

Esquema de Restrição Alimentar Altera a Resposta Celular à Insulina em Ratos Diabéticos

artigo original

RESUMO

A resistência à insulina é um elemento chave na gênese de várias alterações fisiopatológicas. O esquema de restrição alimentar *meal-feeding* (MF) consiste na oferta de uma única refeição diária de 2h, sem, contudo, limitar a quantidade de alimento durante esse período. Este esquema determina várias adaptações morfo-metabólicas, algumas sugerindo maior sensibilidade à insulina. No presente estudo investigou-se, em adipócitos isolados, a sensibilidade à insulina de ratos submetidos a treinamento alimentar e tornados diabéticos (MFD) comparando-os com ratos em livre curso alimentar diabéticos (FFD). A curva dose resposta da captação de 2-deoxi-D-glicose estimulada por insulina sugeriu maior sensibilidade, enquanto a captação máxima foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos ratos MFD. Esta maior responsividade à insulina refletiu-se no metabolismo dos adipócitos que mostraram aumento ($p < 0,05$) na capacidade máxima de oxidar glicose a CO_2 e incorporar glicose em triacilglicerol. O aumento da resposta celular à insulina em ratos MFD refletiu-se *in vivo* em menor ($p < 0,05$) insulinemia e maior ($p < 0,05$) índice glicose/insulina (G/I). Em conjunto, os resultados indicam que o treinamento alimentar melhora a resposta à insulina em ratos diabéticos, o que pode representar uma abordagem alternativa no tratamento do diabetes mellitus. (Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/4: 339-346)

Unitermos: Restrição alimentar; Ação da insulina; Diabetes mellitus; Captação de glicose; Oxidação de glicose; Receptor de insulina

ABSTRACT

Insulin resistance is a key element in the genesis of several pathophysiological changes. Meal feeding (MF) - one daily 2-hour meal, without food restriction in the period - determines several morpho-metabolic adaptations, some of them suggesting enhanced insulin sensitivity. In the present study with isolated adipocytes, we investigated insulin resistance in rats submitted to meal feeding, making them diabetic (MFD). Later, they were compared with diabetic rats under a free feeding diet (FFD). The insulin-stimulated 2-deoxy-D-glucose uptake dose-response curve suggested higher sensitivity, whereas maximum uptake was significantly higher ($p < 0.05$) in MFD rats. This higher sensitivity to insulin had an impact on adipocyte metabolism which showed an increase ($p < 0.05$) in its capacity to oxidize glucose to CO_2 and to transform glucose into triacylglycerol. The increase in the cellular response to insulin in MFD rats *in vivo* resulted in lower insulinemia ($p < 0.05$) and in higher glucose/insulin (G/I) index ($p < 0.05$). In combination, these results indicate that meal feeding improves insulin response in diabetic rats, which can represent an alternative approach in treating diabetes mellitus. (Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/4: 339-346)

Keywords: Food restriction; Insulin action; Diabetes mellitus; Glucose uptake; Glucose oxidation; Insulin receptor

Doris Hissako Sumida
Maristela Mitiko Okamoto
Fábio Bessa Lima
Ubiratan Fabres Machado
Naomi Shinomiya Hell

Departamento de Fisiologia e
Biofísica, Instituto de Ciências
Biomédicas, Universidade de São
Paulo (USP), São Paulo, SP.

Recebido em 13/09/1999
Revisado em 18/02/2000
Aceito em 10/04/2000

A RESISTÊNCIA À INSULINA TEM SIDO considerada um elemento chave na gênese de importantes alterações fisiopatológicas que aumentam tanto a morbidade como a mortalidade dos indivíduos acometidos. O conjunto destas alterações tem sido referido como “síndrome X” ou “doença plurimetabólica”, apresentando um espectro que envolve obesidade, diabetes mellitus, hipertensão arterial, doença cardiovascular aterosclerótica e dislipidemias (1). A investigação das alterações do mecanismo de ação da insulina presentes na resistência, assim como a investigação de protocolos que melhorem a sensibilidade, à insulina representam um passo importante na busca de mecanismos preventivos e/ou curativos para condições relacionadas com a resistência à insulina.

O esquema de restrição alimentar usualmente denominado de *meal feeding* (MF), consiste na oferta de uma única refeição diária de 2 horas, sem restringir a disponibilidade de ração durante esse período, e desenvolve muitas adaptações morfo-metabólicas como, por exemplo: aumento da capacitância gástrica (2), lento esvaziamento gástrico (3), intensificação de processos lipogênicos tanto no tecido hepático (4,5) como no adiposo (4,6), baixa lipomobilização (2), alto conteúdo de glicogênio hepático no período interprandial e resistência a sua depleção (3,7), baixa atividade neoglicogênica hepática (8), aumento da atividade na via glicolítica (9) e maior eficiência alimentar (3,10,11). Muitos desses aspectos falam a favor de sensibilização tecidual às ações da insulina.

