ALAM, T. e UNGER, R. H.(1989)]. O tamanho e número das ilhotas varia dentro das espécies, e parece ser regulado por fatores nutricionais e hormonais [HELLMAN, B.(1959); BONNEVIE-NIELSEN, V.; SKOVGAARD, L.T. e LERNMARK, A. (1983)]. No rato adulto o tamanho da ilhota varia de menos de 50 a 500 μm , e seu número é estimado excedendo 10^5 por órgão [LACY, P. E. e GREIDER, M. H.(1972)].

A célula beta pancreática compõe mais que 60% do volume da ilhota adulta (RAHIER et al, 1983). Em pâncreas de roedores, a célula beta fica numa posição central na ilhota e as outras células endócrinas ficam ao redor dela [FERNER, H. (1952); HELLMAN, B. (1962) ; ORCI, L.; MALAISSE-LAGAE, F.; RAVAZOLLA, M.;

ROUILLER, D.; RENOLD, A. E.; PERRELET, A. e UNGER, R. (1975)]. Existe uma organização intra-ilhota onde as células beta formam uma área homogênea e somente uma pequena proporção da célula beta fica justaposta às outras células endócrinas (ORCI, L. e UNGER, R. H., 1975).

A observação que a célula beta, quando retirada da ilhota, libera pouca insulina em resposta à glicose (PIPELEERS, D., 1984), suporta a visão que a organização da célula beta dentro da ilhota pancreática pode determinar a amplitude da resposta secretória.

Como a grande maioria das células beta está justaposta a outras células beta (GRUBE, D.; ECKERT, I.; SPECK, P. T. e WAGNER, H. J., 1983), podem trocar ions e pequenas moléculas via junções "gap". Estas junções não correspondem a estruturas anatômicas fixas, representam formações dinâmicas que rapidamente se formam ou desaparecem (IN'T VELD, P.; PIPELEERS, D.; e GEPTS, W. , 1986).

A glicose, o cálcio e o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) influenciam a configuração, o número e a permeabilidade das junções entre as células beta [MEDA, P.; PERRELET, A. e ORCI, L.(1979); MEDA, P.; MICHAELS, R. L.; HALBAN, P. A.; ORCI, L. e SHERIDAN, J. D.(1983); KOHEN, E.; KOHEN, C. e RABINOVITCH, A.(1983); IN'T VELD, P.; SCHUIT, F. e PIPELEERS, D. (1985); IN'T VELD, P.; et al (1986)].

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a secreção de insulina pode ser modulada pelos hormônios pancreáticos [PIPELEERS, D.(1984); SAMOLS, E.; BONNER-WEIR, S.; e WEIR, G. C. (1986)]. O glucagon é conhecido por seus efeitos estimulatórios [SAMOLS, E.; MARRI, G.; e MARKS, V. (1965); GRODSKY, G. M.; BENNETT, L. L.; SMITH, D. F. e SCHMID, F.G. (1967); MALAISSE, W. J.;

MALAISSÉ-LAGAE, F. e MAYHEW, D. (1967)], enquanto a somatostatina, insulina e o polipeptídeo pancreático são descritos como inibitórios [KOERKEN, D. J.; RUCH, W.; CHIDECKEL, E.; PALMER, J.; GOODNER, C. J.; ENSINCK, J.; e GALE, C. G. (1974); LILJENQUIST, J. E.; HORWITZ, D. L.; JENNINGS, A. S.; CHIASSON, J. L.; KELLER, U. e RUBENSTEIN, A. H. (1978); MURPHY, W. A.; FRIES, J. L.; MEYERS, C.A. e COY, D. H.(1981); WALDHÄUSL, W. K.; GASIC, S.; BRATUSCH-MARRAIN, P.; KORN, A. e NOWOTNY, P. (1982)].

2.2 SECREÇÃO DE INSULINA

O principal determinante da taxa de liberação de insulina é o nível de glicose sanguínea. Os hormônios e neurotransmissores atuam modulando a resposta secretória à glicose.

Os secretagogos da insulina podem ser divididos em dois grupos, os iniciadores e os potencializadores. A forma como as substâncias iniciadoras estimulam a liberação de insulina é própria e inclui nutrientes (como glicose) que são metabolizados pela célula beta; substâncias que estimulam o metabolismo de nutrientes endógenos e drogas como as sulfoniluréias (tolbutamina e glibenclamida) . As substâncias potencializadoras compreendem um grande número de hormônios como glucagon, peptídeo gastrointestinal(GIP), peptídeo intestinal vasoativo(VIP), e neurotransmissores como a acetilcolina. Estes secretagogos são ditos potencializadores porque são capazes de potencializar a liberação da insulina apenas na presença da glicose, na ausência da glicose não são capazes de iniciar a liberação de insulina.

A seqüência de eventos no processo de secreção de insulina parece ser o

seguinte (ASHCROFT, F. M. e ASHCROFT, S. J. H., 1993):

A inibição dos canais potássio dependente de adenosina trifosfato (K-ATP) despolariza a célula beta . Assim, abrem-se os canais de cálcio voltagem-dependente e resulta em influxo de cálcio estimulando a secreção de insulina. Enquanto as sulfoniluréias atuam diretamente bloqueando os canais K-ATP, a glicose e outros nutrientes deverão ser metabolizados pela célula para inibir os canais K-ATP.

A metabolização da glicose e de outros nutrientes secretagogos é essencial no processo estímulo-secreção na célula beta. No citosol, a glicose é convertida a piruvato por glicólise anaeróbica . O piruvato é primeiro convertido a acetil coenzima A que é oxidado em dióxido de carbono(CO₂) e água pelo ácido cítrico. A nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida (NADH) produzido por estas reações é oxidado pela cadeia respiratória, acoplado à síntese de ATP num processo conhecido como fosforilação oxidativa. O ATP gerado bloqueia os canais K-ATP e com isto causa influxo de cálcio intracelular.

A secreção de insulina ocorre por exocitose como consequência da elevação intracelular de íons cálcio, os grânulos secretórios se movem e se fundem à membrana plasmática, descarregando seu conteúdo no meio extracelular.

2.3 DIABETES EXPERIMENTAL E STZ

O diabetes pode ser produzido em animais por cirurgia, infecção viral, administração de dietas e agentes químicos ou a doença se desenvolver de forma espontânea, como nos ratos diabéticos não obesos (NOD). MENDEZ, J.D.; RAMOS, H.G., 1994.

A produção de diabetes experimental começou em 1890 com VON MERING e MINKOWSKI por remoção cirúrgica do pâncreas de cães.

Em 1943, iniciaram-se os experimentos com a aloxana. Em 1963, a STZ foi acidentalmente descoberta e descrita por RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M.L.; NADKARINI, M.V.. Estas drogas demonstraram ser altamente seletivas, citotóxicas para a célula beta e potentes substâncias diabetogênicas. Desde então, a aloxana e a STZ têm sido usadas para produzir diabetes em animais experimentais.

A STZ é uma droga derivada da cultura do *Streptomyces acromogenes*, consiste de 2-deoxi-D-glucose com uma cadeia no segundo átomo carbono[2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosourea)-D-glucopiranosose] (HERR, R. R.; JAHNKE, H. K. & ARGOUDELIS, A.D., 1967). Administração da STZ ocasiona destruição seletiva da célula beta em várias espécies animais.

A maneira pela qual a STZ produz lesão citotóxica é bastante discutida e muitas hipóteses têm sido questionadas. O componente glicose na molécula da STZ tem sido responsabilizado pela sua captação para dentro da célula beta, enquanto a metilnitrosourea responsabilizada pela citotoxicidade (GUNNARSSON, R.; BERNE, C. e HELLERSTROM, C. em 1974; ANDERSON, T.; SCHEIN, P., McMENAMIN, M. G.; COONEY, D. A. em 1974).

Em 1975, WILANDER, E. e GUNNARSSON, R., demonstraram que a lesão na célula beta do hamster Chinês, *in vivo* e *in vitro*, ocorre após administração de N-nitrosometilurea, o derivado sem glicose da STZ. Assim, parece que o resíduo glicose não é absolutamente necessário para induzir lesão à célula beta, a parte glicose parece aumentar a sensibilidade e especificidade da ação citotóxica (ROSSINI, A. A.; LIKE, A. A.; DULIN, E. W. e CAHILL, F. G., 1977). Em 1967 SCHEIN, P. S.; COONEY, D. A.; VERNON, M. L., em 1972 HO, C. K. &

HASHIM, A. S., em 1973 SCHEIN, P. S.; COONEY, D. A.; McMENAMIN M. G. e ANDERSON, T., em 1974 GUNNARSSON, R.; BERNE, C.; HELLERSTRÖM, C., em 1982 AKPAN, J. O.; WRIGHT, H. P. & DULIN, E. W., demonstraram que a STZ depleta o conteúdo de NAD intracelular e que a nicotinamida poderia proteger contra este efeito.

A STZ induz quebras no DNA, provavelmente por alquilação, ativando a poliadenosina difosforibose (poli ADP ribose) sintetase para reparar a injúria ao DNA (UCHIGATA, Y.; YAMAMOTO, H.; KAWAMURA, A. e OKAMOTO, H. EM 1981).

Em 1988, WILSON, G. L.; HARTING, P. C.; PATTON, N. J. and LeDOUX, S. P., discutiram os mecanismos de ação da STZ na célula beta. Referem que na decomposição espontânea da STZ, seriam liberados íons carbono que alquilam o DNA das células beta, na posição N⁷ da base guanina, causando sua quebra. Ainda, sugeriram, que a STZ também alquilaria componentes importantes para a geração de ATP (por exemplo: enzimas glicolíticas ou mitocondriais). Isto poderia causar diminuição na re-síntese de NAD associado ao seu maior consumo causado pela ativação da poli (ADP-ribose) sintetase.

