

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Fabiano Ferreira

Modulação colinérgica da secreção de insulina em ilhotas de ratos alimentados com dieta hipoprotéica.

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

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

2002

UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 30
Nº CHAMADA T/UNICAMP
F413m
V EX
TOMBO BCI 50591
PROC 16.837/02
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28/08/02
Nº CPD

CM00172450-7

BIB ID 253780

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

F413m **Ferreira, Fabiano**
Modulação colinérgica da secreção de insulina em ilhotas de
ratos alimentados com dieta hipoprotéica/Fabiano Ferreira.—
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

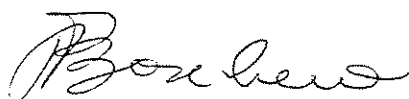
1.Desnutrição. 2.Insulina. 3.Pancreas. I. Carneiro, Everardo Magalhães.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 01/03/2002

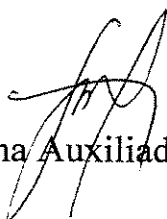
Banca examinadora:



Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro (Orientador)



Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero



Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

20029600

A todos os que me conhecem

**O mais sábio de todos os homens é aquele que
consegue viver todos os seus dias como se fosse seu
último dia.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares José Batista Ferreira, Edna Maria Ferreira, Alda Maria Ferreira e João Batista de Lima, pelo carinho e pela confiança em mim depositada.

À minha noiva Alessandra Carvalho Alves pelo carinho e compreensão.

Ao meu orientador Dr. Everardo Magalhães Carneiro que me ajudou muito profissionalmente e psicologicamente durante meu mestrado.

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

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

Aos colegas de laboratório Jairo, Fabrizio, Alesandro, Eliane, Esméria, Vanessa e Viviane.

Aos meus amigos Rafael, Reginaldo, Mosca e Bauru que me deram apoio em todos os momentos difíceis.

A minha amiga Tatiane pela paciência e pela enorme colaboração na elaboração final deste trabalho.

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

A CAPES, FAPESP e CNPQ pelo apoio financeiro .

Ao meu tio José Batista Ferreira,

Dedico este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Desnutrição e Diabetes	2
1.2 A secreção de Insulina	6
1.3 Estimulação colinérgica e secreção de insulina	7
1.5 Proteína quinase C	10
2. OBJETIVO	12
2.1 Objetivos específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Animais e Dietas	15

3.2 Avaliação do estado nutricional	19
3.3 Avaliação da secreção de insulina e quantificação das enzimas	21
3.4 Procedimento estatístico	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Avaliação do estado nutricional dos animais	32
4.2 Efeito do carbacol e do PMA sobre a secreção de insulina	36
5. DISCUSSÃO	53
5.1 - Modelo experimental e Parâmetros Bioquímicos	54
5.2 Secreção de insulina, estímulos colinérgicos e efluxo de cálcio	56
6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICE	81

RESUMO

Sabe-se que 50% da insulina secretada no período pós-prandial imediato depende da estimulação colinérgica e que no diabetes tipo 2, a fase rápida da secreção de insulina é a primeira a desaparecer. Ilhotas de ratos desnutridos também apresentam perfil de secreção de insulina sem o padrão bifásico. Até o momento, pouco se sabe a respeito da regulação autonômica, especialmente da modulação colinérgica da secreção de insulina, em ilhotas de Langerhans de ratos submetidos à restrição protéica.

Assim, o presente projeto tem como objetivo estudar o efeito da restrição protéica sobre a modulação colinérgica da secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, um grupo controle tratado com dieta normoprotéica (NP) (17%) e outro grupo desnutrido tratado com dieta hipoprotéica (LP) (6%). Após dois meses de desnutrição os animais foram sacrificados para o início dos experimentos.

Nossos resultados indicaram que a dieta hipoprotéica induz uma diminuição na massa corpórea dos animais. A albuminemia está diminuída no grupo tratado com dieta hipoprotéica. O grupo LP mostrou níveis de ácidos graxos livres aumentados no plasma e redução dos níveis de proteínas totais em relação ao grupo NP, caracterizando o quadro de desnutrição. A insulinemia está reduzida nos animais LP e a glicemia mantida, sugerindo uma maior sensibilidade dos animais LP ao hormônio.

A resposta secretória de insulina pelas ilhotas LP foi menor que a resposta secretória das ilhotas NP, quando estimuladas com o agonista muscarínico carbacol (CCh) e o forbol éster (PMA) em presença glicose (G). A curva dose resposta para o carbacol mostrou que

as ilhotas de ratos submetidos a restrição protéica são menos sensíveis que as ilhotas dos animais controle (LP $EC_{50} = 4.64 \pm 0.98$ e NP $EC_{50} = 2.15 \pm 0.70$ ($p < 0.05$)).

Quando as ilhotas foram estimuladas com PMA (200 nM) the increased in insulin secretion was higher in NP islets (3.04 fold for 8.3 mM of G and 1.50 fold for 16.7 mM of G) ($p < 0.05$).

A monitoração do efluxo de cálcio mostrou um maior efluxo de cálcio nas ilhotas de animais LP estimuladas com CCh e PMA em presença de glicose. A técnica de imunohistoquímica, mostrou uma diminuição na quantidade da proteína quinase C alfa (PKC α) que foi confirmada utilizando-se a técnica de Western Blotting, onde encontramos PKC α e fosfolipase C beta1 (PLC β 1) diminuídas em ilhotas isoladas de ratos LP ($p < 0.05$).

O RT-PCR mostrou uma diminuição na quantidade de mRNA para a enzima PKC α , o que nos sugeriu uma possível relação entre a restrição protéica a qual o animal foi submetido e alterações na transcrição de genes que codificam enzimas relacionadas com o processo secretório estimulado com glicose e potencializadas com CCh.

Até o momento podemos concluir que, a alteração no conteúdo destas enzimas neste modelo experimental permite explicar, pelo menos em parte, a pobre resposta secretória encontrada frente a G, e a associação de CCh e PMA. Mais ainda, a restrição protéica efetuada no período pós desmame poderia estar induzindo modificações importantes em enzimas envolvidas com a transdução de sinais no sistema colinérgico da ilhota, repercutindo na fase adulta do animal.

ABSTRACT

We studied the effects of carbamylcholine (CCh) and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), in insulin secretion of isolated Langerhans islets of male Wistar rats maintained with normal protein diet (17% of protein =NP) or low protein diet (6% of protein =LP). Islets isolated by collagenase digestion of pancreata, were incubated (1h) in Krebs medium with 8.3 mM or 16.7 mM of glucose (G), with or without CCh and PMA. The insulin content of media was available by radioimmunoassay. Concentrations of CCh (0,1-1000 μ M) increased insulin secretion in both groups. Stimulation with CCh shifted the LP dose-response curve to the right (LP EC_{50} = 4.64 ± 0.98 and NP EC_{50} = 2.15 ± 0.70) ($p < 0.05$). When the islets were stimulated with PMA (200 η M) the increased in insulin secretion was higher in NP islets (3.04 fold for 8.3 mM of G and 1.50 fold for 16.7 mM of G) ($p < 0.05$). Immunocytochemical showed a decrease in PKC α content in LP islets and Western blot analysis revealed that PKC α and PLC β 1 expression in LP isolated rat islets, after 2.5 h of incubation in 8.3 mM glucose media, were lower than NP ($p < 0.05$) and RT-PCR showed a decrease in mRNA levels to PKC α ($p < 0.05$).

Low protein intake is associated with a lowered PKC α and PLC β 1 expression in Langerhans islets. This alteration may be one factor involved in reduced insulin secretion by LP animals isolated islets, when stimulated with CCh and PMA in presence of glucose.

Keywords: Carbamylcholine; Islets; Insulin; Low protein diet; PMA; PKC

LISTA DE ABREVIATURAS

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

^{125}I – Isótopo do Iodo

^{45}Ca – Isótopo do Cálcio

AC - Adenilato ciclase

AMP_c - Monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA - Análise de Variância

ATP - Trifosfato de adenosina

B – Célula beta

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

CCh – Carbacol

DAG - Diacilglicerol

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

G - Glicose

IP3 - 1,4,5 inositol trifosfato

K^+ - Potássio

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

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

KOH - Hidróxido de potássio

LP – Animal Hipoprotéico

M3 - Receptor muscarínico subtipo M3

MLCK - Quinase da cadeia leve da miosina.

Na_2SO_4 - Sulfato de sódio.

NP – Animal Normoprotéico

PKA - Proteína quinase A

$PKC\alpha$ - Proteína quinase C alfa

PLC - Fosfolipase C

PLC β 1 – Fosfolipase C beta 1

PMA – Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

SDS - Duodecil sulfato de sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Massa corpórea dos animais NP e LP.

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

Figura 2 - Secreção estática de insulina em presença de diferentes concentrações de CCh (0,1-1000 μ M).

Figura 3A - Secreção dinâmica de insulina em presença de 8.3 mM de G e CCh (100 μ M).

Figura 3B - Área sob as curvas da Figura 3A.

Figura 4A - Efluxo fracional de cálcio em presença de 8.3 mM de G e CCh (100 μ M).

Figura 4B - Área sob as curvas da Figura 4A.

Figura 5A - Secreção dinâmica de insulina em presença de 16.7 mM de G e CCh (100 μ M).

Figura 5B - Área sob as curvas da Figura 5A.

Figura 6A - Efluxo fracional de cálcio em presença de 16.7 mM de G e CCh (100 μ M).

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

Figura 7A - Secreção dinâmica de insulina em presença de 8.3 mM de G, PMA (100nM) e CCh (100 μ M).

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

Figura 8A - Efluxo fracional de cálcio em presença de 8. mM de G, PMA (100nM) e CCh (100 μ M).

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

Figuras 9A e 9B- Secreção estática de insulina em presença de 2.8 mM e 8.3 mM e 16.7 mM de G juntamente com PMA (200nM).

Figuras 10A e 10B- Imunohistoquímica de pâncreas mostrando a enzima PKC α em ilhota proveniente de animal NP e LP.

Figura 11 - Western blotting da enzima PKC α .

Figura 12A e 12 B – RT-PCR da enzima PKC α e RT-PCR do vírus PVX.

Figura 13 - Western blotting da enzima PLC β 1.

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Parâmetros bioquímicos dos animais NP e LP.

Tabela II – Primers utilizados nos RT-PCRs.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição das dietas

Quadro 2 - Mistura de Vitaminas

Quadro 3 - Mistura de minerais

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Desnutrição e Diabetes

Desde a antiguidade reconhece-se o papel do hábito alimentar no desenvolvimento do diabetes mellitus. A desnutrição é um problema em todas as populações do mundo, onde crianças com baixo peso ao nascer correspondem a 15% do total da taxa de nascimento (DAHRI et al., 1991).

Na América Latina, em nove países onde foi efetuado inquérito populacional, a desnutrição foi um dos fatores responsáveis pela elevada mortalidade em crianças abaixo de 5 anos de idade (ANGELIS, 1977).