Estudos anteriores demonstraram que, de fato, os ratos MF exibem alta sensibilidade e responsividade à insulina (resposta confirmada no teste de tolerância à insulina, captação de glicose, oxidação de glicose, incorporação de glicose na molécula lipídica) principalmente no momento da expectativa da refeição habitual (11,12).

Sabendo-se que a restrição alimentar promove um aumento na sensibilidade insulínica, especialmente no metabolismo de carboidratos, tornou-se fundamental averiguar se esse protocolo poderia promover melhora na responsividade à insulina, mesmo na vigência de uma hipoinsulinemia induzida.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram estudados ratos Wistar adultos (2 meses de idade e peso corpóreo oscilando ao redor de 250g no início do experimento), mantidos em ambiente de 12/12h de claro/escuro (período claro iniciado às 7:00h) e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Ao iniciar os estu-

dos, avaliou-se o peso corporal de cada animal que, em seguida, foi transferido para gaiola individual onde permaneceu 24h com disponibilidade plena de água e ração. Após esse período de ambientação, os animais foram divididos em dois grupos, segundo o esquema alimentar imposto: grupo *free-feeding* (FF) cuja disponibilidade de ração era sempre plena e MF alimentado apenas das 8:00 às 10:00h, sem, contudo, limitar a quantidade de ração nessas 2 horas. A quantificação de alimento ingerido foi realizada diariamente e a do peso corpóreo, a intervalos de 3 dias. Este procedimento possibilita o manuseio constante dos animais de modo a reduzir o grau de estresse nos experimentos. Na segunda semana de estudo, os animais (em restrição ou não) foram tornados diabéticos pela injeção intravenosa (veia peniana) de aloxana (40mg/kg p.c.) ministrada sob anestesia com éter, e mantidos por mais 2 semanas em regime alimentar próprio. Neste estudo, os ratos tornaram-se diabéticos não dependentes de insulina. Os experimentos foram realizados às 8:00h. Os animais foram sacrificados por decapitação, o sangue foi obtido do tronco cerebral, e o plasma separado para posterior determinação da glicemia e insulinemia.

Isolamento de adipócitos

Imediatamente após o sacrifício realizou-se laparotomia mediana para remoção do tecido adiposo periepididimal. Os adipócitos foram isolados de acordo com Rodbell (13), com algumas modificações (14). Em resumo, foi retirado o pâncreo adiposo periepididimal de cada animal, pesado e colocado em 4mL de tampão digestivo (D'MEM/HEPES 25mM/BSA 4%, colagenase II 2,0mg/mL, pH 7,4 a 37°C). O tecido foi fragmentado com tesoura fina e incubado por 55min (37°C) sob agitação (180rpm em banho-maria de agitação orbital). Após a digestão, a amostra foi filtrada e lavada três vezes com 25mL de tampão EARLE 20mM contendo soro albumina bovina 1%, piruvato de sódio 1mM, sem glicose, pH 7,4 e mantido a 37°C (EARLE “Buffer” - EB). Após a terceira lavagem, a suspensão celular foi deixada 1h em banho-maria a 37°C , com a finalidade de minimizar os efeitos da insulina endógena. Em seguida lavou-se novamente a suspensão celular com o tampão EB e o volume final foi acertado, a fim de se obter um lipócrito de 5%.

Captação de 2-deoxi-D-glicose triciada (^3H -2DG) insulino-induzida

Alíquotas (450 μL) de suspensão celular foram pipetadas em tubos plásticos contendo 25 μL de insulina fria em concentrações crescentes (0; 0,1; 0,2; 0,3;

0,5; 1,0; 2,5; 10 e 25ng/mL) e incubadas por 30min a 37°C, sob agitação horizontal. Pela adição de 25µL de ³H-2DG (concentração final de 0,1mM e 0,15µCi/tubo) e incubação durante exatos 3min, avaliou-se a captação de glicose. Para tanto, ao término do terceiro minuto, 200µL da suspensão foram transferidos para tubos de microcentrífuga contendo óleo de silicone (densidade 0,963) e foram centrifugados por 5seg. A centrifugação separou 3 fases: uma superior, contendo camadas de células compactadas (*pellet* celular), uma intermediária, correspondente ao óleo, e a mais interna, constituída pelo tampão aquoso. A fase superior foi separada e mergulhada em frascos contendo 4mL de líquido de cintilação para amostras aquosas; a radiação beta emitida foi avaliada em contador beta (Beckman LS-8000). Em outro tubo procedeu-se à incubação de 450µL da mesma suspensão celular com adição de 25µL de L-[1-¹⁴C]-glicose (0,1µCi/tubo) em lugar de ³H-2DG. Este destinou-se à determinação da incorporação inespecífica.