OKAMOTO, H., em 1981 demonstrou que ocorre um aumento na atividade da poli(ADP-ribose) sintetase na ilhota exposta a STZ *in vivo* e *in vitro* (YAMAMOTO, H.; UCHIGATA, Y. & OKAMOTO, H. em 1981^(a,b)). Esta enzima utiliza NAD como seu substrato, está envolvida no reparo do DNA e é ativada quando o DNA sofre quebras no seu filamento.

Outros estudos experimentais em ratos também têm demonstrado que o captador de radicais hidroxil dimetilurea (DMU) protege parcialmente contra a hiperglicemia causada pela STZ e também reduz a inibição da biossíntese de

proinsulina estimulada pela glicose na exposição *in vitro* a STZ (SANDLER, S. & A. ANDERSON 1982). Estes dados sugerem um papel dos radicais hidroxil na citotoxicidade da STZ, talvez por participação destes radicais na lesão inicial ao DNA.

Além das ações já descritas, por colaborarem direta ou indiretamente na lesão da célula beta na presença da STZ, outras possíveis ações são também sugeridas, como:

- Liberação de óxido nítrico (NO) da STZ como atividade citotóxica adicional.
- Envolvimento da Descarboxilase do Ácido Glutâmico (GAD).

Em 1998, KRÖNCKE K.D., FEHSEL, K., SOMMER, A., RODRIGUEZ, L. M., e KOLB-BACHOFEN, V., mostraram, por espectroscopia, que o NO não é gerado durante decaimento espontâneo da STZ, porém a sua metabolização no hepatócito do rato e ilhota pancreática gera NO. Esta formação de NO não é devida a atividade da NO sintetase (NOs), porque sua formação no hepatócito na presença da STZ não é bloqueada pelo inibidor da NOs o NG-metil -l-arginina (BEDOYA, F. J.; SOLANO, F. e LUCAS, M. em 1996).

Em 1996, SMISMANS, A.; LING, Z.; PIPELEERS, D., demonstraram que as ilhotas expostas à STZ, mantidas em cultura, 24 horas após a exposição apresentam nível 10 vezes menor de atividade do GAD e GABA (Ácido Gama-aminobutírico) quando comparado ao controle, concluindo que a lesão à célula beta resulta em transitória liberação de GAD para o meio extracelular tornando esta enzima uma candidata a marcador do processo tóxico para célula beta e um potencial autoantígeno para reatividade imune.

Compreendendo os mecanismos de ação dos agentes diabetogênicos, pode-se elucidar não somente as causas do diabetes como sua prevenção.

2.4 UTILIZAÇÃO DA NICOTINAMIDA NO DIABETES

A nicotinamida é uma vitamina hidrossolúvel do grupo B, precursora da adenina dinucleotídeo nicotinamida, uma coenzima envolvida em diversos processos de transferência de energia dentro da célula. A deficiência da nicotinamida e do ácido nicotínico resulta em pelagra. Apesar de quimicamente muito semelhantes, ambos diferem amplamente nos seus efeitos, quando administrados em doses farmacológicas. O ácido nicotínico é utilizado como agente hipolipemiante e vasodilatador e, experimentalmente, para induzir insulino-resistência.

A NCT não apresenta nenhum destes efeitos, ela oferece proteção às células beta pancreáticas contra grande variedade de insultos tóxicos ou imune mediados.

As primeiras observações do efeito de proteção da NCT foram feitas em 1947, quando mostrou proteção contra o diabetes induzido pela aloxana em ratos (LAZAROW, A., 1947), e mais tarde reproduzido com a STZ (DULIN, W. E.; WYSE, B. M.; KALAMAZOO, M. S., 1969).

YAMADA, K.; NONAKA, K.; HANAFUSA, T.; MIYAZAKI, A.; TOYOSHIMA, H.; TARUI, S., em 1982, demonstraram que quando usada antes do início clínico do diabetes, a nicotinamida é efetiva na prevenção do diabetes espontâneo no rato NOD, e inibe insulite em modelo animal de transplante (NOMIKOS, I. N.;

PROWSE, S. J.; CAROTENUTO, P.; LAFFERTY, K. J., 1986).

A NCT preserva células beta residuais em ratos parcialmente pancreatectomizados (YONEMURA, Y.; TAKISHIMA, T.; MIWA, K.; MIYAZADI, I.; YAMAMOTA, H.; OKAMOTO, H., 1984) e aumenta sua regeneração, também promove o crescimento de ilhotas humanas em cultura fetal.

Nos estudos em ratos, UCHIGATA, Y.; YAMAMOTO, H.; NAGAI, H.; OKAMOTO, H., 1983, mostraram que a NCT inibe a poli ADP-ribose sintetase e preserva a síntese de proinsulina.

Em altas doses, a NCT pode atuar como captadora de radicais livres, como a timidina (LE DOUX, S. P.; HALL, C. R.; FORBES, P. M.; PATTON, N. J.; WILSON, G. L., 1988).

A NCT apresenta efeito na imunidade celular, inibindo a ativação dos macrófagos, em células beta *in vitro* (KOLB, H.; BURKART, V.; APPELS, B.; HANNENBERG, H.; KANTWERK-FUNKE, G.; KIESEL, U.; FUNDA, J.; SCHRAERMEYER, U.; KOLB-BACHOFEN, V., 1990). Também inibe a indução de citocinas a partir das moléculas de classe II do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) na célula beta.

Evidências sugerem que o diabetes Tipo 1 é mediado por citocinas, a doença depende das células T auxiliares e macrófagos, e os radicais livres (NO, O₂ e OH) são os mediadores intracelulares da morte celular.

A hipótese de STENO, formulada por NERUP, J.; MANDRUP-POULSEN, T.; MOLVING, J.; WOGENSEN, L.; EGEBERG, J. em Copenhague 1990, associa estas observações como se segue: injúria inicial à célula beta como resultado de eventos ambientais conduzindo à lesão da célula beta e liberação de constituintes solúveis intracelulares. Estes componentes da célula são apresentados por células

apresentadoras de antígenos às células T. Estes antígenos são reconhecidos no contexto de peptídeos Classe II MHC, com liberação de citocinas, resultando em recrutamento de macrófagos e células matadoras naturais. A lesão da célula beta é mediada pelo efeito sinérgico tóxico da interleucina 1 (IL-1), Fator de Necrose Tumoral α e β , produzidos por estas células. A IL-1 é um potente e específico indutor da NOs na célula beta.

Como resultado do aumento da atividade da NOs são gerados NO e radicais oxigênio. Estes podem causar lesão direta ao DNA intranuclear. NO também nitrosila grupos Fe-S nas enzimas respiratórias mitocondriais, principalmente a aconitase, a enzima chave no ciclo de Krebs. A inibição da aconitase resulta em diminuição da oxidação da glicose e redução da produção de ATP. A NCT previne a produção de NO induzida pela IL-1 por inibição da expressão da Nos (CETKOVIC-CVRLJE, M.; SANDLER, S.; EIZIRIK, D. L., 1993).

A exposição da célula beta à STZ resulta em rápido aparecimento de quebras no DNA, subsequente depleção intracelular de NAD e morte celular após algumas horas. Parece que há envolvimento de radicais oxigênio e óxido nítrico induzindo a morte celular em ilhotas isoladas. Seguindo a geração de radicais oxigênio da xantina oxidase, ou de doadores químicos de óxido nítrico, ocorre ativação da poli ADP ribose, que tem sido demonstrada por imunofluorescência próxima ao núcleo das células dentro de minutos e, simultaneamente, a depleção de NAD é observada. As células beta expostas a NCT não mostram depleção de NAD e sobrevivem ao insulto letal.

Estes estudos realizados por KOLB, H.; et al (1990) levam a concluir que a toxicidade mediada pelos radicais oxigênio, óxido nítrico e STZ é mediada por via semelhante envolvendo lesão ao DNA e depleção de NAD.

HELLER, S. P.; WANG, Z. Q.; WAGNER, E. F.; RADONS, J.; BURKLE, A.; FEHSEL, K.; BURKART, V.; KOLB, H., em 1995, observaram que a depleção de NAD esteve ausente nas células beta com deficiência do gene da Poli ADP Ribose Polimerase (PARP).

Em 1999, MASUTANI, M.; SUZUKI, H.; KAMADA, N.; WATANABE, M.; UEDA, O.; NOZAKI, T.; JISHGE, K.; WATANABE, T.; SUGIMOTO, T.; NAKAGAMA, H.; OCHIYA, T.; SUGIMURA, T., estudaram a importância da ativação da PARP e conseqüente depleção de NAD, no diabetes induzido pela STZ. Os autores utilizaram ratos PARP-deficientes e observaram que estes animais tinham morte celular e disfunção da célula beta em menor extensão que os controles quando expostos a STZ.

As ações farmacológicas da NCT são dose dependente, conforme a concentração aumenta obtém-se ações diferente (KOLB, H.; BURKART, V. 1999).

2.4.1 Nicotinamida como Agente Terapêutico em Humanos

Em um estudo piloto, 8 controles não tratados com idade abaixo de 16 anos, altos níveis de anticorpo anti-ilhota (ICA), foram comparados com grupo de 14 irmãos com redução secreção de insulina recebendo nicotinamida. Após um seguimento de 30 meses, todos os 8 controles e apenas 5 dos 14 tratados com NCT (38%) desenvolveram diabetes Tipo 1 (ELLIOTT, R. B.; CHASE, H. P., 1991).

A NCT foi estudada em pacientes com diabetes estabelecido, porém com secreção residual de insulina. Nestes pacientes, a NCT demonstrou efeito protetivo na secreção residual de insulina, melhor controle da doença e sem efeitos deletérios (VAGUE, P.; PICQ, R.; BERNAL, M.; LASSMAN-VAGUE, V.;

VIALETTIS, B., 1989).

Dois grandes estudos randomizados foram iniciados para avaliar a eficácia da nicotinamida na prevenção do diabetes Tipo 1 (GALE, E. A. M, 1996).