SHILS, OLSON & SHIKE (1994) descreveram que deficiências protéicas e energéticas normalmente ocorrem juntas, embora possa haver a predominância de uma sobre a outra. Quando se manifestam de forma severa, podem desencadear síndromes clínicas denominadas “ Kwashiorkor ” e “ Marasmo ”. Kwashiorkor é resultante de ingestão insuficiente de proteínas mas quantidades de carboidratos e de gorduras adequadas , e o marasmo é resultante de deficiência energética (NEWSHOLME & LEECH, 1984).

Tradicionalmente, a redução do peso e a baixa ingestão de energia estão associados a uma menor incidência e prevalência do diabetes. Nos países desenvolvidos, o sedentarismo associado à alimentação hipercalórica, pobre em fibras e rica em proteínas, gorduras saturadas e carboidratos simples, têm contribuído para o rápido aumento do desenvolvimento do diabetes mellitus do tipo 2 (RAO, 1988). Esta é, geralmente, acompanhada de obesidade, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e resistência à

insulina. O conjunto dessas anomalias foi designada de Síndrome X” (ZAVARONI et al., 1994) e sua etiopatogenia permanece desconhecida.

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

Menos freqüente e menos estudado do que o diabetes do tipo 2, o diabetes mellitus associado à desnutrição tem recebido maior atenção nos últimos anos devido ao aumento da sua incidência em algumas populações vítimas da fome em países subdesenvolvidos (RAO, 1988). As evidências de que a desnutrição pode ser diabetogênica vêm de estudos que mostram intolerância à glicose, insulinopenia e resistência à insulina em animais (HEARD & TURNER, 1967; SWENNE, CRACE & MILNER et al., 1987) e em seres humanos desnutridos (COOK 1967; BECKER et al. 1971; SMITH et al., 1975). Duas variações da síndrome diabética têm sido associadas à desnutrição crônica: 1) diabetes do tipo J, semelhante ao diabetes tipo 1 pelo seu início abrupto e em uma idade bastante precoce, caracterizado por deficiência de insulina, resistência periférica a esse hormônio e ausência de cetose; 2) diabetes pancreático tropical, presente em indivíduos severamente

desnutridos, acompanhado por sinais de pancreatite, com macrocalcificações pancreáticas e falência na produção de insulina (RAO, 1988).

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

Nos últimos anos temos estudado as alterações morfológicas e funcionais das ilhotas pancreáticas em modelos de desnutrição pré e pós-natal (CARNEIRO et al., 1995; LATORRACA et al., 1998a, b) e observamos que a restrição protéica determina a redução do peso absoluto mas não do peso relativo do pâncreas (LATORRACA et al., 1998a). Quanto à morfologia, verificamos células beta com volume reduzido e com número menor de grânulos, vários dos quais imaturos. Observamos ainda, células beta com degenerações mitocondriais e com indícios de permeabilidade celular diminuída (CARNEIRO, 1996). Ao avaliarmos a capacidade funcional das ilhotas de ratos desnutridos, observamos comprometimento da secreção de insulina estimulada por aminoácidos; perda do padrão bifásico de secreção; sensibilidade à glicose diminuída (CARNEIRO et al., 1995). Frente a diferentes concentrações de glicose, essas ilhotas apresentaram captação de ^{45}Ca menor do que as ilhotas controle (Latorraca et al., 1999). Portanto, defeito na mobilização do íon Ca^{2+} parece contribuir para as alterações secretórias verificadas em ilhotas de ratos desnutridos (CARNEIRO et al., 1995; LATORRACA et al., 1998b).

Curiosamente, algumas anormalidades observadas no organismo desnutrido, tais como redução do volume das ilhotas, atrofia e perda de granulação das células beta, insensibilidade das ilhotas à glicose e alteração da cinética secretória, são similares às aquelas observadas no diabético do tipo 2 (GEPTS & LECOMPT 1981; GRODSKY, 1996; LEAHY, 1996).

Um estudo mais profundo é necessário para o conhecimento dos mecanismos envolvidos no comprometimento da secreção insulínica da célula beta pancreática na desnutrição. É provável que, a exemplo do que ocorre em modelos animais de diabetes tipo 2, alterações ultraestruturais na inervação da célula beta (DIANI, PETERSON & GILCHRIST et al., 1983), nos níveis de neuropeptídeos (BAILEY & FLATT, 1988), ou na ação de neurotransmissores, como a acetilcolina (HOLST, 1992), contribuam para a redução da secreção de insulina nas ilhotas de animais desnutridos.

Há relatos de modificações no sistema nervoso autônomo com alteração da modulação simpática e parassimpática em ratos que receberam dieta hipoprotéica. Animais submetidos a este tipo de dieta apresentaram impulsos parassimpáticos diminuídos e simpáticos aumentados, acarretando uma elevação nos níveis de catecolaminas na circulação e possivelmente uma diminuição na estimulação colinérgica envolvida na potencialização da secreção de insulina (TRINDAD, CHRISTOPHER & BERNARD, 1998).

Com a estimulação simpática exacerbada em ratos desnutridos, altos níveis de catecolaminas estariam circulantes atuando nos seus receptores específicos na célula beta, diminuindo a secreção de insulina (TRINDAD, CHRISTOPHER & BERNARD, 1998). Esta característica pode ser também observada em pacientes com diabetes tipo 2 (CHRISTENSEN, 1979).

1.2 - A Secreção de Insulina

As células beta respondem positivamente, secretando insulina, a mudanças na glicose extracelular, ativadores da fosfolipase-C (acetilcolina e colecistoquinina) e ativadores da adenilato ciclase (Glucagon e GIP) (HADESCOV, 1980; WOLLHEIM & SHARP, 1981; PRENTKI & MATSCHINSKY, 1987).

A secreção de insulina estimulada por glicose inicia-se com o reconhecimento e entrada da glicose na célula via GLUT2 e subsequente fosforilação da glicose pela enzima hexoquinase IV. Após fosforilação a glicose é clivada na glicólise e os compostos formados vão para a mitocôndria onde vão ser utilizados no ciclo de Krebs e consequentemente na cadeia fosforilativa para a geração de ATP. A diferença na relação ATP/ADP leva à redução da condutância ao K^+ e este evento provoca um acúmulo relativo do referido cátion nas células beta, com consequente despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca^{2+} (L) sensíveis a voltagem. O influxo de Ca^{2+} e o aumento do Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) ativa a maquinaria exocitótica, finalizando com a migração das vesículas armazenadoras de insulina em direção à membrana e subsequente extrusão do conteúdo granular para o líquido intersticial (HADESCOV, 1980; WOLLHEIM & SHARP, 1981; SUTTER, 1982; PETERSEN & FINDLAY, 1987; GRODSKY, 1989).

Um efeito secundário da elevação do $[Ca^{2+}]_i$ é a estimulação da adenilato ciclase (AC) e da fosfolipase C (PLC) que podem ser diretamente ativadas por receptores de membrana específicos para hormônios (FLATT, 1996), e gerar AMP_c e DAG ativadores da PKA e PKC, respectivamente.

1.3 – Estimulação colinérgica da secreção de insulina

Aumento na secreção de insulina estimulada pela via autonômica ou pela via endócrina induzida por mecanismos sensoriais e não pela absorção dos nutrientes são denominadas respostas cefálicas da secreção de insulina. Estas respostas são divididas em três etapas: 1- Sensorial (olfato, gustação, visão, e estímulos mecânicos); 2- Integração dos sinais aferentes (hipotálamo Ventro-Medial); 3- Eferente (impulsos nervosos) que vão culminar com a liberação de neurotransmissores, incluindo a acetilcolina (POWLEY, 1977). A quantidade de insulina secretada na fase cefálica é muito pequena (1-3% do total de insulina secretada após a ingestão dos alimentos) (TEFF & ENGELMAN, 1996). Apesar da quantidade de insulina secretada na fase cefálica ser muito pequena é de extrema importância fisiológica, uma vez que ratos desnervados tratados com pequenas quantidades de insulina imediatamente após administração oral de glicose tiveram sua tolerância a glicose restaurada (BERTHOUD et al., 1981).

Devido a grande importância da inervação das ilhotas na tolerância à glicose, vários estudos foram realizados demonstrando que a acetilcolina, na presença de concentrações sublimiáres de glicose, pode despolarizar a membrana da célula beta e iniciar a atividade elétrica que culmina com a secreção de insulina. Porém, esse efeito sobre a atividade elétrica foi observado mediante a despolarização prévia não só por glicose como também por uma variedade de agentes estimulatórios (GAGERMAN et al., 1978; COOK, CRILL & PORTE, 1981; HERMANS, SCHMEER & HENQUIN, 1986; SANTOS & ROJAS, 1989). Três mecanismos iônicos foram propostos para explicar a despolarização induzida pela estimulação muscarínica: 1) aumento da permeabilidade ao Na^+ (HENQUIN et al.,

1988); 2) aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} ; 3) redução da permeabilidade ao K^{+} (SANTOS & ROJAS, 1989).

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

O canal $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ exerce papel fundamental na manutenção do potencial de repouso de célula beta (ASHCROFT; HARISON & ASHCROFT, 1984; ASHCROFT, 1988). Este canal é bloqueado por diferentes substâncias desencadeadoras e/ou potencializadoras da secreção de insulina, tais como: glicose, gliceraldeído, aminoácidos, metabólitos intermediário do ciclo de Krebs, anestésicos, quinina, sulfoniluréias, proteínas quinases, fosfatases, proteína G e por neurotransmissores tais como a acetilcolina (BOSCHERO et al. 1990; SENER et al. 1990; JONES, PERSUAD & HOWELL, 1991; BOYD et al. 1991, FREDHOLM et al., 1991; CATERRAL & EPSTEIN, 1992; CATERRAL, 1995).

Os canais de K^{+}_{Ca} são dependentes da variação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e do potencial de membrana (MARTY, 1981; HUNTER et al. 1984; MORRIS, GALLACHER & LEE, 1986). No entanto, não participam da modulação do potencial de membrana induzido por glicose (PETERSEN & FINDLAY 1987; KUKULJAN, GONÇALVES & ATWATER, 1991), mas quando estimulados pela acetilcolina parecem exercer função importante na repolarização celular (BORDIN et al., 1995).

Os fluxos de Ca^{2+} são regulados por dois tipos de canais: um canal T que é ativado entre -50 a -40 mV, sendo insensível às diidropiridinas, cujo significado fisiológico ainda

permanece desconhecido (MCCLESKEY et al., 1986; NOWYCKY, FOX, TSIEN, 1985). Um outro, chamado canal de Ca^{2+} -dependente da voltagem ou L, é ativado em potencial de membrana entre -70 a -50 mV e se caracteriza por ser sensível as diidropiridinas. Esses canais podem ser modulados pelo próprio aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, agindo, assim, como um sinal para inativação dos mesmos. Essa autorregulação é singular para esses canais, e pode constituir-se em importante controle da atividade elétrica da membrana e da secreção de insulina quando estimulada por glicose (CHAY, 1987).