Ligação da insulina a seus receptores

A suspensão celular foi transferida para tampão EB de pH 7,8. Alíquotas (450µl) dessa suspensão celular foram incubadas a 15°C por 3h, na presença de 25µL de ¹²⁵I-insulina monoiodada (20.000 c.p.m./tubo) e 25µL de insulina “fria” em concentrações crescentes (concentração final: 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 50; 100; e 5.000ng/mL). A esta temperatura, a internalização do complexo insulina-receptor é desprezível (15). Ao final da incubação, 200µL da suspensão celular foram transferidas para tubos de microcentrífuga contendo óleo de silicone e centrifugados por 5seg. A radioatividade do *pellet* celular foi avaliada no contador gama. A análise de Scatchard (16) foi realizada para calcular o número de receptores e a constante de dissociação aparente (K_D) que representa a afinidade do hormônio ao seu receptor.

Nas avaliações acima mencionadas, parte da suspensão celular foi destinada à determinação do volume celular de acordo com DiGirolamo (17), de modo a permitir a expressão dos resultados por área da superfície celular.

Oxidação de D-(U-¹⁴C)-glicose a ¹⁴CO₂

A suspensão celular foi transferida para o tampão Krebs-Ringer-Bicarbonato de sódio 24,6mM - BSA 1% (KRB), saturado de O₂/CO₂ (95%/5%), pH 7,4 e temperatura de 37°C. Aos 450µL de suspensão celular acrescentou-se 25µL de insulina “fria” nas concentrações de 0 e 100ng/µL e 25µL de D-[U-¹⁴C]-glicose (2mM, 0,1µCi/tubo). Esta mistura foi incubada

por 1h, a 37°C, sob agitação orbital (150rpm) em tubos plásticos, com tampas de borracha para evitar o escape do carbogênio injetado a cada 15min. Ao término da incubação, procedeu-se à digestão celular com H₂SO₄ 8 N para provocar a liberação de CO₂ a ser adsorvido em tiras de papel de filtro Whatman #2 (2x5cm) embebidas com 100µL de etanolamina. A transferência destas para um frasco contendo coquetel de cintilação permitiu avaliar em contador beta a radiação emitida (18).

Incorporação de D-(U-¹⁴C)-glicose em lipídios

Para a extração dos lipídios das amostras remanescentes nos tubos do experimento anterior, adicionou-se, em cada tubo, 2,5mL de reativo de Dole (isopropanol: heptano: H₂SO₄ 8 N, na proporção de 4:1:0,25) e, durante os 30min seguintes, esse tubo foram agitados 5 vezes em “vortex”. Terminada essa fase, acrescentou-se 1,5mL de água destilada e 1,65mL de heptano. Da fase superior dessa mistura, 500µL foram transferidos para um frasco contendo líquido de cintilação para determinação da radioatividade beta acumulada (19).

Procedimentos analíticos

A glicemia foi quantificada pelo método de glicose-oxidase (Analisa, São Paulo, Brasil) e a insulinemia pelo método radioimunológico (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA).

Análise estatística dos resultados

A avaliação estatística dos resultados foi realizada pelo teste “t” de Student, prefixando-se o nível de significância para 95% (p<0,05).

RESULTADOS

Perfil geral dos animais

O perfil geral dos animais pode ser visto na tabela 1. Ao final de 28 dias de observação, os ratos *meal-feeding* diabéticos (MFD) apresentaram redução de 19,4% no peso corpóreo e de 50% na ingestão alimentar em relação aos *free-feeding* diabéticos (FFD). No momento do sacrifício, as glicemias não diferiram entre os grupos. Por outro lado, a insulinemia do grupo MFD foi estatisticamente inferior à do grupo FFD. A partir dos valores de glicemia e insulinemia, foi calculado o valor do índice G/I, um importante índice de sensibilidade à insulina *in vivo* (20), quanto maior este valor mais insulino-sensível é considerado o animal. O grupo MFD apresentou valor G/I significativamente maior (p<0,05) que o grupo FFD.