O primeiro foi o estudo na Alemanha, Deutsche Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (DENIS). Um estudo multicêntrico de 3 anos, envolvendo 74 irmãos de pacientes com diabetes Tipo 1, ICA positivos, com idade entre 3-12 anos, metade deles recebeu NCT e a outra metade placebo. Este estudo foi finalizado em 1997 porque demonstrou que a NCT não diminuiu o risco de diabetes nos pacientes estudados. O estudo utilizou indivíduos com alto risco para a doença e de rápida progressão. Os autores comentam, entretanto, que os dados não excluem a possibilidade de um efeito menos intenso, porém potencialmente expressivo, na diminuição de risco ou efeitos clínicos maiores da NCT em indivíduos com risco menor de progressão para diabetes Tipo 1 do que o grupo por eles estudado (LAMPETER, E. F.; KLINGHAMMER, A.; SCHERBAUM, W. A.; HEINZE, E.; HAASTERT, B.; GIANI, G.; KOLB, H., 1998).

O segundo estudo é o European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT), é duplo cego, randomizado, e placebo-controlado. Inclui parentes de primeiro grau de pacientes com diabetes Tipo 1 e idade inferior a 20 anos. Foram selecionados aqueles com ICA positivo em dois testes, um dos quais maior ou igual a 20 unidades Juvenil Diabetes Foundation (JDF), idade abaixo de 40 anos e teste oral de tolerância a glicose normal. Este estudo está em andamento, sua duração será de 5 anos e a previsão de término em 2001.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo foi realizado no laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná e no laboratório de Biologia da Secreção Celular da Universidade Estadual de Maringá.

Foram adotadas as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (1996), Normas para Referências Bibliográficas de Títulos e Periódicos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR-6023-1989), Nomina Anatômica Veterinária (1983), bem como os Princípios Éticos na Experimentação Animal, propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1985).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia Mammalia*), da linhagem Wistar, para cada protocolo experimental, provenientes do Biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), com idade de 8 semanas e peso em média de 350 gramas. Os animais foram alojados e mantidos em caixas de polipropileno, recebendo água e ração (Nuvilab CRI Nuvital®-Curitiba/Paraná) específica para a espécie, *ad libitum*, durante 15 dias para adaptação às condições laboratoriais. O ambiente era climatizado (20 a 24°C), umidade relativa do ar de 50 a 60%, com ciclos de luz e escuro a cada 12 horas e limpeza das caixas realizadas a cada 48 horas.

Foi utilizado um total de 66 animais entre o treinamento para isolamento das

ilhotas e a obtenção de rendimento satisfatório de ilhotas para realização dos protocolos experimentais.

3.3 SOLUÇÕES

3.3.1 Solução de Hanks

A solução foi preparada com os seguintes componentes: NaCl (Reagen®) 136mM; KCl (Reagen®) 5,36mM; MgSO₄ 7H₂O (Reagen®) 0,8mM; Na₂ HPO₄ (Reagen®) 0,33mM ; KH₂ PO₄ (Reagen®) 0,44mM; CaCl₂ 2H₂O (Reagen®) 1,26mM; NaHCO₃ (Reagen®) 24,0mM; glicose (Reagen®) 5,6mM.

Esta solução foi utilizada para preparar a solução de collagenase e nas lavagens do sedimento contendo ilhotas. Prévia a sua utilização, a solução era borbulhada por 10 minutos em mistura carbogênica (95% de oxigênio e 5% de gás carbônico) sob pressão. A seguir o pH era acertado para 7,4 e a mesma mantida em banho de gelo (-4°C) durante todo o experimento.

3.3.2 Solução de Collagenase

Utilizou-se Collagenase tipoV Sigma®, lote 124H6868, 308 U/mg(Sigma,St Louis, Mo, USA). A enzima é obtida da bactéria *Clostridium histolyticum*, comercializada na forma de pó, que foi dissolvida, imediatamente antes de ser usada, em 10 ml de solução de Hanks, na concentração de 1,7mg/ml e usada para inoculação intraductal e distensão do pâncreas.

3.3.3 Solução de Krebs-Ringer Bicarbonato Modificada

A solução foi preparada imediatamente antes de ser utilizada e continha os seguintes componentes: NaCl (Reagen®) 120,0 mM; KCl (Reagen®) 5,0mM; NaHCO₃ (Reagen®) 25,0mM; MgCl₂.6H₂O (Reagen®) 1,13mM; CaCl₂ (Reagen®) 2,56mM.

Após o preparo da solução de Krebs, foram acrescentadas albumina bovina humana Fração 5, Sigma® lote 98F0047, na concentração de 5mg/ml, e glicose que variava de acordo com o protocolo experimental de 0mM a 16,7mM.

As drogas utilizadas foram acrescentadas à solução de Krebs, sempre imediatamente antes do seu uso. A STZ Sigma® lote S0130 (Sigma, St Louis, Mo, USA) foi usada na concentração de 1,8mM e a NCT Sigma®, lote 28H0561 (Sigma, St Louis, Mo, USA) na concentração de 20mM.

A solução era mantida em banho de gelo (-4°C) durante todo protocolo experimental e pH ajustado para 7,4 antes do seu uso. Foi utilizada para preparar os meios de pré-incubação, incubação e para lavagem das ilhotas entre a pré e a incubação.

3.4 PROCEDIMENTOS

3.4.1 Realização da Pancreatectomia

Anestesia do rato por inalação com éter sulfúrico, tricotomia da região abdominal, imobilização em decúbito dorsal. Incisão abdominal ampla e exposição do ducto biliar.

Retração cranial do fígado e clampeamento da porção distal do ducto bíleo-pancreático junto à confluência com o duodeno.

Incisão do ducto biliar comum junto ao hilo hepático com tesoura. Canulação com catéter de polietileno fino (Intracath®, número 38316661, diâmetro de 0,7mm/22 GA, Becton Dickinson) e posterior fixação com fio de sutura de algodão 2-0 (classe II Multipak, SHALON®).

Injeção de 10 ml de solução de Hanks gelada com 17 mg de colagenase no ducto biliar comum.

Evisceração do baço, retração do estômago cranialmente para melhor exposição do pâncreas distendido, dissecação do pâncreas a partir do duodeno.

Colocação do pâncreas distendido em placa de Petri (100x100mm, Pyrex®) gelada para separação da gordura, vasos sanguíneos e linfonodos mesentéricos. Realização de cortes, com tesoura, de mais ou menos 1 cm, para facilitar a ação da colagenase.

3.4.2 Isolamento das Ilhotas

A técnica utilizada para o isolamento das ilhotas foi a de LACY e KOSTIANOVSKY descrita em 1967, e digestão estacionária descrita por GOTOH, M.; MAKI, T.; KIYOIZUMI, T.; SATOMI, S.; MONACO, A. P. em 1985.

Incubação do pâncreas em placa de Petri a 37°C em banho-maria (Fanem®) durante 15 minutos para digestão estacionária.

O produto da incubação foi colocado em Becker de 100ml e adicionado 60ml de solução de Hanks gelada (4°C) para interromper a digestão.

Distribuição do volume em 4 tubos graduados de 15ml plástico, com fundo

cônico, apropriados para centrífuga. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado por 10 segundos em agitador automático de tubos (mod. AT56, Phoenix®) em intensidade máxima.

Os tubos com a suspensão tecidual foram sedimentados em centrífuga clínica (Fanem® -modelo 206-) por 15 segundos a 1500 rotações por minuto.

Desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento até 15ml e repetiu-se a homogeneização no agitador de tubo por 10 segundos e centrifugação por 15 segundos. Este procedimento foi repetido por três vezes. O material dos 4 tubos foi colocado em um Becker de 100ml e acrescentada solução de Hanks até 100 ml. A seguir, agitado com pipeta tipo Pasteur, deixado sedimentar espontaneamente por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e novamente ressuspendido para 100ml, agitado com pipeta, e deixado sedimentar por mais 3 minutos. O sobrenadante novamente foi desprezado e ressuspendido para 100ml .

A suspensão passada por um filtro de malha de nylon com poros de 500 μ (Tegape®), para remover tecidos não digeridos, como linfonodos mesentéricos, vasos sanguíneos e fragmentos ductais, deixando passar somente as ilhotas e restos celulares.

Esperou-se sedimentar por 2 minutos e desprezou-se o sobrenadante, deixando volume final de 50ml.

Separação das ilhotas, para incubação, em lupa (Olympus® mod SZH10) no aumento de 10 vezes. Utilizando a pipeta automática de 100 μ l (Gilson®) com ponteira de plástico para transferir as ilhotas para o meio de incubação.

Para o isolamento das ilhotas uma segunda técnica foi utilizada:

Os animais foram sacrificados por decapitação e, em seguida, realizou-se

laparotomia e exposição do ducto biliar . Após canalização do ducto biliar, com catéter de polietileno, procedeu-se injeção de 15 ml de solução de Hanks gelada para distensão do pâncreas.

A seguir, dissecação do pâncreas iniciando pela porção duodenal até completa retirada do órgão. Colocação deste em placa de Petri para retirada da gordura e linfonodos mesentéricos.

O material foi transferido para Becker com solução de Hanks gelada e realizado um picotamento rápido com tesoura para obter um material homogêneo. Em seguida, foi lavado com solução de Hanks gelada, 100ml, por 3 vezes.

O sedimento foi passado para um tubo de ensaio e lavado por mais 2 vezes.

Colocação da colagenase, calculada em 14 mg para cada 3,5 ml de pâncreas, levado para banho-maria a 37°C, com mistura carbogênica borbulhando dentro do tubo por 10 minutos.

Retirou-se a mistura de gases e agitou-se o tubo manualmente de forma lenta dentro do banho-maria por 5 minutos, em seguida agitou-se o tubo rapidamente durante 90 segundos .

O material foi levado para o gelo em um Becker, acrescido com solução de Hanks gelada até 100ml. Realizada agitação com pipeta tipo Pasteur e sedimentação espontânea por 8 minutos no gelo. O sobrenadante foi desprezado e ressuspendido para 100ml, deixado sedimentar por 4 minutos, repetido o procedimento e deixado sedimentar por 2 minutos e depois 1 minuto. A seguir, as ilhotas foram separadas em lupa, coletadas com micropipeta automática e distribuídas nos respectivos meios para pré-incubação.

