

EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO



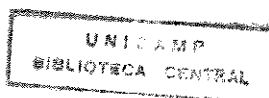
PARTICIPAÇÃO DOS ÍONS Ca^{2+} K^{+} NO PROCESSO DE ACOPLAMENTO ESTÍMULO/SECREÇÃO DE INSULINA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATOS SUBMETIDOS À DIETA DEFICIENTE EM PROTEÍNA

Este exemplar correspondendo à redação final da tese do(a) candidato(a) Everardo Magalhães Carneiro é aprovada pela Comissão Julgadora.

2/6/96 *Borhens*

Tese submetida ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Doutor em Biologia, na área de Fisiologia.

CAMPINAS - SÃO PAULO
1996



9607840

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	71UNICAMP
	C215p
	27973
	667/96
	05/07/96
	R\$ 11,00
	05/07/96
	CPD

CM-00089440-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

C215p

Carneiro, Everardo Magalhães

Participação dos íons Ca^{2+} K^{+} no processo de acoplamento estímulo / secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos submetidos à dieta deficiente em proteína / Everardo Magalhães Carneiro. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientadores : Antonio Carlos Boschero, Maria Alice Rostom de Mello.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Desnutrição. 2. Pâncreas. 3. Insulina. 4. Rato como animal de laboratório. 5. Cálcio no organismo. I. Boschero, Antonio Carlos. II. Mello, Maria Alice Rostom de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 03 de Junho de 1996

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

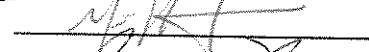
Prof. Dr. ANTONIO CARLOS BOSCHERO (Orientador)



Prof. Dr. ANTONIO ARI GONÇALVES



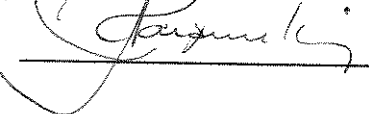
Prof. Dr. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD



Prof. Dr. MARIO H. HIRATA



Prof. Dr. ANGELO RAFAEL CARPINELLI



SUPLENTES:

Prof. Dr. ANIBAL EUGENIO VERCESI



Prof. Dr. RUI CURY



Profa. Dra. ELIETE LUCIANO



INDICE

Introdução	001
1. Desnutrição proteico calórica e secreção de insulina	004
2. Potássio, cálcio e secreção de insulina	007
Objetivo	010
Material e Metodos	011
1. Animais	011
2. Composição das dietas	011
3 Composição corporea	013
4. In vivo	014
4.1. Testes de tolerância à glicose oral (TTG)	014
4.2 .Testes de tolerância à insulina (TTI)	014
5. Determinação bioquímicas	015
5.1. Glicose sérica	015
5.2. Proteínas totais sérica	015
5.3. Albumina sérica	015
5.4 .Ácidos graxos livres sericos (AGL)	016
5.5 .Gorduras hepáticas	016
5.6 .Glicogenio hepático	017

6. Insulina plasmática	017
7. Total de insulina	018
7.1. Conteúdo pancreático de insulina	018
7.2 .Conteúdo de insulina por ilhota	018
8. Estudo <u>In vivo</u>	018
8.1. Isolamento das ilhotas pancreáticas	018
8.2 .Microscopia eletrônica de transmissão	018
8.2.1. Fixação	019
8.2.2 .Desidratação	020
8.2.3. Infiltração e Inclusão	020
8.2.4. Obtenção de cortes semifinos	021
8.2.5. Obtenção dos cortes ultrafinos e contratação	022
8.2.6. Observação dos cortes ultrafinos	022
8.3. Medida da secreção estática da insulina	023
8.4. Dosagem da insulina	023
8.5. Captação de ⁴⁵ Ca	024
8.6. Efluxo de ⁴⁵ Ca	026
8.7. Efluxo de ⁸⁶ Rb	026
8.8. Metabolismo da glicose	027
8.9. Reagentes e soluções	029
8.9.1. Reagentes	029
8.9.2. Soluções	030
Resultados	033
1.Avaliação do estado nutricional dos animais	033
1.1. Composição corporea	034

2. Avaliação dos estado glicêmico dos animais	035
2.1. Teste de tolerância à glicose oral	035
2.2. Teste de tolerância à insulina subcutânea	035
2.3. Insulina plasmática	036
2.4. Extração de insulina	036
3. Microscopia eletrônica: características estruturais	037
3.1. Ratos normoproteicos	037
3.2. Animais hipoproteicos	038
4. Metabolismo da glicose	039
5. Efeito de diferentes agentes sobre o efluxo de ⁸⁶ Rb	039
6. Efeito da glicose e arginina sobre a captação de ⁴⁵ Ca	042
7. Efeito de diferentes agentes sobre o efluxo de ⁴⁵ Ca	043
8. Efeito da glicose sobre a secreção da insulina	045
9. Efeito da leucina e arginina sibre a secreção de insulina	046
10.Efeito do K+ sobre a secreção de insulina	046
11. Efeito de potencializadores da secreção de insulina	047

Discussão	048
1. Modelo Experimental	048
Estudos “In Vitro”	052
1. Estudos morfológicos	052
2. Oxidação da Glicose e movimentos iônicos	053
3. Segundos mensageiros e secreção de insulina	061
4. Cálcio e secreção de insulina	063
5. Secreção de insulina e estímulos colinérgicos	066
Resumos e Conclusões	069
Summary	071
Referências Bibliográficas	072
Apêndice	099

LISTA DE ABREVIações

BG-	Background” ou radiação de fundo
CPM	Contagens por minuto
MAX	Número de cpm contidos em 1,0 µl de meio
KREBS-	Solução Tampão Bicarbonato de KREBS-RINGER
HANKS	Solução Tampão para isolamento de ilhotas
MIN	Minuto
A	Célula Alfa
B	Célula Beta
D	Célula Delta
AMPc	Mono fosfato de adenosina cíclica
ARG	Arginina
LEU	Leucina
ATP	Trifosfato de adenosina
pS-	Picosiems
K ⁺ _{ATP}	Canais de K ⁺ sensíveis ao ATP
K ⁺ _{Ca}	Canais de K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺
L	Canais de Ca ²⁺ sensíveis à voltagem
[Ca ²⁺] _i	Concentração citoplasmática de Ca ²⁺
PKC	Proteína quinase C
TPA	Tetradecanoil acetato de forbol
G	Glicose
GTT	Teste de Tolerância Glicose
D-[U- ¹⁴ C]-glicose	Glicose marcada com o isótopo ¹⁴ C
mEq/g	Mili equivalente por grama
mU	Mili unidade
ng/ml	Nanogramas por mililitro
µg/ml	Micrograma por mililitro
TOL	Tolbutamida
DIAZ	Diazoxida
KIC-	2-cetoisocaproato
HEPES	Ácido hidroxietilpiperazina ethanosulfonico
pmol	Picomol
OXO-m	Oxotremorina -M
IBMX	Isometilbutilxantina
AG	Ácidos graxos
n	Número de experimentos
epm	Erro padrão da média
IIR	Insulina imunoreativa
GSH	Glutathiona
GSSG	Glutathiona dissulfídrica
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
PMA	13 Acetato 12 Miristato forbol

INTRODUÇÃO

A desnutrição tem sido considerada por alguns pesquisadores como possível causa do diabetes melito na infância e na fase adulta (JAMES & COORE, 1970; DAHRI, et al, 1995). Observações em crianças desnutridas e em animais experimentais sugerem que a base dessa ligação está relacionada com a deficiência nutricional no início do desenvolvimento das células B das ilhotas de Langerhans (PHILLIPS, et al, 1994).

Essas observações podem ser confirmadas quando gestantes são submetidas à dieta isocalórica com baixo teor protéico provocando em sua prole, ao nascer, redução no tamanho e número das células B, e conseqüentemente resposta secretória reduzida quando submetidas à estimulação com diferentes substâncias insulínótropas (SWENNE, et al 1988; SNOECK et al, 1990; DAHRI et al, 1991; SWENNE, 1992; PHIPPS, et al, 1993 & DARHI, et al, 1994). Essas alterações, observadas na fase inicial do desenvolvimento do pâncreas endócrino, podem repercutir na fase adulta mesmo após recuperação alimentar de filhos de mães que receberam dieta com baixos teores de proteína (SNOECK, et al 1990; DAHRI, et al 1994).

Vários estudos têm demonstrado que a desnutrição predispõe ao aparecimento de diabetes em populações adultas. Também tem sido descrito que a desnutrição crônica prejudica tanto a tolerância à glicose quanto a reserva secretória de insulina das células B (RAO, 1984; RAO, 1988; RAO, 1990; RAO, 1993; ABDULKANDIR et al, 1989; WIYONO, MORIMOTO & TANIGUSHI, 1989 & KOKO et al, 1992). Uma das formas de deficiência protéica conhecida que pode estar envolvida na geração do diabetes é o Kwashiorkor. Esses pacientes apresentam tolerância à glicose reduzida e resposta secretória insulínica

deficiente quando o pâncreas é estimulado pela hexose. Outra forma de deficiência nutricional que também pode estar implicada na gênese do diabetes é o Marasmus, doença caracterizada por desequilíbrio no balanço energético. A associação dessas síndromes pode estar envolvida na prevalência do diabetes em populações que foram submetidas à deficiência protéico-calórica em diferentes fases da vida (HADDEN, 1967; CRACE, SWENNE & MILNER, 1989; WIYONO, MORIMOTO & TANIGUSHI, 1989 & SWENNE et al 1992).

Duas modalidades de diabetes, claramente distintas dos dois tipos clássicos dessa enfermidade relacionados com as formas de desnutrição descritas acima, têm sido relatadas em populações tropicais (AHUJA, KUMAR, 1975; HUGH-JONES, 1985; WHO, 1985; RAO, 1988; RAO, 1990; RAO, 1993; WIYONO, MORIMOTO & TANIGUSHI, 1989; ABDULKANDIR, 1989, & AKANJI, 1990). A primeira denominada Tipo J, cujos portadores clinicamente apresentam: moderada desnutrição, severa hiperglicemia, resistência à insulina e ausência de cetose, não respondem as sulfoniluréias e dependem de insulina para o controle da glicose sangüínea (RAO, VIGG, & RAO, 1983 & RAO, 1988).

A segunda modalidade chamada Diabetes Pancreático Tropical é caracterizada por: início agudo, desnutrição profunda, hiperglicemia severa, insuficiência pancreática exócrina e presença de calcificações no parênquima pancreático. Os pacientes respondem ocasionalmente as sulfoniluréias e necessitam de insulina para manutenção da glicemia (VISWANATHAN, 1980 & RAO, 1993). Embora a interação dessas modalidades de diabetes com a desnutrição tenha sido exaustivamente investigada, os mecanismos envolvidos na gênese da doença ainda não estão esclarecidos.

Foram observadas, em crianças desnutridas, alterações no metabolismo dos carboidratos, redução da insulinemia basal, intolerância à glicose e resistência periférica à insulina exógena. Isto demonstra que o problema é bastante complexo envolvendo várias etapas, desde a metabolização do

nutriente na célula B, passando pela secreção da insulina e a interação desse hormônio com receptor na membrana das células dos tecidos alvo (BOWIE, 1964; HADDEN, 1967; OXMAN et al, 1968; JAMES & COORE, 1970; ALLEYNE et al, 1972; BECKER et al, 1975; BAIG & EDOZIEN, 1985 & CZECH, 1995).

Algumas dessas observações foram confirmadas em animais de experimentação. Assim, redução da insulinemia basal e intolerância à glicose foram registradas em ratos e coelhos desnutridos (HILL et al, 1970; HEARD & STEWART, 1971; ANTHONY & FALOONA, 1974; TURNER et al, 1974; WEINKOVE et al, 1976; KABADI et al, 1976; CARPINELLI, 1978; HEARD et al, 1977 & MOLDAWER et al, 1981). Estudos mais recentes, utilizando ratos alimentados com baixos teores de proteína, têm caracterizado essas anormalidades na homeostase da glicose, determinando sua evolução temporal e sua parcial reversão quando recuperados com dieta controle (DOLLET et al, 1985; OKITOLONDA et al, 1987 & ESCRIBA et al, 1991).

Insensibilidade marcada das células B a vários nutrientes insulinoatrópicos, e alta sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina, foram as duas características mais importantes nesses ratos, que podem explicar porque os mesmos não desenvolveram intolerância à glicose quando submetidos à dieta com baixo teor de proteína ou, recuperados com dieta controle (OKITOLONDA et al, 1988 & ESCRIBA et al, 1991). Por outro lado, outros autores encontraram, após desnutrição crônica produzida por restrição alimentar (em torno de 60% da ingesta dos animais-controle), relativa hipoglicemia associada à redução da secreção de insulina e de glucagon. Baseado nesses dados, propuseram que a tendência à hipoglicemia nesses animais provavelmente se deve à diminuição da secreção do glucagon. Concluem também que esse modelo de desnutrição, por privação nutricional, é distinto do modelo baseado na redução protéica, no qual o glucagon de jejum está normal (RAO, 1995).

1. Desnutrição Protéico-Calórica e Secreção de Insulina

Aceita-se que a desnutrição protéico-calórica altera a homeostase de glicose resultando em intolerância a hidratos de carbono (BECKER, 1983). Estudos recentes usando ratos alimentados com dieta hipoprotéica, têm caracterizado essas anormalidades na homeostase da glicose, e tem determinado sua evolução temporal, após recuperação alimentar desses animais com dieta controle (DOLLET et al, 1985; OKITOLONDA, et al, 1987 & SWENNE, et al, 1987).

Ratos alimentados com baixos teores de proteína por longo período, apresentaram em jejum menores níveis de glicose plasmática e de insulina circulante quando comparado aos controle. Também apresentaram alterações ao teste de tolerância à glicose oral (GTT-ORAL), mas não desenvolveram intolerância a glicose. (YOUNOSZAY & DIXIT, 1980; LEVINE et al, 1983 & OKITOLONDA et al, 1987).

Em contraste, ratos privados de proteína, durante 3 a 4 semanas apresentaram intolerância a glicose, e essa característica se intensificou após administração de uma carga intravenosa de glicose (WEINKOVE, et al, 1976 & MELLO & CURY, 1989). Um longo e duradouro processo de desnutrição aumenta a vulnerabilidade da célula e portanto pode facilitar o desenvolvimento do diabetes em indivíduos geneticamente predispostos, na presença de resistência à insulina durante a demanda aumentada do hormônio ou após agressão tóxica ou viral (OKITOLONDA, BRICHARD & HENQUIN, 1987 & RAO, BETSCHART & VIRJI, 1991).

YOUNOSZAY & DIXIT (1980) & MELLO et al (1990), observaram redução na secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos hipoprotéicos, quando estimuladas com glicose. Contudo, esses pesquisadores não determinaram claramente qual ou quais etapas do processo secretório estavam comprometidos. Outros estudos sugeriram decréscimo na quantidade dos transportadores de glicose na membrana das células B de pâncreas de ratos

tratados com dieta hipoprotéica (DIXIT & KAUNG, 1985). No entanto, esses pesquisadores, em estudo posterior, relataram que a liberação de insulina estimulada por glicose, foi proporcional à quantidade de tecido endócrino existente no pâncreas. A partir dessas características, concluíram que não há defeito no mecanismo de liberação de insulina glicose-dependente nas ilhotas de ratos carentes em proteína (DIXIT & SORENSON, 1988). Essa conclusão pode ser contestada quando se compara os dados obtidos em ratos e em crianças desnutridas onde foram observadas; redução na massa e volume das células B, aumento das células A e D, menor produção de insulina, vários graus de degeneração de todos os tipos celulares das ilhotas (destruição da membrana celular, redução de ribossomos, edema mitocondrial). Ainda, foram observados mudanças hormonais significativas incluindo altos níveis de cortisol e hormônio do crescimento acompanhados de baixos níveis de insulina. Em adição a essas alterações, as células B apresentaram uma alta proporção de grânulos precursores de insulina (KOKO et al, 1992; SWENNE et al, 1992 & BROOKS et al, 1993).

Mais recentemente, foi demonstrada em ilhotas isoladas de ratos desnutridos redução no conteúdo de insulina, menor resposta secretória de insulina à glicose ou em combinação com aminoácidos, baixa atividade da enzima glicerofosfato desidrogenase (enzima chave da lançadeira do glicerol fosfato), e alteração na atividade das transaminases glutamato-alanina e glutamato-aspartato em homogenado de ilhotas de Langerhans desses animais (RASSCHAERT et al, 1995). Esses autores concluíram que a perturbação encontrada no processo secretório observado em animais desnutridos, deve-se em parte à baixa atividade da enzima glicerofosfato desidrogenase em associação a outras anormalidades enzimáticas encontradas nessas ilhotas ou em outros tecidos que participam do controle metabólico desses animais (SENER, MALAISSE-LAGAE & MALAISSE, 1993 & RASSCHAERT et al, 1995).

Outro ponto que reforça o papel de comprometimento do pâncreas endócrino, consiste na associação da desnutrição crônica por restrição alimentar com resistência hepática para ambos os hormônios insulina e glucagon. A resistência ao glucagon deve-se, em parte, a um defeito pós-receptor e não a um prejuízo da glicogenólise. Foi proposto que a resistência ao glucagon leva a um prejuízo na gliconeogênese sendo este processo uma resposta adaptativa para economizar proteína a despeito de níveis baixos de glicose plasmática apresentada por este modelo experimental de deprivação nutricional (RAO, 1995 & RAO, 1995a). O conjunto das alterações, observadas nesses estudos, convergem para o aparecimento a longo prazo de intolerância a glicose ou a outros nutrientes e como consequência diabetes, principalmente em situações onde exista uma demanda maior de insulina. Concluindo, a série de resultados discutidos anteriormente, sugere que a deficiência secretória apresentada por essas ilhotas é bastante complexa podendo estar comprometida em várias etapas, desde o reconhecimento do nutriente até a secreção de insulina e muito provavelmente a ação desse hormônio em tecidos alvos.

O processo de secreção de insulina estimulado por glicose constitui-se de uma seqüência encadeada de eventos. Inicia-se com o reconhecimento e subsequente metabolização do nutriente pela célula B, gerando um ou diversos sinais que levam à redução da condutância dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) na membrana das células secretoras desse hormônio. O resultado da diminuição da condutância ao K^+ , provoca um acúmulo relativo do referido cation nas células B, com consequente despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem e influxo desse íon, aumentando assim a concentração citosólica de cálcio e ativação do sistema de microtúbulos e miofilamentos. Finalizando, ocorre migração das vesículas armazenadoras de insulina em direção à membrana e extrusão do conteúdo granular para o líquido intersticial (HADESKOV, 1980; WOLLHIEM & SHARP, 1981; SUTTER, 1982; PETERSEN & FINDLAY, 1987; GRODSKY, 1989; BOSCHERO et al, 1990; GEMBAL, GILON & HENQUIN, 1993; BOSCHERO et al 1993 & BOSCHERO, 1996).

O mecanismo exato pelo qual a desnutrição severa pode interferir no mecanismo de secreção de insulina discutido acima, levando à uma resposta deficiente à estimulação com glicose e/ou outros nutrientes insulínotropicos, não está esclarecido. Contudo, algumas hipóteses podem ser levantadas. Dentre estas; o comprometimento do metabolismo dos nutrientes (glicose e aminoácidos) nas células B, o prejuízo na expressão e atividade da glicoquinase ou de outras enzimas regulatórias e/ou transportadores de glicose (GLUT₂), as alterações dos subtipos de receptores muscarínicos na membrana celular, as mudanças nos eventos iônicos que levam ao acoplamento estímulo/secreção nas mesmas células, as variações nos níveis de AMP_c e proteína quinase C (PKC), as modificações na glutatona reduzida e grupos tiois e; as alterações na interação insulina receptor em tecidos alvos (MALAISSE et al, 1974; ASHCROFT, 1980; HENQUIN & MEISSNER, 1981; MATHIAS et al, 1985; BERRIDGE, 1986; HENQUIN, 1987; AMMON, & WAHL, 1989; BLACHER et al, 1989; BOSCHERO et al, 1990; SENER et al, 1990; RASMUSSEN et al, 1990; BOSCHERO et al, 1990; JONES et al 1991; STEINER & JAMES, 1992; MAZANCOURT et al 1994; BOSCHERO et al, 1995; CZECH, 1995; RASSCHAERT et al, 1995 & MALAISSE, 1995).

2. Potássio, Cálcio e secreção de insulina

Como já discutimos antes, mudanças nos fluxos de K⁺ alteram o potencial de membrana e sob apropriadas circunstâncias, os fluxos de Ca²⁺ (BOSCHERO et al, 1990 & GEMBAL, GILON & HENQUIN, 1993).

Através da técnica de “Patch Clamp” 3 tipos de canais de K⁺ foram identificados em células B pancreática. Um canal de baixa condutância (30-pS), um de alta (250-pS) ativado por Ca²⁺ e sensível à voltagem e um terceiro tipo com condutância entre (50-80 pS) modulado pela relação ATP/ADP celular (COOK & HALES, 1984; STURGESS et al, 1986 & RAJAN, 1990).

Este último, o canal K^+_{ATP} exerce papel fundamental na manutenção do potencial de repouso de célula B (ASHCROFT, HARRISON & ASHCROFT, 1984 & ASHCROFT, 1988). O mesmo pode sofrer a ação de diferentes substâncias desencadeadoras e/ou potencializadoras da secreção de insulina tais como: glicose, gliceraldeído, aminoácidos, metabólitos intermediário do ciclo de Krebs, bem como de anestésicos, quinina, sulfoniluréias, proteínas quinases, fosfatases e proteína G (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).

Galanina, somatostatina e catecolaminas, hormônios de grande importância para o controle da secreção de insulina, também interagem com esses canais promovendo abertura através de um mecanismo dependente da proteína G e conseqüentemente inibe a secreção do referido hormônio (DE WEILLE et al, 1989 & CATERRAL & EPSTEIN, 1992).

Os canais de K^+ -ativado por Ca^{2+} (K^+_{Ca}) também são encontrados em células B pancreáticas e têm uma condutância em torno de (200-300 pS). Esses, são dependentes das variações das $[Ca^{2+}]_i$ e do potencial de membrana (MARTY, 1981; HUNTER, et al, 1984; MORRIS, GALLACHER & LEE, 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, GONÇALVES & ATWATER, 1991). Contudo, parece exercer função importante na repolarização celular, estimulada por acetilcolina (BORDIN et al, 1995). O conhecimento da modulação complexa dos canais (K^+_{ATP} e K^+_{Ca}), pelos diferentes agentes desencadeadores e/ou potencializadores da secreção de insulina, pode constituir-se em ferramenta importante para entender as possíveis falhas no controle do processo secretório nas células B provenientes de animais que receberam dieta deficiente em proteína.

Os canais de Ca^{+2} também exercem um papel fundamental na fisiologia da célula B. A despolarização celular promovida pela retenção de K^+ , ativa os canais de Ca^{2+} voltagem dependente regulando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, e dessa maneira controlando muitos eventos intracelulares, em especial a secreção de insulina. Dois tipos de canais de Ca^{+2} são encontrados em células B pancreáticas. 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, FOX & TSIEN, 1985). Um outro, chamado canal de Ca^{2+} -dependente da voltagem (L), é ativado em um 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 auto-regulação é singular para esses canais, e pode constituir-se em importante controle da atividade elétrica da membrana e da secreção de insulina quando estimulada por glicose (CHAY,1987). Outros segundos mensageiros tais como AMP_c , inositol trifosfato (IP_3), proteínas quinases e proteína G, também modulam esses canais e conseqüentemente a secreção de insulina.(RAJAN, HILL & BOYD, 1989; ZAWALICH, 1988; BROWN & BIRNBAUMER, 1988).

Substâncias ativadoras da adenil ciclase como o forskolina, ou inibidores da quebra de AMP_c como isobutilmetilxantina, promovem uma elevação rápida na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ culminando com a potencialização tanto da primeira quanto da segunda fase da secreção de insulina reforçando assim o papel dos canais (L) nas células B (HILL, 1987 & HILL, BOYD, 1985). Por outro lado, substâncias antagonistas desses canais como, verapamil, nitrendipine, nimodipine, nifedipine e diltiazem que se ligam a sítios específicos nestes canais(L), inibem a secreção de insulina (MALAISSE & BOSCHERO, 1977; SCRIABINE, 1987 & KEAHEY et al, 1989). O conhecimento da dinâmica de funcionamento desses canais permite compreender os mecanismos pelo qual a desnutrição pode alterar a homeostase da glicose no homem ou em outras espécies.

OBJETIVO

Desnutrição protéico-calórica em ratos pode ser produzida com facilidade apresentando características comuns àquelas encontradas na desnutrição infantil tipo Kwashiorkor (MELLO, 1985; MELLO et al, 1989). O presente estudo teve por objetivo desvendar alguns dos possíveis fatores determinantes da resposta pancreática deficiente à estimulação com diferentes agentes insulíntrópicos, tendo o rato como modelo experimental.

Para atingir esse objetivo, realizamos estudos “in vivo” e “in vitro”. Os procedimentos in vivo incluíram a caracterização do modelo de desnutrição, testes de tolerância à glicose e à insulina. Com relação aos procedimentos in vitro, utilizamos ilhotas pancreáticas isoladas dos animais-controle e hipoprotéicos e analisamos: morfologia celular; oxidação da D-[U-¹⁴C]glicose; permeabilidade da membrana aos íons K⁺ e Ca²⁺; e a secreção estática e dinâmica de insulina, induzida por agentes inicializadores e potencializadores da liberação do referido hormônio.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, recém desmamados (21 dias de vida), distribuídos ao acaso, em 2 grupos experimentais:

- a) Normoprotéicos(Controle): ratos alimentados a partir dos 21 dias até idade adulta (90 dias) com dieta (25% proteína);
- b) Hipoprotéicos: ratos alimentados a partir dos 21 dias até idade adulta (90 dias) com dieta (6% de proteína).

2. Composição das dietas

As dietas preparadas no Laboratório de Biodinâmica, Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências, UNESP, "Campus" de Rio Claro, possuíam as composições descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Composição das dietas

Componentes	normoprotéica (25% proteína) (g/Kg)	hipoprotéica (6% proteína) (g/Kg)
Caseína *	315,00	75,00
Amido	183,00	268,00
Glicose	141,00	255,00
Sacarose	150,00	150,00
DL metionina	7,00	0,00
Óleo de milho	150,00	40,00
Mistura de sais	40,00	40,00
Mistura de vitaminas	10,00	10,00
Cloridrato de colina	4,00	4,00

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

Quadro 2 - Composição da mistura de vitaminas

Componentes	g/Kg
Vitamina A + D2(500,000 UI A/50.000UI D2)	. 0,60
Vitamina E (500UI/g	20,00
Vitamina K	0,50
Tiamina Hcl	1,00
Riboflavina	2,00
Niacina	5,00
Vitamina C	20,00
Piridoxina	1,02
Ac. p-aminobenzóico(PABA)	10,00
Biotina	0,05
Pantotenato de cálcio	0,20
Inositol	20,00
Vitamina B12	0,005
Sacarose qsp	1 Kg

Quadro 3 - Composição da mistura de Sais

Componentes	g/Kg
Carbonato de cálcio	292,90
Fosfato de cálcio bihidratado	4,30
Fosfato de potássio monobásico	343,10
Cloreto de sódio	250,60
Sulfato de magnésio	99,80
Citrato de ferro hexahidratado	6,23
Sulfato de cobre	1,52
Cloreto de zinco	0,20
Sulfato de manganês monohidratado	1,21
Iodeto de potássio	0,005
Molibdato de amônio tetrahidratado	0,015
Selenito de sódio pentahidratado	0,015

3.Composição Corpórea

Após sacrifício os animais foram eviscerados pela remoção do estômago e dos intestinos. Nas carcaças, assim obtidas, foram avaliados os seguintes parâmetros: peso corpóreo fresco, peso corpóreo seco, água corpórea total e peso em gordura. Após determinação do peso fresco, as carcaças foram colocadas em estufa a temperatura entre 55 a 60 °C para desidratação até que atingissem o peso constante; a diferença de peso forneceu o conteúdo de água das carcaças. Em seguida elas foram colocadas em extratores de Soxlet para o desengorduramento com éter de petróleo. Por diferença de peso obteve-se o conteúdo em gordura das carcaças (OLLER DO NASCIMENTO & WILLIAMSON, 1988). Para a dosagem de sódio e potássio corpóreo totais, o material seco e desengordurado foi diluído em água destilada até o volume de 100 ml e triturado em liquidificador até atingir consistência pastosa. Amostras de 1 grama foram retirada do homogenato,

diluídas em 10 partes de ácido nítrico 0,75 N e centrifugadas após 24 horas de repouso. O sobrenadante foi aspirado e analisado em fotômetro de chama.