Tabela 1. Perfil geral dos ratos *free-feeding* diabéticos (FFD) e *meal-feeding* diabéticos (MFD).

	FFD	MFD
• Peso corpóreo (g)		
inicial	235,0 ± 8,6 (21)	251,8 ± 6,2 (20)
14º dia	271,4 ± 7,4 (21)	236,0 ± 8,0 (20)*
28º dia	269,2 ± 6,0 (21)	217,0 ± 6,0 (20)*
• Ingestão alimentar (g)		
inicial	19,6 ± 0,3 (19)	6,4 ± 0,3 (19)*
14º dia	21,4 ± 0,6 (21)	12,1 ± 0,5 (20)*
28º dia	25,8 ± 1,6 (21)	12,9 ± 0,8 (20)*
• Glicemia (mg/dL)	285,0 ± 34,0 (21)	273,5 ± 33,4 (22)
• Insulinemia (µU/mL)	29,0 ± 2,9 (21)	14,0 ± 0,7 (22)*
• Índice G/I	13,3 ± 2,4 (21)	22,4 ± 3,6 (22)*

Os dados são média ± EPM. Entre parênteses, o número de animais.

* p < 0,05 vs FFD.

Captação de ³H-2DG pelos adipócitos isolados

Na figura 1A estão representadas as EC₅₀ (concentração hormonal necessária para atingir metade da resposta máxima de transporte) dos ratos MFD e FFD; nesta figura pode-se constatar uma diminuição de 33% na EC₅₀ dos ratos MFD, que não foi estatisticamente significativa. A figura 1B apresenta as curvas dose-resposta à insulina e ilustra a tendência do grupo MFD em apresentar deslocamento da curva para a esquerda, com valores de captação mais altos que do FFD. Comparações feitas entre os grupos demonstraram que não houve diferença significativa em relação à captação basal de ³H-2DG. Entretanto, a captação máxima de ³H-2DG e o delta (diferença entre a captação máxima e a basal) foram maiores (p < 0,05) no grupo MFD (figura 1C).

Oxidação de (¹⁴C)-glicose a CO₂ pelos adipócitos isolados

A capacidade de oxidar glicose estimulada por insulina foi avaliada através da análise da diferença entre o valor basal e o máximo (delta-Δ), que foi maior (p < 0,05) no grupo MFD (figura 2A).

Incorporação de (¹⁴C)-Glicose em lipídios pelos adipócitos isolados

A capacidade de incorporar glicose em lipídios sob estímulo com insulina foi avaliada e o valor de delta da incorporação de [¹⁴C]-glicose foi maior (p < 0,05) no grupo MF (figura 2B).

Ligação da insulina a seus receptores

A figura 2C mostra o número de receptores insulínicos (R_i) e a constante de dissociação aparente (K_D). Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos estudados.

DISCUSSÃO

A alteração na disponibilidade energética exerce um importante papel no metabolismo celular. Um balanço energético positivo pode ocasionar alterações fisiopatológicas na ação insulínica, como, por exemplo, na obesidade e no diabetes mellitus tipo 2. Por outro lado, uma restrição alimentar ocasiona profundos efeitos na homeostasia glicídica e na ação insulínica.

Um dos modelos experimentais, estudados no intuito de esclarecer os ajustes metabólicos necessários para um melhor aproveitamento do suprimento energético em condições de baixa disponibilidade de alimento, é o esquema de restrição alimentar (MF), na qual uma única refeição diária é oferecida aos animais. As adaptações morfo-metabólicas apresentadas pelo rato MF, mencionadas anteriormente, sugerem que ocorra, neste modelo experimental, a instalação de mecanismos protetores, capazes de enfrentar um jejum prolongado sem gasto rápido do substrato energético armazenado.

Estudos anteriores demonstraram que a restrição alimentar (*meal-feeding*) aumenta a sensibilidade e a responsividade celular à insulina em ratos normais (11,12). Com base nestes resultados, averiguou-se se a restrição alimentar também poderia ocasionar melhora na responsividade celular à insulina, na vigência de um modelo de diabetes não dependente de insulina, induzido por aloxana.