3.4.3 Protocolo Experimental com as Ilhotas Pancreáticas Isoladas

3.4.3.1 Pré-Incubação

Grupos de 4 ilhotas foram transferidos para placa de cultivo de células tipo Colstar com 24 pocinhos. Para pré-incubação, cada pocinho recebeu 4 ilhotas e 0,5 ml de solução de Krebs, albumina a 5% e glicose nas concentrações específicas para cada protocolo experimental descritos abaixo:

Placa A: glicose 16,7mM em todos os pocinhos.

Placa B e C: glicose 16,7mM em todos os pocinhos e 4 protocolos diferentes: STZ 1,8mM; STZ 1,8mM e NCT 20mM; NCT 20mM e controle.

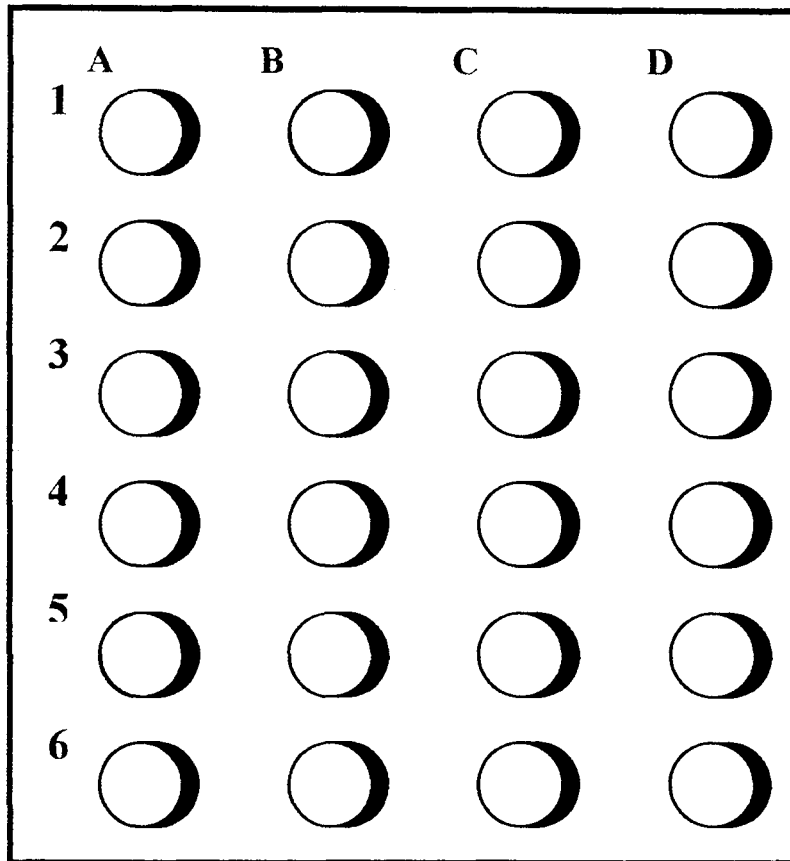
Placa D: glicose 0mM, glicose 5,6 mM, glicose 11,1mM e glicose 16,7mM.

Placa E: glicose 0mM, glicose 5,6mM, glicose 11,1mM, glicose 16,7mM e STZ 1,8 mM em todos os pocinhos.

As placas foram colocadas em pré-incubação por 60 minutos em atmosfera com a mistura carbogênica e banho-maria a 37°C. Agitações sucessivas eram feitas a cada 10 minutos.

Após 60 minutos, as placas foram colocadas no gelo e as ilhotas recolhidas, com pipeta de microlitros. Da placa de pré-incubação, as ilhotas foram transferidas para outra placa contendo solução de Krebs gelada com albumina a 5% e glicose a 5,6mM. Permaneceram neste meio, em banho de gelo, durante 20 minutos.

FIGURA 1: DESENHO ESQUEMÁTICO DA PLACA DE CULTURA DE CÉLULAS TIPO COLSTAR.



3.4.3.2 INCUBAÇÃO

Ao final dos 20 minutos, as ilhotas foram distribuídas na placa para incubação nos meios com solução de Krebs contendo albumina 5% , na presença ou ausência de glicose em diferentes concentrações e das drogas testadas, como seguem abaixo:

Placa A : glicose 0mM; glicose 5,6mM; glicose 11,1mM; glicose 16,7mM.

Placa B e C: glicose 16,7mM para todos os pocinhos e as drogas da seguinte forma: controle; STZ 1,8mM; STZ 1,8mM +NCT 20mM e NCT 20mM.

Placa D: glicose 16,7mM para incubação para todos os pocinhos.

Placa E: glicose 16,7mM e STZ 1,8mM em todos os pocinhos.

As placas foram, então, colocadas em incubação por 60 minutos, sob atmosfera da mistura carbogênica, a 37°C em banho-maria e agitadas a cada 10 minutos.

No final do protocolo experimental, as placas foram colocadas no gelo e coletou-se do meio material para dosagem da insulina liberada durante a incubação.

3.5 DOSAGEM DA INSULINA SECRETADA *IN VITRO* PELAS ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS

O sobrenadante, ao final das incubações, foi coletado com pipeta e diluído na proporção de 1:5 e submetido ao ensaio para dosagem da insulina.

Princípio do teste:

A insulina secretada pela ilhota pancreática de rato foi medida por radioimunoensaio, método de Fase Sólida (MICROMEDIC® INSULIN RIA KIT), onde a insulina porcina marcada com Iodo 125 (ICN MICROMEDIC SYSTEMS, INC.) compete com a insulina de rato pelo mesmo sítio de ligação do anticorpo específico anti-insulina que estava imobilizado na parede do tubo de poliestireno. Após completar o período de incubação de 18 horas em temperatura ambiente, o complexo insulina-anticorpo foi separado da insulina livre (insulina marcada com Iodo 125) por decantação e posterior lavagem do tubo de ensaio. Os tubos foram para contador automático gama C12 DPC®, durante 1 minuto, e a medida da insulina presente na amostra foi obtida através de curva de calibração.

Este kit tem 100% de especificidade (atividade relativa 1,0) para insulina humana e 89,5% (atividade relativa 0,895) para insulina de rato. O resultado final deve ser multiplicado pelo fator de conversão .

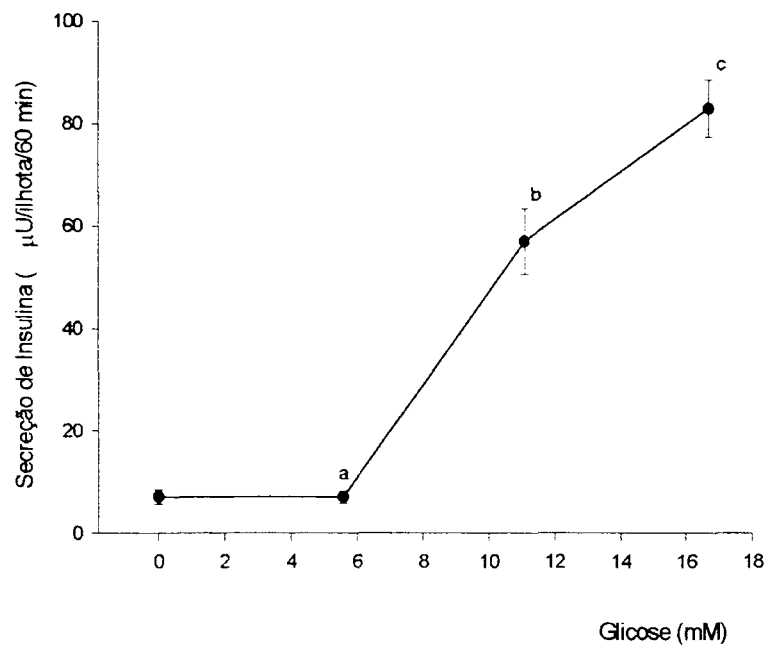
4 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Para avaliação de cada um dos protocolos experimentais, foi adotado o modelo de análise de variância completamente aleatorizado com efeitos fixos. Em função do mesmo número de repetições por tratamento, o referido modelo é robusto para moderado afastamento da condição de homogeneidade de variâncias. Desta forma, para análise dos resultados, optou-se por uma transformação de dados visando-se obter a referida homogeneidade. Para tanto, considerou-se o logaritmo na base 10 dos resultados em função da existência de uma proporcionalidade entre as médias e desvios padrões. Quando da constatação de diferença significativa entre as médias sob comparação, testou-se as hipóteses associadas aos contrastes estabelecidos *a priori*, através do procedimento de comparações múltiplas de Dunn. Com isto, levou-se em consideração que o nível de significância dos testes dos contrastes não superou o nível de significância do protocolo experimental, o qual foi estabelecido em todas as comparações igual a 0,05.

5 RESULTADOS

Nas ilhotas do protocolo experimental da placa A, podemos observar um efeito crescente na liberação de insulina, conforme a concentração de glicose aumenta. Isto pode ser representado através de uma curva dose-resposta que está apresentada na figura 2.

FIGURA 2 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NA SECREÇÃO DE INSULINA



Na curva pode-se observar que as ilhotas respondem de forma crescente, ou seja, aumenta a secreção de insulina conforme aumenta a concentração de glicose. O número de observações em cada concentração foi 6, com exceção da concentração de 16,7mM que teve 19 observações. Na curva cada ponto

representa a média das observações e as linhas em cada ponto representam o erro padrão da média.

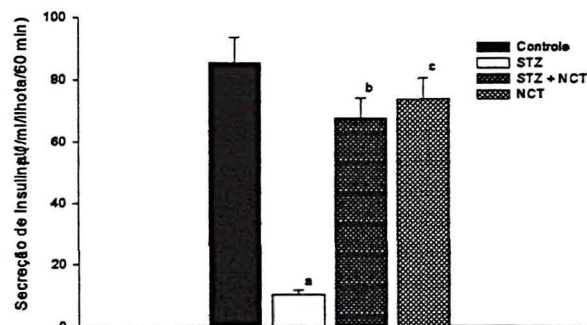
Quando comparou-se as concentrações 0mM e 5,6mM de glicose, nota-se que não houve diferença na secreção de insulina ($p = 0,4849$). A secreção de insulina para ambas concentrações é de apenas 8,45% da exposição a 16,7mM de glicose.

