

O PÂNCREAS ENDÓCRINO

Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo

Profa. Dra. Ísis do Carmo Kettelhut

Maria Ida Bonini Ravanelli

Walter Dias Júnior

INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus (DM)* é uma desordem metabólica causada por deficiência na secreção e/ou na ação da insulina, o que resulta na exacerbação de processos catabólicos e inibição das vias de síntese do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas.

Sintomas semelhantes ao *DM* foram primeiramente descritos nos papiros do Egito por volta de 1500 a.C.. *Mellitus*, palavra em latim que significa doce, caracterizando o alto conteúdo de glicose presente na urina do diabético. A palavra *diabetes*, possui origem grega e significa sifão, referindo-se à grande excreção de água que caracteriza o *DM*.

Embora conhecida há milênios e imaginada ser uma doença renal, devido à grande eliminação de água, foi apenas em 1889, que Oskar Minkowski e Von Mering correlacionaram os sintomas observados em cães pancreatectomizados com o quadro de *Diabetes* severo e morte, anteriormente descrito. A partir desta descoberta atribuiu-se ao pâncreas um papel endócrino, responsável pela produção de hormônios fundamentais no controle do metabolismo de carboidratos. Foi somente em 1921 que Banting e Best descobriram a insulina, obtendo a forma cristalina do hormônio a partir de um grupo isolado de células do pâncreas, as ilhotas de Langerhans (as quais haviam sido descritas em 1869 por Langerhans). Em 1955, Sanger divulgou a estrutura química da molécula da insulina.

Mais recentemente, o emprego de drogas que causam a destruição das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas tem sido utilizado como um procedimento interessante para obtenção de modelos de Diabetes experimental para o estudo das alterações metabólicas decorrentes da deficiência de insulina.

Dentre as drogas citotóxicas destaca-se a aloxana, uma droga de ação rápida, seletiva em células β e de baixo custo. Sua toxicidade é devido à geração de radicais hidroxila altamente reativos, o que resulta na perda de função mitocondrial e

necrose celular, e conseqüentemente deficiência de insulina em animais de laboratório.

OBJETIVO

Estudar em ratos os efeitos da deficiência insulínica, induzida por aloxana, sobre o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas simulando o quadro de *diabetes mellitus* experimental do tipo I.

Protocolo Experimental

A - Preparação dos animais e avaliação dos parâmetros metabólicos

Utilizar ratos machos Wistar de aproximadamente 200-250 gramas de peso. Deixá-los em jejum, com água, por cerca de 15 horas. Administrar no final deste período aloxana, por via intravenosa peniana, na dose de 40 mg/Kg de peso do animal (Preparar uma solução de 2 %, contendo portanto 4 mg da droga por 0,2 ml de salina, e administrar 0,2 ml para cada 100 g de peso do rato). Cerca de meia hora após a administração da droga oferecer comida aos animais.

Após este procedimento, 5 animais controles e 5 animais diabéticos serão colocados individualmente em gaiolas metabólicas. Durante 1 semana, serão determinados diariamente os seguintes parâmetros: peso corporal, volume urinário, quantidade em gramas de alimento ingerido (quantidade diária oferecida: 40 g) e o volume de água ingerida. Ao final deste período de acompanhamento, os animais serão sacrificados realizando-se os seguintes procedimentos:

- Construção da tabela final dos parâmetros metabólicos.
- Determinação das médias dos resultados referentes à variação de peso corporal, volume urinário, quantidade de água e alimento ingerido, a partir dos dados coletados na gaiola metabólica após a indução do *diabetes*.
- Determinação da uréia na urina (ver o procedimento a seguir).
- Medida da glicosúria, pH e cetonúria utilizando fitas testes em uma pequena alíquota da urina de 24 horas (Labstix – Bayer Diagnósticos).
- Determinação da glicemia pelo método da glicose oxidase (ver o procedimento a seguir).
- Medida dos pesos da gordura retroperitoneal e epididimal dos ratos controles e diabéticos.
- Discussão final dos resultados.

Determinação de uréia na urina

Kit uréia - Labtest Diagnóstica S.A.

A. Procedimento

1. Diluir a urina do animal controle 50 vezes e a urina do animal diabético 25 vezes.
2. Pipetar em 4 tubos de ensaio:
 - 0,02 ml da urina diluída (nos tubos controle e diabético).
 - 0,02 ml de H₂O destilada (no tubo branco).
 - 0,02 ml da solução padrão (70 mg/100 ml) no tubo padrão.
 - 2 ml de reagente I (urease tamponada)
3. Misturar e incubar a 37° C durante 5 minutos.
4. Pipetar em todos os tubos:
 - 2 ml de reagente II (oxidante de uso).
5. Misturar e incubar a 37° C durante 5 minutos. Determinar as absorvâncias em 600 nm. A cor é estável por 2 horas.

B. Cálculo

$$\text{uréia (mg/100 ml)} = \frac{\text{Leit. desc.} \times 70 \times \text{diluição}}{\text{Leit. Padrão}}$$

Diluição: controle = 50

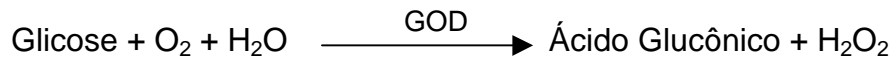
diabético = 25

Obs.: Corrigir para volume urinário de 24 horas.

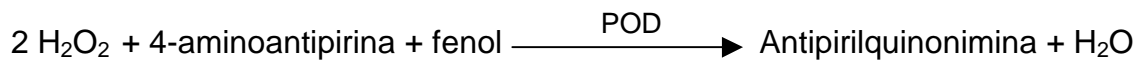
Determinação da glicemia (método da glicose oxidase)

Kit Glicose-oxidase – Glicolabor

A. Princípio - A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose da amostra (ver reação abaixo).



B. Procedimento

- Aquecer ratos em caixa com lâmpada, fazer corte na ponta da cauda e retirar aproximadamente 0,5 mL de sangue em tubo eppendorf (previamente heparinizados).
- Centrifugar amostras a 2500 rpm por 10 minutos.
- Transferir o plasma para outro eppendorf.
- **Realizar o ensaio da seguinte forma:**
- No tubo denominado Branco pipetar 20 µL de água destilada.
- No tubo denominado Padrão pipetar 20 µL da solução padrão de glicose.
- No tubo denominado Controle pipetar 20 µL de plasma do rato controle.
- No tubo denominado Diabético pipetar 20 µL de plasma do rato diabético.
- Pipetar em todos os tubos 2 mL do reagente de cor
- Misturar vigorosamente e colocar em banho-maria a 37° C durante 15 minutos.
- Realizar a medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 505 nm. Não demorar mais que 60 minutos para proceder a leitura.

C. Cálculo

$$\text{Glicose (mg/dL)} : \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. **Fisiologia**, 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999. cap. 71, p. 842-854: O Pâncreas Endócrino.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Physiology**. 3.ed. Mosby Year Book, 1992. cap. 46, p. 851-875: Hormones of the Pancreatic Islets
- CAHILL, J. G. F. Physiology of insulin in man. **Diabetes**, v.20, p. 785-799, 1971.
- DUNN, J. S.; McLETCHIE, N. G. B. Experimental Alloxan Diabetes in the rat. **Lancet**, v. II, p. 384-387, 1943.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3.ed. WORTH, 2000. cap. 23, p. 869-902: Integration and Hormonal Regulation of Mammalian Metabolism.