

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Eliane Filiputti



Modulação Colinérgica da Secreção de Insulina em Presença de Leucina em Ilhotas de Ratos

Submetidos à Restrição Protéica.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Eliane Filiputti e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

2003

b66627 post

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Filiputti, Eliane
F478m Modulação colinérgica da secreção de insulina em presença de
leucina em
ilhotas de ratos submetidos à restrição protéica/Eliane Filiputti. --
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia

Everardo
Biologia.

1.Ihotas pancreaticas. 2.Desnutrição. 3.Insulina. I.Carneiro,
Magalhães. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
III.Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	F478m
V	
TOMADA	59788
PREÇO	16-21/7/04
	X
PREÇO	16,00
DATA	14/09/2004
Nº CPD	

Bibid 321792

Data de Defesa: 13 de fevereiro de 2003

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro



Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli

Profa. Dra. Márcia Queiroz Latorraca



Prof. Dr. José Camillo Novello

Diz o mestre:

Feche os olhos. Não precisa sequer fechar os olhos. Basta imaginar a seguinte cena: um bando de pássaros voando, ok? Agora diz quantos pássaros você vê? Cinco? Onze? Dezessete? Seja qual for a resposta - e dificilmente alguém sabe dizer o número exato - alguma coisa fica bem clara nesta pequena experiência. Você pode imaginar um bando de pássaros, mas o número exato de aves fugiu ao seu controle. Entretanto a cena era clara, definida, exata. Em algum lugar existe a resposta para esta pergunta. Quem definiu quantos pássaros deviam aparecer na cena? Você não foi.

Aos meus pais

Ondina Batista Filiputti e Luiz Filiputti:

Pela ternura e amor que conduziram minha educação e formação, pelos ensinamentos éticos e preciosos, mesmo que de vez em quando eles tenham sido duros ou não compreendidos por mim no momento apropriado.

*“Pai-Mãe, respiração da Vida,
Fonte do som, Ação sem palavras, Criador do Cosmos!
Faça sua Luz brilhar dentro de nós, entre nós e fora de nós
Para que possamos torna-la útil.
Ajude-nos a seguir nosso caminho
Respirando apenas o sentimento que emana do Senhor.
Nosso EU, no mesmo passo, possa estar com o SEU,
Para que caminhemos como Reis e Rainhas
Com todas as outras criaturas.
Que o Seu e o nosso desejo, sejam um só,
Em toda a Luz, assim como em todas as formas,
Em toda existência individual, assim como em todas as comunidades.
Faça-nos sentir a alma da Terra dentro de nós,
Pois, assim, sentiremos a Sabedoria que existe em tudo.
Não permita que a superficialidade e a aparência das coisas do
Mundo nos iluda, e nos liberte de tudo aquilo que
Impede nosso crescimento.
Não nos deixe ser tomados pelo esquecimento
De que o Senhor é o Poder e a Glória do mundo,
A Canção que se renova de tempos em tempos
E que a tudo embeleza.
Possa o Seu amor ser o solo onde crescem nossas ações”.*

Obrigada por tudo. Amo vocês.

Á você, Christian:

Que se faz presente em todos os momentos de minha vida, transmitindo-me segurança e incentivando-me a seguir o caminho e conquistar meus ideais, mesmo quando isso signifique renunciarmos algum tempo juntos. Agradeço pelo apoio quando desanimei e pelo encorajamento nas horas de dúvida. Agradeço sinceramente agora e sempre, pelo amor e carinho dedicados. Quero dividir contigo a felicidade e mérito desta tese.

*Drão o amor da gente é como um grão
Uma semente de ilusão
Tem que morrer pra germinar plantar em algum lugar
Ressuscitar no chão nossa semente
Quem poderá fazer aquele amor morrer!
Nossa caminhada
Dura caminhada pela estrada escura
Drão não pense na separação
Não despedace o coração
O verdadeiro amor é vazio, estende-se, infinito
Imenso monólito, nossa arquitetura
Quem poderá fazer aquele amor morrer!
Nossa caminhada
Cama de tatame pela vida afora
Drão os meninos são todos sãos
Os pecados são todos meus
Deus sabe a minha confissão, não há o que perdoar
Por isso mesmo é que há de haver mais compaixão
Quem poderá fazer aquele amor morrer
Se o amor é como um grão!
Morre, nasce, trigo; vive, morre pão.*

Obrigada. Eu amo você

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Dr. Everardo Magalhães Carneiro pela orientação preciosa, incentivo, confiança e dedicação com que me conduziu durante o curso. Obrigada pelos ensinamentos e conhecimentos proporcionados durante o período do mestrado. Obrigada, mais uma vez, pela oportunidade de poder dar continuidade ao meu trabalho.

À minha melhor e mais fiel amiga Claudia Cavalli Rosim pelas vezes em que não estive presente e pelos momentos agradáveis que passamos juntas, sempre à disposição nos momentos difíceis. Obrigada pela compreensão nas situações de estresse durante o processo acadêmico.

À minha amiga e colega de trabalho Vanessa Giozzet pelo carinho, compreensão e ajuda nos momentos de sufoco.

Ao amigo Fabiano e amiga Eliana pela dedicação e respeito em todos os momentos de minha vida científica e pela amizade e ajuda na elaboração desta tese.

À amiga Esméria pelos ensinamentos e paciência no início de minha vida científica.

Ao amigo Fabrício pelo carinho e apoio e pelos momentos de correria no final desta tese.

Aos professores Dr. Antonio Carlos Boschero e Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira, pelos ensinamentos, competência, seriedade, profissionalismo e paciência em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto da Silva pela participação na banca examinadora e por ter sido meu orientador e amigo durante a iniciação científica.

Aos Professores Dr. Ângelo Rafael Carpinelli, Dra. Márcia Queiroz Latorraca e Dr. Camilo Novello pela participação na banca examinadora e pelo carinho, respeito e admiração.

Ao amigo Marcos Toyama pela ajuda na avaliação de aminoácidos e proteínas plasmáticas.

Aos amigos Jairo, Alessandro, Cláudia, Vanessa, Marize, Janaína, Andréia, Helena e Viviane pela colaboração e carinho.

Ao amigo Léscio, pela colaboração em todas as rotinas laboratoriais.

Aos funcionários Alexandra e Ivo pelo apoio na confecção deste trabalho.

A todos que participaram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À CAPES, FAPESP e CNPQ pelo apoio financeiro .

Muito Obrigada

Aos meus pais

Ondina Batista Filiputti e Luiz Filiputti

Dedico este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Desnutrição e Diabetes.....	2
1.2 A secreção de Insulina.....	4
1.3 Estimulo Colinérgico da Secreção de insulina.....	6
1.4 Envolvimento de Proteínas Fundamentais para a Síntese Protéica	8
2. OBJETIVO.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Animais e Dietas.....	13
3.3 Procedimentos experimentais.....	16

3.4 Procedimento estatístico.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Avaliação do estado nutricional dos animais.....	29
4.2 Secreção de Insulina em Presença de Leucina e Carbacol.....	30
4.3 Metabolismo de Leucina.....	40
4.4 Secreção de Insulina em Presença de Potássio e Carbacol.....	40
4.5 Potencializadores da Secreção de Insulina e Leucina.....	47
4.6 Secreção de Insulina em Ilhotas de Animais Recuperados.....	49
4.7 Proteínas Envolvidas na Síntese Protéica.....	55
5. DISCUSSÃO.....	60
5.1 - Modelo experimental e Parâmetros Bioquímicos.....	61

5.2 Secreção de insulina em Presença de Leucina e Carbacol.....	64
6. CONCLUSÃO.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar alguns dos possíveis determinantes da resposta pancreática deficiente à estimulação com leucina (L) e a associação com agente colinérgico carbacol (CCh), tendo os ratos submetidos à dieta hipoprotéica como modelo experimental. Os sinais de desnutrição tais como: baixo peso corporal, hipoalbuminemia, teores elevados de glicogênio e de gordura hepática, estiveram presentes nos animais que receberam dieta hipoprotéica. Esses animais apresentaram ainda menores níveis de insulina plasmática.

A análise do aminograma mostrou que aminoácidos importantes com leucina, valina, arginina e taurina estão reduzidos neste modelo experimental, tanto no jejum como no alimentado.

Por outro lado, os estudos “*in vitro*” demonstraram menor oxidação de leucina em ilhotas de rato hipoprotéicos. A monitorização do efluxo de cálcio mostrou aumentado em ilhotas LP em presença de L e CCh. Contudo a resposta secretória de insulina das ilhotas LP foi menor, comparada com a dos animais NP quando estimulada com leucina, potássio na ausência ou na presença de CCh. O mesmo resultado foi observado quando foram utilizados os agentes potencializadores tais como: gliceraldeído, cetoisocaproato, IBMX e PMA em presença de leucina. Com o uso da técnica de Western Blotting observamos redução na quantidade de proteína p70^{S6K} e AKT e por RT-PCR diminuição da quantidade de mRNA para a p70^{S6K}.

Diante disso o período de restrição protéica a que foram submetidos esses animais alterou em ilhotas pancreáticas a oxidação da leucina, o movimento de cálcio, e conseqüentemente a secreção de insulina frente à leucina, potássio, agentes potencializadores e CCh. Por fim, a associação destes resultados com a redução de proteínas como a p70^{S6K} e Akt em ilhotas desses animais pode explicar, pelo menos em parte, a pobre secreção de insulina observada neste modelo experimental.

ABSTRACT

The aim of the present work was to study the effect of low protein diet (LP), in particular the role of reduced intake of the amino acid leucine (L) in the mechanism of pancreatic islet insulin secretion.

Male Wistar rats submitted to LP (6% protein) were compared to age and gender matched controls maintained with normal protein diet (NP) (17% protein). Pancreatic islets isolated from NL and LP groups were submitted to various glucose concentrations and stimulatory drugs to compare the amount of the insulin secretion. The insulin was measured by radioimmunoassay. The level of leucine oxidation and ^{45}Ca outflow were also compared by $^{14}\text{CO}_2$ output and ^{45}Ca efflux, respectively.

Western Blotting was applied to compare the levels of p70^{S6k-1} and Akt and RT-PCR to evaluate the levels of p70^{S6k-1} mRNA in both groups.

LP rats presented with significantly lower body weight, serum protein and albumin, but higher glycogen and liver fat. No differences in serum glucose levels were observed.

The aminogram analysis from serum demonstrated that LP groups either fasted or fed had significantly lower levels of leucine, valine, arginine, taurine compared to NP.

In vitro insulin secretion in the LP group was significantly lower in the basal situation and in response to stimulation with carbachol, potassium, gliceraldeid, PMS, KIC, IBMX. The addition of the amino acids leucine in the media did not elevated the insulin secretion in the LP group to levels comparable to NP group.

In addition, leucine oxidation and calcium out flow from pancreatic islets of LP group were significantly lower.

The p70^{S6k-1} and Akt protein expression and p70^{S6k-1} mRNA levels were lower in LP group as revealed by Western Blotting and RT-PCR analysis, respectively.

These findings indicate that LP diet let to pancreatic islets dysfunction and that correlated with reduced calcium outflow and decreased leucine oxidation in those cells. The mechanisms may involve lower systemic leucine levels, and lower expression of the signaling elements p70^{S6k-1} and Akt.

Keywords: Carbamylcholine; islets; insulin; low protein diet; p70^{S6k-1}; Akt.

LISTA DE ABREVIATURAS

$[Ca^{+2}]_i$ - Concentração de cálcio intracelular

^{125}I - Isótopo do Iodo

^{45}Ca - Isótopo do Cálcio

AC - Adenilato ciclase

AMP_c - Monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA - Análise de Variância

ATP - Trifosfato de adenosina

B - Célula beta

$Ca^{+2(L)}$ - Canais de cálcio sensíveis a voltagem

CCh - Carbamilcolina

DAG - Diacilglicerol

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

G - Glicose

Gli - gliceraldeído

GLUT-4 - Transportador de glicose 4

IP3 - 1,4,5 inositol trifosfato

IR - Receptor de insulina

IRS - Substrato do receptor de insulina

K⁺ - Potássio

K⁺_{ATP} - Canais de potássio ATP dependentes

K⁺_{Ca} - Canais de potássio ativados por cálcio

KOH - Hidróxido de potássio

LP - Animal Hipoprotéico

M3 - Receptor muscarínico subtipo M3

MLCK - Quinase da cadeia leve da miosina.

mTOR - alvo de rapamicina em células de mamífero

Na₂SO₄ - Sulfato de sódio.

NP - Animal Normoprotéico

p70^{S6K-1} - Proteína quinase efetor da via PI3K

PHAS-1 - Proteína fosforilada regulada pela insulina

PKA - Proteína quinase A

PKC α - Proteína quinase C alfa

PLC - Fosfolipase C

PLC β 1 - Fosfolipase C beta 1

PMA - Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

PI3K - Fosfoinositol 3-quinase

Rc - Animal Recuperado

SDS - Duodecil sulfato de sódio

ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

phser - fosfatidilserina

taur - taurina

urea - uréia

asp - aspartato

hypro - hidroxiprolina

thr - treonina

ser - serina

asn - asparagina

glu - ácido glutâmico

gln - glutamina

pro - prolina

gly - glicina

ala - alanina

citr - citrulina

val - valina

cys - cisteína

met - metionina

ile - isoleucina

leu - leucina

tyr - tirosina

b-ala - beta-alanina

phe - fenilalanina

homocys - homocisteína

orn - ornitina

lys - lisina

arg - arginina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A - Massa corpórea dos animais NP e LP.

Figura 1B - Velocidade de crescimento de ratos NP e LP.

Figura 2A - Aminograma plasmático de ratos NP e LP em jejum

Figura 2B - Aminograma plasmático de ratos NP e LP no estado alimentado

Figura 3 - Eletroforese de proteínas de ratos NP e LP

Figura 4 - Secreção estática de insulina em presença de 2,8 mM de glicose e 20 mM de leucina em associação com diferentes concentrações de CCh (0,1-100 μ M).

Figura 5 - Secreção estática de insulina em presença de 8,3 mM de glicose, 20 mM de leucina em associação com diferentes concentrações de CCh (0,1-100 μ M).

Figura 6A - Secreção dinâmica de insulina em presença de 2,8 mM de G, 20 mM leucina e 100 μ M de CCh

Figura 6B - Área sob as curvas da Figura 6A.

Figura 7A - Efluxo fracional de cálcio em presença de 2,8 mM de G, 20 mM de leucina e 100 μ M de CCh

Figura 7B - Área sob as curvas da Figura 7A.

Figura 8A - Secreção dinâmica de insulina em presença de 8,3 mM de G, 20 mM leucina e 100 μ M de CCh

Figura 8B - Área sob as curvas da Figura 8A.

Figuras 9A - Efluxo fracional de cálcio em presença de 2,8 mM de G, 20 mM de leucina e 100 μ M de CCh

Figuras 9B - Área sob as curvas da Figura 9A.

Figuras 10 - Oxidação de leucina em ilhotas de ratos NP e LP.

Figura 11 - Secreção estática de insulina em presença de 2,8 mM de glicose, 40 mM de potássio em associação com diferentes concentrações de CCh (0,1-100 μ M).

Figura 12 - Secreção estática de insulina em presença de 2,8 mM de glicose, 10 mM de leucina em associação com 15 mM de gliceraldeído.

Figura 13 - Secreção estática de insulina em presença de 2,8 mM de glicose, 10 mM de leucina em associação com 15 mM de KIC

Figura 14 - Secreção estática de insulina em presença de 2,8 mM de glicose, 10 mM de leucina em associação com 1 mM de IBMX.

Figura 15 - Secreção estática de insulina em presença de 2,8 mM de glicose, 10 mM de leucina em associação com 100 nM de PMA.

Figura 16A - Secreção estática de insulina em presença de 2,8 mM de glicose, 20 mM de leucina em associação com 100 μ M de CCh.

Figura 16B - Secreção estática de insulina em presença de 8,3 mM de glicose, 20 mM de leucina em associação com 100 μ M de CCh.

Figura 17 - Western blotting da enzima p70S6K-1

Figura 18 - RT-PCR da enzima p70S6K-1

Figura 19 - Western blotting da enzima Akt

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Parâmetros bioquímicos dos animais NP e LP.

Tabela II - Primers utilizados nos RT-PCRs.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição das dietas

Quadro 2 - Mistura de Vitaminas

Quadro 3 - Mistura de minerais

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Desnutrição e Diabetes

Desde a antigüidade reconhece-se o papel do hábito alimentar no desenvolvimento do diabetes mellitus. Tradicionalmente, a redução do peso e a baixa ingestão de energia são associados a uma menor incidência e prevalência do diabetes. Nos países desenvolvidos, o padrão de vida sedentário associado à alimentação hipercalórica, pobre em fibras e rica em proteínas, gorduras saturadas e carboidratos simples têm contribuído para o rápido aumento da incidência de diabetes mellitus do tipo 2 (Rao, 1988). Essa forma de diabetes mellitus é geralmente acompanhada de obesidade, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e resistência à insulina, amplamente conhecida por “Síndrome X” (Reaven, 1988). A etiopatogenia dessa síndrome metabólica permanece desconhecida.

Hales & Barker (1992) formularam a hipótese do “*thrifty phenotype*” para explicar a etiopatogenia do diabetes mellitus tipo 2 e da “Síndrome X”. De acordo com essa hipótese, o diabetes mellitus do tipo 2 e a “Síndrome X” são determinadas por fatores ambientais, inclusive nutricionais, e são originadas *in útero* ou durante a infância. Presume-se que a desnutrição intra-uterina e durante o primeiro ano de vida produz mudanças morfológicas e funcionais no pâncreas, fígado, e no tecido muscular e tecido adiposo, que se traduzem em insulinopenia e resistência à insulina. Quando a resistência à insulina é agravada pela obesidade, inatividade física ou idade, o pâncreas não consegue suprir os requerimentos aumentados de insulina e o diabetes se instala. O padrão de anormalidades metabólicas e funcionais depende da fase da vida em que a desnutrição ocorre, do tipo e da intensidade da carência nutricional.

Mais recentemente a Organização Mundial de Saúde (OMS) apresentou uma nova classificação para o Diabetes Mellitus e nesta classificação a desnutrição não está incluída como um fator diabetogênico (Gavin III et al., 2003). Ao contrário desta classificação, é possível estabelecer que a desnutrição exerça um papel primordial no desenvolvimento da síndrome metabólica, pois trabalhos recentes de nosso grupo de pesquisa e da literatura, reforçam esta afirmação.

As evidências de que a desnutrição pode ser diabetogênica vêm de estudos que mostram intolerância à glicose, insulinopenia e resistência à insulina em animais (Heard &

Turner 1967; Swenne et al., 1987) e em seres humanos desnutridos (Cook, 1967; Becker et al., 1971; Smith et al., 1975). Duas variações da síndrome diabética foram associadas à desnutrição crônica: 1) Diabetes do tipo J, semelhante ao diabetes tipo 1 pelo seu início abrupto e numa idade bastante precoce, caracterizado por deficiência de insulina, resistência periférica a esse hormônio e ausência de cetose; 2) diabetes pancreático tropical, presente em indivíduos severamente desnutridos, acompanhado por sinais de pancreatite, como macrocalcificações pancreáticas e hiperamilasemia e falência da produção de insulina (Rao, 1988).

Como no diabetes mellitus tipo 2, o comprometimento da secreção de insulina parece desempenhar um papel central na etiopatogenia do diabetes relacionado à desnutrição. Ao avaliarmos a insulinopenia no organismo desnutrido, pelo menos quatro possibilidades devem ser consideradas: 1) a redução do número de células B pancreáticas; 2) o defeito funcional das células B pancreáticas; ou 3) a combinação da redução do número de células B com alterações funcionais das células B remanescentes; 4) alteração no sistema autônomo que inerva as ilhotas.

Nos últimos anos temos estudado as alterações morfológicas e funcionais das ilhotas pancreáticas em modelos de desnutrição pré e pós-natal (Arantes et al, 2002; Ferreira et al, 2003; Carneiro et al., 1995; Latorraca et al., 1998a, b; Viera et al; 2001;). Observamos que a restrição protéica determina a redução do peso absoluto, mas não do peso relativo do pâncreas (Latorraca et al., 1998a). Quanto à morfologia, verificamos células B com volume reduzido; com menos grânulos secretores, tendo muitos deles aspecto de grânulos secretores imaturo; células B com degenerações mitocondriais e com indícios de permeabilidade celular diminuída (Carneiro, 1996). Ao avaliarmos a capacidade funcional das ilhotas de ratos desnutridos, observamos comprometimento da secreção de insulina estimulada por aminoácidos; perda do padrão bifásico de secreção; sensibilidade à glicose diminuída, representada por uma curva dose-resposta glicose-insulina deslocada para a direita em relação à curva dos ratos controles. Mediante estímulos com diferentes concentrações de glicose, essas ilhotas apresentaram captação de ^{45}Ca menor do que as ilhotas controle. Portanto, defeito na mobilização do íon Ca^{2+} parece contribuir para as alterações secretórias verificadas em ilhotas de ratos desnutridos (Carneiro et al., 1995; Latorraca et al., 1998b, 1999).

Curiosamente, algumas anormalidades observadas no organismo desnutrido, tais como, redução do volume das ilhotas, das vascularizações das ilhotas, diminuição do conteúdo de insulina das ilhotas, atrofia e perda de granulação das células B, insensibilidade das ilhotas à glicose, alteração da cinética secretória, são similares àquelas observadas no diabético do tipo 2 (Gepts & Lecompt, 1981; Grodsky, 1996; Leahy, 1996; Cherif et al, 2001).

Observações anteriores demonstraram que animais alimentados com uma dieta hipoprotéica (8% de proteína) adquiriram uma severa intolerância a glicose comparados àqueles que receberam uma dieta normoprotéica (20% de proteína). O período de restrição protéico que passam esses animais tem sua atividade enzimática hepática permanentemente alterada, incluindo àquelas enzimas de primordial importância na homeostase da glicose (Ozanne et al, 1996). Observa-se que há uma diminuição nas enzimas glicoquinase (GK) e um aumento da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK - enzimas chave para a glicólise e gliconeogênese, respectivamente). Pode-se sugerir, com isso, que a desnutrição conduza a uma reprogramação da atividade enzimática hepática associada com a homeostase da glicose a qual pode levar a uma mudança na regulação da produção de glicose do fígado. Muitas referências têm documentado que no diabetes mellitus não dependente de insulina há um aumento da produção hepática de glicose. Uma explicação possível é que possa estar ocorrendo redução na habilidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose (DeFronzo, Bonadonna & Ferrannini, 1992).

Muito há que se estudar para obtenção de um panorama mais completo do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no comprometimento da secreção insulínica da célula B pancreática na desnutrição. É provável que, a exemplo do que ocorre em modelos animais de diabetes tipo 2, alterações ultraestruturais na inervação da célula B (Diani et al., 1983), nos níveis de neuropeptídeos (Bailey & Flatt, 1988), ou na ação de neurotransmissores como a acetilcolina (Holst, 1992) possam estar contribuindo para a supressão da secreção de insulina.

1.2 - Secreção de Insulina

A secreção de insulina estimulada por glicose inicia-se com o reconhecimento e subsequente metabolização do nutriente pelas células B, gerando um ou diversos sinais

que levam à redução da condutância ao K^+ . A diminuição da condutância ao K^+ provoca um acúmulo relativo do referido cátion nas células B, com conseqüente despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem. O influxo de Ca^{2+} e o aumento do Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) ativa a maquinaria excitotóxica, resultando na secreção de insulina. Um efeito secundário da elevação do $[Ca^{2+}]_i$ é a ativação da Adenilato Ciclase (AC) e Fosfolipase C (PLC), que agindo sobre substratos específicos, geram AMP cíclico (Ampc), diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP_3). Estes aumentam o $[Ca^{2+}]_i$ por liberar os estoques celulares e por promover a fosforilação de proteínas que sensibilizam o processo secretório. As enzimas AC e PLC são diretamente ativadas por receptores de membrana específicos para hormônios e neurotransmissores (Flatt 1996).

Outros nutrientes podem alterar a permeabilidade ao K^+ e estimular a secreção de insulina. Floyd et al, 1963; Henquin & Meissner, 1981; Blacher et al, 1989 demonstraram que leucina e arginina aumentam a secreção de insulina tanto “in vivo” como “in vitro”. Esses aminoácidos, através da alteração dos fluxos iônicos modificam o potencial de membrana das células B, influenciando assim a permeabilidade ao cálcio, (Henquin, 1980; Herchuelz et al, 1984; Blacher et al, 1989 & Sener et al, 1990).

Leucina e seu derivado α -cetogluturato (KIC) reduzem a permeabilidade aos íons K^+ em células B pancreáticas, com magnitude idêntica àquela observada por glicose. Esses substratos entram diretamente no ciclo de Krebs e são metabolizados, gerando ATP. Estudos mais recentes demonstraram uma ação regulatória exercida pela leucina na síntese de diferentes proteínas envolvidas no metabolismo celular. Esse aminoácido modula a expressão gênica de proteínas envolvidas na regulação do crescimento e proliferação das células B. (Xu et al, 2001).

Arginina, ao contrário da glicose e da leucina, aumenta a permeabilidade ao potássio. Portanto, o mecanismo responsável pela ação insulínica deste aminoácido difere daqueles envolvidos na resposta secretória a outros estímulos de nutrientes e não nutrientes. Embora a arginina eficientemente metabolizada, gerando poliamidas que podem servir de substratos para as transaminases ou ativar as proteínas quinases (Henquin & Meissner, 1981; Tamagawa & Henquin, 1982; Gomis et al, 1983; Garcia-Morales et al, 1984; Thams, Capito & Haldeskov, 1986), a resposta secretória pode ser meramente atribuída ao acúmulo dessa molécula carregada positivamente no interior das

células B. A captação deste aminoácido catiônico coincide com a despolarização da membrana plasmática e, conseqüentemente, abertura de canais de cálcio sensíveis a voltagem (Henquin & Meissner, 1981; Blacher et al, 1989; Sener et al, 1990).

1.3 - Estímulo Colinérgico da Secreção de Insulina

É sabido que a estimulação colinérgica exerce ação moduladora sobre a secreção de insulina iniciada por estímulo metabólico. Vários estudos têm demonstrado que a acetilcolina, na presença de concentrações sublimiáres de glicose, pode despolarizar a membrana da célula B e iniciar a atividade elétrica que culmina com a secreção de insulina. Porém, esse efeito sobre a atividade elétrica foi observado mediante a despolarização prévia não só pela glicose, como também por uma variedade de agentes estimulatórios, em especial pela leucina (Gagerman et al., 1978; Cook et al., 1981; Santos & Rojas, 1989; Hermans et al., 1986). Três mecanismos iônicos foram propostos para explicar a despolarização induzida pela estimulação muscarínica: 1) aumento da permeabilidade ao Na^+ (Henquin et al., 1988); 2) aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} ; c) redução da permeabilidade ao K^+ (Santos & Rojas, 1989).