O influxo de Ca^{2+} extracelular parece ser a fonte principal do íon no aumento da concentração e atividade citosólica de Ca^{2+} . Entretanto, a liberação de Ca^{2+} por frações subcelulares, essencialmente o retículo endoplasmático, tem papel importante na atividade secretória da célula beta. A estimulação muscarínica promove um substancial aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Essa resposta foi observada em estudos com ^{45}Ca (NENQUIN et al. 1984, MATHIAS et al. 1985) e pela quantificação do Ca^{2+} livre com indicadores fluorescentes (GRAPENGIESSER, GYLFE & HELMAN, 1989). O aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por acetilcolina resulta da formação de IP_3 , que age como mensageiro intracelular mobilizando o Ca^{2+} de estoques não mitocôndriais. A saída de Ca^{2+} de estoques intracelulares induzida por agentes colinérgicos não é, entretanto, suficiente para estimular a exocitose dos grânulos de insulina, visto que a secreção é abolida na ausência de Ca^{2+} extracelular (WOLLHEIN & SHARP, 1980). O IP_3 e outros segundos mensageiros como AMPc, proteínas quinases e proteínas G também modulam os canais de Ca^{2+} , contribuindo para a amplificação da secreção de insulina (RAJAN, HILL & BOYD, 1989; ZAWALICH, 1988; BROWN & BIRNBAUMER, 1988).

O carbacol como um homólogo estrutural da acetilcolina, pode se ligar a receptores muscarínicos (M_3 principalmente) existentes nas células beta e exercer efeitos similares à

acetilcolina. Após a ligação da droga nos receptores muscarínicos da célula beta a respectiva proteína G vai ser ativada, e esta última, que tem a capacidade de clivar GTP, libera uma de suas três subunidades que por sua vez vai estimular a PLC. A PLC ativada hidrolisa fosfolipídios de membrana liberando DAG e IP_3 . O DAG permanece na membrana e o IP_3 liberado é responsável pela mobilização de íons cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma, estes íons ligam-se ao DAG, um complexo essencial para a ativação da PKC (DAG-cálcio-fosfatidilserina) é então formado (HUANG, 1989). A PKC ativada, fosforila elementos fundamentais na exocitose dos grânulos de insulina aumentando a liberação do conteúdo granular para o meio extracelular.

1.4 - Proteína quinase C

As PKCs são distribuídas em diversos tecidos animais, mas especialmente enriquecida no tecido nervoso, pois estão envolvidas na liberação de neurotransmissores e na plasticidade neural. Na célula beta podemos encontrar diversas isoformas de PKCs, dentre elas as dependentes e independentes de cálcio. Essas enzimas possuem sítios distintos de autofosforilação e são distinguidas por anticorpos específicos para cada enzima (HUANG, 1989).

A família das PKCs consiste em aproximadamente 12 diferentes polipeptídios, indicados pelos símbolos: α , βI , βII , γ , δ , ϵ , ξ , η , θ , ι , λ e μ . Estas diferentes isoformas podem possuir atividades biológicas distintas dependendo da sua estrutura e de seus ativadores.

A divisão da família das PKCs está baseada na estrutura primária de seus respectivos polipeptídios. A PKC é responsável por uma variedade de respostas celulares, incluindo a secreção de insulina, iniciadas pela fosforilação de resíduos de serina e treonina (GARRETT & CHARLES, 1995). A maior parte das isoformas de PKCs tem peso molecular de aproximadamente 80 KDa. A maioria das isoformas PKCs possuem pelo menos algumas regiões conservadas e também algumas regiões variáveis distribuídas em dois domínios, o regulatório e o catalítico.

As regiões conservadas são responsáveis pela ligação de ativadores, dentre eles o Ca^{++} (região C2), DAG e TPA (região C1). A região C3, presente em todos os isótipos de PKC, é responsável pela ligação com o ATP.

Algumas destas enzimas podem ser estimuladas por ésteres de forbol (PMA), hormônios, fatores de crescimento e neurotransmissores. As vias de sinalização envolvidas no aumento os níveis de Ca^{+2} e DAG parecem estar implicadas na ativação de diversas isoformas de PKC. A desnutrição pode estar relacionada com alterações no conteúdo de enzimas, incluindo as PKCs. Estas enzimas podem ter sua atividade alterada em diversos órgãos de roedores submetidos a desnutrição (BANSAL ET AL., 1996; NAIR et al., 1995; KATHAYAT et al., 1997).

Diante disto, a interação restrição protéica e modulação colinérgica da secreção de insulina deve ser considerada um importante alvo de estudo, dando ênfase a alterações de enzimas envolvidas na secreção de insulina estimulada com glicose e potencializada com CCh.

II –OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

Trabalhos anteriores de nosso laboratório e dados da literatura demonstraram redução da secreção de insulina induzida por glicose em ilhotas de ratos submetidos a restrição protéica. Com bases nestes trabalhos, avaliamos a modulação colinérgica da secreção de insulina neste modelo de desnutrição, bem como as enzimas envolvidas na cascata de eventos pós-ativação dos receptores muscarínicos.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ♣ Verificar o crescimento dos animais LP e NP.
- ♣ Verificar os parâmetros bioquímicos dos animais LP e NP.
- ♣ Verificar a secreção de insulina em presença de CCh e PMA.
- ♣ Verificar o efluxo de cálcio em ilhotas NP e LP.
- ♣ Verificar a expressão da PKC α e da PLC β 1 em ilhotas LP e NP.
- ♣ Verificar a transcrição do gene que codifica a enzima PKC α .

III – MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais e dieta:

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

- a) **Controle (normoprotéico):** ratos alimentados dos 28 dias até a idade adulta (90dias) com dieta contendo 17% de proteína.
- b) **Desnutridos (hipoprotéico):** ratos alimentados dos 28 dias até a idade adulta (90dias) com dieta contendo 6% de proteína.

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

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

Quadro 1 - Composição das dietas

Ingredientes	Normoprotéica	Hipoprotéica
	(17% de proteína) g/Kg	(6% proteína) g/Kg
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 da quantidade de proteína desejada.

** Composição detalhada dada por REEVES, NILSEN & FAHEY, 1993.

Quadro 2 - MISTURA DE VITAMINAS (AIN-93G-VX)

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

Quadro 3 - MISTURA DE MINERAIS (AIN-93G-MX)

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

3.2 - Avaliação do estado nutricional

Um grupo de ratos foi sacrificado por decapitação e o sangue coletado em tubos de vidro sem anticoagulante. O soro foi separado por centrifugação a 700 rpm durante 15 minutos e parte foi armazenado a -20°C para posterior determinação de glicose, proteínas totais, albumina (DOUMAS, WATSON & BIGGS, 1971) e mais alguns parâmetros bioquímicos.

3.2.1 - Glicose e Proteína

O soro dos ratos foi coletado e a concentração de proteínas e glicose foram determinados usando métodos enzimáticos colorimétricos (Merck – Diagnostic Darmstadt Germany).

3.2.2 - Insulina Sérica

Os animais foram sacrificados por decapitação, recolhendo-se o sangue em tubos de plástico. O soro foi separado por centrifugação a 700 rpm durante 15 min. Foram armazenados 3mL a -20°C para posterior determinação de insulina por radioimunoensaio como descrito no item 3.3.4.

3.2.3 - Albumina sérica

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

3.2.4 - Gordura hepática

Fragmentos de tecido hepático pesando aproximadamente 500 mg, foram retirados e digeridos em 2 ml de solução KOH 30%. A precipitação do glicogênio foi feita em 0,1 ml de Na_2SO_4 e 7,0 ml de etanol, em banho-maria fervente por 2 min. Após extração, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante, contendo a fração lipídica, foi armazenado. A seguir tubos de ensaio receberam a identificação de “padrão” (P_1) e “desconhecido” (D_1) e nesses foram adicionados 20 µl de solução de etoxilados de lanolina equivalentes a 10 g/l de lipídeos totais(utilizado como padrão para lipídeos) e 20 µl da amostra desconhecida (fração lipídica), respectivamente. Em seguida em cada tubo foi colocado 1,0 ml de ácido sulfúrico e agitado vigorosamente para homogeneização das amostras e levados para o banho (fervente) por 10 min. Após esse período, os tubos permaneceram em repouso até que atingissem a temperatura ambiente. Em outros 3 tubos, branco (B), padrão (P_2) e desconhecido (D_2)

colocamos 100 µl de ácido sulfúrico, 100 µl de padrão (P₁) e 100 µl da amostra desconhecida(D₁). Após este procedimento, juntou-se a esses tubos 2,5 ml do reagente fosfovanilínico (solução de vanilina a 9,02 mmol/l em ácido fosfórico) e foram agitados para homogeneização e colocados em banho a 37 °C durante 10 min. Finalizada a incubação os tubos foram retirados do banho e deixados em repouso por 30 min sendo as amostras avaliadas em espectrofotômetro a 550 nm.

3.2.5 - Glicogênio Hepático

Fragmentos de tecido hepático foram processados de modo semelhante ao item 5.5. Após extração, as amostras foram centrifugadas e o precipitado suspenso em 25 ml de água deionizada. A 1,0 ml desse extrato foram adicionados 20 µl de fenol 80% (m/v) em água e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi levada à fervura durante 15 min e em seguida ficou em repouso até atingir a temperatura ambiente, para a medida da absorbância em 490 nm. Foram utilizadas soluções padrões de glicose para as curvas de calibração.

3.3 – Avaliação da secreção de insulina e quantificação das enzimas

3.3.1 - Isolamento de ilhotas pancreáticas

Dois animais de cada grupo foram sacrificados por decapitação. Após incisão abdominal e oclusão da extremidade do ducto biliar comum, foi inserida uma cânula através de uma pequena incisão na parte proximal (hepática) deste ducto. Através da cânula

de polietileno, foi injetada solução de Hanks enriquecida com 2.8 mM de glicose e collagenase 1 mg /mL, que promoveu a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi excisado e dissecado de gorduras, da maioria do tecido vascular e dos gânglios linfáticos. A seguir, foi reduzido a fragmentos pequenos que foram transferidos para um tubo de ensaio contendo Hanks e collagenase (Boehringer Mannheim Biochemicals, USA). Em seguida, os fragmentos foram incubados em banho-maria a 37°C durante aproximadamente 18 minutos. Após o período de incubação, o tubo foi agitado manualmente por aproximadamente 1 minuto ou até a obtenção de mistura com viscosidade homogênea. O conteúdo foi transferido para um becker e o material foi lavado com solução de Hanks 4 vezes para a remoção da collagenase, das enzimas digestivas liberadas durante a incubação e também dos fragmentos celulares.

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

3.3.2 - Secreção estática de insulina

As ilhotas coletadas foram transferidas para placas de cultura com 24 reservatórios contendo 0,5 ml de solução de Krebs, suplementada com 0,5% de albumina bovina (m/v) e 5,6 mM de glicose. Em todos os experimentos 5 ilhotas foram colocadas em cada reservatório. A seguir as placas foram acondicionadas em banho-maria a 37 °C e mantidas em ambiente controlado (umidificado e gaseado com mistura carbogênica). O pH da solução foi ajustado em 7,4 pela injeção desse gás. Inicialmente as ilhotas foram pré-incubadas por 60 minutos em meio contendo 5,6 mM de glicose.. A solução foi

rapidamente removida e substituída por nova solução de incubação contendo glicose (8.3mM ou 16.7mM) juntamente com CCh e/ou ativadores da proteína quinase C (PMA). Após 60 minutos de incubação, as placas foram resfriadas em banho de gelo e o sobrenadante removido, transferido para tubos de ensaio e armazenado a -20°C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio descrito no item 3.3.4.