4. Estudos In Vivo

4.1. Teste de Tolerância à Glicose Oral (TTGO)

Cinco animais de cada grupo, após 12 h de jejum, tiveram a extremidade da cauda seccionada para a coleta de sangue. Retirada a primeira amostra (tempo 0), foi introduzida uma cânula de polietileno, via oral, até o estômago do animal pela qual foi injetada uma solução de glicose a 20% (2g/Kg peso corporal). Em seguida, a cânula foi retirada e foram coletadas amostras de sangue da calda do rato aos 30, 60, 90, 120 e 180 min após administração da sobrecarga de glicose.

Vinte microlitros de sangue total, coletados em capilares de vidro, foram desproteinizados em 200 μ l de ácido perclórico e 3%. A seguir os capilares foram centrifugados a 3000 rpm durante 10 min e a glicose foi analisada no sobrenadante por método enzimático (NOGUEIRA et al, 1990).

4.2. Teste de Tolerância à Insulina (TTI)

Três dias após à realização do TTGO, os mesmos ratos foram submetidos ao teste de tolerância à insulina subcutâneo (TTISC), utilizando-se os procedimentos de coleta de sangue e processamento das amostras idêntico ao do item 4.1. Nesse caso, foi injetada insulina simples (30mU/100 g de peso) subcutâneo. Após a realização desse teste, os ratos foram sacrificados e descartados.

5. Determinações Bioquímicas

5.1. Glicose sérica

O método utilizado para a determinação da glicose sérica foi o enzimático (glicose oxidase), tendo como reativo fenol 2,5 mM, 4 (p-benzoquinona monoimino) fenazona 1,14 mM, tampão Tris 0,04 mM, glicose-oxidase 2,7 U/ml e peroxidase 0,33 U/ml. Os tubos contendo as amostras e padrão foram incubados por 15 min em banho a 37°C. A absorbância das amostras e dos padrões foram avaliadas em espectrofotômetro a 505 nm (HENRY, CANNON & WINKELMAN, 1974).

5.2. Proteínas Totais séricas

A determinação da concentração sérica de proteínas totais foi realizada através do método do reagente de biureto (sulfato de cobre a 10%), que utiliza a presença de íons Cu^{2+} 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-se a 0,1 ml de soro, 5,0 ml de reagente de biureto. As absorbâncias das amostras foram medidas em espectrofotômetro a 545 nm e as concentrações obtidas contra curva de calibração de proteínas totais (GORNALL, BARDAWILL & DAVID, 1949).

5.3. Albumina sérica

A concentração de albumina sérica foi determinada através do método colorimétrico do verde de bromocresol. Foram adicionados a 0,02 ml de soro, 5,0 ml de reagente de cor, contendo solução de verde de bromocresol 0,6 mM, tampão succinato 0,1 M, surfactante não-iônico 30% e com pH 4,0. 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, 1971).

5.4. Ácidos Graxos Livres séricos (AGL)

Para determinação desse substrato, foram adicionados em 0,3 ml de soro, 7 ml da mistura solvente clorofórmio; heptano; metanol, na proporção de 28:21:1, seguida de forte agitação e centrifugação a 700 rpm por um período de 5 min. O sobrenadante foi aspirado e a ele adicionada uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,05 mM, trietanolamiona 0,10 mM, NaOH 0,35 mM e NaCl 35% a pH 8,1, em seguida procedeu-se a uma nova agitação e centrifugação. A 3,0 ml do sobrenadante foram adicionados 0,5 ml de solução de dietilditiocarbonato de sódio (1 mg/ml de butanol secundário). A concentração de AGL foi medida a 435 nm contra curva de calibração de ácido palmítico (REGOW & CORNELISSEN, 1971).

5.5. Gordura hepática

Fragmentos 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 Na_2SO_4 e 7,0 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” (P_1) e “desconhecido” (D_1) e nesses foram adicionados 20 µl de solução de etoxilados de lanolina equivalentes a 10 g/l de lipídeos totais(utilizado como padrão para lipídeos) e 20 µl da amostra desconhecida (fração lipídica), respectivamente. Em seguida em cada tubo foi colocado 1,0 ml 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 este procedimento, juntou-se a esses tubos 2,5 ml do reagente fosfovanilínico (solução de vanilina a 9,02 mmol/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 (NOGUEIRA et al, 1990).

5.6. Glicogênio Hepático

Fragmentos de tecido hepático, foram processados de modo semelhante ao item 5.5. Após extração, as amostras foram centrifugadas e o precipitado suspenso em 25 ml de água deionizada. A 1,0 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 (SJÖRGREEN et al, 1938 & HASSID & ABRAHAM, 1957).

6. Insulina Plasmática

Os animais foram sacrificados por decapitação, recolhendo-se o sangue em tubos de vidro sem anticoagulante. O soro foi separado do sangue total por centrifugação a 700 rpm durante 15 min. Foram armazenados 3 ml a -20 °C para posterior determinação de insulina por radioimunoensaio (como descrito no item 7.4), bem como a avaliação de outros parâmetros bioquímicos.

7. Extração total de insulina

7.1. Conteúdo pancreático de insulina

Os ratos foram mortos por decaptação e o pâncreas retirado e colocado em 10 ml de solução extratora (15 ml de HCl e 985 ml de etanol a 75%). Logo após, os pâncreas foram homogeneizados em gelo e centrifugados (2500 RPM) a 0 °C durante 15 min. O sobrenadante foi coletado e seu pH corrigido para 8,5, e novamente foi Centrifugado e o sobrenadante armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio.

7.2. Conteúdo de insulina por ilhota

Após isolamento das ilhotas de Langerhans por digestão com collagenase, grupos de 20 ilhotas foram coletadas em 0,25 ml de água e sonicados (3 vezes com pulsos de 10 s). Aliquotas de 25 µl do homogeneizado foi adicionado 975 µl de tampão fosfato contendo albumina bovina (10 mg/ml) estocada a -20 °C, para posterior dosagem da insulina.

8. Estudos In Vitro

8.1. Isolamento das Ilhotas Pancreáticas

Dois ratos de cada grupo foram sacrificados por decapitação, tendo seus pâncreas excisados e suas ilhotas isoladas de acordo com o método proposto LACY e KOSTIANOVSKY (1967), modificado por BOSCHERO et al (1980).

Após a morte e laparotomia do animal, o ducto biliar comum foi canulado próximo ao hilo do fígado e ligado na sua posição distal adjacente ao duodeno. Através de cânula de polietileno, foi injetado 10 ml de solução de Hanks contendo glicose (2.8 mM) e colagenase 1 mg/ml, que fluindo através dos ductos pancreáticos em sentido contrário, promoveu a divulsão do tecido acinoso.

O pâncreas foi retirado livre do tecido acinoso e nódulos linfáticos, sendo a seguir, reduzido a fragmentos pequenos com o auxílio de uma tesoura. Posteriormente os fragmentos foram transferidos para um tubo de ensaio de 12 x 1,5 cm. Esses fragmentos foram incubados a 37°C durante aproximadamente 18 min. Após o período de incubação, o material foi agitado manualmente por 30 segundos e colocado em becker (de 80 ml) e adicionado Hanks (50 ml). Esse procedimento foi repetido 5 vezes para a remoção da colagenase, das enzimas digestivas liberadas durante a incubação e também dos fragmentos celulares. Um período de mais ou menos 2 min entre as lavagens foi necessário para proceder a decantação do material.

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

8.2. Microscopia eletrônica de transmissão

8.2.1. Fixação

Após isolamento de fragmentos de pâncreas exócrino e das ilhotas de Langerhans, os respectivos tecidos foram imersos em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,0%) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2 - 7,4)(acrescido de 0,03 g de cloreto de cálcio

para 1,5 litros de tampão a 0,2 M). Em seguida os tecidos foram cortados com lâmina de aço sob microscópio estereoscópico, permanecendo imersos na solução fixadora por aproximadamente 16 h. Posteriormente foram lavadas em 3 banhos de 40 min cada (no mesmo tampão utilizado na solução fixadora de imersão), e a seguir colocados em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% na solução tampão por um período de 3 h. Após este procedimento, os fragmentos foram lavados 2 vezes com água bidestilada, durante 10 min. Como terceiro fixador e contrastante foi utilizado acetato de uranila a 2% em solução aquosa, onde os fragmentos permaneceram por aproximadamente 16 h. Em seguida os fragmentos foram lavados em água destilada durante 5 min. Todos esses procedimentos foram realizados à 4 °C.

8.2.2. Desidratação

As amostras, após fixadas e cortadas, foram desidratadas a 4°C, por passagem numa série de concentração crescente de etanol ou seja: 30%, 50%, 70% e 90%; permanecendo 20 min em cada uma das soluções. A seguir as amostras foram lavadas 3 vezes em banho de etanol absoluto permanecendo 20 min em cada banho.

8.2.3. Infiltração e inclusão

Com o objetivo de possibilitar a infiltração da resina, as amostras foram lavadas à 4°C por uma solução 1:1 de etanol absoluto e óxido de propileno 100% por 15 min. Depois de desidratados e imersos em óxido de propileno, os fragmentos foram transferidos para a solução de infiltração. Esta solução foi constituída pelo óxido de propileno e pela resina de inclusão, misturados em diferentes proporções. As resinas de inclusão utilizadas foram:

1) mistura Poly/Bed 812 Araldite 502; ou 2) Araldite 502 pura. Os esquemas de infiltração para resina 1 foram: Poly/bed 812 - Araldite 502 + óxido de propileno(1:1) - 12 h; - Poly/Bed 812 - Araldite 502 - 4 h. Para a resina 2 foram: Araldite 502 + óxido de propileno nas proporções de 1:2; 1:1 e 2:1. Em cada solução, contendo as proporções indicadas, as amostras permaneceram por 1 h. Em seguida foram transferidos para Araldite 502 pura por 1 h a 37°C.

Durante a infiltração os espécimes permaneceram à temperatura ambiente, sob agitação (com exceção da última etapa quando foi utilizada a resina 2), em frascos abertos. Na etapa seguinte foi realizada a inclusão do material em moldes de silicone. As amostras incluídas na resina 1 foram transferidas para estufa à 70°C, onde permaneceram por 3 a 5 dias, para a completa polimerização. Já as amostras incluídas na resina 2 foram transferidas para estufa a 60°C, onde permaneceram por 3 dias, para a completa polimerização. A resina 1, isto é, mistura de Poly/Bed 812 e Araldite 502 foi padronizada no Centro de Microscopia Eletrônica do I.B. Unicamp, e consiste de, Araldite 502: 23,0g, Poly/Bed 812: 22,3g e DDSA 60 ml. Essa mistura é estável à temperatura ambiente durante alguns dias e, por semanas, se congelada. No momento de utilização da resina a mesma foi trazida à temperatura ambiente sendo adicionadas 4 gotas de DMP-30 para cada 5 ml da mistura da resina. A resina 2, isto é, Araldite 502 consistiu de, Araldite 502 10,0 g, DDSA 8,0 g, DMP-30 0,6ml e Ditutylphtalato 0,03 ml, sendo que essa resina foi sempre preparada no momento de uso, dada a sua facilidade de polimerização

8.2.4. Obtenção de cortes semifinos

Os blocos de resina contendo os fragmentos de pâncreas ou de ilhotas foram aparados com lâminas de aço de forma a originar a superfície

trapezoidal de corte, além de eliminar áreas de resina desprovidas de material pancreático.

Para a microscopia óptica cortes semifinos (0,5 - 1,0 μm de espessura) foram obtidos em ultra-micrótomo LKB Ultratome III (Super Nova), com a utilização de navalhas de vidro. Os cortes foram coletados e colocados em lâmina de vidro sobre uma gota de água, e a seguir em placa aquecida sendo a água em excesso removida com papel de filtro. Para a distensão e aderência dos cortes as lâminas foram transferidas para estufa 37°C, por 1 h. Os cortes foram então tratados por uma solução de azul de toluidina a 0,5%, em borato de sódio a 5%, por 1 a 2 min, mantendo-se as lâminas sobre uma placa aquecida (aproximadamente 80°C). A seguir os cortes foram lavados rapidamente em água destilada e secados em placa aquecida.

8.2.5. Obtenção de cortes ultrafinos e contrastação

Os cortes foram examinados em microscópio e fotografados em fotomicroscópio Zeiss. Através destes cortes selecionamos as áreas onde estavam presentes as células da ilhota de Langerhans, removendo-se as áreas sem interesse e conseqüentemente diminuindo a superfície de corte. Este procedimento facilitou a obtenção de cortes ultrafinos de melhor qualidade.

8.2.6. Obsevação dos cortes ultrafinos

A observação das amostras e das micrografias eletrônicas foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão, marca Zeiss modelo EM 9S2, operado a 60 KV, e obtidos com filmes Kodalith, Fuji ou Dupont.

8.3. Medida da secreção estática de insulina

Grupos de 100 a 150 ilhotas foram pré- incubadas durante 60 min, sob gaseamento constante com carbogênio (5% de CO₂ e 95% O₂) em solução de Krebs contendo 5,6 mM de glicose. A seguir, grupos de 5 ilhotas foram incubadas durante 60 min em solução de Krebs contendo concentrações crescentes de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 11,1; 16,4; 22,2; 27,0 e 33,4 mM); arginina e leucina (20,0 mM) ou ainda, concentrações crescentes de K⁺ (5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0 mM). Durante os 10 min iniciais de incubação, o pH foi equilibrado a 7,4 com carbogênio. Após a incubação, o sobrenadante foi armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina.

8.4. Dosagem da insulina

A insulina plasmática ou aquela secretada durante os diferentes experimentos “in vitro”, foi determinada por radioimunoensaio (HERBERT et al, 1965). 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 ¹²⁵I (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 ¹²⁵I para averiguação da radiação máxima.
- b) 3 tubos (Ligação não específica) contendo 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada ¹²⁵I 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; 0,39; 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) e 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 a 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 no plasma ou secretada durante os experimentos “in vitro”.

8.5. Captação de ^{45}Ca

Grupos de 180 a 200 ilhotas distribuídos em 3 tubos eppendorfs foram pré-incubados, durante 30 min, em solução de Krebs modificado, tamponado com 10 mM de HEPES, pH 7,4, contendo 2,8 mM de glicose e

gaseado com oxigênio puro. Após este período, as ilhotas foram incubadas por 5 ou 90 min, em 100 µl de solução de Krebs contendo $^{45}\text{CaCl}_2$ (60 µCi/ml) e glicose em concentrações crescentes (2,8; 8,3 e 16,7 mM) ou arginina (20 mM). Após incubação, o sobrenadante de cada frasco foi transferido para outros três tubos eppendorfs, para posterior preparo do padrão externo ou máximo (MAX). Imediatamente após retirada do sobrenadante das diferentes situações experimentais (5 ou 90 min de incubação), a reação foi interrompida pela adição, em cada tubo eppendorf, de 0,9 ml de solução de LaCl_3 a uma concentração final de 2,0 mM, a 0 °C e pH 7,4. Os tubos contendo as ilhotas e a solução de LaCl_3 foram mantidos durante 60 min a 0 °C. O sobrenadante foi descartado e as ilhotas lavadas 3 vezes com a solução de LaCl_3 a 0 °C. As ilhotas foram então, transferidas para placas de Petri pequenas (5 cm de diâmetro) e recoletadas em grupos de 10 e transferidas para frascos de polietileno contendo 0,5 ml de solução de EGTA (0,5 mM). Todas as etapas pós-incubação foram executadas a baixa temperatura (0 °C). De cada uma das placas de Petri, foi tomado um volume de líquido igual ao transportado junto com as ilhotas durante a coleta (em duplicata). Esse volume, serviu para a avaliação da radioatividade contida no meio (BG).

O valor do MAX foi obtido através da avaliação da radioatividade contida em 1 µl do sobrenadante radioativo (meio de incubação), em triplicata, para cada situação experimental. A cada frasco de polietileno foi adicionado 6 ml de líquido de cintilação, sendo a radioatividade medida em contador de partículas beta. A quantidade de cálcio incorporado por ilhota foi calculada pela multiplicação de um fator F pelo número de cpm de cada frasco, após a subtração do (BG) correspondente. O fator F foi obtido pela seguinte equação:

$$F = \frac{40000}{\text{cpm do MAX} \times 10}$$

Na fórmula:

40000 = quantidade em picogramas de Ca^{2+} contida em $1,0 \mu\text{l}$
do meio de incubação (conc. do $\text{Ca}^{2+} = 1,0 \text{ mM}$);

cpm(MAX) = número de radiações por min obtido em $1,0 \mu\text{l}$
do meio de incubação;

10 = número de ilhotas em cada frasco

Os resultados foram expressos em picomol Ca^{2+} /ilhotas por min. Para isso, dividiu-se os valores obtidos em picogramas pelo peso molecular do Ca^{2+} .

8.6. Efluxo de ^{45}Ca

Para a análise do efluxo do ^{45}Ca , grupos de 100 a 150 ilhotas foram incubadas por 60 min em solução de Krebs contendo 16,7 mM de glicose e 10 a 20 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^{45}\text{CaCl}_2$. Durante os 10 min iniciais de incubação, o pH foi equilibrado com carbogênio. Após a incubação, as ilhotas foram lavadas duas vezes com Krebs e imediatamente transferidas para 4 câmaras de perfusão contendo filtro millipore SW1300 (poro $8 \mu\text{m}$). 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. As amostras do perfusato foram coletadas em frascos de polietileno, a intervalos regulares de 1 ou 2 min. A radioatividade contida no efluente de cada frasco foi medido em contador de partícula beta.

8.7. Efluxo de ^{86}Rb

Para a análise do efluxo do ^{86}Rb (utilizado como substituto do K^+), grupos de 100 a 150 ilhotas foram incubados por 90 min em solução de Krebs

contendo 16,7 mM de glicose e 19 a 30 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^{86}\text{RbCl}_2$. Durante os 10 min iniciais de incubação, o pH foi equilibrado com carbogênio. Após a incubação, as ilhotas foram lavadas duas vezes com Krebs e imediatamente transferidas para 4 câmaras de perfusão contendo filtro millipore SW1300 (poro de 8 μm). As câmaras foram conectadas a um sistema de perfusão constituído por 4 recipientes ligados por intermédio de catéteres a uma torneiras de 2 vias. As soluções perfusoras, contendo diferentes substâncias presentes nos recipientes foram mantidas a 37°C e equilibradas com carbogênio durante toda a perfusão. A razão de fluxo do sistema perfusão foi de 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. A radioatividade contida no efluente de cada frasco foi medido em contador de partícula beta e expresso em (cpm).

A apresentação dos resultados tanto para o efluxo de ^{45}Ca como para o ^{86}Rb (cpm) foi expresso como a razão fracional do efluxo, a qual indica a porcentagem do conteúdo total de radioatividade contida na ilhota que foi liberada em cada intervalo de coleta 1 min ou 2 min.

8.8. Metabolismo da Glicose

A oxidação da glicose nas ilhotas isoladas foi avaliada através da determinação da oxidação da D-[U- ^{14}C]glicose em $^{14}\text{CO}_2$ (MALAISSE et al., 1974). Para isso, grupos de 15 ilhotas foram coletados e transferidos para tubos de ensaio com volume aproximado de 0,7 ml contendo solução de KREBS. A seguir o meio de coleta foi descartado sendo introduzido 75 μl do meio de incubação (solução de Krebs) contendo 2,8; 8,3 e 16,7 mM de glicose e traços de D-[U- ^{14}C]glicose (10 $\mu\text{Ci/ml}$). Paralelamente, preparou-se para cada condição experimental, 3 tubos-controle que receberam os respectivos meios de incubação com a glicose 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 HCl a 0,1 N, para interromper a oxidação, e 0,5 ml de NaOH 1,0 N 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 pelo NaOH, 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:

$$F = \frac{\{G\} \times 10^{-3}}{15 \times \text{cpm (MAX)}}$$

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:

[G] = concentração molar da glicose no meio de incubação;

15 = número de ilhotas em cada tubo de ensaio
cpm (MAX) = número de radiações por min obtido em
em 1 μ l do meio de incubação.

8.9. Reagentes e Soluções

8.9.1. Reagentes

Todos os sais e vitaminas utilizados, bem como a glicose e demais substâncias adicionadas ao meio de isolamento e/ou incubação possuíam grau analítico de pureza (p.a). Albumina bovina V, tolbutamida, diazoxida, cetoisocaproato, isometilbutilxantina, E.G.T.A.(ácido etileno glicol tetracético) e éster de forbol 12,13 dibutirato, glutaraldeído e tetróxido de ósmio foram obtida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, M.O.). Citrato de chumbo, acetato de uranila e tolueno foram obtidos da Merk. Araldite foi obtida da Poly Science Inc. Warrington. Colagenase P, foi obtida da Boerinbger. Arginina e leucina foram obtidas da Fluka. Oxitremorina-m, obtida da R.B.I.(Research Biochemicals International; carvão ativado da Pfanstiehl Laboratories, Illinois; dextran 70 da Pharmacia. Os radiosótopos ^{86}Rb , ^{45}Ca , glicose uniformemente marcada (^{14}C), insulina marcada (^{125}I), omnifluor e frascos de polietileno para contagem de radiação beta, foram obtidos da New England Nuclear Corp. (Boston, M.O.) e os tubos para radiação gama foram obtidos da Becton Dickinson, New Jersey. Os anticorpos anti-insulina foram doados pela Dra LECLERCQ-MEYER (Faculdade de Medicina da Universidade Livre de Bruxelas). Insulina padrão foi obtida da Novo Nordisk, Dinamarca. Tinovetin foi obtido da Coema Produtos Industriais e Tecnologia, Ltda.

8.9.2. Soluções

As soluções estoques comumente empregadas nos experimentos obedeceram as seguintes composições:

Quadro 4 - Composição das Soluções

Solução de HANKS*		Solução de KREBS	
Componentes (g/l)		Componentes (g/l)	
NaCl	8,00	NaCl	26,886
KCl	0,40	NaH ₂ PO ₄	8,065
CaCl ₂	0,14	KCl	1,491
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0,20	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,613
NaH ₂ PO ₄	0,48	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,588
KH ₂ PO ₄	0,06	H ₂ O dest. qsp	1,00 L
NaHCO ₃	0,35		
H ₂ O dest.	qsp 1,00 L		

* no momento do uso foram adicionados 0,5 g/l de glicose (2,8 mM).

No momento de utilização das soluções a composição iônica final foi de: 141,5 mM de Na⁺, 5,8 mM de K⁺, 1,3 mM de Ca²⁺, 0,8 mM de Mg²⁺, 143,6 de Cl⁻, 4,2 mM de HCO₃⁻, 0,3 mM de HPO₄²⁻, 0,8 mM de SO₄²⁻ e 0,4 mM de H₂PO₄⁻ para solução de Hanks; e 139,0 mM de Na⁺, 5,0 mM de K⁺, 1 mM de Ca²⁺, 1 mM de Mg²⁺, 123,6 mM de Cl⁻, e 24 mM de HCO₃⁻ para a solução de Krebs. Para os protocolos onde utilizamos arginina e concentração elevada de cálcio o pH e osmolaridade da solução foram corrigidos.

8.9.3 Líquido de Cintilação

Componentes	Concentração
Tolueno .	70%
Tinovetin	30%
Omnifluor	400 mg/ml

9. Análise Estatística dos Dados

Para avaliar a magnitude da variação do efluxo do ^{86}Rb e do ^{45}Ca calculou-se, para cada experimento, a diferença entre os valores registrados depois da alteração da condição experimental (min 40) e os esperados, calculados pela extrapolação da curva exponencial, baseada nos valores obtidos antes da alteração (min 22 ao 40). O mesmo procedimento foi mantido quando a droga foi retirada do meio (min 60). Existe uma relação entre o efluxo do referido isótopos e seu conteúdo no interior das ilhotas de langerhans, que pode ser descrita pela equação:

$$E = a \times e^{b \times t} \quad (1)$$

Onde E é igual ao efluxo do referido isótopos, a e b são constantes definidas exponencialmente, t indica o tempo e e o número de Euler. Para avaliarmos este parâmetro realizamos uma análise de regressão linear simples, após a aplicação de logaritmo neperiano (ln) em ambos os termos da equação (1), (COSTA NETO, 1977), assim:

$$\ln E = \ln a + b \times t \quad (2)$$

Estimando-se os coeficientes a e b pelo método dos mínimos quadrados, calcula-se o efluxo esperado e avalia-se a significância estatística pela aplicação do teste t de Student, sendo os resultados expressos como média e seus respectivos erros padrões. As tabelas A-1, A-2 e A-3, foram confeccionadas a partir do tratamento acima citado admitindo-se como não significativo valores de $p > 5\%$. O tratamento estatístico para os demais, foi realizado através do teste t de Student e/ou análise de variância, sendo pré-fixado o nível de significância para 5%.

Para obtenção da área nas figuras de efluxo, calculamos uma curva exponencial teórica baseada nos 10 primeiros pontos do efluxo (min 20 a 40). Em seguida fizemos a diferença entre a curva exponencial teórica e a obtida experimentalmente e integramos para obter a área correspondente. A área calculada foi expressa em percentual de variação da diferença entre as duas curvas.

Resultados

1. Avaliação do estado nutricional dos animais

Os ratos jovens mantidos dos 21 aos 90 dias com a dieta hipoprotéica, apresentaram peso corporal (tab. I) e teor sérico de albumina (tab. II) menores do que aqueles mantidos com dieta normoprotéica. Em contraste com o baixo peso corporal apresentado pelo grupo de animais hipoprotéicos, não houve diferença ($p > 0,05$) na ingestão alimentar entre os dois grupos experimentais. Também não ocorreu edema em ratos de qualquer dos grupos. O conteúdo hepático de glicogênio e de gordura mostraram-se significativamente mais elevados nos animais hipoprotéicos do que nos normoprotéicos (tab. II). Os níveis séricos de proteína total, de glicose e de ácidos graxos livres não diferiram entre os dois grupos experimentais (tab. II).

Tabela I Peso corporal (g) dos animais durante o período experimental.

Grupos	Pesos		
	7º dia	30º dia	70º dia
Dieta com 25% de proteína	74,5 $\pm$ 11,9	133,6 $\pm$ 21,5	222,4 $\pm$ 32,5
Dieta com 6% de proteína	78,4 $\pm$ 13,9	88 $\pm$ 10,5*	107,7 $\pm$ 25,6*

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 20 animais por grupo.

* Diferença significativa ($P < 0,05$) em relação à dieta com 25% de proteína.

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

Parâmetros	dieta com 25% de proteína	dieta com 6% de proteína
Proteínas séricas totais (g/dl)	6,8 ± 0,5	6,7 ± 0,3
Albumina sérica (g/dl)	3,5 ± 0,1	3,3 ± 0,1*
Glicose sérica (mg /dl)	95,8 ± 12,8	111,1 ± 27,2
AGL séricos (mM)	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Glicogênio hepático (mg glicose/100mg tecido)	0,7 ± 0,1	11,4 ± 0,1*
Gordura hepática (g AG/100g tecido)	7,0 ± 0,5	12,3 ± 0,9*

Resultados expressos como média ± desvio padrão de 10 animais por grupo exceto para gordura hepática onde cada grupo contém 8 animais.

* Diferença significativa (P < 0,05) em relação à dieta com 25% de proteína.

1.1 Composição corpórea

A fig.1 apresenta os parâmetros de composição corpórea de ratos normo e hipoprotéicos. Os animais submetidos a dieta normoprotéica apresentaram aumento em todos os parâmetros avaliados, ou seja: peso 3,0 vezes, conteúdo de água 4,29 vezes, gordura corporal 2,1 vezes e peso magro 3,6 vezes maior que os animais hipoprotéicos (p < 0,05).