As mudanças dos fluxos de K^+ são dependentes de três tipos de canais: um canal de baixa condutância (30 pS); um de alta condutância (200-300 pS) ativado por Ca^{2+} e sensível à voltagem; e um terceiro tipo com condutância entre 50-80 pS, modulado pela relação ATP/ADP celular, chamado de canal K^+_{ATP} (Cook & Hales, 1984; Sturgess et al., 1986; Rajan, 1990).

O canal K^+_{ATP} exerce papel fundamental na manutenção do potencial de repouso de célula B (Ashcroft et al., 1984; Ashcroft, 1988). É bloqueado por diferentes substâncias desencadeadoras e/ou potencializadoras da secreção de insulina, tais como: glicose, gliceraldeído, leucina, arginina, metabólitos intermediários do ciclo de Krebs, anestésicos, quinina, sulfoniluréias, proteínas quinases, fosfatases, proteína G e por neurotransmissores tais como a acetilcolina (Boschero et al., 1990; Sener et al., 1990; Jones et al., 1991; Boyd III et al., 1991; Fredholm et al., 1991; Caterral & Epstein, 1992; Caterral, 1995).

Os canais de K^+_{Ca} são dependentes das variações das $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e do potencial de membrana (Marty, 1981; Hunter et al., 1984; Morris et al., 1986). Sua condutância pode

ser inibida pelo íon tetraetilamônio e caribdotoxina, caracterizando assim seu papel na repolarização das células B pancreáticas. No entanto, não participam da modulação do potencial de membrana induzido por glicose (Petersen & Findlay, 1987; Kukuljan et al., 1991), mas em presença de acetilcolina parecem exercer função importante na repolarização celular (Bordin et al., 1995).

Os fluxos de Ca^{2+} são regulados por dois tipos de canais: um canal T que é ativado entre -50 a -40 mV, sendo insensível às diidropiridinas, cujo significado fisiológico ainda permanece desconhecido (McCleskey et al., 1986; Nowycky et al., 1985). Um outro, chamado canal de Ca^{2+} -dependente de voltagem ou L, é ativado em potencial de membrana entre -70 a -50 mV e se caracteriza por ser sensível as diidropiridinas. Esses canais podem ser modulados pelo próprio aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, agindo assim, como um sinal para inativação dos mesmos. Essa autoregulação é específica para esses canais, e pode constituir-se em importante controle da atividade elétrica da membrana celular e conseqüentemente da secreção de insulina quando estimulada por glicose (Chay, 1987).

O influxo de Ca^{2+} extracelular parece ser a fonte principal do íon no aumento da concentração e atividade citosólica de Ca^{2+} . Entretanto, a liberação de Ca^{2+} por frações subcelulares, essencialmente o retículo endoplasmático, tem papel importante na atividade secretória da célula B. A estimulação muscarínica promove um substancial aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Essa resposta foi observada em estudos com ^{45}Ca (Nenquin et al., 1984; Mathia et al., 1985) e pela quantificação do Ca^{2+} livre com indicadores fluorescentes (Grapengiesser et al., 1989). O aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzido por acetilcolina resulta da formação de IP_3 , que age como mensageiro intracelular mobilizando o Ca^{2+} livre no citoplasma. A saída de Ca^{2+} de estoques intracelulares induzidas por agentes colinérgicos não é, entretanto suficiente para estimular a exocitose dos grânulos de insulina, visto que a secreção é abolida na ausência de Ca^{2+} extracelular (Wollhein & Sharp, 1980). O IP_3 e outros segundo mensageiros como AMPc, proteínas quinases e proteínas G também modulam os canais de Ca^{2+} , contribuindo para a amplificação da secreção de insulina (Rajan et al., 1989; Zawalich, 1988; Brown & Birnbaumer, 1988).

O carbacol como um análogo da acetilcolina, pode se ligar a receptores muscarínicos (M_3 principalmente) existentes na célula B e exercer efeitos similares à acetilcolina. Após a ligação da droga aos receptores muscarínicos da célula B, a respectiva proteína G irá ser ativada e esta, por sua vez, tem a capacidade de clivar GTP, liberando

uma de suas três subunidades a qual irá estimular a PLC. A PLC ativada hidrolisa fosfolipídios de membrana liberando DAG e IP₃. O DAG permanece na membrana e o IP₃ liberado é responsável pela mobilização de íons cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma, estes íons ligam-se ao DAG, um complexo essencial para a ativação da PKC (DAG-cálcio-fosfatidilserina) é, então, formado. (Huang, 1989). A PKC ativada, fosforila elementos fundamentais na exocitose dos grânulos de insulina aumentando a liberação do conteúdo granular para o meio extracelular.

1.4 - Envolvimento de Proteínas Fundamentais Para a Síntese Protéica

Recentes estudos têm demonstrado que a insulina e aminoácidos regulam a síntese protéica em ilhotas pancreáticas. A insulina e também fatores de crescimento estão associados com o aumento da massa das células B e esse efeito é controlado pela via de sinalização da PI3K (fosfoinositol 3-quinase). Uma importante proteína relacionada com essa via é a Akt ou proteína quinase B (PKB), a qual após ser ativada, fosforilando uma gama de alvos intracelulares que estão envolvidos com crescimento e sobrevivência celular, inibição da apoptose, translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática em tecido periférico, controle do metabolismo de glicogênio e progressão do ciclo celular (Bernal-Mizrachi et al, 2001).

Outra proteína relacionada a esta família é a mTOR (alvo da rapamicina em células de mamífero), uma proteína que é sensível a mudanças na concentração dos nutrientes, estando relacionada com a regulação de amplas respostas metabólicas em diferentes tecidos, por exercer um controle da função ribossomal (Dennis et al, 2001). Para exercer seu papel nos diferentes tecidos, ela precisa fosforilar outras proteínas de extrema importância na via de sinalização da PI3K, tais como as quinases: p70^{S6K} e PHAS-I (Acid-stable Protein Regulated by Insulin). Estas têm a importante função de controlar a síntese protéica relacionada a inúmeros fatores de transcrição (Sherwood et al, 1999).

Como destacamos anteriormente, além da insulina, os aminoácidos também participam do controle de ativação destas proteínas e dentre eles podemos citar os aminoácidos de cadeia longa, leucina, isoleucina e valina cujo produto da sua oxidação é capaz de produzir sinais metabólicos que ativam a via mTOR. Essa interação entre aminoácidos e mTOR leva à proliferação celular (Xu et al, 2001).

Em células B a secreção de insulina induzida por leucina é mediada pelo seu metabolismo na mitocôndria através de sua descarboxilação além de ativar alostéricamente a glutamato desidrogenase favorecendo a entrada de substrato para o ciclo de Krebs (acetil CoA e α -cetogluturato, respectivamente) e com isso promover o aumento da razão ATP/ADP necessários para o controle do processo de secreção induzido por este nutriente. Por outro lado, o produto do metabolismo deste aminoácido gerados pela mitocôndria também podem, independentes de insulina, induzir ativação das proteínas Akt, mTOR e p70^{S6K}, como já discutido anteriormente (**Patti et al, 1998; Xu et al, 2001**). A existência deste mecanismo envolvendo leucina e a presença de insulina no micromeio que compõe as ilhotas de Langerhans podem em parte ser o responsável pelo controle do processo de proliferação celular e possivelmente de produção e liberação de insulina, a longo prazo, em presença deste aminoácido ou de outros nutrientes que possam usar a mesma via de estimulação.

A inativação da via de sinalização já citada, controlada pela insulina e/ou por aminoácidos, IR/IRS/PI3K/PKB/mTOR/S6K por determinados processos fisiopatológicos, pode promover hipoinsulinemia, intolerância à glicose, diminuição da massa de célula B e do conteúdo de insulina encontrada em tais células. Essas alterações estão relacionadas com o estado patológico de diabetes mellitus tipo 2 e podem ser dependentes de estados nutricionais (**Pende et al, 2000**).

Diante disso o conhecimento da interação metabólica produzida pela leucina, e a ação insulínica presente no micromeio das ilhotas de Langerhans pode ajudar a explicar alterações hormonais associadas com a síndrome metabólica resultante da exposição de diferentes organismos à pobre nutrição em fases iniciais da vida, as quais produzem permanentes mudanças no metabolismo dos nutrientes nas células B pancreáticas. Entre essas modificações destacamos a redução da capacidade da célula B secretar insulina e também o desenvolvimento de resistência periférica a este hormônio, características que em associação com obesidade e inatividade física são importantes fatores desencadeadores do diabetes tipo 2.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

O objetivo foi avaliar a modulação colinérgica da secreção de insulina em presença de leucina, bem como quantificar proteínas envolvidas no aumento da massa celular e síntese protéica em ilhotas de Langerhans de animais que passaram por um período de restrição protéica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS E DIETA:

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, com 28 dias de vida, provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Os ratos foram distribuídos em três grupos experimentais:

- a) **Controle (normoprotéico - NP):** ratos alimentados dos 28 dias até a idade adulta (90dias) com dieta contendo (17% de proteína).
- b) **Desnutridos (hipoprotéico - LP):** ratos alimentados dos 28 dias até a idade adulta (90dias) com dieta contendo (6% de proteína).
- c) **Recuperados (Rc):** ratos alimentados dos 28 dias até a idade adulta (90dias) com dieta contendo (6% de proteína) e dos 90 dias até os 110 dias alimentados com dieta contendo 17% de proteína.

Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) sob condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de 22 ± 2 °C. Durante todo o período experimental tiveram livre acesso à água e as respectivas dietas.

As dietas, mistura de vitaminas e mistura de minerais, cujas composições encontram-se descritas nos Quadros 1, 2 e 3, foram preparadas no Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Biologia, da UNICAMP. A dieta controle segue as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93) para roedores nas fases de crescimento, gravidez e lactação.

Quadro 1 - Composição das Dietas

Ingredientes	Normoprotéica (17% de proteína)	Hipoprotéica (6% proteína)
Caseína (84% de proteína)*	202	71,5
Amido	397	480
Dextrina	130,5	159
Sacarose	100	121
L-cistina	3	1
Fibra (microcelulose)	50	50
Óleo de soja	70	70
Mistura de sais AIN93G**	35	35
Mistura de vitaminas AIN93G**	10	10
Cloridrato de colina	2,5	2,5

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

** Composição detalhada dada por Reeves et al. 1993.

Quadro 2 - Mistura de Vitaminas (AIN-93G-VX)

	Vitaminas	g/Kg
1	Ácido nicotínico	3.0
2	Pantotenato de cálcio	1.6
3	Piridoxina-HCl	0.7
4	Tiamina-HCl	0.6
5	Riboflavina	0.6
6	Ácido fólico	0.2
7	d-biotina	0.02
8	Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina) 0.1% em manitol	2.5
9	Vitamina E (acetato de α -tocoferol) (500 UI/g)	15.0
10	Vitamina A (retinil palmitato) (500.000 UI/g)	0.8
11	Vitamina D3 (coleciferol) (400.000 UI/g)	0.25
12	Vitamina K (filoquinose)	0.075
13	Sacarose	974.65

Quadro 3 - Mistura de Minerais (AIN-93G-MX)

	Sais	g/Kg
1	Carbonato de cálcio anidro	357
2	Fosfato de potássio monobásico	196
3	Citrato de potássio tribásico monohidratado	70.78
4	Cloreto de sódio	74
5	Sulfato de potássio	46.6
6	Óxido de magnésio	24
7	Citrato férrico	6.06
8	Carbonato de zinco	1.65
9	Carbonato manganoso	0.63
10	Carbonato cúprico	0.30
11	Iodato de potássio	0.01
12	Selenato de sódio anidro	0.01025
13	Paramobilidato de amônio. 4H ₂ O	0.00795
14	Meta-silicato de sódio 12H ₂ O	1.45
15	Sulfato de crômio e potássio 12H ₂ O	0.275
16	Cloreto de lítio	0.0174
17	Ácido bórico	0.0815
18	Fluoreto de sódio	0.0635
19	Carbonato de níquel	0.0318
20	Vanato de amônio	0.0066
21	Sacarose	221.026

3.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 - Avaliação do Estado Nutricional:

O peso corporal de quatro animais de cada grupo foi monitorado semanalmente, dos 28 dias aos 90 dias de vida.

No final do período experimental, no período da manhã, um grupo de ratos foi sacrificado por decapitação e o sangue coletado em tubos de vidro sem anticoagulante. O soro foi separado por centrifugação a 700 G durante 15 minutos e parte foi armazenado a - 20 °C para posterior determinação de insulina por radioimunoensaio (Scott et al. 1981), glicose (Trinder 1969), proteínas totais (Wolfson et al. 1948), albumina (Doumas, Watson & Biggs, 1971) e ácidos graxos livres (Nonesterified fat acid C Kit, WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Germany). Parte do soro foi transferido para tubos de plástico estéreis para a análise automática de aminoácidos.

Após a coleta de sangue, procedeu-se a abertura da cavidade peritoneal, sendo o fígado ressecado e pesado, para determinação da concentração de glicogênio e de gordura hepáticos.

3.2.2 - Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos

1- Glicose sérica

Foi determinada pelo método da glicose oxidase-peroxidase, usando kit comercialmente disponível (Merck - Diagnostic Darmstadt Germany). A 1 mL de reativo contendo fenol 2,5 mM, 4 (p-benzoquinona monoimino) fenazona 1,14 mM, tampão Tris 0,04 mM, glicose-oxidase 2,7 U/L e 10 µL de soro. Após 15 minutos de incubação, as absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas a 505 nm (Trinder 1969).

2- Proteínas totais séricas

Foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico, usando kit comercialmente disponível (Merck-Diagnostic Darmstadt, Germany). O método utiliza a presença de íons cobre em meio alcalino reagindo com as ligações peptídicas das proteínas, dando origem a um complexo de cor violeta, portanto, proporcional ao teor de proteínas. Os valores das amostras foram obtidos adicionando 10µl de soro, 0,2 mL de reagente de biureto (sulfato de cobre a 10%). As absorbâncias das amostras foram lidas a 550 nm (Wolfson et al. 1948).

3 - Albumina Sérica

A concentração de albumina sérica foi determinada através do método colorimétrico do verde de bromocresol. Foram adicionados a 0,02 mL do soro, 5 mL do reagente de cor, contendo solução de verde de bromocresol 0,6 mM, tampão succinato 0,1 M, surfactante não iônico 30% e com pH = 4. As absorbâncias foram avaliadas a 630 nm e as concentrações determinadas através de uma curva de calibração de albumina, linear até concentrações de 6 g/L (Doumas, Watson & Biggs, 1971).

4- Ácidos Graxos Livres

As medidas de ácidos graxos livres foram feitas utilizando-se Kits enzimáticos da WAKO (Alemanha) e ROCHE (Alemanha) respectivamente conforme instruções do fabricante. Os métodos originais foram modificados para utilização de microamostras em placas de ELISA, onde utilizamos 2 µL de amostra de soro e dos padrões e 200 µL do reagente do Kit.

5- Análise Automática de Aminoácidos Livres no Soro

O soro dos animais NP e LP foram desproteinizados usando uma solução orgânica composta por metanol, TCA e acetonitrila de água. O soro foi misturado à solução desproteinizadora na proporção 2:1 (v/v) e incubadas a temperatura ambiente (20° C) por

15 min. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3800 xg por 3 min e alíquotas de 200 µL foram misturadas ao tampão de amostra do analisador de aminoácidos (tampão de lítio pH 2.2) na proporção 1:2 (v/v) (Pharmacia).

A análise dos aminoácidos foi realizada em sistema de derivatização pós coluna usando um reagente de ninhidrina e a mistura dos aminoácidos livres foi realizado em uma coluna de troca iônica da Pharmacia para aminoácidos livres. A eluição dos aminoácidos foi realizado usando um gradiente “step wise” de tampão de lítio em diferentes pH e molaridades como indicados pelo sistema Biochrom 20 Plus (Pharmacia).

6 - Gordura Hepática

Fragments de tecido hepático, pesando aproximadamente 500 mg, foram retirados e digeridos em 2 mL de solução KOH 30%. A precipitação do glicogênio foi feita em 0,1 mL de Na₂SO₄ e 7 mL de etanol, em banho-maria fervente por 2 min. Após extração, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante, contendo a fração lipídica, foi armazenado. A seguir tubos de ensaio receberam a identificação de “padrão” (P₁) e “desconhecido” (D₁) e nesses foram adicionados 20 µL de solução de etoxilados de lanolina equivalentes a 10 g/L de lipídeos totais (utilizados como padrão para lipídeos) e 20 µL da amostra desconhecida (fração lipídica), respectivamente. Em seguida em cada tubo foi colocado 1mL de ácido sulfúrico e agitado vigorosamente para homogeneização das amostras e levados para o banho (fervente) por 10 min. Após esse período, os tubos permaneceram em repouso até que atingissem a temperatura ambiente. Em outros 3 tubos, branco (B), padrão (P₂) e desconhecido (D₂), colocamos 100 µL de ácido sulfúrico, 100 µL de padrão (P₁) e 100 µL da amostra desconhecida (D₁). Após esse procedimento, juntou-se a esses tubos 2,5 mL do reagente fosfovanílico (solução de vanilina a 9,02 nmol/L em ácido fosfórico) e foram agitados para homogeneização e colocados em banho a 37 °C durante 10 min. Finalizada a incubação os tubos foram retirados do banho e deixados em repouso por 30 min. sendo as amostras avaliadas em espectrofotômetro a 550 nm.

7 - Glicogênio Hepático

Fragmentos de tecido hepático foram processados de modo semelhante ao item anterior. Após extração, as amostras foram centrifugadas e o precipitado suspenso em 25 mL de água deionizada. A 1 mL desse extrato foram adicionados 20 µL de fenol 80% (m/v) em água e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi levada à fervura durante 15 min. e em seguida ficou em repouso para atingir a temperatura ambiente e a absorbância foi medida em 490 nm. Foram utilizadas soluções padrões de glicose para as curvas de calibração.

O soro dos animais NP e LP foram desproteinizados usando uma solução orgânica composta por metanol, TCA e acetonitrila de água. O soro foi misturado à solução desproteinizadora na proporção 2:1 (v/v) e incubadas a temperatura ambiente (20° C) por 15 min. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3800 xg por 3 min e alíquotas de 200 µL foram misturadas ao tampão de amostra do analisador de aminoácidos (tampão de lítio pH 2.2) na proporção 1:2 (v/v) (Pharmacia).

A análise dos aminoácidos foi realizada em sistema de derivatização pós coluna usando um reagente de ninhidrina e a mistura dos aminoácidos livres foi realizada em uma coluna de troca iônica da Pharmacia para aminoácidos livres. A eluição dos aminoácidos foi realizada usando um gradiente "step waise" de tampão de lítio em diferentes pH e molaridades como indicados pelo sistema Biochrom 20 Plus (Pharmacia).

3.2.3 - Metabolismo de Nutrientes

1 - Metabolismo de Leucina

A oxidação de leucina nas ilhotas isoladas foi avaliada através da determinação da oxidação da D-[U-¹⁴C]leucina em ¹⁴CO₂ (Malaisse et al., 1973). Para isso, grupos de 25 ilhotas foram coletas e transferidas para tubos de ensaio com volume aproximado de 0,7 mL contendo solução de Krebs 2,8 mM de glicose. A seguir o meio de coleta foi descartado sendo introduzido 75 µL de meio de incubação Krebs contendo 2,8 mM de glicose e traços de D-[U-¹⁴C]leucina (10 µCi/ml). Paralelamente, preparou-se para cada condição experimental, 3 tubos-controle que receberam os respectivos meios de incubação com a

leucina marcada, porém sem as ilhotas (correspondeu ou BG). Os tubos de ensaio foram introduzidos em frascos maiores (suportes), hermeticamente fechados com tampas de borracha e incubados durante 120 min a 37 °C sob constante agitação, sendo o pH 7,4 equilibrado com carbogênio durante os primeiros 10 min.

Após o período de incubação, foram adicionados aos tubos de ensaio 0,1 mL de uma solução de citrato a 0,1 N, para interromper a oxidação, e 0,25 mL de hiamina nos frascos suportes para a captação do $^{14}\text{CO}_2$ liberado no meio. Para que todo o $^{14}\text{CO}_2$ liberado no meio fosse captado pela hiamina, os frascos suportes foram agitados durante 60 min à temperatura ambiente. Após este período, os tubos contendo as ilhotas e os controles foram descartados. Foram preparados também, 3 frascos denominados MAX, onde se introduziu 1,0 μl dos respectivos meios de incubação. Todos os frascos receberam 10 mL de líquido de cintilação e a radioatividade de cada frasco foi medida em um contador de radiação beta.

Através da equação:

$$F = \frac{[L] \times 10^{-3}}{25 \times \text{cpm (MAX)}}$$

Obteve-se o fator F que multiplicado pelo número de cpm de cada amostra propiciou a quantidade em pmol de glicose oxidada durante 120 min por ilhota.

Na equação:

[L] = concentração molar da leucina no meio de incubação;

25 = número de ilhotas em cada tubo de ensaio

cpm (MAX) = número de radiações por min obtido em 1 μl do meio de incubação.

3.2.17 - Avaliação de Aminoácidos e Proteínas Plasmáticas

1 - Eletroforese de Proteínas

De acordo com **Shagger and Von Jagow 1987**, utilizou-se um gel de empacotamento de 7.5% e um de corrida de 12% em condições desnaturantes em presença de SDS 20% (Tricina SDS-PAGE). Previamente as amostras foram liofilizadas e 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de solução de

proteínas foram preparadas em um volume final de 100 µl, que foram aquecidas durante 5 min a 100°C, centrifugadas e aplicadas na cavidade das placas. O sistema eletroforético usado foi o sistema Rubby SE 600 da Pharmacia, as dimensões dos géis foram 18x16cm, a corrida foi realizada “over night” por aproximadamente 12 horas a 15°C, a 70V constantes. As placas foram coradas com coomasie e posteriormente descoradas e as imagens analisadas em um sistema de análise de géis Personal Densitometer SI (Pharmacia).

3.2.4 - Avaliação da Secreção de Insulina e Quantificação de Enzimas

1 - Isolamento de Ilhotas Pancreáticas

Utilizou-se a técnica da colagenase, descrita por Moskalevsky (1965), modificada por Lacy e Kostianovsky (1967) e adaptada por Boschero et al. (1980). Animais dos respectivos grupos (NP, LP e Rc) foram sacrificados por decapitação. Após incisão abdominal e oclusão da extremidade do ducto biliar comum, foi inserida uma cânula através de uma pequena incisão na parte proximal (hepática) deste ducto. Através da cânula de polietileno, foi injetada solução de Hanks enriquecida com 2.8 mM de glicose e colagenase para o grupo NP e Rc 0,9 mg/mL e para o grupo LP 0,7 mg/mL que promoverá a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi excisado e dissecado de gorduras, da maioria do tecido vascular e dos gânglios linfáticos. A seguir, foi reduzido a fragmentos pequenos que serão transferidos para um tubo de ensaio contendo Hanks e colagenase. Em seguida, os fragmentos foram incubados em banho-maria a 37°C durante aproximadamente 18 minutos. Após o período de incubação, o tubo foi agitado manualmente por aproximadamente 1 minuto ou até a obtenção de mistura de viscosidade homogênea. O conteúdo foi transferido para um Becker e o material lavado com solução de Hanks 4 vezes para a remoção da colagenase, das enzimas digestivas liberadas durante a incubação e também dos fragmentos celulares.

As ilhotas, completamente separadas do tecido acinoso, foram coletadas uma a uma, sob lupa, por aspiração com o auxílio de pipeta de Pasteur, previamente estirada e Osiliconizada.

2 - Secreção Estática de Insulina

As ilhotas coletadas foram transferidas para placas de cultura com 24 reservatórios contendo 0,5 mL de solução de Krebs, suplementada com 0,5% de albumina bovina (m/v) e 5,6 mM de glicose (fase de pré-incubação). A seguir as placas foram acondicionadas em banho-maria a 37 °C e mantidas por um período de 60 minutos em ambiente controlado (umidificado e gaseado com carbogênio). O pH da solução foi ajustado em 7,4 pela injeção desse gás. A seguir, o meio foi removido, e as ilhotas foram incubadas por 60 ou 90 minutos nas seguintes condições experimentais:

- a) Glicose (2,8 mM), leucina (20mM), na ausência ou na presença de concentrações crescentes de carbacol (0,1; 1,0; 3,3; 10,0; 100,0 mM).
- b) Glicose (8,3 mM), leucina (20mM), na ausência e na presença de duas concentrações de carbacol (0,1 e 100 mM).
- c) Glicose (2,8 mM), leucina (20 mM), potássio (40 mM) e carbacol (0,1; 1,0; 3,3; 10,0; 100,0 mM).
- d) Glicose (2,8 mM), leucina (20 mM), gliceraldeído (1mM).
- e) Glicose (2,8 mM), leucina (20 mM), cetoisocaproato (15mM).
- f) Glicose (2,8 mM), leucina (20 mM), isometilbutilxantina (1mM).
- g) Glicose (2,8 mM), leucina (20mM), éster de forbol (100nM).

Após período de incubação, as placas foram resfriadas em banho de gelo e o sobrenadante removido, transferido para tubos de ensaio e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (Scott et al. 1981).

3 - Secreção Dinâmica de Insulina

Para a análise da secreção dinâmica de insulina, grupos de 100 a 150 ilhotas foram imediatamente transferidos para 4 câmaras de perfusão contendo filtro Millipore SW1300 (poro 8 µm). As câmaras foram conectadas a um sistema de perfusão constituído por 4 recipientes ligados por intermédio de catéteres a uma torneira de 2 vias. As soluções perfusoras contendo diferentes substâncias foram mantidas a 37 °C e equilibradas constantemente com carbogênio. A razão de fluxo do sistema de perfusão foi 1 mL/min, impulsionado por uma bomba peristáltica de 4 canais Ismatec.

No primeiro experimento, as ilhotas foram inicialmente perfundidas com meio contendo glicose (2,8 mM) e leucina (20 mM), e, a seguir, com solução contendo glicose (2,8 mM), leucina (20 mM) e carbacol (100 μ M).