As comparações realizadas inter-grupos no 28º dia mostraram que o grupo MFD apresentou uma redução de 19,4% no peso corpóreo em relação ao FFD, sendo 13% dessa diferença já detectável antes da indução do diabetes (14º dia de observação), de acordo com o observado em ratos MF não diabéticos (11). Em relação à ingestão alimentar, no 28º dia a diferença entre MFD e FFD era da ordem de 50%. A par-

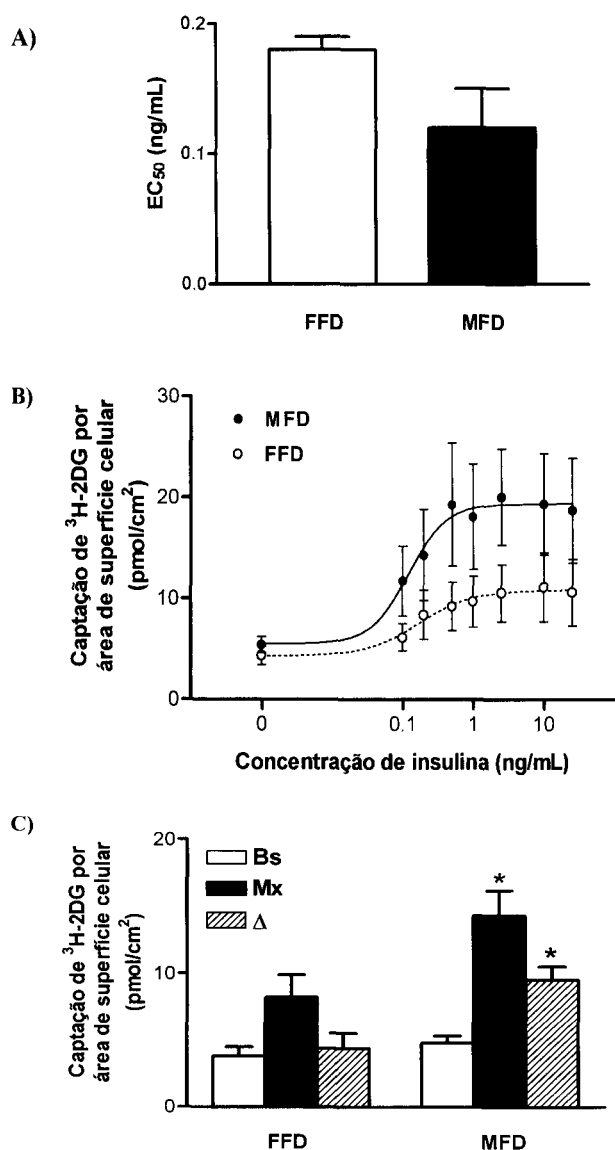


Figura 1. Captação de ³H-2DG por área de superfície celular (cm²) em adipócitos isolados de ratos *free-feeding* diabéticos (FFD) e *meal-feeding* diabéticos (MFD). Em **A**, valores de EC₅₀ dos grupos FFD e MFD. Em **B**, curva dose-resposta da captação de ³H-2DG insulino-estimulada. Em **C**, resposta basal (Bs), máxima (Mx) e delta (Δ), da captação de ³H-2DG. Valores são média ± EPM de 6 (MFD) a 9 (FFD) experimentos. * p < 0,05 vs. FFD.