3.3.3 - Secreção dinâmica de insulina

Após isolamento, 4 grupos de 100 ilhotas foram lavadas 4 vezes com solução de Krebs com 8.3 mM de G e em seguida transferidas para 4 câmaras de perfusão contendo membrana millipore SW1300 (poro 8 μm). As câmaras foram conectadas ao sistema de perfusão constituído por 4 recipientes ligados por intermédio de cateteres a uma torneira de 2 vias. As soluções perfusoras contendo G, CCh e PMA foram mantidas a 37°C e equilibradas constantemente com a mistura carbogênio. A razão de efluxo do sistema de perfusão foi 1 ml/min, impulsionado por uma bomba peristáltica de 4 canais (Ismatec). As amostras do perfusato foram coletadas em frascos de polietileno, a intervalos regulares de 1 ou 2 min. O efluente de cada frasco foi estocado em -80°C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio.

3.3.4 - Dosagem da insulina

A insulina secretada durante os diferentes experimentos “*in vitro*” foi determinada por radioimunoensaio. Para isso transferiu-se 0,1 ml das amostras desconhecidas (em

duplicata) as quais receberam a seguir 0,2 ml de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com ^{125}I (traçador) em tampão fosfato pH 7.4, acrescido de NaCl 0,9 % e albumina 0,5 %. Em seguida foram preparados os seguintes controle:

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

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

Após este período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, todos os outros tubos receberam 0,2 ml de uma solução contendo 2,5 % de carvão (Norit A), 0,5 % de albumina e 0,25 % de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso durante 20 min e a seguir centrifugados durante 20 min (2800 rpm) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo avaliada em contador de radiação gama. Os 3 tubos elaborados para análise da radiação máxima não tiveram o

sobrenadante descartado, sendo a radiação dos mesmos avaliada diretamente. Com bases nos valores obtidos nos tubos contendo insulina conhecida elaborou-se uma curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores desconhecidos das amostras. Os resultados foram expressos em ng/mL de insulina secretada durante os experimentos “*in vitro*”.

3.3.5 - Efluxo de radioisótopo

Após o isolamento, as ilhotas foram distribuídas em frascos de 1,5 ml. O sobrenadante foi removido e substituído por meio de incubação contendo 10 a 20 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{CaCl}_2$ em presença de 16,7 mM de glicose. Os frascos contendo 150 ilhotas foram incubados por 120 min, em banho-maria gaseados com mistura carbogênica. Ao final desse período as ilhotas foram lavadas 4 vezes com solução de incubação não radioativa, transferidas para 4 câmaras de perfusão contendo membrana millipore SW1300 (poro 8 μm). As câmaras foram conectadas ao sistema de perfusão constituído por 4 recipientes ligados por intermédio de cateteres a uma torneira de 2 vias. As soluções perfusoras contendo diferentes concentrações de glicose em presença de CCh, foram mantidas a 37°C e equilibradas constantemente com a mistura carbogênio. A razão de efluxo do sistema de perfusão foi 1 mL/min, impulsionado por uma bomba peristáltica de 4 canais (Ismatec). As amostras do perfusato foram coletadas em frascos de polietileno, a intervalos regulares de 1 ou 2 min. Em cada frasco foi adicionado líquido de cintilação para a leitura do ^{45}Ca ; a radioatividade contida no efluente de cada frasco foi medido em contador de partícula beta (Beckman LS 6000TA).

3.3.6 - Imunohistoquímica

Ratos Wistar machos, submetidos ou não a dieta hipoprotéica por 90 dias foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg). Após perda de reflexos pedioso e corneano, realizou-se toracotomia mediana com canulação trans-cardíaca da artéria aorta. Os animais foram então perfundidos com 80 ml de solução fisiológica heparinizada (0,01 % v/v) e a seguir 80 ml de paraformaldeído (4 % em água destilada), ambos numa velocidade de infusão de 4 mL/min. Ao final da perfusão retirou-se o pâncreas o qual permaneceu por mais 24 hs em solução de paraformaldeído 4 %. O órgão foi incluído em blocos de parafina, seccionados (5 μ m) e fixados em lâminas para microscopia. Após desparafinização as secções foram incubadas por 12 hs a + 4°C com anticorpos primários anti- PKC α (20 a 40 μ g/mL). Os anticorpos foram retirados por 5 rinsagens consecutivas com PBS. A seguir as secções foram incubadas por 2 hs à temperatura ambiente em câmaras umidificadas com anticorpos secundários conjugados a peroxidase. Após 5 etapas de rinsagem com PBS, as lâminas contendo secções marcadas com peroxidase foram reveladas com DAB e H₂O₂ em PBS, contra-coradas com hematoxilina de Harris e montadas com Entellan. A análise foi realizada em microscópio ótico e documentadas por micro-fotografia.

3.3.7 - Western Blotting

Para detectar o nível de expressão celular da PKC α foi empregada a metodologia de Western Blot. Grupos de 500 ilhotas recém-isoladas e incubadas por 2,5 horas em Krebs contendo 8.3 mM de glicose foram centrifugados rapidamente e o sobrenadante

desprezado. A seguir, foram adicionados 200 μ L de Coquetel Anti-protease. As ilhotas foram então politronizadas nesta solução, por aproximadamente 10s, e o homogeneizado foi centrifugado a 3000g por 10min.

O precipitado foi desprezado e foi feita a dosagem protéica no sobrenadante obtido, utilizando-se o reagente para ensaio de proteína da “BioRad Protein Assay-Dye Reagent Concentrate” (Melville, NY). Foi utilizado como referencial, uma curva padrão de albumina.

As amostras foram então incubadas à 37°C por 1h em 20% do volume de Tampão de Laemmli 5X (Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%).

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

Após transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em solução Tris Salina (TBS) (Trisma base 1M, NaCl 5M, Tween 20 0.5%) *overnight* à 4°C. A PKC α foi detectada na membrana de Nitrocelulose por incubação por 2h, à temperatura ambiente, com anticorpo monoclonal específico anti-PKC α (Sta Cruz, diluição 1:500 em TBS com 3% de leite desnatado). Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo (diluição 1:1000 em TBS com 3% de leite desnatado)

seguido de exposição por 2h à temperatura ambiente com proteína A marcada com I^{125} (diluição 1:1000 em TBS com 1% de leite desnatado).

O complexo anticorpo- [I^{125}] proteína A foi detectado por autoradiografia, após armazenamento desta membrana à -70°C por aproximadamente 5 dias dentro de cassete provido de uma tela amplificadora.

3.3.8 - Extração de RNA total

Para a extração dos RNAs totais das ilhotas foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, o tecido foi inicialmente rompido com sonicador e homogeneizado com o reagente Trizol até completa solubilização. Em seguida a mistura foi incubada por 5 min a temperatura ambiente, acrescida de 0,2 mL de clorofórmio por mL de Trizol para desproteinização. O sobrenadante foi separado por centrifugação ($12.000 \times g$, 15 min, 4°C), e o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 75% e 100%, e dissolvido com H_2O desionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Após quantificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2%, para análise da integridade do RNA.

3.3.9 - RT-PCR semi-quantitativo

Inicialmente, uma amostra de 2µg de RNA foi submetida a reação de transcrição reversa com *primers* randômicos. A partir dos cDNAs obtidos foram realizadas as curvas de ciclos para cada *primer* (Ver Tab. 2), com o mínimo de 5 pontos para cada curva. Após obtenção das curvas os experimentos foram realizados com um número de ciclos equivalente a 20% abaixo do ponto de saturação da reação (platô).

Os resultados obtidos no RT-PCR, foram expressos como média ± erro padrão da média. Devido a grande dificuldade de se encontrar um controle interno para a normalização dos resultados, utilizou-se um controle externo (RNA de um vírus de planta (PVX)), uma vez que os controles internos mais utilizados para normalização se mostraram alterados nos animais desnutridos. Na comparação de dois grupos foi utilizado teste t de Student para dados não pareados, sendo adotado o nível de significância $P < 0.05$.

Tabela II – Primers utilizados.

GENE	Sense Primer (5' a 3')	Antisense Primer (5' a 3')
PKCα Gene Bank (X072586)	CCTGCTCTACGGACTTATC	TGTAGTATTCACCCTCCTC
PVX* Gene Bank (D00344)	CGATCTCAAGCCACTCTCCG	GTAGTTGAGGTAGTTGACCC

3.4 - Procedimento Estatístico

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

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

Com relação ao dados obtidos nas secreções dinâmicas e estáticas foi utilizado análise de variância (duas fontes: estado nutricional (normoprotéico e hipoprotéico) e droga. Foi realizado o teste de comparação múltipla (teste Tukey) para a primeira e para a segunda fonte de variação e na interação das duas fontes. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$. A homogeneidade das variâncias foi testada segundo Cochran, Hartley e Bartlett. As análises foram feitas utilizando-se o programa "STATISTICA" (versão 4.3, 1993) da StatSoft, inc.

IV – RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 - Avaliação do estado nutricional dos animais

Os ratos jovens mantidos dos 21 aos 90 dias com a dieta hipoprotéica apresentaram peso corporal (Fig.1A) e teor sérico de albumina (Tab.I) menores do que aqueles mantidos com dieta normoprotéica. Os ratos LP e NP não apresentaram edema e o conteúdo hepático de glicogênio, de gordura e ácidos graxos mostraram-se significativamente mais elevados nos animais LP do que nos animais NP (Tab. I). Os níveis séricos de proteína total foram menor no grupo LP ($p<0.05$) e a glicose sérica não diferiu entre os dois grupos experimentais (Tab. I).

A Fig. 1A ilustra a massa corpórea entre os grupos NP e LP, mostrando que não havia diferença significativa na massa corpórea dos animais na primeira semana de desnutrição (semana 1). As diferenças significativas começaram a ser observadas a partir da quarta semana, onde os animais NP apresentaram uma maior massa corpórea quando comparados aos animais LP ($p<0.05$).

A Fig. 1B representa a velocidade do ganho de massa corpórea, mostrando que a velocidade de crescimento do grupo NP foi maior que a velocidade de crescimento do grupo LP. O grupo NP atingiu a velocidade máxima de crescimento uma semana antes que o grupo LP. O grupo NP atingiu sua velocidade máxima de crescimento na terceira semana, enquanto que o grupo LP atingiu sua velocidade máxima na quarta semana.