No segundo experimento, ilhotas foram perfundidas com solução contendo glicose (8,3 mM) e leucina (20 mM), e, em seguida, com meio contendo glicose (8,3 mM), leucina (20 mM) e carbacol (100 μ M).

As amostras do perfusato foram coletadas em frascos de polietileno, a intervalos regulares de 1 minuto e armazenado a -20 °C para posterior dosagem da insulina por radioimunoensaio (Scott et al. 1981).

4 - Dosagem de Insulina

A insulina secretada durante os diferentes experimentos “*in vitro*” e “*in vivo*” foi determinada por radioimunoensaio. Para isso transferiu-se 0,1 mL das amostras desconhecidas (em duplicata) as quais receberam a seguir 0,2 mL de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com 125 I (traçador) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9 % e albumina 0,5 %. Em seguida foram preparados os seguintes controle:

- a) 3 tubos (Totais) que receberam somente 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada 125 I para averiguação da radiação máxima.
- b) 3 tubos (Ligação não específica) contendo 0,2 mL do tampão fosfato contendo insulina marcada 125 I e 0,1 ml de tampão fosfato, para determinar possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão.
- c) 3 tubos (Referência) contendo 0,2 mL de solução tampão fosfato contendo insulina marcada com 125 I e anticorpo anti-insulina e 0.1 ml de tampão fosfato, constituindo assim o zero de insulina da curva padrão.

Em seguida preparou-se, também em triplicata, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0,1 ml de insulina conhecida nas seguintes concentrações: 0,02; 0,039; 0,078; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; e 5,0 ng/mL. Cada tubo dessa série recebeu também 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada 125 I e anticorpo anti-insulina. No final da preparação dos tubos (amostras, controle e curva padrão), eles foram agitados em vortex e estocados a 4 °C, durante 48 h.

Após este período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, todos os outros tubos receberam 0,2 ml de uma solução contendo 2,5 % de carvão (Norit A), 0,5 % de albumina e 0,25 % de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso durante 20 min e a seguir centrifugados durante 20 min (2800 rpm) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo avaliada em contador de radiação gama. Os 3 tubos elaborados para análise da radiação máxima não tiveram o sobrenadante descartado, sendo a radiação dos mesmos avaliada diretamente. Com bases nos valores obtidos nos tubos contendo insulina conhecida elaborou-se uma curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores desconhecidos das amostras. Os resultados foram expressos em ng/mL de insulina secretada durante os experimentos.

5 - Efluxo de Radioisótopos

Após o isolamento, as ilhotas foram distribuídas em eppendorffs de 1,5 mL. O sobrenadante foi removido e substituído por meio de incubação 10 a 20 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{CaCl}_2$ em presença de 16,7 mM de glicose. Os eppendorffs contendo de 80 a 100 ilhotas foram incubados por 90 min, em banho-maria gaseados com carbogênio. Ao final desse período as ilhotas foram lavadas 4 vezes com solução de incubação não radioativa, transferidas para 4 câmaras de perfusão contendo membrana millipore SW1300 (poro 8 μm). As câmaras foram conectadas ao sistema de perfusão constituído por 4 recipientes ligados por intermédio de catéteres a uma torneira de 2 vias. As soluções perfusoras contendo leucina, na presença de CCh, foram mantidas a 37 °C e equilibradas constantemente com carbogênio. A razão de efluxo do sistema de perfusão foi 1 mL/min, impulsionado por uma bomba peristáltica de 4 canais Ismatec. As amostras do perfusato foram coletadas em frascos de polietileno, a intervalos regulares de 2 min. Em cada frasco foi adicionado líquido de cintilação para a leitura de ^{45}Ca ; a radioatividade contida no efluente de cada frasco foi medida em contador de partícula beta (Beckman LS 6000TA).

6 - Western Blotting

Para detectar o nível de expressão celular da p70^{S6K-1} e Akt foi empregada a metodologia de Western Blot. Grupos de 500 ilhotas recém-isoladas e incubadas por 2,5 horas em Krebs contendo 8.3 mM de glicose foram centrifugados rapidamente e o sobrenadante desprezado. A seguir, foram adicionados 200µL de Coquetel anti-protease. As ilhotas foram então politronizadas nesta solução, por aproximadamente 10s, e o homogeneizado foi centrifugado a 3000g por 10min.

O precipitado foi desprezado e foi feita a dosagem protéica no sobrenadante obtido, utilizando-se o reagente para ensaio de proteína da “BioRad Protein Assay-Dye Reagent Concentrate” (Melville, NY). Foi utilizado como referencial uma curva padrão de albumina. As amostras foram então incubadas à 37°C por 1h em 20% do volume de Tampão de Laemmli 5X (Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%).

Para corrida eletroforética foi utilizado gel bifásico: gel de empilhamento (EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 750mM, pH 6.7) e gel de resolução (EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 50mM, pH 6.7). A corrida foi efetuada à 200V por aproximadamente 30min com Tampão de Corrida (Trisma base 200mM, glicina 1.52M, EDTA 7.18mM e SDS 0.4%), diluído 1:4. As amostras foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (BioRad). A transferência foi realizada durante 60min à 30V em gelo, banhada com Tampão de Transferência (Trisma base 25mM, glicina 192M).

Após transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em solução Tris Salina (TBS) (Trisma base 1M, NaCl 5M, Tween 20 0.5%) *overnight* à 4°C. A p70^{S6K-1} e Akt foram detectadas na membrana de Nitrocelulose por incubação por 2h, à temperatura ambiente, com anticorpo monoclonal específico anti- p70^{S6K-1} e anti-Akt (Sta Cruz, diluição 1:500 (p70^{S6K-1}) e 1:1000 (Akt) em TBS com 3% de leite desnatado). Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo (diluição 1:1000 em TBS com 3% de leite desnatado) seguido de exposição por 2h à temperatura ambiente com proteína A marcada com I¹²⁵ (diluição 1:1000 em TBS com 1% de leite desnatado).

O complexo anticorpo-[I¹²⁵] proteína A foi detectado por auto-radiografia, após armazenamento desta membrana à -70°C por aproximadamente 5 dias dentro de cassete provido de uma tela amplificadora.

7 - Extração de RNA total

Para a extração dos RNAs totais das ilhotas foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, o tecido foi inicialmente rompido com sonicador e homogeneizado com o reagente Trizol até completa solubilização. Em seguida a mistura foi incubada por 5 min a temperatura ambiente, acrescida de 0,2 mL de clorofórmio por mL de Trizol para desproteinização. O sobrenadante foi separado por centrifugação (12.000 x g, 15 min, 4°C), e o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 75% e 100%, respectivamente, e dissolvido com H₂O deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Após quantificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2%, para análise da integridade do RNA.

8 - RT-PCR semi-quantitativo

Os resultados obtidos nos experimentos de hibridação foram confirmados por RT-PCR semi-quantitativo, de genes relacionados com a biossíntese e secreção da insulina. Alguns genes que se mostraram alterados foram amplificados juntamente com um gene constitutivo e um gene exógeno (para normalização dos resultados). Inicialmente, uma amostra de 2µg de cada RNA utilizado nos 'arrays' foi submetida à reação de transcrição reversa com *primers* randômicos. Para isto, foi adicionado em cada amostra tampão da enzima, DTT (100 mM), dNTP mix (10mM) e a enzima SuperScript II (200U), e incubadas por 50 min a 42°C para a reação. A partir dos cDNAs obtidos foram realizadas as curvas de ciclos para cada *primer* (Ver Tab. II), com o mínimo de 5 pontos para cada curva. Após obtenção

das curvas os experimentos foram realizados com um número de ciclos equivalente a 20% abaixo do ponto de saturação da reação (platô).

Tabela II – Primers utilizados.

<i>GENE</i>	<i>Sense Primer (5' a 3')</i>	<i>Antisense Primer (5' a 3')</i>
<i>p70^{S6K-1}</i> <i>(D1038A03)</i>	<i>TGG ATT GGT GGA GTT TGG G</i>	<i>ATT TGA CTG GGC TGA CAG GC</i>
<i>Fosfolipase</i>	<i>ACG GCA TAG ACA GGA AGT GGG</i>	<i>CTG CTG GCT GCT TTG CTC AC</i>

3.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média e erro padrão. Nos resultados referentes aos parâmetros bioquímicos (proteínas séricas totais, albumina, glicose sérica, AGL séricos, glicogênio hepático e gordura hepática) e dosagem de p70^{S6K-1} e Akt através de densitometria (programa utilizado Beta 4.0.2 of Scion Image – Scion Corporation) foram aplicados o teste t (Student) para amostras independentes. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

Para obtenção das áreas nas figuras de efluxo de cálcio, calculamos uma curva exponencial teórica para cada grupo (normoprotéico e hipoprotéico) baseado em todos os pontos excluindo-se os pontos que faziam parte dos picos. Em seguida fizemos a diferença entre a curva obtida experimentalmente e a teórica e integramos para obter a área correspondente. Em seguida realizamos o teste t (Student) para as áreas calculadas.

Com relação aos dados obtidos nas secreções dinâmicas e estáticas foi utilizada análise de variância (duas fontes: estado nutricional (normoprotéico e hipoprotéico) e droga). Foi realizado o teste de comparação múltipla (teste de Tukey) para a primeira e para a segunda fonte de variação e na interação das duas fontes. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. A homogeneidade das variâncias foi testada segundo Cochran, Hartley e Barlett. As análises foram feitas utilizando-se o programa “Statistica” (versão 4.3, 1993) da StatSoft, inc.

O resultado da quantificação do mRNA da proteína p70^{S6K} foi utilizado o teste t (Student) onde o nível de significância utilizado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

6 - RESULTADOS

6.1 - Avaliação do Estado Nutricional dos Animais

Os ratos jovens mantidos dos 34 aos 90 dias com uma dieta hipoprotéica (LP) apresentaram peso corporal (Fig. 1A) menor do que aqueles que permaneceram com uma dieta normoprotéica (NP). Observamos aumento de glicogênio hepático, gordura hepática e ácidos graxos nos animais hipoprotéicos (Tab. I). Os níveis séricos de proteína total e albumina foram menores no grupo hipoprotéico e a glicose sérica permaneceu inalterada nos dois grupos em estudo.

A Fig. 1A demonstrou que a massa corpórea entre os grupos NP e LP, não apresentaram diferença significativa na primeira semana de desnutrição. Podemos concluir, com isso, que a massa corpórea dos dois grupos animais estavam homogêneas no início da desnutrição. As diferenças começaram a aparecer da segunda semana em diante, onde os animais NP apresentaram um aumento da massa corpórea quando comparado aos animais LP ($p < 0,05$). Este padrão de crescimento permaneceu desta forma até o final do estudo.

A Fig. 1B representa a velocidade do ganho de massa corpórea. Com esse resultado podemos constatar que a velocidade de crescimento do grupo NP foi maior em relação ao grupo LP e, além disso, atingiu a velocidade máxima na terceira semana enquanto que o grupo LP atingiu sua velocidade máxima por volta da sexta semana.

Quando foram analisadas as diferenças nos valores máximos de velocidade de ganho de massa corpórea, podemos observar, ainda, que o grupo NP apresentou uma velocidade de crescimento aproximadamente duas vezes maior que a velocidade de crescimento do grupo LP.

Verificamos na Fig. 2A o perfil de aminoácidos no plasma de animais LP e NP em jejum, onde observamos que o período de restrição protéica a que foram submetidos estes animais produziu alterações importantes no perfil sérico desses aminoácidos. Podemos destacar a redução de Taur, Hypro, Thr, Asn, Val, Met, Ile, Leu, Phe e 3-Mhis. Por outro lado, observamos aumento da Ser, Homocys e Hylys, embora os outros aminoácidos tenham permanecido inalterados. Quando analisamos o aminograma no estado alimentado na Fig. 2B, verificamos que os animais LP apresentaram redução da Taur, Thr,

Val, Leu, Phe, Hyls, Orn, Arg e aumento de Ser, Gln, Gly e Ala. Podemos ainda destacar que o aumento da alanina foi de 2.9 vezes em relação aos níveis plasmáticos dos animais NP. Os aminoácidos insulínótropicos, os quais são objetos de nosso estudo neste trabalho, permaneceram reduzidos no estado alimentado.

Na **fig 3** verificou-se a eletroforese de proteínas citoplasmáticas solúveis em ilhotas de animais NP e LP. Observou-se que o grupo LP apresentou um perfil de proteínas bastante distinto do grupo NP. Isto pode ser melhor evidenciado pela densitometria (**fig. 3B**), onde notamos que diferentes bandas apresentam quantidades alteradas de proteínas. O processo de restrição protéica a que foram submetidos esses animais induziu uma expressão diferenciada dessas proteínas nessas ilhotas.

6.2 - Secreção de Insulina em Presença de Leucina e CCh

A **Fig. 4** ilustra o efeito de concentrações crescentes de CCh sobre a secreção de insulina em ilhotas isoladas de animais NP e LP incubadas durante 1h em presença de 2,8 mM de glicose e 20 mM de leucina. A liberação de insulina em valores absolutos foi significativamente maior nas ilhotas provenientes dos animais NP, quando comparadas às ilhotas isoladas dos animais LP. Em condições basais de glicose (G 2,8 mM) a secreção de insulina das ilhotas NP não se alterou em relação à secreção de insulina das ilhotas proveniente dos animais LP. Com a adição de 20 mM de leucina, já se pode observar diferença na secreção de insulina entre os dois grupos animais, as ilhotas NP aumentaram a secreção de insulina 1,73 vezes em relação às ilhotas LP, essa tendência de aumento permaneceu quando acrescentamos CCh em diferentes concentrações 0,1 μ M (3,36 vezes), 1 μ M (3,71 vezes), 3,3 μ M (4,29 vezes), 10 μ M (4,43 vezes) e 100 μ M (2,95 vezes), respectivamente. A EC_{50} do grupo NP foi de $1,12 \pm 0,8 \mu$ M e do grupo LP foi de $28,0 \pm 0,08 \mu$ M. O grupo controle pontencializou a secreção de insulina em presença de CCh a partir de 0,1 μ M do agonista colinérgico apresentando diferenças significativas a cada incremento em sua concentração. Já nas ilhotas de animais LP este padrão de resposta desapareceu e somente observamos mudanças no padrão secretório em torno de 100 μ M de CCh.

A **Fig. 5** representa o efeito de 0,1 μ M e 100 μ M de CCh em associação com 20 mM de leucina sobre a secreção de insulina em ilhotas de animais NP e LP incubadas durante

Tabela I - Parâmetros bioquímicos avaliados nos ratos ao final do período experimental.

Parâmetros	NP	LP
Proteínas séricas totais Jejum (g/dl)	5,5 ± 0,2	4,9 ± 0,3*
Albumina sérica Jejum (g/dl)	3,6 ± 0,1	3,4 ± 0,1*
Glicose sérica Jejum (mg /dl)	125,5 ± 7,4	128,0 ± 14,6
AGL séricos Jejum (mM)	0,3 ± 0,01	0,5 ± 0,09*
Insulina sérica Jejum (ng/mL)	0,95 ± 0,13	0,72 ± 0,18
Insulina sérica alimentado (ng/mL)	1,95 ± 0,6	0,69 ± 0,2 *
Glicogênio hepático Jejum (mg glicose/100mg tecido)	0,9 ± 0,1	1,16 ± 0,1*
Gordura hepática Jejum (g AG/100g tecido)	7,2 ± 0,5	12,5 ± 0,9*

Resultados expressos como média ± se; n=10.* Diferença significativa (P < 0,05).

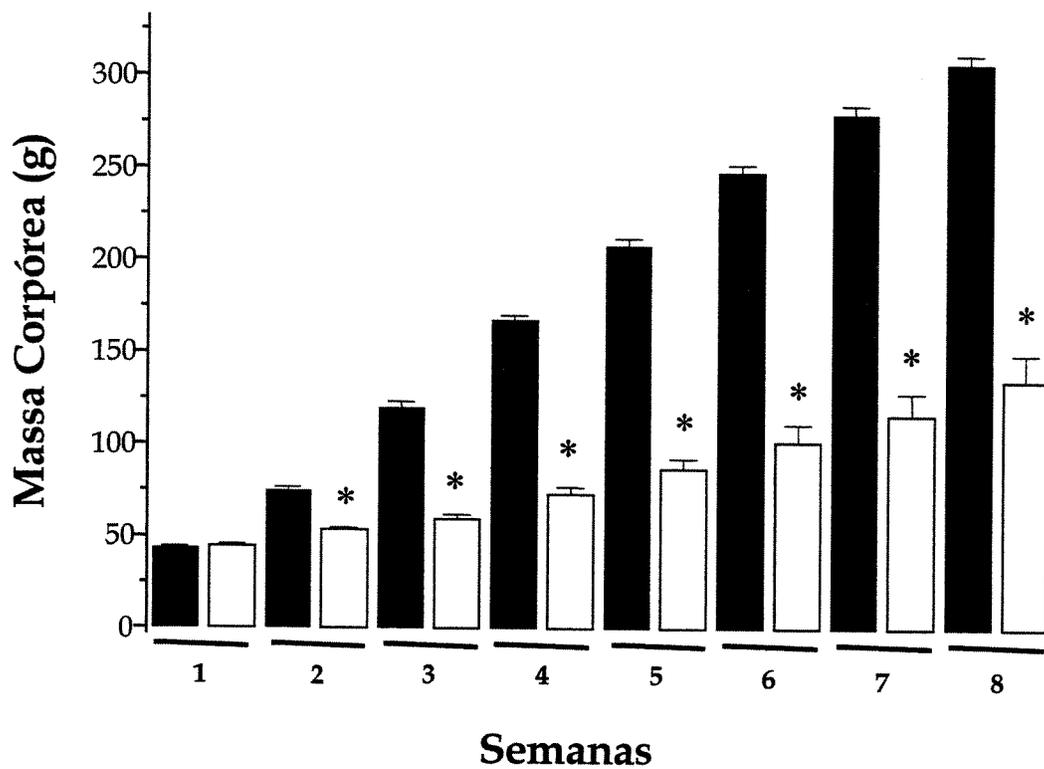


Fig. 1A - Ganho de massa corpórea de ratos Wistar machos de 34 dias de vida Normoprotéicos (■, n=4) e Hipoprotéicos (□, n=4) , avaliado ao longo de oito semanas. Valores expressos em média \pm se. * Diferença significativa ($p < 0,05$)

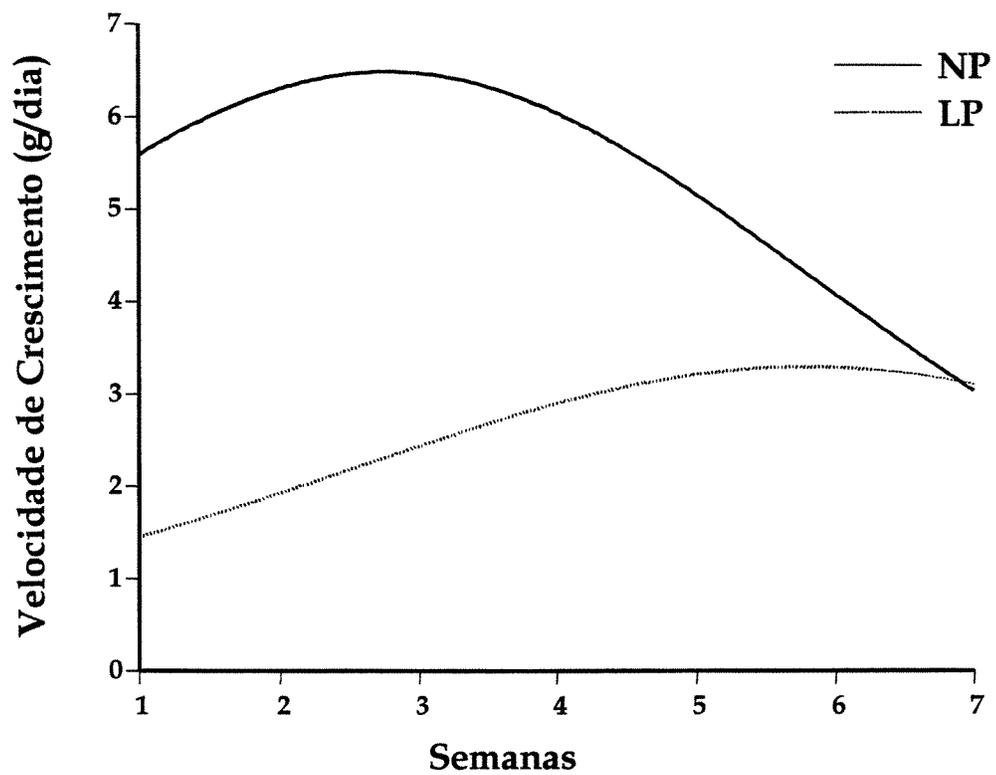


Fig. 1B - Velocidade de ganho de massa corpórea de ratos Wistar machos no decorrer de oito semanas de desnutrição

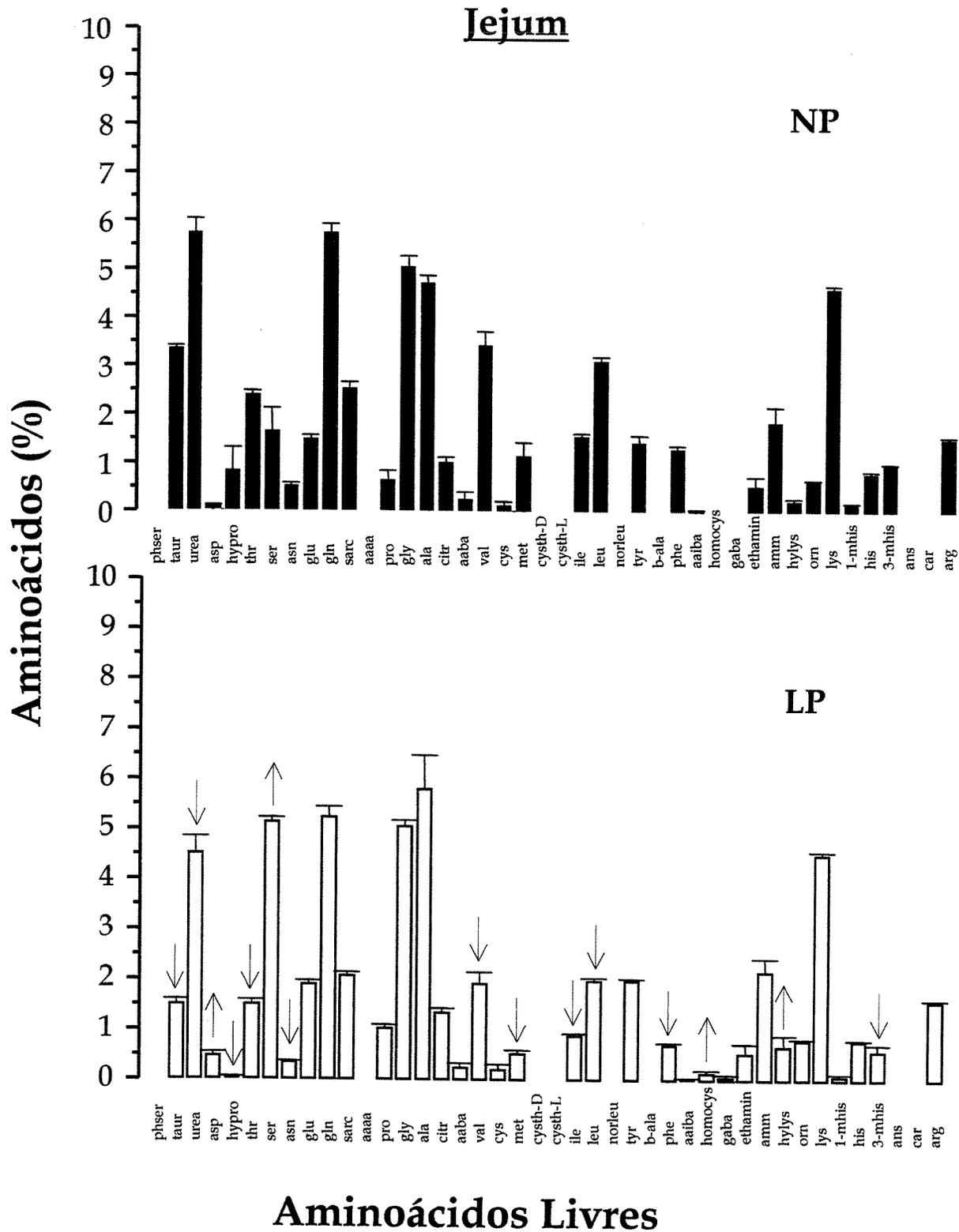


Fig. 2A - Quantidade de aminoácidos no plasma de ratos Wistar machos NP (■, n=4) e LP (□, n=4) em jejum. Setas representam aumento ou diminuição na quantidade de aminoácidos.

