

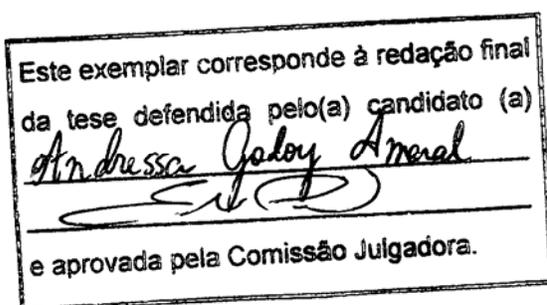
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Andressa Godoy Amaral

**Caracterização de mediadores envolvidos na  
regulação da secreção de insulina em ilhotas de  
Langerhans de camundongos submetidos à  
restrição protéica e suplementados com leucina**



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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**Am13c**

Amaral, Andressa Godoy

Caracterização de mediadores envolvidos na regulação da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans de camundongos submetidos à restrição protéica e suplementados com leucina / Andressa Godoy Amaral. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dieta com restrição de proteínas. 2. Insulina - Secreção. 3. Leucina. I. Carneiro, Everardo Magalhães. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Characterization of mediators involved in the regulation of insulin secretion in pancreatic from mice maintained on a low protein diet and supplemented with leucine.

**Palavras-chave em inglês:** Protein restricted diet; Insulin - Secretion; Leucine.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Everardo Magalhães Carneiro, Ângelo Rafael Carpinelli, José Roberto Bosqueiro.

**Data da defesa:** 04/07/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

**Campinas, 04 de julho de 2008**

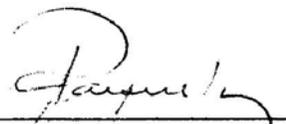
**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro (Orientador)**



Assinatura

**Prof. Dr. Ângelo Rafael Carpinelli**



Assinatura

**Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro**



Assinatura

**Prof. Dr. Lício Augusto Velloso**

Assinatura

**Prof(a). Dr(a). Maria Cristina Cintra Gomes  
Marcondes**

Assinatura

Aos meus queridos pais,  
dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço todas as dificuldades, todas as lágrimas, toda a revolta, pois me mostraram todos os dias os meus valores e quem eu realmente sou, por me fazerem crescer como pessoa e por me mostrarem o tamanho da minha força. Agradeço por esta etapa vencida!

Aos meus pais e irmãs, pelo amor incondicional, por serem sempre meu porto seguro, pelo colo, pelo sofrimento silencioso... Amo muito vocês.

À minha querida avó, pela fé, pela simplicidade e pelo amor à vida.

Ao prof. Everardo Magalhães Carneiro, pela oportunidade, pela orientação, pelos conselhos e pela ajuda em todos os experimentos.

Ao prof. Antônio Carlos Boschero, pela oportunidade e pelo exemplo de humildade, minha eterna admiração. À prof<sup>a</sup> Helena C. de Oliveira, pela disposição em ajudar e pelo exemplo de dedicação.

Um agradecimento especial aos colegas de laboratório que me ajudaram diretamente a realizar esse projeto: Eliane, Rosane, Thiago, Amon, Alex e Camila. Aos demais colegas: Letícia, Helena B., Fabrizio, Kelly, Daniel, Maria Lúcia, Lelly, Baby, Kleber, Priscilla, Ana Paula, Flávia, Gabriel, Paty e Helena R. agradeço a colaboração. Agradeço ainda a Prof. Dra Márcia Latorraca pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao querido Léscio, por toda a ajuda, pela companhia nos longos almoços e pelas histórias compartilhadas. Ao Marcelo e Priscila pela ajuda com os animais.

Ao meu querido amigo Gustavo por toda a ajuda, pela amizade incondicional, por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis e por ser um exemplo de determinação.

À minha querida amiga Cássia, por ter acreditado mais em mim do que eu mesma, pelas intermináveis conversas e confidências e acima de tudo, por todas as orações e energia positiva.

Ao Rodrigo pelo carinho em todos os momentos, principalmente os de grande dificuldade.

Ao quarteto fantástico, pela amizade, pela descontração, pelas risadas, pelos conselhos... Vocês tornaram tudo mais fácil e divertido... Estarão junto comigo sempre!

Agradeço ainda meus amigos queridos, que mesmo longe, sempre estiveram torcendo por mim: Kelvin, Val, Naná, Leticia e Luciana. **Saudades que dói demais!**

Agradeço ainda aos professores participantes desta banca, pela generosidade e atenção.

À Capes, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

|                                                                                                          |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>RESUMO</b> .....                                                                                      | xvi   |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                                                    | xviii |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                                                               | 2     |
| <b>1.1 Desnutrição e Diabetes</b> .....                                                                  | 2     |
| <b>1.2 Secreção de insulina</b> .....                                                                    | 4     |
| <b>1.3 Alterações causadas pela desnutrição- Células <math>\beta</math> e Secreção de insulina</b> ..... | 6     |
| <b>1.4 Alterações causadas pela desnutrição- Tecidos periféricos</b> .....                               | 9     |
| <b>1.5 Estimulação colinérgica da secreção de insulina</b> .....                                         | 12    |
| <b>1.6 Papel do aminoácido leucina em células <math>\beta</math></b> .....                               | 14    |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                                                                                | 17    |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                                                      | 19    |
| <b>3.1 Animais, dieta e suplementação</b> .....                                                          | 19    |
| <b>3.2 Procedimentos Experimentais</b> .....                                                             | 24    |
| <b>3.2.1 Avaliação de parâmetros biométricos e bioquímicos</b> .....                                     | 24    |
| <b>3.2.2 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose e à insulina</b> .....                            | 26    |
| <b>3.2.3 Avaliação da secreção de insulina</b> .....                                                     | 26    |
| <b>3.2.4 Western Blotting</b> .....                                                                      | 28    |
| <b>3.2.5 Viabilidade celular pelo teste de MTS</b> .....                                                 | 29    |
| <b>3.2.6 Registro do cálcio citoplasmático em ilhotas de Langerhans</b> .....                            | 29    |
| <b>3.3 Análise Estatística</b> .....                                                                     | 30    |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....                                                                               | 32    |
| <b>4.1 Caracterização do Modelo Experimental</b> .....                                                   | 32    |
| <b>4.2 Conteúdo Total e Secreção de insulina</b> .....                                                   | 35    |
| <b>4.3 Vias de sinalização: Expressão Protéica e Viabilidade Celular</b> .....                           | 41    |
| <b>4.4 Oscilações citoplasmáticas de cálcio</b> .....                                                    | 47    |

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....                                                                       | 50 |
| <b>5.1 Caracterização do Modelo Experimental</b> .....                                          | 50 |
| <b>5.2 Conteúdo Total e Secreção de insulina</b> .....                                          | 51 |
| <b>5.3 Expressão Protéica, Oscilações citoplasmáticas de cálcio e Viabilidade Celular</b> ..... | 55 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....                                                                       | 63 |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                                      | 65 |

## Lista de Abreviaturas

a-TUB- proteína  $\alpha$ -tubulina

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

$[Ca^{2+}]_n$ - Concentração de cálcio nuclear

$^{22}Na$ - Isótopo do sódio

$^{45}Ca$ - Isótopo do cálcio

AC- Adenilato ciclase

Ach- Acetilcolina

ADP- Bifosfato de adenosina

AGL- Ácidos graxos livres

Akt/PKB- Proteína quinase B

AMPC- Monofosfato de adenosina cíclico

Anova- Análise de variância

ATP- Trifosfato de adenosina

AUC- área abaixo da curva

$Ba^{2+}$ - Íon bário

$BaCl_2$ - Cloreto de bário

BAD – Antagonista da Bcl2

Bcl2 – Célula B de linfoma

C- Controle

Ca(v)- Canal de cálcio voltagem-dependente

Cch/carbacol- Carbamilcolina

CL- Controle suplementado com leucina

CNA- comprimento naso-anal

COL- Colesterol

CREB- Proteína ligante responsiva ao AMPC

D- Desnutrido

DAG- Diacilglicerol

DL- Desnutrido suplementado com leucina

DM2- Diabetes Melittus tipo 2

EC50- Concentração de glicose onde obtém-se metade da resposta secretória máxima

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

eIF4B- Fator de iniciação da tradução em eucariotos 4B

eIF4E- Fator de iniciação da tradução em eucariotos 4E

EPM- Erro padrão

ERK- Proteína quinase reguladora de sinais extracelulares

GABA- ácido aminobutírico

GDH- Glutamato desidrogenase

GK- Glicoquinase

GLP-1 - Peptídeo semelhante ao glucagon 1

GLUT-2- Transportador de glicose 2

GLUT-4- Transportador de glicose 4

G<sub>sα</sub>- Subunidade estimulatória alfa da proteína G

GTP- Trifosfato de guanosina

IGF- Fator de crescimento insulínico

IP3- 1,4,5 Inositol trisfosfato

ipGTT- Teste intraperitoneal de tolerância à glicose

ipITT- Teste intraperitoneal de tolerância à insulina

IR- Receptor de insulina

IRS- Substrato do receptor de insulina

K<sup>+</sup> - Íon potássio

K<sub>ATP</sub>- Canal de potássio dependente de ATP

[K<sub>ATP</sub>]n- Canal de potássio dependente de ATP nuclear

KIC- Ácido cetoisocapróico

Leu- Leucina

MARKS- Substrato da kinase C

M3- Receptor muscarínico 3

mTOR- Alvo da rapamicina em células de mamíferos

Na<sup>+</sup> - Íon sódio

NEK2- Proteína quinase reguladora do ciclo celular

p110- Subunidade catalítica da PI3K

p70<sup>S6K</sup>/ S6K-1- Proteína quinase efetora da via da PI3K

p85- Subunidade regulatória da PI3K

p53 - Proteína 53

PDX-1- Fator homeobox pancreático-duodenal

PHAS-1/4E-BP1- Proteína ligante do fator de iniciação da tradução em eucariotos 4E

PI- Fosfoinositol

PI2- Inositol bifosfato

PI3K- Fosfoinositol 3 quinase

PKA- Proteína quinase A

PKC- Proteína quinase C

PLC- Fosfolipase C

RPS26- Proteína ribossomal S26

SDS- Duodecil sulfato de sódio

SOCS- Canais iônicos ativados pelo esvaziamento dos reservatórios internos de cálcio

TG- Triglicerídeos

XIAP – Inibidor de apoptose ligado ao cromossomo X

## Lista de Figuras

**Figura 1-** Diagrama da hipótese do Thrifty Phenotype retirado de Hales & Barker (2001)

**Figura 2-** **A)** Peso corpóreo de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL) avaliado ao longo de 16 semanas (n=12). Dados representam média  $\pm$  EPM. **B)** Média  $\pm$  EPM da área abaixo das curvas (AUC) de peso corpóreo. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 3-** **A)** Glicemia de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL) durante o teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT), n=10. Dados representam a média  $\pm$  EPM da concentração plasmática de glicose antes e depois da injeção intraperitoneal de 2g/Kg de glicose. **B)** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva (AUC). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 4-A)** Glicemia de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL) durante o teste intraperitoneal de tolerância a insulina (ipITT), n=08. Dados representam a média  $\pm$  EPM da concentração plasmática de glicose antes e depois da injeção intraperitoneal de 0,75UI/Kg de insulina. **B)** Média  $\pm$  EPM da cinética de decaimento da glicose ( $K_{ITT}$ ). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 5-** Média  $\pm$  EPM do conteúdo total de insulina em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=18. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 6-** Secreção estática de insulina, em resposta à diferentes concentrações de glicose (2,8, 8,3, 11,1, 16,7, 22,2 e 27mM) de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=10. As ilhotas foram pré-incubadas com solução de Krebs contendo 5,6mM de glicose por 30 min. O líquido de pré-incubação foi retirado e foi adicionado 1 mL de solução de Krebs contendo diferentes concentrações de glicose por 1h. A EC50 foi expressa como média  $\pm$  EPM, letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 7-A)** Média  $\pm$  EPM da secreção dinâmica de insulina, em resposta à glicose, de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=4. As ilhotas foram perfundidas de 0-26min. com solução de Krebs 2,8mM de glicose e de 28-54min com solução de Krebs 22,2 mM de glicose. **B)** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva (AUC) da secreção dinâmica de insulina em resposta à glicose. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 8-** Média  $\pm$  EPM da secreção estática de insulina, em resposta ao carbacol, de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=12. As ilhotas foram pré-incubadas com solução de Krebs contendo 5,6mM de glicose por 30 min. O líquido de pré-incubação foi retirado e foi adicionado 1 mL de solução de Krebs contendo 11,1mM de glicose e 100uM de carbacol por 1h. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 9-A)** Média  $\pm$  EPM da secreção dinâmica de insulina, em resposta ao carbacol, de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=6. As ilhotas foram perfundidas de 0-15min. com solução de Krebs 11,1mM de glicose e de 16-50min com solução de Krebs 11,1mM de glicose e 100uM de carbacol. **B)** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva (AUC) da secreção dinâmica de insulina em resposta ao carbacol. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 10-A)** Média  $\pm$  EPM da secreção dinâmica de insulina, em resposta à leucina, de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=4. As ilhotas foram perfundidas de 0-24min. com solução de Krebs 2,8mM de glicose e de 26-50min com solução de Krebs 2,8 mM de glicose e 10mM de leucina. **B)** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva (AUC) da secreção dinâmica de insulina em resposta à leucina. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 11-A)** Média  $\pm$  EPM da secreção dinâmica de insulina, em resposta ao KIC, de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=4. As ilhotas foram perfundidas de 0-24min. com solução de Krebs 2,8mM de glicose e de 26-50min com solução de Krebs 2,8 mM de glicose e 15mM de KIC. **B)** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva (AUC) da secreção dinâmica de insulina em resposta ao KIC. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 12-** Expressão protéica do receptor M3 em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da  $\alpha$ -TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos independentes (n=4). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 13-** Expressão protéica PKC em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da  $\alpha$ -TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos independentes (n=4). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 14-** Expressão protéica da PKA em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da  $\alpha$ -TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos independentes (n=4). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 15-** Expressão protéica do canal de Cálcio (subunidade  $\beta_2$ ) em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da  $\alpha$ -TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos independentes (n=4). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)

**Figura 16-** Expressão protéica da AKT em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da  $\alpha$ -TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes (n=3). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ )

**Figura 17-** Expressão protéica da fosfo-AKT (p-AKT) em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da  $\alpha$ -TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes (n=3). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ )

**Figura 18-** Viabilidade celular avaliada por MTS de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Resultados representam a média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva (AUC) normalizada por proteína total de três experimentos independentes (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ )

**Figura 19-** Representa mudanças na razão de fluorescência para cálcio intracelular em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). As ilhotas foram incubadas por 2h em presença de solução de Krebs com  $2\mu\text{M}$  de fura 2AM. Após este período, as ilhotas foram colocadas na câmara de perfusão com diferentes concentrações de **A)** glicose e **B)** carbacol. As figuras são de um registro representativo (n=5).

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1-** Composição das dietas

**Tabela 2-** Mistura de Vitaminas (AIN-93G-MX)

**Tabela 3-** Mistura de Minerais (AIN-93G-MX)

**Tabela 4-** Peso Corporal final, Comprimento naso-anal (CNA), Peso do coração, Baço, Fígado, Rins, e Peso da Gordura Retroperitoneal de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL).

**Tabela 5-** Parâmetros bioquímicos plasmáticos avaliados nos camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL) ao final do período experimental.

## RESUMO

Restrição protéica pós-desmame induz redução na liberação de insulina, resultado de alterações morfo-fisiológicas nas ilhotas de Langerhans. Leucina, aminoácido chave de nosso estudo, exerce uma modulação importante no processo de secreção de insulina e síntese protéica. Camundongos swiss com 21 dias receberam dieta normoprotéica – 17% (C) ou hipoprotéica – 6% (D) por 60 dias. Em seguida, os grupos foram redivididos e receberam leucina 1,5% (Leu) na água de beber por 30 dias (CL e DL). Caracterizamos o modelo de restrição protéica através da avaliação de parâmetros bioquímicos plasmáticos e de teste de tolerância à glicose e à insulina. Avaliamos nas ilhotas desses animais a secreção de insulina frente a diferentes secretagogos, a expressão de proteínas chaves envolvidas no processo de regulação da secreção de insulina, a sobrevivência celular e as oscilações citoplasmáticas de cálcio. Os animais desnutridos se mostraram mais sensíveis à insulina e com melhor captação periférica de glicose, sendo que a Leu não influenciou neste parâmetro. Frente aos estímulos testados: glicose, carbacol, leucina e KIC, as ilhotas dos animais D secretam significativamente menos insulina quando comparados com C e com exceção do KIC, a Leu influenciou na secreção de insulina principalmente no grupo DL. A expressão das proteínas: M3, PKC, PKA, canal de cálcio, AKT e p-AKT se mostraram diminuídas nos animais D e a Leu aumentou os níveis de expressão principalmente no DL. Avaliamos também a viabilidade celular das ilhotas e não houve diferença entre os grupos, observamos apenas uma tendência de diminuição no D. Por fim, verificamos que a restrição protéica modificou o padrão oscilatório de cálcio das ilhotas frente à glicose e carbacol, produzindo ondas rápidas com baixa amplitude e alta frequência. A Leu teve efeito contrário, produzindo ondas lentas com alta amplitude e baixa frequência, sugerindo maior mobilização de cálcio e secreção de insulina nos animais tratados. Concluímos que a restrição protéica durante os estágios iniciais de vida induz diversas alterações nas ilhotas de camundongos que causam comprometimento de processos essenciais como secreção de insulina e síntese protéica. A Leu restaura parcial ou totalmente a secreção de insulina prejudicada nos animais desnutridos, pois proporciona maior aporte energético para a célula e mais importante, nossos resultados mostraram que a Leu estimula a síntese protéica e restaura os níveis de expressão de

proteínas chaves do processo de secreção de insulina nas ilhotas dos animais desnutridos, explicando a melhora na secreção de insulina encontrada nos animais DL.

## ABSTRACT

Protein restriction after weaning induce reduced insulin release, as a result of morpho-physiologic alterations in the islets of Langerhans. Leucine, the aminoacid investigated in our study, modulates insulin secretion process as well as protein synthesis. Twenty-one days-old Swiss mice received normoproteic – 17% (C) or hipoproteic diet – 6% (D) for 60 days. Then, the groups were further divided and part of the animals received leucine 1.5% (Leu) into the drinking water for 30 days (CL and DL). This model of protein restriction was characterized through plasmatic biochemistry analysis and glucose and insulin tolerance tests. Islets were evaluated for insulin secretion stimulated by different secretagogues, expression of proteins involved in the process of insulin secretion regulation, cellular survival and citoplasmatic calcium oscillations. The malnourished animals (D and DL) were more sensitive to insulin and had improved peripheral glucose uptake, with no Leu influence. In response to: glucose, carbachol, leucine and KIC, the islets of the D group secreted less insulin compared to the C group and, except for KIC, Leu influenced insulin secretion, mainly in the DL group. The expression of the proteins: M3, PKC, PKA, calcium channel, AKT and p-AKT were reduced in the D animals and Leu increased the expression of these proteins mainly in the DL animals. We have also evaluated the cellular viability of the islets, and no difference among the groups was observed. Finally, we observed that the protein restriction modulates the calcium oscillations in response to stimulation of glucose and carbachol resulting in high-frequency and low-amplitude oscillations. Leu had the opposite effect resulting in high-amplitude and low-frequency oscillations, which suggests bigger ion traffic and insulin secretion. We concluded that protein restriction during the early stages of life cause alterations in mice islets of Langerhans that compromise essential process such as insulin secretion and protein synthesis. Leu recovers partial or completely insulin secretion in the malnourished animals by increasing cells energy stocks and most importantly, our results showed that Leu stimulates protein synthesis and restores the expression of key proteins in the process of insulin secretion in the islets of malnourished animals, explaining the improvement in insulin secretion found in the DL animals.

# Introdução

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Desnutrição e Diabetes

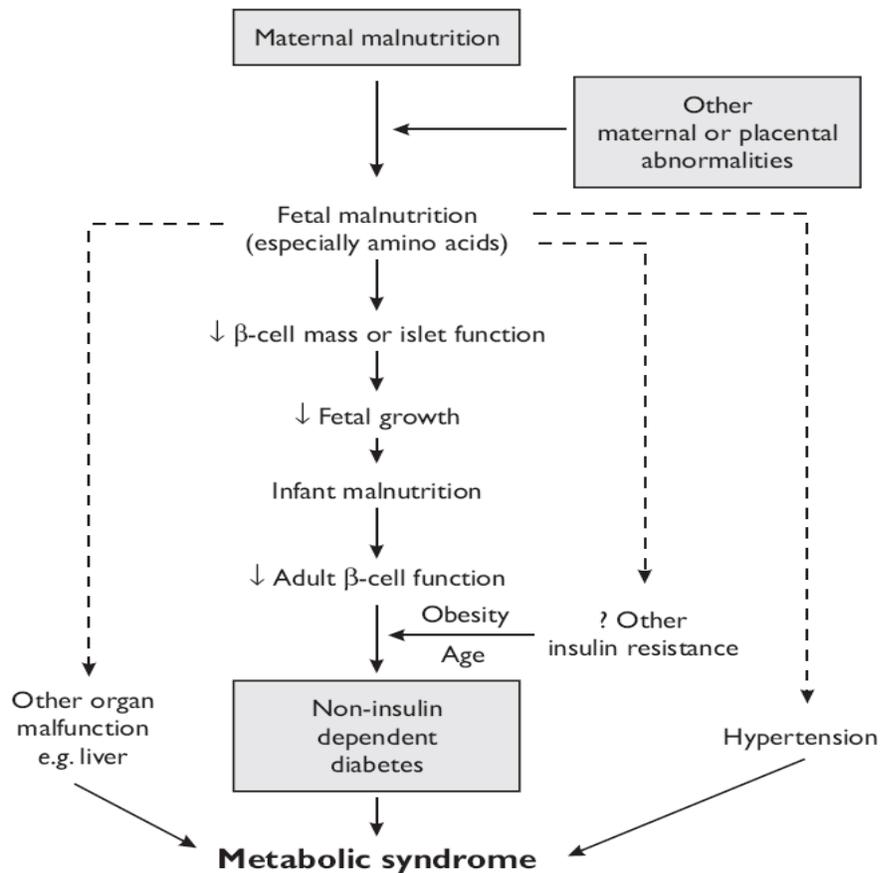
A desnutrição é um termo genérico ao qual se associa uma série de doenças decorrentes da escassez dietética de nutrientes. Dependendo da intensidade podem ser observados desde pequenas alterações metabólicas, de efeito adaptativo, até falência orgânica generalizada e irreversível. Os primeiros relatos clínicos de doenças associadas à desnutrição datam da década de 30 e se referem ao Kwashiokor, atribuído à deficiência de proteínas e o Marasmo, associado à deficiência total de alimentos (Moura, 1984).