Quando os valores máximos de velocidade de ganho de massa de ambos os grupos foram analisados, pudemos observar ainda que o grupo NP apresentou uma velocidade de

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

Parâmetros	NP	LP
Proteínas séricas totais Jejum (g/dl)	5,3 ± 0,2	4,7 ± 0,3*
Albumina sérica Jejum (g/dl)	3,5 ± 0,1	3,3 ± 0,1*
Glicose sérica Jejum (mg /dl)	127,5 ± 7,4	130,0 ± 14,6
AGL séricos Jejum (mM)	0,4 ± 0,01	0,6 ± 0,09*
Insulina sérica Jejum (ng/mL)	0,94 ± 0,13	0,71 ± 0,18
Insulina sérica alimentado (ng/mL)	1,93 ± 0,6	0,67 ± 0,2 *
Glicogênio hepático Jejum (mg glicose/100mg tecido)	0,7 ± 0,1	1,14 ± 0,1*
Gordura hepática Jejum (g AG/100g tecido)	7,0 ± 0,5	12,3 ± 0,9*

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

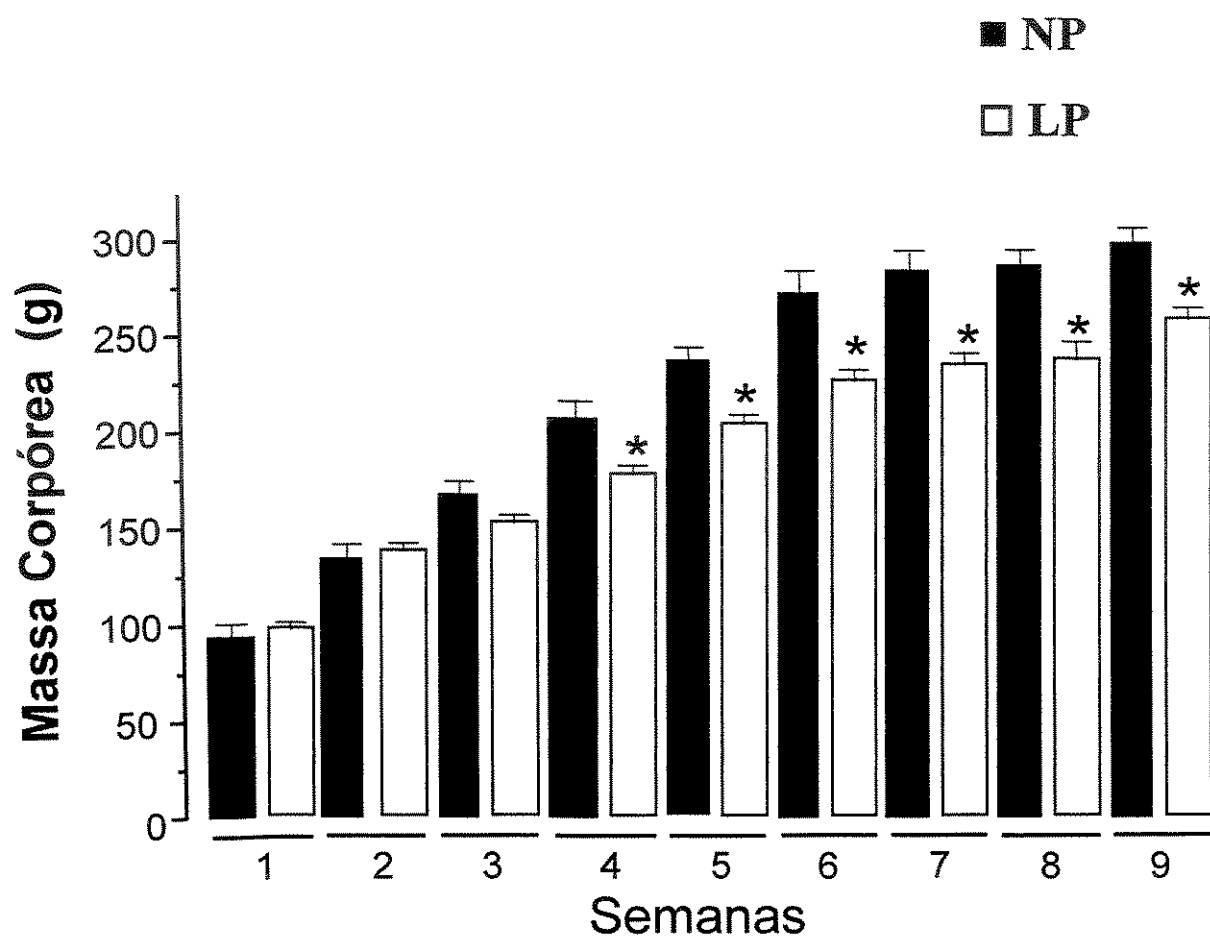


Fig. 1A- Ganho de massa corpórea de ratos machos Wistar de 28 dias NP e LP, avaliado ao longo de oito semanas. Valores expressos em média \pm se; n=15. * Diferença significativa ($p < 0.05$).

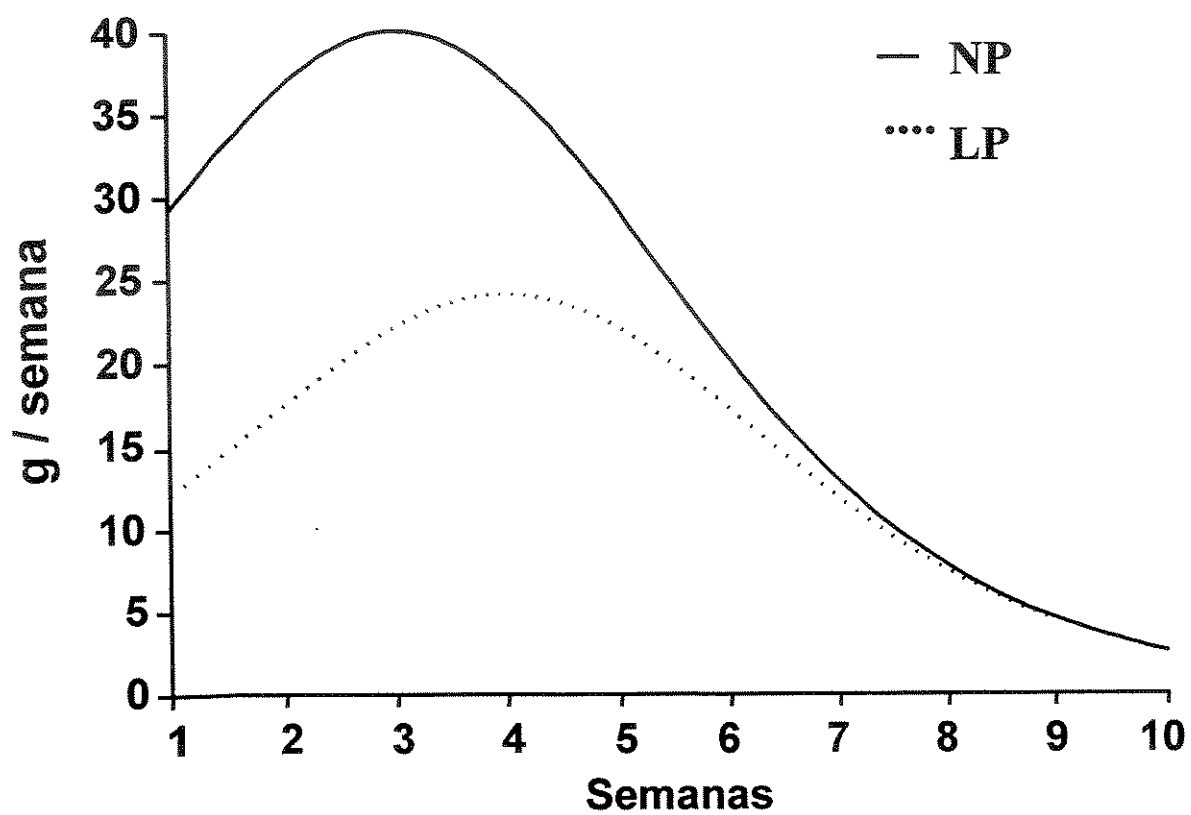


Fig. 1B – Velocidade de ganho de massa corpórea de ratos machos Wistar ao longo de nove semanas.

crescimento de aproximadamente duas vezes a velocidade de crescimento do grupo LP na terceira semana.

4.2 - Efeito do Carbacol e do PMA sobre a secreção de insulina.

A **Fig. 2** representa o efeito de concentrações crescentes do agonista muscarínico carbacol (CCh), sobre a secreção de insulina em ilhotas isoladas de animais NP e LP incubadas durante 1h em presença de 8.3mM de glicose. A secreção de insulina em valores absolutos foi significativamente maior nas ilhotas provenientes de animais NP, quando comparadas às ilhotas isoladas de animais LP. Em condições basais (G 2.8mM) a secreção de insulina das ilhotas NP foi 1.6 vezes maior que a secreção de insulina das ilhotas proveniente de animais LP. Com o aumento da concentração de glicose para 8.3 mM, este aumento foi de 1.83 vezes. Os respectivos aumentos na secreção de insulina, de ilhotas de ratos NP em relação às ilhotas de ratos LP, em diferentes concentrações de CCh foram: 1.86 vezes (0,1 μ M), 1.76 vezes (1 μ M), 2.18 vezes (3.3 μ M), 1.42 vezes (10 μ M), 2.03 vezes (100 μ M), 1.85 vezes (330 μ M) e 1.97 vezes (1000 μ M) ($p < 0.05$). O limiar para a secreção de insulina com estímulo colinérgico (CCh) foi mais elevado em ilhotas provenientes de animais LP quando comparados aos animais NP. A EC_{50} dos animais LP foi de $4,64 \pm 0,98 \mu$ M contra $2,15 \pm 0,70 \mu$ M para as ilhotas NP.

Na **Fig. 3A** avaliamos a secreção dinâmica de insulina por ilhotas provenientes de ratos NP e LP. As ilhotas foram perfundidas durante 90 min na presença de 8.3 mM de glicose e estimuladas ou não com CCh (100 μ M). Na ausência do CCh, a insulina secretada foi maior nas ilhotas de ratos NP quando comparadas as ilhotas de ratos LP.