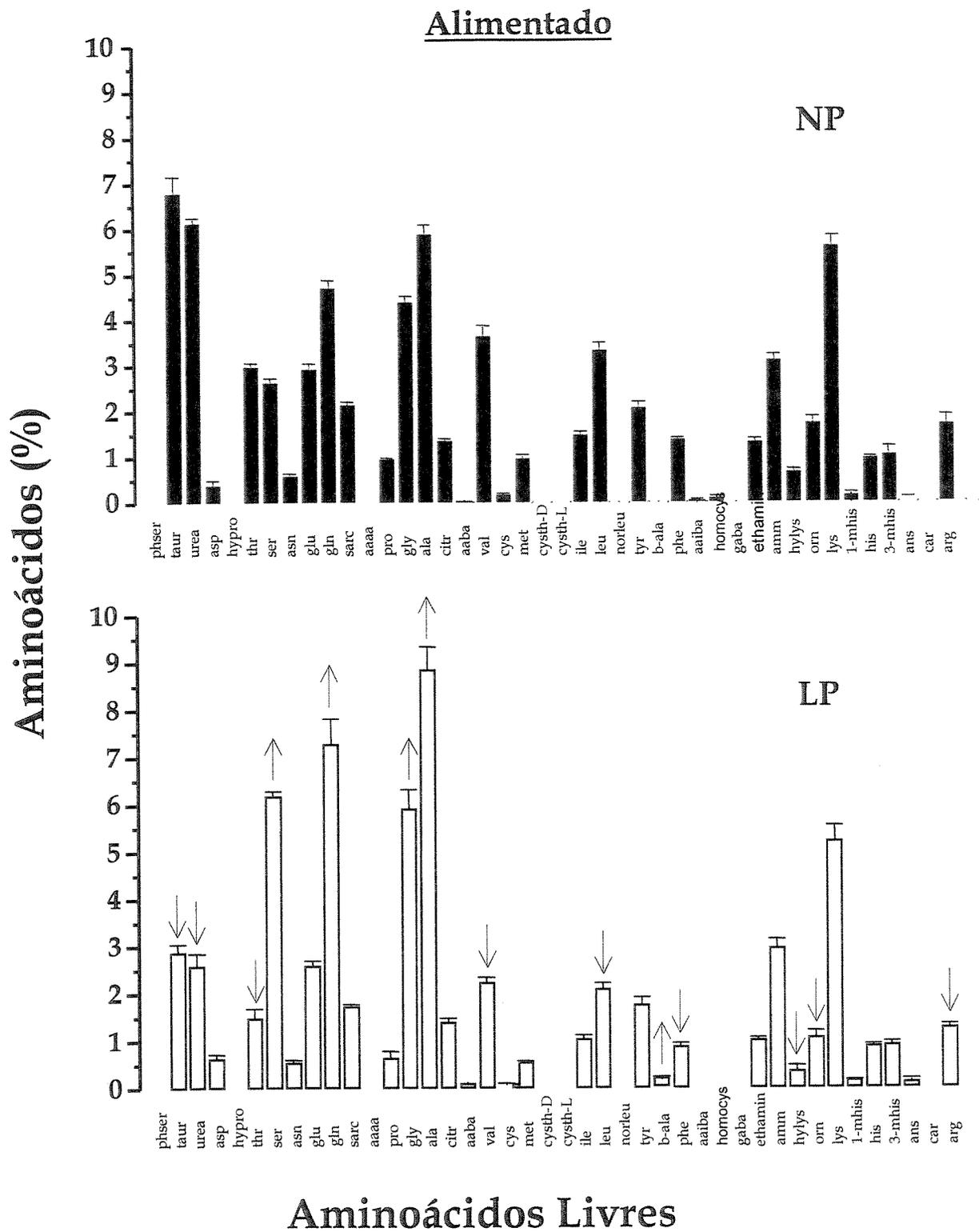


Fig. 2B - Quantidade de aminoácidos no plasma de ratos Wistar machos NP (■, n=4) e LP (□, n=4) alimentados. Setas representam aumento ou diminuição na quantidade de aminoácidos.

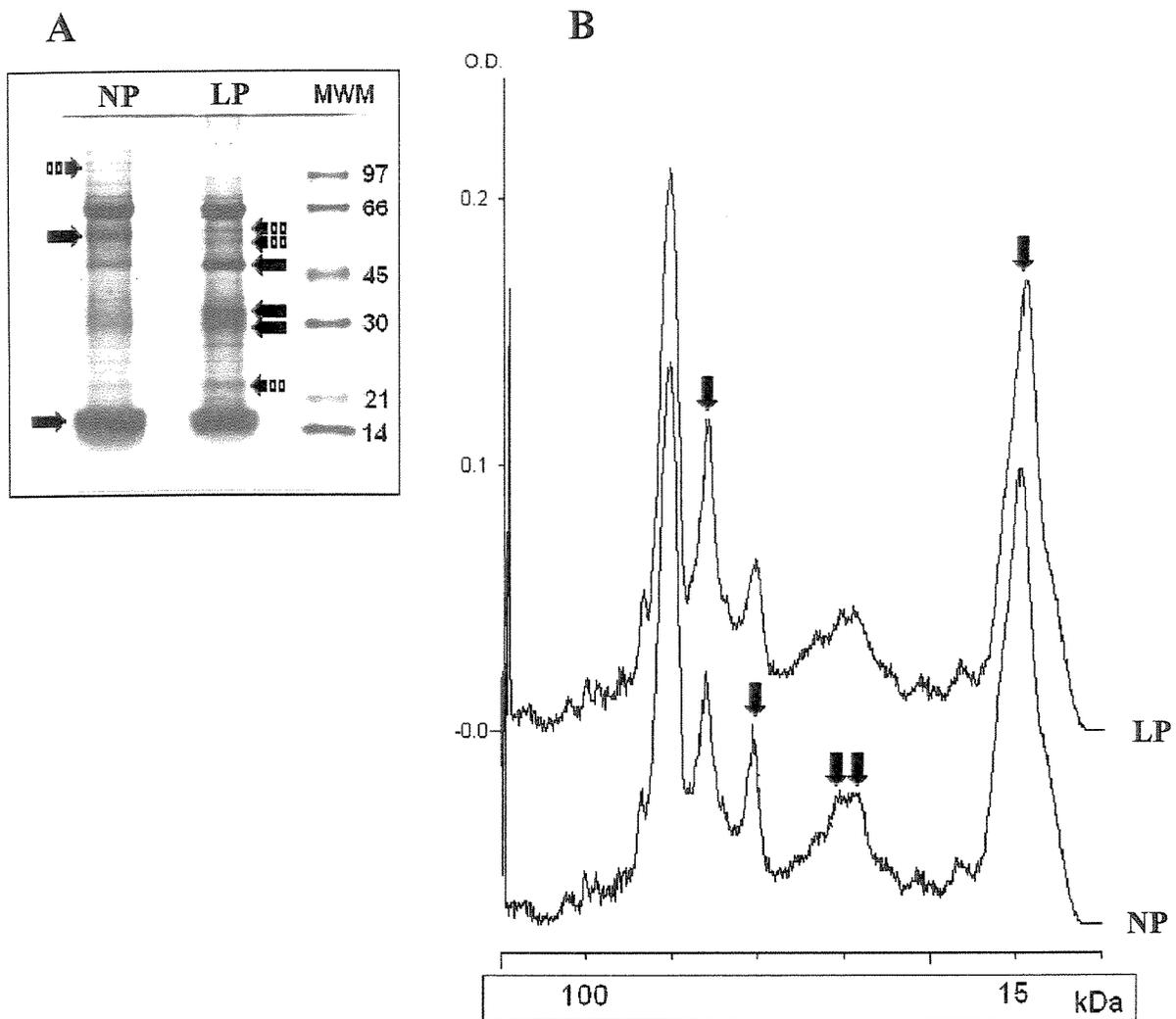


Fig. 3 - Eletroforese de proteínas em gel de empacotamento em ilhotas isoladas de ratos wistar machos NP (■, n=1) e LP (□, n=1). Grupos de 100 ilhotas permaneceram em Hank's 2,5 mM de glicose, foram sonicadas e equivalentes quantidades de proteínas foram aplicadas para a obtenção da proteína. A quantidade de proteína do grupo LP foi expressa em porcentagem do NP.

□□ → pouco significante

→ significante.

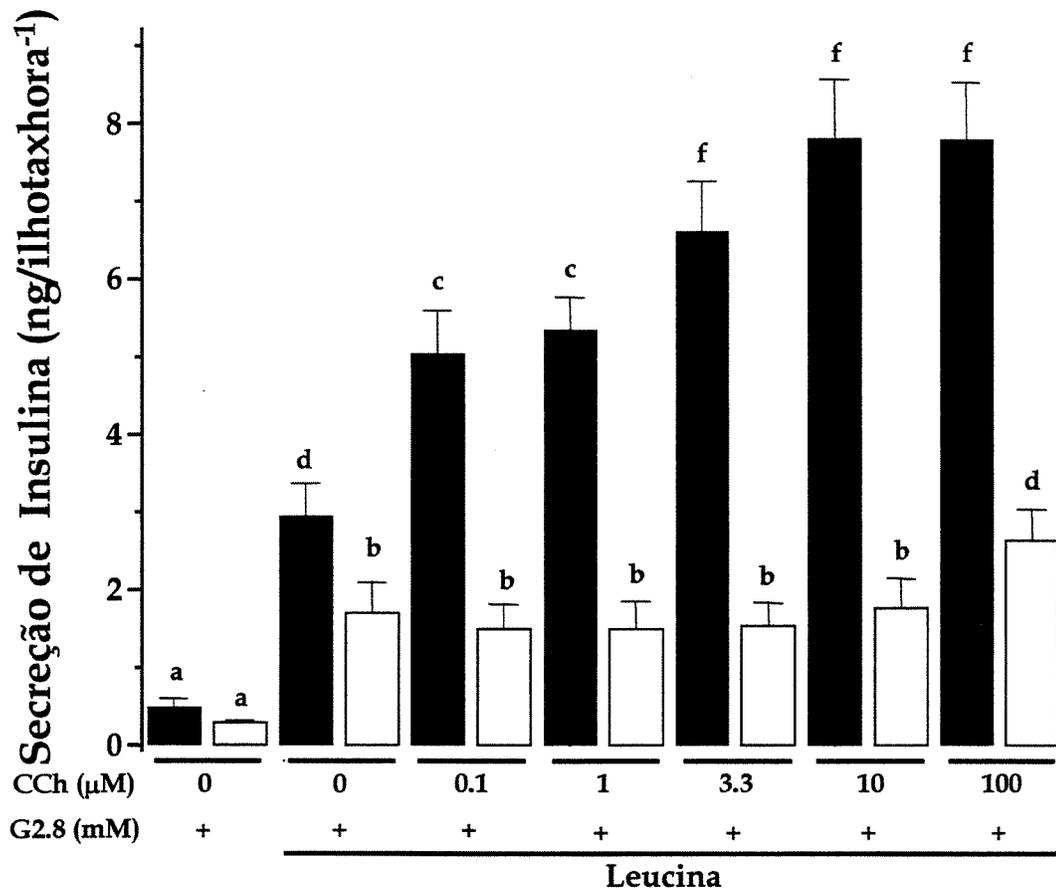


Fig. 4- Efeito da concentração crescente de Carbacol (0.1 a 100 μ M) sobre secreção estática de insulina em ilhotas de ratos Wistar machos Normoprotéicos (■, n=18) e Hipoprotéicos (□, n=18) incubadas por 1 h em solução de Krebs contendo 2.5 mM de cálcio, 2.8 mM de glicose e 20 mM de leucina. As barras indicam a média \pm se. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

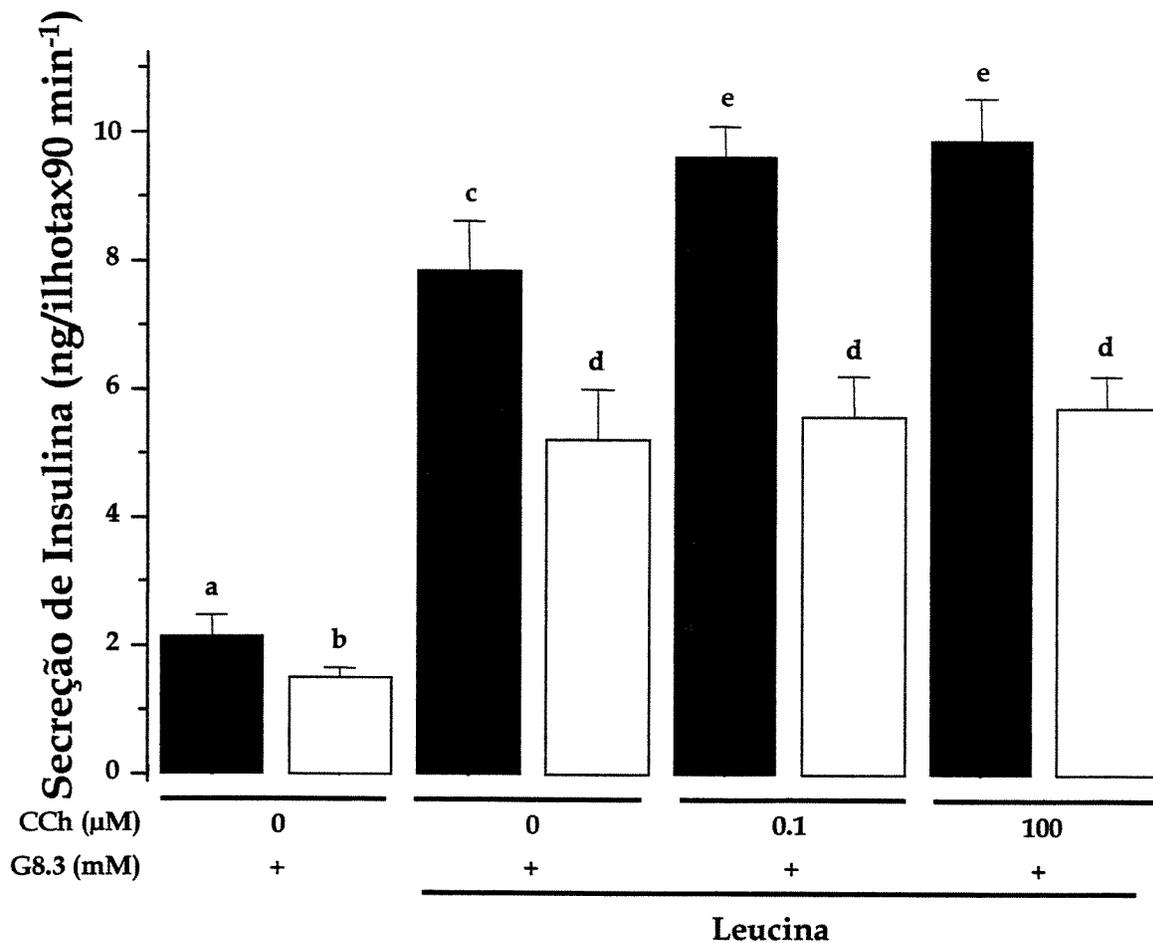


Fig. 5 - Efeito da concentração crescente de Carbacol (0.1 a 100 μM) sobre secreção estática de insulina em ilhotas de ratos Wistar machos Normoprotéicos (■, n=12) e Hipoprotéicos (□, n=12) incubadas por 90 min em solução de Krebs contendo 2.5 mM de cálcio, 8.3 mM de glicose e 20 mM de leucina. As barras indicam a média \pm se. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

90 min em presença de 8,3 mM de glicose. A liberação de insulina em valores absolutos foi significativamente maior nas ilhotas provenientes dos animais NP, quando comparadas às ilhotas isoladas dos animais LP. A adição de 20 mM de leucina, produziu aumento significativo na secreção de insulina em ambos os grupos experimentais, porém a adição das concentrações crescentes de CCh potencializou a secreção somente nas ilhotas controle. O aumento na secreção em presença do agonista colinérgico foi 1,72 vezes para 0,1 μ M e 1,73 vezes para 100 μ M, em relação às ilhotas LP. Quanto às ilhotas LP não houve potencialização da secreção nas duas concentrações de CCh utilizadas nestes experimentos.

Na **Fig. 6A** observamos a secreção dinâmica de insulina em ilhotas provenientes de animais NP e LP. As ilhotas foram perfundidas durante 60 min na presença de 2,8 mM de glicose e 20mM de leucina, na ausência ou presença de 100 μ M CCh. Com a adição do CCh (min 30) , apenas o grupo NP potencializou a secreção de insulina, não observando diferença na secreção de insulina no grupo LP, quando comparado com o período da perfusão em que o CCh esteve ausente no perfusato. O incremento na secreção de insulina foi significativamente maior no grupo NP, sendo 2.13 vezes maior em relação às ilhotas LP. Este aumento pode ser melhor caracterizado quando calculamos a área sob as curvas (**Fig. 6B**) ($p < 0.05$). No mesmo perfusato onde analisamos a secreção de insulina, foi possível avaliar o efluxo do ^{45}Ca , **Fig. 7A**, e observamos que a introdução do CCh (min 30 a 60) elevou a taxa de efluxo nos dois grupos experimentais próximo ao min 35, sendo mais elevado nas ilhotas LP. Esta elevação na taxa de efluxo apresentado por essas ilhotas pode ser comprovada pela análise da área da **Fig. 7B**, onde observamos que as ilhotas do grupo LP apresentaram uma taxa de efluxo 1,45 vezes maior quando comparada com o grupo de ilhotas NP ($p < 0,05$).

Na **Fig. 8A** observamos a secreção dinâmica de insulina em ilhotas provenientes de animais NP e LP. As ilhotas foram perfundidas durante 60 min na presença de 8,3 mM de glicose e 20mM de leucina, na ausência ou presença de 100 μ M CCh. Com a adição do CCh (min 30), apenas o grupo NP potencializou a secreção de insulina, não observando diferença na secreção de insulina no grupo LP, quando comparado com o período da perfusão em que o CCh esteve ausente no meio. O incremento na secreção de insulina foi significativamente maior no grupo NP, sendo 2.11 vezes maior em relação às ilhotas LP, como pode ser avaliado quando calculamos a área sob as curvas (**Fig. 8B**) ($p < 0.05$). No

mesmo perfusato onde analisamos a secreção de insulina, foi possível avaliar novamente o efluxo do ^{45}Ca , Fig. 9A, e observamos que a introdução do CCh (min 30 a 60) elevou a taxa de efluxo nos dois grupos experimentais próximo ao min 35, sendo mais elevado nas ilhotas LP. Esta elevação na taxa de efluxo apresentado por essas ilhotas pode ser comprovada pela análise da área da Fig. 9B, onde observamos que as ilhotas do grupo LP apresentaram uma taxa de efluxo 1,53 vezes maior quando comparada com o grupo de ilhotas NP mas apesar de uma taxa mais elevada não houve diferença estatística ($p < 0,05$).

6.3 - Metabolismo de Leucina

Na Fig. 10 observamos a oxidação de 20 mM de leucina em presença de 2,8 mM de glicose de ilhotas de animais NP e LP. As ilhotas NP apresentaram maior metabolismo deste aminoácido quando comparado as ilhotas LP. O grupo de ilhotas NP apresentou uma utilização de leucina 1,38 vezes maior que o grupo de ilhotas LP ($p < 0,05$). Este resultado pode explicar a menor secreção apresenta pelas ilhotas proveniente de ratos hipoprotéicos.

6.4 -Secreção de Insulina em Presença de Potássio e CCh

Para melhor caracterizar o efeito da leucina sobre a secreção de insulina, utilizou-se um secretagogo que exerce seu papel somente por despolarizar a membrana celular. Diante disso a Fig. 11 representa o efeito de concentrações crescentes do CCh e de 40 mM de potássio, sobre a secreção de insulina de ilhotas de animais NP e LP incubadas durante 1h em presença de 2,8 mM de glicose. A secreção de insulina em valores absolutos foi significativamente maior nas ilhotas provenientes dos animais NP, quando comparadas às ilhotas de animais LP. Em condições basais de glicose (G 2,8) a secreção de insulina das ilhotas NP não se alterou em relação à secreção de insulina das ilhotas proveniente dos animais LP. Com a adição de 40 mM de potássio, já se pode observar diferença na secreção de insulina entre os dois grupos de ilhotas, as ilhotas NP aumentaram a secreção de

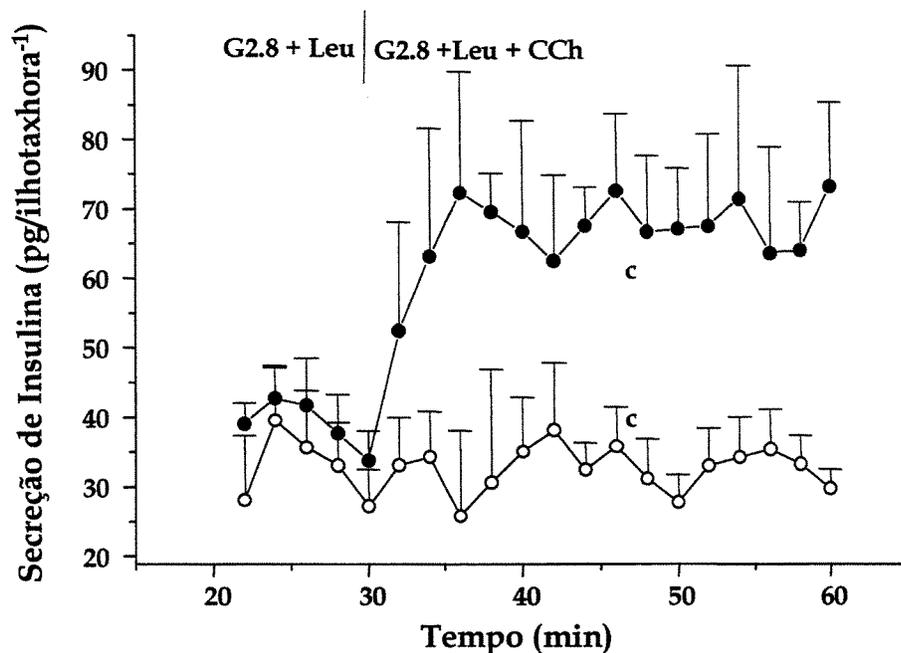


Fig. 6A - Efeito de $100 \mu\text{M}$ de Carbacol sobre secreção dinâmica de insulina, por ilhotas de ratos Wistar machos Normoprotéicos (\bullet , $n=4$) e Hipoprotéicos (\circ , $n=4$). As ilhotas foram perfundidas com solução de Krebs contendo 2.8 mM de glicose + 20 mM de leucina (0-30 min.) e carbacol (30-60 min.). Os resultados foram expressos em média \pm se ($n=4$).

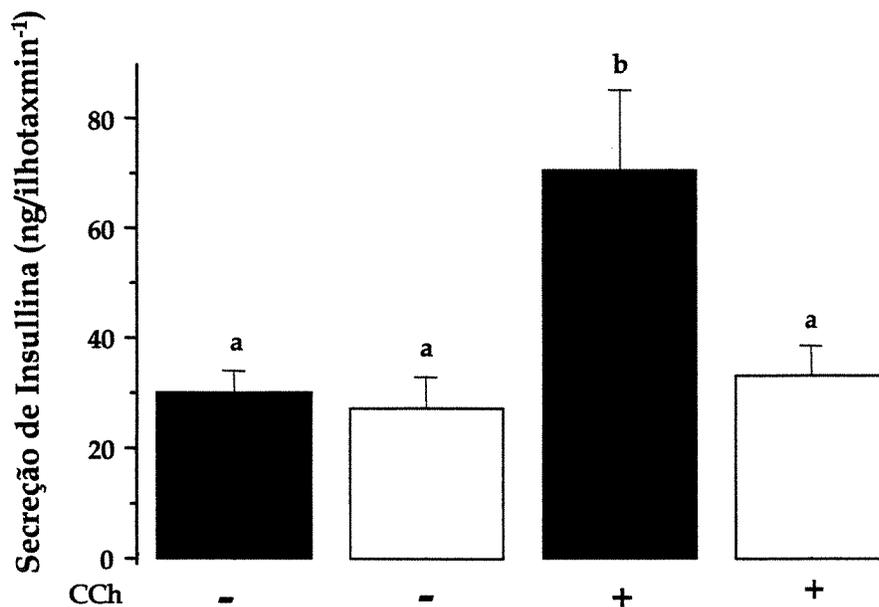


Fig. 6B - Cálculo das áreas sob a curva da fig. 6A (20-30 min. e 30-60 min.), que representa a secreção dinâmica de insulina quando estimulada com $100 \mu\text{M}$ de carbacol em presença de 2.8 mM de glicose + 20 mM de leucina em ilhotas isoladas de ratos Wistar machos Normoprotéicos (\blacksquare , $n=4$) e Hipoprotéicos (\square , $n=4$). Resultados expressos em média \pm se. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

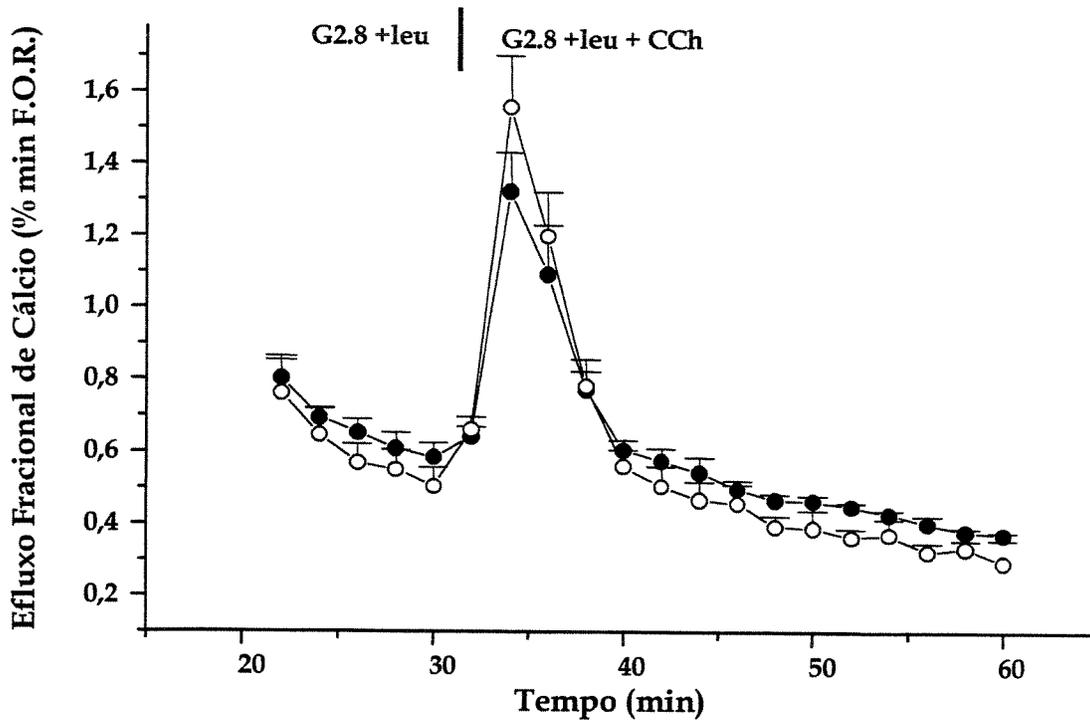


Fig. 7A - Efeito de 100 μ M de Carbacol sobre o efluxo de cálcio de ilhotas isoladas de ratos Wistar machos Normoprotéicos (●, n=4) e Hipoprotéicos (○, n=4) em presença de 2.8 mM de glicose + 20 mM de leucina . O referido isótopo foi incorporado após incubação das ilhotas em Krebs contendo 16.7 mM de glicose , ausência de Ca^{2+} e traços de ^{45}Ca . Em seguida as ilhotas foram perfundidas durante 60 min.