Estudos epidemiológicos identificaram que em regiões endêmicas de desnutrição o desenvolvimento de diabetes tem características clínicas particulares, indicando que a desnutrição pode ter um papel importante na patogênese dessa forma da doença chamada de diabetes tipo J ou diabetes tropical. As pessoas mais acometidas moram em países em desenvolvimento e apresentam dieta rica em carboidratos e pobre em proteínas, indicando que fatores como a localização geográfica e a condição socioeconômica podem ser importantes para o desenvolvimento desse tipo de diabetes. (Campbell & McNeill, 1959; Kar & Tripathy, 1965; Rao, 1984; Mohan *et al.*, 1985; Abu-Bakare *et al.*, 1986).

Outros estudos identificaram associação entre recém-nascidos de baixo peso corpóreo e aumento da incidência de intolerância à glicose (Rao, 1988; Hales *et al.*, 1991) ou síndrome X (Barker *et al.*, 1993) na idade adulta. Em 1992, Hales e Barker propuseram a hipótese do “thrifty phenotype”: a alta associação de recém-nascidos com baixo peso e o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 na idade adulta (DM2) era causada pela falta de nutrientes nos estágios iniciais de vida. Nielsen *et al.* (1999) reportam que a produção de novas células  $\beta$  pode ocorrer por replicação das células já diferenciadas ou por neogênese de células indiferenciadas e que estes mecanismos são mais pronunciados no desenvolvimento fetal e neonatal do pâncreas. A restrição dietética nessa fase resulta em mudanças permanentes na morfologia das ilhotas pancreáticas, com desenvolvimento da massa de células  $\beta$  prejudicada. Com o passar do tempo, outros fatores ambientais como idade, dieta e sedentarismo podem levar à obesidade e

resistência à insulina. O pâncreas e outros tecidos não conseguem se adaptar a essa nova condição e como consequência desenvolve-se a DM2 ou a síndrome metabólica (**Fig.1**). Desde que essa hipótese foi proposta, muitos estudos em todo o mundo confirmaram as evidências epidemiológicas iniciais. (Cook *et al.*, 1993; Law *et al.*, 1995; Yajnik *et al.*, 1995; Crowther *et al.*, 1998; Dabelea *et al.*, 1999; Flanagan *et al.*, 2000; Eriksson *et al.*, 2002; Filiputti *et al.*, 2008).

Atualmente considera-se o diabetes tipo 2 uma doença metabólica multifatorial com alta incidência em todo o mundo (Zimmet *et al.*, 2001). Fatores genéticos e ambientais têm papel importante na patogênese da doença, porém a hipótese do “thrifty phenotype” preconiza que os fatores ambientais são dominantes no desenvolvimento do DM2 (Hales & Barker, 2001).



**Fig.1)** Diagrama da hipótese do “thrifty phenotype”, retirado de Hales & Barker (2001).

Estudar a desnutrição em seres humanos é muito difícil, pois não há possibilidade de induzir esse estado nutricional, são muito demorados e podem ter influência de diversos outros fatores ambientais. Em vista dessas dificuldades diversos modelos experimentais com animais foram desenvolvidos. Os animais mais usados são ratos e camundongos devido à sua semelhança fisiológica com os humanos e por ser possível reproduzir quadros semelhantes ao kwashiorkor e marasmo. A desnutrição pode ser protéico-calórica, só calórica ou só protéica e pode ser induzida na fase intra-uterina ou após o nascimento, durante os estágios iniciais de desenvolvimento. O padrão de anormalidades metabólicas e funcionais depende da fase da vida em que a desnutrição ocorre, do tipo e da intensidade da carência nutricional (Heywood *et al.*, 2004).

Dahri *et al.* (1995) estudaram a influência do estado nutricional no possível desenvolvimento de DM2 ao longo de duas gerações. A desnutrição durante a gestação induz diversas mudanças nos fetos e que se mantém ou progridem durante a fase adulta. A prole dessa primeira geração também apresenta severo quadro de alterações que os predispõem ao DM2 na fase adulta.

Alguns autores relatam que animais que receberam dieta hipoproteica diminuem espontaneamente seu consumo absoluto de alimento em cerca de 35% (Okitolonda *et al.*, 1987; Swenne *et al.*, 1987; Okitolonda *et al.*, 1988), sendo assim difícil atribuir a real causa das anormalidades encontradas nesse modelo animal. Para solucionar esse problema animais foram submetidos apenas à restrição calórica e outros à restrição protéico-calórica. Diversos parâmetros foram avaliados ao final do período experimental. Tanto albumina plasmática, tolerância à glicose, insulina plasmática, conteúdo total de insulina e secreção de insulina não mostraram grandes alterações no grupo submetido à restrição calórica quando comparado com o grupo controle, porém, o grupo submetido à restrição protéico-calórica mostrou-se significativamente alterado. Essas observações indicam que tais alterações são causadas em sua grande parte pela baixa ingestão de proteínas (Okitolonda *et al.*, 1987; Wade *et al.*, 1988; Picarel-Blanchot *et al.*, 1995).

## **1.2 Secreção de insulina**

O pâncreas endócrino é uma glândula única, composta por quatro principais tipos de células distribuídas por toda a porção exócrina. Essas células estão agregadas em “ilhas” denominadas ilhotas de Langerhans. Cada ilhota é formada por diferentes tipos de células: as células  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  e PP. Estima-se que humanos adultos tenham aproximadamente 2 milhões de ilhotas (2% do peso do pâncreas). Em roedores cada ilhota é composta por 2.000 a 4.000 células, das quais 70 a 80% são células  $\beta$ , produtoras de insulina, 5% são células  $\delta$ , produtoras de somatostatina, e 15 a 20% são células  $\alpha$  produtoras de glucagon ou células PP, produtoras de polipeptídeo pancreático, a depender da localização no pâncreas (Orci, 1985).

A glicose induz efeitos pleiotrópicos na célula  $\beta$ , potencialmente mediados pela ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular. O efeito principal - o desencadeamento do processo secretório - é resultante da ligação de eventos metabólicos e elétricos. O metabolismo da glicose altera a razão ATP e ADP promovendo o fechamento dos canais de  $K^+$  sensíveis a ATP/ADP (Ashcroft *et al.*, 1984; Cook & Hales, 1984). A redução da condutância ao  $K^+$  despolariza a membrana plasmática, ativando canais de  $Ca^{2+}$  tipo L (voltagem dependente) e há conseqüente influxo de  $Ca^{2+}$  para o citoplasma (Gilon & Henquin, 1993). A resposta a este processo é a ativação da maquinaria secretória, que resulta na extrusão dos grânulos e liberação de insulina para o meio extracelular. O recrutamento de vesículas para a membrana plasmática é dependente do rearranjo de microtúbulos e microfilamentos, facilitado pelo aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  (Takei *et al.*, 1986). Um efeito secundário da elevação do cálcio no citoplasma ( $[Ca^{2+}]_i$ ) é a ativação da adenilato ciclase e fosfolipase C (PLC), que agindo sobre substratos específicos, geram AMP cíclico (AMPC), diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato ( $IP_3$ ). Estes amplificam o sinal de  $[Ca^{2+}]_i$  pelo efeito de liberação dos estoques celulares de cálcio e por promover a fosforilação de proteínas que sensibilizam o processo secretório ao cálcio (Flatt, 1996). Esta secreção pode ser modulada por vários nutrientes, neurotransmissores e hormônios peptídicos. Muitos nutrientes, entre eles os ácidos graxos, aminoácidos e cetoácidos influenciam a secreção de insulina tão bem como a glicose (Gao *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Um *et al.*, 2004). As ilhotas de Langerhans podem ser conhecidas como “sensoras de energia”, as quais simultaneamente integram a sinalização de muitos nutrientes e moduladores, secretando

insulina de acordo com as necessidades do organismo (Floyd *et al.*, 1966; Henquin & Meissner, 1981; Blachier *et al.*, 1989).

A glicose produz diversos efeitos na fisiologia da célula  $\beta$ , incluindo a regulação da secreção, da proliferação e diferenciação celular, da apoptose e expressão gênica. Recentemente demonstrou-se que esta hexose pode regular um canal de potássio presente no núcleo ( $K_{ATP}$ )<sub>n</sub> cujo bloqueio resulta em aumento do conteúdo nuclear de cálcio induzindo fosforilação do fator de transcrição chamada proteína de ligação para o AMPc (CREB). A elevação na concentração de cálcio no núcleo ( $[Ca^{2+}]_n$ ) resulta na rápida expressão de genes tais como C-fos e C-myc, este último tendo uma importância crucial em célula  $\beta$ , pois está envolvido com glicotoxicidade e diferenciação celular (Franco-Obregon *et al.*, 2000; Quesada *et al.*, 2002; Quesada *et al.*, 2004; Soria *et al.*, 2004). Esta hexose é também capaz de ativar Erk 1/2 e p70<sup>S6</sup> kinase, via mTor, independente de cálcio e cAMP (Briaud *et al.*, 2003). Diante disso a glicose não inibe somente os canais de  $K_{ATP}$  da membrana celular, para iniciar o processo de secreção de insulina, mas interage também com os canais ( $K_{ATP}$ )<sub>n</sub> aumentando a concentração de cálcio deste compartimento celular, modulando as funções nucleares, bem como expressão gênica em células  $\beta$ .

### **1.3 Alterações causadas pela desnutrição – Células $\beta$ e Secreção de insulina**

Já é bem descrito na literatura que a desnutrição protéico-calórica reduz os níveis plasmáticos de insulina e sua secreção, alterando também a homeostase glicêmica. Diversos estudos contribuíram para explicar a secreção de insulina prejudicada nesses animais. O pâncreas dos animais desnutridos tem peso absoluto reduzido e conteúdo total de insulina reduzido (Snoeck *et al.*, 1990). Isso pode ser explicado em parte pelas diversas alterações morfológicas das ilhotas e células  $\beta$  que já foram descritas nesse modelo experimental.

Animais desnutridos apresentam massa de células  $\beta$  reduzida (Swenne *et al.*, 1992) com menos grânulos secretores e de aspecto imaturo, alterações degenerativas nas mitocôndrias e permeabilidade celular reduzida (Carneiro, 1996). Outros estudos ainda sugerem que as ilhotas de animais desnutridos são menos vascularizadas (Snoeck *et al.*,

1990; Iglesias-Barreira *et al.*, 1996) e que a atividade do sistema nervoso autônomo que as inervam está alterado (Leon-Quinto *et al.*, 1998). Uma possível explicação para o mau desenvolvimento do pâncreas é a menor expressão de PDX-1 (Arantes *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2004), que também pode estar relacionado com a menor secreção de insulina estimulada por glicose (Brissova *et al.*, 2002) e com a diminuição da expressão gênica e protéica da insulina (Harmon *et al.*, 1999).

É sabido que a restrição protéica modifica o mecanismo de secreção de insulina alterando a resposta secretória para diferentes secretagogos, tais como: glicose, aminoácidos, potássio e também para agentes que potencializam a secreção de insulina (Dahri *et al.*, 1991; Reis *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2004). Falhas em diferentes etapas do mecanismo de secreção são propostas para explicar a menor sensibilidade dessas ilhotas.

A utilização da glicose pela célula  $\beta$  dos animais desnutridos está prejudicada pela menor expressão do transportador de glicose GLUT-2 e/ou por sua menor metabolização (Dixit & Kaung, 1985). Enzimas chaves na homeostase glicêmica como a glicocinase envolvida na glicólise (Heywood *et al.*, 2004) e a glicerolfosfato desidrogenase envolvida na produção de ATP estão diminuídas nos animais desnutridos (Rasschaert *et al.*, 1995). A captação de cálcio, induzida por glicose, está diminuída nas ilhotas de desnutridos indicando que defeitos na mobilização desse íon contribuem para as alterações secretórias (Carneiro, 1996; Latorraca *et al.*, 1998a; Latorraca *et al.*, 1998b). Nessas ilhotas, a expressão da PKA $\alpha$  e da PKC $\alpha$  está diminuída o que explica, pelo menos em parte, a redução da secreção de insulina (Ferreira *et al.*, 2004; Milanski *et al.*, 2005).

Usando um modelo de desnutrição materna, Cherif *et al.* (2001) estudaram a secreção de insulina de fetos estimulada por diferentes secretagogos metabolizáveis ou não. Nesse modelo experimental não houve diminuição do conteúdo total de insulina das ilhotas dos animais desnutridos e por esse motivo, os autores tentaram identificar que etapa do processo de secreção de insulina está prejudicada nos animais desnutridos. Nenhum secretagogo metabolizável ou não restaurou a secreção de insulina dos animais desnutridos, porém quando as ilhotas foram incubadas com cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ) ou com cytochalasin-B, houve restauração da secreção de insulina. Os íons  $\text{Ba}^{2+}$  atravessam a membrana plasmática, pois tem alta afinidade pelos canais de cálcio, e uma vez dentro

da célula disparam a maquinaria de exocitose que culmina na secreção de insulina independente de cálcio (Hagiwara *et al.*, 1974). A cytochalasin-B atua diretamente nos microtúbulos envolvidos na última etapa do processo secretório (Lacy *et al.*, 1973). Com base nesses resultados, os autores concluíram que a secreção de insulina prejudicada nos fetos provenientes de mães desnutridas é devido à alterações no processo de exocitose dos grânulos de insulina.

Petrik *et al.* (1999) estudaram o efeito da restrição protéica no balanço entre replicação e apoptose de ilhotas de fetos e neonatos de ratos. Eles usaram dois marcadores de fases do ciclo celular distintas, a ciclina D1 (marcadora da fase G1) e NEK2 (marcador da fase G2 e mitose) para estimar a taxa de replicação das ilhotas. Também usaram a técnica de túnel para determinar a taxa de apoptose. As ilhotas dos animais desnutridos estavam mais marcadas pela ciclina D1 e apresentavam maior taxa de apoptose, indicando uma desregulação entre replicação e apoptose que pode contribuir para o menor tamanho das ilhotas e na secreção de insulina prejudicada na fase adulta. Esses autores ainda detectaram menor expressão gênica e protéica do fator de sobrevivência IGF-II nos animais desnutridos, que pode explicar a maior taxa de apoptose.

Outro mecanismo que pode influenciar na secreção de insulina diminuída em animais desnutridos é o aumento de ácidos graxos livres (AGLs) circulantes (Reis *et al.*, 1997; Latorraca *et al.*, 1998a; Arantes *et al.*, 2002; de Barros Reis *et al.*, 2008). Já em 1963, Randle propôs o ciclo glicose-AGL. Ele observou que o aumento de AGL no plasma diminuía a oxidação de carboidratos e a captação da glicose no músculo cardíaco e diafragma de ratos. Estudos subseqüentes mostraram exposição aguda aos AGLs promove a secreção de insulina, no entanto, a exposição crônica a altas concentrações de AGL pode levar a inibição da secreção de insulina estimulada por glicose (Sako & Grill, 1990; Randle *et al.*, 1994). Segundo Zhou & Grill (1994), a exposição de ilhotas de ratos à altas concentrações de glicose e AGLs por 48h diminui a secreção de insulina em 30-50% e a síntese de pró-insulina em 30-40%. Também se verifica diminuição da metabolização da glicose e diminuição da síntese protéica total. Estudos mais detalhados mostraram que o efeito dos AGLs sobre as células  $\beta$  não depende apenas do tempo de exposição, depende também do tamanho e do grau de insaturações do mesmo. Os ácidos

graxos podem elevar a secreção de insulina com o aumento do comprimento da sua cadeia carbônica e diminuir a secreção de insulina com o aumento do grau de insaturações (Stein *et al.*, 1997; Picinato *et al.*, 1998). Arantes *et al.* (2006) estudaram o efeito *in vitro* do ácido palmítico (ácido graxo de cadeia longa e monoinsaturado) nas ilhotas de ratos submetidos à restrição protéica e verificou que nesse modelo animal houve uma melhora na secreção de insulina estimulada por glicose e aumento na expressão de PDX-1 e p38/SAPK2. Esses resultados indicam uma complexa interrelação entre nutrientes no controle da secreção da insulina.

Outro aspecto importante que merece ser mencionado é a modulação parácrina e/ou autócrina do mecanismo de secreção de insulina. Araujo *et al.* (2002) mostraram que a diminuição da expressão de IRS-1, pela técnica de antisense, aumenta a secreção de insulina em ilhotas de ratos, mostrando dessa maneira que a insulina pode causar um feedback negativo na sua própria via de produção e secreção. Em 2004 o mesmo grupo de pesquisa mostrou que em animais desnutridos há uma diminuição na expressão de IRS-1 e um aumento da IRS-2 como adaptação ao estado de insulinopenia, na tentativa de aumentar a secreção de insulina. Quando as ilhotas desses animais foram tratadas com antisense para IRS-1, diminuindo ainda mais sua expressão, a secreção de insulina foi restaurada, indicando que a sinalização da insulina está comprometida em animais desnutridos (Araujo *et al.*, 2004). Corroborando este último estudo, Filiputti (2006) e Filiputti *et al.* (2008) encontraram em animais desnutridos a expressão protéica diminuída para o IRS-1, porém observou um aumento da associação entre IRS-1 e PI3K, podendo este ser um mecanismo compensatório. No mesmo estudo foi avaliada a expressão de proteínas alvo da PI3K, como AKT, p70<sup>S6K</sup>, mTOR e PHAS-1, e todas mostraram diminuição na sua expressão.

#### **1.4 Alterações causadas pela desnutrição – Tecidos periféricos**

A intolerância à glicose é uma característica central da desnutrição, principalmente em crianças com severa restrição protéica (Bowie, 1964; Becker, 1983) e é considerada secundária ao funcionamento inadequado das ilhotas de Langerhans (Rao, 1988). Sabe-se que a restrição protéica intra-uterina e durante o primeiro ano de vida

programa o desenvolvimento dos órgãos, produzindo mudanças morfológicas e funcionais no pâncreas, fígado, tecido muscular e tecido adiposo, que causam predisposição a ação de insulina prejudicada. Em um primeiro estágio, a restrição protéica causa diminuição da insulina plasmática, mas para compensar essa diminuição de insulina circulante, há um aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (Levine *et al.*, 1983). A insensibilidade das células frente vários secretagogos e o aumento da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina são as duas características principais dos animais desnutridos e a co-existência dessas duas características é responsável pelo não desenvolvimento da intolerância à glicose (Okitolonda *et al.*, 1988). A desnutrição *per se* não causa intolerância à glicose, mas a possibilidade existe quando subseqüentemente os animais são expostos a uma dieta hipercalórica rica em gorduras e carboidratos (Hales & Barker, 1992).

Okitolonda *et al.* (1987), verificaram que ratos desnutridos apresentavam glicemia diminuída comparada com os controles. A resposta ao teste de tolerância à glicose foi melhor e a hipoglicemia induzida por infusão de insulina exógena foi mais sustentada, indicando uma sensibilidade à insulina aumentada. Eles também verificaram que essas alterações são apenas parcialmente corrigidas quando os animais são em seguida submetidos à dieta controle por várias semanas. Escriva *et al.* (1991), estudaram a ação da insulina *in vivo* através de clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico e verificaram que a captação de glicose mediada por insulina e a supressão da produção de glicose hepática estão aumentados nos animais desnutridos. Usando a mesma técnica, Picarel-Blanchot *et al.* (1995), observaram que a captação de glicose mediada por insulina também se encontra aumentada em animais desnutridos, no entanto, observaram que a produção hepática de glicose está aumentada nos animais submetidos à restrição protéica, indicando uma resistência a ação insulínica nessa via.

Estudos moleculares foram realizados para comprovar os estudos *in vivo* que demonstravam maior sensibilidade à insulina. Ozanne *et al.* (1996), verificaram que a concentração de transportadores de glicose em músculo de ratos, não era diferente entre desnutridos e controles, porém esses animais desnutridos mostraram um aumento de duas vezes no receptor de insulina (IR). Em um estudo mais detalhado, Gavete *et al.* (2005), não observaram diferenças no conteúdo total de transportadores de glicose GLUT4 e

GLUT1 em músculo de animais submetidos ao modelo de desnutrição materna, porém, houve um aumento significativo na expressão da p38MAPK, proteína envolvida no processo de translocação desses transportadores para a membrana plasmática. Nesse mesmo estudo, os autores mostraram que animais desnutridos apresentam maior expressão de IR e maior fosforilação em IR e IRS1, assim como maior associação entre a subunidade regulatória da PI3K-p85 e IRS1. Adipócitos isolados de ratos desnutridos mostraram aumento na expressão protéica do IR e maior associação entre IRS-1 e PI3K (Ozanne *et al.*, 1997). Dados semelhantes também foram obtidos por Reis *et al.* (1997), que mostraram aumento da fosforilação em IR e IRS-1 em hepatócitos e músculo de animais desnutridos.

O fígado é um órgão central no controle da homeostase glicêmica. Ozanne *et al.* (1996) verificaram que a liberação hepática de glicose está aumentada na prole de mães submetidas à restrição protéica, indicando resistência à ação da insulina. Outros estudos demonstraram diminuição na atividade da glicoquinase e aumento na atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, enzimas chaves envolvidas respectivamente na glicólise e gliconeogênese, no fígado de animais cujas mães foram submetidas à restrição protéica (Desai *et al.*, 1995; Desai *et al.*, 1997). A desnutrição conduz a uma reprogramação da atividade das enzimas hepáticas que culmina em mudanças na regulação da produção de glicose no fígado.

Um defeito na secreção e/ou ação dos hormônios contrareguladores que previnem ou corrigem a hipoglicemia pode explicar a baixa glicemia e melhor sensibilidade à insulina. Leon-Quinto *et al.* (1997), observaram no estado basal que as concentrações de glucagon, epinefrina e norepinefrina estavam aumentadas nos animais desnutridos comparados com os controles, porém, em condição de hiperinsulinemia, a concentração desses hormônios não diferiu do controle, indicando assim uma resposta relativa prejudicada desses hormônios. Em contrapartida, os níveis de cortisol e de hormônio de crescimento estavam aumentados. Recentemente nosso grupo também observou um aumento de glucagon plasmático nos animais desnutridos e maior resistência em testes de tolerância ao glucagon (dados não publicados). Isso pode ser explicado em parte pela baixa concentração plasmática de insulina e ácido aminobutírico (GABA), que são potentes inibidores da liberação de glucagon (Samols *et al.*, 1972). Outros estudos ainda

mostraram que a exposição crônica a altas concentrações de epinefrina (Budohoski *et al.*, 1987) e norepinefrina (Lupien *et al.*, 1990) melhora a captação de glicose estimulada por glicose em músculo esquelético de ratos. A diminuição de cortisol e hormônios de crescimento causam diminuição na produção hepática de glicose e um aumento da utilização de glicose, contribuindo assim para o quadro de hipoglicemia estabelecido em alguns modelos de desnutrição (De Feo *et al.*, 1989a; De Feo *et al.*, 1989b).