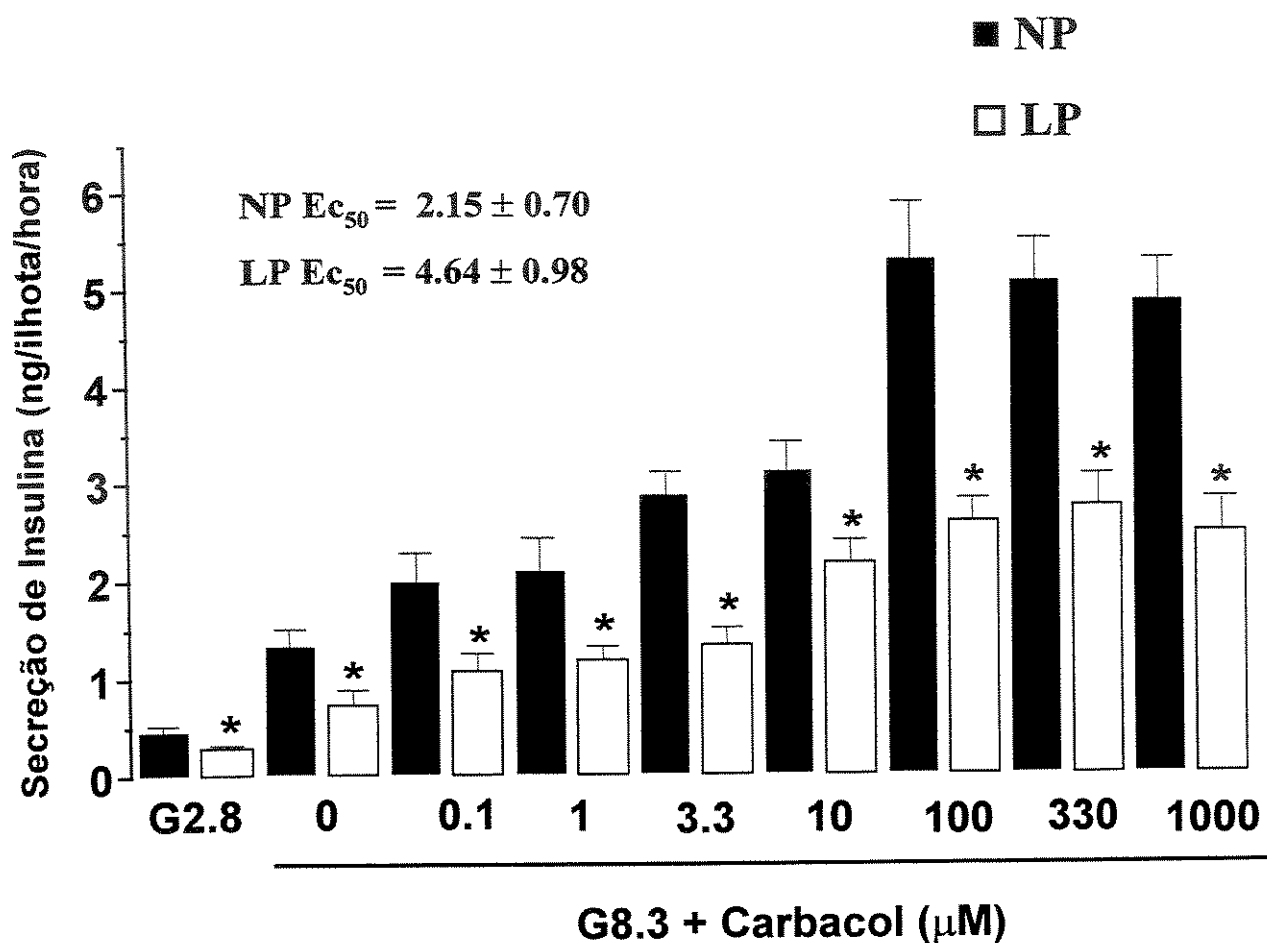


Fig. 2 – Efeito da concentração crescente do agonista muscarínico Carbacol (0,1 μ M - 1000 μ M) na secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos Wistar machos incubadas por 1 h em solução de Krebs contendo 2.5 mM de Ca^{++} e as diferentes concentrações de Carbacol, em presença de 8.3 mM de glicose. As barras indicam a média \pm se; n=20. * Diferença significativa ($p < 0.05$).

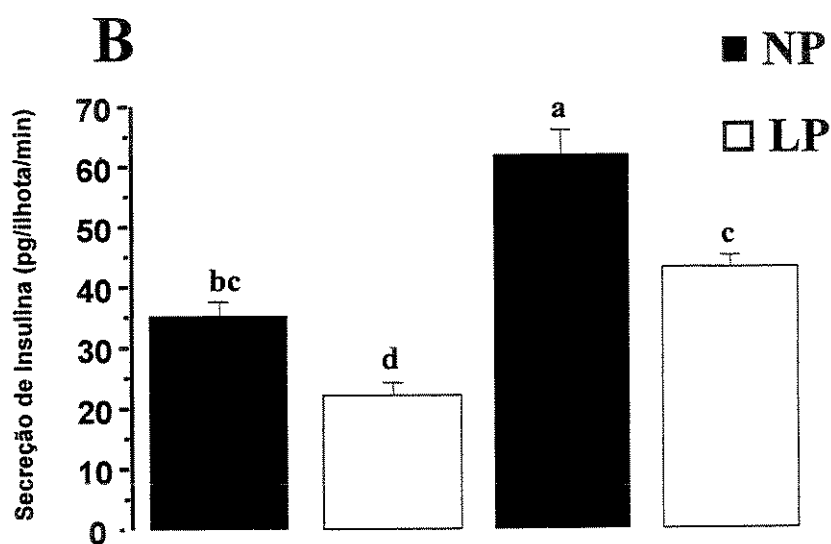
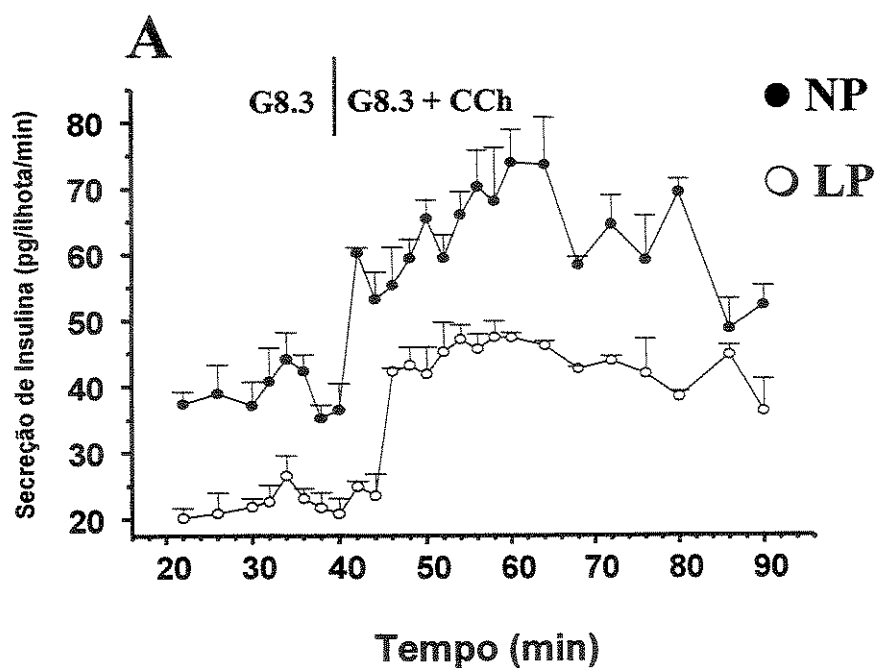


Fig. 3A — Efeito de 100 μ M de Carbacol sobre a secreção de insulina, por ilhotas isoladas de ratos. As ilhotas foram perfundidas com solução de Krebs contendo 8.3mM de glicose (min 0 - 40) e Carbacol (min 40 - 90). Os resultados foram expressos em média \pm se; n=4. **Fig.3B**— Cálculo das áreas sob as curvas (min 20 - 40 e 40 - 90). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$).

Após a adição do CCh (min 40) , ambos os grupos de ilhotas responderam com uma maior secreção de insulina, sendo que o grupo de ilhotas de ratos NP respondeu com um maior aumento ($p<0.05$). Este incremento na secreção de insulina foi melhor visualizado quando calculamos as áreas sob as curvas (Fig. 3B), onde observou-se uma diferença significativa na secreção dinâmica de insulina em concentrações de 8.3 mM de glicose em presença ou ausência do agonista CCh ($p<0.05$). Ilhotas provenientes dos ratos NP apresentaram maior secreção de insulina em relação às ilhotas de ratos LP em presença de apenas glicose (8.3mM) e na presença do agonista CCh, estes aumentos foram de 1.5 vezes e 1.43 vezes respectivamente.

Na Fig. 4A avaliou-se o efeito do CCh (100 μ M) sobre o efluxo ^{45}Ca em presença de 8.3 mM de glicose em ilhotas de ratos NP e LP. Com a introdução do agonista muscarínico CCh (min 44 a 75) a taxa de efluxo elevou-se ao máximo nos dois grupos experimentais próximo ao min 46, sendo mais elevado nas ilhotas de ratos LP. A elevação da taxa de efluxo apresentado por essas ilhotas pode ser comprovada pela análise da área da Fig. 4B. Na Fig. 4B observou-se uma diferença significativa entre o efluxo de cálcio do grupo NP e o grupo LP em presença de 8.3 mM de glicose mais CCh (100 μ M) ($p<0.05$).

Na Fig. 5A, avaliamos mais uma vez a secreção dinâmica de insulina de ilhotas provenientes de animais NP e LP, perfundidas durante 60 min em 16.7 mM de glicose na presença ou ausência do agonista CCh (100 μ M). Na ausência do agonista muscarínico CCh a insulina secretada, minuto a minuto, foi significativamente maior nas ilhotas provenientes dos animais NP quando comparadas às ilhotas do grupo LP. Após a adição de CCh (min 30) , ambos os grupos de ilhotas responderam com uma elevação na secreção de insulina, mas o incremento na secreção deste hormônio foi mais uma vez significativamente maior