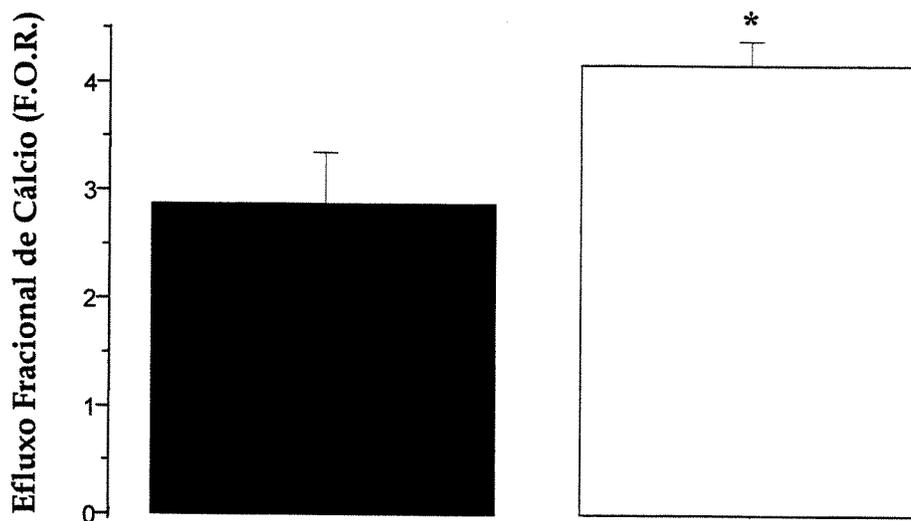


Fig. 7B - Cálculo das áreas sob os picos da curva (min. 30-50) derivado da fig.7A, em ilhotas isoladas de ratos Wistar machos Normoprotéicos (■, n=4) e Hipoprotéicos (□, n=4). As barras indicam a média \pm se. *Diferença significativa ($p < 0,05$).

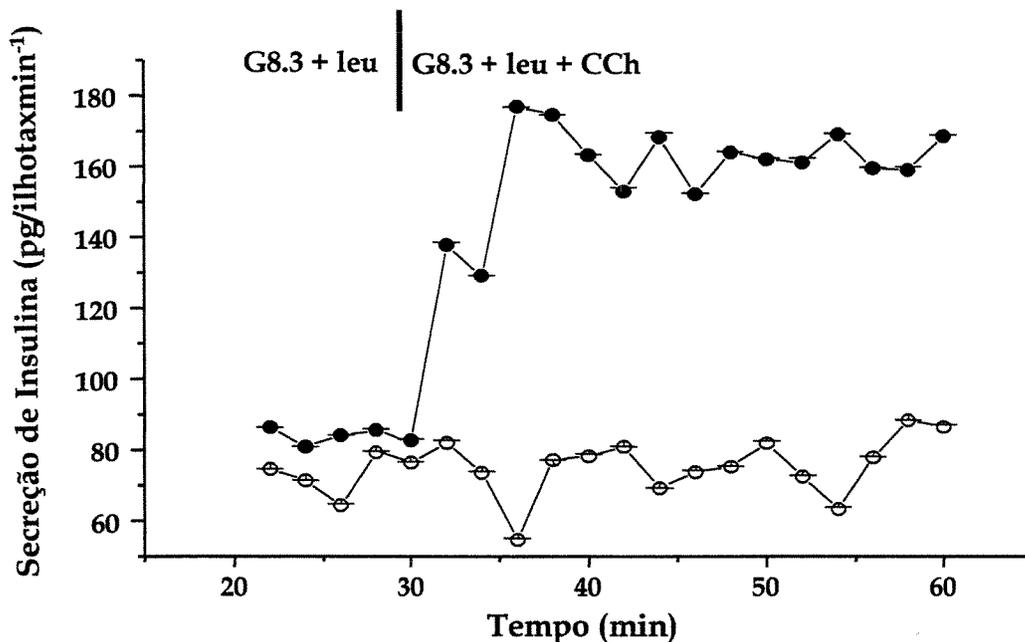


Fig. 8A - Efeito de 100 μ M de Carbacol sobre a secreção dinâmica de insulina, por ilhotas isoladas de ratos wistar machos NP (●, n=4) e LP (○, n=4). As ilhotas foram perfundidas com solução de Krebs contendo 8.3 mM de glicose + 20 mM de leucina (0-30 min.) e carbacol (30-60 min.). Os resultados foram expressos em média \pm se.

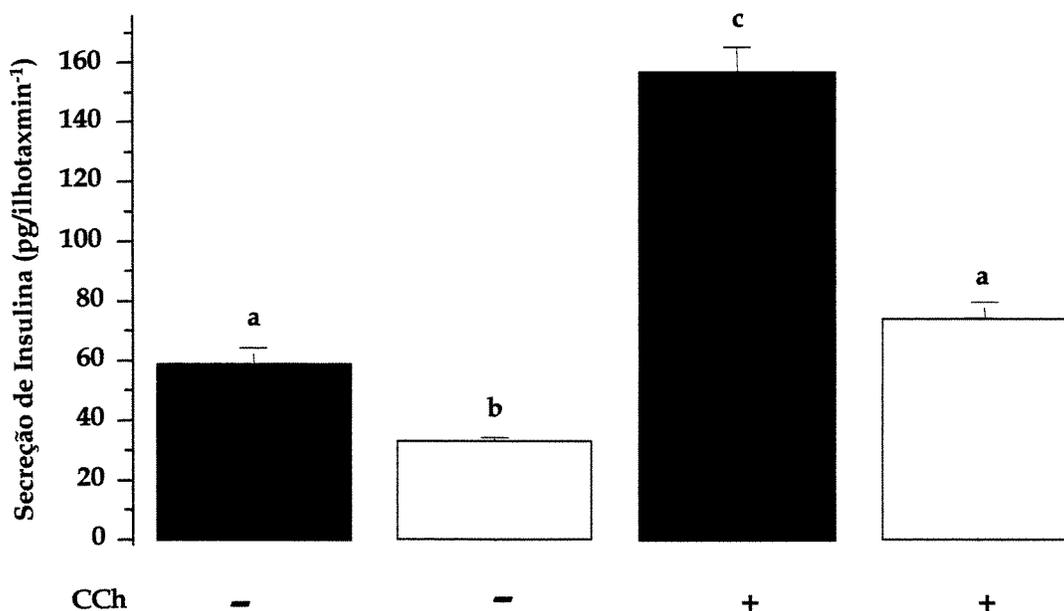


Fig. 8B - Cálculo das áreas sob a curva da fig. (20-30 min. e 30-60 min.), que representa a secreção dinâmica de insulina quando estimulada com 100 μ M de carbacol em presença de 8.3 mM de glicose + 20 mM de leucina em ilhotas isoladas de ratos Wistar machos NP (■, n=4) e LP (□, n=4). Resultados expressos em média \pm se. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

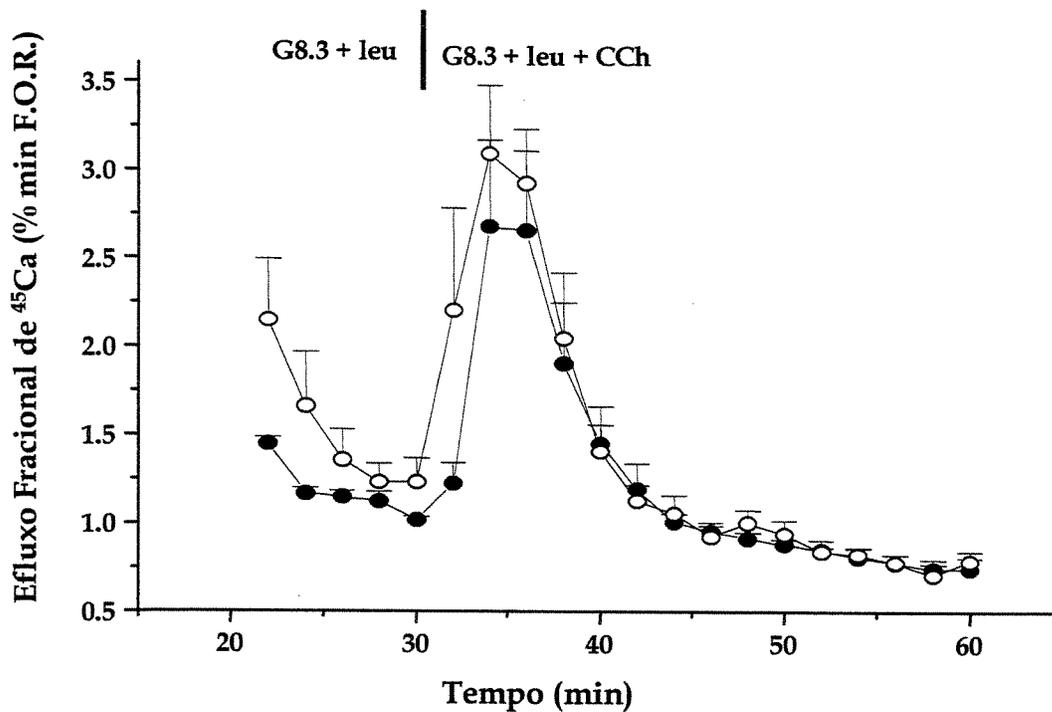


Fig. 9A - Efeito de 100 μ M de Carbacol sobre o efluxo de cálcio de ilhotas isoladas de ratos Wistar machos NP (\bullet , n=4) e LP (\circ , n=4) em presença de 8.3 mM de glicose + 20 mM de leucina. O referido isótopo foi incorporado após incubação das ilhotas em Krebs contendo 16.7 mM de glicose, ausência de Ca^{2+} e traços de ^{45}Ca . Em seguida as ilhotas foram perfundidas durante 60 min.

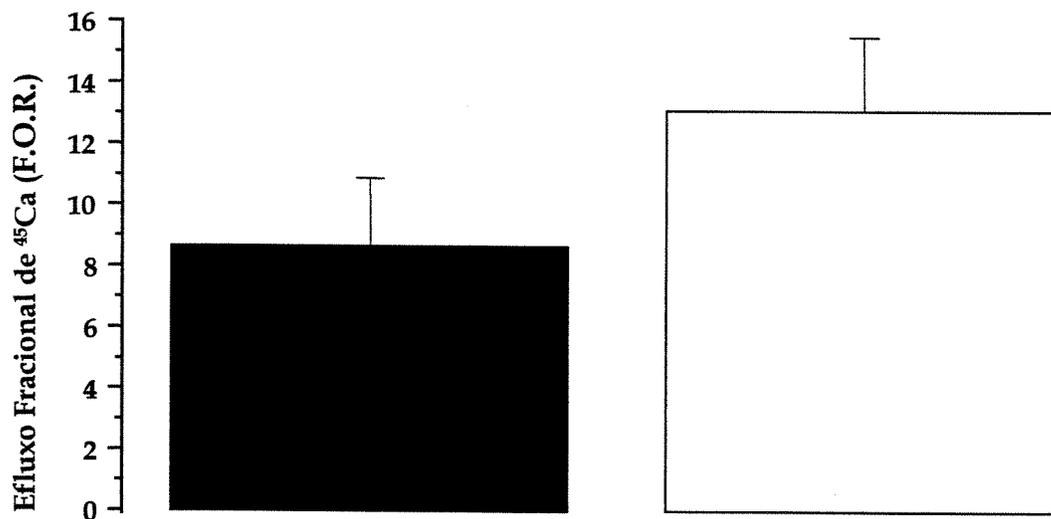


Fig. 9B - Cálculo das áreas sob os picos da curva (min. 30-50) derivado da fig.9A, ilhotas isoladas de ratos Wistar machos NP (\blacksquare , n=4) e LP (\square , n=4). As barras indicam a média \pm se. *Diferença significativa ($p < 0.05$).

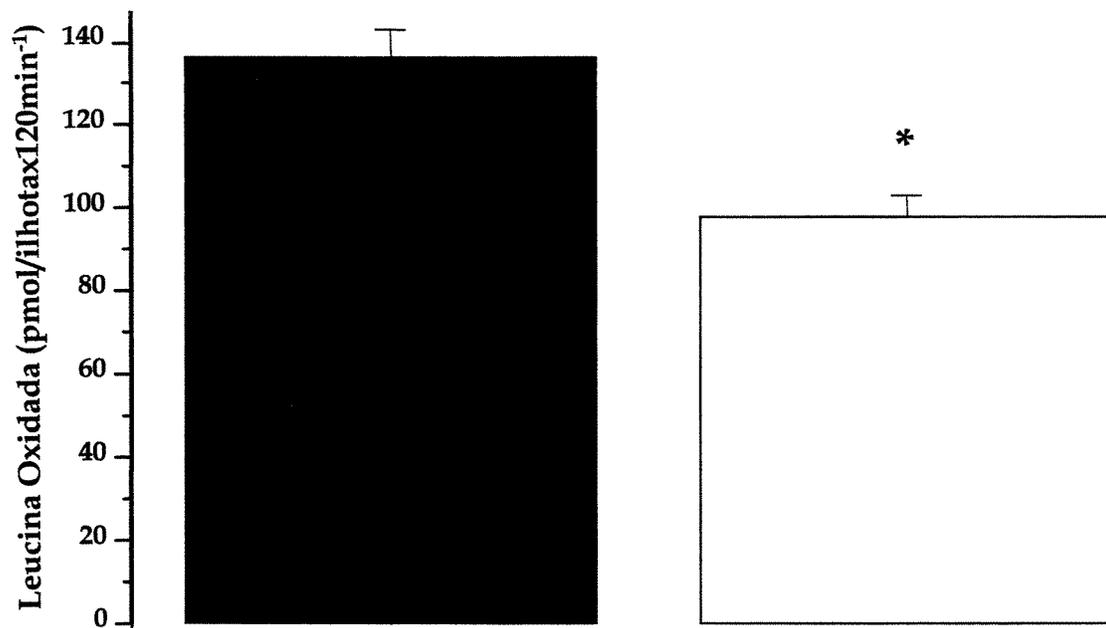


Fig. 10 - Oxidação de leucina em presença de 2.8 mM de glicose e 20 mM de leucina e traços de ¹⁴C leucina em ilhotas provenientes de ratos NP (■, n=11) e LP (□, n=16). Resultados expressos em média ± se. *Diferença significativa p<0,05.

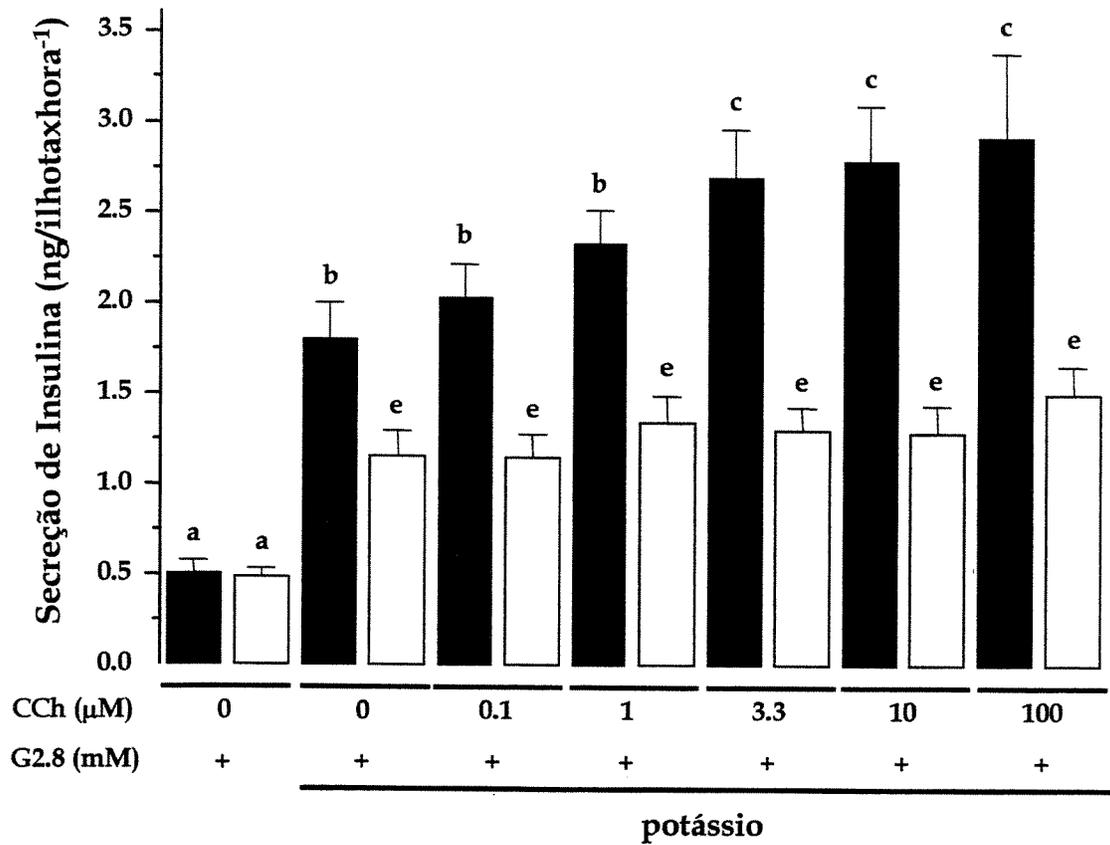


Fig. 11 - Efeito da concentração crescente de Carbacol (0.1 a 100 μM) sobre a secreção estática de insulina em ilhotas de ratos Wistar machos Normoprotéicos (■, n=24) e Hipoprotéicos (□, n=24) incubadas por 1 hora em solução de Krebs contendo 2.5 mM de cálcio, 2.8 mM de glicose e 40 mM de potássio. As barras indicam a média \pm se. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

insulina 1,56 vezes, em relação às ilhotas LP, essa tendência de aumento permaneceu quando acrescentamos CCh em diferentes concentrações 0,1 μ M (1,78 vezes), 1 μ M (1,73) vezes), 3,3 μ M (2,06 vezes), 10 μ M (2,17 vezes) e 100 μ M (1,95 vezes), respectivamente ($p < 0,05$). A EC_{50} dos animais NP foi de $0,98 \pm 0,08 \mu\text{M}$ e a do LP foi de $8,47 \pm 0,1 \mu\text{M}$. O grupo controle potencializou a secreção de insulina em presença de CCh a partir de 3.3 μM do agonista colinérgico, não apresentando mais diferenças significativas com o incremento na concentração deste agente. Já nas ilhotas de animais LP este padrão de resposta desapareceu em todas concentrações de CCh utilizadas.

6.5 - Potencializadores da Secreção de Insulina em Associação com Leucina

Com o objetivo de verificar a participação da via glicolítica em associação com leucina avaliamos na **Fig. 12** o efeito de 15 mM de gliceraldeído (Gli) em presença de 10 mM de leucina sobre a secreção estática de insulina em ilhotas de animais NP e LP incubadas durante 90 min em presença de 2,8 mM de glicose. A secreção de insulina, em valores absolutos, foi significativamente maior nas ilhotas provenientes de animais NP quando comparadas às ilhotas do grupo LP no meio onde continha somente 2,8 mM de glicose. Quando adicionamos 10 mM de leucina houve um aumento da secreção de insulina nos dois grupos de ilhotas, sendo que o maior aumento foi no grupo de ilhotas NP (1.5 vezes). Na adição de 15 mM de Gli houve aumento da secreção de insulina nos dois grupos de ilhotas (NP e LP), porém o aumento da secreção de insulina foi de 1.43 vezes maior quando comparado ao grupo de ilhotas LP. A associação de Gli e leucina também aumentou a secreção de insulina no grupo NP mas não no grupo LP. O aumento da secreção no grupo NP foi 1.49 vezes maior quando comparado ao grupo LP.

Com o intuito de avaliar se a associação de leucina com outros substratos poderia corrigir a redução da secreção apresentada por este modelo, utilizamos na **Fig. 13**, 15 mM de cetioisocaproato (KIC) em associação com 10 mM de leucina sobre a secreção estática de insulina em ilhotas de animais NP e LP incubadas durante 90 min em presença de 2,8 mM de glicose. A secreção de insulina, em valores absolutos, foi significativamente maior nas ilhotas provenientes de animais NP quando comparadas às ilhotas do grupo LP no meio onde continha somente 2,8 mM de glicose. Quando adicionamos 10 mM de leucina houve um aumento da secreção de insulina nos dois grupos de ilhotas, sendo que o maior

aumento foi no grupo de ilhotas NP (1.51 vezes). Na adição de 15 mM de KIC houve aumento da secreção de insulina nos dois grupos de ilhotas, sendo mais significativo no grupo NP e de 1.44 vezes maior quando comparado ao grupo de ilhotas LP. Já a associação de KIC e leucina provocou aumento da secreção de insulina de mesma magnitude, de quando a incubação foi feita com KIC sozinho, nos dois grupos de ilhotas estudados. Porém quando se compara o valor absoluto de secreção de insulina, notamos que o grupo LP apresentou valores significativamente menores quando comparados com as ilhotas NP. O aumento da secreção no grupo NP foi 1.74 vezes maior quando comparado ao grupo LP ($p < 0,05$).

Para leucina exercer seu efeito ela precisa ser metabolizada gerando ATP, este metabólito pode bloquear os canais de potássio e gerar despolarização celular, além disso, poderá também sofrer clivagem e gerar outros produtos (AMPc) que poderá participar do processo de secreção. Baseado neste enfoque utilizamos na Fig. 14, 1 mM de isometilbutilxantina (IBMX), que aumenta os níveis celulares de AMPc, em associação com 10 mM de leucina sobre a secreção estática de insulina em ilhotas de animais NP e LP incubadas durante 90 min em presença de 2,8 mM de glicose. A secreção de insulina, em valores absolutos, foi significativamente maior nas ilhotas provenientes de animais NP quando comparadas às ilhotas do grupo LP no meio onde continha somente 2,8 mM de glicose. Quando adicionamos 10 mM de leucina houve um aumento da secreção de insulina nos dois grupos de ilhotas, sendo que o maior aumento foi no grupo de ilhotas NP (1,51 vezes). A secreção de insulina com 1 mM de IBMX foi significativamente maior no grupo de ilhotas NP quando comparado com o grupo LP, com um aumento de 1,49 vezes. A associação de IBMX com leucina aumentou de forma significativa a secreção de insulina no grupo NP tanto quanto no grupo LP. O aumento da secreção no grupo NP foi 1.3 vezes maior quando comparado ao grupo LP. Porém os dois grupos de ilhotas foram hábeis em aumentar a secreção em resposta ao aumento de AMPc induzido por esta substância.

Outro ponto importante para o processo secretório é o envolvimento de proteínas como a PKC, e para testar sua atuação na presença de leucina nos utilizamos na Fig. 15 o efeito de 100 nM de Éster de Forbol (PMA), ativador da PKC, em associação com 10 mM de leucina sobre a secreção estática de insulina em ilhotas de animais NP e LP incubadas durante 90 min em presença de 2,8 mM de glicose. A secreção de insulina, em valores

absolutos, foi significativamente maior nas ilhotas provenientes de animais NP quando comparadas às ilhotas do grupo LP no meio onde continha somente 2,8 mM de glicose. Quando adicionamos 10 mM de leucina houve um aumento da secreção de insulina nos dois grupos de ilhotas, sendo que o maior aumento foi no grupo de ilhotas NP (1.49 vezes). Com a adição de 100 nM de PMA houve aumento da secreção de insulina somente no grupo de ilhotas NP quando comparado ao grupo LP. Esse aumento na secreção de insulina do grupo NP foi 1.39 vezes maior. A associação de PMA e leucina aumentou significativamente a secreção de insulina no grupo NP mas não no grupo LP. O aumento da secreção no grupo NP foi 3.61 vezes maior quando comparado ao grupo LP. PMA não conseguiu potencializar a secreção de insulina nas ilhotas LP tanto sozinho quanto na presença de leucina, isto pode indicar que o processo de desnutrição a que foram submetidas essas ilhotas provocou comprometimento desta proteína chave para o processo secretório.

6.6 - Secreção de Insulina em Ilhotas de Animais Recuperados (Rc)

Após análise dos resultados anteriores, uma questão que se julga necessária para compreendermos nossos estudos é: A recuperação nutricional poderia melhorar a resposta a este aminoácido? .

Baseado nesta questão avaliamos na Fig. 16A o efeito de 100 μ M agonista muscarínico CCh e de 20 mM de leucina, sobre a secreção estática de insulina em ilhotas isoladas de animais NP, LP e Rc incubadas durante 90 min. em presença de 2.8 mM de glicose. A secreção de insulina em valores absolutos foi significativamente maior nas ilhotas provenientes dos animais NP, quando comparadas às ilhotas isoladas dos animais LP e Rc. Em condições basais (G 2.8 mM) a secreção de insulina das ilhotas NP se alterou em relação à secreção de insulina das ilhotas proveniente dos animais LP e Rc, 1.71 e 1.32 vezes, respectivamente. Com adição de 20 mM de leucina, foi observada uma diferença entre o grupo de animais LP (3.23 vezes). Porém observa-se uma recuperação importante da resposta secretória em ilhotas do grupo Rc. A diferença foi visível entre os três grupos de animais NP, LP e Rc quando se acrescentou CCh na concentração de 100 μ M (2.64 e 1.96 vezes respectivamente). Os valores absolutos de secreção de insulina com estímulo colinérgico (CCh) em associação com leucina foram mais elevados em ilhotas provenientes

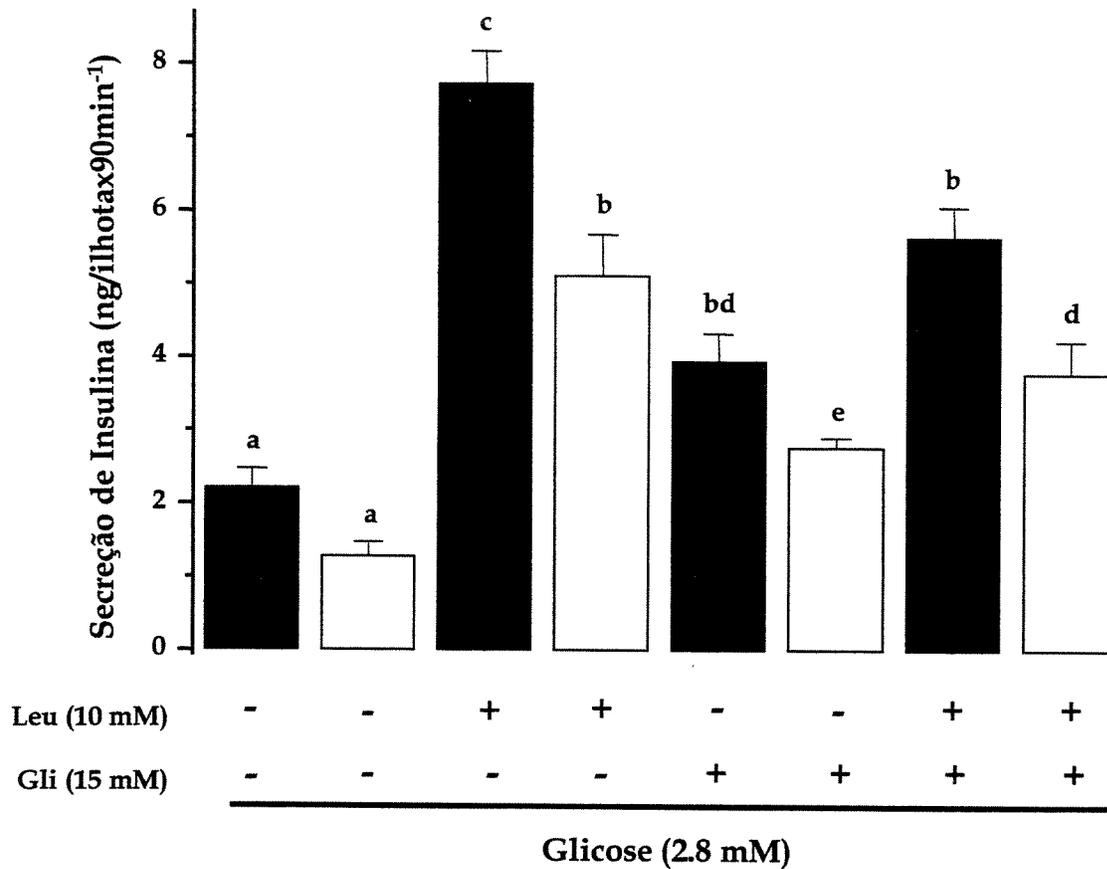


Fig. 12 - Efeito de 15 mM de Gliceraldeído (Gli) em presença de 10 mM de leucina sobre a secreção de insulina em ilhotas provenientes de ratos NP (■, n=12) e LP (□, n=12). A incubação foi feita em solução de Krebs contendo 2,5 mM de Ca²⁺ e 2,8 mM de glicose durante 90 min. Resultados expressos em média ± se. Letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05).