### **1.5 Estimulação colinérgica da secreção de insulina**

A secreção de insulina pode ser modulada por diversos hormônios e neurotransmissores, dentre os quais a acetilcolina (ACh) tem um papel primordial. A ACh é liberada pelas terminações nervosas parassimpáticas durante a fase cefálica e absorvida do processo de digestão (Ahren, 2000).

Malaisse (1986) descobriu que as ilhotas de Langerhans estão equipadas com receptores colinérgicos muscarínicos que apresentam características de ligação semelhantes às encontradas nos tecidos extrapancreáticos. Embora múltiplas formas de receptores muscarínicos tenham sido encontradas nas células  $\beta$  (M1, M3, M4 e M5), o receptor M3 parece ser o subtipo predominantemente expresso nas células  $\beta$  pancreáticas (Henquin *et al.*, 1988; Boscher *et al.*, 1995; Tang & Sharp, 1997; Iismaa *et al.*, 2000).

Estudos funcionais demonstraram que a estimulação colinérgica potencializa a secreção de insulina iniciada por diferentes estímulos metabólicos através da ativação dos receptores muscarínicos nas células  $\beta$ . Sabe-se que estimulação muscarínica é potencializadora e não iniciadora da secreção de insulina, e que a ação despolarizante da ACh é insuficiente para ativar os canais de cálcio a partir do potencial de repouso (Gagerman *et al.*, 1978; Henquin *et al.*, 1988; Santos & Rojas, 1989). O efeito da ACh começa a aparecer entre 5 e 7mM de glicose, ou seja, perto da concentração para o limiar da despolarização da célula  $\beta$  e seu efeito se mantém até a concentração máxima efetiva de 30mM (Hermans *et al.*, 1987). O efeito estimulatório da ACh também é dependente de cálcio extracelular. Quando o cálcio é retirado do meio de incubação, somente altas concentrações de ACh e glicose disparam um rápido e transiente pico de secreção de insulina (Garcia *et al.*, 1988; Gilon & Henquin, 1993).

O principal efeito da Ach é mobilizar os estoques citoplasmáticos de cálcio. Após a ligação do agonista no receptor muscarínico, a proteína G acoplada a ele, é ativada e libera uma de suas três subunidades que por sua vez vai ativar a PLC. A PLC ativada hidrolisa fosfolipídeos da membrana plasmática liberando DAG e IP3. O IP3 promove liberação  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático ao se ligar em receptores específicos, já o DAG permanece na membrana plasmática e transloca e ativa proteínas kinases presentes no citossol (Huang, 1989). Essa translocação é dependente de cálcio e fosfolipídeos como fosfatidilserina (Oancea & Meyer, 1998). O principal alvo do DAG é a PKC, que quando ativada se liga em seu principal substrato, MARKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) e este por sua vez se liga a actina com o complexo Ca-calmodulina, responsável pelo movimento celular e tráfico de vesículas (Arbuzova *et al.*, 1998; Chakravarthy *et al.*, 1999). Outra função proposta para a PKC é de ativação da adenilato ciclase com conseqüente aumento do conteúdo intracelular de AMPc. A indução da produção da AMPc ativa a PKA, que parece agir nos processos de síntese protéica e na potencialização da secreção de insulina através da fosforilação do canal de cálcio sensível à voltagem, permitindo a entrada do íon na célula (Hughes & Ashcroft, 1992). A PKA também é responsável pela fosforilação de proteínas vesiculares e da membrana plasmática que participam do processo de secreção de insulina (Jones & Persaud, 1998).

Além da mobilização interna de cálcio, muitos estudos foram dirigidos para descobrir os mecanismos iônicos envolvidos na ação despolarizante da Ach. A ação despolarizante da Ach depende criticamente da resistência da membrana plasmática e é maior quando a membrana tem alta resistência devido ao fechamento dos canais de K dependentes de ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), por esse motivo a ação despolarizante da Ach depende de concentrações limiares de agentes despolarizantes como glicose, tolbutamida, leucina, entre outros (Palafox *et al.*, 1986; Hermans *et al.*, 1987; Bordin *et al.*, 1995). A Ach pode agir diretamente nos canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , diminuindo a permeabilidade a esse íon. Essa modulação negativa pode ser causada pelos subprodutos da lise dos fosfolipídeos de membranas como PI e  $\text{PI}_2$  (Baukrowitz *et al.*, 1998; Shyng & Nichols, 1998). Outro mecanismo iônico alterado pela Ach é a permeabilidade ao  $\text{Na}^+$ . Henquin *et al.* (1988), mostraram que na ausência de  $\text{Na}^+$  extracelular a despolarização não ocorre, já Gilon & Henquin (1993), conduziram estudos com  $^{22}\text{Na}$  e comprovaram o aumento da

permeabilidade a esse íon. O esvaziamento dos reservatórios internos de cálcio da célula ativam diferentes canais iônicos, essa família de canais é chamada de SOCs e podem aumentar a permeabilidade da membrana da célula  $\beta$  ao  $\text{Na}^+$  (Bertram *et al.*, 1995; Zitt *et al.*, 1996) e ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Liu & Gylfe, 1997; Miura *et al.*, 1997). Os canais de cálcio dependente de voltagem também participam do influxo de cálcio e esse é o principal mecanismo pelo qual a Ach induz um aumento de cálcio citoplasmático sustentado (Nenquin *et al.*, 1984; Henquin *et al.*, 1988; Gilon *et al.*, 1995).

Para entender melhor os efeitos fisiológicos do receptor M3, foi desenvolvido um camundongo knockout para esse receptor. Esses camundongos apresentaram hipofagia, diminuição de peso corpóreo, assim como diminuição significativa de leptina e insulina séricos (Yamada *et al.*, 2001). Esses animais também mostraram uma diminuição sérica de glucagon e melhor tolerância à glicose, indicando maior sensibilidade à insulina (Duttaroy *et al.*, 2004). Gautam *et al.* (2006), criou camundongos transgênicos que superexpressam o receptor M3 em células  $\beta$  pancreáticas. Esses camundongos apresentaram diminuição da glicemia, aumento da insulina sérica e se mostraram resistentes quando desafiados com dieta que induzia intolerância à glicose. Esses achados indicam que o receptor M3 está envolvido também na homeostase glicêmica.

## **1.6 Papel do aminoácido leucina em células $\beta$**

Leucina, foco de interesse deste projeto, e seu derivado ácido cetoisocapróico (KIC) reduzem a permeabilidade aos íons  $\text{K}^+$  em células  $\beta$  pancreáticas. Este aminoácido é capaz de estimular e potencializar a secreção de insulina por dois mecanismos diferentes: 1) através da transaminação da leucina formando KIC e 2) através da ativação alostérica da GDH, causando oxidação de glutamato em  $\alpha$ -ceto glutarato, ambas as vias geram intermediários do ciclo de Krebs e ATP, resultando em influxo de cálcio e liberação de insulina (Gao *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003). Dados recentes mostram, que a leucina ainda causa aumento da expressão das enzimas ATP-sintetase e glicoquinase, conseqüentemente a quantidade de ATP formado na metabolização da glicose aumenta, aumentando também a secreção de insulina em células  $\beta$  de ratos e humanos (Yang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006).

Recentes estudos têm demonstrado sinergismo entre os efeitos da insulina e aminoácidos principalmente os de cadeia longa como leucina, isoleucina e valina na regulação da síntese protéica (Xu *et al.*, 2001; Kimball & Jefferson, 2006). Insulina e fatores de crescimento estão associados ao aumento da massa das células  $\beta$  e são controlados pela via de sinalização da fosfoinositol 3-quinase (PI3K). Importante proteína relacionada com essa via é a AKT ou proteína quinase B (PKB), a qual depois de ativada, fosforila uma gama de alvos intracelulares que estão envolvidos com crescimento e sobrevivência celular e inibição da apoptose, promove translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática em tecido periférico, regula a síntese protéica, metabolismo de glicogênio e a progressão do ciclo celular (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2001; Georgakis & Younes, 2006). Outra proteína relacionada à família da AKT é a mTOR (proteína alvo da rapamicina em células de mamíferos), proteína sensível à nutrientes e relacionada com a regulação de amplas respostas metabólicas. Ela é modulada por aminoácidos, regulando a biogênese ribossomal (Dennis *et al.*, 2001). Essa proteína regula e fosforila a atividade de outra proteína de extrema importância na via de sinalização que é a S6K-1 (efetor da via PI3K). Esta tem a importante função de controlar a síntese protéica relacionando inúmeros fatores de transcrição (Sherwood *et al.*, 1999; Kimball & Jefferson, 2006; Lewis *et al.*, 2006).

Diante disso o conhecimento destas vias em modelos de desnutrição/ restrição protéica pode contribuir para explicar alterações hormonais que ocorrem quando os tecidos destes animais sofrem privações de determinados grupos de nutrientes, em particular de aminoácidos (Lewis *et al.*, 2006). Também permite avaliar como estas células respondem quando fazemos a reposição global ou de nutrientes específicos.

# Objetivos

## **2. OBJETIVOS**

Caracterizar o modelo de restrição protéica pós-desmame e suplementação com leucina 1,5% na água de beber para camundongos.

Avaliar a secreção de insulina em ilhotas de Langerhans estimuladas por nutrientes e carbacol, bem como, avaliar o papel da via colinérgica na regulação da secreção de insulina em camundongos submetidos à restrição protéica e suplementados com leucina.

Verificar a participação de proteínas chaves no processo de regulação da secreção de insulina em camundongos submetidos à restrição protéica e suplementados com leucina.

## Materiais e Métodos

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

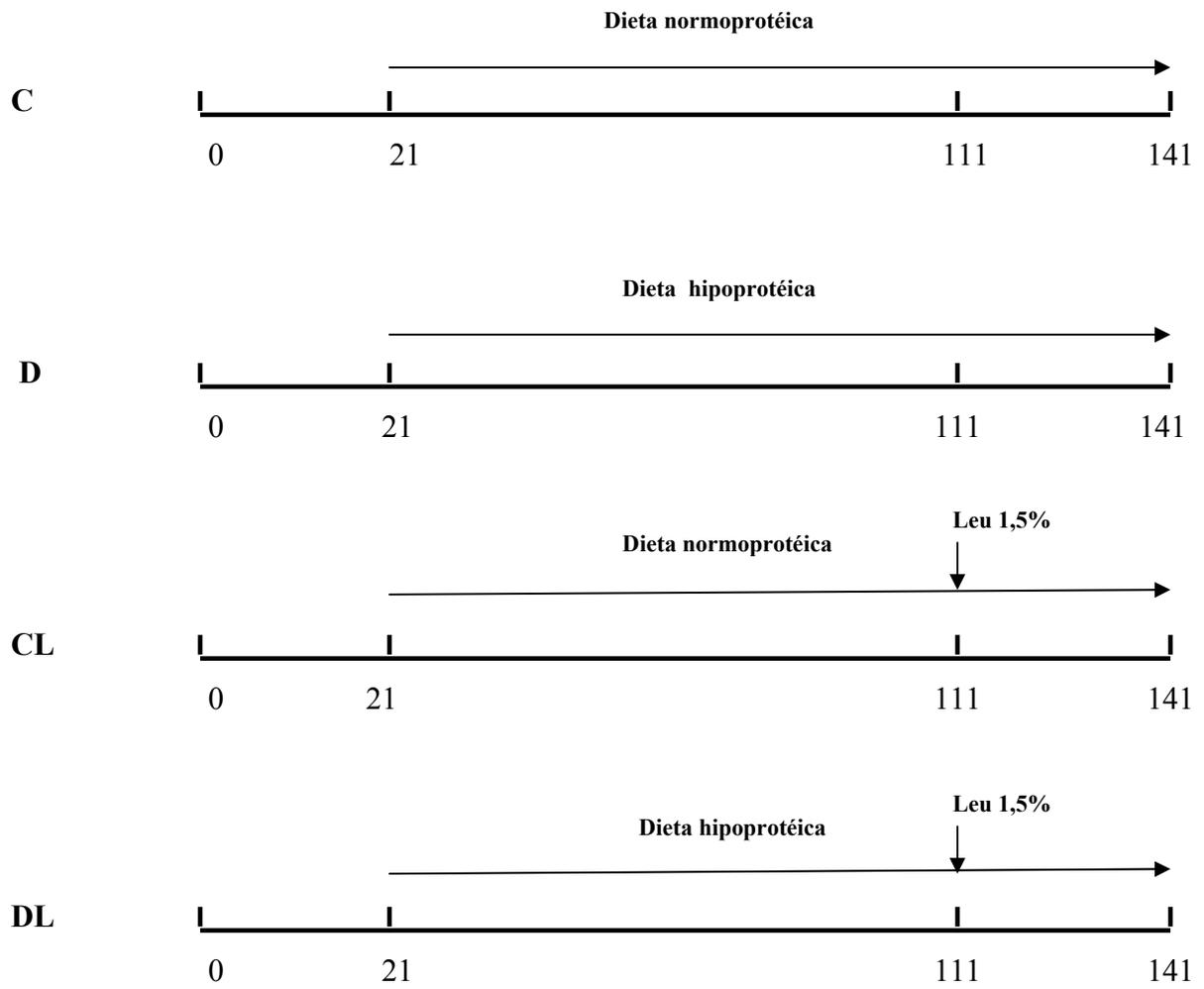
#### 3.1 Animais, dieta e suplementação

Foram utilizados camundongos swiss fêmeas, com 21 dias de vida, provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- a) **Controle (C):** camundongos alimentados com ração normoproteica (17% de proteína) e que receberam água para beber.
- b) **Desnutrido (D):** camundongos alimentados com ração hipoproteica (6% de proteína) e que receberam água para beber.
- c) **Controle Suplementado (CL):** camundongos alimentados com ração normoproteica (17% de proteína) e que receberam leucina 1,5% administrada na água de beber dos 111 aos 141 dias de vida
- d) **Desnutrido Suplementado (DL):** camundongos alimentados com ração hipoproteica e que receberam leucina 1,5% administrada na água de beber dos 111 aos 141 dias de vida.

Os camundongos foram mantidos em gaiolas coletivas ( $\pm$  8 animais por gaiola) sob condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de  $22\pm 2^\circ\text{C}$ . Em todos os grupos experimentais os animais tiveram livre acesso à água. Os animais C e CL receberam ração *ad libitum*, enquanto que os D e DL receberam ração racionada de modo que a ingesta calórica fosse igual a dos C. Para tanto, o consumo dos animais controle e o peso de corpóreo dos animais dos quatro grupos foram registrados três vezes por semana durante todo o período experimental, o consumo alimentar dos animais controle foi normalizado pelo peso corpóreo e disponibilizado para os desnutridos na mesma proporção.

Desenho Experimental



As dietas, mistura de vitaminas e de sais minerais (Tab. 1, 2 e 3) foram preparadas no Departamento de Fisiologia e Biofísica da Unicamp. As dietas seguem as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93) para roedores em fase de crescimento, gravidez e lactação.

Tabela 1 - Composição das Dietas

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

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

\*\* Composição detalhada dada por Reeves et al. (1993).

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

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

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

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

## **3.2 Procedimentos Experimentais**

### **3.2.1 Avaliação de parâmetros biométricos e bioquímicos**

O peso corporal dos quatro grupos foi monitorado semanalmente, dos 21 aos 120 dias de vida. No final do período experimental mediu-se a glicemia de jejum dos animais e em seguida um grupo de camundongos foi sacrificado por decapitação. Os órgãos foram removidos e pesados e o sangue coletado. O plasma foi separado por centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C e foi armazenado a -20 °C para posterior determinação de insulina (radioimunoensaio), proteínas totais, albumina, TG, AGL e COL. Parte do plasma foi transferido para tubos de plástico estéreis para a análise automática de aminoácidos.

#### ***Glicemia***

Os animais foram mantidos em jejum por 12h e amostras de sangue foram obtidas através de um pequeno corte na extremidade da cauda dos animais. A concentração de glicose plasmática foi determinada com fitas reativas e glicosímetro Accu Check Advantage II.

#### ***Proteínas totais***

A concentração plasmáticas de proteínas totais foi determinada pelo método colorimétrico de biureto (Wokes & Still, 1942), utilizando o kit PROTAL (Laborlab), adaptado para microensaio. Pipetou-se alíquotas de 2 µl de plasma e 200 µl de reativo Biureto em placas de microtitulação. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C durante 15 min e as absorbâncias das amostras foram lidas em 540 nm. Os cálculos foram feitos com base na absorbância de uma solução padrão de concentração conhecida.

#### ***Albumina***

A concentração plasmática de albumina foi determinada pelo método colorimétrico de verde de bromocresol (Doumas *et al.*, 1971), utilizando o kit PROTAL (Laborlab), adaptado para microensaio. Pipetou-se alíquotas de 2 µl de plasma e 200 µl

de reativo VBC em placas de microtitulação. Posteriormente a placa foi incubada à temperatura ambiente por 10 min e as absorbâncias das amostras foram lidas em 625 nm. Os cálculos foram feitos com base na absorbância de uma solução padrão de concentração conhecida.

### ***Ácidos Graxos Livres***

A concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGLs) foi determinada através de um kit de ensaio enzimático colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Wako®; Richmond, USA). Os AGLs em presença de ATP, coenzima A (CoA) e acil-CoA-sintetase formam ésteres tiois CoA (Acil-CoA), que são oxidados pela Acil-CoA oxidase e formam peróxido de hidrogênio, este por sua vez em presença de peroxidase permite a condensação oxidativa do B-hidroxietil anilina com 4-aminoanifirina em um composto de cor púrpura. As amostras foram lidas em espectrofotômetro em 550 nm. A concentração plasmática de AGLs foi determinada com base em uma curva padrão.

### ***Triglicerídeos***

A concentração plasmática de triglicerídeos (TG) foi determinada através de um kit de ensaio enzimático colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Roche/Hitachi®; Indianopolis, USA). O método baseia-se na hidrólise do TG pela lipoproteína lipase formando glicerol, que por sua vez é oxidado formando fosfato de dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. Em presença de peroxidase, o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminofenazona e 4-clorofenol formando um produto de cor avermelhada (reação de Trinder). As amostras foram lidas em espectrofotômetro em 492 nm. A concentração plasmática de TG foi determinada com base em uma curva padrão.

### ***Colesterol***

A concentração plasmática de colesterol (COL) foi determinada através de um kit de ensaio enzimático colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Roche/Hitachi®; Indianopolis, USA). O método baseia-se na hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol estearase formando colesterol que por sua vez é oxidado

formando colest-4-en-3-one e peróxido de hidrogênio. Em presença de peroxidase, o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminofenazona e 4-clorofenol formando um produto de cor avermelhada (reação de Trinder). As amostras foram lidas em espectrofotômetro em 492 nm. A concentração plasmática de COL foi determinada com base em uma curva padrão.

### **3.2.2 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose e à insulina**

#### ***Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)***

Os animais foram mantidos em jejum por 12h e após a verificação da glicemia de jejum com o aparelho Accu-Check Advantage II, administrou-se na cavidade peritoneal uma solução de glicose 20% (2,0 g/Kg de peso corpóreo). As glicemias foram verificadas nos tempos 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos.

#### ***Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)***

Os animais foram mantidos em jejum por 6h e após a verificação da glicemia de jejum com o aparelho Accu-Check Advantage II, administrou-se na cavidade peritoneal 0,75U/kg de peso corpóreo de insulina regular humana. A glicemia foi verificada nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos. A razão constante do clearance da glicose (*kitt*), foi calculado usando a fórmula  $0.693/t_{1/2}$ . A glicose  $t_{1/2}$  foi calculada usando a análise da queda do quadrado da concentração de glicose plasmática durante o decaimento da fase linear.

### **3.2.3 Avaliação da Secreção de Insulina**

#### ***Isolamento de Ilhotas Pancreáticas de camundongos***

As ilhotas de Langerhans foram isoladas segundo método da colagenase descrito por Lernmark (1974). Animais foram sacrificados por decapitação, em seguida realizou-se uma incisão abdominal e interrompeu-se o ducto pancreático com um fio cirúrgico a altura da ampola de Water para evitar a saída de solução de colagenase para o duodeno. Em seguida, inseriu-se uma cânula através de uma pequena incisão na parte proximal

deste ducto e foram injetados aproximadamente 5 ml de solução de colagenase (0,9mg/ml diluídas em solução de Hanks enriquecida com 5,6 mM de glicose) no pâncreas dos animais. O pâncreas foi então retirado da cavidade abdominal por dissecação e transferido para um tubo de 15 ml onde se adicionou mais 5 ml da solução de colagenase. A digestão do pâncreas foi feita em banho-maria a 37°C durante 10 min. Ao final deste período realizou-se uma agitação manual de 30s para facilitar a desagregação do tecido pancreático. A digestão do tecido foi interrompida mediante a adição de solução de Hanks a 4°C. As ilhotas foram lavadas três vezes com a mesma solução e separadas por centrifugação. Finalmente as ilhotas foram coletadas uma a uma, sob lupa, com o auxílio de pipeta Pasteur.

### ***Secreção Estática de Insulina***

As ilhotas coletadas foram transferidas para placas de cultura com 24 poços contendo 0,5 ml de solução de pré-incubação composta de solução de Krebs acrescida de 0,5% albumina bovina (m/v) e 5,6 mM de glicose. Em todos os experimentos 5 ilhotas foram colocadas em cada reservatório. A seguir as placas foram mantidas em estufa gaseada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) a 37°C por 60 minutos. A solução de pré-incubação foi removida e substituída por nova solução de incubação contendo diferentes secretagogos. Após 60 min de incubação, as placas foram resfriadas em banho de gelo e o sobrenadante removido e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio.

### ***Secreção Dinâmica de Insulina***

Grupos de 50 ilhotas foram coletadas e pré-incubadas em estufa gaseada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) à 37°C por 60 minutos, em solução de Krebs acrescida de 0,5% de albumina bovina (m/v) e 2,8 mM de glicose. Em seguida as ilhotas foram colocadas em um filtro Milipore SW1300 (8µm) e transferidas para câmaras de perfusão. As ilhotas foram continuamente perfundidas a uma taxa de 1ml/min. Durante os 20 min iniciais as ilhotas foram perfundidas com solução de Krebs 2,8 mM de glicose e após os 20 min as ilhotas foram perfundidas por uma solução de Krebs contendo os

diferentes estímulos: 22,2 mM de glicose, 2,8 mM de glicose + 10 mM de leucina e 2,8 mM de glicose + 15 mM de KIC. Para a secreção dinâmica estimulada com carbacol, os 20 min iniciais de perfusão foi feito com solução de Krebs 11,1 mM de glicose e depois com 11,1 mM de glicose + 100  $\mu$ M de carbacol. Amostras para a quantificação da insulina foram coletadas em intervalos regulares de tempo e dosadas por radioimunoensaio.