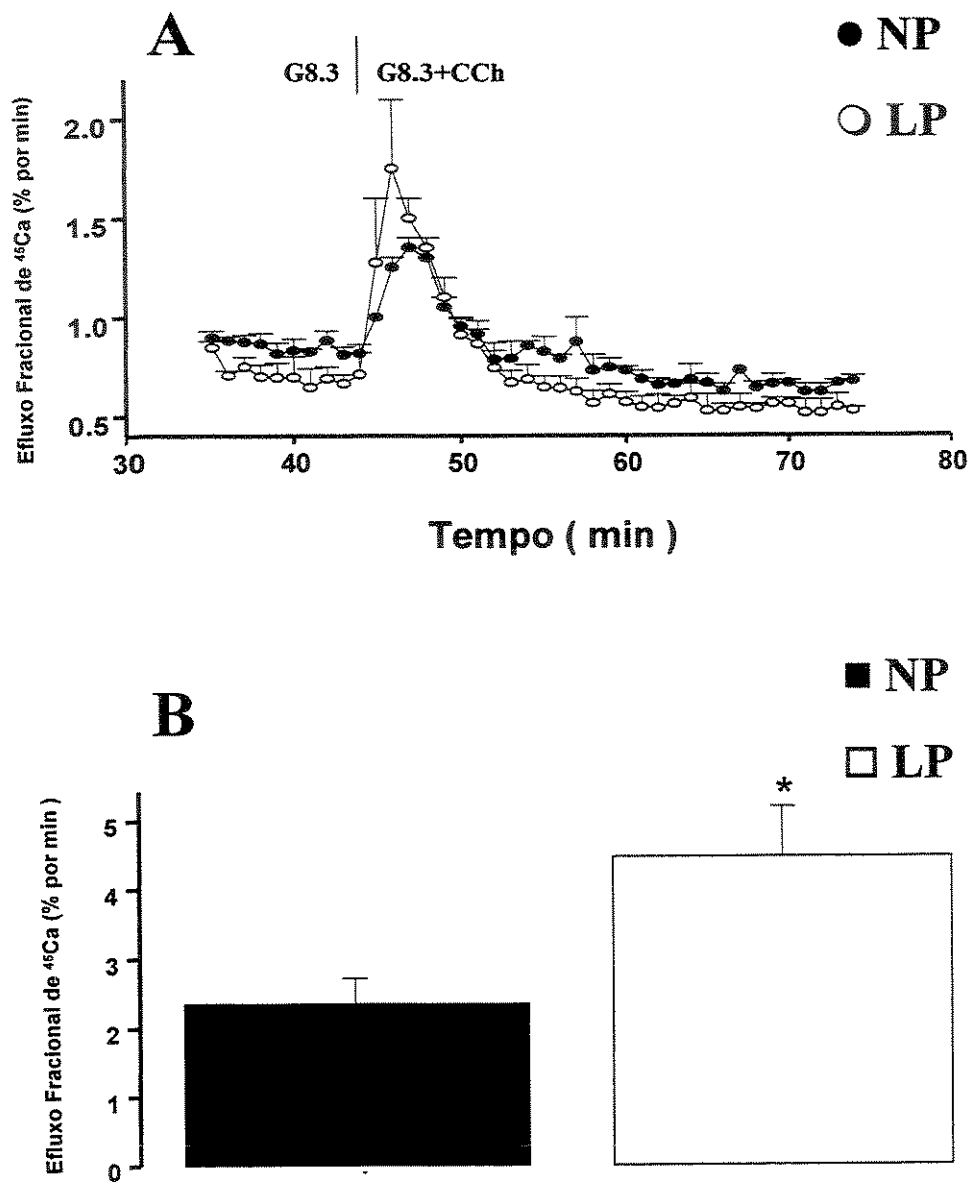


Fig. 4A - Efeito de 100 μM de Carbacol sobre o efluxo de ^{45}Ca de ilhotas isoladas de ratos Wistar macho em presença de 8.3mM de glicose. O referido isótopo foi incorporado após incubação das ilhotas em Krebs contendo 16.7 mM de glicose, ausência de Ca^{++} e traços de ^{45}Ca . Em seguida as ilhotas foram perfundidas durante 75 min. Os círculos indicam a média \pm se; n=4. **Fig. 4B** - Cálculo das áreas sob os picos das curvas (min 45-55) derivadas da Fig 4A. * Diferença significativa ($p < 0.05$).

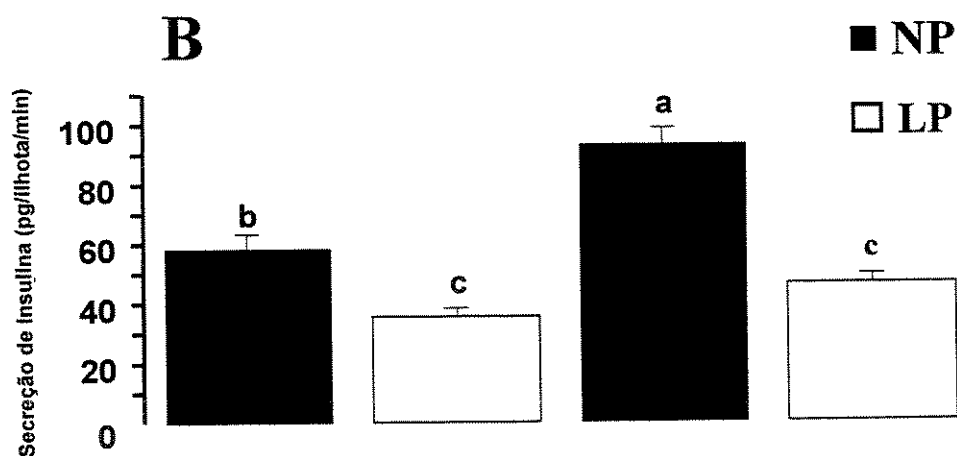
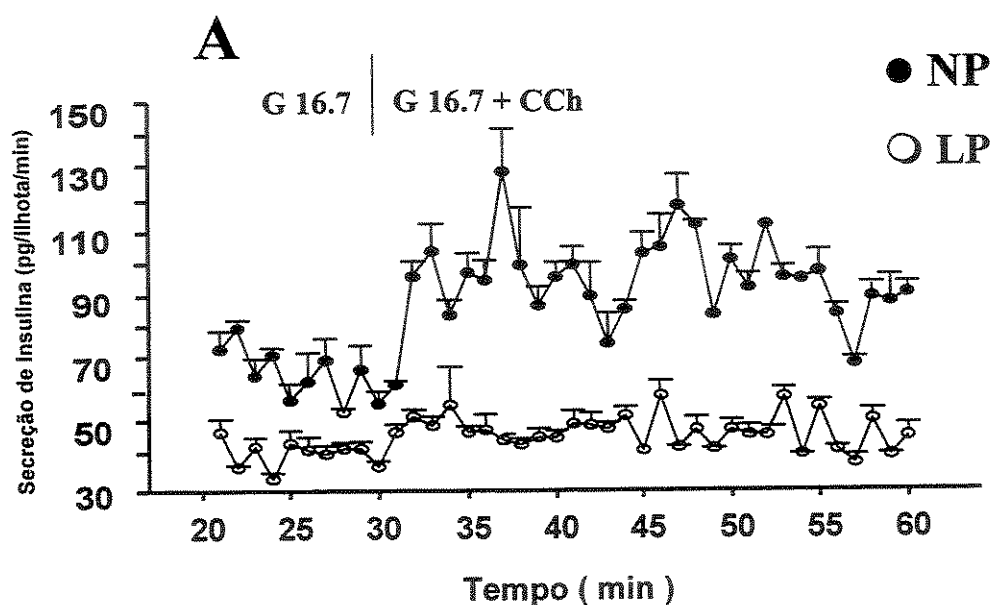


Fig. 5A – Efeito de 100 μ M de Carbacol na secreção de insulina, por ilhotas isoladas de ratos. As ilhotas foram perfundidas com solução de Krebs contendo 16.7 mM de glicose (min 0 a 30) e Carbacol (min 30 a 60). Os resultados foram expressos em média \pm se; n=4. **Fig. 5B** – Cálculo das áreas sob as curvas da fig (min 20-30 e 30-60) derivadas da **Fig. 5A**. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$).

no grupo de ilhotas NP. Calculando-se as áreas sob as curvas (**Fig. 5B**), observou-se diferença significativa na secreção dinâmica de insulina entre os grupos de ilhotas em estudo. O incremento secretório do grupo de ilhotas de ratos NP em relação ao grupo LP foi de 1.61 vezes (G16.7mM) e de 2.01 vezes (G16.7mM + CCh) ($p < 0.05$).

A **Fig. 6A** representa o efluxo de cálcio em ilhotas de ratos NP e LP em presença de glicose (16.7mM) potencializada com CCh. O gráfico mostrou que o efluxo de cálcio elevou-se ao máximo nos dois grupos de ilhotas no min 32, sendo mais elevado nas ilhotas provenientes de ratos NP. A elevação da taxa de efluxo apresentado por essas ilhotas foi verificado pela análise da área dos picos como mostra a **Fig. 6B**. A **Fig 6B** demonstrou que não há diferença significativa entre o efluxo de cálcio de ilhotas de ratos NP e LP em presença de 16.7 mM de glicose potencializada com CCh.

Na **Fig. 7A** avaliamos a secreção dinâmica de insulina de ilhotas provenientes de animais NP e LP, perfundidas durante 60 min em presença de 8.3 mM de glicose, mais PMA(100nM) e CCh(100 μ M). Em 8.3mM de glicose, a insulina secretada, minuto a minuto, foi significativamente maior nas ilhotas provenientes de ratos NP. Após a adição de PMA (min 30) , ambos os grupos não responderam com uma elevação significativa da secreção de insulina quando comparada com seus respectivos controles (G 8.3mM). Já a associação entre PMA e CCh (min 50), induziu um incremento significativo na secreção de insulina nos dois grupos experimentais. Porém este aumento foi significativamente maior no grupo NP ($p < 0.05$). Este resultado pode ser melhor visualizado quando calculou-se as áreas sob as curvas para cada condição experimental (**Fig. 7B**).

Na **Fig. 8A** avaliamos o efluxo ^{45}Ca nas mesmas condições apresentada na **Fig. 7A**. Com a introdução do PMA(100nM) e CCh(100 μ M) (min 50 a 60) a taxa de efluxo se

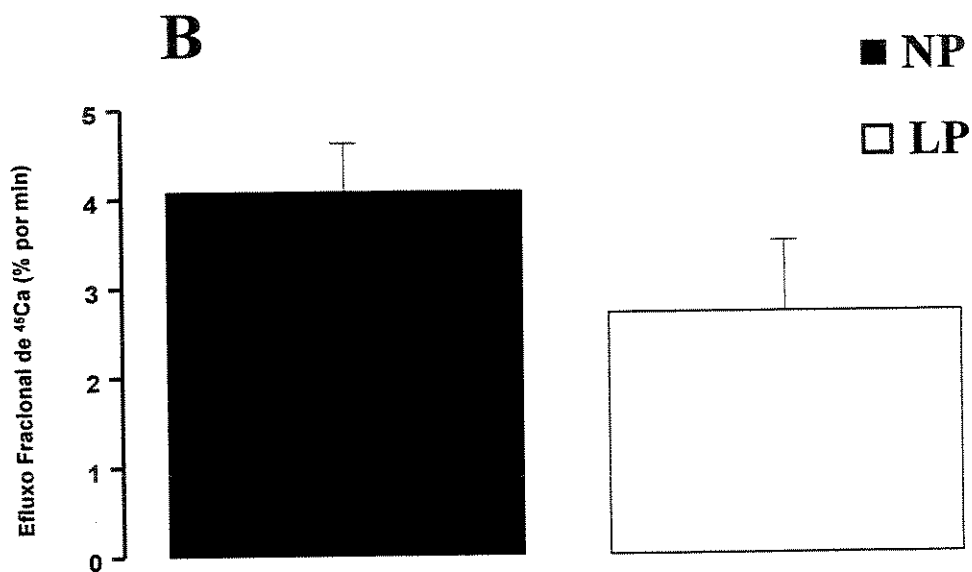
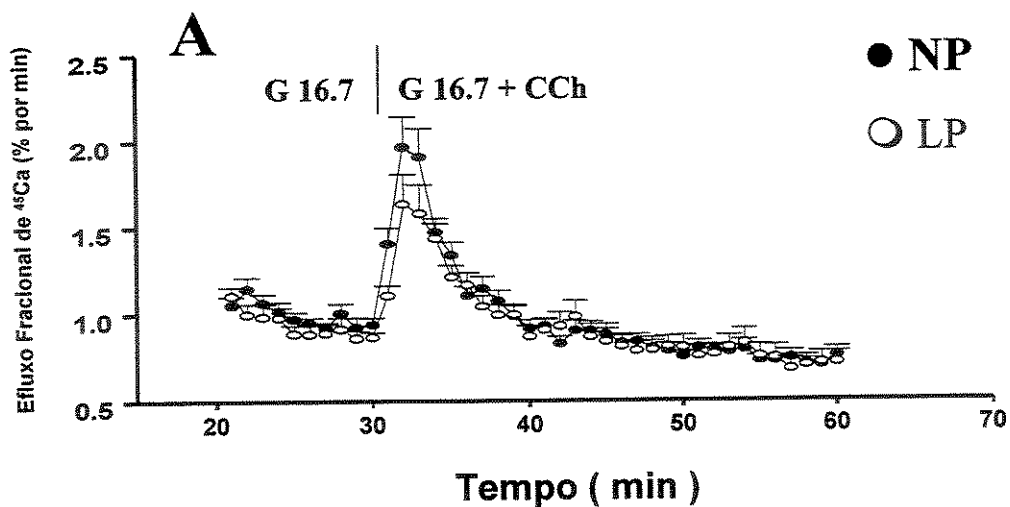


Fig. 6A - Efeito de 100 μM de Carbacol sobre o efluxo de ^{45}Ca em ilhotas isoladas de ratos Wistar machos, em presença de 16.7mM de glicose. O referido isótopo foi incorporado após incubação das ilhotas em Krebs contendo 16.7 mM de glicose, ausência de Ca^{++} e traços de ^{45}Ca . Em seguida as ilhotas foram perfundidas durante 60 min. Os círculos indicam a média \pm se; n=6. **Fig. 6B** - Cálculo das áreas sob os picos das curvas (min 30-40) derivadas da Fig 6A.