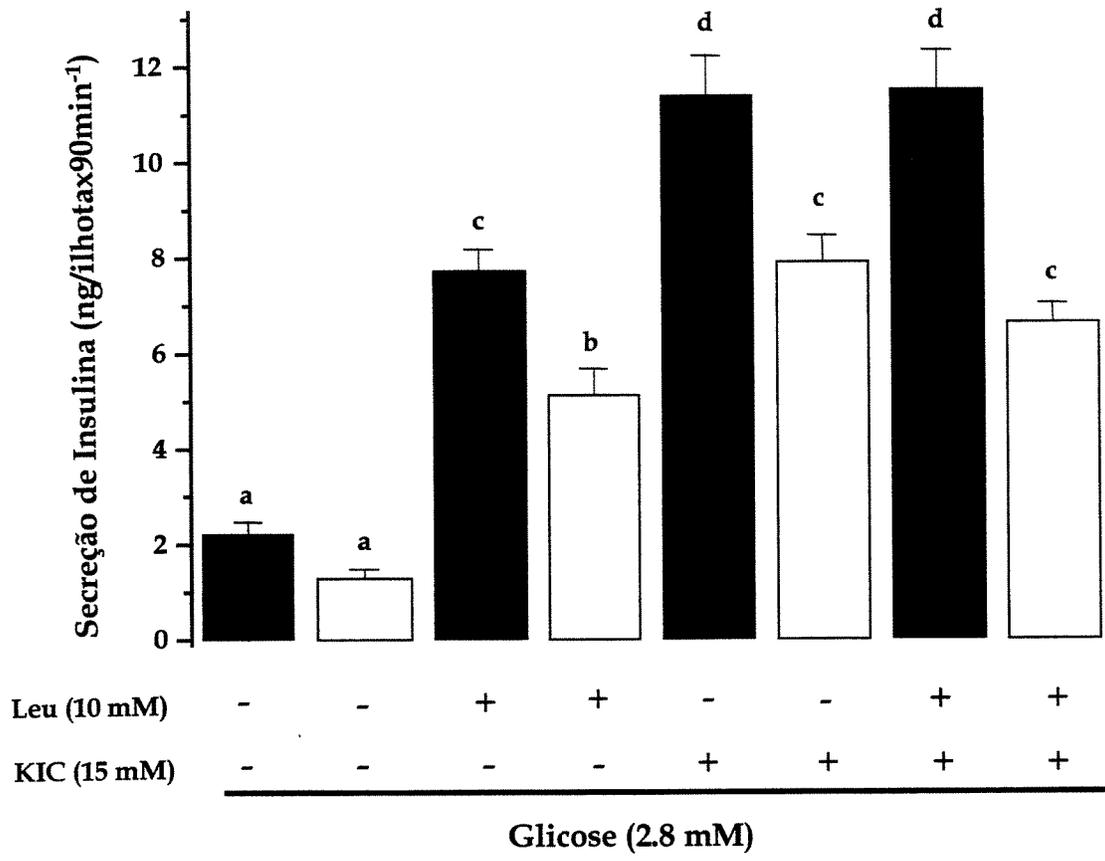


Fig. 13 - Efeito de 15 mM de Cetoisocaproato (KIC) em presença de 10 mM de leucina sobre a secreção de insulina em ilhotas provenientes de ratos normoprotéicos (■, n=12) e hipoprotéicos (□, n=12). A incubação foi feita em solução de Krebs contendo 2,5 mM de Ca²⁺ e 2,8 mM de glicose durante 90 min. Resultados expressos em média ± se. Letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05).

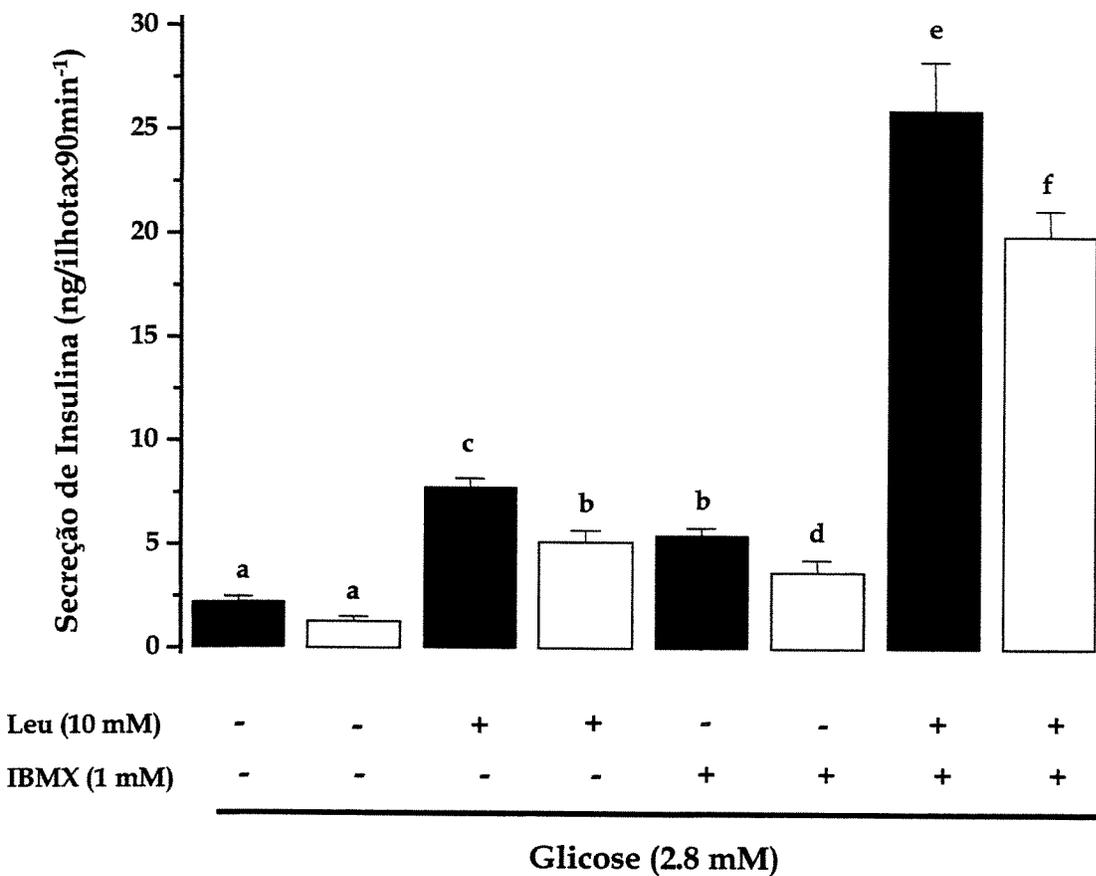


Fig. 14 - Efeito de 1 mM de isobutilmetilxantila (IBMX) em presença de 10 mM de leucina sobre a secreção de insulina em ilhotas provenientes de ratos NP (■, n=12) e LP (□, n=12). A incubação foi feita em solução de Krebs contendo 2,5 mM de Ca²⁺ e 2,8 mM de glicose durante 90 min. Resultados expressos em média ± se. Letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05).

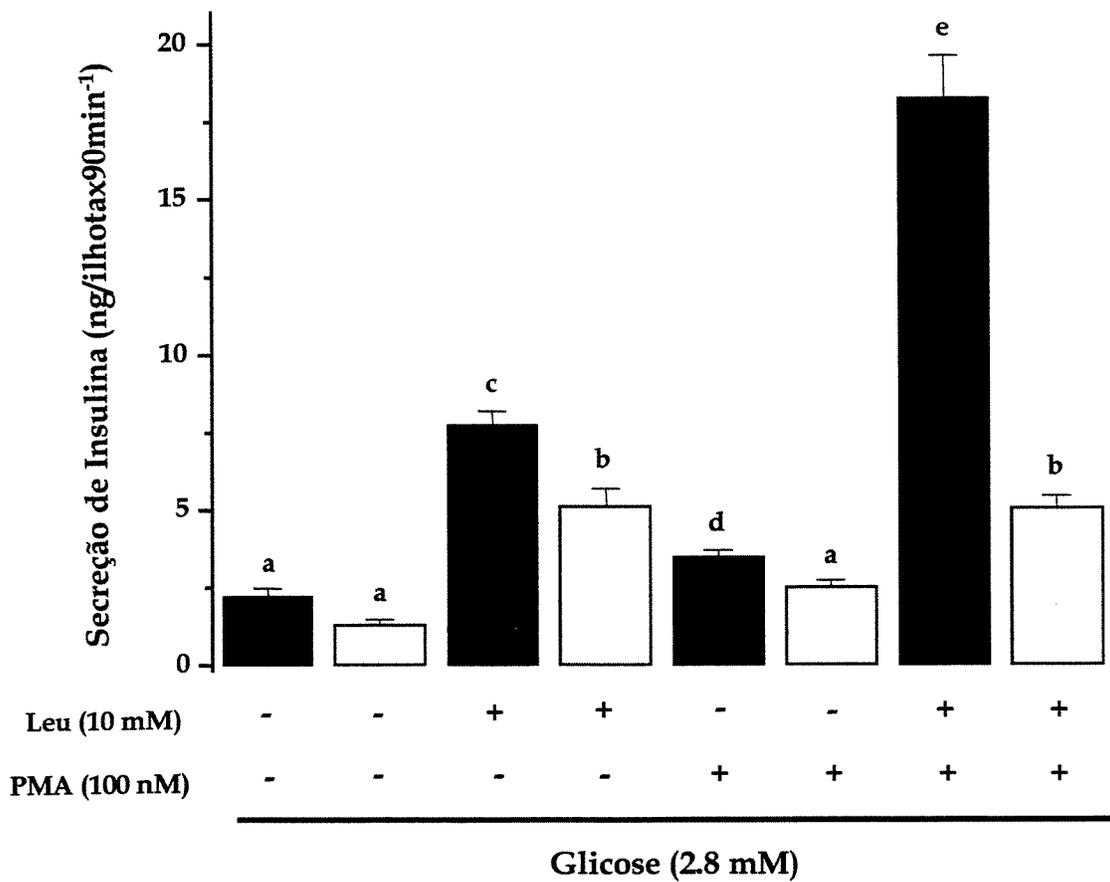


Fig. 15 - Efeito de 100 nM de éster de forbol (PMA) em presença de 10 mM de leucina sobre a secreção de insulina em ilhotas provenientes de ratos NP (■, n=12) e LP (□, n=12). A incubação foi feita em solução de Krebs contendo 2,5 mM de Ca²⁺ e 2,8 mM de glicose durante 90 min. Resultados expressos em média ± se. Letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05).

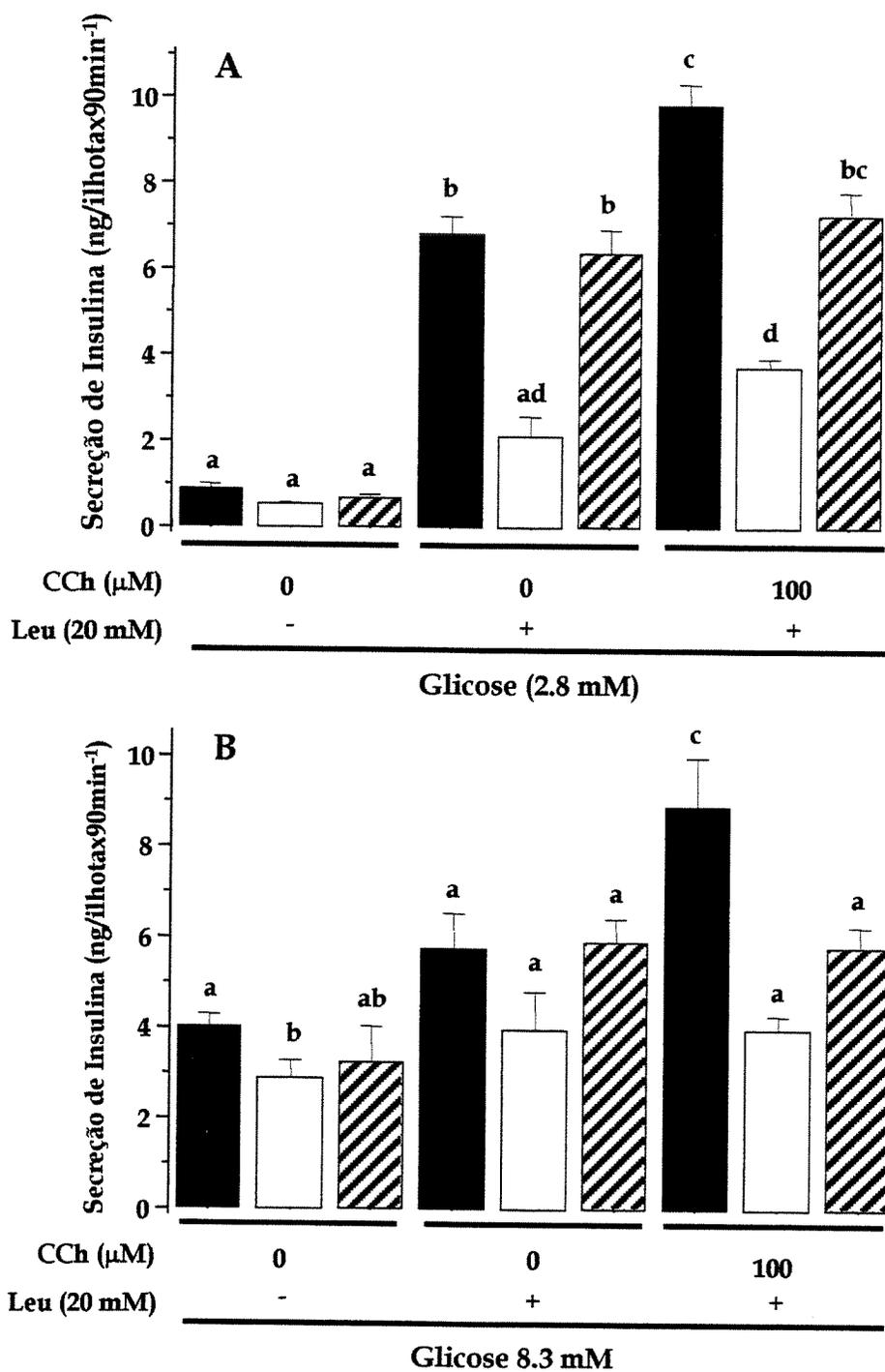


Fig. 16 - Efeito de 100 μM de CCh sobre secreção estática de insulina em ilhotas de ratos Wistar machos NP (■, n=6), LP (□, n=6) e Rc (▨, n=6) isoladas. As ilhotas foram perfundidas com solução de Krebs contendo 2.8 mM de glicose (**fig. 16A**) e 8.3 mM de glicose (**fig. 16B**) e 20 mM de leucina e CCh. Os resultados foram expressos em média ± se (n=6). Letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05).

de animais NP quando comparada as ilhotas de animais LP e Rc. A **Fig. 16B** representa o efeito de 100 μM agonista muscarínico CCh e de 20 mM de leucina, sobre a secreção estática de insulina em ilhotas isoladas de animais NP, LP e Rc incubadas durante 90 min. em presença de 8.3 mM de glicose. A secreção de insulina em valores absolutos foi significativamente maior nas ilhotas provenientes dos animais NP, quando comparadas às ilhotas isoladas dos animais LP e Rc. Em condições estimuladas (G 8.3) a secreção de insulina das ilhotas NP se alterou em relação à secreção de insulina das ilhotas proveniente dos animais LP mas não houve diferença em relação às ilhotas provenientes dos animais Rc. Com adição de 20 mM de leucina, foi observada uma diferença entre o grupo de animais LP (1.45 e vezes) mas não houve diferença entre os animais Rc. Indicando que a o processo de recuperação foi eficaz em melhorar a resposta secretória. Esta condição ocorreu em presença de glicose e de leucina. Este fato sugere que a recuperação induz melhoria na via de metabolização tanto da glicose como da leucina nestas ilhotas A diferença entre os três grupos foi observada quando se acrescentou CCh na concentração de 100 μM (2.23 e 1.46 vezes respectivamente).

6.7 - Proteínas Envolvidas na Síntese Protéica.

Uma vez que se observou mudança no padrão secretório quando ocorreu recuperação nutricional, fez-se necessário analisar proteínas que estivessem envolvidas com a síntese protéica e também com o metabolismo de leucina. Em função disso, avaliamos na **Fig. 17** a quantificação da proteína p70^{S6k-1} utilizando a técnica de Western Blotting, as quais revelaram a diminuição de 20 % aproximadamente, dessas proteínas, em ilhotas provenientes de animais LP. Concomitante a esse resultado, realizou-se a quantificação de mRNA para a mesma proteína (**Fig. 18**) onde se observou diminuição da expressão dessa proteína em ilhotas de animais submetidos à restrição protéica quando comparada às ilhotas controle ($p > 0,05$).

Na **Fig. 19** avaliou-se a quantidade da proteína Akt (PKB) pela técnica de Western Blotting e a densitometria das bandas revelou uma significante diminuição da proteína em ilhotas provenientes de animais desnutridos comparadas às ilhotas provenientes de animais controle. Mais resultados deverão ser realizados para confirmação dos dados obtidos.

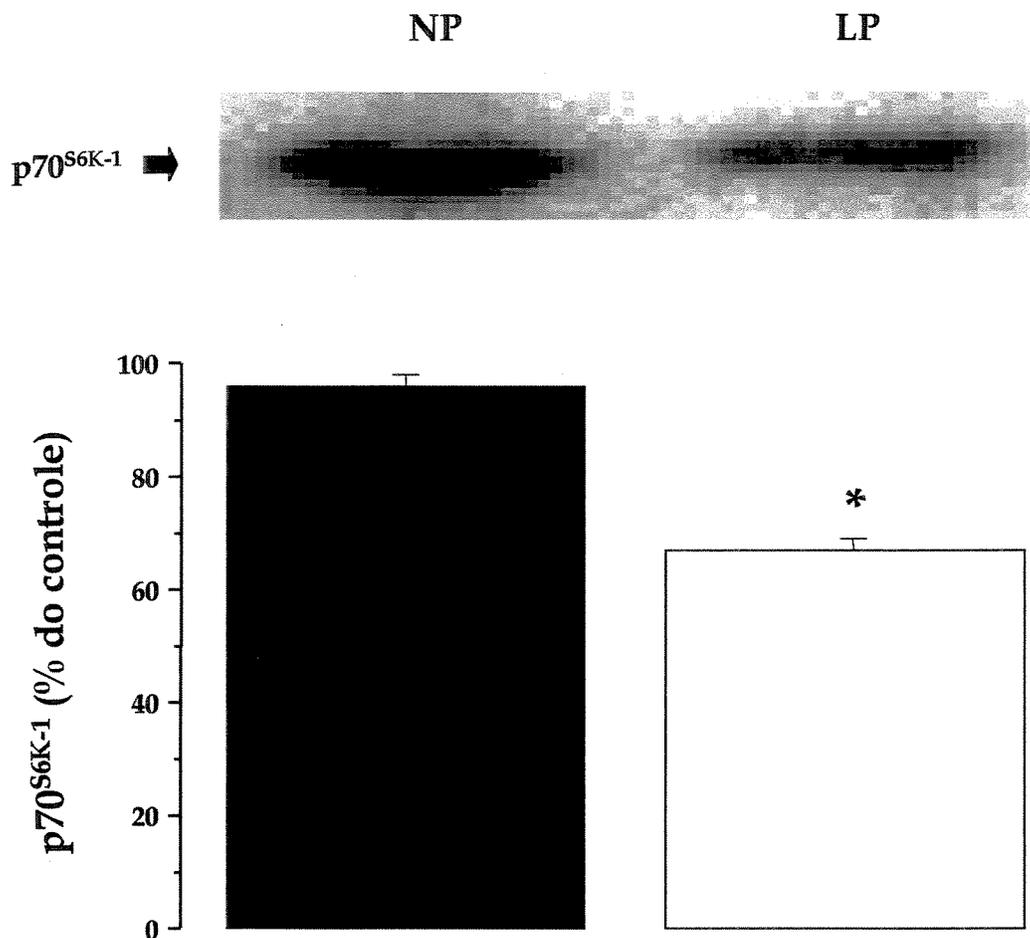


Fig. 17 - Quantificação da proteína p70^{S6K-1} por densitometria das bandas do gel de poliacrilamida em ilhotas isoladas de ratos wistar machos NP (■, n=4) e LP (□, n=4). Grupos de 500 ilhotas permaneceram em Hank's 2,8 mM de glicose, foram sonicadas e equivalentes quantidades de proteínas foram aplicadas para a obtenção da proteína. A quantidade de proteína do grupo LP foi expressa em porcentagem do NP. Os resultados foram expressos em média \pm se. * Diferença significativa ($p < 0,05$).

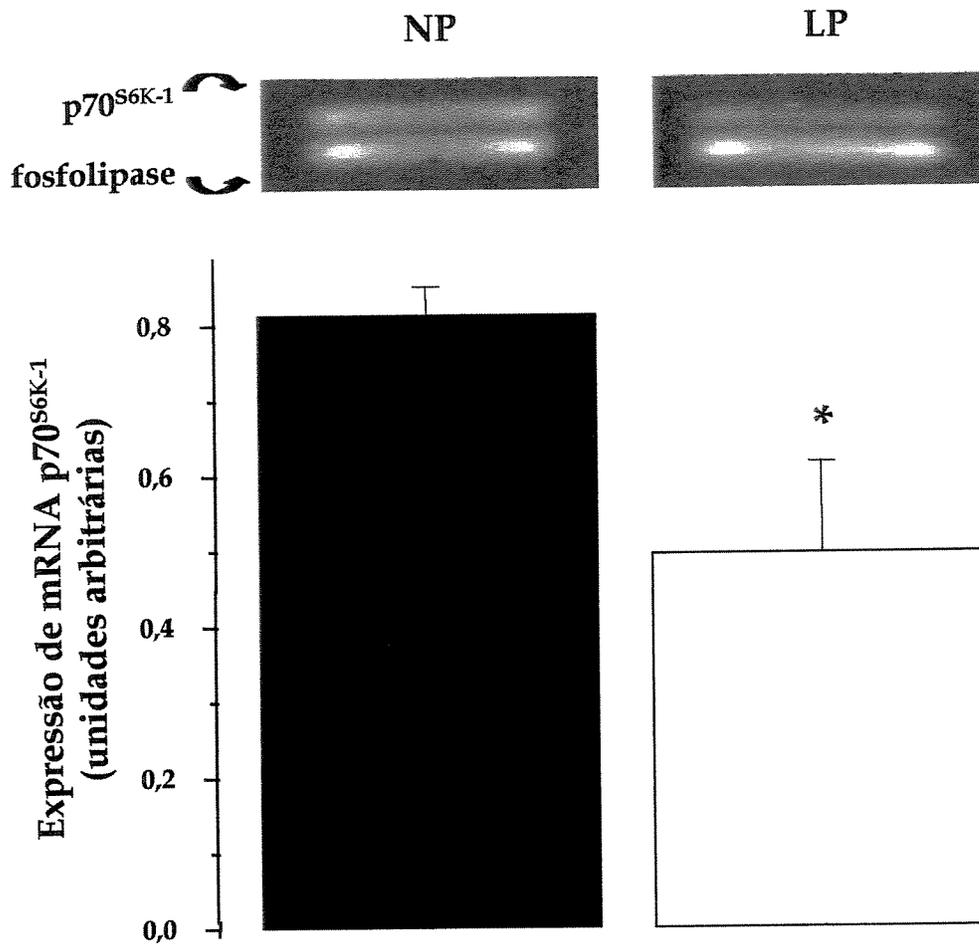


Fig. 18 - Expressão de mRNA da proteína p70^{S6K-1} em ilhotas isoladas de ratos wistar machos NP (■, n=4) e LP (□, n=3). Os níveis de mRNA foram semiquantificados através da técnica de RT-PCR. Os resultados foram expressos em média ± se. * Diferença significativa (p<0,05).