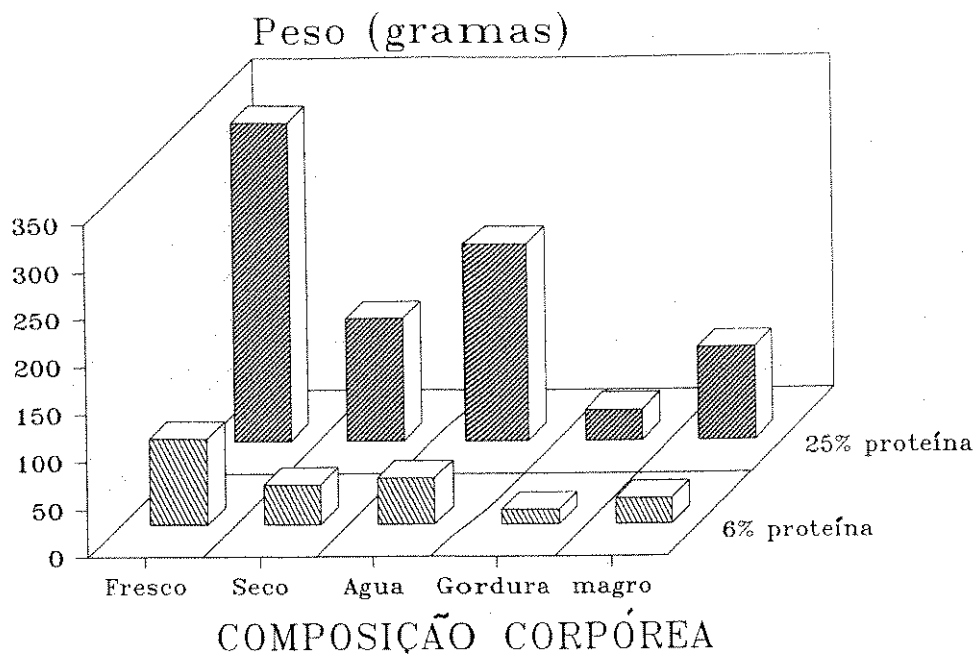


FIGURA 1

Avaliação das carcaças de animais normo (barras escuras) e de animais hipoprotéicos (barras claras). Os animais foram sacrificados e em seguida eviscerados pela remoção do estômago e intestinos. Nas carcaças assim obtidas foram mensurados peso corpóreo fresco, peso corpóreo seco, água corpórea total, peso seco em gordura e peso seco sem gordura. Os resultados foram expressos como médias com n de 8 para ambos grupos experimentais.

O conteúdo total de Na^+ foi de $10,9 \pm 2,5$ mEq/g para os animais normoprotéicos e de $18,5 \pm 3,5$ mEq/g para os hipoprotéicos, ($p < 0,05$). Com relação ao K^+ encontramos $99,0 \pm 20,7$ mEq/g para os animais-controle e $93,0 \pm 21,2$ mEq/g para os hipoprotéicos. Também observamos que a relação Na^+/K^+ está ligeiramente aumentada nos animais submetidos a dieta hipoprotéica ($n=8$ para ambos os grupos).

2 Avaliação do estado glicêmico dos animais

2.1 Teste de Tolerância à Glicose Oral

A fig. 2 mostra que a glicemia de jejum foi semelhante para ratos normo e hipoprotéicos. Decorridos 30 min de administração da sobrecarga de glicose (2 g/kg de peso), os níveis glicêmicos foram significativamente maiores em relação aos seus respectivos basais nos dois grupos. Os valores da glicemia retornaram aos níveis basais 90 min após a sobrecarga de glicose em ambos os grupos, não diferindo entre si ao longo do teste ($n=15$ para o grupo normoprotéico e $n= 11$ para o hipoprotéico).

2.2 Teste de tolerância à insulina subcutâneo

A fig.3 mostra que a administração subcutânea de insulina (30 mU/100 de peso), provocou redução da glicemia nos animais normo e hipoprotéicos após 30 min. Esse efeito persistiu por aproximadamente 90 min, com a glicemia retornando aos valores basais após 240 min. Não foram constatadas diferenças nos níveis glicêmicos entre os 2 grupos nos tempos analisados ($n=6$ para ambos os grupos experimentais).

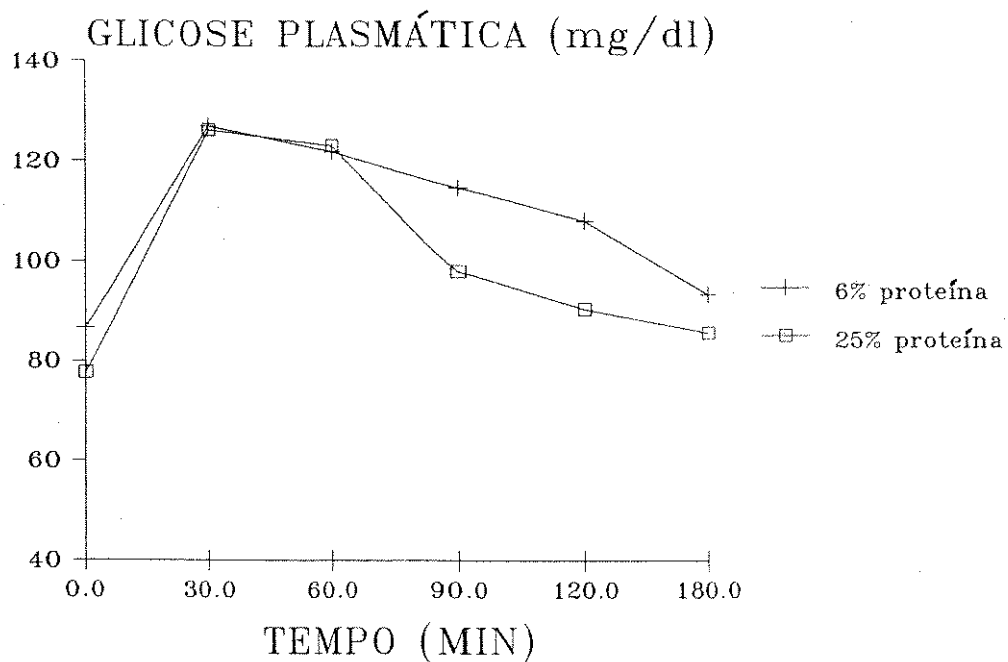


FIGURA 2

Níveis de glicose plasmática durante o teste de tolerância à glicose oral (2g/Kg de peso) em ratos normoprotéicos (□) e hipoprotéicos(+). Os resultados foram expressos como médias $\pm$ epm (erro padrão da média), sendo o n de 13 e 10 para os animais normo e hipoprotéicos, respectivamente.

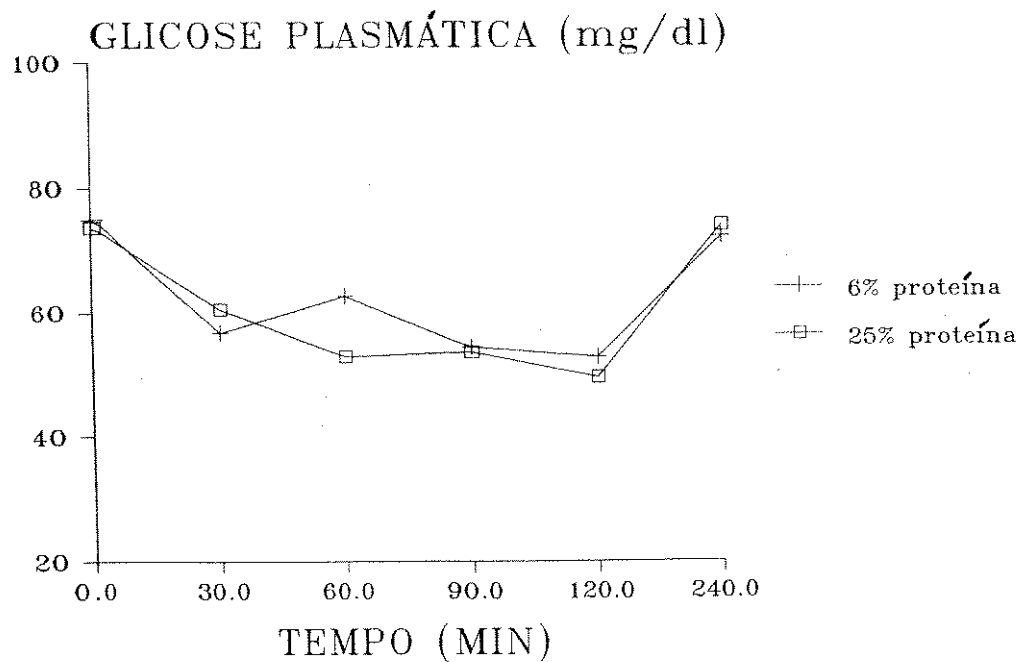


FIGURA 3

Níveis de glicose plasmática (mg/dl) durante o teste de tolerância à insulina (administrado subcutâneo 30 mU/100g de peso) em ratos normoprotéicos (□) e hipoprotéicos(+). Os resultados foram expressos como medias $\pm$ epm, sendo o n de 6 para os animais normoprotéicos e 6 para os animais hipoprotéicos.

2.3 Insulina plasmática

Os valores de insulina plasmática de animais em jejum não diferiram, sendo $0,94 \pm 0,1$ (n=6) e de $0,71 \pm 0,2$ ng/ml (n=6) para os normo e hipoprotéicos respectivamente. Quando alimentados, a insulina plasmática atingiu $1,93 \pm 0,6$ e $0,70 \pm 0,2$ ng/ml para os animais normo e hipoprotéicos, respectivamente ($p < 0,05$). Contudo, a relação insulina/massa corporal não foi diferente entre os dois grupos experimentais (n=17 para os animais normo e n=19 para os hipoprotéicos).

2.4 Extração de insulina

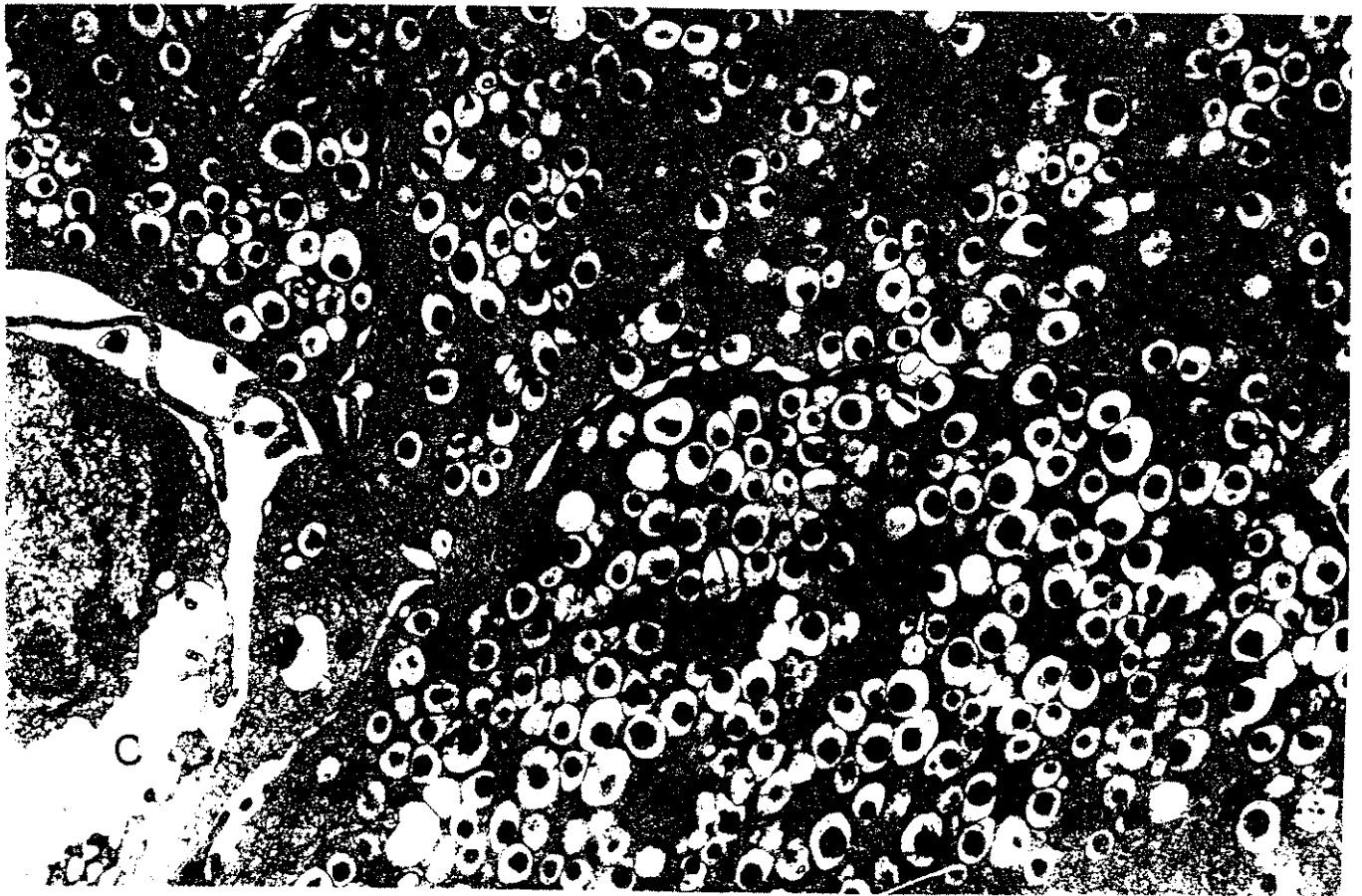
O conteúdo total de insulina do pâncreas foi de $73,2 \pm 15,7$ µg/ml para os ratos normoprotéicos e de $30,5 \pm 5,6$ µg/ml nos hipoprotéicos, ou seja, 2,4 vezes maior nos animais-controle quando comparado com os hipoprotéicos. Todavia quando a insulina foi expressa como percentual da massa corporal essa relação se inverteu. Nesse caso, o conteúdo foi 1,32 vezes maior nos pâncreas hipoprotéicos quando comparado com o controle (n=4 para ambos os grupos em estudo). A extração de insulina de ilhota isolada foi de $238,7 \pm 27,2$ e de $102,0 \pm 14,6$ ng/ml para as ilhotas de animais-controle e hipoprotéicos, respectivamente. Novamente observamos redução no conteúdo total de insulina nas ilhotas desnutridas quando comparadas com as ilhotas-controle ($p < 0,05$, n=4 para ambos grupos).

3-Microscopia Eletrônica: Características estruturais

3.1 Ratos normoprotéicos

A ultraestrutura das ilhotas de Langerhans dos ratos normoprotéicos, e em particular das células B, mostrou cordões de células organizadas em torno dos capilares, com nítida polarização. A Fig. 4 mostra os núcleos das células na face basal, o aparelho de Golgi localizando-se na região supra-nuclear e os grânulos de secreção concentrando-se apicalmente, ou seja, junto à face vascular (fv). As mitocôndrias estavam distribuídas por toda a volta do núcleo, porém com localização supra-nuclear preferencial (Fig. 4 e 5). As mitocôndrias em geral apresentaram formas alongadas e matriz eletrodensas. Os núcleos das células apresentavam contorno irregular, com cromatina condensada junto à membrana. Em geral apresentaram nucléolo central ou sub-central (Fig.4).

Os grânulos de secreção apresentaram as características ultraestruturais normais, ou seja, núcleo cristalóide eletrodenso e halo claro perimembranoso. A quantidade e distribuição dos grânulos secretores foi normal, confluindo para o polo vascular (Fig.4). Nas fotos de maior aumento foi possível observar o perfil das cisternas do retículo endoplasmático rugoso infiltrando-se entre os grânulos secretores e as mitocôndrias (Fig.5). Os limites entre as células B foram facilmente visíveis e freqüentemente o espaço intercelular ampliava-se, formando verdadeiros canais entre as células (Fig.5). O endotélio dos capilares apresentou características de grande permeabilidade, evidenciáveis pelos inúmeros poros, fenestrações e adelgaçamento do citoplasma.

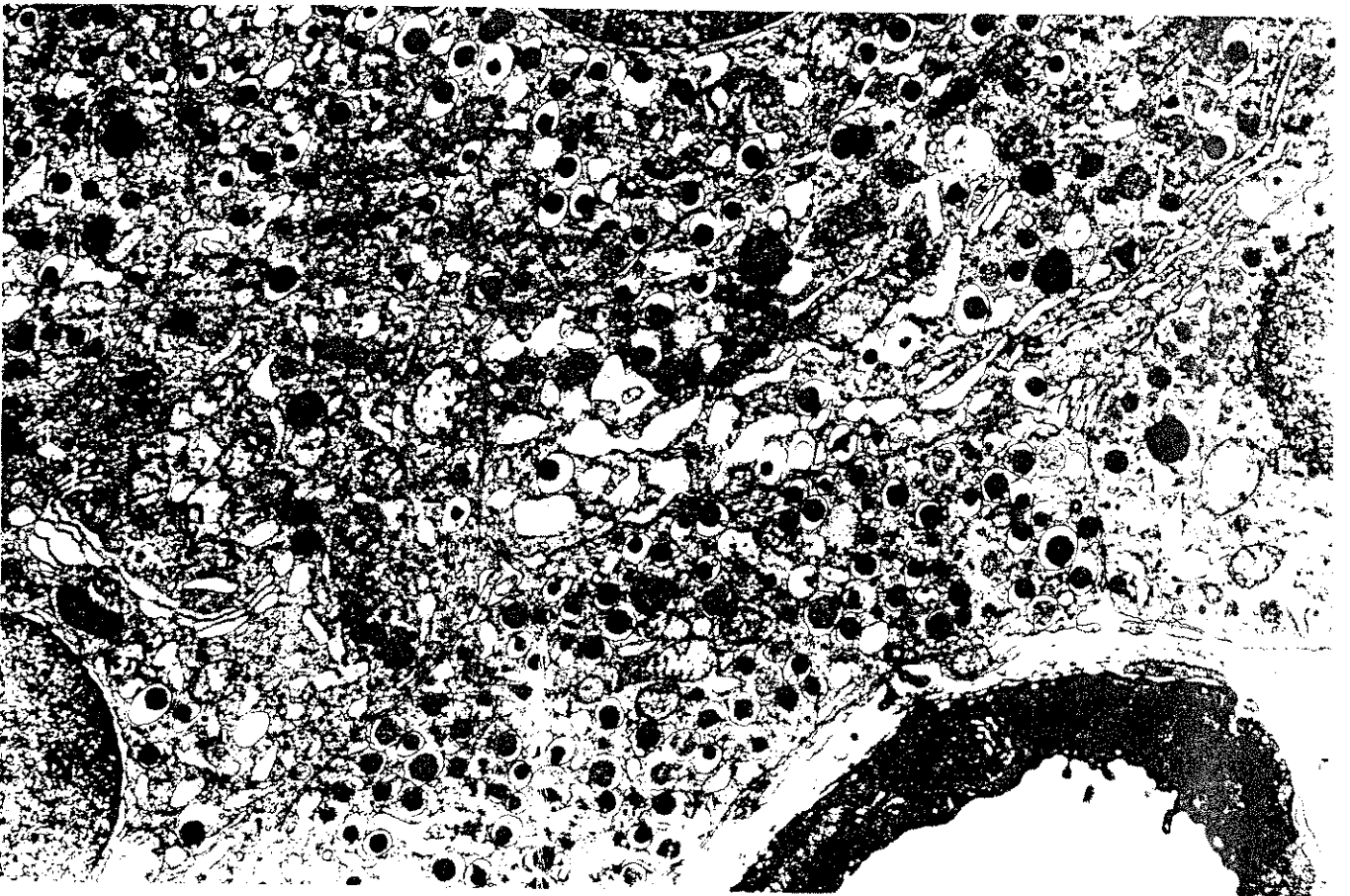
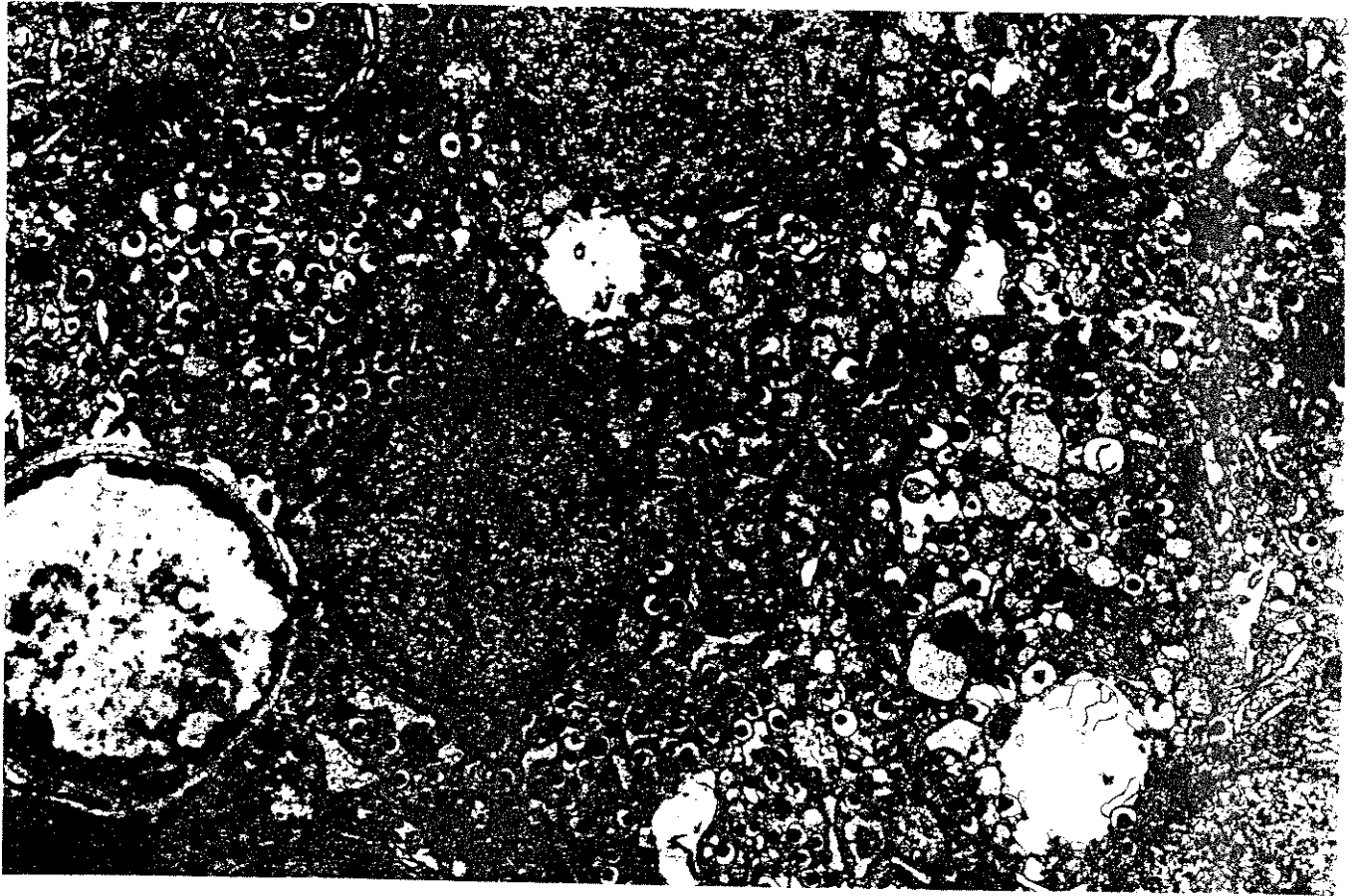


3.2 Animais hipoprotéicos

Nos animais submetidos à dieta hipoprotéica a arquitetura dos cordões celulares das células B aparenta desorganização devido à pouca visibilidade dos espaços intercelulares, dando um aspecto compacto ao tecido endócrino. As células B apareceram com volume menor, o que fica claro pela presença de maior número de células nas micrografias quando comparada às micrografias de mesmo aumento dos ratos-controle. Via de regra, não foram evidenciados os nucléolos, embora a cromatina fosse delicada (Fig.6).

Como característica importante, muitas células não exibiram polaridade. As organelas citoplasmáticas não mantiveram a posição convencional das células epiteliais secretoras. A fig.6, mostra bem esse desarranjo, pois os núcleos das células B estão colocados no polo capilar, ao invés de situados basalmente. Outra característica notável foi a diminuição dos grânulos secretores, além disso, muitos deles tinham aspecto de grânulos precursores imaturos, ou seja, com menor eletrodensidade do que usual, evidenciados pelas diferentes tonalidades de cinza e pelo aspecto granular mais frouxo (Fig.6 e 7). Muito embora observássemos células com retículo endoplasmático rugoso formando algumas cisternas paralelas e bem organizadas (Fig.7), o padrão mais comum foi o de cisternas curtas ingurgitadas, com conteúdo floculento (Fig. 6 e 7). Na verdade essas cisternas ingurgitadas mais parecem os vacúolos de condensação (fase imatura) dos grânulos de secreção, que habitualmente seriam encontrados na face cis do aparelho de Golgi, na condição de pré-grânulos de insulina.

Outros aspectos digno de nota, observado nas ilhotas de Langerhans dos animais hipoprotéicos, foram a degeneração mitocondrial evidenciada pela rarefação das cisternas, matriz eletrolusente e edema importante que levou a alteração de sua forma alongada para redonda. Por



outro lado o aparelho de Golgi apresentou-se desenvolvido (Fig. 6, 7 e 8) com inúmeras vesículas de transporte situadas na face trans do Golgi (Fig. 6 e 8). Além disso podemos observar que o endotélio capilar apresentou uma nítida diminuição no número de fenestrações das células, aliado ao aumento da espessura da parede dos capilares e de um aspecto mais denso no citoplasma (Fig. 6 a 8), indícios de permeabilidade diminuída.

4. Metabolismo da glicose

Na fig. 9 observamos que as ilhotas obtidas de ratos hipoprotéicos, quando em presença de 8,3 e 16,7 mM de glicose apresentaram, respectivamente, um consumo de glicose 3,6 e 7,6 vezes maior que o consumo basal, registrado em 2,8 mM de glicose ($p < 0,05$). O aumento do consumo de glicose observado nas ilhotas-controle, nas concentrações de glicose acima citadas, foi de 2,1 e 2,9 vezes o consumo basal, respectivamente ($p < 0,05$). Esses dados indicam que tanto o consumo basal (2,8 mM de glicose) quanto o consumo estimulado por 8,3 e 16,7 mM de glicose foram significativamente maiores nas ilhotas de animais hipoprotéicos em relação as ilhotas-controle.