Entre as concentrações 5,6mM e 11,1mM de glicose, a célula beta responde ao aumento de glicose aumentando a liberação de insulina em 60,15%, uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

Entre as concentrações 11,1mM e 16,7mM, as células beta comportam-se da mesma forma, com aumento 31,39% na secreção de insulina estimulada pelo aumento na concentração de glicose, que foi estatisticamente significativa ($p < 0,03$).

A figura 3 demonstra a ação da STZ, da STZ e NCT juntas no meio de incubação, da NCT sozinha e controle.

FIGURA 3 – EFEITO DA STZ E NCT NA SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR 16,7 mM DE GLICOSE

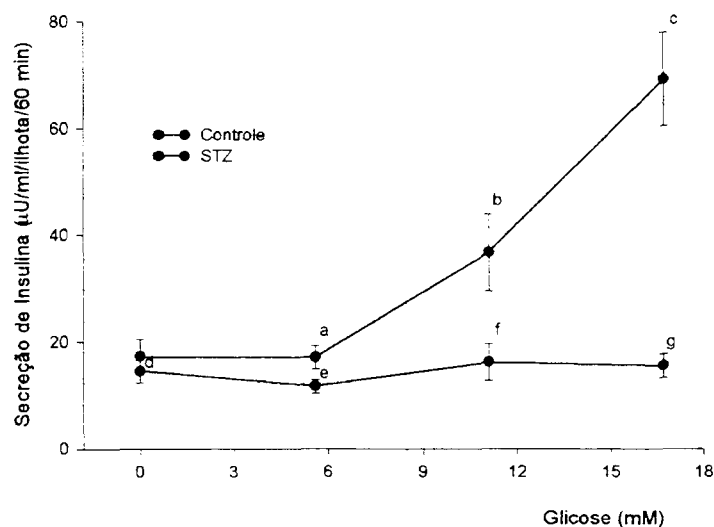


No grupo tratado com STZ e glicose 16,7mM, houve inibição na secreção de insulina. A diminuição na secreção de insulina foi de 87,84% em relação ao controle ($p < 0,0001$).

Quando adicionada a NCT junto com STZ, esta ofereceu proteção à célula beta dos efeitos da STZ e manteve a secreção de insulina semelhante ao controle ($p = 0,0534$). A secreção de insulina foi aumentada em 83,68 % quando a NCT esteve associada ao meio com STZ comparada à STZ sozinha ($p < 0,0001$).

A NCT sozinha resultou em pequena diminuição na liberação de insulina, mas estatisticamente não foi significativo, demonstrando que sozinha a NCT não altera a secreção de insulina ($p = 0,1788$).

FIGURA 4 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE DURANTE A PRÉ-INCUBAÇÃO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DA STZ



As ilhotas (figura 4) sofreram pré-incubação com diferentes concentrações de glicose na presença ou ausência de STZ. Após ilhotas foram incubadas durante

60 minutos, com 16,7 mM de glicose, na presença ou ausência da STZ 1,8mM.

Cada ponto na curva representa a média de 6 observações, as linhas em cada ponto representam o erro padrão da média.

Nota-se que o comportamento da curva é ascendente, conforme aumentou-se a concentração de glicose na pré-incubação, houve aumento na liberação de insulina no grupo controle durante a incubação (a,b,c).

Quando comparou-se o ponto 0mM com 5,6mM obteve-se diferença estatisticamente significativa na liberação de insulina (**p = 0,4187**).

Nos pontos 5,6mM e 11,1mM, a diferença foi significativa (**p < 0,03**) demonstrando a tendência da célula secretar mais insulina quando pré-exposta a uma maior concentração de glicose.

Levando em consideração a pré-exposição a 11,1mM e a 16,7mM de glicose, observou-se um aumento importante e estatisticamente significativo (**p < 0,005**).

A resposta secretória da célula beta, quando pré-incubada em 16,7mM, é 75% maior do que quando pré-incubada na ausência de glicose, com 5,6mM a resposta permaneceu baixa e quando com 11,1mM já demonstrou ascendência (52,98%).

Na figura 4 (d,e,f,g), observou-se que o uso da STZ bloqueou a resposta secretória para o grupo exposto na pré-incubação a 11,1mM e 16,7mM, representado pelas letras f e g na curva de secreção de insulina. A comparação entre os pontos b e f, c e g foi estatisticamente significativa (**p=0,0013** e **p<0,0001** respectivamente). A diminuição na secreção de insulina foi de 77,46% para concentração de 16,7mM e de 55,85% para 11,1mM comparado ao controle.

Nas concentrações de 0mM e 5,6mM, embora tenha havido diminuição na

secreção de insulina, esta não foi estatisticamente significativa ($p=0,3127$ e $p=0,0802$, respectivamente). Na concentração 0mM, ocorreu uma diminuição de 31,47% e na concentração 5,6mM houve uma diminuição de 16% na presença da STZ comparado ao controle.

6 DISCUSSÃO

O processo secreção de insulina é dependente da presença da glicose e de sua concentração. A regulação da secreção de insulina *in vivo* e *in vitro* é muito semelhante. Aumentando-se a glicemia, ocorre aumento na secreção de insulina, o que pode ser observado *in vivo*, quando se faz teste de tolerância à glicose.

Em ilhotas pancreáticas de roedores, e mesmo em humanos, existe uma relação dose-resposta. Incubando-se as ilhotas com concentrações crescentes de glicose, a liberação de insulina também é crescente. Os resultados (figura2) confirmam os dados da literatura. A partir da concentração 5,6 mM de glicose, observa-se uma resposta secretória ascendente dependente da concentração de glicose.

Os valores obtidos e o comportamento da célula beta pancreática são classicamente mostrados por trabalhos anteriores. ANDERSON, A.; WESTMAN, J. and HELLERSTRÖM, J., em 1974 demonstraram, através da incorporação de leucina em ilhotas mantidas em cultura, que a síntese de insulina estava correlacionada não somente com a concentração de glicose no meio de incubação, mas também com o meio de cultura em que previamente estavam. Os autores sugerem, ainda, que a célula beta estaria equipada com uma "memória", a qual poderia regular a biossíntese de insulina em situações onde as concentrações de glicose extracelulares alterassem rapidamente.

O processo estímulo-secreção de insulina indica maior concentração de glicose ativa mais o metabolismo e a secreção observada pode ser consequência deste efeito.

Em ratos, o jejum promove uma menor capacidade secretória nas ilhotas

pancreáticas, EFENDIC, S.; CERASI, E.; LUFT, R.; GLADNIKOFF em 1976 demonstraram que o jejum reduz a sensibilidade da ilhota ao estímulo secretório da glicose.

Isto pode ser observado também *in vitro*. CARPINELE, A. R.; MATHIAS, P. C. F.; LECLERCQ-MEYER, V. and MALAISSE, W. J em 1986, mostraram que a pré-incubação por uma hora com glicose a 5,60mM promove uma diminuição em mais da metade da secreção de insulina em ilhotas perfundidas com solução de glicose a 16,7mM.

Em 1992, RASSCHAERT, J.; EIZIRIK, D. L.; MALAISSE, W. J., estudando os efeitos da STZ e concentração de glicose na atividade das desidrogenases mitocondriais, demonstraram que as ilhotas cultivadas em meio com glicose a 28mM apresentavam maior resposta secretória na presença tanto de 1,7mM como com 16,7mM de glicose.

Os resultados mostram, na figura 4, nítida curva dose-dependente, quando as ilhotas foram previamente incubadas com diferentes concentrações de glicose.

A incubação com glicose a 16,7mM, em ilhotas previamente incubadas na ausência de glicose, mostrou uma diferença com as ilhotas que previamente foram incubadas com 16,7mM de glicose. Houve um incremento de 75,04% na liberação de insulina para o grupo pré-incubado com 16,7mM de glicose.

Estes resultados reforçam a observação que as ilhotas pancreáticas respondem melhor quando pré-tratadas com uma concentração de glicose maior.

Sabe-se que o jejum, *in vivo*, debilita o metabolismo da célula beta pancreática e faria com que a resposta secretória destas ilhotas fosse menor que dos animais alimentados (GIROIX, M. H.; DUFRANE, S. P.; MALAISSE-LAGAE, F.; SENER, A. A e MALAISSE, W. J. em 1984).

O pré-tratamento de ilhotas com glicose 5,6mM provoca um menor grau na condutância do potássio comparado com ilhotas pré-tratadas com glicose 16,7mM, indicando que possivelmente neste breve período as ilhotas tiveram seu metabolismo celular comprometido (CARPINELLI, A. R.; et al, 1986).

A STZ bloqueia a liberação de insulina (figura 3), GOLDEN, P.; BAIRD, L.; MALAISSE, W. J.; MALAISSE-LAGAE, F. e WALKER, M. em 1971, demonstraram que a STZ, na primeira hora de incubação, faz uma diminuição de 39,30% na secreção de insulina e na segunda hora diminuição de 76,90%. Os resultados deste estudo mostraram uma inibição de 87,84% na segunda incubação, o que está de acordo com os achados da literatura.

O mecanismo pelo qual a STZ causa bloqueio na liberação de insulina é bastante discutido. Sabe-se que a droga lesa o DNA celular, com isto ativa a poli ADP ribose, consome NAD causando diminuição crítica deste, bloqueando o processo secretório celular, síntese de proinsulina e liberação de insulina (MALDONATO, A.; TRUEHEART, P. A.; RENOLD, A. E. e SHARP, G. W. G., 1976).

A reação metabólica e a deterioração funcional observada *in vitro* após STZ foram explicadas por HIROSHI OKAMOTO, em 1985, onde o autor termina dizendo que a célula beta mostra uma “resposta suicida” para reparar a lesão do seu DNA.