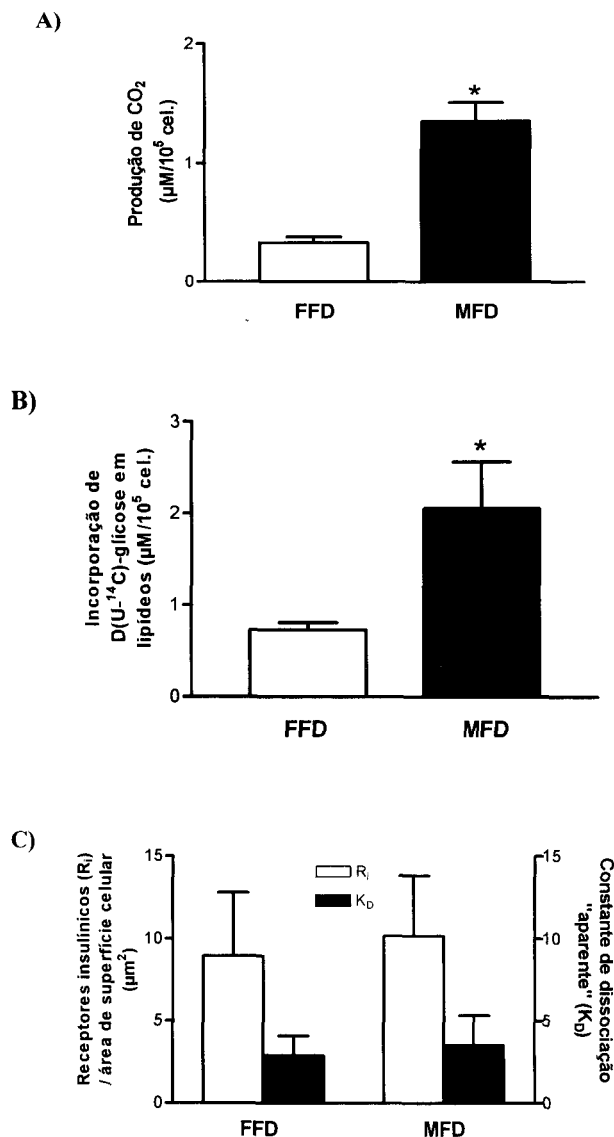


Figura 2. Teste de oxidação de D-(U-¹⁴C)-glicose a ¹⁴CO₂, incorporação de D-(U-¹⁴C)-glicose em lipídios e ligação da insulina a seus receptores, em adipócitos isolados de ratos *free-feeding* diabéticos (FFD) e *meal-feeding* diabéticos (MFD). Em **A**, valor de delta (Δ - diferença entre o valor máximo e basal) da oxidação de D-(U-¹⁴C)-glicose a ¹⁴CO₂. Em **B**, valor de delta da incorporação de D-(U-¹⁴C)-glicose em lipídios. Em **C**, número de receptores insulínicos (R_i) por área (μm²) de superfície celular e constante de associação "aparente" (K_d). Os dados são média ± EPM de 6 (MFD) a 9 (FFD) experimentos. * p < 0,05 vs. FFD.

tir dos resultados acima, pode-se observar que o déficit de 50% na quantidade de ingestão provocou, no MF, um comprometimento no peso corporal de apenas 19,4%. Parece, portanto, que o aumento no índice de eficiência alimentar já descrito (2,21-23) contribuiu para impedir um emagrecimento excessivo.

As glicemias não diferiram entre os dois grupos. Por outro lado, a insulinemia do grupo MFD apresentou valores mais baixos e o índice G/I apresentou-se aumentado, indicando maior sensibilidade insulínica *in vivo*.

É sabido que a insulina deve, agudamente, promover a captação de glicose em tecidos insulino-sen-

síveis pelo aumento da velocidade máxima de transporte, envolvendo aumento no número de transportadores funcionais de glicose (24,25). Por esta razão, foi escolhido o teste de captação de ^3H -2DG para averiguar a sensibilidade e a responsividade das células adiposas à insulina. O análogo de glicose, 2-desoxi-D-glicose, foi escolhido por ser um substrato que é captado e fosforilado pelos mesmos processos da D-glicose, sem contudo sofrer metabolização pela célula (26). Na quantificação da radioatividade inespecífica utilizou-se a L-glicose, pois a membrana celular é relativamente impermeável a esse análogo. A curva dose-resposta à insulina da captação da ^3H -2DG do grupo MFD sugeriu um deslocamento à esquerda, o qual não foi estatisticamente confirmado na análise da EC_{50} . Por outro lado, o MFD apresentou capacidade máxima de captação da ^3H -2DG e incremento (Δ) maiores que os do FFD, o que foi interpretado como maior responsividade do MFD à insulina.

O grupo MFD apresentou menor insulinemia que o FFD e aumento da resposta à insulina, o que poderia ser esperado caso ocorresse, por exemplo, o fenômeno de *up regulation* dos receptores insulínicos. *Up* ou *down regulation* dos receptores pode ocasionar alteração nos processos de translocação de transportadores de glicose para a membrana plasmática (27), modificando a resposta celular ao hormônio. Para testar essa hipótese, realizou-se o teste de *binding* de insulina aos receptores específicos; os resultados demonstraram que a alteração na sensibilidade e na responsividade celular à insulina não se devem ao aumento do número ou afinidade dos receptores de insulina. É possível inferir, portanto, que o aumento na resposta celular à insulina, observado no animal cronicamente adaptado ao esquema de restrição, se deva a modificações nos eventos pós-receptores, entre os quais destaca-se aumento na quantidade de GLUT-4, bem como na sua translocação para a membrana plasmática (28,29). Outra possibilidade seria a ocorrência de maior fosforilação de IRS-1/2, já que estes substratos, quando fosforilados, apresentam grande afinidade por proteínas com domínio SH_2 (30). Essas proteínas têm sido responsabilizadas por importantes processos intracelulares, entre os quais se destaca a ativação da expressão gênica de outras proteínas, ativação de diversas vias metabólicas, etc. Uma dessas proteínas é a fosfatidil-inositol 3'-cinase (PI3K), cujo envolvimento com o processo de translocação do GLUT4 para a membrana plasmática já foi demonstrado (31).