5. Efeito de diferentes agentes sobre o efluxo do ^{86}Rb

A fig. 10(A e B), ilustra o efeito de concentrações crescentes de glicose (0-16,7 mM) sobre o efluxo fracional do ^{86}Rb de ilhotas de ratos hipoprotéicos (A) e normoprotéicos (B). Inicialmente as ilhotas foram perfundidas com meio contendo 2.8 mM de glicose. Durante o período compreendido entre o 40° e 60° min a glicose foi retirada do meio perfusor e observamos elevação na taxa de efluxo ^{86}Rb nos dois grupos em estudo. quando a glicose foi aumentada para 8,3 mM ou 16.7 mM a taxa do referido

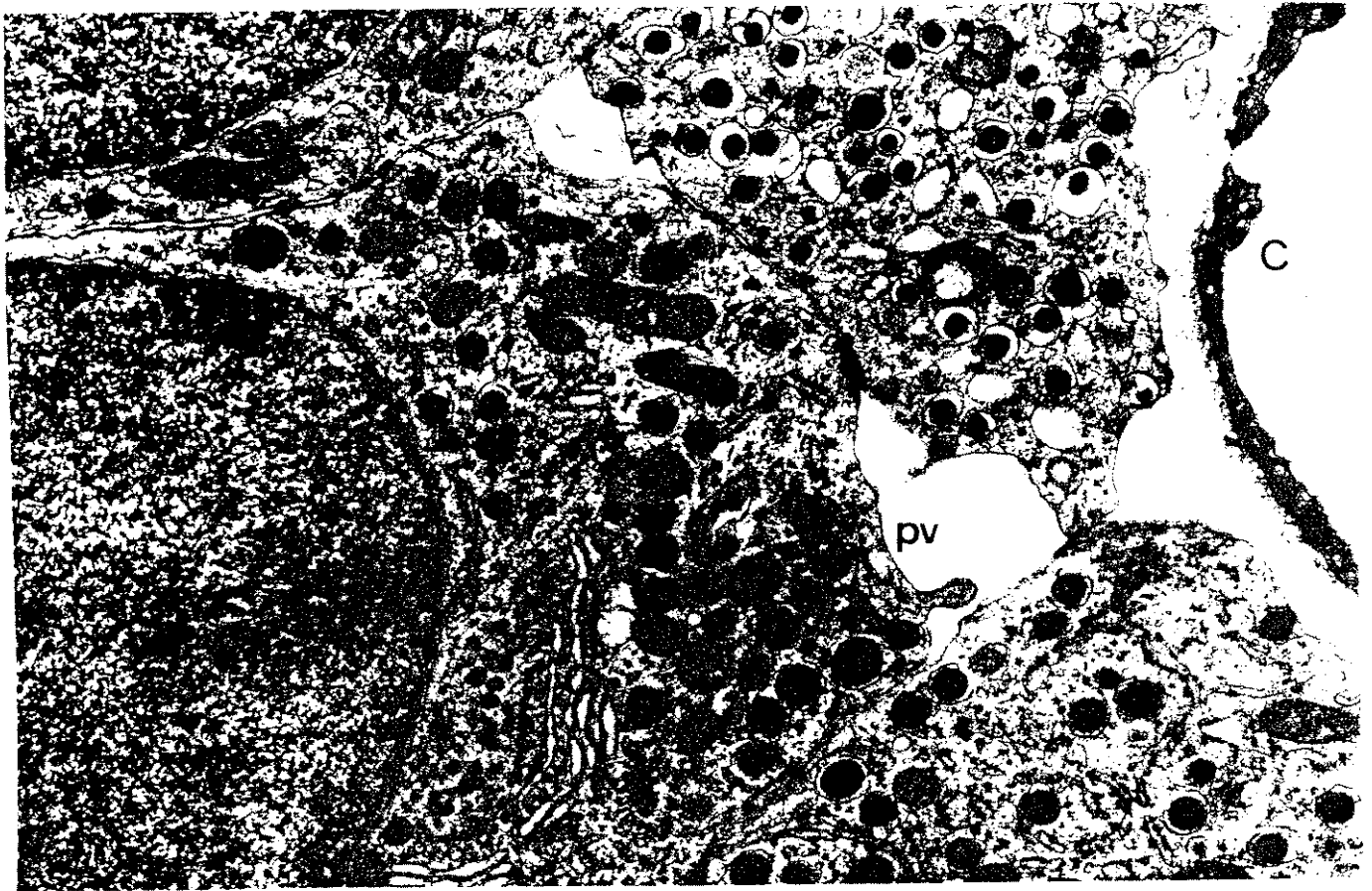


FIGURA 8

Micrografia eletrônica de células B de ilhotas de Langerhans provenientes de ratos hipoprotéicos. No detalhe notamos as relações células endócrinas/capilar (C). Observa-se também o núcleo (N) com cromatina frouxa, sem nucléolo, complexo de Golgi (G) supranuclear com inúmeras vesículas de transporte na face trans; mitocôndrias (m) e polo vascular (pv). 20800X

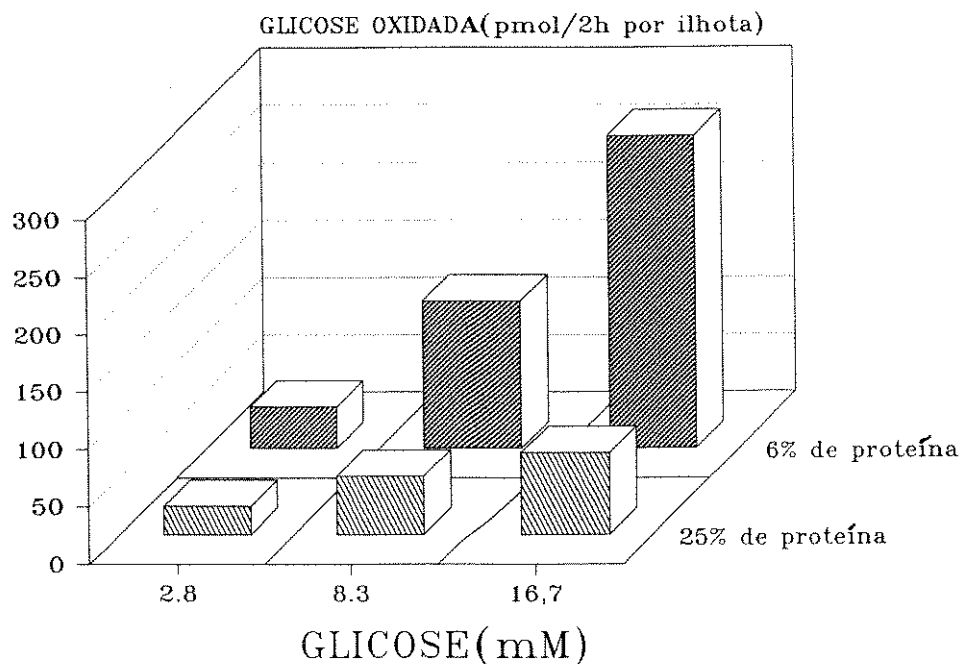


FIGURA 9

Oxidação de glicose por ilhotas provenientes de animais normoprotéicos (barras claras) e hipoprotéicos (barras escuras). As ilhotas foram incubadas em meio contendo diferentes concentrações de glicose e traços de D-[U- 14 C]glicose, durante 120 min. Após este período o $^{14}\text{CO}_2$ liberado pelas ilhotas foi avaliado através de cintilação líquida. As barras indicam a média dos valores obtidos em 20 e 29 experimentos (n) para as ilhotas-controle e de 27 a 31 experimentos para as ilhotas de animais hipoprotéicos.

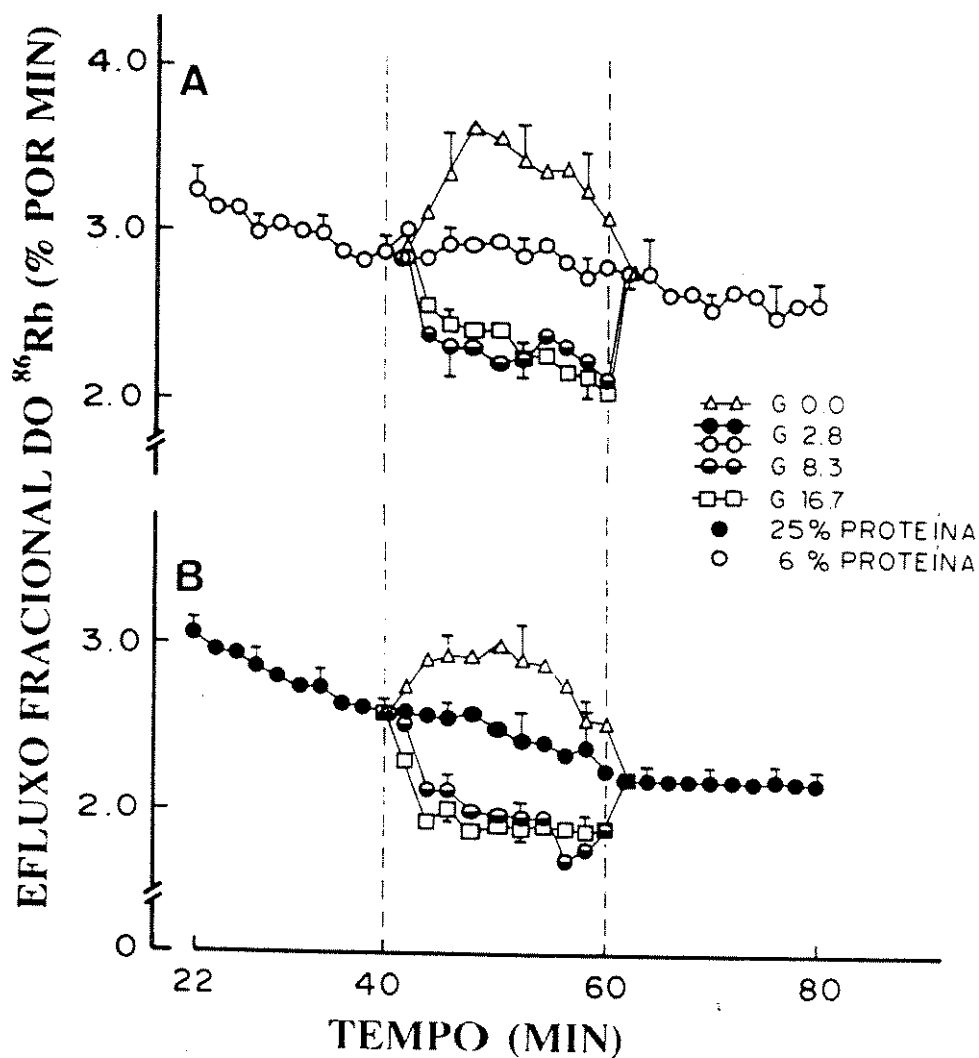


FIGURA 10

Efeito da glicose sobre o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas de animais hipoprotéicos (A) e normoprotéicos (B). As ilhotas foram previamente marcadas com o isótopo durante 1 h em presença de 16.7 mM de glicose. A seguir, as foram perfundidas em solução de Krebs contendo 1 mM de Ca^{+2} e diferentes concentrações de glicose, como indicado na figura. As linhas pontilhadas verticais indicam o momento no qual as alterações na concentração de glicose foram efetuadas (intervalo de 40 a 60 min). Os círculos indicam a média $\pm$ epm. O número de experimentos foram de n=6 e n=4 na ausência de glicose, n=10 e n=14 na presença de 2.8 mM, n=6 na presença de 8.3 mM e n=8 e n=6 na presença de 16.7 mM glicose, para os grupos normoprotéicos e hipoprotéicos, respectivamente.

isótopo sofreu uma nítida redução tanto nas ilhotas-controle quanto nas hipoprotéicas. A partir do 61° até o 80° min de perfusão, a concentração de glicose voltou aos valores basais, isto é, 2.8 mM. A análise estatística (vide metodologia e apêndice) revelou que os dois grupos de ilhotas responderam à retirada ou ao aumento da concentração de glicose no meio (min 40 - 60) com igual magnitude, como ilustra a fig. 10-a.

A fig. 11 (A e B) ilustra o efeito do bloqueador dos canais K_{ATP} (tolbutamida 20 μ g/ml) sobre o efluxo do ^{86}Rb (A) e a secreção de insulina (B) de ilhotas- controle ilhotas de animais hipoprotéicos. Tolbutamida reduziu significativamente o efluxo do ^{86}Rb de ambas as ilhotas. Esse efeito foi revertido pela retirada da droga do meio, contudo o retorno aos valores basais, foi mais rápido nas ilhotas-controle (min 60-80).

A fig. 11 B, mostra que a tolbutamida também aumentou a secreção de insulina de ambos os tipos de ilhotas. contudo, a velocidade e a magnitude desse aumento foi significativamente maior nas ilhotas-controle, quando comparadas àquelas provenientes de animais hipoprotéicos. Podemos verificar ainda que a secreção basal nas ilhotas- controle (min 22 a 40 e 60 a 80) foi também maior do que em ilhotas de animais hipoprotéicos. Outro ponto a destacar, é que a resposta secretória foi mais rápida nas ilhotas-controle quando comparadas com as ilhotas de animais hipoprotéicos.

A introdução de diazoxida (20 μ g/ml) no meio perfusor (min 40 a 60), provocou um aumento significativo na taxa de efluxo do ^{86}Rb em ambos os grupos experimentais (Fig. 12 A e a). O aumento do efluxo observado nas ilhotas- controle foi 2,2 vezes maior, quando comparado com às ilhotas de animais hipoprotéicos, como pode ser observando na fig. 12-a, que representa a área correspondente ao aumento na taxa do efluxo de ^{86}Rb , provocado pela diazoxida.

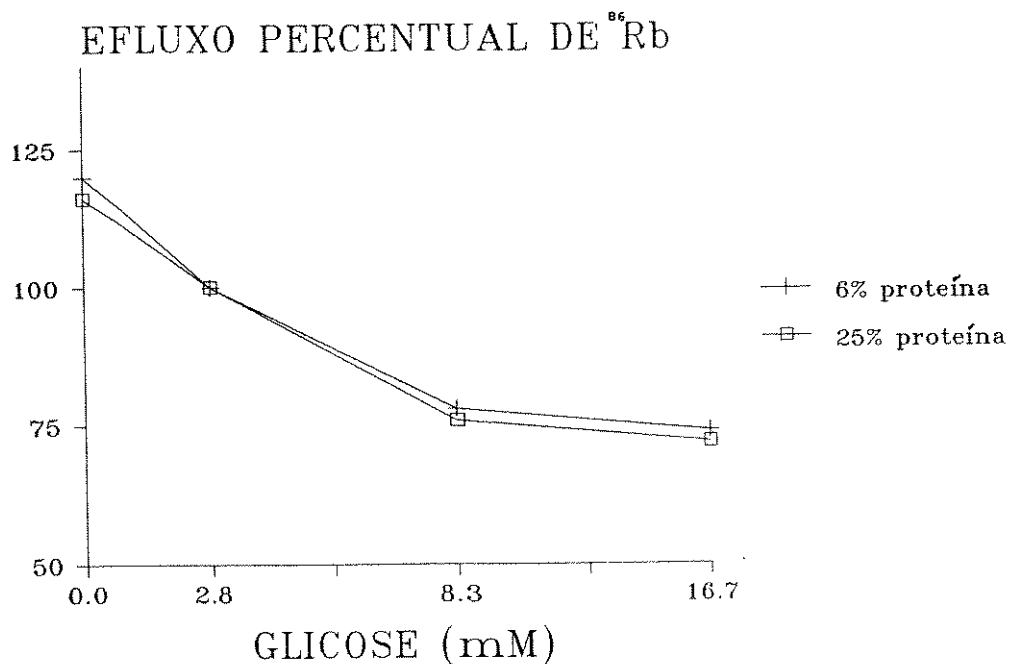


FIGURA 10 a

Mostra a comparação percentual de efluxo de ^{86}Rb de ilhotas de animais normoprotéicos (□) e hipoprotéicos (+), referente a fig. 10. O percentual de efluxo foi obtido a partir da média dos 10 valores de efluxos entre os min 40 e 60. A concentração basal de 2.8 mM de glicose, representou o percentual (100%) de referência para obtenção das outras condições de glicose.

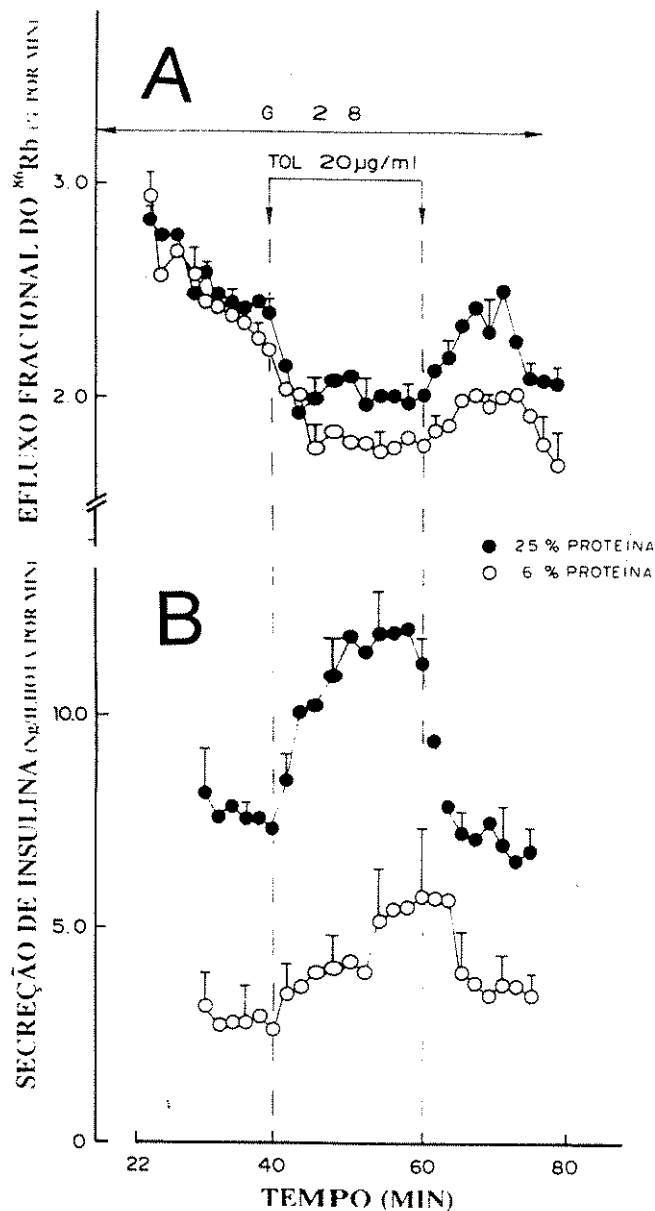


FIGURA 11 A e B

Efeito da tolbutamida (20 $\mu\text{g/ml}$) sobre o efluxo de ^{86}Rb em (A) e sobre a secreção de insulina (B), de ilhotas de animais normo (círculos cheios) e hipoprotéicos (círculos vazios). As ilhotas foram incubadas durante 1h em solução de Krebs contendo 1 mM de Ca^{2+} e 16.7 mM de glicose em presença de $^{86}\text{RbCl}$. A seguir, foram perfundidas com solução de Krebs contendo 2.8 mM de glicose e 20 $\mu\text{g/mL}$ de tolbutamida (min 40 a 60). Do efluente coletado a cada min, uma alíquota foi utilizada para dosagem de insulina, (min 30 ao min 76), e o restante para avaliação de cintilação líquida para o ^{86}Rb . Os círculos representam média $\pm$ epm onde o n foi de 4 para os dois grupos experimentais.

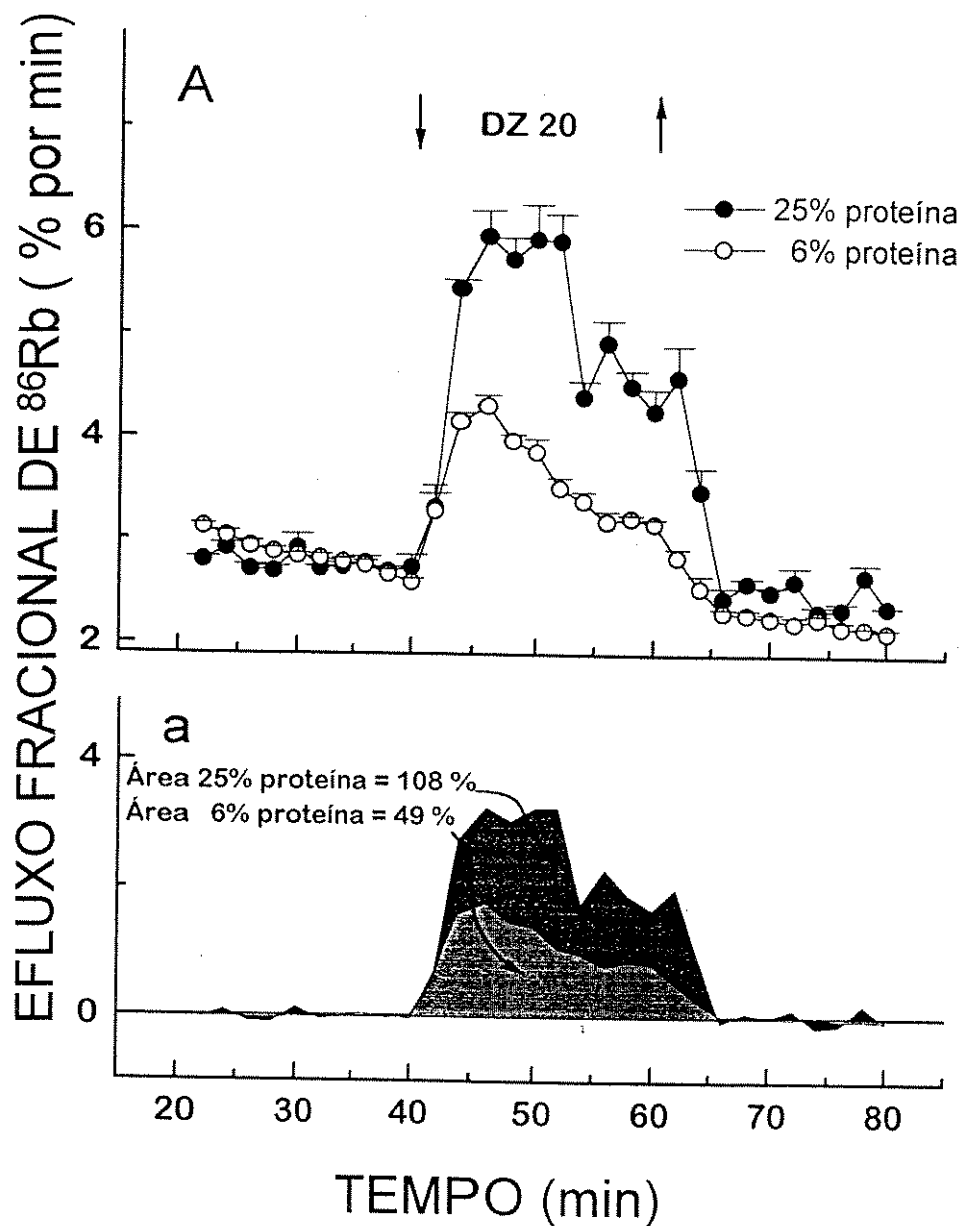


FIGURA 12

Efeito da diazoxida (20 $\mu\text{g/ml}$) sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas de animais normo e hipoprotéicos (A). As ilhotas foram incubadas de maneira semelhantes ao descrito fig. 11, em presença de 2.8 mM de glicose. As setas verticais indicam a introdução bem como a retirada da diazoxida do meio perfusor. Os círculos representam a média $\pm$ epm de 4 experimentos. Em (a), observamos a área correspondente ao efluxo do ^{86}Rb , quando da presença da diazoxida.

As figs 13 A; B,b e V C, ilustram o efeito da arginina (20 mM) sobre o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas-controle e ilhotas provenientes de ratos hipoprotéicos, perfundidas, respectivamente, na ausência e na presença de 2,8 e 8,3 mM de glicose. Nota-se que nas ilhotas-controle a arginina induziu aumento da taxa de efluxo do ^{86}Rb mesmo na ausência de glicose, como podemos observar através do cálculo da área apresentadas na fig. 13-b. Ao contrário, nas ilhotas de animais hipoprotéicos, arginina induziu aumento significativo apenas na presença de 8,3 mM de glicose (exceto no min 42 em presença de 2,8 mM de glicose).

A fig. 14, mostra o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas de animais normo e hipoprotéicos perfundidas em presença de glicose 2,8 mM glicose com o meio contendo 10 mM cálcio. A taxa basal de efluxo das ilhotas-controle foi mais elevada que das ilhotas de ratos hipoprotéicos (min 22 a 40). A introdução de arginina (20 mM) elevou o efluxo de ^{86}Rb de ambos os tipos de ilhotas ($P < 0,05$). Após a retirada do aminoácido do meio perfusor, a taxa de efluxo voltou aos valores basais respectivos.

Os efeitos da leucina (20 mM) e de seu derivado cetoisocaproato (KIC 25 mM) sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas provenientes de ratos normo e hipoprotéicos, estão ilustradas nas Fig. 15 A e B, respectivamente. Em presença de 2,8 mM de glicose, a introdução desses agentes no meio perfusor, induziu uma rápida, permanente e significativa redução do efluxo do ^{86}Rb de ambos os tipos de ilhotas. Esse efeito foi totalmente revertido após a retirada da leucina e/ou KIC do perfusato.

Finalmente a Fig. 16-A ilustra o efeito do éster de forbol (TPA 100 nM) sobre o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas normo e hipoprotéicas, perfundidas na presença de 5,6 mM de glicose. Com relação as ilhotas-controle, após a introdução do (TPA) no meio perfusor, a taxa de efluxo sofreu uma redução significativa apenas nos primeiros min. A seguir, houve um ligeiro aumento

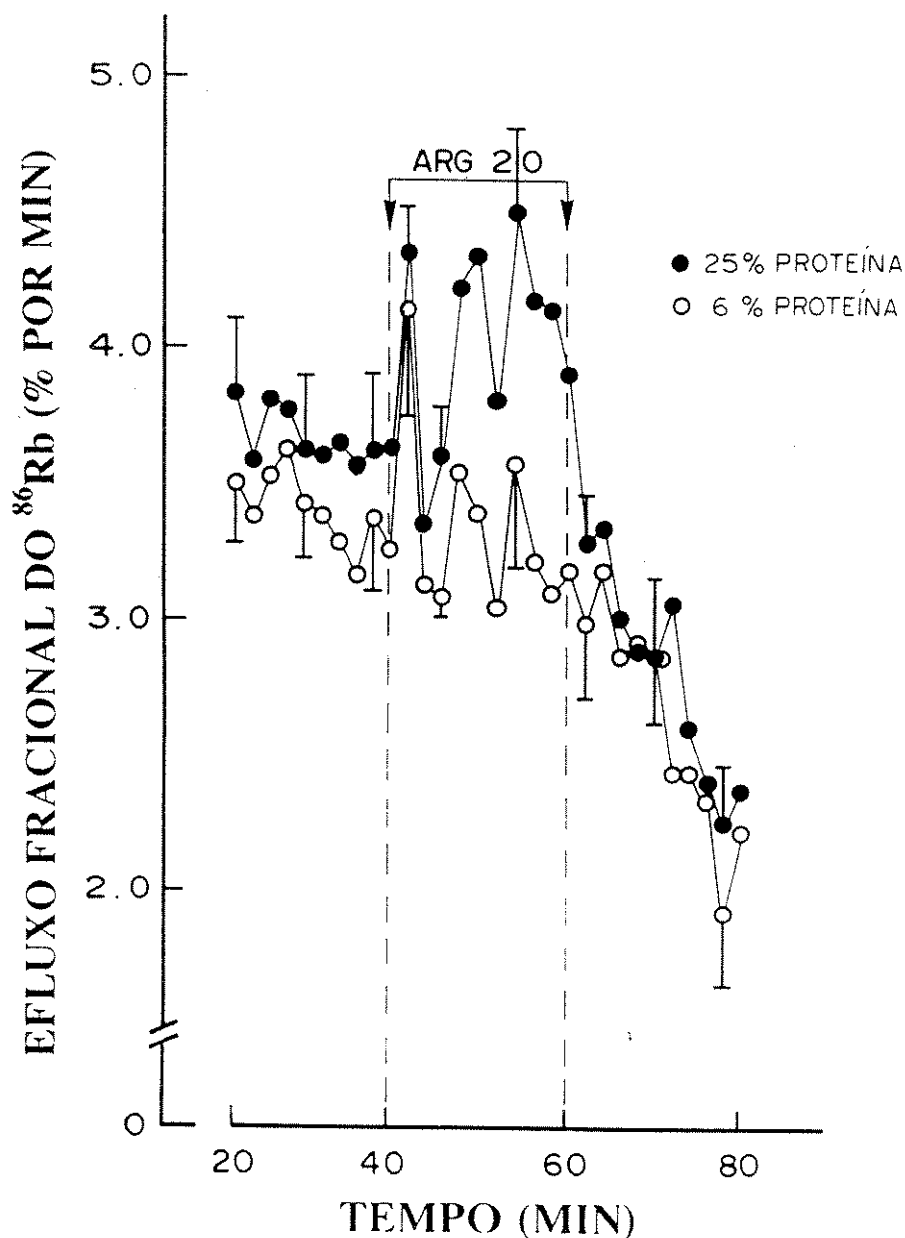


FIGURA 13 A

Efeito da arginina (20 mM) sobre o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas provenientes de animais normo (círculos cheios) e hipoprotéicos (círculos vazios). As ilhotas foram perfundidas com meio contendo 1 mM de Ca^{2+} na ausência de glicose. Arginina esteve presente no intervalo de tempo compreendido entre o 40° e 60° min da perfusão, como indicado pelas barras verticais. Os círculos indicam média $\pm$ pm e o n foi de 4 experimentos.