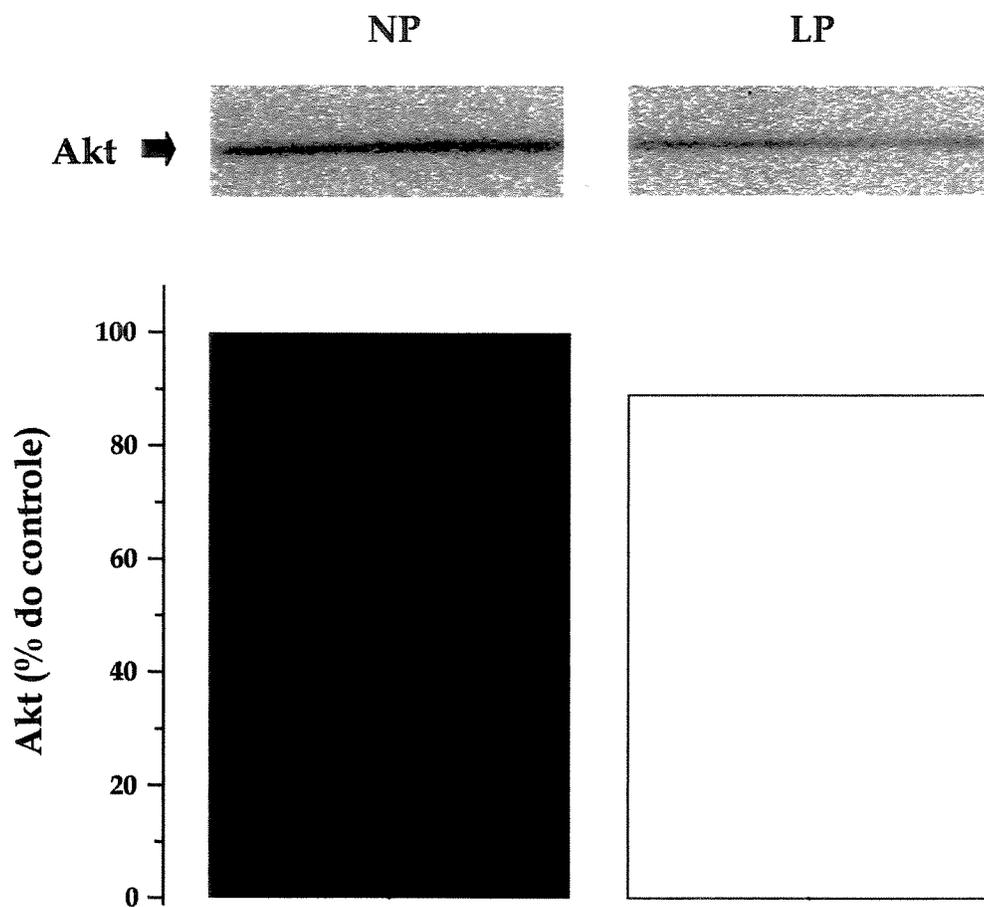


Fig. 19 - Quantificação da proteína Akt por densitometria das bandas do gel de poliácridamida em ilhotas isoladas de ratos wistar machos NP (■, n=1) e LP (□, n=1). Grupos de 500 ilhotas permaneceram em Hank's 2,5 mM de glicose, foram sonicadas e equivalentes quantidades de proteínas foram aplicadas para a obtenção da proteína. A quantidade de proteína do grupo LP foi expressa em porcentagem do NP.

Esse gel é o resultado de uma padronização da técnica. Em virtude disso, não fizemos a análise estatística adequada.

DISCUSSÃO

7 - DISCUSSÃO

7.1 - Modelo Experimental e Parâmetros Bioquímicos.

Ratos jovens, mantidos dos 34 aos 90 dias de idade com dieta contendo 6% de proteína apresentaram características observadas na desnutrição infantil e modelos experimentais de desnutrição (Weinkove et al, 1976; Heard et al, 1977; Chaves, 1985), tais como: baixo peso corporal, hipoalbuminemia, teores elevados de glicogênio, gordura hepática e ácidos graxos livres (Figs. 1A e 1B e Tab. I). A ausência de sinais de edema não surpreendeu, tendo em vista a dificuldade anteriormente relatada por outros pesquisadores em produzir edema em ratos (Widowson & McCance, 1957; Weinkove et al, 1976; Carpinelli, 1978). É difícil atribuir todas as diferenças observadas entre os ratos LP e NP exclusivamente a diferença no teor protéico da dieta. Embora ambas as dietas sejam isocalóricas, a dieta LP possui um alto teor de carboidratos (para que as calorias sejam mantidas com a retirada de proteína), o que deve ser levado em consideração.

Nossos resultados mostraram uma diminuição na concentração sérica de proteínas nos ratos submetidos à restrição protéica, comuns aos apresentados na literatura (Lunn & Austin, 1983; Wikes et al. 1996). Ratos mantidos por 7 semanas com dieta hipoprotéica a partir dos 21 dias apresentaram diminuição de 25% na concentração sérica de proteínas (Okitolonda et al., 1990; Clayessens et al., 1990).

Diminuição na insulina sérica em ratos LP também foi constatada em nossos experimentos (Tab. I) e pode ser explicada baseando-se em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso próprio grupo de pesquisa. Existe uma diminuição na massa de células beta, diminuição da metabolização de nutrientes (glicose e aminoácidos), alterações morfológicas e funcionais das ilhotas pancreáticas e/ou ainda uma diminuição na captação de cálcio pelas células B nas ilhotas proveniente de animais LP (Carneiro et al, 1995; Carneiro et al., 1996; Latorraca et al. 1998 a, b). Os animais LP apesar de apresentarem baixos níveis de insulina sérica no período alimentado, apresentaram uma glicemia normal quando comparados aos animais NP. É possível sugerir que os animais LP possuam uma maior sensibilidade ao hormônio insulina. Na literatura é possível encontrar trabalhos os quais suportam a idéia de que a desnutrição possa levar a uma maior sensibilidade ao referido hormônio (Cace et al. 1990; Latorraca et al. 1998a, b).

Houve também uma elevação na quantidade de AGLs sérico (**Tab. I**) nos ratos LP, isso vai de encontro a trabalhos registrados na literatura (**Kumar et al., 1972**). Uma possível explicação é que a insulina, um dos mais potentes inibidores da lipase sensível a hormônio do tecido adiposo, estando diminuída em animais LP estaria aumentando os níveis de ácidos graxos livres no sangue.

Glicogênio hepático mais elevado em ratos LP (**Tab. I**), também foi apresentado em nossos experimentos. Ratos desnutridos avaliados com 28 dias de vida apresentaram aumento do glicogênio hepático em 32% em relação aos controles (**Okitolonda et al., 1987; Clayessens et al., 1990**). Este aumento pode ser causado pela ineficácia do hormônio glucagon e a menor atividade de diversas enzimas, dentre elas a Glicose 6-fosfatase (**Galdino et al., 2000**).

Avaliamos a gordura hepática e observamos um aumento da mesma em ratos LP quando comparada a ratos NP (**Tab. I**). Estes dados podem ser confirmados por autores que encontraram os mesmos resultados em seus experimentos (**Alleyne et al., 1972; Kumar et al., 1972; Trindade et al., 1986**). Devido a menor secreção de insulina e conseqüente aumento de AGLs no sangue dos animais LP, estariam ocorrendo um maior fluxo destes AGLs para o fígado e, provavelmente, a chegada de lipídios no fígado seria maior que a saída, gerando assim, um acúmulo (**Lewis et al., 1964**). Outra hipótese é que o aumento de carboidratos na dieta hipoprotéica poderia estar sobrecarregando o fígado, pois parte destes carboidratos se depositaria como glicogênio e parte como lipídios. (**Trindade et al., 1986**). Pode, ainda, estar ocorrendo defeitos na liberação dos triglicerídeos hepáticos, devido à redução de proteínas transportadoras (lipoproteínas) cuja síntese seria também sensível à restrição protéica. (**Kumar et al., 1972**).

Os aminoácidos (AA) podem ter múltiplas funções, dentre elas agir como substrato para gliconeogênese. Podem ainda regular o turnover de proteínas e neurotransmissores e ainda exercer papel de transdutor de sinais intracelulares. Várias formas de desnutrição, traumas, febre, queimadura, podem alterar o perfil de aminoácidos no plasma bem como seu metabolismo nos tecidos (**Bruhat & Fafournoux, 2001**). Diante do papel importante destes nutrientes em organismos vivos, bem como em nosso modelo experimental no qual se baseia em restrição protéica, avaliamos na **fig 2A, e 2B**, os níveis plasmáticos de aminoácidos, nesse modelo experimental.

Em jejum (**fig. 2A**), observamos uma redução de Taur, Hypro, Thr, Asn, Val, Met, Ile, Phe, 3-Mhis e um aumento dos aminoácidos Asp, Ser, Homocys e Hylys detectados no plasma de animais LP quando comparamos aos animais NP. Já no estado alimentado (**fig. 2B**), houve uma redução dos aminoácidos Ser, Gln, Gly, Ala e b-Ala e um aumento de Ser, Gln, Gly, Ala, e b-Ala. Esta redução na quantidade de aminoácidos no plasma de animais LP, tanto em jejum como alimentado, permite concluir que a restrição protéica a que estes animais foram submetidos alterou seu perfil no plasma, mantendo assim, os sinais de desnutrição. Além disso, promoveu diversos ajustes nas funções fisiológicas deste organismo por modular a expressão de numerosos genes como observado por **Bruhat & Fafournoux, 2001**.

Entre as alterações no perfil de aminoácidos causadas pela desnutrição podemos destacar a redução da Taur, Leu, Ileu, Orn e Arg, tanto em jejum como no estado alimentado. Estes aminoácidos sabidamente participam do processo secretório tendo um papel primordial no mecanismo de secreção de insulina e no tamanho das ilhotas (**Hansen, 2001; Cherif et al., 1996; Fafournoux, Bruhat & Jousse, 2000**) Alguns destes aminoácidos são capazes, por si só, de desencadear o processo secretório de insulina e por isso foi objeto de estudo neste trabalho.

É importante salientar ainda o aumento da Ala que foi 2,9 vezes maior no grupo LP no estado alimentado, em relação ao grupo NP. Favoráveis a esta hipótese são os teores de alanina aumentado como destacamos aqui, sugerindo assim aumento de substrato para indução desta via nos animais LP, pois este aminoácido tem papel primordial no processo de neoglicogênese. Dados da literatura demonstraram que a desnutrição intra-uterina e também pós-uterina induz mudanças no conteúdo e atividade de enzimas como glicoquinase (GK) e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) no tecido hepático, enzimas fundamentais para glicólise e a gliconeogênese, respectivamente. Estas enzimas são fortemente reguladas pelos níveis séricos de insulina (**Desai et al, 1995**). No modelo experimental em estudo, nossos animais apresentam baixos níveis de insulina, e isto deve contribuir para o aumento da gliconeogênese.

Outro ponto de destaque é o perfil de proteínas solúveis (**fig. 3**) apresentado pelas células das ilhotas de Langerhans deste modelo experimental. Essas proteínas são fisiologicamente importantes para o processo de secreção de insulina. Nós verificamos por eletroforese, aumento e/ou diminuição dessas proteínas quando comparadas ao controle.

Quando avaliamos o total de proteínas nas ilhotas de Langerhans, notamos que não existe diferença significativa entre os dois grupos estudados. Porém o perfil eletroforético mostra que estão alteradas e poderá com isso ajudar a explicar os baixos níveis de secreção apresentada por esse modelo, tanto “in vivo” quanto “in vitro”.

7.2 - Secreção de Insulina em Presença de Leucina e CCh

Embora não necessária para regulação da secreção de insulina estimulada por nutrientes, a modulação neural exercida nas células beta é importante para assegurar uma perfeita homeostase da glicose. Numerosos estudos, usando diferentes modelos experimentais, têm demonstrado que acetilcolina aumenta a liberação de insulina agindo diretamente sobre os receptores muscarínicos, (subtipo M_3) nas células B (**Woods & Porte, 1974; Hermans, Schmeer & Henquin, 1987; Boschero et al, 1995; Bordin et al, 1995**). Esses receptores colinérgicos estão acoplados a uma PLC e tem seu efeito mediado por proteína G (**Henquin & Nenquin, 1988; Santos & Rojas, 1989; Verchere et al, 1991; Boschero et al, 1995**).

Em presença de concentrações fisiológicas de cálcio, a acetilcolina induz despolarização da membrana das células B, podendo resultar em um influxo de Na^+ e/ou Ca^{2+} na célula (**Cook, Crill & Porte, 1981; Henquin et al, 1988; Santos & Rojas, 1989; Hughes, Chalk & Ashcroft, 1990; Gilon & Henquin, 1993**). O Acúmulo intracelular de Na^+ pode mobilizar Ca^{2+} de estoques distintos daqueles sensíveis ao IP_3 . Finalmente, a geração de DAG como um produto do aumento do turnover do fosfatidil inositol, ativa a PKC aumentando assim a secreção de insulina (**Henquin et al, 1988; Prentki & Matischinsky, 1987**).

Esses nutrientes insulínotropicos estimulam a liberação de insulina aumentando o pool de cálcio no interior das células B pancreáticas (**Malaisse, Brisson & Baird, 1973; Sener et al, 1990**). Este acúmulo de cálcio pode ser o resultado da redução na saída do íon mediada pelo co-transporte Na^+/Ca^{2+} e a estimulação do influxo de cálcio através dos canais de cálcio sensíveis a voltagem (**Malaisse, Brisson & Baird, 1973; Meissner & Preissler, 1979; Herchuelz, Sener & Malaisse, 1980; Herchuelz, Couturier & Malaisse, 1980**).

Outros nutrientes podem alterar a permeabilidade ao K^+ e estimular a secreção de insulina (Floyd et al, 1963; Henquin & Meissner, 1981; Blacher et al, 1989). Leucina, como já demonstrado neste trabalho, aumenta a secreção de insulina “in vitro”. Esse aminoácido, através da alteração dos fluxos iônicos modifica o potencial de membrana das células B, influenciando assim a permeabilidade ao cálcio, (Henquin, 1980; Herchuelz et al, 1984; Blacher et al, 1989; Sener et al, 1990). O aminoácido leucina entra diretamente no ciclo de Krebs, e a exemplo da glicose precisa ser metabolizado para geração de ATP. Ele também estimula a secreção de insulina ativando alostericamente a enzima glutamato desidrogenase em mitocôndrias das células B. Ambos, acetil-CoA e α -cetoglutarato parecem ser necessários como substratos do ciclo de Krebs para ativar completamente a mitocôndria das células B (Xu et al, 2001).

A elevação da glicose e aminoácidos extracelulares em ilhotas pancreáticas isoladas determina a estimulação preferencial dos eventos oxidativos mitocondriais, incluindo aumento da atividade da lançadeira de glicerol fosfato, descarboxilação do piruvato e oxidação dos resíduos acetil no ciclo de Krebs em relação ao fluxo glicolítico (Sener & Malaisse, 1987; Malaisse e Sener, 1988; De Vos et al, 1991). A aceleração da lançadeira de glicerol fosfato pela glicose, deve-se em parte ao aumento do Ca^{2+} no citosol, induzindo ativação de uma FAD ligada a glicerofosfato desidrogenase mitocondrial (Sener & Malaisse, 1992; Malaisse, 1993). Portanto, as estimulações preferenciais dos eventos oxidativos estão prejudicadas em vários modelos de disfunção das células B caracterizados por uma alteração seletiva na resposta secretória induzida pela D-glicose e de outros nutrientes metabolizáveis (De Vos, Schuit & Malaisse, 1991; Malaisse & Sener, 1992; Cherif. Et al, 2001).

A estimulação dos eventos oxidativos é essencial para assegurar a função sensora-metabólica do pâncreas endócrino, uma vez que esses eventos fornecem a maior parte do ATP gerado pelo catabolismo da glicose e de aminoácidos (De Vos, Schuit & Malaisse, 1991; Malaisse & Sener, 1992; Newgard & McGarry, 1995). Dessa forma, avaliamos a secreção de insulina em presença de leucina e também associada ao CCh. A leucina foi capaz de produzir aumento na secreção de insulina nos dois grupos de ilhotas estudado na ausência de CCh, porém este aumento foi significativamente menor nas ilhotas provenientes de animais LP (fig. 7). Uma possível explicação para isto seria o comprometimento do metabolismo deste aminoácido, Cherif et al, 2001 observaram

redução da secreção de insulina quando as ilhotas foram expostas à leucina e seu derivado, o cetoisocaproato, em ilhotas de animais submetidos ao modelo experimental semelhante ao estudo deste trabalho.

Para testar o envolvimento do metabolismo da leucina nós avaliamos na **fig.10** a oxidação deste aminoácido em ilhotas de Langerhans do animal NP e LP. Nós encontramos que o metabolismo deste aminoácido está comprometido em ilhotas do grupo LP, isto explica, em parte, a pobre secreção de insulina observada neste modelo quando estimulado por esta substância. Quando utilizamos o metabólito primário da leucina o cetoisocaproato, nós observamos que os valores absolutos de secreção de insulina também foram menores nas ilhotas de animais LP, **Fig 13**. Resultados semelhantes foram também observados por **Cherif et al, 2001**, em ilhotas fetais de ratos que sofreram desnutrição intra-uterina. O comprometimento do metabolismo celular gerado pelo quadro de desnutrição a que foram submetidos estes animais prejudicou a resposta secretória de insulina em LP, para leucina e outros agentes insulínotropicos. Por outro lado, temos também evidências da literatura de que o aminoácido leucina, em concentrações fisiológicas, após sua oxidação em células B, induz sinais metabólicos que estimulam através da ativação da via de sinalização da mTOR, a fosforização de proteínas como a p70^{S6K} (quinase), proteínas responsáveis por aumentar a proliferação celular (**Xu, et al, 2001**). Portanto, a leucina serve como combustível mitocondrial e ativador alostérico da enzima glutamato desidrogenase (GDH) a qual converte glutamato a alfa cetogluturato, favorecendo a produção de ATP. Diante disso, o comprometimento do metabolismo de aminoácido apresentado em ilhotas LP (**fig.10**) em associação com a redução p70^{S6K} (quinase) pode contribuir para reduzir a função das células B e ajudar a explicar a pobre secreção apresentada neste modelo experimental.

Com bases nessas informações da literatura descrita acima sobre o metabolismo da leucina em células produtoras de insulina, e de que nosso modelo experimental consiste em redução da ingestão de proteína desde a fase de desmame até a fase adulta, nós investigamos algumas proteínas que possivelmente estão relacionadas com o envolvimento da leucina na regulação do metabolismo. Na **fig 18**, investigamos através da técnica PCR os níveis de mRNA em ilhotas de animais NP e LP da p70^{S6K}. Nossos resultados mostram uma significativa redução da quantidade de RNA mensageiro desta proteína neste modelo experimental. Além disso, verificamos também os níveis protéicos,

fig 17, em extrato dessas ilhotas e novamente observamos redução do conteúdo da mesma. Outra importante via que está indiretamente relacionada com a via de sinalização da mTOR é a via da AKT/PKB, cuja ativação em células B “*in vivo*” produz aumento no tamanho e função destas células (Bernal-Mizrachi, et al 2001). Pensando neste princípio, nós também avaliamos o conteúdo desta proteína em células B pancreáticas desses animais e os resultados preliminares indicam que os processos de restrição protéica que passaram estas ilhotas indicam uma tendência de redução nos níveis protéicos **fig.19**. A associação destes resultados relacionada com a redução do metabolismo do aminoácido leucina pesa para um comprometimento da regulação dos processos metabólicos que estão envolvidos na geração de ATP e como conseqüência podem explicar a redução de insulina encontrada em ilhotas LP quando estimulada por leucina ou seu metabólito primário cetoisocaproato.

Quando associamos leucina com CCh (**fig. 4 e 5**), as ilhotas controle potencializaram a secreção de maneira dose dependente. As ilhotas provenientes de animais LP não responderam ao CCh de maneira eficiente, somente a partir de 100 μ M que exibiu resposta a este agente potencializador. As ilhotas LP exibiram uma menor sensibilidade a este agente. Este resultado pode ser comprovado pelos achados da literatura que demonstraram que a mobilização de cálcio induzida por CCh é dependente dos eventos oxidativos mitocondriais (Schöfl et al, 2000) e nossos resultados já demonstrados na **Fig 10**, sugerem comprometimento do metabolismo de leucina, uma vez que esse secretagogo necessita ser oxidado para que possa promover seus efeitos. Como discutimos anteriormente, nosso modelo experimental produz redução nos níveis de leucina tanto em jejum como no estado alimentado e esta condição pode favorecer respostas adaptativas que permitam à mitocôndria das ilhotas destes animais responderem de maneira distinta. Isto pode ser evidenciado quando analisamos as figuras. **Fig 17, Fig 18 e Fig 19**, onde observamos redução tanto no mRNA com do conteúdo dessas proteínas, cujas funções esta relacionadas com o metabolismo celular e vias de crescimento, e pode explicar a pobre secreção de insulina apresentada pelas ilhotas LP.

A elevação da glicose em associação com leucina e CCh (**Fig. 5**) produziu resultado semelhante ao observado na **Fig. 4**, ou seja, as ilhotas LP foram novamente incapazes de secretar insulina semelhante ao grupo controle. Essa associação, provavelmente deve exigir mais do metabolismo oxidativo destas células.

Como discutida anteriormente a elevação dos níveis de glicose e aminoácidos extracelulares em ilhotas pancreáticas isoladas, determina a estimulação preferencial dos eventos oxidativos mitocondriais, incluindo aumento da atividade da lançadeira de glicerol fosfato, descarboxilação do piruvato e oxidação dos resíduos acetil no ciclo de Krebs. A aceleração da lançadeira de glicerofosfato pela glicose, deve-se em parte ao aumento do Ca^{2+} no citosol, induzindo ativação de uma FAD ligada a glicerofosfato desidrogenase mitocondrial

Em função dessas informações da literatura analisamos na **Figs. 6A e B**, a secreção dinâmica de insulina e também o efluxo de ^{45}Ca (**Fig. 7A e B**), em presença de leucina e CCh. As ilhotas LP novamente não responderam de maneira eficiente, porém apresentaram uma mobilização de cálcio significativamente maior quando comparada com as ilhotas NP. Recentemente foi demonstrado em modelo experimental semelhante ao nosso, uma redução da enzima glicerofosfato desidrogenase (**Rasschaert et al, 1995**), cujos níveis de cálcio são essenciais para seu funcionamento, como discutido anteriormente. Talvez a maior mobilização de cálcio encontrado na **Fig. 7A** esteja relacionada à redução desta enzima e do possível comprometimento do metabolismo do nutriente neste modelo experimental.

Semelhante ao observado na **Figs. 6 A e B**, elevamos a concentração de glicose de 2.8 para 8.3 mM em associação com leucina. Novamente as ilhotas LP foram incapazes de elevar sua secreção de maneira semelhante às ilhotas NP, **Figs. 8A e B**. Como fizemos tal associação (glicose e leucina) nossa esperança era de que o aumento da concentração de glicose melhorasse a resposta secretória, porém o que observamos foi um aumento da secreção de insulina em ilhotas de animais NP e nenhuma alteração na secreção das ilhotas LP. O efluxo de cálcio nessa condição não se alterou, sugerindo com isso que o aumento na concentração de glicose não foi capaz de reproduzir o aumento do efluxo observado na **Fig. 9**, em ilhotas LP. Isto indica que essas ilhotas já atingem a elevação máxima deste íon com a concentração sublimiáres de glicose e supralimiar de leucina em associação com CCh. Com o efluxo semelhante com mostra a **Fig 8**, deveríamos observar comportamento secretório semelhante, porém o que obtivemos foi aumento da secreção somente em ilhotas NP. Portanto, a resposta secretória deficiente apresentada neste modelo parece ser complexa e depende de um conjunto de variáveis, entre elas, dos níveis de cálcio e do conteúdo de proteínas que participam do processo de acoplamento/estímulo e secreção.

A via glicolítica tem um papel primordial e exerce um controle fino no processo secretório estimulado por glicose. Com o intuito de verificar a participação desta via no processo de acoplamento estímulo/secreção em associação com leucina, avaliamos na **Fig. 12** a resposta secretória ao gliceraldeído na ausência ou na presença deste aminoácido. Este metabólito isolado ou em associação a leucina foi eficaz em produzir aumento nos dois grupos de ilhotas estudadas, porém este aumento foi sempre maior nas ilhotas NP. Agora a magnitude de aumento foi semelhante nos dois grupos de ilhotas. Isto sugere que o controle ou o ATP disponível produzido neste compartimento celular em associação ao da leucina, foi capaz de promover o mesmo grau de aumento na secreção de insulina.

Também avaliamos a produção de AMPc (utilizando IBMX como estímulo) em associação com leucina para verificar comprometimento de proteínas envolvidas nestas vias, através da avaliação da capacidade secretória de insulina. Nos encontramos, **Fig 14** que o IBMX sozinho ou em associação com leucina induziu aumento nas ilhotas proveniente do grupo NP e LP, mas os valores absolutos de secreção foram maiores nas ilhotas NP. Porém o delta de secreção parece ser semelhante nos dois grupos estudados. Isto indica que as ilhotas LP conseguem responder bem a produção de AMPc e como consequência conseguem ativar as proteínas envolvidas nesta via de potencialização da secreção.

Quando utilizamos um ativador da PKC, (PMA) em associação com leucina este ativador produziu alterações significativas na secreção de insulina das ilhotas LP. Houve redução da secreção quando utilizamos somente o PMA ou em associação com a leucina, seja em valores absolutos ou quando se avalia o delta secretório (**fig. 15**). Estes dados estão de acordo com resultados anteriores onde se demonstrou que os níveis de mRNA e do conteúdo de proteína da PKC estão reduzido em ilhotas de animais LP (**Ferreira et al, 2003**). A redução desta proteína em associação com a redução apresentada em outras proteínas chaves no metabolismo celular, demonstrada aqui neste trabalho, **Fig, 17, 18 e 19**, poderiam explicar a pobre secreção apresentada por este modelo quando o estímulo foi a leucina, e em parte, pode também justificar algum resultado encontrado quando o estímulo foi potássio (**Fig 11**) e por fim potencializado com carbacol.

Nós também verificamos a possibilidade de que a recuperação nutricional pudesse reverter o quando já instalado. Isto se justifica, pois o processo de desnutrição afetou o nível sérico de aminoácidos, metabolismo das células B à leucina e o conteúdo de

proteínas fundamentais para a manutenção do metabolismo celular do tecido pancreático endócrino. Após recuperação de 20 dias a resposta para leucina foi restaurada quando em presença de baixa glicose, porém quando fizemos a associação entre leucina e carbacol, não foi possível obter a reversão total da secreção **Fig 16A**. Quando as ilhotas LP precisam potencializar a resposta secretória, essas ilhotas não conseguem responder de maneira semelhante às ilhotas NP, isto sugere alterações no conteúdo de proteínas chave no processo secretório. Explicações prováveis para isto são nossas observações em que os níveis de PKC estão reduzidos neste modelo em estudo, **(Ferreira, et al, 2003)**. Além disso, observamos também **(Fig 15)** a incapacidade destas ilhotas em potencializar a secreção quando utilizamos um ativador da PKC em associação com leucina.