As ilhotas, quando mantidas em cultura após exposição à STZ, apresentam um modelo de liberação de insulina com algumas características das primeiras fases do diabetes Tipo 1. A diminuição na oxidação da glicose, no consumo de oxigênio, na biossíntese de insulina e a severa redução da liberação de insulina estimulada pela glicose são semelhantes ao encontrado nas ilhotas imediatamente

após exposição à interleucina 1 (SANDLER S.; ANDERSON A.; HELLERSTRÖM C., 1987), uma citocina derivada do macrófago com papel no desenvolvimento do diabetes Tipo 1 (MANDRUP-POULSEN, T.; BENDTZEN, K.; NIELSEN, J. H.; BENDIXEN, G.; NERUP, J. 1985).

Os resultados deste estudo mostram que a NCT (figura 2) protegeu a célula beta, efeito demonstrado *in vivo* e *in vitro* na literatura.

Inicialmente, o efeito da nicotinamida era apenas atribuído a sua potencial capacidade de fornecer substrato para produção de NAD (que fica comprometido na exposição da célula beta à STZ), e assim inibir a poli ADP ribose. Hoje sabemos que a NCT tem mecanismos de ação mais amplos, interferindo na imunidade celular e como captadora de radicais livres e óxido nítrico (EDWIN A.M. GALE, 1996).

Além deste efeito protetor, os autores têm mostrado que não há ação da NCT *per si* no processo estímulo secreção da insulina. No presente estudo, o grupo tratado apenas com NCT não apresentou diferença em relação ao grupo controle na secreção de insulina. GOLDEN, P.; et al em 1971, mostrou semelhantes achados em ilhotas de rato isoladas.

Na figura 4, nota-se que quando a célula beta foi exposta a uma maior concentração de glicose (11,1mM e 16,7mM) a STZ foi mais deletéria. Isto foi estudado por SANDLER, S.; WELSH, M. e ANDERSON, A., 1983, eles observaram que as ilhotas, expostas à STZ e glicose a 16,7mM em comparação a 5,6mM, sofreram mais inibição na liberação de insulina estimulada pela glicose. Uma maior atividade metabólica conferiu uma maior suscetibilidade aos efeitos da STZ, especialmente na estimulação da biossíntese de proinsulina.

Outro estudo, mais tarde, mostrou que ilhotas, mantidas em cultura com

glicose 11,1mM, sofriam mais com a presença da STZ do que as ilhotas expostas a 5,6mM. Porém, quando se aumentou a concentração da glicose para 28mM houve proteção da célula beta em relação a 11,1mM. Podemos, então, ter um efeito diferente da glicose quando acrescentada ao meio de cultura em concentração muito alta (28mM), uma ativação de mecanismos de defesa da célula contra toxinas (EIZIRIK, D. L.; STRANDELL, E. and SANDLER, S. em 1988).

BURKART, V.; BRENNER, H. H.; HARTMANN, B. e KOLB, H .em 1996, demonstraram que as ilhotas, em cultura, na presença de glicose em alta concentração (29mM), eram mais resistentes a ação da STZ. Os autores testaram a hipótese que poderia ser devido ao efeito da glicose como nutriente ou a competição entre glicose e STZ na captação celular (mesmo transportador). Utilizaram teofilina e glibenclamida para estimular o metabolismo celular. Encontraram o mesmo efeito da glicose, descartando, assim, as duas possibilidades. Concluíram que a maior atividade metabólica influenciaria a capacidade celular para resistir a toxinas em cultura.

Diante destes achados e da literatura, vemos que existe uma certa complexidade no entendimento da fisiopatologia do diabetes e as pesquisas mostram que a NCT pode, realmente, ser útil para prevenir a doença. O conhecimento dos resultados dos estudos em andamento pode trazer novas perspectivas para os pacientes com risco de desenvolver a doença e talvez o processo auto-imune contra as células beta não seja inevitável.

7 CONCLUSÕES

Concluimos, assim, que (1) a célula beta responde ao aumento na concentração de glicose com aumento na liberação de insulina, (2) o aumento na liberação de insulina é dependente da concentração de glicose em que a célula beta pancreática foi previamente exposta, (3) a STZ bloqueia a liberação de insulina pela célula beta, (4) a NCT foi capaz de proteger a célula beta dos efeitos lesivos da STZ, e, finalmente (5), a concentração de glicose no meio de cultura pode influenciar o efeito lesivo da STZ.

ANEXOS

Resultados obtidos em cada protocolo experimental:

Protocolo experimental 1: liberação de insulina em $\mu\text{U}/\text{ilhota}/\text{ml}/60\text{minutos}$.

Glicose 0	Glicose 5,6mM	Glicose 11,1mM	Glicose 16,7mM
8,95	6,71	55,93	71,16
6,04	8,95	71,16	47,52
6,14	5,59	78,31	78,31
13,42	4,46	38,03	26,85
4,25	12,30	55,93	44,75
3,80	4,13	42,51	100,68

Protocolo experimental 2: liberação de insulina em $\mu\text{U}/\text{ilhota}/\text{ml}/60\text{minutos}$

STZ	STZ + NCT	NCT	CONTROLE
5,59	78,31	83,90	106,28
13,96	100,68	86,70	123,06
13,96	27,96	55,93	61,53
6,71	39,15	111,87	83,90
20,13	72,71	55,93	55,93
6,71	83,90	50,34	67,12

STZ	STZ + NCT	NCT	CONTROLE
5,6	72,71	95,09	95,09
15,10	83,90	89,50	139,84
12,86	44,75	55,94	55,95
6,71	45,00	100,69	95,10
6,15	78,31	50,34	61,53
11,19	83,90	51,00	78,31

Protocolo Experimental 3: liberação de insulina em $\mu\text{U}/\text{ilhota}/\text{ml}/60\text{minutos}$

Glicose 0/16,7mM	Glicose5,6/16,7	Glicose11,1/16,7	Glicose16,7/16,7
21,38	14,89	20,68	45,37
15,79	19,48	58,55	42,42
21,27	16,99	36,25	80,46
28,29	14,29	11,60	88,21
9,67	10,84	44,80	91,92
7,48	26,38	48,58	67,67

Glicose+STZ	Glicose+STZ	Glicose+STZ	Glicose +STZ
22,83	11,74	4,5	-----
16,78	12,21	28,17	9,68
16,29	15,10	15,10	17,76
8,29	8,70	23,18	23,84
10,82	7,68	10,81	12,77
12,21	15,14	15,59	14,10

Relatório estatístico:

Protocolo Experimental 1

Inicialmente testou-se a hipótese de médias iguais de liberação de insulina, para todos os tratamentos (níveis de glicose na incubação iguais a 0; 5,6; 11,1 e 16,7mM) *versus* a hipótese alternativa de pelo menos um tratamento com média

diferente. O resultado do teste estatístico indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 0,05($p < 0,0001$).

Dado este resultado, comparou-se os níveis de concentração de glicose 0 com 5,6mM , 5,6 com 11,1mM e 11,1 com 16,7mM. Também testou-se as concentrações 0; 5,6; 11,1 mM com 16,7 mM. O nível de significância adotado nestas comparações foi de 0,01 de forma que não foi ultrapassado o nível de significância de 0,05 do experimento.

TABELA 1: DEMONSTRATIVO DOS RESULTADOS DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DOS DIFERENTES TRATAMENTOS (PROTOCO EXPERIMENTAL 1)

Glicose(mM)	secreção de insulina(μ U/ml/ilhota/60min)	
0,0	7,10 \pm 1,47	n=6
5,6	7,02 \pm 1,27	n=6
11,1	56,98 \pm 6,39	n=6
16,7	83,05 \pm 5,61	n=19

Protocolo Experimental 2:

Inicialmente testou-se a hipótese nula de médias iguais de liberação de insulina para todos os tratamentos (STZ ; STZ + NCT ; NCT ; Controle) *versus* a hipótese alternativa de pelo menos um tratamento com média diferente. O

resultado do teste estatístico indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 0,05 ($p < 0,0001$)).

Dado este resultado, comparou-se cada um dos tratamentos dois a dois. Em cada comparação testou-se a hipótese nula de médias de liberação de insulina iguais *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes. O nível de significância adotado nestas comparações foi de 0,008, de forma que não foi ultrapassado o nível de significância de 0,05 do experimento.

TABELA 2: APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DO USO DAS DROGAS STZ E NCT SOZINHAS OU EM COMBINAÇÃO

Droga	Secreção de insulina(μ U/ml/ilhota/60 min)	
STZ	10,38 \pm 1,38	n=12
STZ+NCT	67,61 \pm 6,50	n=12
NCT	73,94 \pm 6,58	n=12
Controle	85,30 \pm 6,58	n=12

Protocolo Experimental 3:

Primeiramente testou-se a hipótese nula de médias iguais de liberação de insulina para todos os tratamentos envolvidos no experimento *versus* a hipótese alternativa de pelo menos um tratamento diferente. O resultado do teste estatístico indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 0,05

($p < 0,0001$). Comparou-se os tratamentos e o nível de significância nestas comparações foi 0,0033, de modo que não ultrapassou o nível de significância de 0,05 do experimento.