É bem conhecido que a insulina estimula várias enzimas da via glicolítica e da via lipogênica, além de ativar a lipase de lipoproteínas e inibir a atividade da

lipase hormônio-sensível. Já foi demonstrado que a insulina aumenta a oxidação de ^{14}C -glicose a $^{14}\text{CO}_2$ em adipócitos isolados (32), assim como aumenta a incorporação de ^{14}C -glicose em lipídios (33). Considerando-se que o esquema de restrição alimentar aumenta a captação de glicose nos adipócitos isolados, investigou-se as respostas insulino-induzidas de oxidação de glicose e incorporação desta em moléculas de triacilglicerol. Os incrementos (D) obtidos foram maiores no grupo MFD, mostrando, mais uma vez, que este grupo é mais responsivo à insulina que o FFD. A lipogênese mais intensa do esquema MF provavelmente contribuiu para evitar a perda excessiva do peso corporal e representaria um aspecto do fenômeno genericamente denominado de aumento da eficiência alimentar.

É sabido que em camundongos (34), macacos (35,36) e ratos (37-39), a restrição alimentar prolonga significativamente a longevidade da espécie. Em ratos MF (40) e camundongos (33,41), a incidência tumoral diminui com a imposição do *meal feeding*. No presente estudo, foi demonstrado que ratos sob *meal feeding* manifestam alta responsividade celular à insulina mesmo no estado diabético. Portanto, é possível que a modalidade alimentar de disciplinar o horário da refeição, restringindo o tempo de consumo, constitua uma conduta alternativa a ser acoplada a outras abordagens terapêuticas para o diabetes mellitus, principalmente por melhorar a resposta dos tecidos periféricos à insulina.

REFERÊNCIAS

1. De Fronzo RA, Ferranini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care** 1991;14:173-94.
2. Curi R, Hell NS. Metabolic changes of twenty weeks food-restriction schedule in rats. **Physiol Behav** 1986;36:239-43.
3. Lima FB, Hell NS, Timolária C, Dolnikoff MS, Pupo AA. Carbohydrate metabolism and food intake in food restricted rats: effects of an unexpected meal. **Physiol Behav** 1982;29:931-7.
4. Hollifield G, Parson W. Metabolic adaptations to a "stuff and starve" feeding program. II. Obesity and the persistence of adaptive changes in adipose tissue and liver occurring in rats limited to a short daily feeding period. **J Clin Invest** 1962;41:250-3.
5. Tepperman J, Tepperman HM. Effects of antecedent food intake pattern on hepatic lipogenesis. **Am J Physiol** 1958;193:55-64.
6. Levelle GA. Lipogenesis in adipose tissue of meal-fed rats. A possible regulatory role of α -glycerophosphate formation. **Can Physiol Pharmacol** 1967;45:201-14.