Quando aumentamos a concentração de glicose no meio de incubação em associação com leucina em ilhotas provenientes de animais que foram recuperados nutricionalmente, **Fig 16B**, verificamos que as ilhotas LP foram eficientes em responder a estes estímulos de maneira semelhante ao controle, mas novamente quando adicionamos CCh no meio de incubação as ilhotas LP não foram capazes de potencializar a secreção como as ilhotas NP, mais uma vez estes resultados favorecem a hipótese de redução do conteúdo de proteínas estratégicas para a fisiologia da célula B.

Nossa principal proposta neste trabalho foi estudar a modulação colinérgica em presença de leucina. A justificativa para isso está, em primeiro plano relacionado aos baixos níveis séricos desse aminoácido encontrado neste modelo experimental **(fig.2A e B)**. Outro ponto de destaque foi o mecanismo de ação, que para exercer seu papel insulínico precisa ser metabolizado. Com o intuito de melhor avaliar a participação deste aminoácido, utilizamos alta concentração de potássio o qual sabidamente induz secreção de insulina somente por despolarizar a membrana das células B. Com este protocolo poderíamos avaliar a ação do CCh independente do metabolismo celular, constituindo assim, para entender os mecanismos pelo qual a células B de animais LP não respondem com eficiência ao aminoácido estudado, uma vez que somente exerce seu efeito quando é metabolizado.

Alta concentração potássio foi capaz de aumentar a secreção de insulina nos dois grupos de ilhotas na ausência de CCh, porém este aumento foi significativamente menor nas ilhotas provenientes de animais LP, **fig. 11**. Uma possibilidade é que este agente não consiga induzir despolarização e seja capaz de mobilizar cálcio e sensibilizar a maquinaria

enzimática para secretar insulina com eficiência. Quando introduzimos o CCh a resposta das ilhotas NP ocorreu de maneira dose-dependente, enquanto que em ilhotas LP não produziu efeito significativo, semelhante o ocorrido quando estimulado com aminoácido. Esta análise permitiu caracterizar que as ilhotas LP são menos sensíveis ao CCh, que as ilhotas NP, diante dos estímulos utilizados, seja usando um agente metabolizável ou que somente despolarize a membrana das células B.

De forma especulativa poderíamos inferir que as ilhotas LP não responderam porque o estímulo com potássio não foi suficiente para ativar todas as vias envolvidas no processo secretório. Nossos resultados sugerem que em ilhotas LP haja um comprometimento da despolarização ou que a cascata de eventos enzimáticos envolvidos na metabolização, despolarização e secreção de insulina foram afetados pelo processo de desnutrição.

Por fim, os resultados adquiridos com o uso de alta concentração de potássio e leucina associados com CCh, recuperação nutricional e expressão e quantificação de proteínas envolvidas com o metabolismo energético das ilhotas de Langerhans, confirmam que o período de restrição a que foram submetidos os animais LP conferiu mudanças no metabolismo bem como na despolarização celular das células B, como consequência houve um prejuízo na resposta secretória frente a estes estímulos. Também destacamos as enzimas envolvidas no processo de acoplamento estímulo/secreção de insulina, que foram afetadas por este processo, contribuindo para o comprometimento do mecanismo de secreção, explicando assim a pobre resposta secretória apresentada pelas ilhotas de animais submetidos à restrição protéica a estes agentes insulitrópicos aqui estudados.

CONCLUSÃO

8 - CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos, podemos concluir que período de restrição protéica a que esses animais foram submetidos alterou, em ilhotas de Langerhans, a mobilização de cálcio e a resposta secretória de insulina frente à leucina em presença de CCh. Essas alterações estão relacionadas ao comprometimento do metabolismo de leucina e ao processo de despolarização das células B neste modelo experimental. Podemos afirmar também que vias importantes no processo secretório como a glicólise e o ciclo de Krebs estão sendo afetados neste modelo animal, uma vez que a estimulação dessas vias não reverteu o quadro secretório em associação com leucina. A recuperação nutricional reverteu, em parte, a resposta secretória frente a estímulos como leucina. Por fim, a redução de proteínas envolvidas com a síntese protéica e a proliferação celular pode ajudar a explicar a redução da secreção de insulina apresentada neste modelo animal.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

9 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alleyne, G. A. O.; Trust, P. M.; Flores, H.; Robinson, H. . Glucose tolerance and insulin sensitivity in malnourished children. **Br. J. Nutr.**, **27**: 585-92.
- Arantes, V. C., Teixeira, V. P. A, Reis, M. A. B., Latorraca, M. Q., Leite, A. R., Carneiro, E. M., Yamada, A. T., Boschero, A. C. (2002) Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islet from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. **J. Nutrition** **132**: 3030-3035.
- Ashcroft, F. M., Harrison, D. E., Ashcroft, S. J. H. (1984) Glucose induces close of single potassium channels in isolated rat pancreatic B cells. **Nature** **312**: 446-448.
- Ashcroft, F.M. (1988) Adenosine triphosphate sensitive K⁺ channels. **A. Rev Neurosc** **11**: 97-118.
- Becker, D. J., Pimstone, B. L., Hansen, J. D. L., Hendricks, S. (1971) Insulin secretion in protein-calorie malnutrition. 1. Quantitative abnormalities and response to treatment. **Diabetes** **20**: 542-551.
- Blacher, F., Mourtada, A., Sener, A., Malaisse, W. J. (1989) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release uptake of metabolized and nonmetabolized cation amino acids by pancreatic islets. **Endocrinol** **24**: 134-141.
- Bailey, C.J. & Flatt, P.R. (1988) The enteroinsular axis in models of hyperinsulinaemic and hypoinsulinaemic diabetes. In **Frontiers in Diabetes Research: Lessons from Animal Diabetes**, vol. 2, pp.217-224 [E. Shafrir and A.E. Renold, editors]. Chichester: John Libbey.
- Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C. M., Permutt, M., A., (2001) Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB α induces striking hypertrophy, hyperplasia and hyperinsulinemia. **JCI** **108**: 1631-1638.
- Bordin, S., Boschero, A. C., Carneiro, E. M., Atwater, I. (1995) Ionic mechanisms involved in regulation of insulin secretion by muscarinic agonists. **J Memb Biol** **148**: 177-184.
- Boschero, A. C., Bordin, S., Herchuelz, A. Lebrun, P. (1990) Effects of glucose on ⁴⁵Ca outflow, cytosolic Ca²⁺ concentration and insulin release from freshly isolated and cultured adult rat islets. **Cell Calcium** **11**: 603-609.

- Boschero, A. C., Szpak-Glasman, M., Carneiro, E. M., Bordin, S., Paul, I., Rojas, E., Atwater, I. (1995). Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. **Am J Physiol** **268**: E336-42.
- Boschero, A. C.; Delatre, E. & Santos, M. L. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. **Anais XIII Cong. Soc. Bras. Fisiol. (Ribeirão Preto)**: 117.
- Boyd, A. E. III, Bryan, L. A., Bryan, J., Kunze, D. L., Moss, L., Nelson, D. A., Rajan, A. S., Raef, H., Xiang, H., Yaney, G. C. (1991) Sulfonylurea signal transduction. **Rec Prog Horm Res** **47**: 299-317.
- Brown, A. M., Birnbaumer, L. (1988) Direct G-protein gating of ion channels. **Am J Physiol** **254**: 401-410
- Bruhat, A., Fafournoux, P., Jousse, C. (2000). Amino acid regulation of gene expression. **Biochem J** **351**: 1-12.
- Bruhat, A., Fafournoux, P. (2001). Recent advances on molecular mechanisms involved in amino acid control of gene expression. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** **4**: 439-43.
- Carneiro, E. M. (1996) Participação dos íons Ca^{2+} e K^{+} no processo de acoplamento estímulo/secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos submetidos à dieta deficiente em proteína. **Tese de Doutorado**. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas.
- Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Gobatto, C. A., Boschero, A. C. (1995) Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and ^{45}Ca uptake by pancreatic rat islets. **J Nutr Biochem** **6**: 314-318.
- Carpinelli, A. R. (1978). Estudo da secreção de insulina e da homeostase glicêmica em ratos desnutridos. **Tese de Doutorado**. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, USP.
- Caterral, W. A. (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annu Rev Biochem** **64**: 493-531.
- Chaves, N. Nutrição básica e Aplicada. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 1985.
- Chay, T. R. (1987) The effects of inactivator of calcium channels by intracellular Ca^{2+} ions bursting pancreatic β -cells. **Cell Biophys** **11**: 77-90.

- Cherif, H., Reusens, B., Dahri, S., Remacle, C., Hoet, J. J. (1996). Stimulatory effects of taurine on insulin secretion by fetal rat islets cultured in vitro. **J Endocrinol** **151** (3): 501-6.
- Cherif, H., Reusens, B., Dahri, S. and Remacle, C. (2001). A protein-restricted diet during pregnancy alters in vitro insulin secretion from islets of fetal Wistar rats. **J Nutr** **131**: 1555-9.
- Claeyenssens, S., Lavoigne, A., Fresl-Ragot, M., Bois-Joyeux, B., Chanez, M & Peret, J. (1990) Metabolic changes in rats fed a low protein diet during post-weaning growth. **Metabolism**, v.39, p676-681.
- Crace, C. J. (1990). Protein-Energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. **Diab Metabol** **16**: 484-91.
- Cook, D. L., Crill, W. E., Porte, D. (1981) Glucose and acetylcholine have different effects on the pacemaker potential of pancreatic islet cells. **Diabetes** **30**: 558-561.
- Cook, D. L., Hales, C. N. (1984) Intracellular ATP directly blocks K⁺ channel in pancreatic beta cells. **Nature** **311**: 271 -273.
- Cook, G. C. (1967) Glucose tolerance after kwashiorkor. **Nature** **215**: 1295-1296.
- DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C., Ferrannini, E., (1992) Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. **Diabetes Care** **15**(3):318-68.
- Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, Kozma, S. C., Thomas, G. (2001) Mammalian TOR: A homeostatic ATP sensor. **Science** **294**: 1102-1105.
- De Vos, A., Schuit, F. C., Malaisse, W. J. (1991) Preferential stimulation by glucose of its oxidation relative to glycolysis in purified insulin-producing cells. **Biochem Internat** **24**: 1117-21.
- Desai, M., Crowther, N. J., Ozanne, S. E., Lucas, A., Hales, C. N. (1995). Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. **Biochem Soc Trans** **23**: 331-5.
- Diani, A. R., Peterson, T., Gilchrist, R. J. (1983) Islet innervation of nondiabetic and diabetic Chinese hamsters. I Acetylcholinesterase histochemistry and norepinefrine fluorescence. **J Neur Trans** **56**: 223-238.
- Doumas, B. T., Watson, W. A., Biggs, H. G. (1971). Albumin standards and measurements of serum albumin with bromocresol green. **Clin Chim Acta** **31**: 87-96.

- Flatt, P. R. (1996) Hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. In: *Textbook of Diabetes*, 2nd ed, pp.9.1-9.7 [J.C. Pickup and G. Williams, editors]. Oxford: Blackwell.
- Ferreira, F., Filiputti, E., Stoppiglia; F., Delghingaro-Augusto, V., Latorraca, M. Q., Toyama, M. H., Boschero, A. C., Carneiro, E. M. Decreased colinergic stimulation of insulin secretion by islet from rats fed a low protein diet is associated with reduced PKC α expression. Paper in press – **Journal Nutrition**.
- Floyd, J. C., Fajans, S. S., Knoff, R. F. Conn, J. W. (1963) Evidence that insulin release is the mechanism for experimentally-induced leucina hypoglicemia in man. **J Clin Invest** **42**: 1714-1719.
- Fredholm, B. B., Dunér-Engstrom, M., Fastbom, J., Hu, P. S., Der Ploeg, I. V. (1991) Role of G protein, cyclic AMP, and ion channel in the of transmitter release by adenosine. **Ann N Y Acad Sci** 276-288.
- Gagerman, E., Idahl, L. Å., Meissner, H. P., Täljidal, I. B. (1978) Insulin release, cGMP, cAMP, and membrane potential in acetylcholine-stimulated islets. **Am J Physiol** **235**: E493-E500.
- Galdino, R., Almeida, C. C. S., Luciano, E., Mello, M. A. R. (2000). Protein malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to exercise-training. **Nutrition Research** **20**: 527-35.
- Garcia-Morales, P., Dufrane, S. P., Sener, A., Valverde, I., Malaisse, W. J. (1984) Inhibitory effects od clonidine upon adenylate cyclase activity, cyclic AMP production, and insulin release in rat pancreatic islets. **Biosci Rep** **4**: 511.
- Gepts, W., Lecompt, P. M. (1981) The pancreatic islets in diabetes. **Am J Med** **70**: 105-109.
- Gilon, P., Henquin, J. C. (1993) Activation of muscarinic receptors increases the concentration of free Na⁺ in mouse pancreatic B-cells. **FEBS Letters** **315**: 353-356.
- Gomis, R., Sener, A., Malaisse, L. F., Malaisse, W. J. (1983) Trasglutaminase activity in pancreatic islets. **Biochim Biophys Acta** : 760-765.
- Grodsky, G. M. (1996) Kinetics of insulin secretion: current implications. In: *Diabetes Mellitus*, pp.12-20 [Le Roith, D., Taylor, S.I & Olefsky, J.M. eds.]. Philadelphia: Lippincott-Raven.

- Hales, C. N., Barker, D. J. P. (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia** **35**: 595-601.
- Heard, C. R. C., Turner, M. R. (1967) Glucose tolerance and related factors in dogs fed diets of suboptimal protein value. **Diabetes** **16**: 96-107.
- Henquin, J. C. (1980) Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islet cells. **Biochem J** **186**: 541-550.
- Henquin, J. C., Garcia, M. C., Bozem, M., Hermans, M. P., Nenquin, M. (1988) Muscarinic control of pancreatic β -cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium-influx. **Endocrinology** **122**: 2134-2142.
- Henquin, J. C., Meissner, H. P. (1981) Effects of amino acids on membrane potential and ^{86}Rb fluxes in pancreatic β -cells. **Am J Physiol** **240**: 245-252.
- Henquin, J. C., Nenquin, M. (1988) The muscarinic receptor subtype in mouse pancreatic B-cells. **FEBS Lett** **236**: 89-92.
- Herchuelz, A., Couturier, E., Malaisse, W. J. (1980) Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: glucose-induced calcium exchange. **Am J Physiol** **238**: 96-103.
- Herchuelz, A., Lebrun, P., Boschero, A. C., Malaisse, W. J. (1984) Mechanism of arginine-stimulated Ca^{2+} influx into pancreatic B cell. **Am J Physiol** **246**: 38-43.
- Herchuelz, A., Sener, A., Malaisse, W. J. (1980) Regulation of calcium fluxes in rat pancreatic islets IV. calcium extrusion by sodium-calcium countertransport. **J Membr Biol** **57**: 1-12.
- Hermans, M. P., Schmeer, W., Henquin, J. C. (1986) Why is acetylcholine a potentiator and not an initiator of insulin release? **Diabetologia** **29**: 548A-549A (Abst. 212).
- Hermans, M. P., Schmeer, W., Henquin, J. C. (1987). Modulation of the effect of acetylcholine on insulin release by the membrane potential of B cells. **Endocrinology** **120**: 1765-73.
- Holst, J. J. (1992) Role of classical and peptidergic neurotransmitters in insulin secretion. In: *Nutrient Regulation of Insulin Secretion*, pp. 23-39 [P.R. Flatt, editor]. London: Portland Press Ltd.
- Hughes, S. J., Chalk, J. G. Ashcroft, S. J. H. (1990) The role of cytoplasmic free Ca^{2+} and protein kinase C in acetylcholine--induced insulin release in the clonal B-cell line, HIT-T15. **Biochem. J.** **267**: 227-232.

- Huang, P.K. (1989) The mechanism of protein kinase C activation. **Trend Biochem. Sci.** 12(11):425-431.
- Hunter, M., Lopes, A. G., Boulpapep, E. I., Giebisch, G. (1984) Single-channel recordings of calcium-activated K⁺ channel in the apical membrane of rabbit cortical collecting tubules. **Proc Nat Acad Sci** 81: 4237-4239.
- Jones, P. M., Persaud, S. J., Howell, S. L. (1991) Protein kinase C and the regulation of insulin secretion from pancreatic B cells. **J Mol Endocr** 6: 121-127.
- Kurkuljan, M., Gonçalves, A. A. & Atwater, I. (1991) Charybdotoxin-sensitive K_(Ca) channel is not involved in glucose-induced electrical activity in pancreatic β -cells. **J Mem Biol** 119: 187-195.
- Kumar, V., Deo, M. G., Ramalingaswami, V. (1972). Mechanism of fatty liver in protein deficiency. **Gastroenterology** 62: 445-51.
- Lacy, P. E. & Kostianovsky, M. Method for isolation of the intact islet of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, 16: 35-9.
- Latorraca, M. Q., Carneiro, E. M., Boschero, A. C., Mello, M.A R. (1998a) Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. **Br J Nutr** 80: 291-297.
- Latorraca, M. Q., Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Boschero, A. C. (1999) Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with a diminished calcium uptake. **J Nutr Biochem** 10.
- Latorraca, M. Q., Reis, M. A. B., Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Velloso, L. A., Saad, M. J. A., Boschero, A. C. (1998b) Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. **J Nutr** 128: 1643-1649.
- Leahy, J. L. (1996) Detrimental effects of chronic hyperglycemia on the pancreatic β -cell. **In: Diabetes Mellitus**, pp.103-113 [Le Roith, D., Taylor, S.I & Olefsky, J.M. eds.]. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Lewis, E. M., Feldman, R. S. (1964). The depressive effect of chlordiazepoxide on a negative incentive. **Psychopharm** 6(2): 143-50.
- Lunn, P. G., Austin, S. Differences in nitrogen metabolism between protein and energy deficient rats with similar restricted growth rates (1983). **Ann Nutr Metab** (27) 242-51.

- Malaisse, W. J. (1993) Is type 2 diabetes due to a deficiency of FAD-linked glycerophosphate dehydrogenase in pancreatic islets? **Acta Diabet** 30: 1-5.
- Malaisse, W. J., Brisson, G. R., Baird, L. E. (1973) Stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. X. Effect of glucose on ^{45}Ca efflux from perfused *islets* **Am J Physiol** 224: 389-394, 1973.
- Malaisse, W. J., Sener, A. (1988) Hexose metabolism D-glucose oxidation by functional events. **Biochim. Biophys. Acta** 971: 246-254.
- Malaisse, W.J., Sener, A. (1992) Hexose metabolism in pancreatic islets: Unequal oxidation of the two carbons of glucose-derived acetyl residues. **Arch Biochem Biophys** 292: 244-249.
- Marty, A. (1981) Ca^{+2} -dependent K^{+} channel with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. **Nature** 291: 497-500.
- Mathias, P. C. F., Carpinelli, A. R., Billaudel, B., Garcia-Morales, P., Valverde, I., Malaisse, W. J. (1985) Cholinergic stimulation of ion fluxes in pancreatic islets. **Biochem Pharmacol** 43: 3451-3457.
- McCleskey, M. C., Fox, A. P., Feldman, D., Tsien, R. W. (1986) Different types of calcium channels. **J Exp Biol** 124: 177-190.
- Meissner, H. P., Preissler, M. Glucose-induced changes of the membrane potential of pancreatic B-cells: their significance for the regulation of insulin release. **In: Treatment of Early Diabetes** [R. A. Camerini-Davalos, B. Hanover Edit]. New York: Plenum 79-107, 1979.
- Morris, A. P., Gallacher, D. V., Lee, J. A. C. (1986) A large conductance, voltage and calcium-activated K^{+} channel in the basolateral membrane of rat enterocytes. **FEBS Lett** 206: 87-92.
- Nenquin, M., Awouters, P., Mathot, F., Henquin, J. C (1984) Distinct effects of acetylcholine and glucose on ^{45}Ca and ^{86}Rb efflux from mouse pancreatic islets. **FEBS Lett** 176: 457-461.
- Newgard, C. B. and McGarry, J. D. (1995). Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. **Annu Rev Biochem** 64: 689-719.
- Nowicky, M. C., Fox, A. P., Tsien, R. W. (1985) Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. **Nature** 316: 440-443.

- Ozanne, S. E., Smith, G. D., Tikerpae, J. and Hales, C. N. (1996). Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. **Am J Physiol** **270**: E559-64.
- Okitolonda, W., Brichard, S. M., Henquin, J. C. Repercutions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat (1987). **Diabetologia**, v.30, p.946-951.
- Patti, M-E., Brambilla, E., Luzi, L., Landaker, E. J., Kahn, C. R. (1998). Bidirectional modulation of insulin actino by amino acids. **JCI** **101**: 1519-1529.
- Pende, M., Kozma, S. C., Jaquet, M., Oorschot, V., Burcelin, R., Marchand-Brustel, Y. L., Klumperman, J., Thorens, B., Thomas, G. (2000). Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta cell size in S6K1-deficient mice. **Nature** **408**: 994-997.
- Petersen, O. H., Findlay, Z. (1987) Electrophysiology of the pancreas. **Physiol Rev** **67**: 1054-1116.
- Prentki, M. Matschinsky, F. M. (1987) Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. **Physiol Rev** **67**: 1185.
- Rajan, A. S., Aguilar-Bryan, L., Nelson, D. A., Yaney, G. C., Hsu, W. H., Kunze, D. L., Boyd III, A. E. (1990) Ion channels and insulin secretion. **Diabetes Care** **13**: 340-367.
- Rajan, A. S., Hill, R. S., Boyd III, A. E.(1989) Effect of rise in cAMP levels in Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels in Hit cells: second-messenger synarchy in β -cells. **Diabetes** **38**: 874-880.
- Rao, R. H. (1988) Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence? **Endocrine Rev.** **9**: 67-87.
- Rasschaert, J., Reusens, B. Darhi, S., Sener, A., Remacle, C., Hoet, J. J., Malaisse, W. J. (1995) Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein manutrition. **Endocrinology** **136**: 2631-2634.
- Reaven, G. M. (1988) Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes** **37**: 1595-1607.
- Santos, R. M., Rojas, E. (1989) Muscarinic receptor modulation of glucose electrical activity in mouse pancreatic B-cell. **FEBS Lett** **249**: 411-417.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey, C. G. Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: report of the American Institute of Nutrition ad hoc working committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J Nutr** **123**: 1939-51.

- Schofl, C., Borger, J., Lange, S., von zur Muhlen, A. and Brabant, G. (2000). Energetic requirement of carbachol-induced Ca²⁺ signaling in single mouse beta-cells. **Endocrinology** **141**: 4065-71.
- Scott, A. M., Atwater, I. and Rojas, E. (1981). A method for simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* **21**, 470-475.
- Sener, A., Blacher, J., Rasschaert, J., Malaisse, W. J.(1990) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release: comparison with histidine-induced insulin release. **Endocrinology** **127**: 107-113.
- Sener, A., Malaisse, W. J. (1987) Stimulation by D-glucose of mitochondrial oxidative events in islets cells. **Biochem J** **246**: 89-95.
- Sener, A., Malaisse, W. J. Hexose metabolism in pancreatic islets. **Bochem Mol Biology** **267**: 13251-13256, 1992.
- Sherwood, D. J., Dufresne, S. D., Markuns, J. F., Cheathan, B., Moller, D. E., Aronson, D., Goodyer, L. J. (1999). Differential regulation of MAP kinase, p70S6K and Akt by contraction and insulin in rat skeletal muscle. *Am Physiol Soc* **276**: 870-878.
- Smith, S. R., Edgar, P. J., Pozefsky, T., Chetri, M. K., Prout, T. E. (1975) Insulin secretion and glucose tolerance in adults with protein-calorie malnutrition. **Metabolism** **24**: 1073-1084.
- Sturgess, N. C., Ashford, M. L. J., Carrington, C. A., Hales, C. N. (1986) Single channel recordings of potassium currents in an insulin-secreting cell line. **J Endocr** **109**: 201- 207.
- Tamagawa, C. S., Henquin, J. C. (1982) A single mechanism for the stimulation of insulin release and ⁸⁶Rb efflux from rat islets by cationic amino acids. **Biochem. J.** : 208-301.
- Thams, P., Capito, K., Hedekov, C. J. (1986) An inhibitory role for polyamines in protein kinase C activation and insulin secretion in mouse pancreatic islets. **Biochem., J.** **221**: 247-253.

- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003). Report the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care** 26: S5-S20
- Trindade, C. E. P., Nóbrega, F. J. de & Tonete, S. S. Q (1986). Repercussões metabólicas da desnutrição protéico-calórica. In: Nóbrega, F. J. (ed.) Desnutrição intra-uterina e pós-natal. São Paulo: **Panamed editorial**.
- Trinder, P. (1969) Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J Clin Path** 22: 158-61.
- Verchere, C. B., Kwok, Y. N., Brown, J. C. (1991) Modulation of acetylcholine-stimulated insulin release by glucose and gastric inhibitory polypeptide. **Pharmacol** 42: 273-282, 1991.
- Vieira, E. C., Carneiro, E. M., Latorraca, M. Q., Delguingaro-Augusto, V., Amaral, M. E., Bosqueiro, J. R., Boschero, A. C. (2001). Low protein diet confers resistance to the inhibitory effects of interleukin 1 beta on insulin secretion in pancreatic islets. **J Nutr Biochem**. 12 (5): 285-91.
- Weinkove, C., Weikove, E. A., Pimstone, B. L. (1976) Glucose tolerance and insulin release in malnourished rats. **Clin Sci Mol Med** 50: 153-63.
- Who Study Group On Diabetes Mellitus (2003) **Who Tech. Rep. Ser** 53: 12.
- Widowson, E. M., Mccance, R. A. (1957) Effect of low protein diet on chemical composition of the bodies and tissues of young rats. **Br J Nutr** 11: 198-206.
- Wikes, L. J., Fiorotto, M., Burrin, D. G., Del Rosario, M., Frazer, M. E., Pond, W. G. & Jahoor, F. (1996) Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. **J. Nutr.**, v.126, p.1481-1488.
- Wollhiem, C. B., Sharp, G. W. G. (1980) Regulation of insulin release by calcium. **Physiol Rev** 61: 914-973.
- Woods, S. C., Porte, D. (1974) Neural control of the endocrine pancreas. **Physiol Rev** 54: 595-599.
- Xu, G., Kwon, G., Cruz, W. S., Marshall, C. A. and McDaniel, M. L. (2001). Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mTOR-signaling pathway by pancreatic beta-cells. **Diabetes** 50: 353-60.

Zawalich, W. S. (1988) Modulation of insulin secretion from β -cells by phosphoinositide-derived second-messenger molecules. **Diabetes** 37 : 137-141.