TABELA 3: RESULTADOS DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3

Pré-incubação (glicose mM/l)	Secreção de insulina $\mu\text{U/ml/ilhota}/60\text{min}$	
	Sem STZ	com STZ
0,00	17,31 \pm 3,21	14,54 \pm 2,11
5,60	17,16 \pm 2,18	11,76 \pm 1,27
11,1	36,74 \pm 7,23	16,22 \pm 3,45
16,7	69,34 \pm 8,73	15,63 \pm 2,21

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1 ANDERSON, T., SCHEIN, P., McMENAMIN, M. G., COONEY, D. A. Streptozotocin diabetes: Correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. **J. Clin. Invest.**, [S.I.], v. 54, p. 672-677, Sep., 1974.
- 2 ANDERSON, A., WESTMAN, J. and HELLERSTRÖM, J. Effects of glucose on the ultrastructure and insulin biosynthesis of isolated mouse pancreatic islets maintained in tissue culture. **Diabetologia**, [S.I.], Uppsala, v. 10, p. 743-753, Dec., 1974.
- 3 AKPAN, J. O., WRIGHT, H. P. & DULIN, E. W. Effect of diabetogenic nitrosourea on activity of the pentose phosphate shunt in isolated islets. **Acta diabet. Lat.**, [S.I.], v.19, p.37-47, 1982.
- 4 ASHCROFT, F. M., and ASHCROFT, S. J. H. Mechanism of insulin secretion. **Insulin: Molecular Biology to Pathology**, New York, Oxford University Press, p. 97-124, 1993.
- 5 ATKINSON, M. A., MACLAREN, N. K. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, [S.I.] v. 331, n. 21, p. 1428 -1436, 1994.
- 6 BEDOYA, F. J.; SOLANO, F. and LUCAS, M. N_Monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. **Experientia**, Sevilla, v. 52, p. 344-347, 1996.
- 7 BONNEVIE-NIELSEN, V., SKOVGAARD, L.T., e LERNMARK, A. β -cell function relative to islet volume and hormone content in the isolated perfused mouse pancreas. **Endocrinology**, [S.I.], v.112, p.1049-56, 1983.

- 8 BURKART, V., BRENNER, H. H., HARTMANN, B., and KOLB, H. Metabolic activation of islet cell improves resistance against oxygen radicals or streptozotocin, but not nitric oxide. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Düsseldorf, v.81, p. 3966-3971, 1996.
- 9 CARPINELE, A R.; MATHIAS, P.C.F.; LECLERCQ-MEYER, V. and MALAISSE, W.J. Fasting-induced dissociation of cationic and secretory events in pancreatic islets. **Cell Biochemistry and function**, Brussels, v. 4,p. 123-130, 1986.
- 10 CETKOVIC-CVRLJE M, SANDLER S, EIZIRIK DL. Nicotinamide and dexamethasone inhibit IL-1 induced nitric oxide production by RINn5F cells without decreasing mRNA expression for nitric oxide syntetase. **Endocrinology**, [S.I.], v.133, p.1739-1743, 1993.
- 11 CHEN, L., KOMIYA, I., IMMAN, L., Mc CORKLE, P., ALAM, T., and UNGER, R.H. Molecular and cellular responses of islets during perturbations of glucose homeostasis determined by in situ hybridization histochemistry. **Proc. Natl Acad. Sci., USA**, v.86, p.1367-71, 1989.
- 12 DIB, S.A., RUSSO, E.M.K., CHACRA, A.R. Diabetes melito tipo I. In: WAJCHENBERG, B.L. **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Roca, 1992. p.683-706.
- 13 DULIN, W. E., WYSE, B. M., KALAMAZOO, M. S. Studies on the ability of compouds to block the diabetogenic activity of streptozotocin. **Diabetes**, [S.I.], v. 18, p. 459-466, 1969.
- 14 EFENDIC, S.; CERASI, E.; LUFT, R.; GLADNIKOFF, G. Potentiation of glucose-induced insulin release by glucose in the isolated pancreas of fed and fasted rats. **Diabetes**, Stockolm, v. 25, p.954-954, Oct., 1975.
- 15 ELLIOTT R.B., CHASE H.P. Prevention or delay on type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in children using nicotinamide. **Diabetologia**, [S.I.], v.34, p. 362-365, 1991.

- 16 EIZIRIK, D.L.; STRANDELL, E. and SANDLER, S. Culture of mouse pancreatic islets in different glucose concentrations modifies B cell sensitivity to streptozotocin. **Diabetologia**, Uppsala, v. 31, n. 3, p. 168-174, Mar., 1988.
- 17 FERNER, H. Das Inselsystem des pankreas, pp. 109-86. **Thieme Verlag**, Stuttgart, 1952.
- 18 GALE, E. A. M. Theory and Praticce of Nicotinamide Trials in Pre-Type 1 Diabetes. **J. Pediatr Endocrinol. & Metabolism**, London, v. 9, p. 375-379, 1996.
- 19 GIROIX, M.H.; DUFRANE, S.P.; MALAISSE-LAGAE, F.; SENER, A.A and MALAISSE, W.J. Fasting-induced impairment of glucose-1, 6-bisphosphate syntesis in pancreatic islets. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, [S.I.], v. 119, p. 543-548, 1984.
- 20 GOLDEN, P.; BAIRD, L.; MALAISSE, W.J.; MALAISSE-LAGAE, F. and WALKER, M. Effect of streptozotocin on glucose-induced insulin secretion by isolated islets of Langerhans. **Diabetes**, St. Louis, v.20, p. 513-518, Aug., 1971.
- 21 GOTOH, M.; MAKI, T.; KIYOIZUMI, T.; SATOMI, S.; MONACO, A. P. Na improved method for isolation of mouse pancreatic islets. **Transplantation**, Baltimore, v. 40, n. 4, p. 437-438, 1985.
- 22 GRODSKY, G. M.; BENNETT, L. L.; SMITH, D. F.; e SCHMID, F. G. Effect of pulse administration of glucose or glucagon on insulin secretion *in vitro*. **Metabolism**, [S.I.], v.16, p.22-3, 1967.
- 23 GRUBE, D.; ECKERT, I.; SPECK, P.T.; e WAGNER, H.J. Immunohistochemistry and microanatomy of the islets of Langerhans. In Brain-gut axis (ed. T. Fujito, T. Kanno and N.Yanaihara). **Biomed. Res.**, [S.I.], v.4 (Suppl.), p.25-36, 1983.

- 24 GUNNARSSON, R., BERNE, C., and HELLERSTROM, C.: Cytotoxic effects of streptozotocin on N-nitrosomethylurea on the pancreatic B-cell with special regard to the role of NAD. **Biochem. J.**, Sweden, v.140, p.487-94, 1974.
- 25 HELLER SP, WANG ZQ, WAGNER EF, RADONS J, BURKLE A, FEHSEL K, BURKART V, KOLB H. Poly (ADP-ribose) polymerase dependent toxicity of oxygen radicals and oxide in murine islet cells. **J. Biol. Chem.**, [S.I.], in press, 1995.
- 26 HELLMAN, B. The volumetric distribution of the pancreatic islet tissue in young and old rats. **Acta Endocrin**, [S.I.], v.31, p.91-106, 1959.
- 27 _____. Islet morphology and glucose metabolism in relation to the specific function of the pancreatic b-cells. **Excerpta Med. Int. Congr. Ser.** [S.I.], v.172, p.92-109, 1967.
- 28 HO, C. K. & HASHIM, A. S.: Pyridine nucleotide depletion in pancreatic islets associated with streptozotocin-induced diabete. **Diabetes** , [S.I.], v.21, p. 789-793, 1972.
- 29 HERR, R. R., JAHNKE, H. K.and ARGOUDELIS, A.D. The structure of streptozotocin. **J. Am. Chem. Soc.** , [S.I.], v.89, p. 4808-4809, 1967.
- 30 IN'T VELD, P., SCHUIT, F., e PIPELEERS, D. Gap junctions between pancreatic β -cells are modulated by cyclic AMP. **Eur. J. Cell Biol.**, [S.I.], v.36, p. 269-76, 1985.
- 31 IN'T VELD, P.; PIPELEERS, D.; e GEPTS, W. Glucose alters configuration of gap junctions between pancreatic islet cells. **Am. J. Physiol.**, [S.I.], v.251, p. C191-C196,1986.
- 32 KOERKEN, D. J.; RUCH, W.; CHIDECKEL, E.; PALMER, J.; GOODNER, C. J.; ENSINCK, J. and GALE, C. G. Somatostatin: hypothalamic inhibitor of the endocrine pancreas. **Science**, [S.I.], v.184, p. 482-4, 1974.

- 33 KOHEN, E.; KOHEN, C.; and RABINOVITCH, A. Cell-to-cell communication in rat pancreatic islet monolayer cultures is modulated by agents affecting islet-cell secretory activity. **Diabetes**, [S.I.] v. 323, p. 95-8, 1983.
- 34 KOLB, H.; BURKART, V. Nicotinamide in type 1 diabetes: Mechanism of action revisited. **Diabetes Care**, Düsseldorf, v. 22, Suppl.2, p. 16-20, 1999.
- 35 KOLB, H.; BURKART, V.; APPELS, B.; HANNENBERG, H.; KANTWERK-FUNKE, G.; KIESEL, U.; FUNDA, J.; SCHRAERMAYER, U.; KOLB-BACHOFEN, V. Essential contribution of macrophages to islet cell destruction in vivo and in vitro. **J. Autoimmun.**, [S.I.], v.2, p. 1-4, 1990.
- 36 KRÖNCKE K.D., FEHSEL, K., SOMMER, A., RODRIGUEZ, L. M., and KOLB-BACHOFEN. Nitric Oxide Generation during Metabolization of the Diabetogenic N-Methyl-N-Nitroso-Urea Streptozotocin Contributes to Islet Cell DNA Damage. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, [S.I.], v.376, p. 179-185, 1998.
- 37 LACY, P.E. e GREIDER, M.H. Ultrastructural organization of mammalian pancreatic islets. In **Handbook of physiology**. [S.I.], (ed. S.R.Greiger), Section 7, Vol. 1, pp. 77-90, 1972. American Physiological Society, Washington, DC.
- 38 LACY, P. E. and KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, St. Louis, v. 16, p. 33-39, Jan., 1967.
- 39 LAMPETER E.F., KLINGHAMMER A., SCHERBAUM W.A., HEINZE E., HAASTERT B., GIANI G., KOLB H. The Deutsche Nicotinamide Intervention Study: Na Attempt to Prevent Type Diabetes. **Diabetes**, Düsseldorf, v. 47, p. 980-984, 1998.
- 40 LAZAROW, A. Protection against alloxan diabetes. **Anat. Rec.**, [S.I.], v. 97, p. 353-344, 1947.