### ***Dosagem de Insulina***

A concentração de insulina dos diferentes experimentos foi determinada por radioimunoensaio (adaptado de Scott *et al.* 1981). Para a realização do ensaio, pipetou-se 0,1 mL das amostras e 0,2 mL de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina humana recombinante marcada com  $^{125}$ I em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9 % e albumina 0,5 %. A concentração de insulina foi determinada com base em uma curva padrão de insulina de rato com concentrações conhecidas (0,025 até 5,0 ng/mL). Após um período de incubação de 48h, todos os tubos receberam 0,2 ml de uma solução contendo 2,5 % de carvão ativado, 0,5 % de albumina e 0,25 % de dextran T 70 em tampão fosfato. Os tubos foram agitados e deixados em repouso durante 20 min, a seguir foram centrifugados por 20 min (2800 rpm) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade foi medida em contador de radiação gama.

### **3.2.4 Western Blotting**

A expressão e fosforilação das proteínas foi avaliada pela técnica de “Western blotting”. As ilhotas foram rompidas e homogeneizadas por sonicação com 6 pulsos de 5 sec com 5 sec de intervalo entre os pulsos (VirSoni 60). Os extratos foram centrifugados a 15.000 g, 4 °C por 15 min para remoção do material insolúvel. As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DDT 10 mM, e fervidas em banho seco por 5 min. Alíquotas com concentrações protéicas semelhantes foram aplicadas no SDS-PAGE (10% Tris acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após corrida, as proteínas foram transferidas para

membrana de nitrocelulose de 0,45 $\mu$ m (BioRad). Esta foi incubada por 2 h em solução bloqueadora de leite desnatado (5%) para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários policlonais: anti-M3 (Santa Cruz Biotechnology, sc9108), anti-AKT 1/2/3 (Santa Cruz Biotechnology, sc8313), anti-p-AKT 1/2/3 (Santa Cruz Biotechnology, sc7985R) anti-PKA $\alpha$ cat (Santa Cruz Biotechnology, sc903), anti-Canal de cálcio subunidade  $\beta$ 2 (Sigma, C5738) e com os anticorpos monoclonais anti-PKC $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, sc80) e anti  $\alpha$ -tubulina (Sigma, T6199). Todos os anticorpos da Santa Cruz Biotechnology foram diluídos 1:200 em BSA 3%, já o da Sigma 1:500 para canal de cálcio e 1:1000 para  $\alpha$ -tubulina. Após o tempo de incubação, os anticorpos primários foram removidos e se fez a lavagem das membranas. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Invitrogen), diluído 1:10000 em leite desnatado 5%, por 2h. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para auto-radiografia. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation). Todas as lavagens foram feitas em TBS acrescida de tween 0,05% por aproximadamente 5 minutos, três vezes.

### **3.2.5 Viabilidade celular pelo teste de MTS**

O método espectrofotométrico da redução para formazan, conhecido como MTS (CellTiter 96<sup>TM</sup> Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, USA), foi utilizado para todos os testes de viabilidade. Grupos de aproximadamente 100 ilhotas foram distribuídos em placas tipo Costar com 96 poços. A mistura PMS/MTS foi preparada segundo as indicações do fabricante e diluída para 15 % em tampão Krebs-Hepes contendo 11 mM de glicose. A leitura cinética foi realizada em 465 nm, cada 10 min, por 3 h. A viabilidade foi expressa como área integrada sobre a curva.

### **3.2.6 Registro do cálcio citoplasmático em ilhotas de Langerhans**

Grupos de aproximadamente 50 ilhotas foram lavadas em solução de Krebs e incubadas em 2 ml de Krebs 5.6 mM de glicose em presença de 2 $\mu$ M fura-2/AM dissolvido em DMSO (0,1%). As ilhotas foram mantidas em estufa gaseada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) a 37°C por 60 min. Após a incubação com o fura, as ilhotas foram aderidas em lâminas de vidro com polyisina e transferidas para uma câmara de perfusão em presença de diferentes secretagogos. As ilhotas foram perfundidas com Krebs 2,8mM de glicose até a estabilização do sistema, após esse período, as mesmas foram estimuladas durante aproximadamente 25 minutos com glicose e carbacol. As imagens das oscilações de cálcio foram captadas usando aparelhagem adequada. As ondas excitatórias de 340 e 380 nm serão selecionadas por uma fonte de luz de xenônio e a emissão será de 510 nm. A mudança no cálcio citoplasmático será detectada como uma mudança na proporção F340/F380 (Quesada *et al.*, 2002).

### **3.3 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média e erro padrão. Os resultados referentes às leituras densitométricas do Wester Blotting foram expressos como porcentagem em relação ao controle. O teste estatístico utilizado foi Anova de duas vias (Anova two-way), onde avaliamos o efeito da dieta e da suplementação com leucina, assim como a interação entre esses fatores. O post hoc adotado foi o de Newman-Keuls e o nível de significância adotado para todas as análises foi  $p < 0,05$ .

## Resultados

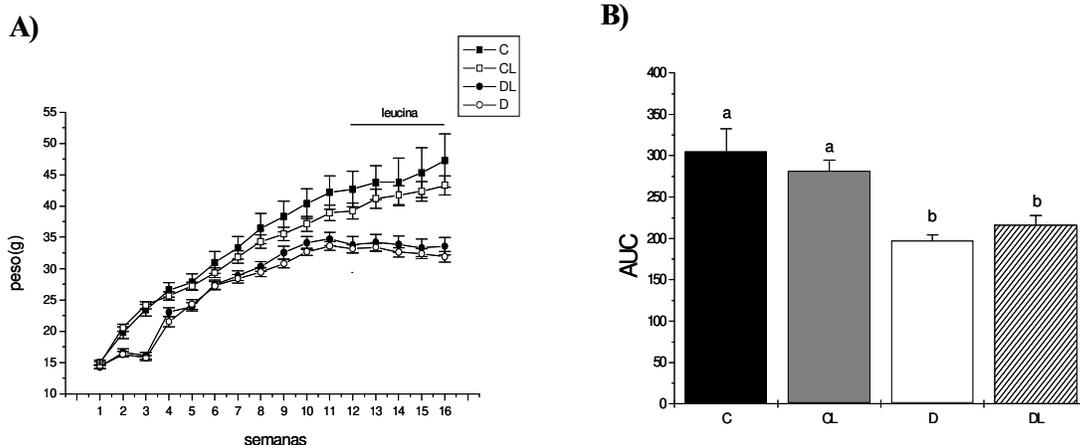
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização do Modelo Experimental

A **Fig.2A** representa a evolução do peso corpóreo ao longo de 16 semanas. Observou-se que a partir da segunda semana, os animais desnutridos (D e DL) apresentaram peso corpóreo menor em relação aos animais controle (C e CL), assim como evidenciado pela área abaixo das curvas de crescimento (**Fig.2B**). A leucina não influenciou o ganho de peso dos animais. A **Tab.4** mostra que o peso corpóreo final, o comprimento naso-anal (CNA) e todos os órgãos e tecidos avaliados se mostraram reduzidos nos animais desnutridos. Também não se verificou influência da suplementação com leucina sobre esses parâmetros.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos (**Tab.5**) mostrou uma redução significativa de proteínas totais, albumina, triglicérides (TG) e insulina nos animais desnutridos. Não houve diferença de glicemia e colesterol (COL) entre os grupos enquanto que os ácidos graxos livres (AGL) se mostraram aumentados nos animais desnutridos. Para os níveis de AGL a análise estatística mostrou que não houve efeito da leucina, porém, o post hoc mostrou uma redução de AGL nos animais DL em relação ao grupo D. A suplementação com leucina não influenciou nos demais parâmetros plasmáticos avaliados.

Para investigar diferenças de tolerância à glicose, submetemos os animais a um teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT). Verificou-se a glicemia dos animais antes e depois da injeção intraperitoneal de 2g/Kg de glicose (**Fig.3A**). Em ambos os grupos de desnutridos foi possível observar uma queda mais rápida da glicemia do que nos animais controle. A maior tolerância dos desnutridos pode ser evidenciada pela área abaixo das curvas glicêmicas (**Fig.3B**) que foi significativamente menor nos desnutridos. A suplementação com leucina não influenciou na resposta dos animais frente à carga de glicose administrada.



**Fig.2A)** Peso corpóreo de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL) avaliado ao longo de 16 semanas (n=12) . Dados representam média  $\pm$  EPM. **B)** Média  $\pm$  EPM da área abaixo das curvas (AUC) de peso corpóreo. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).

**Tab.4)** Peso Corporal final, Comprimento naso-anal (CNA), Peso do coração, Baço, Fígado, Rins, e Peso da Gordura Retroperitoneal de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL).

|                                    | C                              | CL                             | D                              | DL                             |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>Peso corporal (g)</b>           | 46,9 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup>   | 46,6 $\pm$ 1,86 <sup>a</sup>   | 34,3 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>    | 32,8 $\pm$ 0,86 <sup>b</sup>   |
| <b>CNA (cm)</b>                    | 10,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>    | 10,2 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>   | 9,85 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>   | 9,76 $\pm$ 0,065 <sup>b</sup>  |
| <b>Coração (g)</b>                 | 0,158 $\pm$ 0,005              | 0,165 $\pm$ 0,006              | 0,147 $\pm$ 0,005              | 0,145 $\pm$ 0,007              |
| <b>Baço (g)</b>                    | 0,138 $\pm$ 0,011 <sup>a</sup> | 0,138 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup> | 0,094 $\pm$ 0,005 <sup>b</sup> | 0,079 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup> |
| <b>Fígado (g)</b>                  | 1,84 $\pm$ 0,085 <sup>a</sup>  | 1,83 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>   | 1,28 $\pm$ 0,048 <sup>b</sup>  | 1,17 $\pm$ 0,043 <sup>b</sup>  |
| <b>Rins (g)</b>                    | 0,353 $\pm$ 0,012 <sup>a</sup> | 0,366 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup> | 0,289 $\pm$ 0,012 <sup>b</sup> | 0,292 $\pm$ 0,012 <sup>b</sup> |
| <b>Gordura Retroperitoneal (g)</b> | 0,52 $\pm$ 0,048 <sup>a</sup>  | 0,49 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>   | 0,30 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>   | 0,31 $\pm$ 0,028 <sup>b</sup>  |

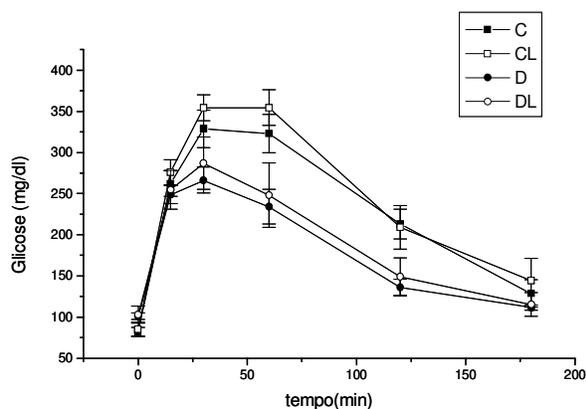
Valores representam média  $\pm$  EPM, n=10. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).

**Tab.5)** Parâmetros bioquímicos plasmáticos avaliados nos camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL) ao final do período experimental.

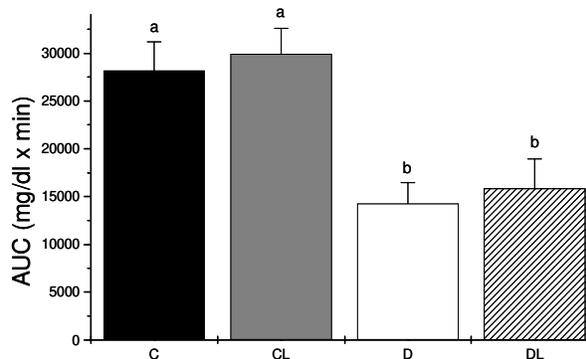
|                                    | C                        | CL                      | D                       | DL                       |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>Proteína total jejum (g/dl)</b> | 4,59±0,261 <sup>a</sup>  | 4,57±0,324 <sup>a</sup> | 3,51±0,078 <sup>b</sup> | 3,42±0,109 <sup>b</sup>  |
| <b>Albumina jejum(g/dl)</b>        | 2,92 ±0,066 <sup>a</sup> | 3,08±0,074 <sup>a</sup> | 2,51±0,062 <sup>b</sup> | 2,63±0,74 <sup>b</sup>   |
| <b>Glicose jejum (mg/dl)</b>       | 84,9±5,62                | 89±8,47                 | 99,2±3,95               | 94,4±6,91                |
| <b>AGL jejum (mmol/l)</b>          | 1,02±0,066 <sup>a</sup>  | 1,07±0,057 <sup>a</sup> | 1,46±0,115 <sup>b</sup> | 1,22±0,112 <sup>ab</sup> |
| <b>TG jejum (mg/dl)</b>            | 151,9±13,9 <sup>a</sup>  | 164,7±16,4 <sup>a</sup> | 90,4±9,27 <sup>b</sup>  | 95,5±9,93 <sup>b</sup>   |
| <b>COL jejum (mg/dl)</b>           | 143,3±9,91               | 141,4±7,25              | 157±5,23                | 135,4±8,42               |
| <b>Insulina jejum (ng/ml)</b>      | 0,90±0,092 <sup>a</sup>  | 1,02±0,134 <sup>a</sup> | 0,41±0,052 <sup>b</sup> | 0,49±0,046 <sup>b</sup>  |

Valores representam média ± EPM. Letras distintas indicam diferença significativa, p<0,05 (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls). .Para proteina total, albumina, AGL e TG n=12, COL n =8, glicose n =10 e insulina n =20.

**A)**



**B)**



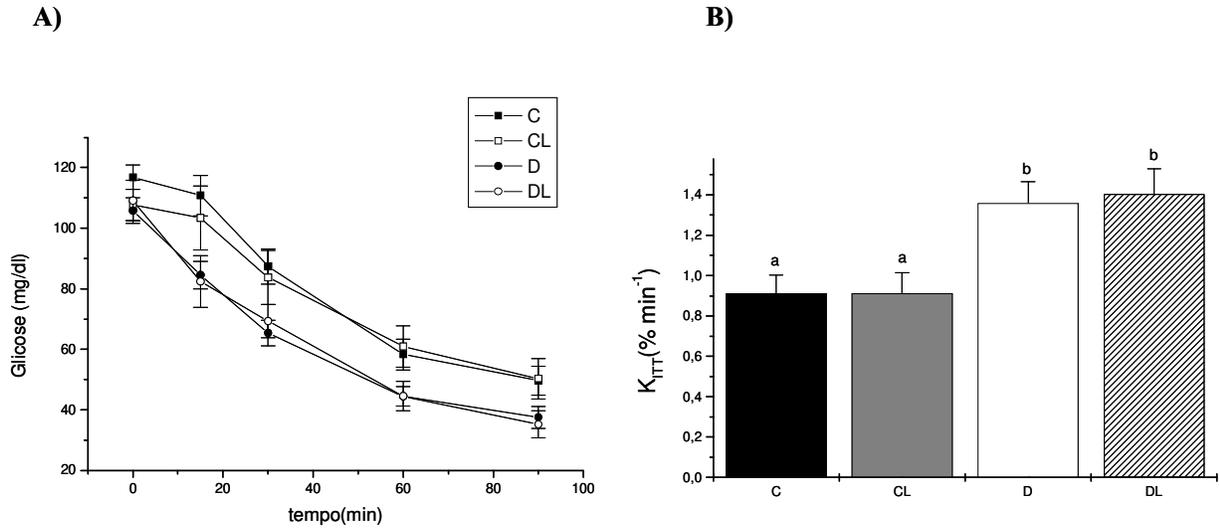
**Fig.3A)** Glicemia de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL) durante o teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT), n=10. Dados representam a média ± EPM da concentração plasmática de glicose antes e depois da injeção intraperitoneal de 2g/Kg de glicose. **B)** Média ± EPM da área abaixo da curva (AUC). Letras distintas indicam diferença significativa, p<0,05 (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls)..

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade dos animais frente à insulina fizemos um teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT). Verificou-se a glicemia dos animais antes e depois da injeção intraperitoneal de 0,75U/Kg de insulina (**Fig.4A**). Os animais desnutridos apresentaram a cinética de decaimento ou “clearance” da glicose ( $K_{ITT}$ ) significativamente maior quando comparado aos controles (**Fig.4B**). Quanto a sensibilidade à insulina, verificou-se que houve efeito da dieta e não houve efeito da suplementação com leucina.

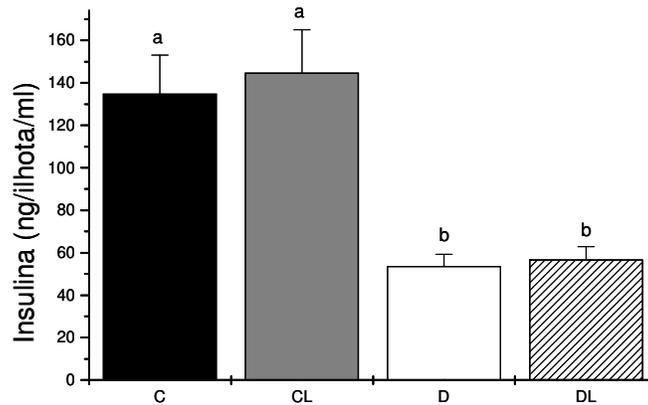
#### 4.2 Conteúdo Total e Secreção de Insulina

A **Fig.5** mostra que o conteúdo total de insulina por ilhota é responsivo à dieta, mas não é responsivo à suplementação com leucina. Para os animais desnutridos o conteúdo total de insulina é significativamente menor que o dos controles (diminuição de aproximadamente 2,5 vezes).

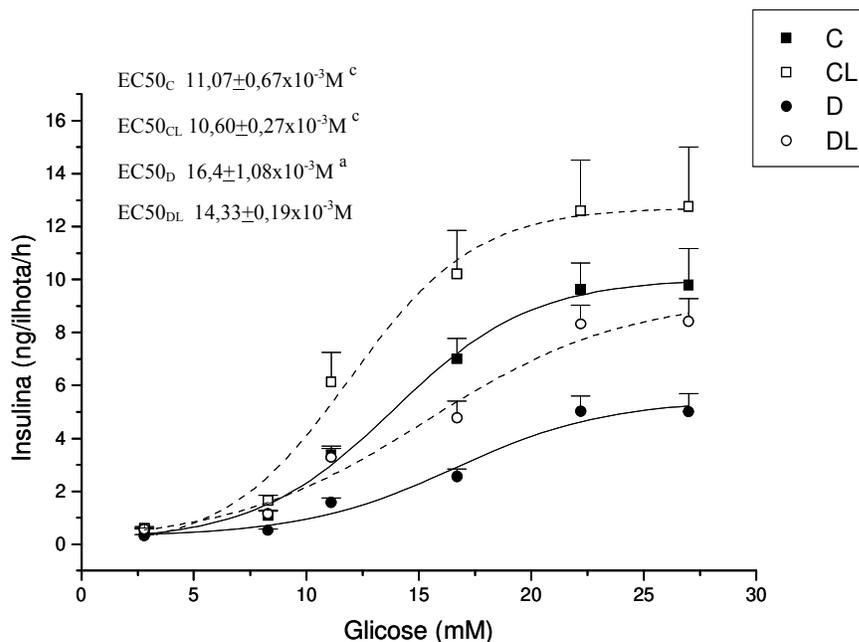
As ilhotas dos animais foram estimuladas com concentrações crescentes de glicose e traçou-se uma curva dose-resposta para cada grupo (**Fig.6A**). Os valores de EC50 (média±EPM) encontrados foram:  $11,07 \pm 0,67 \times 10^{-3} \text{M}$  para o C;  $10,60 \pm 0,27 \times 10^{-3} \text{M}$  para CL;  $16,4 \pm 1,08 \times 10^{-3} \text{M}$  para o D e  $14,33 \pm 0,19 \times 10^{-3} \text{M}$  de glicose para o DL. Quanto à sensibilidade das ilhotas à glicose observou-se o efeito da dieta, o efeito da suplementação com leucina e a interação entre esses dois fatores. Nesse caso, os desnutridos apresentam sensibilidade significativamente menor quando comparados com os controles e a leucina melhorou a sensibilidade das ilhotas apenas no grupo DL. A secreção dinâmica estimulada por glicose mostrou o mesmo perfil que a secreção estática. A **Fig.7A** mostra a secreção de insulina em função do tempo para os quatro grupos, já a **Fig.7B** representa, respectivamente, as áreas sob as curvas. Frente à perfusão constante com glicose, as ilhotas mostraram ser responsivas tanto à dieta quanto à suplementação com leucina. O grupo D teve uma diminuição significativa de 3,4 vezes na AUC em relação ao C. Comparando os grupos suplementados com seus respectivos controles, encontramos que: CL teve um aumento de 1,16 vezes em relação ao C e não difere significativamente do mesmo e DL teve aumento significativo de 2,3 vezes em relação ao D, mas não atinge os níveis do C.



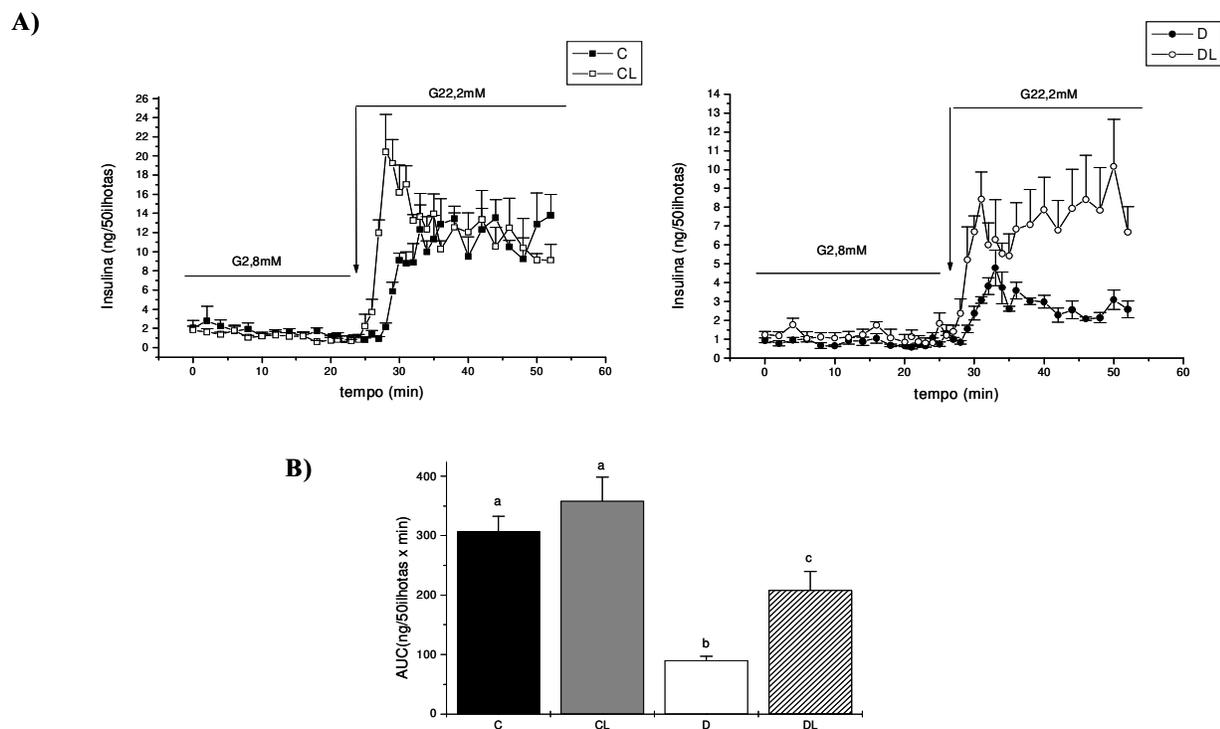
**Fig.4A)** Glicemia de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL) durante o teste intraperitoneal de tolerância a insulina (ipITT), n=08. Dados representam a média  $\pm$  EPM da concentração plasmática de glicose antes e depois da injeção intraperitoneal de 0,75UI/Kg de insulina. **B)** Média  $\pm$  EPM da cinética de decaimento da glicose ( $K_{ITT}$ ). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).