7. Hell NS, Oliveira LBC, Dolnikoff MS, Scivoletto R, Timolaria C. Changes of carbohydrate metabolism caused by food restriction, as detected by insulin administration. **Physiol Behav** 1980;24:473-7.
8. Leveille GA, Chakrabarty K. *In vivo* and *in vitro* studies of gluconeogenesis in meal-fed and nibbling rats. **J Nutr** 1968;96:397-402.
9. Sugden MC, Grimshaw RM, Holness MJ. The regulation of hepatic carbon flux by pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase during long-term food restriction. **Biochem J** 1993;296:217-23.
10. Leveille GA. Adipose tissue metabolism: influence of periodicity of eating and diet composition. **Fed Proc** 1970;29:1294-301.
11. Sumida DH. Sensibilidade celular à insulina decorrente do esquema de restrição alimentar em ratos adultos normais e diabéticos. São Paulo, 1996. 88p. (Dissertação de mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo).
12. Lima FB, Matsushita DH, Hell NS, Dolnikoff MS, Okamoto MM, Cipolla-Neto J. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food intake, time of day and melatonin. **Braz J Med Biol Res** 1994;27:995-1000.
13. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipids. **J Biol Chem** 1964;239:357-80.
14. Lima FB, Machado UF, Seraphim PM, Sumida DH, Moraes SMF et al. Pinelectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am J Physiol** 1998;275:E934-41.
15. Garvey WT, Olefsky JM, Marshall S. Insulin induces progressive insulin resistance in cultured rat adipocytes: sequential effects at receptor and multiple post-receptor sites. **Diabetes** 1986;35:258-67.
16. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. **Ann NY Acad Sci** 1949;51:660-72.
17. DiGirolamo M, Medlinger S, Fertig JW. A simple method to determine cell size and number in four mammalian species. **Am J Physiol** 1971;221:850.
18. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipids. **J Biol Chem** 1964;239:357-80.
19. Dole VP, Meirner H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. **J Biol Chem** 1960;235:2595-9.
20. Caro JF. Insulin resistance in obese and nonobese man. **J Clin Endocrinol** 1991;73:691-6.
21. Leveille GA, Hanson RW. Influence of periodicity of eating on adipose tissue metabolism in the rat. **Can J Physiol Pharmacol** 1965;43:857-68.
22. Leveille GA, O'Hea EK. Influence of periodicity of eating on energy metabolism in the rat. **J. Nutr** 1967;93:541-5.
23. Curi R, Hell NS, Bazotte RB, Timolaria C. Metabolic performance of free fed rats subjected to prolonged fast as compared to the metabolic pattern in rats under long term food restriction. **Physiol Behav** 1984;33:25-31.
24. Olefsky JM. Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. **J Clin Invest** 1975;56:1499-508.
25. Olefsky JM, Kobayashi M. Ability of circulating insulin to chronically regulate the cellular glucose transport system. **Metabolism** 1978;27:917-29.
26. Wick NA, Drury DR, Hakada HI, Wolfe JB. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. **J Biol Chem** 1957;224:963-9.
27. Gliemann J, Gammeltoft S, Vinten J. Time-course of insulin-receptor binding and insulin induced lipogenesis in isolated rat fat cell. **J Biol Chem** 1975;250:3368-74.
28. Sumida DH, Machado UF. Papel do GLUT 4 na sensibilidade celular à insulina. **XXIII Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia / III Congresso Paulista de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, 1998, p S295.
29. Sumida DH, Bessa FA, Okamoto MM, Machado UF. Increased adipocyte insulin sensitivity induced by meal-feeding schedule involves changes in the insulin signal transduction and enhancement of GLUT 4 gene expression. **Diabetes** 1999;48 (suppl.1):A266.
30. Araki E, Lipes MA, Patti MA, Bruning JC, Haag B, Johnson RS et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with target disruption of the IRS-1 gene. **Nature** 1994;372:186-90.
31. Okada T, Kawano Y, Sakakihara T, Hazek O, Uli M. Essential role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. **J Biol Chem** 1994;269:3568-73.
32. Olefsky JM. The effects of spontaneous obesity on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. **J Clin Invest** 1976;57:842-51.
33. Moon CK, Lee HL, Lee MO, Kim SG. Effects of Braziliin on glucose oxidation, lipogenesis and threine involved enzymes in adipose tissues from diabetic kk-mice. **Life Sci** 1993;53:1291-7.
34. Nelson W, Scheving L, Halberg F. Circadian rhythms in mice fed a single daily meal at different stages of lighting regimen. **J Nutr** 1975;105:171-84.
35. Kernnitz JW, Roecker EB, Weindruch R, Elson DF, Baum ST, Bergman RN. Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. **Am J Physiol** 1994;266:E540-7.
36. Lane MA, Reznick AZ, Tilmont EM, Lanir A, Ball SS, Read V, et al. Aging and food restriction alter some indices of bone metabolism in male rhesus monkeys (Macaca mulatta). **J Nutr** 1995;125:1600-10.
37. Leveille GA. The long-term effects of meal-eating on lipogenesis enzyme activity, and longevity in the rat. **J Nutr** 1972;102:549-56.
38. Masoro EJ, Shimokawa I, Higami Y, McMahan CA, Yu BP. Temporal pattern of food intake not a factor in the retardation of aging processes by dietary restriction. **J Gerontol Biol Sci** 1995;50A(1):B48-53.

39. Nichols NR, Fench CE, Nelson JF. Food restriction delays the age-related increase in GFAP mRNA in rat hypothalamus. **Neurobiol Aging** 1995;16:105-10.
40. Roebuck BD, Baumgartner KJ, Macmillan DL. Caloric Restriction and Intervention in Pancreatic Carcinogenesis in the Rat. **Cancer Res** 1993;53:46-52.
41. Volk MJ, Pugh TD, Kim M, Frith CH, Daynes RA, Ershler WB, et al. Dietary restriction from middle age attenuates age-associated lymphoma development and inter-

leukin 6 dysregulation in C57BL/6 Mice. **Cancer Res** 1994;54:3054-61.

Endereço para correspondência:

Ubiratan Fabres Machado
Depto. de Fisiologia e Biofísica, ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes 1524
05.508-900 São Paulo, SP
Fax: (011) 818-7285