- 41 LE DOUX, S. P.; HALL, C. R.; FORBES, P. M.; PATTON, N. J.; WILSON, G. Mechanisms of nicotinamide, thymidine protection from alloxan, streptozotocin toxicity. **Diabetes**, [S.I.], v.37, p. 1015-1019, 1988.
- 42 LILJENQUIST, J. E., HORWITZ, D. L., JENNINGS, A.S., et. all. Inhibition of insulin secretion by exogenous insulin in normal man as demonstrated by C-peptide assay. **Diabetes**, [S.I.], v.27, p. 563-70, 1978.
- 43 Mc EVOY, R. C. Changes in the volumes of the A-, B-, and D-cell populations in the pancreatic islets during the postnatal development of the rat. **Diabetes**, [S.I.], v.30, p. 813-17, 1981.
- 43 MALDONATO, A.; TRUEHEART, P. A.; RENOLD, A. E. and SHARP, G. W. G. Effects of streptozotocin in vitro on proinsulin biosynthesis, insulin release and ATP content of isolated rat islets of Langerhans. **Diabetologia**, [S.I.], Genève, v. 12, n. 5, p. 471-481. Oct., 1976.
- 44 MANDRUP-POULSEN, T.; BENDTZEN, K.; NIELSEN, J. H.; BENDIXEN, G.; NERUP, J. Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans. **Allergy**, [S.I.], v. 40, p. 424, 1985.
- 45 MALAISSE, W. J., MALAISSE-LAGAE, F., and MAYHEW, D. A possible role for the adenylyl cyclase system in insulin secretion. **J. Clin. Invest.** [S.I.], v.46, p. 1724-34, 1967.
- 46 MASUTANI M., SUZUKI H, KAMADA N, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, Japan, v. 96, N. 5, p. 2301-23004, 1999.
- 47 MEDA, P., PERRELET, A., e ORCI, L. Increase of gap junctions between pancreatic β -cells during stimulation of insulin secretion. **J. Cell. Biol.** [S.I.], v.82, p. 441-8, 1979.
- 48 MEDA, P., MICHAELS, R. L., HALBAN, P. A., ORCI, L., e SHERIDAN, J. D. In vivo modulation of gap junctions and dye coupling between β -cells of the intact pancreatic islet. **Diabetes**, [S.I.], v.32, p. 858-68, 1983.

- 49 MENDEZ, J.D.; RAMOS, H.G. Animal models in diabetes research. **Archives of Medical Research**, [S.I.], v.25, n. 4, p. 367-375, 1994.
- 50 MERING, J. VON, and O. MINKOWSKI: **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol**, [S.I.], v.26, p.371-381, 1890.
- 51 MURPHY, W. A., FRIES, J. L., MEYERS, C.A., e COY, D. H. Human pancreatic polypeptide inhibits insulin release in the rat. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, [S.I.], v.101, p.189-93, 1981.
- 52 MUIR, A., SCHATZ, D.A., MACLAREN, N. K. The pathogenesis, prediction, and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North América**, [S.I.], v.21, n. 2, p. 199-219, Jun. 1992.
- 53 NATHAN, D. Long-term complications of diabetes mellitus. **The New England of Medicine**, [S.I.], v. 328, n. 23, p. 1676-1685, Jun. 1993.
- 54 NERUP, J.; MANDRUP-POULSEN, T., MOLVING, J.; WOGENSEN, L.; EGEBERG, J. Mechanisms of pancreatic β -cell destruction in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, Copenhagen, v.11 (Suppl 1), p. 16-23, 1990.
- 55 NOMIKOS IN, PROWSE SJ, CAROTENUTO P, LAFFERTY KJ. Combined treatment with nicotinamide and desferrioxamine prevents islet allografts destruction in NOD mice. **Diabetes**, [S.I.], v. 35, p. 1302-1304, 1986.
- 56 OKAMOTO, H.: Regulation of proinsulin syntesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes. **Mol. Cell. Biochem.**, [S.I.], v. 37, p. 43-61, 1981.
- 57 _____. The role of poly(ADP-ribose) syntetase in the development of insulin-dependent diabetes and islet B-cell regeneration. **Biomed. Biochim. Acta**, Japan, v. 44, p. 15-20, 1985.

- 58 ORCI, L.; MALAISSE-LAGAE, F., RAVAZOLLA, M., et al. A morphological basis for intercellular communication between α - and β -cells in the endocrine pancreas. **J. Clin. Invest.** [S.I.], v.56, p. 1066-70, 1975.
- 59 ORCI, L. e UNGER, R. H., Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. **Lancet** [S.I.], v.2, p. 1243, 1975.
- 60 PIPELEERS, D., Islet cell interactions with pancreatic B-cell. **Diabetologia** [S.I.], v.30, p. 277-91, 1984.
- 61 RAHIER, J.; GOEBBELS, R.M., e HENQUIN, J.C. Cellular composition of the human diabetic pancreas. **Diabetologia**, [S.I.], v.24, p. 366-71, 1983.
- 62 RASSCHAERT, J.; EIZIRIK, D.L.; MALAISSE, W.J. Long term *invitro* effects of streptozotocin, interleukin-1, and high glucose concentration on the activity of mitochondrial dehydrogenases and the secretion of insulin in pancreatic islets. **Endocrinology**, Uppsala, v. 130, n. 6, p.3522-3528, Jun., 1992.
- 63 RODGER, W. Insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal**, v.145, n.10, p.1227-1237, Nov.1991.
- 64 RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M.L.; and NADKARINI, M.V.: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC 37917). **Cancer Chemother. Rep.** [S.I.], v.29, p. 91-98, 1963.
- 65 ROSSINI, A. A., LIKE, A. A., DULIN, E. W., e CAHILL, F. G. Pancreatic Beta Cell Toxicity by Streptozotocin Anomers. **Diabetes**, [S.I.], v.26, p.1120-24, Dec., 1977.
- 66 SAMOLS, E., BONNER-WEIR, S., e WEIR, G. C. Intra-islet insulin-glucagon-somatostatin relationships. **Clin. Endocr. Metab.**, [S.I.], v.15, p.33-58, 1986.
- 67 SAMOLS, E., MARRI, G., e MARKS, V. Promotion of insulin secretion by glucagon. **Lancet**, [S.I.], v.2, p. 415-16, 1965.

- 68 SANDLER, S. & A. ANDERSON: The partial protective effect of the hydroxyl radical scavenger dimethyl urea on streptozotocin-induced diabetes in mouse in vivo and in vitro. **Diabetologia**, [S.I.], v. 23, p. 374-378, 1982.
- 69 SANDLER S.; ANDERSON A.; HELLERSTRÖM C. Inhibitory effects of interleukin 1 on insulin secretion, insulin biosynthesis and oxidative metabolism of isolated rat pancreatic islets. **Endocrinology**, [S.I.], v. 12, p. 1424, 1987.
- 70 SANDLER, S.; WELSH, M. and ANDERSON, A. Streptozotocin-induced impairment of islet B-cell metabolism and its prevention by a hydroxyl radical scavenger and inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. **Acta phamacol. et toxicol.**, Uppsala, v. 53, n. 5, p. 392-400, Nov., 1983.
- 71 SCHEIN, P. S., COONEY, D. A., VERNON, M. L. . The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. **Cancer Res.** [S.I.], v.27, p.2324-2332, 1967.
- 72 SCHEIN, P. S., COONEY, D. A., McMENAMIN M. G. and ANDERSON, T. Streptozotocin diabetes – Further studies on the mechanism of depression of nicotinamide adenine dinucleotide concentration in mouse pancreatic islets and liver. **Biochem. Pharmacol.**, [S.I.], v. 22, p. 2625-2631, Jan., 1973.
- 73 SMISMANS, A.; LING, Z.; PIPELEERS, D. Damaged Rat β Cells Discharge Glutamate Decarboxylase in the Extracellular Medium. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Brussels, v.228, n. 2, p. 293-297, Nov, 1996.
- 74 STEFAN, Y., ORCI, L., MALAISSE-LAGAE, F., PERRELET, A., PATEL, Y., and UNGER, R.H. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of non-diabetic and diabetic humans. **Diabetes**, [S.I.], v.31, p.694-700, 1982.

- 75 UCHIGATA, Y.; YAMAMOTO, H.; KAWAMURA, A. and OKAMOTO, H. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 257, n. 11, p. 6084-6088, Jun., 1981.
- 76 UCHIGATA Y., YAMAMOTO H., NAGAI H., OKAMOTO H. Effect of poly (ADP-ribose) syntetase inhibitor administration to rats before, after injection of alloxan, streptozotocin on islet proinsulin synthesis. **Diabetes**, [S.I.], v. 32, p. 316-318, 1983.
- 77 VAGUE P., PICQ R., BERNAL M., LASSMAN-VAGUE V., VIALETTIS B. Effect of nicotinamide on the residual insulin secretion of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. **Diabetologia**, [S.I.], v. 32, p. 316-321, 1989.
- 78 WALDHÄUSL, W. K., GASIC, S., BRATUSCH-MARRAIN, P., KORN, A., and NOWOTNY, P. Feedback inhibition by biosynthetic human insulin of insulin release in healthy human subjects. **Am. J. Phys**, [S.I.], v.243, p.E476-E482, 1982.
- 79 WILANDER, E. and GUNNARSSON, R.: Diadetogenic effects of N-nitrosomethylurea in the chinese hamster. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A**, [S.I.], v.83, p. 206-12, 1975.
- 80 YAMADA, K., NONAKA, K., HANAFUSA, T., MIYAZAKI, A., TOYOSHIMA, H., TARUI, S. Preventive and therapeutic effects of large-dose nicotinamide injections on diabetes associated with insulinitis. **Diabetes**, [S.I.], v. 31, p. 749-753, 1982.
- 81 YAMAMOTO, H., UCHIGATA, Y. & OKAMOTO, H.: DNA strand breaks in pancreatic islets by *in vivo* administration of alloxan or streptozotocin. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, [S.I.], v.103, p. 1014-20, 1981^(a).