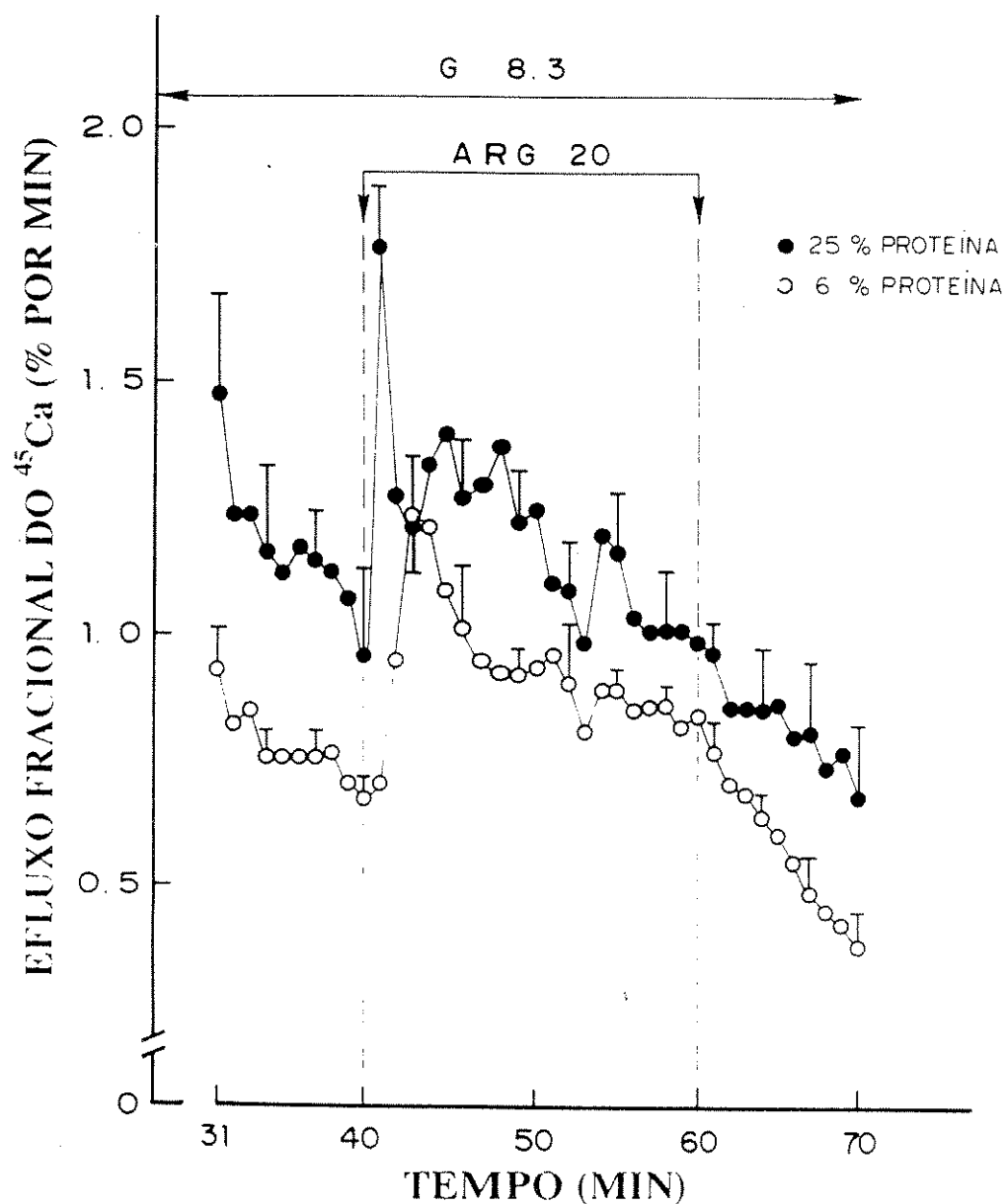


FIGURA 20 B

Efeito da arginina 20 mM efluxo de ^{45}Ca de ilhotas provenientes de animais normo (círculos cheios) e hipoprotéicos (círculos vazios). As ilhotas foram perfundidas em solução de Krebs contendo 1 mM de Ca^{2+} e glicose 8.3 mM. A introdução, bem como a retirada da arginina no meio de perfusão, estão representadas pelas barras verticais. Os círculos indicam a média $\pm$ epm sendo que o n foi de 4 experimentos para cada grupo.

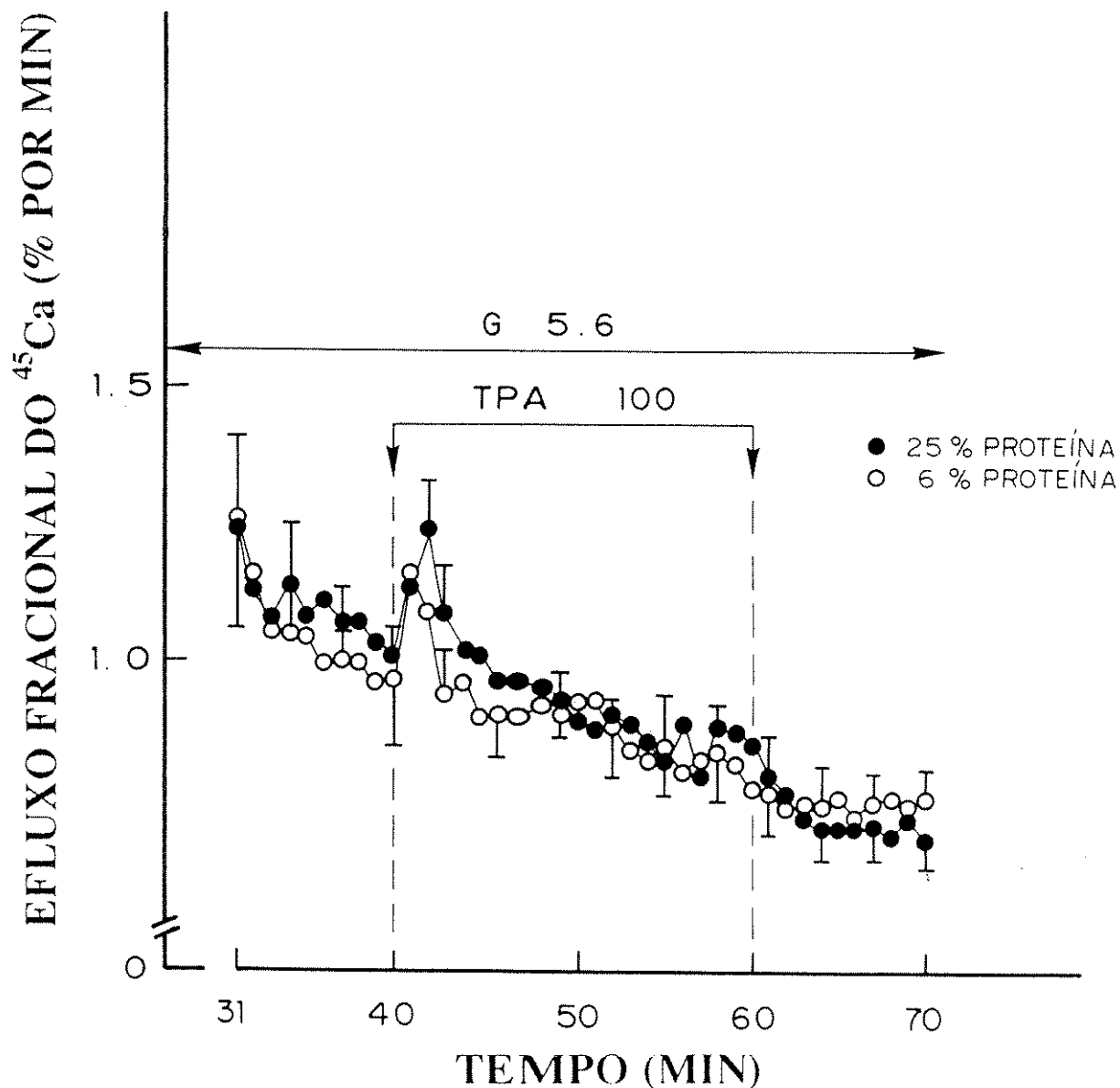


FIGURA 21

Efeito do TPA (100 nM) sobre o efluxo de ^{45}Ca de ilhotas provenientes de animais normo (círculos cheios) e hipoprotéicos (círculos vazios). As ilhotas foram perfundidas em solução de Krebs contendo 1 mM de Ca^{2+} e 5.6 mM de glicose. O TPA foi introduzido e retirado da meio, como indicado pelas barras verticais. Os círculos indicam a média $\pm$ epm sendo $n = 6$ experimentos para ambos os grupos experimentais.

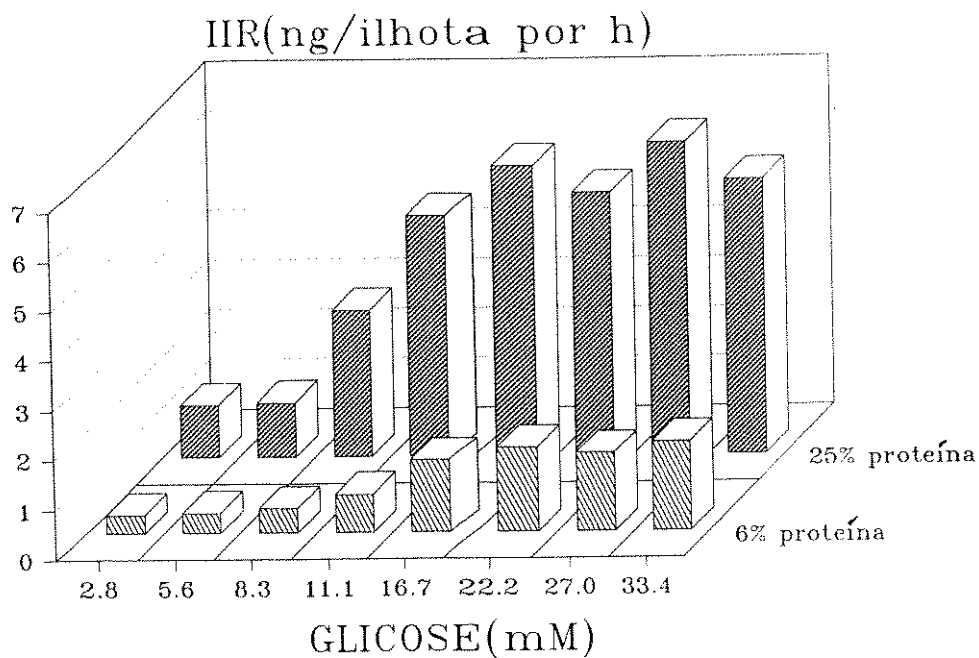


FIGURA 22 A

Efeito de concentrações crescentes de glicose, sobre a secreção de insulina de ilhotas provenientes de animais normoprotéicos (barras escuras) e hipoprotéicos (barras claras), incubadas, por 1h, em solução de Krebs e contendo 1 mM de Ca^{2+} e as diferentes concentrações de glicose. A insulina acumulada foi quantificada através de radioimunoensaio. As barras indicam a média, sendo que o n variou de 12 a 29 experimentos.

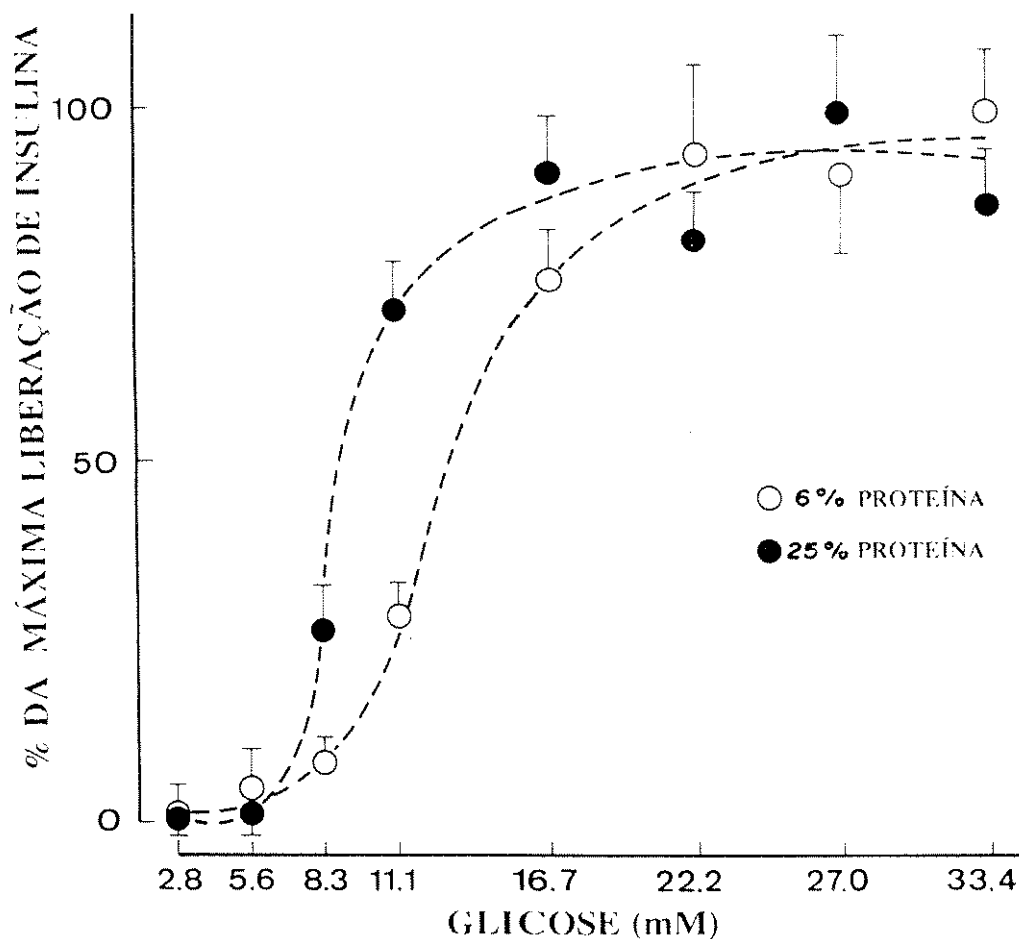


FIGURA 22 B

Curva dose-resposta à glicose confeccionada a partir dos dados de secreção normalizados, contidos na figura XIV-A. Para normalização dos resultados inicialmente subtraiu-se o valor basal (2.8 mM de glicose) do valor máximo de secreção (glicose 27.0 mM para os normoprotéicos (círculos escuros) e glicose 33.4 mM para os hipoprotéicos (círculos vazios)) o qual correspondeu ao incremento máximo de secreção, considerado aqui como 100%. As percentagem correspondentes aos outros valores de glicose foram obtidos após subtração do valor basal de secreção. A EC_{50} (50% da resposta máxima) foi de 8.53 e 14.4, respectivamente para as ilhotas normo e hipoprotéicas. Os círculos representam as médias $\pm$ epm.

9.Efeito da Leucina e Arginina sobre a secreção de insulina

Na Fig. 23, avaliamos a secreção de insulina de ilhotas provenientes de animais normo e hipoprotéicos, incubadas durante 1h em presença de leucina (20 mM) ou arginina (20 mM), na ausência e na presença de glicose 8,3 mM. Os valores absolutos de secreção, estimulada pelos dois aminoácidos em estudo, tanto na ausência quanto na presença de glicose, foram maiores nas ilhotas-controle, que em ilhotas de ratos hipoprotéicos. Contudo, a secreção proporcional (em relação ao basal) de insulina na presença de leucina foi de 1,4 e 1,5 vezes na ausência e de 2,3 e 2,4 vezes na presença de 8,3 mM de glicose, respectivamente para as ilhotas-controle e hipoprotéicos. Em relação à arginina o aumento proporcional da secreção de insulina foi de 2,8 e 1,16 vezes na ausência e de 4,3 e 5,9 vezes na presença de 8,3 mM glicose, respectivamente para as ilhotas-controle e hipoprotéica. A estimulação com esses aminoácidos provocou um aumento na liberação proporcional de insulina em ambos os tipos de ilhotas, exceto na condição onde as ilhotas foram estimuladas com arginina na ausência de glicose, nesta condição o aumento foi maior apenas no grupo controle ($p < 0,05$).

10.Efeito do K^+ sobre a secreção de insulina

A Fig. 24, mostra a secreção de insulina de ilhotas de ratos normo e hipoprotéicos, frente a concentrações crescentes de potássio em presença de 5,6 mM glicose. Os valores absolutos da secreção de insulina das ilhotas provenientes de ratos hipoprotéicos foram menores em relação as ilhotas-controle em todas as concentrações de potássio estudadas. O aumento proporcional da secreção de insulina foi de 2,1; 2,2; 2,7; e 2,9 vezes para as ilhotas-controle e de 1,2; 1,2; 1,5 e 1,6 vezes para as ilhotas de ratos hipoprotéicos, para as concentrações de potássio de 10,0; 20,0; 40,0 e 80 mM, respectivamente. Essa liberação proporcional de insulina foi maior nas ilhotas-controle em todas concentrações de potássio estudada ($p < 0,05$).

11.Efeito de potencializadores da secreção de insulina

Na fig. 25, avaliamos o efeito de substâncias que afetam diferentes vias de sinalização intracelular sobre a secreção de insulina de ilhotas de ratos normo e hipoprotéicos. Como já observado em outros protocolos experimentais deste trabalho, a secreção basal de insulina foi maior no grupo controle comparado ao grupo hipoprotéico. O agonista muscarínico, oxotremorina-m (OMO-m), potencializou a secreção de insulina em 2,2 e 1,4 vezes nas ilhotas-controle e hipoprotéicos, respectivamente. A comparação entre os valores proporcionais de liberação de insulina, provocado pelo OMO-m, também foi maior nas ilhotas-controle ($P < 0.05$).

Isometilbutilxantina (IBMX), que sabidamente aumenta os níveis intracelulares de AMPc, foi empregada nas concentrações de 100 nM e 1 mM. Os valores absolutos de secreção de insulina foram maiores nas ilhotas-controle do que com nas de hipoprotéicos. Já a liberação proporcional da secreção de insulina estimulada pelo IBMX (100 nM), foi de 1,7 e 2,9 vezes para as ilhotas de ratos normo e hipoprotéicos, respectivamente, sendo maior nas ilhotas de ratos hipoprotéicos. Com o aumento da concentração para 1 mM, a liberação proporcional de insulina foi de 4,5 e 6,5 vezes nas ilhotas de ratos normo e hipoprotéicos, respectivamente ($p < 0,05$).

Outra classe de substância que afeta a secreção de insulina é o TPA, o qual utilizamos nas concentrações de 10 nM e 100 nM. TPA 10 nM, potencializou a secreção de insulina em 1,4 e 1,1 vezes nas ilhotas de ratos normo e hipoprotéicos, respectivamente. Com o aumento para 100 nM, a elevação foi de 2,1 e 1,9 vezes para os grupos normo e hipoprotéicos, respectivamente. Para as concentrações de TPA utilizadas, os valores absolutos e relativos de secreção de insulina obtidos foram maiores nas ilhotas-controle ($p < 0,05$).

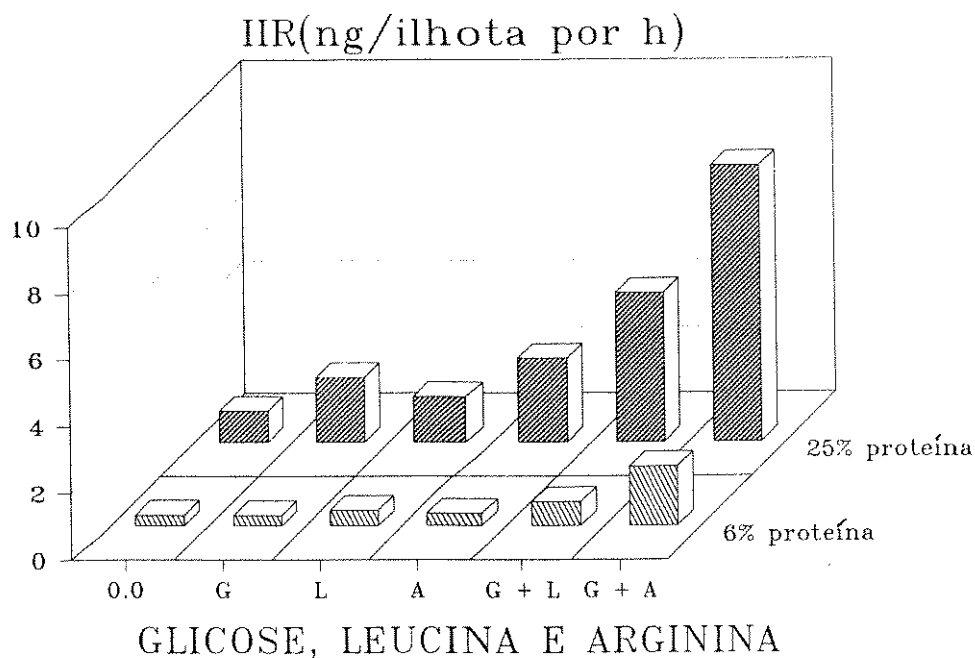


FIGURA 23

Efeito da leucina (20 mM) e da arginina (20 mM) sobre a secreção de insulina por ilhotas incubadas na ausência e em presença de glicose (8.3 mM). As ilhotas de animais normoprotéicos (barra escuras) e de hipoprotéicos (barras claras) foram incubadas em Krebs contendo 1mM de Ca^{2+} e os diferentes aminoácidos, durante 1h. A insulina secretada durante esse período foi avaliada através de radioimunoensaio. As barras indicam a média sendo o (n) de 15 a 18.

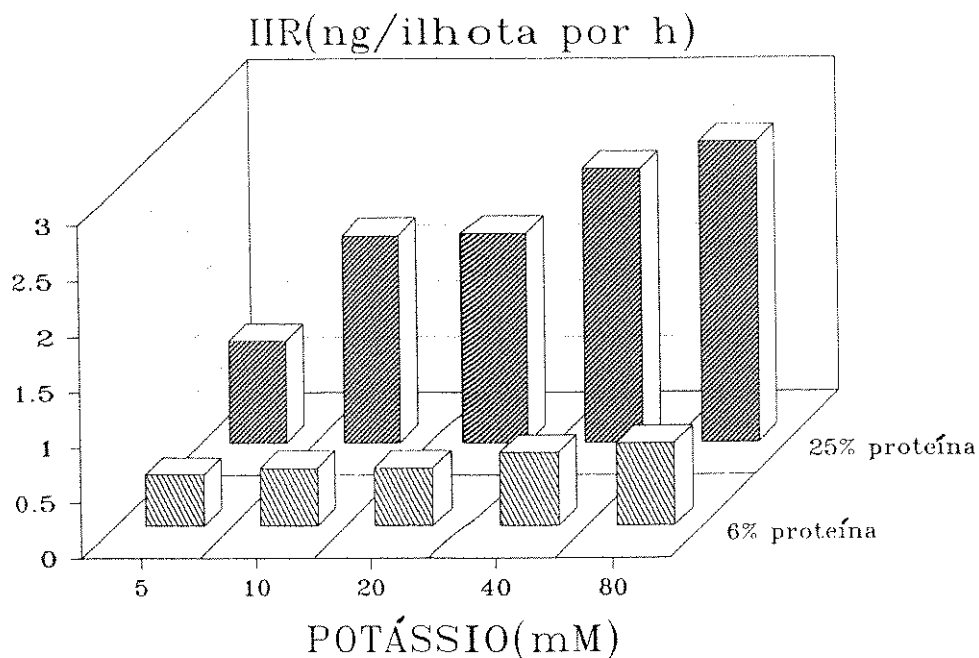


FIGURA 24

Efeito de concentrações crescentes de Potássio sobre a secreção de insulina de ilhotas de animais normoprotéicos (barras escuras) e hipoprotéicos (barras claras). Os grupos de ilhotas foram incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose e 1 mM de Ca^{2+} , acrescidas das concentrações crescentes de K^+ , durante 1h. Nas concentrações de K^+ acima de 5 mM, o Na^+ foi retirado em proporções equivalentes. barras indicam a média e o n variando 13 a 30 repetições.

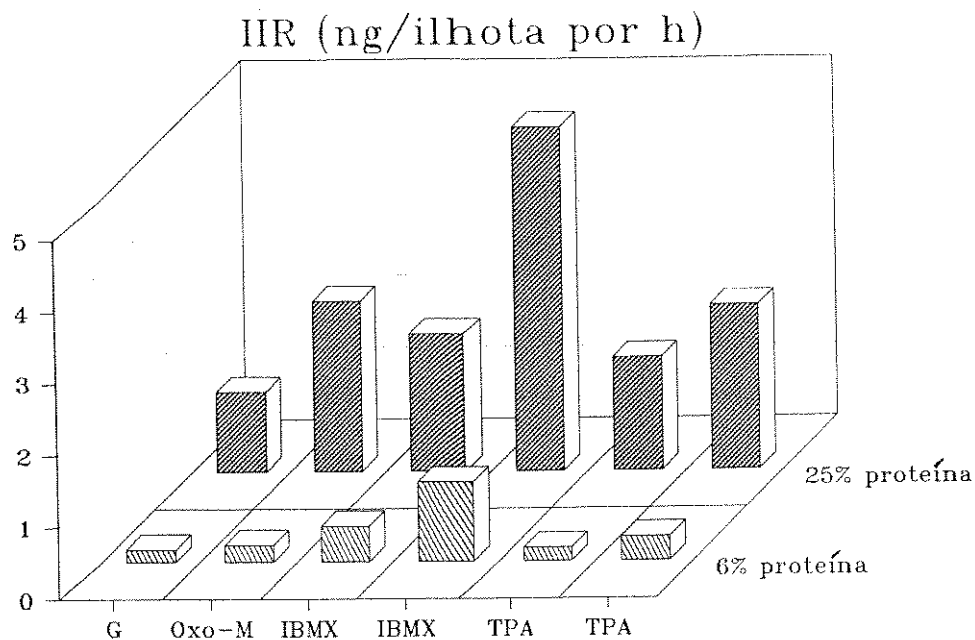


FIGURA 25

Efeito da OXO-m (50 μ M), IBMX (100 nM e 1 mM) e TPA (10 nM e 100 nM), sobre a secreção de insulina de ilhotas provenientes de animais normoprotéicos (barras escuras) e hipoprotéicos (barras claras). A incubação se deu em solução de Krebs com 1 mM de Ca^{2+} , e 5,6 mM de glicose em presença das diferentes condições das substâncias indicadas acima, durante 1h. As barras verticais indicam média onde o n variou de 10 a 24 experimentos.

DISCUSSÃO

1 Modelo Experimental

Ratos jovens, mantidos dos 21 aos 90 dias de idade com dieta contendo 6% de proteína apresentaram características observadas na desnutrição infantil e nos modelos experimentais de desnutrição (WEINKOVE et al, 1976; HEARD et al, 1977 & CHAVES, 1985), tais como: baixo peso corporal, hipoalbuminemia, teores elevados de glicogênio e de gordura hepáticas (tab. I e II e fig. 1). 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 hipoprotéicos e normoprotéicos exclusivamente à diferença no teor protéico da dieta. Embora ambas as dietas sejam isocalóricas, ratos carentes em proteína geralmente diminuem a ingesta alimentar a qual é suficiente apenas para manter o peso corporal (WEINKOVE et al, 1976; MELLO & CURY, 1989).

Crianças com desnutrição apresentam alta concentração de sódio e baixa de potássio em suas células e conseqüentemente aumento do sódio corporal (PATRIC & GOLDEN, 1977 & FORRESTER, et al, 1990). Em nosso modelo experimental encontramos dados semelhantes para conteúdo total de sódio mas não detectamos diferenças quanto ao potássio total e entre os grupos estudados.

Em crianças com Kwashiorkor, (síndrome caracterizada por edema nutricional) e/ou Marasmus, há aumento da atividade da bomba de

sódio/potássio (PATRIC & GOLDEN, 1977 & PATRIC, 1977). Um aumento intracelular de sódio concomitante a um aumento na taxa de extrusão de sódio evidencia um aumento na permeabilidade da membrana a esse cátion. A magnitude desta pode ser suficiente para aumentar o conteúdo do referido íon na célula, independente de um aumento compensatório da extrusão ativa de sódio. Essa disposição anormal de eletrólitos pode levar a um prejuízo nos mecanismos de transporte desses íons com menor extrusão de sódio e retenção de potássio na célula, os quais são importantes para manter o gradiente iônico através da membrana (FORRESTER et al, 1990). Essa alteração no conteúdo do sódio corporal, encontrada em nosso modelo experimental, e prováveis distúrbios nos fluxos iônicos associados a um menor conteúdo de glutathione e grupos tiois na membrana, poderiam explicar as alterações encontradas predispondo para disfunções do pâncreas endócrino e em especial para a secreção de insulina (AMMON & WAHL, 1989; FORRESTER et al, 1990). Uma nova hipótese, tentando explicar a manifestação de edema em ratos desnutridos, sugere que o desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a sua remoção colaboram para estabelecer um estresse oxidativo e a destruição celular. Uma observação que aponta favorável a essa hipótese inclui o menor conteúdo de glutathione (GSH) em hemácias desses ratos (JACKSON, 1986 & GOLDEN & RAMDATH, 1987).