**Fig.5)** Média  $\pm$  EPM do conteúdo total de insulina em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=18. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).



**Fig.6)** Secreção estática de insulina, em resposta à diferentes concentrações de glicose (2,8, 8,3, 11,1, 16,7, 22,2 e 27mM) de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=10. As ilhotas foram pré-incubadas com solução de Krebs contendo 5,6mM de glicose por 30 min. O líquido de pré-incubação foi retirado e foi adicionado 1 mL de solução de Krebs contendo diferentes concentrações de glicose por 1h. O EC50 foi expresso como média  $\pm$  EPM, letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).

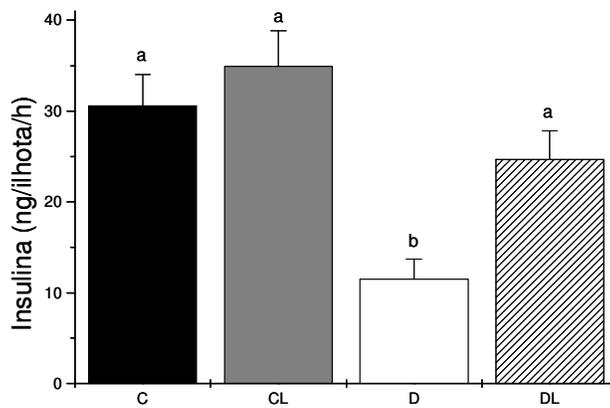


**Fig.7A)** Média  $\pm$  EPM da secreção dinâmica de insulina, em resposta à glicose, de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=4. As ilhotas foram perfundidas de 0-26min. com solução de Krebs 2,8mM de glicose e de 28-54min com solução de Krebs 22,2 mM de glicose. **B)** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva (AUC) da secreção dinâmica de insulina em resposta à glicose. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).

A **Fig.8** mostra a secreção estática de insulina estimulada por glicose e potencializada por carbacol (11,1mM de glicose e 100 $\mu$ M de carbacol). Os resultados sugerem que C e CL não diferem na secreção de insulina frente a esse estímulo, enquanto que o D secreta significativamente menos insulina (diminuição de 2,7 vezes) e o DL retorna aos valores de secreção do C e CL. Em comparação com o D, o DL teve um aumento significativo de 2,15 vezes. A **Fig.9A** mostra a dinâmica da secreção de insulina estimulada com glicose e potencializada por carbacol e a **Fig.9B** representa as áreas sob as curvas. Assim como para a glicose, verificou-se que as ilhotas foram responsivas à dieta e à suplementação com leucina. O D teve uma diminuição significativa da AUC de 5,19 vezes em relação ao C, o grupo CL teve um aumento não significativo de 1,34 vezes em relação ao C, já o DL difere significativamente do D com um aumento de 2,3 vezes e também é diferente do C e CL.

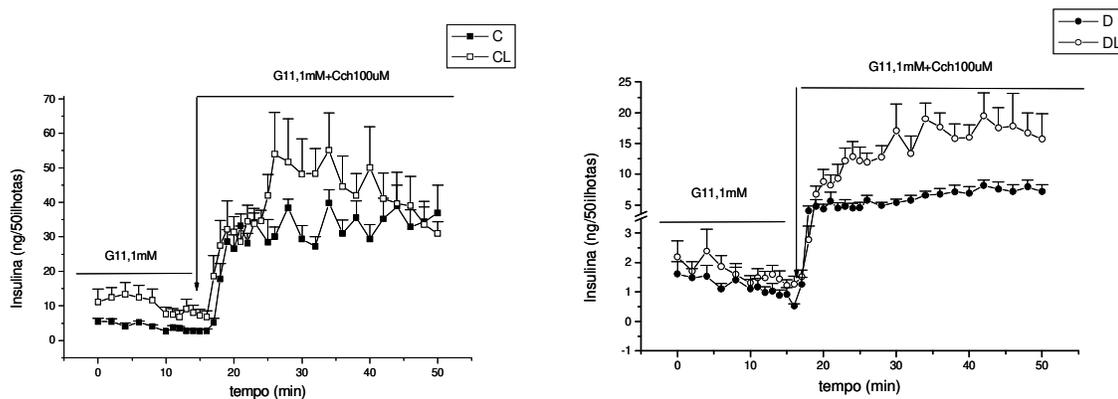
A **Fig.10A** mostra a secreção dinâmica de insulina em resposta à leucina e a **Fig.10B** mostra as áreas sob as curvas. Frente à estimulação com leucina, verificou-se tanto o efeito da dieta quanto da suplementação com leucina. O D teve uma diminuição significativa de 1,66 vezes em relação ao C, o CL teve um aumento significativo de 1,54 vezes em relação ao C e o DL teve um aumento significativo de 1,7 vezes em relação ao D. Nesse caso a suplementação com leucina melhorou a resposta das ilhotas tanto no controle, quanto no desnutrido.

Finalmente, a **Fig.11A** e **11B** mostram, respectivamente, a secreção dinâmica em resposta ao KIC e as áreas sob as curvas. Frente à estimulação com KIC, verificou-se apenas o efeito da dieta. O D teve uma diminuição significativa na AUC de 3,7 vezes em relação ao C. Por sua vez, comparando os grupos suplementados com seus respectivos controles, observou-se que não houve diferença significativa da secreção de insulina. O CL teve um aumento na AUC de 1,15 vezes em relação ao C e o DL teve um aumento de 1,32 vezes em relação ao D.

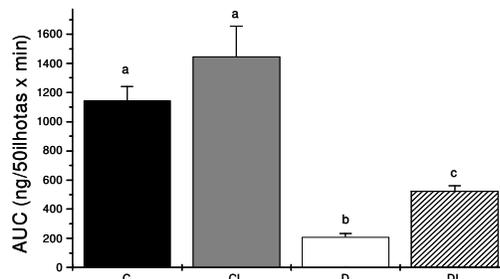


**Fig.8)** Média  $\pm$  EPM da secreção estática de insulina, em resposta ao carbachol, de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=12. As ilhotas foram pré-incubadas com solução de Krebs contendo 5,6mM de glicose por 30 min. O líquido de pré-incubação foi retirado e foi adicionado 1 mL de solução de Krebs contendo 11,1mM de glicose e 100uM de carbachol por 1h. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).

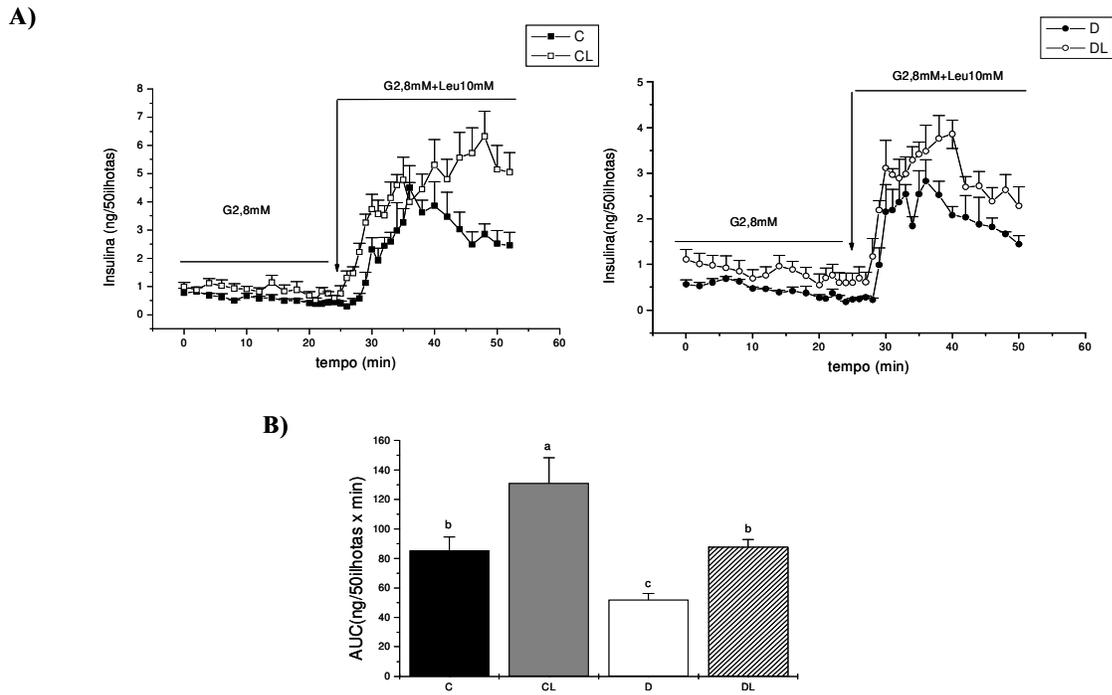
**A)**



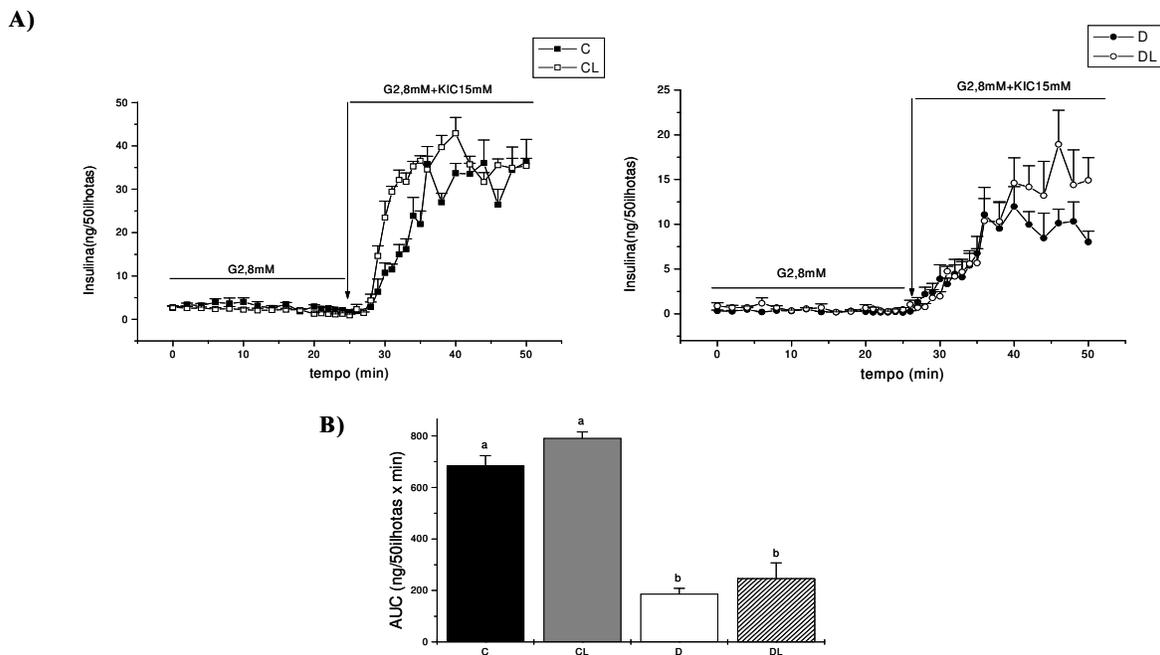
**B)**



**Fig.9A)** Média  $\pm$  EPM da secreção dinâmica de insulina, em resposta ao carbachol, de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL), n=6. As ilhotas foram perfundidas de 0-15min. com solução de Krebs 11,1mM de glicose e de 16-50min com solução de Krebs 11,1mM de glicose e 100uM de carbachol. **B)** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva (AUC) da secreção dinâmica de insulina em resposta ao carbachol. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).



**Fig.10A)** Média  $\pm$  EPM da secreção dinâmica de insulina, em resposta à leucina, de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL),  $n=4$ . As ilhotas foram perfundidas de 0-24min. com solução de Krebs 2,8mM de glicose e de 26-50min com solução de Krebs 2,8 mM de glicose e 10mM de leucina. **B)** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva (AUC) da secreção dinâmica de insulina em resposta à leucina. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p<0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).



**Fig.11A)** Média  $\pm$  EPM da secreção dinâmica de insulina, em resposta ao KIC, de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL),  $n=4$ . As ilhotas foram perfundidas de 0-24min. com solução de Krebs 2,8mM de glicose e de 26-50min com solução de Krebs 2,8 mM de glicose e 15mM de KIC. **B)** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva (AUC) da secreção dinâmica de insulina em resposta ao KIC. Letras distintas indicam diferença significativa,  $p<0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).

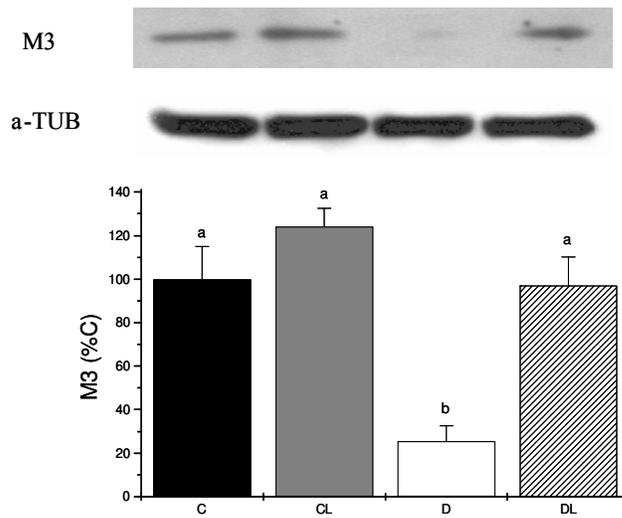
Para todos os estímulos avaliados, nota-se que a suplementação com leucina durante 30 dias tem um efeito menos relevante sobre os animais controles do que para os animais desnutridos, indicando assim uma interação entre os fatores dieta 6% e suplementação com leucina. Mesmo quando a análise estatística não mostra interação significativa entre esses fatores, verifica-se uma importante tendência que não deve ser descartada.

### **4.3 Vias de sinalização: Expressão Protéica e Viabilidade Celular**

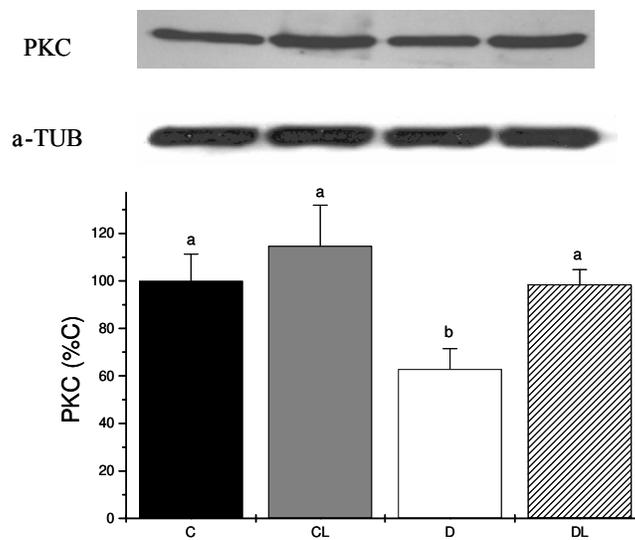
Dando continuidade ao nosso trabalho, resolvemos investigar algumas proteínas chaves que poderiam modular a secreção de insulina. Analisamos a expressão e fosforilação das proteínas por densitometria das bandas da membrana de nitrocelulose. Em ilhotas de Langerhans de camundongos, as proteínas estudadas foram: receptor M3, Ca $\beta$ 2 (canal de cálcio subunidade  $\beta$ 2), PKC (subunidade  $\alpha$ ), PKA (subunidade  $\alpha$ ), AKT e p-AKT. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

A **Fig.12** mostra a quantificação da proteína M3 em ilhotas de camundongos e os resultados foram expressos em porcentagem do controle. Nesse caso observou-se que a expressão protéica foi modulada pela dieta, assim como pela suplementação com leucina e houve interação desses fatores. O D apresentou uma redução significativa da expressão protéica de 75% em relação ao C. Comparando os grupos suplementados com seus respectivos controles, observou-se que o CL teve um aumento não significativo de 24% em relação ao C e que DL teve um aumento significativo de 72% em relação ao D e chegou a níveis similares do C e CL. O efeito marcadamente maior da suplementação com leucina nos animais desnutridos, indica interação entre tipo de dieta e leucina.

A **Fig.13** mostra a quantificação da PKC $\alpha$  em ilhotas de camundongos e assim como as outras proteínas, é modulada pela dieta e suplementação com leucina. O D teve uma redução significativa de 37% comparado ao C. O CL teve um aumento de 15% comparado ao C. O DL teve um aumento de 35,5% comparado ao D, alcançando os níveis tanto de C, quanto de CL. O grupo D difere significativamente dos outros grupos.



**Fig.12)** Expressão proteica do receptor M3 em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da a-TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos independentes (n=4). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).



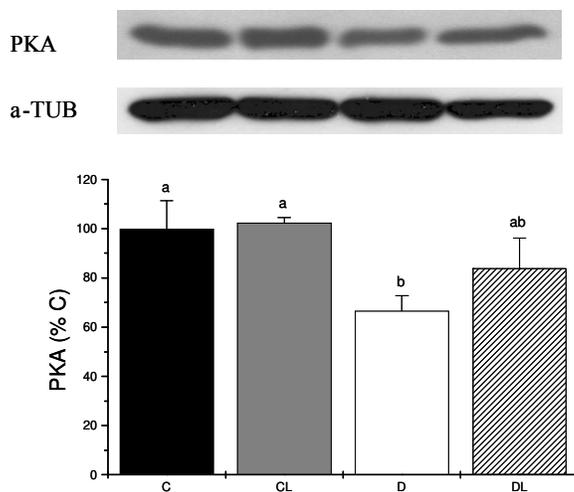
**Fig.13)** Expressão protéica PKC em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da a-TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos independentes (n=4). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).

Por sua vez, a **Fig.14** mostra a quantificação da proteína PKA $\alpha$ . A PKA difere das outras proteínas, sua expressão não é modulada pela suplementação com leucina, é modulada apenas pela dieta. O D tem uma diminuição significativa em relação ao C e CL de aproximadamente 35%. O grupo DL teve um aumento não significativo de 17,5% comparado com o D e também não difere de C e CL.

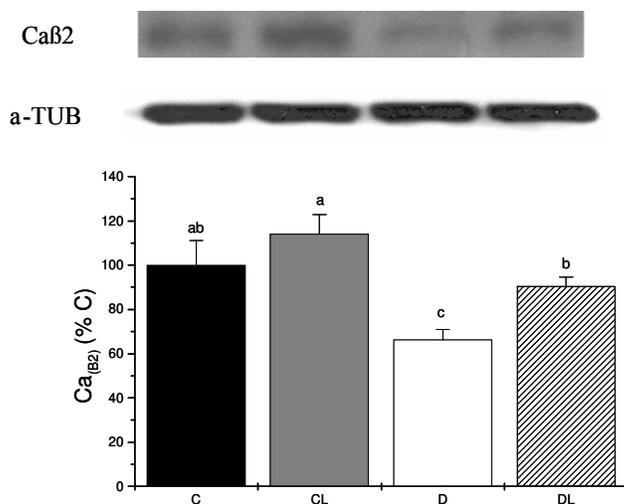
A **Fig.15** mostra a quantificação da proteína constituinte da subunidade  $\beta_2$  do canal de cálcio voltagem-dependente (Ca $\beta_2$ ). Observou-se que houve efeito da dieta e da suplementação com leucina na expressão dessa proteína. O grupo D teve uma redução significativa de 44% em relação ao C, o CL teve um aumento não significativo de 14% em relação ao C e o DL teve um aumento significativo de 34% em relação ao D. O grupo DL chega a níveis próximos do C, mas é diferente do D e do CL.

Finalmente, as **Fig.16** e **Fig.17** mostram a expressão e fosforilação da proteína AKT, respectivamente. A expressão da AKT e da p-AKT foram moduladas tanto pela dieta, quanto pela suplementação com leucina. Com relação à AKT total, o D teve uma redução significativa de 35% em relação ao C. Comparando CL com C, observou-se um aumento significativo de 28%, por sua vez comparando DL com D, observou-se um aumento também significativo de 22%. O D chega a níveis de expressão próximos do C, mas difere do CL. O D chega a níveis de expressão próximos do C, mas difere do CL. Já com relação à p-AKT, o D teve uma redução significativa de 36% em relação ao C. Comparando CL com C, observou-se um aumento significativo de 50%, por sua vez comparando DL com D, observou-se um aumento significativo de 75%. Nesse caso a leucina aumenta a expressão protéica independente da dieta, ou seja, aumenta tanto em CL quanto em DL.

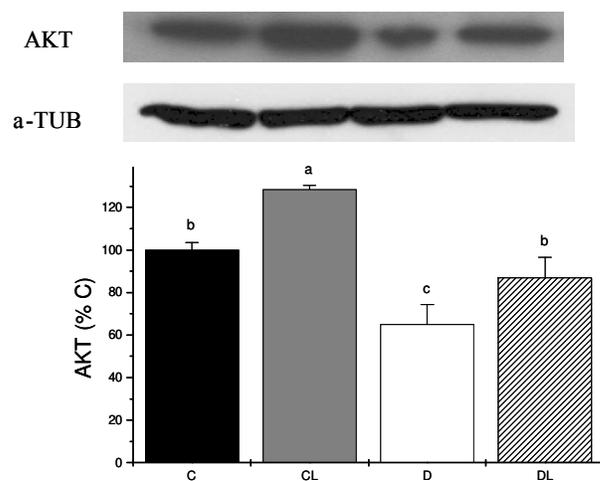
A viabilidade celular das ilhotas foi avaliada por MTS e foi expressa como área integrada sobre a curva (**Fig.17**). Observou-se apenas uma redução na viabilidade celular das ilhotas de D, porém, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos.