Alterações na homeostase da glicose é outro problema que atinge tanto humanos como animais desnutridos. A tolerância à sobrecarga oral de glicose mostrou-se inalterada nos ratos desnutridos no presente estudo (fig. 2) quando comparada com a dos animais-controle. Esses resultados contrastam com dados anteriores da literatura (WEINKOVE, WEINKOVE & PIMSTONE, 1976). Intolerância à glicose é também observada com frequência na desnutrição infantil, tanto no Marasmus quanto no Kwashiorkor (SLONE et al, 1961; HADDEN, 1967; OXMAN et al, 1968; JAMES & COORE, 1970 & BAIG & EDOZIEN, 1985). Dados anteriores da literatura apontam intolerância à

glicose em ratos machos jovens mantidos com dieta contendo 4% de proteína por 4 semanas (WEINKOVE, WEINKOVE & PIMSTONE, 1976 & HEARD et al, 1977). Outro grupo de pesquisadores constataram intolerância à sobrecarga oral de glicose em fêmeas jovens (50 dias) mantidas por curtos períodos (21 dias) com a dieta contendo 6% de proteína (MELLO & CURY, 1989). As discrepâncias entre os resultados do presente estudo e aqueles relatados na literatura possivelmente são consequência das diferenças na duração do experimento, no teor de proteína da dieta hipoprotéica, ou ainda, do sexo e de processos adaptativos que incluem resistência à insulina e ao glucagon (SMITH et al, 1975; RAO, 1995 & RAO, 1995a).

São raros os dados na literatura referentes ao emprego do teste de tolerância à insulina para avaliar a sensibilidade periférica em animais submetidos a desnutrição protéico-calórica. Nossos dados referentes ao teste de tolerância à insulina subcutâneo (TTI_{sc}) não apontam redução da sensibilidade ao hormônio nos ratos hipoprotéicos em relação aos controle. Pelo contrário, sugerem "maior sensibilidade" uma vez que os níveis glicêmicos apresentaram queda mais rápida no grupo desnutrido que no controle. Nossos resultados concordam com aqueles de WEINKOVE et al (1976) e de CARPINELLI (1978), que mostraram não haver impedimento da resposta hipoglicêmica em ratos machos jovens mantidos com dietas contendo 4 - 6% de proteína, no período de 8 semanas.

Animais que receberam dieta hipoprotéica apresentaram níveis menores de glicose e insulina plasmática no estado alimentado quando comparado com animais-controle (LEVINE et al, 1983 & OKITOLONDA et al, 1988). Esses autores demonstraram também que a resposta insulínica, após teste de tolerância à glicose (TTG) está prejudicada, mas os mesmos não desenvolveram intolerância à glicose no decorrer do período experimental. Em nosso modelo também observamos níveis plasmáticos de insulina menores nos animais que receberam dieta hipoprotéica e ausência de intolerância a

glicose (fig. 2). Isto se deve, em parte, ao tempo de dieta como foi demonstrado anteriormente (YOUNOSZAY & DIXIT, 1980; LEVINE et al, 1983 & OKITOLONDA et al, 1987).

Mais recentemente, a influência do tempo da dieta na homeostase da glicose pode ser melhor avaliada. Utilizando animais submetidos a restrição alimentar em torno de 60% da dieta controle, observou-se níveis de insulina e glucagon plasmáticos reduzidos. Em contrapartida, foram observados: relativa hipoglicemia, taxa de renovação e distribuição de glicose normais e conteúdo total da glicose corporal inalterado, quando comparado aos animais-controle. Conclui-se que os níveis de glicose reduzidos no jejum em desnutrição crônica são mantidos por processos adaptativos que incluem resistência à insulina, insulinopenia, resistência ao glucagon e redução na secreção deste hormônio (RAO, 1995 & RAO, 1995a).

A redução da reserva pancreática de insulina em animais submetidos a dieta hipoprotéica, bem como valores menores para relação insulina massa corporal, sugerem que esses animais possuem maior sensibilidade periférica à insulina (SWENNE, CRACE & JANSSON, 1988 & OKITOLONDA et al, 1988). Nós observamos redução no conteúdo total de insulina do pâncreas e das ilhotas de Langerhans isoladas mas, contrário a esses autores, aumento na relação insulina massa corpórea. Como já salientamos, o aumento na relação insulina massa corporal deve-se provavelmente ao tempo de desnutrição a que foram submetidos nossos animais (WEINKOVE et al, 1976 & OKITOLONDA et al, 1987), e/ou por desenvolvimento de resistência ao glucagon e insulina, insulinopenia e redução na secreção do glucagon como demonstrado por RAO (1995).

ESTUDOS “*IN VITRO*”

1-Estudos morfológicos

Ficou claro na introdução e no início desta discussão que a desnutrição protéico-calórica altera a homeostase da glicose no homem e em diversas espécies animais. Este modelo de desnutrição pode ser facilmente reproduzido em animais de laboratório, facilitando a análise de diferentes parâmetros morfológicos e/ou fisiológicos em ilhotas desses animais.

Estudos morfológicos do pâncreas endócrino de animais submetidos a desnutrição protéica tem produzido informações conflitantes. Alguns autores observaram hiperplasia e hipertrofia das ilhotas, outros não encontraram alterações sugerindo que as ilhotas de Langerhans são menos afetadas que o tecido exócrino (KOKO et al, 1992). Esses dados conflitantes podem ser explicados pelo uso de diferentes espécies e/ou pelo tempo de desnutrição. Recentemente, estudos de ultraestrutura do pâncreas endócrino em crianças desnutridas e em outras espécies animais, revelaram vários graus de degeneração de todos os tipos de células da ilhota, tais como; destruição da membrana celular, perda de ribossomos, edema mitocondrial e aumento relativo do número de grânulos imaturos de insulina (SNOECK et al, 1990; SWENNE et al, 1992 & BROOKS et al, 1993).

Com o propósito de caracterizar nosso modelo experimental, explicar as alterações observadas em nosso animal e confrontar com os dados da literatura, avaliamos a ultraestrutura das ilhotas de Langerhans. Observamos; compactação do tecido endócrino, desaparecimento de nucléolos, perda da polaridade funcional, edema mitocondrial, perda da posição convencional de algumas organelas citoplasmáticas, redução do números de grânulos de insulina e um grande número de grânulos imaturos (fig.6). Essas alterações ultraestruturais, induzidas pelo baixo teor protéico da

dieta nas ilhotas de Langerhans, semelhantes as encontradas por outros autores, são indicativas de redução da atividade de síntese nas células B. Entretanto, a restrição protéica, embora tenha reprimido a produção do hormônio, não foi suficiente para reduzir drasticamente a quantidade de grânulos secretores (fig. 6 e 7).

Os resultados sugerem que o processo de maturação desses grânulos foi afetado pois, observamos grânulos com pouco material ou de baixa densidade eletrônica (fig. 6 e 7). Aliado a esse fato, a ausência de polaridade funcional de muitas células pode estar relacionada com distúrbios dos elementos do citoesqueleto, co-responsáveis pela organização compartimentalizada do citoplasma. É possível que, além do comprometimento na maturação dos grânulos (grande número de vesículas de condensação, retículo ingurgitado com material floculento intracisternal) tenha havido comprometimento na liberação de insulina por esses grânulos, o que explica os baixos níveis séricos do hormônio no estado alimentado. Associado a essa alteração granular, está a redução da permeabilidade capilar à insulina (paredes mais eletrodensas, mais espessas e menos fenestrada das células endoteliais dos capilares).

2-Oxidação da glicose e movimentos iônicos

A elevação da glicose extracelular, 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 à glicerofosfato desidrogenase

mitocondrial (SENER & MALAISSE, 1992 & MALAISSE, 1993). Portanto, a estimulação preferencial 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 (DE VOS, SCHUIT & MALAISSE, 1991 & MALAISSE & SENER, 1992).

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 (DE VOS, SCHUIT & MALAISSE, 1991, MALAISSE & SENER, 1992 & NEWGARD & McGARRY, 1995). Dessa forma, avaliamos a oxidação desse substrato a CO₂ nas ilhotas pancreáticas provenientes de animais normo e hipoprotéicos. A fig. 9 mostra que a oxidação da glicose foi mais elevada nas ilhotas de animais hipoprotéicos tanto em condições basais quanto em concentrações estimulatórias da secreção de insulina. Esses dados foram semelhantes aos encontrados com ilhotas humanas cultivadas em presença de altas concentrações de glicose (EIZIRIK, KORBUTT & HELLERSTRÖM, 1992). Os valores mais altos encontrado na oxidação da glicose não apoiam a hipótese de inibição desse evento nesse tecido. Contudo, resta a dúvida se a quantidade de ATP gerada pelas ilhotas de ratos hipoprotéicos foi maior do que as ilhotas-controle, pois pode ter ocorrido desacoplamento e portanto, menor produção de ATP. Embora indiretamente, nossas observações sobre degeneração mitocondrial nas células B de ilhotas hipoprotéicas, dão suporte à essa hipótese. Pode-se especular que tal degeneração afetaria não somente a forma como a função mitocondrial e em consequência a produção de ATP.

Outro ponto que podemos especular é a resposta da célula B exposta a altas concentrações de glicose. Em nosso modelo experimental a dieta normo e hipoprotéica são isocalóricas. Mas o teor de carboidratos na dieta deficiente em proteína é maior e provavelmente, as ilhotas destes animais ficariam mais expostas a maiores concentrações de glicose que as

ilhotas-controle. Ilhotas isoladas de ratos e de humanos expostas à altas concentrações de glicose apresentam redução de sua capacidade secretória (OKAMOTO, et al, 1992 & EIZIRIK, KORBUTT & HELLERSTRÖM, 1992). Nossos dados sobre a oxidação da glicose são semelhantes aos resultados obtidos em ilhotas humanas (EIZIRIK, KORBUTT & HELLERSTRÖM, 1992), e apoiam a idéia de que o conteúdo de carboidrato na dieta pode ter um papel importante no aumento da oxidação da glicose pelas ilhotas de animais hipoprotéicos. O aumento da glicose favorece alterações no pool enzimático tanto do citosol quanto mitocondrial, como observado por RASSCHAERT, et al, (1995).

Canais iônicos controlam os fluxos dos íons através da membrana das células B mantendo assim a diferença de potencial eletroquímico dessas células. São portanto fundamentais na mediação da liberação de insulina estimulada por diferentes agentes insulínotropicos. Os canais K^+_{ATP} exercem uma função primordial no acoplamento estímulo/secreção nas células B pancreáticas. O metabolismo da glicose e o conseqüente aumento na relação ATP/ADP celular constituem o estímulo primário para o fechamento desses canais, induzindo à despolarização da membrana celular. A taxa de efluxo de K^+ das células B ou de ilhotas perfundidas podem ser mensurada pela utilização do isótopo ^{86}Rb , análogo funcional do K^+ (BOSCHERO, et al, 1979 & RAJAN et al, 1990). Na Fig. 10, observamos que glicose (em diferentes concentrações) reduziu o efluxo do ^{86}Rb com igual magnitude nos dois tipos de células. Isto indica que mesmo com o aumento do metabolismo da glicose, nas ilhotas de animais hipoprotéicos, não houve alteração significativa na capacidade da glicose em reduzir o efluxo do ^{86}Rb em relação às ilhotas-controle (fig.10-a).

Baseado no metabolismo da glicose aumentado e efluxo de potássio inalterado, nós avaliamos a capacidade secretória das ilhotas de ratos hipoprotéicos em presença de concentrações crescentes de glicose e

K^+ (fig. 22 A e B, fig. 24). Nossos dados, referentes a estimulação das ilhotas com glicose, apoiam a idéia de que a secreção de insulina reduzida em ilhotas de animais hipoprotéicos, se deve a defeitos em outra(s) etapa(s) da cascata de eventos responsável pela extrusão da insulina contida nos grânulos e não por uma incapacidade dessas ilhotas de reconhecerem o nutriente. Outros autores também encontraram resposta secretória diminuída à estimulação com glicose e sugerem que a desnutrição protéico-calórica induz defeito funcional na célula B, o qual pode persistir após recuperação alimentar. (LEVINE, WRIGHT & MARCUS, 1983; DIXIT & KAUNG, 1985; SWENNE, CRACE & JANSSON, 1988).

Quando comparamos a estimulação crescente de glicose entre ilhotas-controle e de ratos hipoprotéicos, observamos que a curva dose resposta está deslocada para a direita nas ilhotas de animais hipoprotéicos, comprovando a nossa suposição que o defeito está em qualquer outra etapa do mecanismo de secreção e não na glicólise. O que afasta a possibilidade de funcionamento deficiente da glicoquinase IV, enzima chave na metabolização deste nutriente na célula B.

O fechamento dos canais de K_{ATP} leva despolarização da membrana das células B, e ativa os canais de Ca^{2+} -voltagem dependentes promovendo o influxo de cálcio, aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e, finalmente secreção de insulina (BOSCHERO, 1996). Essa despolarização da membrana das células B, pode ser induzida por concentrações crescentes de K^+ e consiste em uma importante ferramenta para avaliarmos o mecanismo de secreção (fig. 24). Em presença de concentrações crescentes de K^+ as ilhotas de animais hipoprotéicos secretaram menor quantidade de insulina que as ilhotas-controle. Também observamos que a liberação de insulina em relação a secreção basal foi maior nas ilhotas- controle. Esta resposta secretória diminuída deve-se a incapacidade das diferentes concentrações de K^+

induzirem suficiente despolarização e promoverem um influxo de cálcio necessário para aumento adequado da $[Ca^{2+}]_i$ nas células B.

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).

As fig.(s) 15-A,B evidenciam que a leucina e seu derivado KIC, reduziram a permeabilidade ao ^{86}Rb com magnitude idêntico àquela observada por glicose. Como esses substratos entram diretamente no ciclo de Krebs, é evidente que a redução da secreção de insulina não está relacionada à incapacidade da mitocôndria em metabolizar esses nutrientes. Contudo, o bloqueio de 50% da permeabilidade ao K^+ pode ser atingida entre 0 e 5.6 mM de glicose, ou seja, a quantidade de ATP gerada nessas concentrações de glicose são suficientes para bloquear a permeabilidade ao K^+ . Portanto, é provável que nas ilhotas provenientes de animais hipoprotéicos, em altas concentrações de glicose, de leucina e/ou cetoisocaproato a produção de ATP tenha sido menor mas, suficiente para reduzir o efluxo de ^{86}Rb semelhante ao observado pelas ilhotas-controle (ASHCROFT; ASHCROFT & HARRISON, 1987).

Arginina aumenta a permeabilidade ao potássio e despolariza a membrana das células B, por um mecanismo diferente daquele induzido por glicose. A secreção induzida por esse aminoácido catiônico, pode estar relacionado ao seu acúmulo dentro da célula, levando a despolarização da membrana plasmática (HENQUIN & MEISSNER, 1981). Alternativamente, sua

ação insulínótropica pode estar associada ao seu catabolismo, resultando por exemplo, na geração de poliaminas que poderiam servir como substrato para as transglutaminases ou ativar as proteínas quinases (HENQUIN & MEISSNER, 1981; TAMAGAWA & HENQUIN, 1982; GOMIS et al, 1983; GARCIA-MORALES et al, 1984 & THAMS, CAPITO & HELDESKOV, 1986). Contudo, estudos recentes comprovam que a ação insulínótropica dos aminoácidos catiônicos não está relacionado com a capacidade de agir como substrato para as transglutaminase, mas está atribuída ao acúmulo dessa molécula carregada positivamente no interior de célula B com subsequente despolarização (BLACHER et al, 1989 & SENER et al, 1990).

Esses nutrientes insulínótropicos 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 da saída do íon mediada pelo co-transporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e a estimulação do influxo de cálcio através dos canais de cálcio sensíveis a voltagem (MALAISSE, BRISSON & BAIRD, 1973; MEISSER & PREISLER, 1979; HERCHUELZ, SENER & MALAISSE, 1980; HERCHUELZ, COUTURIER & MALAISSE, 1980). Uma forma indireta de analisar o aumento do Ca^{2+} citoplasmático, induzido por arginina e/ou qualquer outro nutriente, consiste em se medir o efluxo do ^{86}Rb (HERCHUELZ et al, 1984; BLACHER et al, 1989 & SENER et al, 1990). Isto se deve à presença nas células B de uma permeabilidade ao K^+ dependente de Ca^{2+} (K_{Ca}). Assim, como já mencionamos antes, arginina que despolariza a membrana das células B, induz aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e conseqüentemente do efluxo do ^{86}Rb . Esse aumento foi menor nas ilhotas provenientes de animais hipoprotéicos quando comparado as ilhotas-controle (fig. 13-A e B). Duas alternativas, não exclusivas podem explicar essa diferença. Uma que o aminoácido não alterou adequadamente a polarização da membrana. E outra, que os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem nas ilhotas de animais hipoprotéicos estejam em menor número e/ou alterados.

Na presença de glicose, arginina induziu aumento do efluxo do ^{86}Rb , idêntico às ilhotas-controle e semelhante ao apresentado na literatura (HERCHUELZ et al, 1984; BLACHER et al, 1989 & SENER et al, 1990). Significando que o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi suficiente para estimular a permeabilidade K_{Ca} . Logicamente isto implica que a arginina, associada à glicose, provocou despolarização suficiente para ativar a permeabilidade do Ca^{2+} -sensível a voltagem (Ca_{Vm}). Aumento da concentração extracelular de Ca^{2+} , como mostrado na fig. 14, permitiu à arginina induzir um incremento no efluxo do ^{86}Rb idêntico às ilhotas-controle. Essa observação reforça a idéia de que a resposta diminuída à arginina, quando da ausência de glicose, se deve à problemas de despolarização e/ou permeabilidade ao Ca^{2+} na membrana plasmática, o que impede a célula atingir concentrações adequadas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Em concordância com os resultados sobre o efluxo de ^{45}Ca (fig.15-A,B), arginina promoveu aumento na secreção de insulina em ilhotas de animais hipoprotéicos (fig. 23), mas em menor intensidade que o registrado em ilhotas-controle e semelhante ao relatado na literatura (SWENNE, CRACE & JANSSON, 1988). O padrão de resposta secretória das ilhotas provenientes de animais hipoprotéicos altera-se profundamente quando associamos a glicose, em concentrações insulínótropas, com o aminoácido. Esta mudança na liberação de insulina pode ser atribuída, em parte, à capacidade que a glicose tem em despolarizar a membrana das células B por um mecanismo diferente dos aminoácidos catiônicos.

As sulfonilurétricas são importantes agentes farmacológicos que bloqueiam os canais de K^+_{ATP} em células B pancreáticas. Essas substâncias ocupam determinados receptores na membrana da célula promovendo o bloqueio desses canais e conseqüentemente reduzindo o efluxo de K^+ , despolarizando a membrana ativando, em consequência, os canais de Ca_{Vm} , com aumento dos níveis intracelulares deste íon (RAJAN et al, 1990; BOYD III et al, 1991 & CATERRAL & EPSTEIN, 1992). Tolbutamida (fig. 11) reduziu a

taxa de efluxo do ^{86}Rb com igual magnitude nos dois tipos de ilhotas. Em paralelo, verificamos que a tolbutamida induziu secreção de insulina menor nas ilhotas de animais hipoprotéicos. A despeito da mesma taxa de efluxo do ^{86}Rb , o que poderia refletir despolarização de magnitude semelhante nos dois tipos de ilhotas.

Outra forma de avaliar os canais K_{ATP} em células secretoras de insulina, foi a utilização da diazoxida, usualmente empregada no tratamento de hipoglicemia secundária, após excessiva liberação de insulina. Em meio contendo concentração basal de glicose, a diazoxida marcadamente aumenta o efluxo de ^{86}Rb . Esses estudos sugerem que a diazoxida inibe a secreção de insulina por aumentar a permeabilidade ao K^+ nas células B, deixando a membrana da célula polarizada (HENQUIN & MEISSNER, 1982; RAJAN et al, 1990 & BOSCHERO, et al, 1993). Na fig. 12 podemos observar que a diazoxida aumentou o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas-controle de modo semelhante ao encontrado por HENQUIN & MEISSNER, (1982). O mesmo efeito foi observado nas ilhotas provenientes de animais hipoprotéicos, porém, com menor intensidade. O aumento maior na taxa de efluxo das ilhotas-controle, sugere que essas ilhotas possuem uma população de canais maior e/ou mais sensível as sulfoniluréias. Esta afirmação poderia ser contestada pelo resultado encontrado na fig. 10 e 11, onde não observamos diferenças na taxa de efluxo entre os dois grupos de ilhotas, induzida por glicose e tolbutamida.

Contudo, COOK & HALES,(1984) demonstraram que em repouso, isto é, com a célula polarizada, a grande maioria dos canais K_{ATP} já estariam fechados e, que o fechamento de 10% do total de canais existentes nas células B seria suficientes para despolarizar a membrana. Isto significa que o efeito máximo da tolbutamida ocorre com o fechamento de uma pequena parcela dos canais existentes nas células B, daí não observarmos diferenças entre ilhotas-controle e hipoprotéicas. Ao contrário, diazoxida que promove abertura desses canais, age em uma população muito maior de canais, por

isso verificamos diferenças de ação dessa droga entre ilhotas de animais hipoprotéicos e controle. Concluindo, os experimentos com diazoxida revelam que também a modulação dos canais de K^+_{ATP} estariam alterados nas células B de animais hipoprotéicos.

3-Segundos mensageiros e secreção de insulina

Mensageiros intracelulares também regulam a secreção de insulina pela célula B. Proteína quinase C é um segundo mensageiro ativado durante a quebra dos fosfoinosítídeos (METZ, 1988). O mecanismo preciso pelo qual a ativação da proteína quinase C (PKC) estimula a secreção de insulina não está esclarecido, mas a ativação dessa proteína está relacionada com a alteração dos fluxos de K^+ e de Ca^{2+} nas células B e em outros tecidos (WOLLHEIM et al, 1988; MALAISSE et al, 1985; BERGGREN, ARKHANMMAR & NILSSON, 1989; YADA et al, 1989 & JONES, PERSAUD & HOWELL, 1991).

Ativadores exógenos da proteína quinase C,(PKC) tais como, éster de forbol (TPA) ou análogos do diacilglicerol, estimulam a translocação da proteína quinase em ilhotas de ratos (EASOM et al, 1989; PERSAUD, JONES, SUGDEN & HOWELL, 1989b). TPA, em concentrações nanomolares estimulam a PKC. Assim, estimula a secreção de insulina, demonstrando o papel da proteína quinase na regulação da secreção do referido hormônio (BERGGREN, ARKHAMMAR & NILSSON, 1989). TPA aumenta a $[Ca^{2+}]_i$, mas o mecanismo de influxo do cálcio ainda é desconhecido (MINAMI, FUKUZAWA & NAKAYA, 1993). Recentemente foi demonstrado que a PKC, estimulada pelo TPA, bloqueia tanto os K_{ATP} em células cromafins da medula adrenal de rato e em linhagem de células secretoras de insulina, quanto os canais de K_{Ca} em células de músculo liso de coronárias de porco (WOLLHEIM, et al, 1988; MINAMI, FUKUZAWA & NAKAYA, 1993 & AKIKE et al, 1993).

Avaliamos (fig. 16) a participação da PKC no efluxo de ^{86}Rb após estímulo com TPA. As ilhotas de animais hipoprotéicos apresentaram uma taxa de efluxo mais alta que as ilhotas-controle. Como observado em outros tecidos e em linhagem de células secretoras de insulina, as ilhotas-controle apresentaram uma redução rápida e reversível na taxa de efluxo do ^{86}Rb na presença do TPA. Outros pesquisadores utilizando o 13-acetato 12-miristato forbol (PMA) não observaram alteração na taxa de efluxo do ^{86}Rb em ilhotas de Langerhans (MALAISSE et al, 1983). Já, WOLLHEIM et al, (1988), concluíram que o PMA bloqueia os canais K_{ATP} , despolariza a membrana da célula B, aumenta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e estimulam a secreção de insulina. A comparação desses resultados com os observados em ilhotas de animais hipoprotéicos, indica que a mobilização da PKC, induzida pelo forbol nessas ilhotas, podem ser diferentes aqueles observados em ilhotas-controle, resultando em alteração na despolarização, influxo de cálcio e taxa de efluxo de ^{86}Rb mais elevada e secreção de insulina reduzida.

Ativadores da PKC também estimulam a captação e o efluxo do ^{45}Ca em ilhotas de Langerhans. A atividade elétrica, induzida por glicose ou sulfoniluréias, reflete a atividade dos canais de cálcio e pode ser amplificada em presença de TPA (MALAISSE et al, 1983 & ZAWALICH, BROWN & RASMUSSEN, 1983). Esses dados sugerem que a PKC pode promover influxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática (TOSHIHIKO et al, 1989). Baseado nesses dados, avaliamos o efluxo do ^{45}Ca e a secreção de insulina em presença do TPA, nas ilhotas em estudo, (fig.(s) 21 e 25). O aumento na taxa efluxo do referido isótopo foi semelhante nos dois grupos, demonstrando assim, que as ilhotas de animais hipoprotéicos foram capazes de mobilizar cálcio de maneira semelhante as ilhotas-controle. Quando analisamos a secreção de insulina, notamos que as ilhotas de animais hipoprotéicos secretaram menos que as ilhotas-controle, indicando que existe um desacoplamento entre os eventos iônicos de membrana e os passos intracelulares que compõe o processo secretório.

4-Cálcio e secreção de insulina

Cálcio ionizado é um dos sinais mais comuns de transdução para as células. Distinto de outros segundos mensageiros, Ca^{2+} é requerido para a manutenção da vida e sua permanência livre no citosol, por período prolongados, pode levar a morte celular. Íons cálcio não sofrem transformação como outras moléculas consideradas segundos mensageiros, assim a célula regula os níveis intracelulares de cálcio através de vários ligantes e compostos especializados na sua liberação para o citosol (CLAPHAM, 1995). Considerando a função importante do cálcio no mecanismos de liberação hormonal em células secretoras de insulina, avaliamos a permeabilidade do referido íon em diferentes situações experimentais.

A monitorização do efluxo do ^{45}Ca de ilhotas previamente marcadas, revela que a glicose exerce um duplo efeito sobre seu efluxo (HERCHUELZ, COUTURIER & MALAISSE, 1980). Primariamente provoca uma queda inicial, seguida de um aumento na taxa do efluxo do referido isotópo. Essa queda inicial do efluxo de ^{45}Ca , poderia ser consequência de uma real redução na taxa de efluxo, ou de um aumento na recaptação do ^{45}Ca por organelas intracelulares. O aumento secundário corresponde aos processos de troca $^{40}\text{Ca}/^{45}\text{Ca}$ refletindo a taxa de entrada do $^{40}\text{Ca}^{2+}$ nas células das ilhotas (MALAISSE, BRISSON & BAIRD, 1973; GYLFE & HELLMAN, 1978; HERCHUELZ & MALAISSE, 1978; KIKUCHI et al 1978 & BOSCHERO, et al, 1990).

Ilhotas-controle estimuladas por glicose tiveram, inicialmente, redução e posteriormente aumento na taxa de efluxo do ^{45}Ca (Fig. 19-A), como já descritos por inúmeros pesquisadores (HERCHUELZ COUTURIER & MALAISSE, 1980 & BOSCHERO, et al, 1990). Nas ilhotas de animais hipoprotéicos, glicose reduziu a taxa de efluxo do ^{45}Ca , contudo em menor

intensidade que nas ilhotas-controle, não apresentando também o aumento bifásico secundário.

Para melhor avaliar o efeito da glicose no efluxo de ^{45}Ca , repetimos o experimento da fig. 19-A na ausência de Ca^{2+} no meio extracelular. Esta condição experimental suprime o aumento secundário na taxa de efluxo provocada pela glicose (HERCHELZ, COUTURIER & MALAISSE, 1980 & BOSCHERO et al, 1990). Em ambos os tipos de ilhotas a taxa de efluxo foi drasticamente reduzida, mas as alterações no efluxo do ^{45}Ca , tanto na ausência como na presença de glicose foram sempre menores nas ilhotas de animais hipoprotéicos. Esses resultados sugerem que a perda da resposta bifásica e uma taxa de efluxo menor nas ilhotas de animais hipoprotéicos, deve-se a uma incapacidade do nutriente em promover entrada deste nas células associado a uma menor mobilização de cálcio dos estoques intracelulares.

Como já referimos anteriormente a glicose altera a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumentando a permeabilidade ao Ca^{2+} na membrana da célula B, diminuindo a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e pela mobilização de estoques intracelulares do referido cátion (WOLLHEIN & SHARP, 1981). Deste modo, avaliamos em ilhotas de animais hipoprotéicos, (fig. 17-A e B), a captação do ^{45}Ca após 5 ou 90 min. Os resultados indicaram que o influxo do ^{45}Ca , baseado na captação tanto em curto como em longo período de incubação, foi alterada em ilhotas de animais hipoprotéicos. Isto indica que os processos de entrada (5 min) e de retenção (90 min) do Ca^{2+} nas células dessas ilhotas estão alterados. A liberação de insulina somente ocorre quando uma determinada $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é atingida (ROJAS et al, 1994). A captação de cálcio em concentrações basais de glicose foi muito maior em ilhotas-controle que nas ilhotas de animais hipoprotéicos. Esta diferença na captação de cálcio pode explicar porque as ilhotas-controle são mais eficientes para atingir a concentração limiar desse íon no citosol

justificando, portanto, a maior liberação de insulina encontrada nessas ilhotas.

Foi postulado recentemente, que altas concentrações de glicose podem exercer ações que independem da despolarização da membrana para induzir secreção de insulina. Este efeito parece ser dependente do estado energético da célula e poderia envolver a hidrólise dos fosfolípidos de membrana e conseqüente geração de IP_3 com ativação da PKC (GEMBAL, GILON & HENQUIN, 1992; GEMBAL et al, 1993 & KELLEY, ZAWALISH & ZAWALISH, 1994). Em nosso modelo experimental verificamos alterações dos fluxos de Ca^{2+} na presença de glicose e outras substâncias insulínótropas. Essas alterações podem explicar os níveis mais baixos de insulina secretadas por essas ilhotas.

Arginina despolariza a membrana das células B, mas não reduz a saída de K^+ , mecanismo de ação diferente de outros nutrientes tais como, glicose e outros aminoácidos (LECLERCQ-MEYER, MARCHAND & MALAISSE, 1976; BEIGELMAN, RIBALET & ATWATER, 1977 & HENQUIN & MEISSNER, 1981; BLACHIER et al, 1989 & SENER et al, 1990). Na fig. 20-A, arginina promoveu uma elevação marcante na taxa efluxo do ^{45}Ca nas ilhotas-controle e um menor aumento nas ilhotas de animais hipoprotéicos. Essas ilhotas em presença do aminoácido somente amplifica a taxa de efluxo do ^{45}Ca na presença de concentrações insulínótropas de glicose (fig. 20-B), mas ainda em um patamar inferior as ilhotas-controle.

Esse aumento verificado nas ilhotas-controle, tanto na presença como na ausência de glicose, foi semelhante aos encontrado por HERCHUELZ, et al (1984). Baseado na capacidade da arginina em modular a taxa de efluxo do ^{45}Ca , avaliamos (fig. 18), a captação do referido isótopo. Arginina promoveu maior captação de cálcio nas ilhotas-controle quando comparadas com as ilhotas de animais hipoprotéicos, tanto na ausência como

na presença de glicose. Concluindo, a arginina promove maior acúmulo de Ca^{2+} no citosol das células B, por uma estimulação mais eficaz do influxo de cálcio do que inibindo o efluxo do referido íon (HERCHUELZ, et al, 1984 & SENER et al, 1990). Isto é favorável a hipótese de que existe alterações tanto no número quanto na estrutura dos canais de cálcio nas células B, em consequência do processo de desnutrição. Outro ponto, que devemos salientar, é a mudança nos grupos tiois na membrana das células, interferindo assim nos movimentos iônicos, em especial, de cálcio (FORTUNET-FOUIN, et al, 1989; FORRESTER, et al, 1990 & BROOKS, et al, 1993).

Substâncias tioxidantes inibem a captação de ^{45}Ca e secreção de insulina, em resposta à glicose, leucina, arginina, potássio e tolbutamida (AMMON et al, 1985 & AMMON & WAHL, 1989). O confronto desses dados com nossos resultados sugerem que as células das ilhotas de ratos hipoprotéicos podem apresentar um conteúdo alterado de grupos tiois, podendo assim, interferir na taxa intracelular de GSH/GSSG e conseqüentemente alterar o influxo de cálcio e a própria resposta secretória.

5-Secreção de insulina e estímulos colinérgicos

Embora não necessário para regulação da secreção de insulina estimulada por nutrientes, a modulação neural das funções das células B 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 fosfolipase C e tem seu efeito mediado por proteína G (HENQUIN & HENQUIN, 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). Acúmulo intracelular de Na^+ pode mobilizar Ca^{2+} de estoques distintos daqueles sensíveis ao IP_3 . Finalmente, a geração de diacilglicerol como um produto do aumento do turnover do fosfatidil inositol, poderia ativar a PKC aumentando assim a liberação de insulina, quando da volta da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para valores próximos aos basais (HENQUIN et al, 1988 & PRENTKI & MATISCHINSKY, 1987). Baseado nestas informações, avaliamos em ilhotas desnutridas o possível efeito do agonista colinérgico OXO-m (fig. 25) descrito como um, agonista de característica mista, nicotínico e muscarínico, sendo, portanto uma substância de grande valor para o estudo da resposta colinérgica em ilhotas de Langerhans (SHIRVAN, POLLARD & HELDMAN, 1991 & BOSCHERO et al, 1995). OXO-m potencializou a secreção de insulina com maior intensidade nas ilhotas-controle que nas ilhotas provenientes de animais hipoprotéicos. Como já discutimos antes isto se deve a uma incapacidade desses ilhotas, após estimulação com esse agente colinérgico, em mobilizar Ca^{2+} para o citosol. Outro ponto importante a explorar, é a possibilidade de uma população menor de receptores muscarínico e/ou de canais de Na^+ e de Ca^{2+} nas células B das ilhotas de animais hipoprotéicos dificultando assim a estimulação colinérgica e conseqüente acúmulo de Ca^{2+} e secreção de insulina.

Em adição aos agentes colinérgicos outros segundos mensageiros modulam os canais de Ca^{2+} -sensíveis a voltagem e a secreção de insulina. Um desses segundo mensageiro é a adenosina monofosfato cíclica (AMP_c), o qual potencializa a liberação de insulina induzida por glicose e outros nutrientes (MALAISSE & MALAISSE-LAGAE, 1984). Vários autores tem demonstrado, através da quantificação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que o aumento nos níveis de AMP_c está acompanhado de um aumento no influxo de cálcio pelos canais

Ca^{2+} -sensíveis a voltagem. Esses agentes que aumentam os níveis de AMP_c elevam a captação do ^{45}Ca e potencializam a atividade elétrica induzida por glicose nas células B (MALAISSE & MALAISSE-LAGAE, 1984; HENQUIN & MEISSNER, 1984; IKEUCHI & COOK, 1984; PRENTKI & MATISCHINSKY, 1987; RAJAN, HILL & BOYD III, 1989 & RAJAN et al, 1990).

Nós estimulamos as ilhotas provenientes de animais hipoprotéicos com IBMX, um potente inibidor da fosfodiesterase, elevando assim os níveis de AMP_c (fig. 25). Após o tratamento com IBMX, essas ilhotas apresentam uma menor liberação de insulina, quando comparada com as ilhotas-controle. Mas, quando analisamos a liberação de insulina em relação ao basal, observamos que as ilhotas de animais hipoprotéicos são mais eficientes em liberar o hormônio através da via estimulada pelo AMP_c . Isto poderia indicar que um ou mais passos da secreção estejam emperrados nas ilhotas de animais hipoprotéicos. Coincidentemente o padrão de resposta secretória dos ratos hipoprotéicos é semelhante àquele encontrado em ilhotas de fetos e/ou de recém-nascidos. Nesses, a secreção de insulina, induzida por glicose, é muito menor quando comparado com ilhotas de adultos (BOSCHERO et al, 1993a). Outro ponto em comum é que as ilhotas de ratos recém-nascidos respondem melhor a situações que elevam o AMP_c celular.

RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo estudar alguns dos possíveis determinantes da resposta pancreática deficiente à estimulação com diferentes substâncias insulinoatrópicas, 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 bem como sódio total aumentado, estiveram presentes nos animais que receberam dieta hipoprotéica. Esses animais apresentaram ainda menores níveis de insulina plasmática e conteúdo total de insulina diminuído.

Através da microscopia eletrônica constatamos nas células dos animais hipoprotéicos desorganização da arquitetura, redução do volume, ausência de nucléolo, perda da polaridade, número reduzido de grânulos, grânulos imaturos, retículo endoplasmático rugoso formando cisternas curtas e ingurgitadas com conteúdo floculento e por último, degeneração e edema mitocondrial.

Por outro lado, os estudos *In vitro* demonstraram maior oxidação da glicose por ilhotas de ratos hipoprotéicos. Os efeitos da glicose, leucina, KIC, tolbutamida e arginina (esta na presença da glicose) sobre efluxo de ^{86}Rb foram semelhantes àqueles observados em ilhotas de ratos normoprotéicos. Contudo, o efeito da arginina (na ausência de glicose) bem como da diazoxida e do TPA sobre o efluxo do referido isótopo foi menor em relação aqueles registrados em ilhotas-controle. A captação e o efluxo do ^{45}Ca , na presença de glicose ou arginina, também foi menor ns ilhotas provenientes de ratos hipotéicos comparados às ilhotas de ratos normoprotéicos. Consoante com

os resultados sobre o efluxo de ^{86}Rb e ^{45}Ca , a secreção de insulina estimulada por glicose, altas concentrações de K^+ , tolbutamida, OXO-m, TPA e arginina, foi menor nas ilhotas de animais hipoprotéicos quando comparado as ilhotas-controle.

Diante disso o desacoplamento entre o ATP, gerado pelos nutrientes ensaiados, e a despolarização da membrana com conseqüente alterações na permeabilidade aos íons K^+ e Ca^{2+} parece ser uma das causas mais importantes na resposta secretória reduzida por ilhotas de ratos hipoprotéicos. Em paralelo parece haver também desacoplamento entre a via de sinalização, induzida pela interação hormônio-receptor e influxo de Ca^{2+} , reduzindo assim a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Concluindo, a secreção reduzida de insulina frente as inúmeras substâncias utilizadas parece ter como causa preponderante a incapacidade das células B de ratos hipoprotéicos em manejar adequadamente os íons Ca^{2+} que, em última análise é o ativador do mecanismo secretório.

Summary

We have analyzed in this study the possible mechanisms involved in the poor secretory response to different secretagogues in islets derived from rats maintained with low protein diet. After 8 weeks, rats kept on low protein diet showed the following features: low body weight, hypoalbuminemia, high liver fatty acids and glycogen contents and increased total body Na^+ . In these animals plasma insulin levels and total insulin content were reduced as compared to control rats. Pancreatic B cells from hypoproteic rats showed marked morphological alterations such as: reduced cell volume, loss of cell polarity, altered endoplasmic reticulum, mitochondrial oedema, nucleolus absent and reduced number of insulin-containing granules, which frequently displayed abnormal appearance. Experiments carried out *in vitro* showed increased glucose oxidation by hypoproteic islets. Nevertheless, there was no significant difference concerning the ^{86}Rb efflux rate induced by glucose, leucine, KCl, tolbutamide and arginine (arginine in the presence of glucose) between islets from hypoproteic and control islets. However the effect of arginine (in the absence of glucose), diazoxide and TPA on ^{86}Rb efflux from hypoproteic islets was as reduced compared to control islets. Alterations in ^{45}Ca uptake and efflux, induced by glucose or arginine were reduced when compared to that observed in control islets. Insulin secretion in the presence of glucose, high concentrations of K^+ , tolbutamide, OXO-m, TPA, leucine and arginine was also reduced in those islets from hypoproteic rats in comparison with the control islets. These data suggest that uncoupling between ATP (produced by nutrient metabolism) and membrane depolarization associated to impairment in K^+ and Ca^{2+} membrane permeabilities could be related to the poor secretory response observed in islets derived from rats kept on low protein diet. In addition, alterations in the hormone receptor second

messenger pathway in association with alterations in Ca^{2+} membrane permeability and internal Ca^{2+} mobilization could be involved in the phenomenon. In conclusion, the reduced insulin secretion observed in hypoproteic islets in response to different stimuli, seems to be related, mainly, to defects in the ability of B cells in handling adequately the Ca^{2+} ions.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKANDIR, J.; WORKU, Y.; SCHREUDER, G.M.T.; AMAROO, J.D.; VRIES, R.R.P. & OTTENHOFF, T.H.M. HLA-DR and -DQ antigens in malnutrition-related diabetes mellitus in Ethiopians: a clue to its etiology? *Tissue Antigens* 43:284-289, 1989.
- AHUJA, M.M.S.; TALWAR, B.P.; VARMA, U.M.; KUMAR, A. Diabetes mellitus in young indians. *Ind.J.Med.Res.*, 53:12, 1975.
- AKANJI, A.O. Malnutrition-related diabetes mellitus in young adult diabetic patients attending a nigerian diabetic clinic. *J. of Trop. Med. and Hygiene* 93:35-38, 1990.
- AKIKE, A.; SASA, M.; TAMURA, Y.; UJIHARA, H. & TAKAORI, S. Effects of protein kinase c on the muscarinic excitation of rat adrenal chromaffin cells. Japan. *J. Pharmacol.* 61:145-148, 1993.
- 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, 1972.
- AMMON, H.P.T. & MARK, M. Thiols and pancreatic B-cell function a review. *Cell Biochem. Funct.* 3:157-171, 1985.

- AMMON, H.P.T. & WAHL, M.A. The impact of thiols for insulin secretion. *Exp. Clin. Endocrinol.* 93:2/3 136-142, 1989.
- ANTHONY, L.E. & FALOONA, G.R. Plasma insulin and glucagon levels in protein malnourished rats. *Metabolism*, 23:303-6, 1974.
- ASHCROFT, S.J.H. Glucoreceptor mechanisms and control of insulin release and biosynthesis *Diabetologia* 18:5-15, 1980.
- ASHCROFT, F.M. Adenosine triphosphate sensitive K⁺ channels *A.Rev.Neurosci*: 11:97-118, 1988.
- ASHCROFT, F.M.; ASHCROFT, S.J.H. & HARRISON, D.E. Effects of 2-ketoisocaproate on insulin release and single potassium channel activity in dispersed rat pancreatic β -cells. *J. Physiol* 385:517-529, 1987.
- ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E. & ASHCROFT, S.J.H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic B cells. *Nature* 312:446-448, 1984.
- BAIG, H.A. & EDOZIEN, J.C. Carbohydrate metabolism in kwashiorkor. *Lancet*, 2:662-5, 1985.
- BECKER, D.J. The endocrine responses to protein calorie malnutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 3:187-212, 1983.

BECKER, D.J.; PIMSTONE, B.L. & HANSEN, J.D.L. The relation between insulin secretion, glucose tolerance, growth hormone and serum proteins in protein-calorie malnutrition. *Pediat.Res.*, 9:35-9, 1975.

BEIGELMAN, P.M.; RIBALET, B. & ATWATER, I. Electrical activity of mouse pancreatic beta-cells II. Effects of glucose and arginine. *J. Physiol.* 73:201-217, 1977.

BERGGREN, PER-OLOF; ARKHAMMAR & NILSSON, T. Activation of protein kinase C assists insulin producing cells in recovery from raised cytoplasmic Ca^{2+} by stimulating Ca^{2+} efflux. *Biochem. and biophysical Res. Commun.* 165:416-421, 1989.

BERRIDGE, M.J. Inositol Trisphosphate and calcium mobilization. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 8:85-89, 1986.

BLACHER, F.; MOURTADA, A.; SENER, A. & MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. uptake of metabolized and nonmetabolized cation amino acids by pancreatic islets. *Endocrinology* 24:134-141, 1989.

BORDIN, S.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M. & ATWATER, I. Ionic mechanisms involved in regulation of insulin secretion by muscarinic agonists. *J. Membrane. Biol.* 148:177-184, 1995.

- BROOKS, S.E.H.; PATH, F.R.C.; GOLDEN, M.H.N.; F.R.C.P.& PAYNE-ROBINSON, H.M. Ultrastructure of the islets of langerhans in protein-energy malnutrition. *W.J.Med.* 42:101-106, 1993.
- BROWN, A.M. & BIRMBBAUMER, L. Direct G-protein gating of ion channels. *Am. J. Physiol.* 254:401-410, 1988.
- BOSCHERO, A.C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células B pancreáticas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinol. e Metabol.* 40:(In press) 1996.
- BOSCHERO, A.C.; TOMBACCINI, D.; CARNEIRO, E.M. & ATWATER, I. Differences in K-permeability between cultured adult and neonatal rat islets of Langerhans in response to glucose, tolbutamide, diazoxide and theophylline. *Pancreas* 8:44-49, 1993.
- BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; SENER, A. & MALAISSE, W.J. D-Glucose and L-Leucine metabolism in neonatal and adult cultured rat pancreatic islets. *Mol. Cel. Endocrinol.* 73:63-71, 1990.
- BOSCHERO , A.C.; BORDIN, S. HERCHUELZ, A. & LEBRUN, P. Effects of glucose on ^{45}Ca outflow, cytosolic Ca^{2+} concentration and insulin release from freshly isolated and cultured adult rat islets. *Cell Calcium*, 11:603-609, 1990.

BOSCHERO, A.C.; CREPALDI, S.C.; CARNEIRO, E.M.; DELATTRE, E. & ATWATER, I. Prolactin induces maturation of glucose sensing mechanisms in cultured neonatal rat islets. *Endocrinology* 133:2 515-520, 1993a.

BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E & SANTOS, M.L. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. *Anais XII Cong. Soc. Bras. Fisiol.* (Ribeirão Preto) p. 117, 1980.

BOSCHERO, A.C.; GLASMAN, M.S.; CARNEIRO, E.M.; BORDIN, S.; PAUL, I.; ROJAS, E. & ATWATER, I. Potentiation of glucose-induced insulin from rat pancreatic islets by oxotremorine-m involves M3 Muscarinic cholinergic receptor. *Am. j. Physiol.* 1995.

BOSCHERO, A.C. & MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release the regulation of ^{86}Rb efflux from perfused islets. *Am. J. Physiol.* 236:139-146, 1979.

BOYD III, A.E.; BRYAN, L.A.; BRYAN, J.; KUNZE, D.L.; MOSS, L.; NELSON, D.A.; RAJAN, A.S.; RAEF, H.; XIANG, H. & YANEY, G.C. Sulfonylurea signal transduction. *Recent progress in hormone research* 47:299-317, 1991.

BOWIE, M.D. Intravenous glucose tolerance in kwashiorkor and marasmus. *S.Afr.Med.J.*, 38:328-9, 1964.

CARPINELLI, A.R. Estudo da secreção de insulina e da homeostase glicêmica em ratos desnutridos. São Paulo, (Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, USP), 1978.

CATERRAL, W.A. & EPSTEIN, P.N. Ions channels. *Diabetologia* 35:2 23-33, 1992.

CATERRAL, W.A. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64:493-531, 1995.

CHAVES, N. Nutrição básica e Aplicada. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985.

CHAY, T.R. The effects of inactivator of calcium channels by intracellular Ca^{2+} ions bursting pancreatic β -cells. *Cell Biophys* 11:77-90, 1987.

CLAPHAM, D.E. Calcium Signaling. *Cell* 80:259-268, 1995.

COOK, D.L.; CRILL, W.E. & PORTE, D.Jr. Glucose and acetylcholine have different effects on the plateau pacemaker of pancreatic islets cells. *Diabetes* 30:558-561, 1981.

COOK, D.L. & HALES, C.N. Intracellular ATP directly blocks k^+ channel in pancreatic beta cells. *Nature*, 311:271-3, 1984.

COSTA NETO, P.L.O. TESTES DE HIPOTHESES. IN COSTA NETO, P.L.O. Estatística, *Edgard Blucher*, 84-129, 1977.

CRACE, C.J.; SWENNE, I. & MILNER, R.D.G. Long-Term follow-up After Early Protein-Calorie Malnutrition in Young Rats: Sex Difference in Glucose Tolerance and Serum Insulin levels. *Metabolism* 38:10 933-938, 1989.

CZECH, M.P. Molecular actions of insulin on glucose transport: *Annu. Rev. Nutr.* 15:441-471, 1995.

DAHRI, S.; CHERIF, H.; REUSENS, B.; REMACLE, C. & HOET, J.J. Effects of isocaloric low protein diet during gestation in on vitro insulin secretion by islets of the offspring. *diabetologia* 37:suppl. 1, A80, 1994.

DAHRI, S.; REUSENS, B.; REMACLE, C. & HOET, J.J. Nutritional influences on pancreatic development and potential links with non-insulin dependent diabetes. *Proc. Nutr. Society* (IN PRESS), 1995.

DAHRI, S.; SNOECK, A.; REUSENS, B.; REMACLE, C. & HOET, J.J. Islet function in offspring of mothers on low protein diet during gestation. *Diabetes* 40:suppl. 2, 115-120, 1991.

DE WEILLE, J.R.; SCMID-ANTOMARCHI H.; FOSSET, M. & LAZDUNSKI, M. Regulation of ATP-sensitive K⁺ channels in insulinoma cells: activation by somatostatin and protein kinase C and the role of cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:2971-2975, 1989.

DIXIT, P.K.; SORENSON, R.L. Effect of protein malnutrition on insulin secretion. *Indian.J.Med.Res.*, 86:663-670, 1988.

DIXIT, P.K. & KAUNG, H.L.C. Rat pancreatic β cell in protein deficiency: a study involving morphometric analysis and alloxan effect. *J.Nutr.*, 115:375-381, 1985.

- DOLLET, J.M.; BECK, B.; VILLAUME, C.; MAX, J.P. & DEBRY, G. Progressive adaptation of the endocrine pancreas during long term protein deficiency in rats: effects on blood glucose homeostasis and on pancreatic insulin, glucagon and somatostatin concentrations. *J. Nutr.* 115:1581-1588, 1985.
- DOUMAS, B.T. & WATSON, W.A. & BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta* 31:87-96, 1971.
- DE VOS, A.; SCHUIT, F.C. & MALAISSE, W.J. Preferential stimulation by glucose of its oxidation relative to glycolysis in purified insulin-producing cells. *Biochemistry International* 24:1 117-121, 1991.
- EIZIRIK, D.L.; KORBUTT, G.S. & HELLERSTRÖM, C. Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentration in vitro impairs the B-cell function. *J. Clin. Invest.* 90:1263-1268, 1992.
- ESCRIBA, F.; KERGOAT, M.; BAILBÉ, D.; PASCUAL-LEONE, A.M. & PORTHA, B. Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. *Diabetologia* 34:559-564, 1991.
- EASOM, R.A., HUGHES, J.H.; LANDT, M.; WOLF, B.A., TURK, J. & McDANIEL, M.L. Comparison of effects of phorbol esters and glucose on protein kinase C activation and insulin secretion in pancreatic islets. *Biochemical Journal* 264:27-33, 1989.

FREDHOLM, B.B.; DUNÉR-ENGSTROM, M.; FASTBOM, J.; HU, P.-S. & DER PLOEG, I.V. Role of G protein, cyclic AMP, and ion channel in the of transmitter release by adenosine. *Annals New York Academy of sciences*. 276-288, 1991.

FLOYD, J.C.; FAJANS, S.S.; KNOFF, R.F. & CONN, J.W. Evidence that insulin release is the mechanism for experimentally-induced leucina hypoglicemia in man. *J. Clin. Invest.* 42:1714-1719, 1963.

FORRESTER, T.; GOLDEN, M. BRAND, S. & SWALES, J. Reduction in vitro of red cell glutation reproduces defects of cellulat sodium transport seen in oedematous malnutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* 44:363-369, 1990.

GARCIA-MORALES, P.; DUFRANE, S.P.; SENER, A.;VALVERDE, I. & MALAISSE, W.J. Inihibitory effects od clonidine upon adenylate cyclase activity, cyclic AMP production, and insulin release in rat pancreatic islets. *Biosci Rep.* 4:511, 1984.

GEMBAL, M.; DETIMARY, P.; GILON, P.; GAO, Z.Y. & HENQUIN, J.C. Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels in mause B-cells. *J. Clin. Invest.* 91:871-880, 1993.

GEMBAL, M.; GILON, P. & HENQUIN, J.C. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J. Clin. Invest.* 89:1288-1295, 1992.

- GILON, P. & HENQUIN, J.C. Activation of muscarinic receptors increases the concentration of free Na^+ in mouse pancreatic B-cells. *FEBS Letters* 315:353-356, 1993.
- GOLDEN, M.H.N. & RAMADATH, D. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. *Proc. Nutr. Soc.* 46:53-68, 1987.
- GOMIS, R.; SENER, A.; MALAISSE, L.F. & MALAISSE, W.J. Transglutaminase activity in pancreatic islets. *Biochim. Biophys. Acta* 760-765, 1983.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. *J. Biol. Chim.* 177:751, 1949.
- GYLFE, E. & HELLMAN, B. Calcium and pancreatic-cell function 2. Mobilisation of glucose sensitive ^{45}Ca from perfused islets rich in β -cells. *Biochim. Biophys. Acta* 436:249-257, 1978.
- GRODSKY, G.M. (1989) A new phase of insulin secretion. How will it contribute to our understanding of β cell function? *Diabetes*, 38:673-678, 1989.
- HADESKOV, C.J. Mechanism of glucose induced insulin secretion. *Physiol. Rev.*, 60:442-509, 1980.
- HADDEN, D.R. Glucose, free fatty acid and insulin interrelations in kwashiorkor and marasmus. *Lancet*, 1:589-93, 1967.

- HASSID, W.Z. & ABRAHAM, S.; Chemical procedures for analysis of polisaccharides. *Methods Enzimol.* 3:34-51, 1957.
- HEARD, C.R.C. & STEWART, R.J.C. Protein-calorie deficiency and disorders of endocrine glands. *Hormones*, 2:40-64, 1971.
- HEARD, C.R.C.; FRANJI, S.M. & WRIGHT, P.M.; McCARTNEY, P.R. Biochemical characteristics of different forms of protein-energy malnutrition: an experimental model using young rats. *Br.J.Nutr.*, 37:1-21, 1977.
- HENQUIN, J.C. Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islet cells. *Biochem. J.* 186:541-550, 1980.
- HENQUIN, J.C. Regulation of insulin release by ionic and electrical events in B cells. *Hormones Res.* 27:168-178, 1987.
- HENQUIN, J.C.; M.-C. GARCIA; BOZEM, M.; HERMANS, M.P. & HENQUIN, M. Muscarinic control of pancreatic B cell function involves sodium- dependent depolarization and calcium influx. *Endocrinology* 122:2134-2142, 1988.
- HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. Effects of amino acids on membrane potential and ^{86}Rb fluxes in pancreatic β -cells. *Am. J. Physiol.* 240:245-252, 1981.
- HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on ^{86}Rb fluxes and membrane potential in pancreatic B-cells. *Biochem. Pharmacol.* 31:1407-1415. 1982.

HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia* 40:1043-1052, 1984.

HENQUIN, J.C. & NENQUIN, M. The muscarinic receptor subtype in mouse pancreatic B-cells. *FEBS Letters* 236:89-92. 1988.

HERBERT, V.; LAU, K.S.; GOTTLIER, C.W. & BLEICHER, S.J. Coated-charcoal immunoassay of insulin. *J.Clin. Endocrinol.* 25:1375-1384, 1965.

HERCHUELZ, A.; COUTURIER, E. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: glucose-induced calcium exchange. *Am. J. Physiol.* 238:96-103, 1980.

HERCHUELZ, A.; LEBRUN, P.; BOSCHERO, A.C. & MALAISSE, W.J. Mechanism of arginine-stimulated Ca^{2+} influx into pancreatic B cell. *Am. J. Physiol.* 246:38-43, 1984.

HERCHUEELZ, A. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: dissociation between calcium and insulin release. *J. Physiol.* 283:409-424, 1978.

HERCHUEELZ, A.; SENER, A. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in rat pancreatic islets IV. calcium extrusion by sodium-calcium countertransport. *J. Membr. Biol.* 57:1-12, 1980.

HERMANS, M.P.; SHMEER, W. & HENQUIN, J.C. Modulation of the effect of acetylcholine on insulin release by the membrane potential of B cells. *Endocrinology* 120:5 1765-1773, 1987.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C. & WINKELMAN, J. *Clinical chemistry. Principles and ed. Harper and Row Publishers Inc.* N. Y. 1288, 1974.

HILL, D.E.; HOLT, A.B.; PARRA, A.; CHEE, D.B. The influence of protein-calorie versus calorie restriction on the body composition and cellular growth of muscle and liver in weanling rats. *Johns Hopkins Med.J.*, 127:146-63, 1970.

HILL, R.S. & BOYD, A.E III. Perfusion of a clonal cell line of simian virus 40-transformed beta cells: insulin secretory dynamics in response to glucose, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, and potassium. *Diabetes* 34:115-120, 1985.

HILL, R.S.; RAJAN, S.A. & BOYD, A.E III. cAMP-dependent protein phosphorylation and insulin secretion. *Endocr. Soc. Abstr. Annu. Meet*, 69th, 228, 1987.