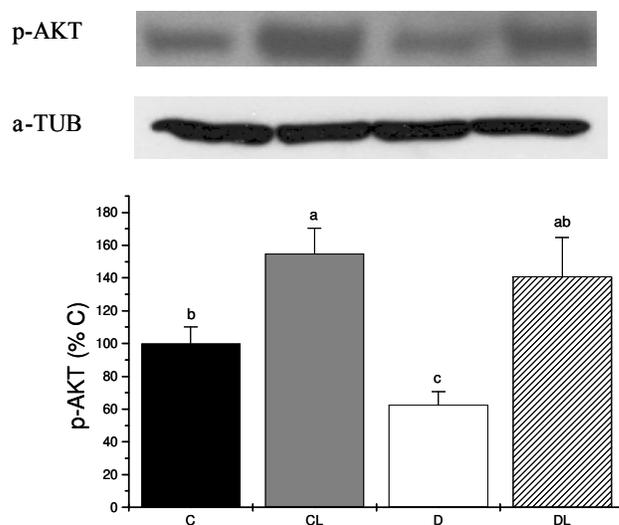
**Fig.14** Expressão proteica da PKA em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da a-TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos independentes (n=4). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).



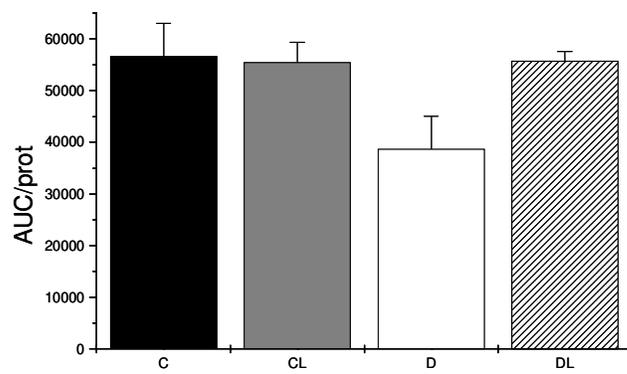
**Fig.15** Expressão proteica do canal de Cálcio (subunidade β2) em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da a-TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos independentes (n=4). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls).



**Fig.16** Expressão protéica da AKT em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da a-TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes (n=3). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (ANOVA e pós teste de Tukey).



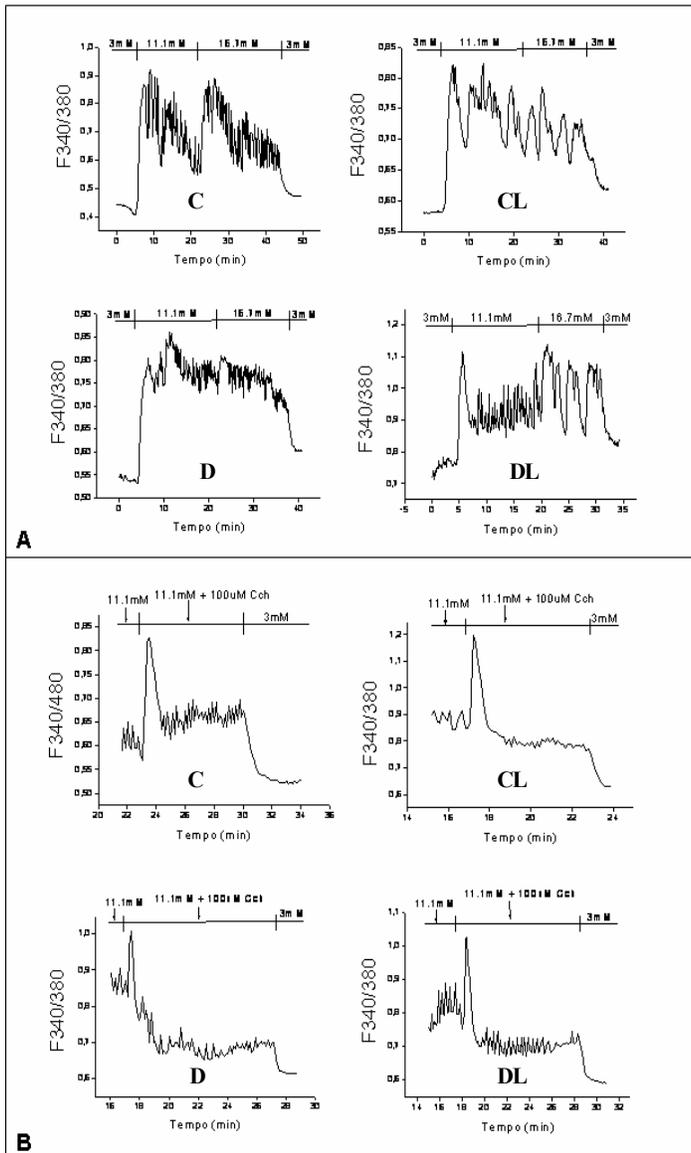
**Fig.17** Expressão protéica da p-AKT em ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Dados normalizados pela expressão da a-TUB, expressos em porcentagem do controle, as barras representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes (n=3). Letras distintas indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (ANOVA e pós teste de Tukey).



**Fig.18)** Viabilidade celular avaliada por MTS de ilhotas de camundongos controle (C), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). Resultados representam a média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva (AUC) normalizada por proteína total de três experimentos independentes (Anova two-way, post hoc de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

#### 4.4 Oscilações citoplasmáticas de cálcio

Por fim, verificamos que a restrição protéica modificou o padrão oscilatório de cálcio das ilhotas frente à glicose (**Fig.19A**), produzindo ondas rápidas com baixa amplitude e alta frequência. A suplementação com leucina teve efeito contrário, produzindo ondas lentas com alta amplitude e baixa frequência, sugerindo maior mobilização de cálcio e secreção de insulina nos animais tratados. A **Fig.19B** mostra as oscilações citoplasmáticas de cálcio frente ao carbacol, que é um agonista colinérgico responsável pela liberação dos estoques intracelulares de cálcio. Este evento é evidenciado na figura abaixo pelo aumento abrupto na concentração de cálcio após o início da perfusão com este estímulo. Verificamos que a restrição protéica reduziu o pico correspondente à liberação de cálcio intracelular e que a Leu restaura a liberação de cálcio.



**Fig.19)** Representa mudanças na razão de fluorescência para cálcio intracelular em ilhotas de camundongos controle (C ), controle suplementado (CL), desnutrido (D) e desnutrido suplementado (DL). As ilhotas foram incubadas por 2h em presença de solução de Krebs com 2 $\mu$ M de fura 2AM. Após este período, as ilhotas foram colocadas na câmara de perfusão com diferentes concentrações de **A)** glicose e **B)** carbacol. As figuras são de um registro representativo (n=5).

## Discussão

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do Modelo Experimental

As características gerais dos grupos que receberam dieta contendo 6% de proteína mostraram o mesmo perfil de animais submetidos ao mesmo protocolo de desnutrição em outros estudos. Dentre elas estão: peso corpóreo, proteínas plasmáticas totais e albumina reduzidos em relação aos animais controle (**Fig.2 e Tab.2**). A glicemia e insulinemia de jejum se mantiveram as mesmas, enquanto os ácidos graxos livres mostraram um aumento nos animais desnutridos em relação aos controles (**Tab.2**) (Latorraca *et al.*, 1998a; Ferreira *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004). Segundo Filiputti (2006), a suplementação com leucina influenciou em diversos parâmetros como: albumina, glicose, ácidos graxos livres e insulina de jejum, porém, colesterol e proteínas totais não foram influenciados por esse aminoácido. Nossos resultados indicaram que apenas os ácidos graxos livres podem sofrer influência da suplementação com leucina. Tais diferenças podem ser explicadas pelas diferenças no modelo experimental em cada caso. Filiputti utilizou ratos machos sem racionamento de ração para os desnutridos, enquanto em nosso trabalho utilizamos camundongos fêmeas com racionamento de ração para os desnutridos. Floyd *et al.* (1966) mostrou que após uma infusão de uma mistura de 10 aminoácidos essenciais em humanos, os níveis séricos de AGLs diminuem, demonstrando que um aumento plasmático de aminoácidos pode modular os níveis de AGLs.

Diferentes estudos mostraram que os animais desnutridos apresentam maior sensibilidade periférica à insulina, pois são normo ou hipoglicêmicos apesar da insulinopenia estabelecida nesses animais (Levine *et al.*, 1983; Okitolonda *et al.*, 1988; Escrive *et al.*, 1991; Picarel-Blanchot *et al.*, 1995). Estudos moleculares demonstraram maior expressão do receptor da insulina (IR) e maior fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e maior associação desta última com a subunidade de 85kDa (p85) da fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) em músculo, fígado e adipócitos de ratos desnutridos (Ozanne *et al.*, 1997; Reis *et al.*, 1997; Latorraca *et al.*, 1998a). Nosso grupo tem demonstrado que a suplementação com leucina melhora a secreção de insulina estimulada por glicose, mas

segundo nossos resultados, não altera a tolerância à glicose (**Fig.3**) nem a sensibilidade periférica à insulina (**Fig.4**), sugerindo que a leucina influenciaria na captação de glicose periférica desses animais. Alguns estudos mostraram que a leucina induz hiperinsulinemia e resistência à insulina em músculo esquelético de humanos (Schwenk & Haymond, 1987; Krebs *et al.*, 2002; Drummond *et al.*, 2008). Tremblay & Marette (2001) estudaram os mecanismos moleculares envolvidos na resistência periférica induzida por aminoácidos e demonstraram que um aumento de aminoácidos circulantes ativam a via mTOR/S6K1, uma vez ativada, essa via é responsável por um mecanismo de *feed-back* negativo na via de sinalização da insulina. A S6K1 fosforila sítios inibitórios do IRS1, que por sua vez causa uma rápida desativação da PI3K, comprometendo desta forma a resposta periférica frente à insulina. Posteriormente, Um *et al.* (2004) utilizaram camundongos deficientes para a S6K1 para comprovar o papel dessa proteína no desenvolvimento de resistência periférica à insulina. Esses camundongos apresentaram menor fosforilação de sítios inibitórios em IRS1 e maior proteção contra a resistência insulínica induzida por dieta. Baum *et al.* (2005) avaliaram o efeito de doses fisiológicas de leucina e carboidratos ministradas oralmente, na via de sinalização da insulina em músculo esquelético de ratos e verificaram que a leucina diminui a duração da atividade da PI3K induzida por insulina.

## **5.2 Conteúdo Total e Secreção de Insulina**

Martin *et al.* (2004) demonstraram que a restrição protéico-calórica tem efeitos diferentes em fetos de ratos e animais adultos. Em fetos submetidos à restrição protéico-calórica o conteúdo total de insulina por ilhota é maior quando comparado com o controle, enquanto que nos ratos adultos acontece um efeito inverso, o conteúdo total de insulina é menor quando comparado com as ilhotas do controle. Dependendo do modelo de restrição adotado, o conteúdo total de insulina por ilhota pode variar de maneira expressiva. Outros estudos demonstraram que fetos/neonatos provenientes de mães submetidas à restrição protéica durante todo o período gestacional (Cherif *et al.*, 2001) e lactação (Latorraca *et al.*, 1999) não apresentam diferenças no conteúdo total de insulina por ilhota. Swenne *et al.* (1992) submeteram ratos desmamados com 3 semanas de vida à

dieta hipoproteica ou normoproteica até a 6 semana de vida e depois forneceram dieta comercial até a 12 semana de vida. As ilhotas dos animais com 6 e 12 semanas de vida foram analisadas por morfometria. Os animais que receberam dieta hipoproteica apresentaram ilhotas significativamente menores que dos animais controle e mesmo depois que esses animais receberam dieta comercial por 6 semanas, as ilhotas ainda se mostraram menores quando comparadas às ilhotas dos animais controle. Esses estudos indicam que as ilhotas de fetos e neonatos possuem uma maior capacidade de adaptação a uma baixa disponibilidade de nutrientes, o que não acontece com animais jovens. A baixa disponibilidade de nutrientes durante os estágios iniciais de vida pós-desmame leva a alterações irreversíveis nas ilhotas desses animais, incluindo diminuição no tamanho e conteúdo total de insulina por ilhota. Nossos resultados ainda indicam que a leucina não altera a quantidade total de insulina por ilhotas nem nos animais controle, nem nos desnutridos (**Fig.5**). Esses resultados corroboram os de Filiputti (2006) que também não mostrou influência da leucina sobre esse parâmetro em ratos submetidos a um protocolo experimental semelhante ao nosso.

Já é bem documentado na literatura que a secreção de insulina estimulada por glicose está prejudicada em animais desnutridos. Falhas em diferentes etapas desse mecanismo são propostas para explicar a menor sensibilidade dessas ilhotas frente à glicose. As principais alterações são: menor metabolização da glicose (Dixit & Kaung, 1985), diminuição na mobilização do íon cálcio (Carneiro, 1996; Latorraca *et al.*, 1999), menor expressão de diversas proteínas como: PDX-1 (Arantes *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2004), do transportador de GLUT-2 (Dixit & Kaung, 1985), da glicoquinase (Heywood *et al.*, 2004), da glicerolfosfato desidrogenase (Rasschaert *et al.*, 1995), da PKC $\alpha$  e da PKA $\alpha$  (Ferreira *et al.*, 2004; Milanski *et al.*, 2005). Nossos resultados corroboram os estudos acima e mostram que a secreção de insulina estimulada por glicose está diminuída nos animais desnutridos (**Fig.6 e 7**).

Floyd *et al.* (1966) observaram que após uma refeição rica em proteínas a concentração plasmática de insulina aumentava e esse aumento não era proporcional ao simples aumento plasmático dos aminoácidos, sugerindo que estes poderiam potencializar a secreção de insulina por outros mecanismos que não fossem sua própria metabolização. Alguns aminoácidos como valina e isoleucina também são eficientemente

oxidadas pela célula  $\beta$ , porém, não apresentam o mesmo potencial que a leucina em estimular a secreção de insulina e a produção de ATP (Malaisse *et al.*, 1981). Leucina é capaz de estimular e potencializar a secreção de insulina por dois mecanismos diferentes: 1) através da desaminação da leucina formando KIC e 2) através da ativação alostérica da GDH, causando oxidação de glutamato em  $\alpha$ -ceto glutarato, ambas as vias geram intermediários do ciclo de Krebs e ATP, resultando em influxo de cálcio e liberação de insulina (Li *et al.*, 2003). Os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo não estão completamente elucidados, mas dados recentes mostraram que a leucina causa aumento da expressão das enzimas glicocinase e ATP-sintase, conseqüentemente a quantidade de ATP formado na metabolização da glicose aumenta, aumentando a secreção de insulina estimulada por glicose em células  $\beta$  de ratos e humanos (Yang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006). Nossos resultados mostram que a suplementação com leucina aumenta a secreção de insulina estimulada por glicose em ambos os grupos: C e D, porém seu efeito é significativo apenas no D, mostrando que o efeito da suplementação com leucina é mais eficaz nesses animais, cujas ilhotas são menos responsivas à glicose (**Fig.6 e 7**).

Leon-Quinto *et al.* (1998) demonstrou que há modificações no sistema nervoso autônomo com alteração na modulação simpática e parassimpática em ratos que receberam dieta hipoprotéica. Esses animais apresentam impulsos parassimpáticos diminuídos e simpáticos aumentados, acarretando uma elevação nos níveis de catecolaminas na circulação e possivelmente uma diminuição na estimulação colinérgica e potencialização da secreção de insulina. Também já foi demonstrado que a expressão da PKA $\alpha$  e da PKC $\alpha$  está diminuída nas ilhotas dos animais desnutridos o que explica, pelo menos em parte, a redução da secreção de insulina (Ferreira *et al.*, 2004; Milanski *et al.*, 2005). Carbacol é um agonista colinérgico, ele se liga ao receptor M3 e desencadeia a mesma cascata de sinalização que a acetilcolina (Zawalich *et al.*, 1989). Nossos resultados também mostraram que estimulação colinérgica exercida pelo carbacol está comprometida nos animais desnutridos e que a suplementação com leucina restaura esse processo, muito provavelmente modulando a expressão de proteínas chaves neste processo (**Fig.8 e 9**).

Em 1980, Sener & Malaisse (1980) descobriram que a glutamato desidrogenase (GDH) estava envolvida na secreção de insulina estimulada por leucina. Gao *et al.* (1999) demonstraram que altas concentrações de glicose inibem a glutaminólise e diminui a secreção de insulina estimulada por leucina. Mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa descobriu que a GDH é modulada negativamente por ATP e GTP, indicando uma forte relação entre o metabolismo da glicose e dos aminoácidos na secreção de insulina (Gao *et al.*, 2003). Em altas concentrações de glicose os níveis de ATP e GTP aumentam e inibem a GDH, nessas condições a leucina não modula a GDH e o substrato para o ciclo de Krebs vem do produto da glicólise: o piruvato (Li *et al.*, 2003). Em nosso modelo experimental, a suplementação com leucina na água de beber, por 30 dias, melhora a secreção de insulina estimulada por diferentes nutrientes e em especial pela leucina. Podemos sugerir que em condições normoglicêmicas o aumento plasmático da leucina pode agir modulando positivamente a GDH e uma vez que essa via está ativada, quando estimulamos as ilhotas com baixa concentração de glicose e alta concentração de leucina, observamos um aumento significativo nos animais que foram suplementados com leucina. A menor secreção de insulina em resposta à leucina verificada nas ilhotas dos animais desnutridos (**Fig.10**) corrobora os resultados encontrados por Cherif *et al.* (2001) e Filiputti (2003). Parte do prejuízo na secreção de insulina estimulada por leucina pode ser explicada pela redução significativa na oxidação desse aminoácido em ilhotas de ratos desnutridos (Filiputti, 2003).

O KIC é um poderoso secretagogo e pode estimular a secreção de insulina por diversos mecanismos. O KIC pode ser metabolizado na mitocôndria e gerar Acetil-CoA que por sua vez entra no ciclo de Krebs, aumentando a quantidade de ATP (Panten *et al.*, 1974). O KIC também pode agir bloqueando diretamente os canais de K dependentes de ATP, despolarizando a célula  $\beta$  e iniciando potenciais de ação (Ashcroft *et al.*, 1987). Nesse contexto é importante salientar que a leucina, que também aumenta a taxa de ATP, não tem atividade sobre os canais de K dependentes de ATP e que mesmo na presença do inibidor metabólico Azide de sódio, o KIC ainda é capaz de bloquear esses canais de K (Branstrom *et al.*, 1998). O KIC pode ainda incorporar uma amina e se transformar em leucina, aumentando a formação de  $\alpha$ -cetoglutarato (Gao *et al.*, 2003). Essa associação de mecanismos estimulatórios da secreção de insulina pelo KIC explica porque

concentrações equimolares de leucina e KIC não produzem o mesmo efeito e porque o efeito da suplementação não é marcante como na secreção estimulada por outros secretagogos. Nossos resultados (**Fig.11**) corroboram os resultados de Filiputti (2003) que também observou que ilhotas de animais desnutridos secretam menos insulina em resposta ao KIC. Estudos em ilhotas de animais desnutridos mostraram que a função mitocondrial pode estar comprometida nessas células, podendo explicar a menor secreção de insulina (Rasschaert *et al.*, 1995; Carneiro, 1996).

### **5.3 Expressão Protéica, Oscilações citoplasmáticas de cálcio e Viabilidade Celular**

Muitos estudos demonstraram que a infusão de aminoácidos, principalmente os de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), melhoram o balanço de nitrogênio em músculo de humanos e roedores, tanto pelo aumento da síntese como pela diminuição da degradação protéica (Buse & Reid, 1975; Sapir & Walser, 1977; Li & Jefferson, 1978; Mitch *et al.*, 1981). O papel isolado da leucina na síntese protéica é contraditório. Alguns estudos indicam que a infusão apenas de leucina não estimula a síntese protéica, porém, quando esse mesmo aminoácido era injetado com glicose ou insulina, a síntese protéica aumentava (Preedy & Garlick, 1986; Garlick & Grant, 1988). Outros estudos mostraram o aumento da síntese protéica apenas pelo efeito da leucina, por exemplo, Anthony *et al.* (2002) demonstraram o aumento da síntese protéica, depois da administração oral de leucina em animais diabéticos. O aumento da síntese protéica causado pela leucina, depende da fosforilação de duas proteínas via mTOR: 1) 4E-BP1 que libera o fator de alongação eIF4E e da 2) S6K1 que fosforila outras proteínas importantes para a tradução como RPS26, eIF4B (Cutler *et al.*, 1999; Meijer & Sauerwein, 1999; Kimball & Jefferson, 2006). Baum *et al.* (2005) avaliaram a administração oral de leucina e de leucina combinada com carboidratos (glicose e sacarose) e observaram que quando a leucina era administrada sem carboidratos ela aumentava a liberação do eIF4E do 4E-BP1, sem alterar a atividade da PI3K, em contrapartida, quando a leucina era administrada em combinação com carboidratos, eles observavam além do aumento da liberação de eIF4E uma diminuição da atividade da PI3K. Xu *et al.* (2001) propuseram

ainda que os sinais mitocondriais gerados pela leucina também participavam do mecanismo pelo qual a leucina é capaz de ativar a mTOR/S6K1 e consequentemente a síntese protéica. Eles usaram um análogo não metabolizável da leucina, o BCH, e verificaram que ele não era capaz de ativar mTOR, ainda mais, utilizaram um inibidor de metabolismo, a azida sódica e verificaram o mesmo efeito. Recentemente, Drummond *et al.* (2008) demonstraram que a ativação da via mTOR/S6K1 e da síntese protéica pela insulina é dependente de aminoácidos tanto em pacientes normais quanto em pacientes com DM2. Sabendo do importante papel da leucina na síntese protéica, resolvemos avaliar seu efeito em proteínas envolvidas no processo de secreção de insulina e ainda mais, verificar se esse aminoácido era capaz de restaurar o prejuízo causado pela restrição protéica nos níveis de expressão de determinadas proteínas.