HUGHES, S.J.; CHALK, J.G. & ASHCROFT, S.J.H. 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, 1990.

HUGH-JONES, P. Diabetes in Jamaica. *Lancet* 2:891, 1985.

- HUNTER, M.; LOPES, A.G.; BOULPAEP, E.I. & GIEBISCH, G. Single-channel recordings of calcium-activated K^+ channel in the apical membrane of rabbit cortical collecting tubules. *Proc. Natl. acad. Sci.* 81:4237-4239, 1984.
- IKEUCHI, M. & COOK, D.L. Glucagon and forskolin have dual effects upon islet cell electrical activity. *Life Sci.* 35:685-691, 1984.
- JACKSON, A.A. Blood glutathione in severe malnutrition in childhood. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80:9111-9113, 1986.
- JAMES, W.P.T. & COORE, H.G. Persistent impairment of insulin secretion and glucose tolerance after malnutrition. *Am.J.Clin.Nutr.*, 23:386-9, 1970.
- JONES, P.M.; PERSUAUD, S.J. & HOWELL, S.L. Protein kinase C and the regulation of insulin secretion from pancreatic B cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 6:121-127, 1991.
- KABADI, V.M.; EISENSTEIN, A.B. & STRACK, I. Decreased plasma insulin but normal glucagon in rats fed low protein diets. *J.Nutr.*, 106:1247-53, 1976.
- KEAHEY, H.H.; RAJAN, A.S.; BOYD, A.E. III & KUNZE, D.L. Characterization of voltage-dependent Ca^{2+} channel in B-cell line. *Diabetes* 38:188-93, 1989.
- KELLEY, G.; ZAWALICH, K.; ZAWALICH, W.S. Calcium and a mitochondrial signal interact to stimulate phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in rat islets. *Endocrinology* 134:1648-1654, 1994.

- KIKUCHI, M.; WOLLHEIM, C.B.; CUENDE, G.S.; RENOLD, A.E. & SHARP, G.W.G. studies on the dual effects of glucose on ^{45}Ca efflux from isolated rat islets. *Endocrinology* 102:1339-1349, 1978.
- KOKO, V. PAVLOVIC, M.; LABAN, A. RADOVANOVIC, J. NIKOLIC,; PETRONIJEVIC, L & RISTIC, M. A sterological investigation of rat endocrine pancreas after a long-term low-protein diet. *Pancreas* 7:6 672-679, 1992.
- KUKULJAN, M.; GONÇALVES, A.A. & ATWATER, I. Charybdotoxin-sensitive $\text{K}_{(\text{Ca})}$ channel is not involved in glucose-induced electrical activity in pancreatic β -cells. *J. Mem. Biol.* 119:187-195, 1991.
- LACY, P.E. & KOSTIANOVSKY, M. Method for isolation of the intact islet of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16:35-9, 1967.
- LECLERCQ-MEYER, J.; MARCHAND, J. & MALAISSE, W.J. The role of calcium in glucagon release. Interactions between arginine and calcium. *Horm. Res.* 7:348-362, 1976.
- LEVINE, L.S.; WRIGHT, P.G. & MARCUS, F. Failure to secrete immunoreactive insulin by rats fed a low protein diet. *Acta Endocrinologica* 102:240-245, 1983.
- MALAISSE, W.J. Is type 2 diabetes due to a deficiency of FAD-linked glycerophosphate dehydrogenase in pancreatic islets? *Acta Diabet.* 30:1-5, 1993.

MALAISSSE, W.J. Anomalies du métabolisme insulaire dans le diabète. *Médecine/Sciences* 11:199-202, 1995.

MALAISSSE, W.J.; BRISSON, G.R. & BAIRD, L.E. 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.

MALAISSSE, W.J. & BOSCHERO, A.C. Calcium antagonists and islet function. XI. Effect of nifedipine. *Horm. Res.* 8:203-209, 1977.

MALAISSSE, W.J.; DUFRANE, S.; MATHIAS, P.C.F.; CARPINELLI, A.R.; MALAISSSE-LAGAE, F.; GARCIA-MORALES, P.; VALVERDE, I. & SENER, A. The coupling of metabolic to secretory events in pancreatic islets. The possible role of glutathion reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 844:256-264, 1985.

MALAISSSE, W.J.; LEBRUN, P.; HERCHUELZ, A.; SENER, A. & MALAISSSE-LAGAE, F. Synergistic effect of a tumor-promoting phorbol ester and a hypoglycemic sulfonylurea upon insulin release. *Endocrinology* 113:1870-1877, 1983.

MALAISSSE, W.J.; MALAISSSE-LAGAE, F. The role of cyclic AMP in insulin release. *Experientia* 40:1068-1075, 1984.

MALAISSSE, W.J. & SENER, A. Hexose metabolism D-glucose oxidation by functional events. *Biochim. Biophys. Acta* 971:246-254, 1988.

- MALAISSE, W.J. & SENER, A. Hexose metabolism in pancreatic islets: Unequal oxidation of the two carbons of glucose-derived acety residues. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 292:244-249, 1992.
- MALAISSE, W.J.; SENER, A. & MAHY, M. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Sorbitol Metabolism in isolated islets. *Eur. J. Biochem.* 47:365-370, 1974.
- MARTY, A. Ca^{+2} -dependent k^{+} channel with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature*, 291:497-500, 1981.
- MATHIAS, P.C.F.; CARPINELLI, A.R.; BILLAUDEL, B.; GARCIA-MORALES, P.; VALVERDE, I. & MALAISSE, W.J. Cholinergic stimulation of ion fluxes in pancreatic islets. *Biochem. Pharmacol.* 43:3451-3457, 1985.
- MAZANCOURT, P.; CARNEIRO, E.C.; ATWATER, I. & BOSCHERO, A.C. Prolactin treatment increases Glut2 but not G protein subunit content in cell membranes from cultured neonatal rat islets. *FEBS letters* 343:137-140, 1994.
- MCCLESKEY, M.C.; FOX, A.P.; FELDMAN, D. & TISIEN, R.W. Different types of calcium channels. *J. Exp. Biol.* 124:177-190, 1986.
- MEISSNER, H.P. & PREISLER, 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*, edited by R.A. Camerini-Davalos & B. Hanover. New York: Plenum 79-107, 1979.

MELLO, M.A.R. Desnutrição protéico-calórica, gravidez e desenvolvimento materno. São Paulo, 1985 (Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, USP).

MELLO, M.A.R. & CURY, L. Circulating thyroid hormone levels in young pregnant rats and their fetuses. Effects of malnutrition. *Ann. Nutr. Metab.* 33:181-187, 1989.

MELLO, M.A.R. & CURY, L. Effect of protein-calorie malnutrition on endocrine pancreatic function in young pregnant rats. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, 22:791-794, 1989.

MELLO, M.A.R.; CARNEIRO, E.M.; BOSCHERO, A.C.; CURY, L. Endocrine pancreatic function in young pregnant malnourished rats. Studies *in vitro*. Book of Abstracts XVIII International Congress of the International Academy of Pathology, p.30, 1990.

METZ, S.A. Is protein kinase C required for physiologic insulin release? *Diabetes* 37:3-7, 1988.

MINAMI, K.; FUKUZAWA, K. & NAKAYA, Y. Protein kinase C inhibits the Ca^{2+} -activated K^{+} -Channel of cultured coronary artery smooth muscle cells. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 15:263-269, 1993.

MOLDAWER, L.L.; BISTRAN, B.R. & BLACKBURN, G.L. Factors determining the preservations of protein status during dietary protein deprivation. *J.Nutr.*, **111**:1287-96, 1981.

MORRIS, A.P.; GALLACHER, D.V. & LEE, J.A.C. A large conductance, voltage and calcium-actived K⁺ channel in the basolateral membrane of rat enterocytes. *FEBS Lett*, **206**:87-92, 1986.

NEWGARD, C.B. & McGARRY, J.D. Metabolic coupling factors in pancreatic β -Cell signal trasduction. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:689-719, 1995.

NOGUEIRA, D.M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M.H.; ABDALLA, D.S.P.; HIRATA, R.D.C. *Metodos de Bioquímica Clínica*. São Paulo, Pancast, 1990.

NOWYCKY, M.C.; FOX, A.P. & TSIEN, R.W. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**:440-443, 1985.

OKAMOTO, Y.; ISHIDA, H.; TAMINATO, T.; TSUJI, K.; KUROSE, T.; TSUURA, Y.; KATO, S.; IMURA, H. & SEINO, Y. Role of cytosolic Ca²⁺ in impaired sensitivity to glucose of rat pancreatic islets exposed to high glucose in vitro. *Diabetes* **41**:1555-1561, 1992.

OKITOLONDA, W.; BRICHARD, & HENQUIN, J.C. Repercussions of chonic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. *Diabetologia* **30**:946-951, 1987.

OKITOLONDA, W.; BRICHARD, S.M.; POTTIER, A.M. & HENQUIN, J.C.
Influence of low- and high-protein on glucose homeostasis in rat. *British Journal Nutrition*, 60:509-516, 1988.

OLLER DO NASCIMENTO, C.M. & WILLIAMSON, D.H. Tissue-specific effects of starvation and refeeding on the disposal of oral (1-¹⁴C) triolein in the rat during lactation and on removal of litter. *Biochem. J.*, 254:539-546, 1988.

OXMAN, S.; MACCIONI, A.; ZUNIGA, A.; SPADAR, R. & MONCKEBERG, F.
Disturbances of carbohydrate metabolism in infantile marasmus. *Am.J.Clin.Nutr.*, 21:1285-90, 1968.

PATRIC, J. Death during recovery from severe malnutrition and its possible relationship to sodium pump in the leucocyte. *Br. Med. J.*, 1:1051-1054, 1977.

PATRIC, J. & GOLDEN, M.H.N. Leucocyte electrolytes and sodium transport in protein-energy malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 30:1478-1481, 1977.

PERSAUD, S.; JONES, P.M.; SUGDEN, D. & HOWELL, S.L. Translocation of protein kinase C in rat islets of langerhans: effects of a phorbol ester, carbacol and glucose. *FEBS Letters*, 245:80-84, 1989.

PHIPPS, K.; BARKER, D.J.P.; HALES, C.N. FALL, C.H.D.; OSMOND, C. & CLARK, P.M.S. Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women. *Diabetologia* 36:225-228, 1993.

PHILLIPS, D.I.W.; HIRST, S.; CLARK, P.M.S.; HALES, C.N. & OSMOND, C. Fetal growth and insulin secretion in adult life. *Diabetologia*, 37:592-596, 1994.

PRENTKI, M. MATSCHINSKY, F.M. Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol. Rev.*, 67:1185, 1987.

PETERSEN, O.H. & FINDLAY, Z. Electro physiology of the pancreas. *Physiol. Rev.*, 67:1054-1116, 1987.

RAJAN, A.S., AGUILAR-BRYAN, L.; NELSON, D.A.; YANEY, G.C.; HSU, W.H.; KUNZE, D.L. & BOYD, A.E. Ion channels and insulin secretion. *Diabetes Care*, 13:340-367, 1990.

RAJAN, A.S.; HILL, R.S. & BOYD, A.E.III. 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, 1989.

RAO, R.H. The role of undernutrition in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 7:595, 1984.

RAO, R.H. Diabetes in the undernourished: Coincidence or Consequence? *Endocrinr Reviews* 9:1 67-87, 1988.

RAO, R.H. Chronic undernutrition may accentuate the β cell dysfunction of type 2 diabetes. *Diabetes Res. and Clin. Practice* 8:125-130, 1990.

- RAO, R.H. Is tropical pancreatic diabetes malnutrition related. *Diabetes Care*, 16:941-945, 1993.
- RAO, R.H. Fasting glucose homeostasis in the adaptation to chronic nutritional deprivation in rats. *Am. J. Physiol*, 268:E873-E879, 1995.
- RAO, R.H. Adaptations in glucose homeostasis during chronic nutritional deprivation in rats: hepatic resistance to both insulin and glucagon. *Metabolism*, 44:6 817-824, 1995a.
- RAO, R.H.; BETSCHART, M. & VIRJI, M. Effects of chronic undernutrition on hepatocyte insulin receptors in rats. *Metabolism*, 40:12, 1292-1297, 1991.
- RAO, R.H; VIGG, B.I. & RAO K.S.J. Suppressible glucagon secretion in young ketosis-resistant, type "J" diabetes in India. *Diabetes* 32:1163, 1983.
- RASMUSSEN, M.H.; ZWALICH, K.C.; GANESSAN, S.; CALLE, P.; ZWALICH, W.S. Physiology and pathophysiology of insulin secretion. *Diabetes Care*, 13:655-66, 1990.
- RASSCHAERT, J.; REUSENS, B. DARHI, S.; SENER, A.; REMACLE, C.; HOET, J.J. & MALAISSE, W.J. Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. *Endocrinology* 136:2631-2634, 1995.

REGOW, B.J.M.; CORNELISSEN, P.J.H.C.; HELDER, A.P.; SPIJKERS, J.B.V. & WEEBER, Y.M. Specific determination of free fatty acid in plasma. *Clin. Chim. Acta*, 31:187-195, 1971.

SANTOS, R.M. & ROJAS, E. Muscarinic receptor modulation of glucose-induced electrical activity in mouse pancreatic B-cells. *FEBS Letters*. 249:411-417, 1989

SHIRVAN, M.H.; POLLARD, H.B. & HELDMAN, E. Mixed nicotinic and muscarinic features of cholinergic receptor coupled to secretion in bovine chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:4860-4864, 1991.

SCRIABINE, A. Ca^{2+} channel ligands: comparative pharmacology. In Structure and Physiology of the Slow Inward Calcium Channel. *New York Liss*: 51-70, 1987.

SENER, A. & MALAISSE, W.J. Stimulation by D-glucose of mitochondrial oxidative events in islets cells. *Biochem. J.* 246:89-95, 1987.

SENER, A. & MALAISSE, W.J. Hexose metabolism in pancreatic islets. *Biochem. and Mol. Biology* 267:13251-13256, 1992.

SENER, A.; BLACHIER, J.; RASSCHAERT, J. & MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release: comparison with histidine-induced insulin release. *Endocrinology* 127:107-113, 1990.

SENER, A.; MALAISSE-LAGAE, F. & MALAISSE, W.J. Decreased activity of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in islets of rats fed a low protein diet. *Med. Sci. Res.* 21:625-626, 1993.

SJÖRGREEN, B.; NORDENSKJOLD, T. HOLMGREN, H.& WOLLERSTRON, J. Bertrag zur kemtmis des leberrhythmik. *Pfliigers Arch. Gesante Menschem Tierr.*, 240:247, 1938.

SLONE, D.; TAITZ, L.S. & GILCHRISTR, G.S. Aspects of carbohydrate metabolism in kwashiorkor. *Br.Med.J.*, 1:32-4, 1961.

SMITH, S.R.; EDGAR, P.J.; POZEFZKY, T.; CHETRI, M.K. & PROUT, T.E. Insulin secretion and glucose tolerance in adults with protein-calorie malnutrition. *Metabolism*, 24:9 1073-1084, 1975.

SNOECK, A.; REMACLE, C.; REUSENS, B. HOET, J.J. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol. Neonate* 57:107-118, 1990.

STEINER, D.F. & JAMES, D.E. Cellular and molecular biology of the beta cell. *Diabetologia* 35:2 41-48, 1992.

STURGEES, N.C; ASHFORD, M.L.J.; CARRINGTON, C.A. & HALES, C.N. Single channel recordings of potassium currents in an insulin-secreting cell line. *J.Endocr.*, 109:201-7, 1986.

- SUTTER, B.C.J. Regulation hormonale de la secretion de l'insuline. *J.Physiol.* (Paris) **78**:119-130, 1982.
- SWENNE, L.; CRACE, C.J. & JANSSON, L. Intermitent protein-calorie malnutrition in the young rat causes long-term impariment of secretory response to glucose *in vitro*. *J. Endocrinology* **118**:295-302, 1988.
- SWENNE, I.; BORG, L.A.H.; CRACE, C.J. & LANDSTRÖM, A.S. Persistent reduction of pancreatic beta-cell mass after a limited period of protein-energy malnitrution in the young rat. *Diabetologia* ,**53**:939-945, 1992.
- SWENNE, I.; CRACE, C.J. & MILNER, R.D.G. Persistent impairment of insulin secretory response to glucose in adult rats after limited period of protein--calorie malnutrition early in life. *Diabetes* **36**:454-458, 1987.
- TAMAGAWA, C.S. & HENQUIN, J.C. A single mechanism for the stimulation of insulin release and ⁸⁶Rb efflux from rat islets by cationic amino acids. *Biochem. J.***208**-301, 1982.
- THAMS, P.; CAPITO, K. & HEDESKOV, C.J. An inhibitory role for polyamines in protein kinase C activation and insulin secretion in mouse pancreatic islets. *Biochem., J.* **221**:247-253, 1986.
- TOSHIHIKO, y.; RUSSO, L.L. & SHARP, G.W. Phorbol ester-stimulated insulin secretion by RINm5F insulinoma cells is linked with membrane depolarization and a increase in cytosolic free Ca²⁺ concentration. *J. Biological Chemistry* ,**264**:2455-2462, 1989.

TURNER, M.R.; ALLEN, K.A. & MUNDAY, K.A. Effects of age and diet on the secretion of insulin and growth hormone in rabbits. *Proc.Nutr.Soc.*, 33:56A, 1974.

VERCHERE, C.B.; KWOK,Y.N. & BROWN, J.C. Modulation of acetylcholine-stimulated insulin release by glucose and gastric inhibitory polypeptide. *Pharmacology*, 42:273-282, 1991.

VISWANATHAN, M. Pancreatic diabetes in Indian: an overview. In: Podolsky S, Viswanathan M. (eds) Secondary diabetes. *The Espectrum of the diabetic Syndromes*. Raven Press, New York, 105, 1980.

YADA, T.; RUSSO, L.L. & SHARP, G.W.G. Phorbol ester-stimulated insulin secretion by RINm5F insulinoma cells is linked with membrane depolarization and an increase in cytosolic free Ca^{2+} concentration. *The Journal Biological Chemistry*. 264:5 2455-2462, 1989.

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

ZAWALICH, W.S.;BROWN, C. & RASMUSSEN, H. Insulin secretion: combined effects of phorbol ester and A23187. *Biochem. Biophys Res. Commun* 117:448-455, 1983.

WEINKOVE, C.; WEIKOVE, E.A. & PIMSTONE, B.L. Glucose tolerance and insulin release in malnourished rats. *Clin.Sci.Mol.Med.*, 50:153-63, 1976.

WHO STUDY GROUP ON DIABETES MELLITUS. *Who Tech. Rep. Ser.*, 53:12, 1985.

WIDOWSON, E.M. & McCANCE, R.A. Effect of low protein diet on chemical composition of the bodies and tissues of young rats. *Br.J.Nutr.*, 11:198-206, 1957.

WIYONO, P.; MORIMOTO, Y. & TANIGUSHI, H. The presence do islet cell antibodies in malnutrition-related diabetes mellitus. *Diabetes Res. and Clin. Practice* ,.6:75-78, 1989.

WOLLHEIM, C.B.; DUNNE, M.J.; PETER-RIESCH, B.; BRUZZONE, R.; POZZAN, T. & PETERSEN, T. Activators of protein kinase C depolarize insulin-secreting cells closing K⁺ chennels. *The EMBO Journal* , 7:2443- 2449, 1988.

WOLLHIEM, C.B. & SHARP, G.W.G. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol.Rev.*, 61:914-973, 1981.

WOODS, S.C. & PORTE, D. Neural control of the endocrine pancreas. *Physiol. Rev.*, 54:595-599, 1974.

YOUNOSZAY, R. & DIXIT, P.K. Decreased insulin secretion by isolated pancreatic islets from rats fed 4% protein diet. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 164:317-21, 1980.

APÊNDICE

Tabela A-1. Efeito de diferentes agentes sobre o Efluxo de ^{86}Rb .

Nº Fig.	Grupo	condição do Krebs	condição de alteração	Tempo (minutos) -- valores de (p)				
				42'	44'	46'	48'	50'
1	controle	G 2.8 mM	Tol 20 µg/ml	0,005	0,005	0,001	0,05	0,05
	desnutrido	G 2.8 mM	Tol 20 µg/ml	0,001	0,005	0,10	0,002	0,005
2	controle	G 2.8 mM	Dia 20 µg/ml	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	desnutrido	G 2.8 mM	Dia 20 µg/ml	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
3	controle		Arg 20 mM	0,05	0,05	0,10	*	*
	desnutrido		Arg 20 mM	0,10	0,10	0,005	0,10	*
4	controle	G 2.8 mM	Arg 20 mM	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001
	desnutrido	G 2.8 mM	Arg 20 mM	0,002	*	0,01	0,02	0,05
5	controle	G 8.3 mM	Arg 20 mM	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	desnutrido	G 8.3 mM	Arg 20 mM	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
6	controle	Ca ²⁺ 10 mM	Arg 20 mM	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	desnutrido	Ca ²⁺ 10 mM	Arg 20 mM	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
7	controle	♣ G 2.8 mM	G 0.0 mM	0,20	0,05	0,05	0,05	0,05
		♥ G 2.8 mM	G 2.8 mM	*	*	*	*	*
		♥ G 2.8 mM	G 8.3 mM	0,001	0,001	0,02	0,002	0,002
		♦ G 2.6 mM	G 16.7 mM	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002
	desnutrido	♣ G 2.8 mM	G 0.0 mM	0,100	0,05	0,001	0,05	0,05
		♥ G 2.8 mM	G 2.8 mM	*	*	*	*	*
		♥ G 2.8 mM	G 8.3 mM	0,20	0,05	0,05	0,05	0,05
		♦ G 2.8 mM	G 16.7 mM	0,05	0,002	0,002	0,002	0,002
8	controle	G 2.8 mM	Kic 25 mM	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	desnutrido	G 2.8 mM	Kic 25 mM	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
9	controle	G 2.8 mM	Leu 20 mM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	desnutrido	G 2.8 mM	Leu 20 mM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
10	controle	G 5.6 mM	TPA 100 nM	0,005	0,10	0,10	0,10	0,05
	desnutrido	G 5.6 mM	TPA 100 nM	0,10	0,02	0,005	0,01	0,001

* não significativo

Tabela A-2. Efeito de diferentes agentes sobre o Efluxo de ^{86}Rb .

Nº Fig.	Grupo	condição do Krebs	condição de alteração	Tempo (minutos) -- valores de (p)				
				62'	64'	66'	68'	70'
1	controle	G 2.8 mM	Tol 20 µg/ml	0,01	0,005	0,001	0,001	0,01
	desnutrido	G 2.8 mM	Tol 20 µg/ml	0,10	0,10	0,010	0,02	0,005
2	controle	G 2.8 mM	Dia 20 µg/ml	0,05	0,001	0,02	0,002	0,005
	desnutrido	G 2.8 mM	Dia 20 µg/ml	0,02	0,001	0,005	0,05	0,005
3	controle		Arg 20 mM	0,002	0,02	0,001	0,005	0,01
	desnutrido		Arg 20 mM	*	*	0,05	0,10	0,10
4	controle	G 2.8 mM	Arg 20 mM	0,20	0,20	0,05	0,05	0,05
	desnutrido	G 2.8 mM	Arg 20 mM	0,05	0,001	0,002	0,002	0,002
5	controle	G 8.3 mM	Arg 20 mM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	desnutrido	G 8.3 mM	Arg 20 mM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
6	controle	Ca ⁺² 10 mM	Arg 20 mM	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	desnutrido	Ca ⁺² 10 mM	Arg 20 mM	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

* não significativo

Tabela A-3. Efeito de diferentes agentes sobre o Efluxo de ^{45}Ca .

Nº Fig. / Grupo	condição do Krebs	condição de alteração	Tempo (minutos) -- valores de (p)									
			41'	42'	43'	44'	45'	46'	47'	48'	49'	50'
1-cont.		Arg 20 mM	0,02	0,02	*	0,10	0,05	0,05	0,05	0,005	0,005	0,005
desn.		Arg 20 mM	0,001	0,10	0,05	0,5	*	0,5	0,50	0,10	*	0,05
2-cont.	G 8.3 mM	Arg 20 mM	0,005	0,05	0,01	0,001	0,01	0,05	0,05	0,002	0,005	0,001
desn.	G 8.3 mM	Arg 20 mM	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
3-cont.	Sem Ca ⁺²	G 16.7 mM	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
desn.	Sem Ca ⁺²	G 16.7 mM	0,001	0,02	0,002	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
4-cont.	Com Ca ⁺²	G 16.7 mM	0,10	0,10	0,01	0,01	0,01	0,10	0,10	0,05	0,10	0,05
desn.	Com Ca ⁺²	G 16.7 mM	0,05	0,001	0,001	0,02	0,05	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
5-cont.	G 5.6 mM	TPA 100 nM	*	*	*	0,05	0,05	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
desn.	G 5.6 mM	TPA 100 nM	*	*	*	*	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

* não significativo

Médias e erro padrão das diferentes incubações apresentadas nos resultados

Curva dose resposta à glicose

CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (mM)	GRUPO	
	CONTROLE	DESNUTRIDO
2,8	1,05 ± 0,08	0,37 ± 0,05
5,6	1,09 ± 0,07	0,41 ± 0,06
8,3	2,95 ± 0,27	0,48 ± 0,03
11,1	4,84 ± 0,28	0,77 ± 0,04
16,7	5,84 ± 0,34	1,43 ± 0,09
22,2	5,29 ± 0,29	1,69 ± 0,12
27	6,29 ± 0,50	1,57 ± 0,16
33,4	5,53 ± 0,07	1,77 ± 0,09

Efeito de concentrações crescentes de potássio sobre a secreção de insulina

	K ₅	K ₁₀	K ₂₀	K ₄₀	K ₈₀
controle	0,92 ± 0,11	1,86 ± 0,77	1,88 ± 0,16	2,46 ± 0,19	2,70 ± 0,13
desnutrido	0,46 ± 0,04	0,52 ± 0,05	0,52 ± 0,05	0,66 ± 0,05	0,74 ± 0,05

Efeito de aminoácidos sobre a secreção de insulina

CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (mM)	GRUPO	
	CONTROLE	DESNUTRIDO
0	0,93 ± 0,04	0,89 ± 0,04
8.3	1,93 ± 0,04	0,30 ± 0,03
glicose + leucina	1,35 ± 0,04	0,46 ± 0,05
glicose + arginina	2,50 ± 0,05	1,76 ± 0,09
glicose 8.3 + leucina	4,48 ± 0,29	0,36 ± 0,03
glicose 8.3 + arginina	8,29 ± 0,37	0,71 ± 0,07

Efeito de substâncias que potencializam a secreção de insulina

CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (mM)	GRUPO	
	CONTROLE	DESNUTRIDO
5.6	1,11 ± 0,07	0,17 ± 0,03
5.6 + oxo	2,37 ± 0,17	0,22 ± 0,06
IBMX + 100nM	1,91 ± 0,20	0,49 ± 0,07
IBMX + 1 mM	4,77 ± 0,09	1,098 ± 0,08
TPA 10	1,57 ± 0,12	0,179 ± 0,03
TPA 100mM	2,29 ± 0,12	0,33 ± 0,03

Efeito da glicose sobre a captação de ⁴⁵Ca

CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (mM)	GRUPO			
	CONTROLE		DESNUTRIDO	
	5 min	90 min	5 min	90 min
2.8	0,93 ± 0,07	5,55 ± 0,41	0,67 ± 0,03	1,46 ± 0,09
8.3	1,37 ± 0,11	7,32 ± 0,32	1,07 ± 0,15	1,55 ± 0,10
16.7	1,91 ± 0,13	8,18 ± 0,37	1,07 ± 0,08	3,80 ± 0,20

Efeito da arginina sobre a captação de ⁴⁵Ca

CONCENTRAÇÃO Em (mM)	GRUPO	
	CONTROLE	DESNUTRIDO
glicose 2.8	8,87 ± 1,16 (14)	5,5 ± 1,5 (14)
arginina 20	13,9 ± 2,4 (17)	8,2 ± 1,9 (22)
glicose 2.8 + arginina 20	17,4 ± 2,4 (17)	8,4 ± 1,5 (19)

Oxidação da ¹⁴C-Glicose

CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (mM)	GRUPO	
	CONTROLE	DESNUTRIDO
2.8	24,11 ± 2,34	35,7 ± 2,5
8.3	50,54 ± 4,48	128,35 ± 8,5
16.7	71,00 ± 3,30	271,8 ± 17,0