Alguns estudos mostraram que tanto glicose quanto agonistas colinérgicos são capazes de hidrolisar, via PLC, lipídeos de membrana (fosfoinositol-PI) e potencializar a secreção de insulina (Best & Malaisse, 1983; Zawalich & Zawalich, 1988). Kelley *et al.* (1995) demonstraram que carbacol e glicose ativam a PLC por vias diferentes, eles incubaram as ilhotas com carbacol e glicose e verificaram que houve sinergismo entre esses dois estímulos na hidrólise do PI. O mecanismo preciso da ativação da via PLC/PKC pela glicose ainda permanece obscuro (Warwar *et al.*, 2006). Mogami *et al.* (2003), demonstraram que apenas o influxo de  $Ca^{2+}$  pode gerar DAG, através da ativação de isoforma da PLC dependente de cálcio, culminando na ativação da PKC $\alpha$  e  $\theta$  em células INS-1. Também já foi descrito que altas concentrações de glicose induzem a translocação da PKC de compartimentos citossólicos para domínios da membrana plasmática (Ganesan *et al.*, 1990). O principal alvo do DAG é a PKC, que quando ativada é responsável pelo movimento celular e tráfico de vesículas, auxiliando no processo de secreção dos grânulos citoplasmáticos de insulina (Arbuzova *et al.*, 1998; Chakravarthy *et al.*, 1999). Outros estudos demonstraram que a ativação da via de sinalização PLC/PKC é importante na secreção de insulina estimulada por glicose, principalmente na segunda fase de resposta secretória (Zawalich, 1990). Investigando as diferenças na secreção dinâmica de insulina entre ratos e camundongos, esse mesmo grupo de pesquisa demonstrou que ausência da segunda fase de secreção em camundongos é devido à diminuição na expressão da PLC e quando essas ilhotas são estimuladas com carbacol há

uma restauração da segunda fase secretória (Zawalich *et al.*, 1995). Nossos resultados estão de acordo com esse estudo, pois a secreção dinâmica de insulina em resposta à glicose não mostra a segunda fase, porém, quando estimulamos as ilhotas com carbacol podemos observar a segunda fase. E mais, nos animais desnutridos que apresentam menor expressão de PKC, mesmo quando as ilhotas são estimuladas com carbacol, observamos que a segunda fase é de menor amplitude e que a suplementação com leucina pode melhorar o perfil dinâmico da secreção de insulina (**Fig.7 e 9**).

Viana *et al.* (1997) já havia demonstrado que a restrição protéico-calórica diminui a densidade do receptor M3 no hipocampo e gânglio basal de cérebros de ratos. Nossos resultados mostraram que restrição protéica também pode diminuir a expressão do receptor M3 em ilhotas de camundongos e que a leucina, através de seu papel na síntese protéica, restaura os níveis de expressão nos desnutridos. Como o receptor M3 pode desencadear a ativação de diversas outras vias intrínsecas, avaliamos também outras proteínas envolvidas na estimulação colinérgica e liberação de cálcio citoplasmático. A menor potencialização da secreção de insulina causada pelo carbacol nos animais desnutridos, pode ser explicada pela menor expressão do receptor M3 nas ilhotas desses animais. A restauração nos níveis de expressão desse receptor nos animais DL também explica a recuperação da secreção de insulina nos animais tratados com leucina (**Fig.12**).

Já foram descritas dez isoformas da enzima PKC em células  $\beta$  de ratos (Jones & Persaud, 1998; Nesher *et al.*, 2001). O grande número de isoformas, reguladores e substratos da PKC torna difícil definir com precisão a função de cada uma de suas isoenzimas. As isoformas de PKC podem ser divididas em três grandes grupos: das cPKCs ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ ) que são ativadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , DAG e ésteres de forbol, nPKCs ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , e  $\theta$ ) ativadas por DAG e ésteres de forbol, e PKCs atípicas ( $\zeta$  e  $\iota/\lambda$ ) que não são ativadas por nenhuma dessas substâncias (Nishizuka, 1995). A PKC $\alpha$  é uma isoforma clássica e a mais expressa em vários tipos celulares e está envolvida na potencialização da secreção de insulina causada pelo carbacol (Ishikawa *et al.*, 2005) e pela glicose (Warwar *et al.*, 2006) em ilhotas de ratos. Já foi descrito que ratos GK (modelo de diabetes não relacionado à obesidade) apresentam menor expressão dessa isoforma (Warwar *et al.*, 2006). Ferreira *et al.* (2003) demonstraram que a expressão de PKC $\alpha$  está diminuída em ratos desnutridos quando comparadas com o controle. Nossos resultados

corroboram os de Ferreira e mostram que a suplementação com leucina restaura seus níveis de expressão (**Fig.13**).

Outra proteína responsável pela potencialização da secreção de insulina é a PKA, ativada pelo AMPc produzido pela enzima Adenilato Ciclase (AC) (Flatt, 1996). A ativação clássica da AC se dá via subunidade estimulatória alfa de proteínas G ( $G_{sa}$ ) associadas a receptores de hormônios como o glucagon e o peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1). Alguns estudos demonstram a existência de isoformas de AC que também são ativadas pelo complexo  $Ca^{2+}$ /calmodulina quinase, sendo o  $Ca^{2+}$  proveniente do influxo iônico promovido pela abertura dos  $Ca(v)$  em consequência do metabolismo da glicose (Valverde *et al.*, 1979; Delmeire *et al.*, 2003). Essas isoformas se tornam, então, um ponto de convergência para a potencialização da secreção de insulina por hormônios (glucagon e GLP-1) e glicose que culminam na produção de AMPc e ativação da PKA. O ATP produzido pela glicose além de ter um papel central no mecanismo clássico de secreção de insulina envolvendo fechamento dos canais de potássio ATP-dependentes, também pode ser utilizado como substrato para a formação de AMPc e subsequente ativação das PKAs (Takahashi *et al.*, 1999). A PKA age na potencialização da secreção de insulina através da fosforilação do canal de cálcio sensível à voltagem, permitindo a entrada do íon na célula (Hughes & Ashcroft, 1992) e no processo de exocitose dos grânulos de insulina (Jones & Persaud, 1998). Outros estudos já haviam mostrado a redução em PKA nos animais desnutridos, corroborando nosso resultado (Ferreira *et al.*, 2004; Milanski *et al.*, 2005). A suplementação com leucina não influenciou significativamente a expressão dessa proteína, porém verificamos um aumento no grupo DL (**Fig.14**).

Outros estudos ainda mostraram interação entre PKA e PKC. A PKC pode ativar a adenilato ciclase, com consequente aumento do conteúdo intracelular de AMPc e ativação da PKA (Hughes & Ashcroft, 1992). Estudos mais recentes mostraram que PKA e PKC agem através da mesma via na sensibilização da maquinaria de exocitose ao  $Ca^{2+}$  em células INS-1 e células  $\beta$  de ratos (Wan *et al.*, 2004; Yang & Gillis, 2004).

Já se sabe há muito tempo que a habilidade das células  $\beta$  em secretar insulina, é dependente de cálcio extracelular (Curry *et al.*, 1968; Hales & Milner, 1968). Distúrbios

na regulação de cálcio e cálcio citoplasmático são características comuns em modelos animais que apresentam alterações na secreção de insulina. A captação de cálcio, induzida por glicose, está diminuída nas ilhotas de desnutridos indicando que defeitos na mobilização desse íon contribuem para as alterações secretórias (Carneiro, 1996; Latorraca *et al.*, 1998b; Latorraca *et al.*, 1999). Nossos resultados (**Fig.15**) indicam que a menor captação de cálcio e conseqüente menor secreção de insulina pelas ilhotas dos animais desnutridos pode ser explicada, pelo menos em parte, pela menor expressão desse canal na membrana plasmática dessas ilhotas. A Leucina pode atuar diretamente aumentando a expressão do canal de cálcio e indiretamente através da via colinérgica e da PKA, que alteram a permeabilidade das ilhotas ao íon cálcio. Arikath & Campbell (2003) observaram que o aumento da expressão da subunidade  $\beta 2$  do Ca voltagem dependente, em linhagens celulares neuronais, torna a inativação desse canal mais lenta, sugerindo uma maior mobilização desse íon. Levando em consideração a modulação da expressão protéica da subunidade  $\beta 2$  do Ca voltagem dependente pela dieta e pela leucina, resolvemos avaliar as oscilações de cálcio citoplasmático nesses animais frente à estimulação com glicose e carbacol. Nossos resultados sugerem que as ilhotas dos animais submetidos à restrição protéica mobilizam menor quantidade de íons cálcio tanto do meio extracelular quanto de estoques intracelulares e que a suplementação com leucina restaura esse prejuízo causado pela dieta (**Fig.19**). Resultados semelhantes também foram obtidos por Filiputti (2006) em ilhotas de animais submetidos ao mesmo protocolo de desnutrição e estimulada com glicose. Também já foi descrito na literatura que aminoácidos podem modular as oscilações citoplasmáticas de cálcio. Nesse caso, destacamos a leucina, que é capaz de disparar o aparecimento de ondas lentas de cálcio em ilhotas de camundongos, aumentando a mobilização desse íon (Martin & Soria, 1995).

Diversos estudos mostraram que a via da PI3K está envolvida no mecanismo de *feed-back* positivo da secreção de insulina (Alter & Wolf, 1995; Xu *et al.*, 1998; Aspinwall *et al.*, 2000). Também já foi descrito na literatura que a PI3K está envolvida com o movimento de cálcio em células  $\beta$  de camundongos e linhagens de células  $\beta$ TC3, liberando cálcio do retículo endoplasmático (Aspinwall *et al.*, 2000), e do seu possível papel no tráfego de canais de cálcio voltagem dependente para a membrana plasmática de

outros tipos celulares (Viard *et al.*, 1999; Viard *et al.*, 2004). Uma importante proteína da via da PI3K é a PKB ou AKT. Essa proteína tem um papel central em vias de transdução de sinais ativadas em resposta a fatores de crescimento ou insulina e contribui para diversas funções celulares como: metabolismo de nutrientes, crescimento celular, regulação da transcrição e sobrevivência celular (Brazil & Hemmings, 2001; Song *et al.*, 2005). Tuttle *et al.* (2001) demonstraram que camundongos transgênicos que superexpressavam a AKT em células  $\beta$  pancreáticas, apresentam maior proteção contra a indução de diabetes com estreptozotocina, aumento do tamanho e da massa de células  $\beta$ , aumento da sobrevivência sem alterar a neogênese e a taxa de replicação. Diversos estudos mostraram que a AKT protege a célula  $\beta$ , pois possui vários substratos anti-apoptóticos, entre eles a proteína Mdm2 que seqüestra e diminui os níveis da p53 (Mayo & Donner, 2001), a proteína XIAP que inibe a atividade de caspases (Dan *et al.*, 2004) e a BAD, que uma vez fosforilada pela AKT, não se liga à proteína anti-apoptótica Bcl2 (Chan *et al.*, 1999). Filiputti (2006) mostrou o mesmo perfil que o nosso resultado de expressão protéica (**Fig.16**), só que na expressão gênica da AKT, demonstrando que tanto a restrição protéica quanto a suplementação alteram a expressão dessa proteína. Nossos resultados mostraram que há influência da dieta e da Leu na expressão protéica tanto nos níveis de expressão da AKT total quanto da p-AKT (**Fig.16** e **Fig.17**). Observamos também que esses dois fatores modulam de forma mais expressiva a p-AKT e dessa maneira podemos sugerir que há modulação tanto da síntese quanto da ativação dessa proteína. Nossos resultados podem indicar que a via da PI3K está envolvida na modulação da secreção de insulina causada por dieta e leucina, mas não são conclusivos, pois a expressão e fosforilação da AKT podem ser influenciadas por outros fatores e sua total ativação requer apenas em parte a ativação da PI3K (Tremblay *et al.*, 2005).

Diversos estudos mostraram que a AKT exerce um importante papel na sobrevivência celular (Brazil & Hemmings, 2001). Sabendo que a desnutrição e o tratamento com leucina alteram a expressão dessa proteína, resolvemos avaliar a viabilidade celular das ilhotas desses animais e verificar uma possível relação com a expressão da AKT. O teste de MTS mede a formação de NADPH, mas pode ser usado como uma medida indireta de proliferação e sobrevivência celular. Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos, mas não podemos descartar um possível papel

modulador da AKT, uma vez que nosso experimento mostra fortes tendências de diminuição da viabilidade em animais D e uma recuperação no DL. Também já foi descrito na literatura que ilhotas de animais desnutridos apresentam função mitocondrial comprometida (Rasschaert *et al.*, 1995; Carneiro, 1996), podendo assim, influenciar nas medidas de viabilidade celular.

## Conclusão

## 6. CONCLUSÃO

Concluimos que a restrição protéica durante os estágios iniciais de vida induz diversas alterações nas ilhotas de camundongos que causam comprometimento de processos essenciais como secreção de insulina e síntese protéica. A Leu restaura parcial ou totalmente a secreção de insulina prejudicada nos animais desnutridos, pois proporciona maior aporte energético para a célula e mais importante, nossos resultados mostraram que a Leu estimula a síntese protéica e restaura os níveis de expressão de proteínas chaves do processo de secreção de insulina como o receptor M3, PKC, PKA, Ca $\beta$ 2, AKT e p-AKT nas ilhotas dos animais desnutridos, explicando a melhora na secreção de insulina encontrada nos animais DL.

## Referências Bibliográficas

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Bakare A, Taylor R, Gill GV & Alberti KG (1986) Tropical or malnutrition-related diabetes: a real syndrome? *Lancet* **1**, 1135-1138.

Ahren B (2000) Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* **43**, 393-410.

Alter CA & Wolf BA (1995) Identification of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in pancreatic islets and insulin-secreting beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 190-197.

Anthony JC, Reiter AK, Anthony TG, Crozier SJ, Lang CH, MacLean DA, Kimball SR & Jefferson LS (2002) Orally administered leucine enhances protein synthesis in skeletal muscle of diabetic rats in the absence of increases in 4E-BP1 or S6K1 phosphorylation. *Diabetes* **51**, 928-936.

Arantes VC, Reis MA, Latorraca MQ, Ferreira F, Stoppiglia LF, Carneiro EM & Boschero AC (2006) Palmitic acid increase levels of pancreatic duodenal homeobox-1 and p38/stress-activated protein kinase in islets from rats maintained on a low protein diet. *Br J Nutr* **96**, 1006-1012.

Arantes VC, Teixeira VP, Reis MA, Latorraca MQ, Leite AR, Carneiro EM, Yamada AT & Boschero AC (2002) Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. *J Nutr* **132**, 3030-3035.

Araujo EP, Amaral ME, Filiputti E, De Souza CT, Laurito TL, Augusto VD, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA & Carneiro EM (2004) Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Endocrinol* **181**, 25-38.

Araujo EP, Amaral ME, Souza CT, Bordin S, Ferreira F, Saad MJ, Boschero AC, Magalhaes EC & Velloso LA (2002) Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett* **531**, 437-442.

Arbuzova A, Murray D & McLaughlin S (1998) MARCKS, membranes, and calmodulin: kinetics of their interaction. *Biochim Biophys Acta* **1376**, 369-379.

Arikkath J & Campbell KP (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 298-307.

Ashcroft FM, Harrison DE & Ashcroft SJ (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* **312**, 446-448.

Ashcroft FM, Ashcroft SJ & Harrison DE (1987) Effects of 2-ketoisocaproate on insulin release and single potassium channel activity in dispersed rat pancreatic beta-cells. *J Physiol* **385**, 517-529.

Aspinwall CA, Qian WJ, Roper MG, Kulkarni RN, Kahn CR & Kennedy RT (2000) Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in insulin-stimulated insulin secretion in beta -cells. *J Biol Chem* **275**, 22331-22338.

Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K & Clark PM (1993) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* **36**, 62-67.

Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP & Fakler B (1998) PIP<sub>2</sub> and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science* **282**, 1141-1144.

Baum JI, O'Connor JC, Seyler JE, Anthony TG, Freund GG & Layman DK (2005) Leucine reduces the duration of insulin-induced PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E86-91.

Becker DJ (1983) The endocrine responses to protein calorie malnutrition. *Annu Rev Nutr* **3**, 187-212.

Bernal-Mizrachi E, Wen W, Stahlhut S, Welling CM & Permutt MA (2001) Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J Clin Invest* **108**, 1631-1638.

Bertram R, Smolen P, Sherman A, Mears D, Atwater I, Martin F & Soria B (1995) A role for calcium release-activated current (CRAC) in cholinergic modulation of electrical activity in pancreatic beta-cells. *Biophys J* **68**, 2323-2332.

Best L & Malaisse WJ (1983) Stimulation of phosphoinositide breakdown in rat pancreatic islets by glucose and carbamylcholine. *Biochem Biophys Res Commun* **116**, 9-16.

Blachier F, Mourtada A, Sener A & Malaisse WJ (1989) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Uptake of metabolized and nonmetabolized cationic amino acids by pancreatic islets. *Endocrinology* **124**, 134-141.

Bordin S, Boschero AC, Carneiro EM & Atwater I (1995) Ionic mechanisms involved in the regulation of insulin secretion by muscarinic agonists. *J Membr Biol* **148**, 177-184.

Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E & Atwater I (1995) Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M<sub>3</sub> muscarinic receptors. *Am J Physiol* **268**, E336-342.

Bowie MD (1964) Intravenous Glucose Tolerance in Kwashiorkor and Marasmus. *S Afr Med J* **38**, 328-329.

Branstrom R, Efendic S, Berggren PO & Larsson O (1998) Direct inhibition of the pancreatic beta-cell ATP-regulated potassium channel by alpha-ketoisocaproate. *J Biol Chem* **273**, 14113-14118.

Brazil DP & Hemmings BA (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* **26**, 657-664.

Briaud I, Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE & Rhodes CJ (2003) Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **52**, 974-983.

Brissova M, Shiota M, Nicholson WE, Gannon M, Knobel SM, Piston DW, Wright CV & Powers AC (2002) Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* **277**, 11225-11232.

Budohoski L, Challiss RA, Dubaniewicz A, Kaciuba-Uscilko H, Leighton B, Lozeman FJ, Nazar K, Newsholme EA & Porta S (1987) Effects of prolonged elevation of plasma adrenaline concentration in vivo on insulin-sensitivity in soleus muscle of the rat. *Biochem J* **244**, 655-660.

Buse MG & Reid SS (1975) Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest* **56**, 1250-1261.

Campbell GD & McNeill WG (1959) Diabetes in the tropics. *Br Med J* **2**, 633-634.

Carneiro EM (1996) Participação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^{+}$  no processo de acoplamento estímulo/secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos submetidos à dieta deficiente em proteína. tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

Chakravarthy B, Morley P & Whitfield J (1999)  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin and protein kinase Cs: a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. *Trends Neurosci* **22**, 12-16.

Chan TO, Rittenhouse SE & Tsichlis PN (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* **68**, 965-1014.

Cherif H, Reusens B, Dahri S & Remacle C (2001) A protein-restricted diet during pregnancy alters in vitro insulin secretion from islets of fetal Wistar rats. *J Nutr* **131**, 1555-1559.

Cook DL & Hales CN (1984) Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**, 271-273.

Cook JT, Levy JC, Page RC, Shaw JA, Hattersley AT & Turner RC (1993) Association of low birth weight with beta cell function in the adult first degree relatives of non-insulin dependent diabetic subjects. *Bmj* **306**, 302-306.

Crowther NJ, Cameron N, Trusler J & Gray IP (1998) Association between poor glucose tolerance and rapid post natal weight gain in seven-year-old children. *Diabetologia* **41**, 1163-1167.

Curry DL, Bennett LL & Grodsky GM (1968) Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Am J Physiol* **214**, 174-178.

Cutler NS, Heitman J & Cardenas ME (1999) TOR kinase homologs function in a signal transduction pathway that is conserved from yeast to mammals. *Mol Cell Endocrinol* **155**, 135-142.

Dabelea D, Pettitt DJ, Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH & Knowler WC (1999) Birth weight, type 2 diabetes, and insulin resistance in Pima Indian children and young adults. *Diabetes Care* **22**, 944-950.

Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C & Hoet JJ (1991) Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* **40 Suppl 2**, 115-120.

Dahri S, Reusens B, Remacle C & Hoet JJ (1995) Nutritional influences on pancreatic development and potential links with non-insulin-dependent diabetes. *Proc Nutr Soc* **54**, 345-356.

Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang HG, Tsang BK & Cheng JQ (2004) Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* **279**, 5405-5412.

de Barros Reis MA, Arantes VC, Cunha DA, Latorraca MQ, Toyama MH, Carneiro EM & Boschero AC (2008) Increased L-CPT-1 activity and altered gene expression in pancreatic islets of malnourished adult rats: a possible relationship between elevated free fatty acid levels and impaired insulin secretion. *J Nutr Biochem* **19**, 85-90.

De Feo P, Perriello G, Torlone E, Ventura MM, Fanelli C, Santeusanio F, Brunetti P, Gerich JE & Bolli GB (1989a) Contribution of cortisol to glucose counterregulation in humans. *Am J Physiol* **257**, E35-42.

De Feo P, Perriello G, Torlone E, Ventura MM, Santeusanio F, Brunetti P, Gerich JE & Bolli GB (1989b) Demonstration of a role for growth hormone in glucose counterregulation. *Am J Physiol* **256**, E835-843.

Delmeire D, Flamez D, Hinke SA, Cali JJ, Pipeleers D & Schuit F (2003) Type VIII adenylyl cyclase in rat beta cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1. *Diabetologia* **46**, 1383-1393.

Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC & Thomas G (2001) Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* **294**, 1102-1105.

Desai M, Crowther NJ, Ozanne SE, Lucas A & Hales CN (1995) Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans* **23**, 331-335.

Desai M, Byrne CD, Zhang J, Petry CJ, Lucas A & Hales CN (1997) Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed a protein-restricted diet. *Am J Physiol* **272**, G1083-1090.

Dixit PK & Kaung HL (1985) Rat pancreatic beta-cells in protein deficiency: a study involving morphometric analysis and alloxan effect. *J Nutr* **115**, 375-381.

Doumas BT, Watson WA & Biggs HG (1971) Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* **31**, 87-96.

Drummond MJ, Bell JA, Fujita S, Dreyer HC, Glynn EL, Volpi E & Rasmussen BB (2008) Amino acids are necessary for the insulin-induced activation of mTOR/S6K1 signaling and protein synthesis in healthy and insulin resistant human skeletal muscle. *Clin Nutr*.

Duttaroy A, Zimlikli CL, Gautam D, Cui Y, Mears D & Wess J (2004) Muscarinic stimulation of pancreatic insulin and glucagon release is abolished in m3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Diabetes* **53**, 1714-1720.

Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Jaddoe VW, Osmond C & Barker DJ (2002) Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia* **45**, 342-348.

Escriva F, Kergoat M, Bailbe D, Pascual-Leone AM & Portha B (1991) Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. *Diabetologia* **34**, 559-564.

Ferreira F, Barbosa HC, Stoppiglia LF, Delghingaro-Augusto V, Pereira EA, Boschero AC & Carneiro EM (2004) Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA $\alpha$  expression. *J Nutr* **134**, 63-67.

Ferreira F, Filiputti E, Arantes VC, Stoppiglia LF, Araujo EP, Delghingaro-Augusto V, Latorraca MQ, Toyama MH, Boschero AC & Carneiro EM (2003) Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase calpha expression. *J Nutr* **133**, 695-699.

Filiputti E (2003) Modulação colinérgica da secreção de insulina em presença de leucina em ilhotas de ratos submetidos à restrição proteica. tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas.

Filiputti E (2006) Regulação da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans de ratos submetidos à restrição proteica e suplementados com leucina. tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

Filiputti E, Ferreira F, Souza KL, Stoppiglia LF, Arantes VC, Boschero AC & Carneiro EM (2008) Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. *Life Sci* **82**, 542-548.

Flanagan DE, Moore VM, Godsland IF, Cockington RA, Robinson JS & Phillips DI (2000) Fetal growth and the physiological control of glucose tolerance in adults: a minimal model analysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E700-706.

Flatt PR (1996) Hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. In *Textbook of Diabetes*, pp. 9.1-9.7 [JCPaG Williams, editor]. Oxford: Blackwell.

Floyd JC, Jr., Fajans SS, Conn JW, Knopf RF & Rull J (1966) Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest* **45**, 1487-1502.

Franco-Obregon A, Wang HW & Clapham DE (2000) Distinct ion channel classes are expressed on the outer nuclear envelope of T- and B-lymphocyte cell lines. *Biophys J* **79**, 202-214.

Gagerman E, Idahl LA, Meissner HP & Taljedal IB (1978) Insulin release, cGMP, cAMP, and membrane potential in acetylcholine-stimulated islets. *Am J Physiol* **235**, E493-500.

Ganesan S, Calle R, Zawalich K, Smallwood JI, Zawalich WS & Rasmussen H (1990) Glucose-induced translocation of protein kinase C in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9893-9897.

Gao Z, Young RA, Li G, Najafi H, Buettger C, Sukumvanich SS, Wong RK, Wolf BA & Matschinsky FM (2003) Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* **144**, 1949-1957.

Gao ZY, Li G, Najafi H, Wolf BA & Matschinsky FM (1999) Glucose regulation of glutaminolysis and its role in insulin secretion. *Diabetes* **48**, 1535-1542.

Garcia MC, Hermans MP & Henquin JC (1988) Glucose-, calcium- and concentration-dependence of acetylcholine stimulation of insulin release and ionic fluxes in mouse islets. *Biochem J* **254**, 211-218.

Garlick PJ & Grant I (1988) Amino acid infusion increases the sensitivity of muscle protein synthesis in vivo to insulin. Effect of branched-chain amino acids. *Biochem J* **254**, 579-584.

Gautam D, Han SJ, Hamdan FF, Jeon J, Li B, Li JH, Cui Y, Mears D, Lu H, Deng C, Heard T & Wess J (2006) A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. *Cell Metab* **3**, 449-461.

Gavete ML, Martin MA, Alvarez C & Escriva F (2005) Maternal food restriction enhances insulin-induced GLUT-4 translocation and insulin signaling pathway in skeletal muscle from suckling rats. *Endocrinology* **146**, 3368-3378.

Georgakis GV & Younes A (2006) From Rapa Nui to rapamycin: targeting PI3K/Akt/mTOR for cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* **6**, 131-140.

Gilon P & Henquin JC (1993) Activation of muscarinic receptors increases the concentration of free Na<sup>+</sup> in mouse pancreatic B-cells. *FEBS Lett* **315**, 353-356.

Gilon P, Nenquin M & Henquin JC (1995) Muscarinic stimulation exerts both stimulatory and inhibitory effects on the concentration of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in the electrically excitable pancreatic B-cell. *Biochem J* **311 ( Pt 1)**, 259-267.

Hagiwara S, Fukuda J & Eaton DC (1974) Membrane currents carried by Ca, Sr, and Ba in barnacle muscle fiber during voltage clamp. *J Gen Physiol* **63**, 565-578.

Hales CN & Milner RD (1968) Cations and the secretion of insulin from rabbit pancreas in vitro. *J Physiol* **199**, 177-187.

Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C & Winter PD (1991) Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *Bmj* **303**, 1019-1022.

Hales CN & Barker DJ (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**, 595-601.

Hales CN & Barker DJ (2001) The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* **60**, 5-20.

Harmon JS, Gleason CE, Tanaka Y, Oseid EA, Hunter-Berger KK & Robertson RP (1999) In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression. *Diabetes* **48**, 1995-2000.

Henquin JC & Meissner HP (1981) Effects of amino acids on membrane potential and 86Rb<sup>+</sup> fluxes in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol* **240**, E245-252.

Henquin JC, Garcia MC, Bozem M, Hermans MP & Nenquin M (1988) Muscarinic control of pancreatic B cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium influx. *Endocrinology* **122**, 2134-2142.

Hermans MP, Schmeer W & Henquin JC (1987) Modulation of the effect of acetylcholine on insulin release by the membrane potential of B cells. *Endocrinology* **120**, 1765-1773.

Heywood WE, Mian N, Milla PJ & Lindley KJ (2004) Programming of defective rat pancreatic beta-cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods. *Clin Sci (Lond)* **107**, 37-45.

Huang KP (1989) The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci* **12**, 425-432.

Hughes SJ & Ashcroft SJ (1992) Cyclic AMP, protein phosphorylation and insulin secretion. In *Nutrient regulation of insulin secretion*, pp. 271-288 [P Flatt, editor]. London: Portland Press.

Iglesias-Barreira V, Ahn MT, Reusens B, Dahri S, Hoet JJ & Remacle C (1996) Pre- and postnatal low protein diet affect pancreatic islet blood flow and insulin release in adult rats. *Endocrinology* **137**, 3797-3801.

Iismaa TP, Kerr EA, Wilson JR, Carpenter L, Sims N & Biden TJ (2000) Quantitative and functional characterization of muscarinic receptor subtypes in insulin-secreting cell lines and rat pancreatic islets. *Diabetes* **49**, 392-398.

Ishikawa T, Iwasaki E, Kanatani K, Sugino F, Kaneko Y, Obara K & Nakayama K (2005) Involvement of novel protein kinase C isoforms in carbachol-stimulated insulin secretion from rat pancreatic islets. *Life Sci* **77**, 462-469.

Jones PM & Persaud SJ (1998) Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Endocr Rev* **19**, 429-461.

Takei M, Kelly RP, Ashcroft SJ & Ashcroft FM (1986) The ATP-sensitivity of K<sup>+</sup> channels in rat pancreatic B-cells is modulated by ADP. *FEBS Lett* **208**, 63-66.

Kar BC & Tripathy BB (1965) Observations on Type "J" Diabetes. *J Assoc Physicians India* **13**, 181-187.

Kelley GG, Zawulich KC & Zawulich WS (1995) Synergistic interaction of glucose and neurohumoral agonists to stimulate islet phosphoinositide hydrolysis. *Am J Physiol* **269**, E575-582.

Kimball SR & Jefferson LS (2006) New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *Am J Clin Nutr* **83**, 500S-507S.

Krebs M, Krssak M, Bernroider E, Anderwald C, Brehm A, Meyerspeer M, Nowotny P, Roth E, Waldhausl W & Roden M (2002) Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes* **51**, 599-605.

Lacy PE, Klein NJ & Fink CJ (1973) Effect of cytochalasin B on the biphasic release of insulin in perfused rat islets. *Endocrinology* **92**, 1458-1468.

Latorraca MQ, Carneiro EM, Boschero AC & Mello MA (1998a) Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. *Br J Nutr* **80**, 291-297.

Latorraca MQ, Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, Velloso LA, Saad MJ & Boschero AC (1998b) Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J Nutr* **128**, 1643-1649.

Latorraca MQ, Carneiro EM, Mello MA & Boschero AC (1999) Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with a diminished calcium uptake. *J Nutr Biochem* **10**, 37-43.

Law CM, Gordon GS, Shiell AW, Barker DJ & Hales CN (1995) Thinness at birth and glucose tolerance in seven-year-old children. *Diabet Med* **12**, 24-29.

Leon-Quinto T, Adnot P & Portha B (1997) Alteration of the counterregulatory hormones in the conscious rat after protein-energy restriction. *Diabetologia* **40**, 1028-1034.

Leon-Quinto T, Magnan C & Portha B (1998) Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology* **139**, 3382-3389.

Lernmark A (1974) The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* **10**, 431-438.

Levine LS, Wright PG & Marcus F (1983) Failure to secrete immunoreactive insulin by rats fed a low protein diet. *Acta Endocrinol (Copenh)* **102**, 240-245.

Lewis MI, Bodine SC, Kamangar N, Xu X, Da X & Fournier M (2006) Effect of severe short-term malnutrition on diaphragm muscle signal transduction pathways influencing protein turnover. *J Appl Physiol* **100**, 1799-1806.

Li C, Najafi H, Daikhin Y, Nissim IB, Collins HW, Yudkoff M, Matschinsky FM & Stanley CA (2003) Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. *J Biol Chem* **278**, 2853-2858.

- Li C, Buettger C, Kwagh J, Matter A, Daikhin Y, Nissim IB, Collins HW, Yudkoff M, Stanley CA & Matschinsky FM (2004) A signaling role of glutamine in insulin secretion. *J Biol Chem* **279**, 13393-13401.
- Li JB & Jefferson LS (1978) Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **544**, 351-359.
- Liu YJ & Gylfe E (1997) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in insulin-releasing pancreatic beta-cells. *Cell Calcium* **22**, 277-286.
- Lupien JR, Hirshman MF & Horton ES (1990) Effects of norepinephrine infusion on in vivo insulin sensitivity and responsiveness. *Am J Physiol* **259**, E210-215.
- Malaisse WJ, Carpinelli AR, Lebrun P, Herchuelz A & Sener A (1981) The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. IV. Ionic response to L-Leucine and L-Glutamine. *Pflugers Arch* **391**, 112-118.
- Malaisse WJ (1986) Stimulus-secretion coupling in the pancreatic B-cell: the cholinergic pathway for insulin release. *Diabetes Metab Rev* **2**, 243-259.
- Martin F & Soria B (1995) Amino acid-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in single mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol* **486 ( Pt 2)**, 361-371.
- Martin MA, Fernandez E, Pascual-Leone AM, Escriva F & Alvarez C (2004) Protein calorie restriction has opposite effects on glucose metabolism and insulin gene expression in fetal and adult rat endocrine pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E542-550.
- Mayo LD & Donner DB (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11598-11603.
- Meijer AJ & Sauerwein HP (1999) Amino acid-dependent signal transduction and insulin sensitivity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2**, 207-211.
- Milanski M, Arantes VC, Ferreira F, de Barros Reis MA, Carneiro EM, Boschero AC, Collares-Buzato CB & Latorraca MQ (2005) Low-protein diets reduce PKA $\alpha$  expression in islets from pregnant rats. *J Nutr* **135**, 1873-1878.
- Mitch WE, Walser M & Sapir DG (1981) Nitrogen sparing induced by leucine compared with that induced by its keto analogue, alpha-ketoisocaproate, in fasting obese man. *J Clin Invest* **67**, 553-562.
- Miura Y, Henquin JC & Gilon P (1997) Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores stimulates Ca<sup>2+</sup> entry in mouse pancreatic beta-cells by both direct and indirect mechanisms. *J Physiol* **503 ( Pt 2)**, 387-398.

- Mogami H, Zhang H, Suzuki Y, Urano T, Saito N, Kojima I & Petersen OH (2003) Decoding of short-lived Ca<sup>2+</sup> influx signals into long term substrate phosphorylation through activation of two distinct classes of protein kinase C. *J Biol Chem* **278**, 9896-9904.
- Mohan V, Mohan R, Susheela L, Snehalatha C, Bharani G, Mahajan VK, Ramachandran A, Viswanathan M & Kohner EM (1985) Tropical pancreatic diabetes in South India: heterogeneity in clinical and biochemical profile. *Diabetologia* **28**, 229-232.
- Moura AS (1984) Estudo em ratos do processo de adaptação a dietas com níveis variáveis de proteína com e sem restrição energética. tese de doutorado, USP.
- Nenquin M, Awouters P, Mathot F & Henquin JC (1984) Distinct effects of acetylcholine and glucose on <sup>45</sup>calcium and <sup>86</sup>rubidium efflux from mouse pancreatic islets. *FEBS Lett* **176**, 457-461.
- Nesher R, Warwar N, Khan A, Efendic S, Cerasi E & Kaiser N (2001) Defective stimulus-secretion coupling in islets of *Psammomys obesus*, an animal model for type 2 diabetes. *Diabetes* **50**, 308-314.
- Nielsen JH, Svensson C, Galsgaard ED, Moldrup A & Billestrup N (1999) Beta cell proliferation and growth factors. *J Mol Med* **77**, 62-66.
- Nishizuka Y (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J* **9**, 484-496.
- Oancea E & Meyer T (1998) Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* **95**, 307-318.
- Okitolonda W, Brichard SM & Henquin JC (1987) Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. *Diabetologia* **30**, 946-951.
- Okitolonda W, Brichard SM, Pottier AM & Henquin JC (1988) Influence of low- and high-protein diets on glucose homeostasis in the rat. *Br J Nutr* **60**, 509-516.
- Orci L (1985) The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. The Minkowski lecture 1973 revisited. *Diabetologia* **28**, 528-546.
- Ozanne SE, Wang CL, Coleman N & Smith GD (1996) Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol* **271**, E1128-1134.
- Ozanne SE, Nave BT, Wang CL, Shepherd PR, Prins J & Smith GD (1997) Poor fetal nutrition causes long-term changes in expression of insulin signaling components in adipocytes. *Am J Physiol* **273**, E46-51.

Palafox I, Sanchez-Andres JV, Sala S, Ferrer R & Soria B (1986) Muscarinic receptors and the control of glucose-induced electrical activity in the pancreatic beta-cell. *Adv Exp Med Biol* **211**, 351-358.

Panten U, Christians J, von Kriegstein E, Poser W & Hasselblatt A (1974) Studies on the mechanism of L-leucine-and alpha-ketoisocaproic acid-induced insulin release from perfused isolated pancreatic islets. *Diabetologia* **10**, 149-154.

Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ & Hill DJ (1999) A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* **140**, 4861-4873.

Picarel-Blanchot F, Alvarez C, Bailbe D, Pascual-Leone AM & Portha B (1995) Changes in insulin action and insulin secretion in the rat after dietary restriction early in life: influence of food restriction versus low-protein food restriction. *Metabolism* **44**, 1519-1526.

Picinato MC, Curi R, Machado UF & Carpinelli AR (1998) Soybean- and olive-oils-enriched diets increase insulin secretion to glucose stimulus in isolated pancreatic rat islets. *Physiol Behav* **65**, 289-294.

Preedy VR & Garlick PJ (1986) The response of muscle protein synthesis to nutrient intake in postabsorptive rats: the role of insulin and amino acids. *Biosci Rep* **6**, 177-183.

Quesada I, Rovira JM, Martin F, Roche E, Nadal A & Soria B (2002) Nuclear KATP channels trigger nuclear Ca(2+) transients that modulate nuclear function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9544-9549.

Quesada I, Martin F, Roche E & Soria B (2004) Nutrients induce different Ca(2+) signals in cytosol and nucleus in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S92-95.

Randle PJ, Priestman DA, Mistry SC & Halsall A (1994) Glucose fatty acid interactions and the regulation of glucose disposal. *J Cell Biochem* **55 Suppl**, 1-11.

Rao RH (1984) The role of undernutrition in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **7**, 595-601.

Rao RH (1988) Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence? *Endocr Rev* **9**, 67-87.

Rasschaert J, Reusens B, Dahri S, Sener A, Remacle C, Hoet JJ & Malaisse WJ (1995) Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. *Endocrinology* **136**, 2631-2634.

Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC, Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-1951.

Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, Boschero AC, Saad MJ & Velloso LA (1997) Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein-deficient rats. *J Nutr* **127**, 403-410.

Sako Y & Grill VE (1990) A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* **127**, 1580-1589.

Samols E, Tyler J & Marks V (1972) Glucagon-insulin inter-relationships. In *Glucagon Molecular Physiology. Clinical and therapeutic implications*, pp. 151-173 [PLaR Unger, editor]. Pergamon: Oxford.

Santos RM & Rojas E (1989) Muscarinic receptor modulation of glucose-induced electrical activity in mouse pancreatic B-cells. *FEBS Lett* **249**, 411-417.

Sapir DG & Walser M (1977) Nitrogen sparing induced early in starvation by infusion of branched-chain ketoacids. *Metabolism* **26**, 301-308.

Schwenk WF & Haymond MW (1987) Effects of leucine, isoleucine, or threonine infusion on leucine metabolism in humans. *Am J Physiol* **253**, E428-434.

Scott AM, Atwater I & Rojas E (1981) A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* **21**, 470-475.

Sener A & Malaisse WJ (1980) L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* **288**, 187-189.

Sherwood DJ, Dufresne SD, Markuns JF, Cheatham B, Moller DE, Aronson D & Goodyear LJ (1999) Differential regulation of MAP kinase, p70(S6K), and Akt by contraction and insulin in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **276**, E870-878.

Shyng SL & Nichols CG (1998) Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science* **282**, 1138-1141.

Snoeck A, Remacle C, Reusens B & Hoet JJ (1990) Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* **57**, 107-118.

Song G, Ouyang G & Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* **9**, 59-71.

Soria B, Quesada I, Ropero AB, Pertusa JA, Martin F & Nadal A (2004) Novel players in pancreatic islet signaling: from membrane receptors to nuclear channels. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S86-91.

Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD & McGarry JD (1997) The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest* **100**, 398-403.

Swenne I, Crace CJ & Milner RD (1987) 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.

Swenne I, Borg LA, Crace CJ & Schnell Landstrom A (1992) Persistent reduction of pancreatic beta-cell mass after a limited period of protein-energy malnutrition in the young rat. *Diabetologia* **35**, 939-945.

Takahashi N, Kadowaki T, Yazaki Y, Ellis-Davies GC, Miyashita Y & Kasai H (1999) Post-priming actions of ATP on Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 760-765.

Tang SH & Sharp GW (1997) Identification of muscarinic receptor subtypes in RINm5F cells by means of polymerase chain reaction, subcloning, and DNA sequencing. *Diabetes* **46**, 1419-1423.

Tremblay F & Marette A (2001) Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **276**, 38052-38060.

Tremblay F, Jacques H & Marette A (2005) Modulation of insulin action by dietary proteins and amino acids: role of the mammalian target of rapamycin nutrient sensing pathway. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **8**, 457-462.

Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, Lee JP, Koeberlein B, Furth EE, Polonsky KS, Naji A & Birnbaum MJ (2001) Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKB $\alpha$ . *Nat Med* **7**, 1133-1137.

Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J & Thomas G (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* **431**, 200-205.

Valverde I, Vandermeers A, Anjaneyulu R & Malaisse WJ (1979) Calmodulin activation of adenylate cyclase in pancreatic islets. *Science* **206**, 225-227.

Viana GS, Figueiredo RM & Bruno JA (1997) Effects of protein-energy malnutrition on muscarinic receptor density and acetylcholinesterase activity in rat brain. *Ann Nutr Metab* **41**, 52-59.

Viard P, Exner T, Maier U, Mironneau J, Nurnberg B & Macrez N (1999) Gbetagamma dimers stimulate vascular L-type Ca<sup>2+</sup> channels via phosphoinositide 3-kinase. *Faseb J* **13**, 685-694.

Viard P, Butcher AJ, Halet G, Davies A, Nurnberg B, Heblich F & Dolphin AC (2004) PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat Neurosci* **7**, 939-946.

Wade S, Bleiberg-Daniel F, Le Moullac B, Iyakaremye D, Biou D, Gauthier F & Lemonnier D (1988) Value of serum transthyretin measurements in the assessment of marginal protein-energy malnutrition in rats. *J Nutr* **118**, 1002-1010.

Wan QF, Dong Y, Yang H, Lou X, Ding J & Xu T (2004) Protein kinase activation increases insulin secretion by sensitizing the secretory machinery to Ca<sup>2+</sup>. *J Gen Physiol* **124**, 653-662.

Warwar N, Efendic S, Ostenson CG, Haber EP, Cerasi E & Neshier R (2006) Dynamics of glucose-induced localization of PKC isoenzymes in pancreatic beta-cells: diabetes-related changes in the GK rat. *Diabetes* **55**, 590-599.

Wokes F & Still BM (1942) The estimation of protein by the biuret and Greenberg methods. *Biochem J* **36**, 797-806.

Xu G, Marshall CA, Lin TA, Kwon G, Munivenkatappa RB, Hill JR, Lawrence JC, Jr. & McDaniel ML (1998) Insulin mediates glucose-stimulated phosphorylation of PHAS-I by pancreatic beta cells. An insulin-receptor mechanism for autoregulation of protein synthesis by translation. *J Biol Chem* **273**, 4485-4491.

Xu G, Kwon G, Cruz WS, Marshall CA & McDaniel ML (2001) Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mTOR-signaling pathway by pancreatic beta-cells. *Diabetes* **50**, 353-360.

Yajnik CS, Fall CH, Vaidya U, Pandit AN, Bavdekar A, Bhat DS, Osmond C, Hales CN & Barker DJ (1995) Fetal growth and glucose and insulin metabolism in four-year-old Indian children. *Diabet Med* **12**, 330-336.

Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX & Wess J (2001) Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* **410**, 207-212.

Yang J, Wong RK, Wang X, Moibi J, Hessner MJ, Greene S, Wu J, Sukumvanich S, Wolf BA & Gao Z (2004) Leucine culture reveals that ATP synthase functions as a fuel sensor in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **279**, 53915-53923.

Yang J, Wong RK, Park M, Wu J, Cook JR, York DA, Deng S, Markmann J, Najj A, Wolf BA & Gao Z (2006) Leucine regulation of glucokinase and ATP synthase sensitizes glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **55**, 193-201.

Yang Y & Gillis KD (2004) A highly Ca<sup>2+</sup>-sensitive pool of granules is regulated by glucose and protein kinases in insulin-secreting INS-1 cells. *J Gen Physiol* **124**, 641-651.

Zawalich WS & Zawalich KC (1988) Phosphoinositide hydrolysis and insulin release from isolated perfused rat islets. Studies with glucose. *Diabetes* **37**, 1294-1300.

Zawalich WS, Zawalich KC & Rasmussen H (1989) Cholinergic agonists prime the beta-cell to glucose stimulation. *Endocrinology* **125**, 2400-2406.

Zawalich W (1990) Multiple effects of increases in phosphoinositide hydrolysis on islets and their relationship to changing patterns of insulin secretion. *Diabetes Res* **13**, 101-111.

Zawalich WS, Zawalich KC & Kelley GG (1995) Regulation of insulin release by phospholipase C activation in mouse islets: differential effects of glucose and neurohumoral stimulation. *Endocrinology* **136**, 4903-4909.

Zhou YP & Grill VE (1994) Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* **93**, 870-876.

Zimmet P, Alberti KG & Shaw J (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782-787.

Zitt C, Zobel A, Obukhov AG, Harteneck C, Kalkbrenner F, Luckhoff A & Schultz G (1996) Cloning and functional expression of a human Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* **16**, 1189-1196.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado/doutorado intitulada: **Caracterização de mediadores envolvidos na regulação da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans de camundongos submetidos à restrição protéica e suplementados com leucina**

( ) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_

( x ) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1187-1). *27/05/2007*

( ) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº \_\_\_\_\_).

*Andressa Godoy Amaral*  
\_\_\_\_\_  
Aluno

*[Assinatura]*  
\_\_\_\_\_  
Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

*Anamaria Aparecida Guaraldo*  
\_\_\_\_\_  
Nome: Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO  
Função: Presidente  
Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/IB - UNICAMP