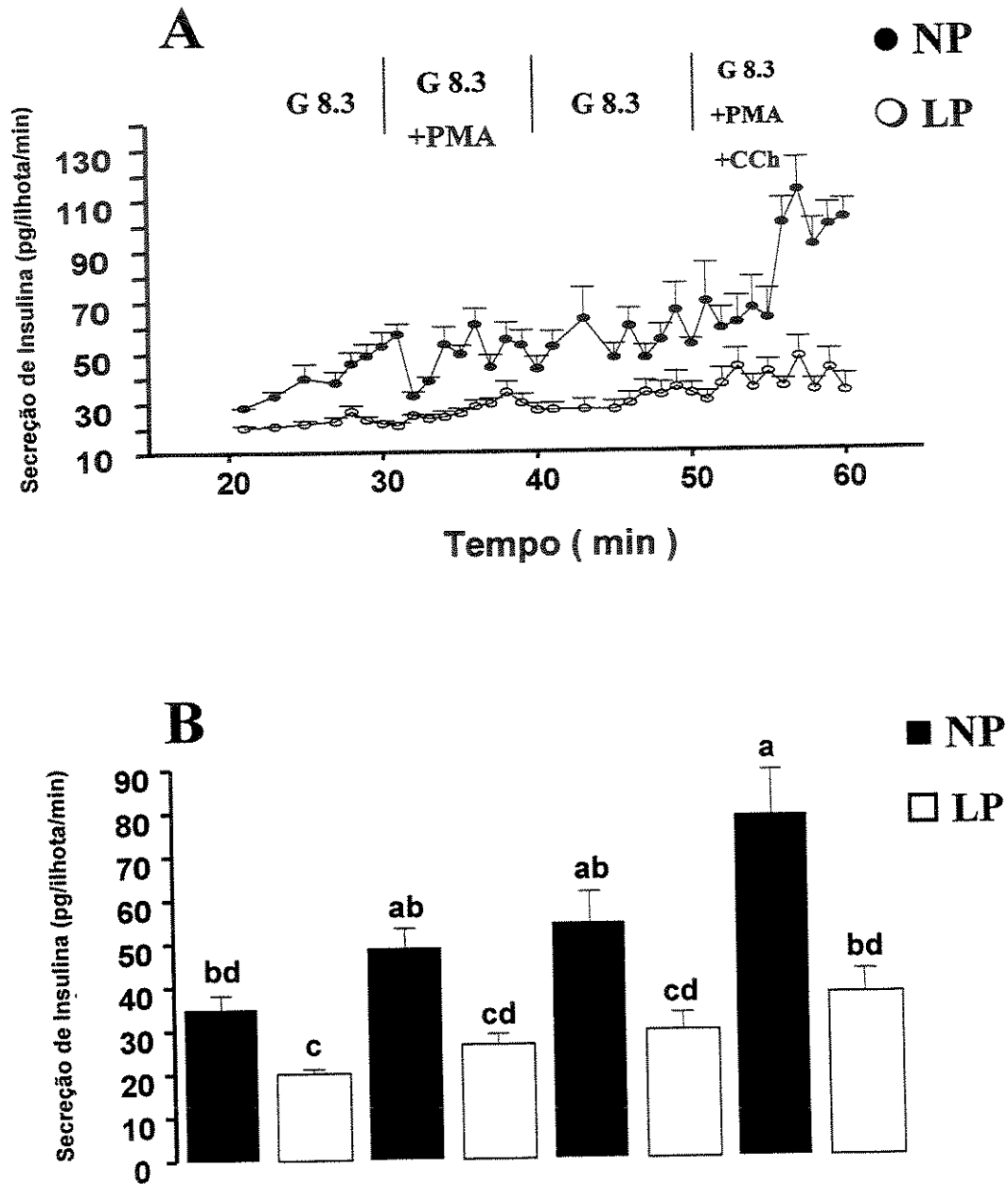


Fig. 7A – Efeito secretório de 100 μ M de Carbacol + 100 η M de PMA em ilhotas isoladas de ratos em presença de 8.3mM de glicose. As ilhotas foram perfundidas com solução de Krebs contendo 8.3 mM de glicose (min 0-30), 100 η M PMA (min 30-40), 8.3 mM glicose (min 40-50) e 100 μ M CCH e 100 η M PMA (min 50-60). Resultados expressos em média \pm se; n=4. **Fig. 7B** – Cálculo das áreas sob as curvas derivadas da **Fig. 7A**. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$).

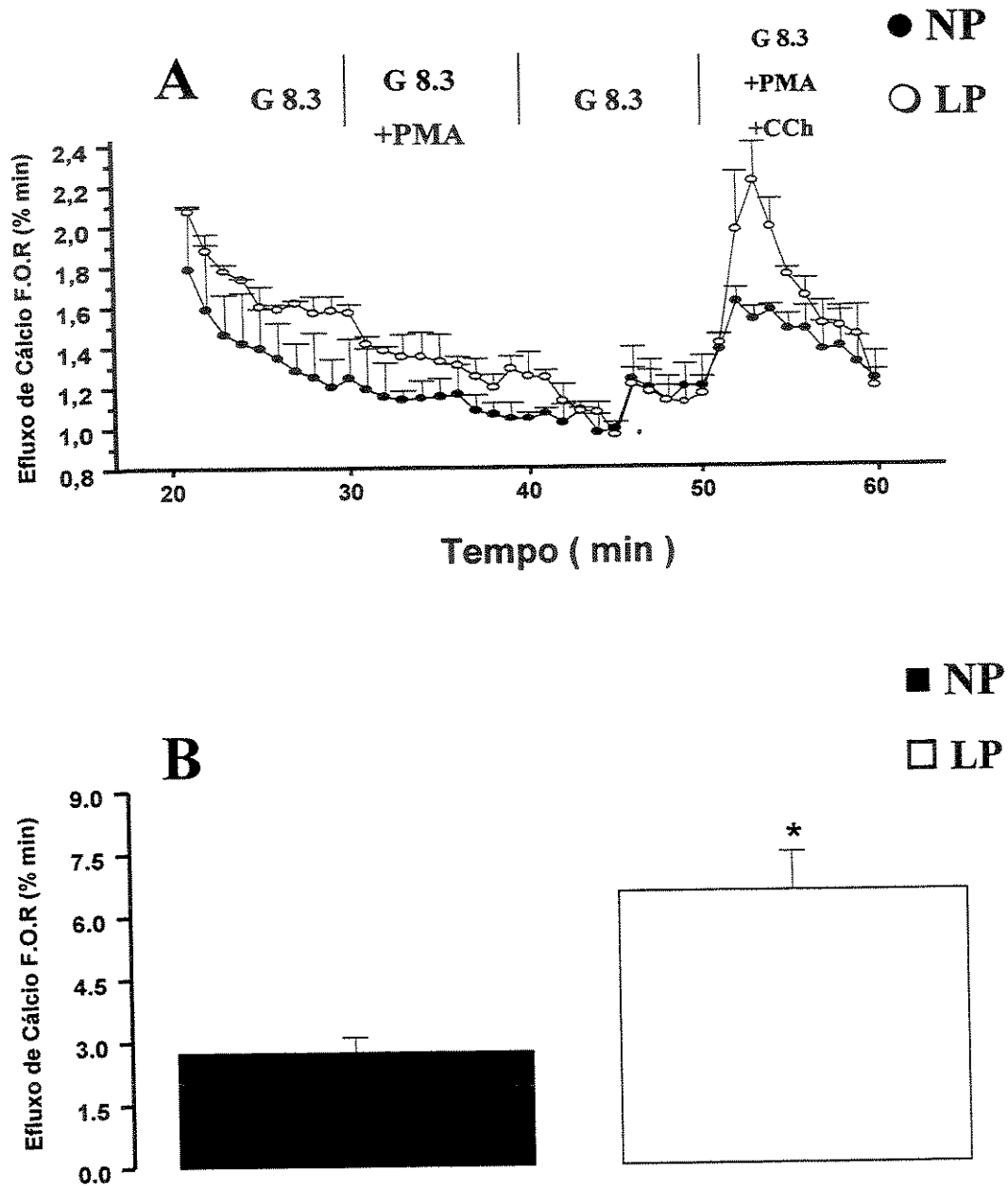


Fig. 8A - Efeito de 100 μ M de Carbacol + 100nM de PMA no efluxo de ^{45}Ca em ilhotas isoladas de ratos Wistar machos, em presença de 8.3mM de glicose. O isótopo foi incorporado após incubação das ilhotas em Krebs contendo 16.7 mM de glicose, ausência de Ca^{++} e traços de ^{45}Ca . Em seguida as ilhotas foram perfundidas durante 60 min. Valores expressos em média \pm se; n=6. **Fig. 8B** - Cálculo das áreas sob os picos das curvas (min 50-60) derivadas da Fig. 8A. * Diferença significativa ($p<0.05$).

elevou ao máximo nos dois grupos experimentais aproximadamente min 53, sendo mais elevado nas ilhotas provenientes de animais LP. Na **Fig. 8B** observou-se diferença significativa entre o efluxo de cálcio do grupo NP e LP em presença CCh (100 μ M) mais PMA (100nM) mostrando um maior efluxo pelas ilhotas LP ($p < 0.05$).

Como não verificamos um aumento significativo na secreção de insulina quando estimulamos as ilhotas com 100nM de PMA (**Fig. 7A**), realizamos uma secreção estática de insulina elevando a concentração de PMA para 200nM e mantendo a concentração de glicose em 8.3 mM (**Fig. 9A**).

A **Fig 9A** representa a secreção estática de insulina, mostrando a secreção do hormônio insulina em presença de 8.3 mM de glicose juntamente com PMA (200nM). A figura mostra que as ilhotas de ratos NP secretaram mais insulina que as ilhotas de ratos LP (2.83 vezes) em presença de apenas 8.3 mM de glicose ($p < 0.05$) e 3.04 vezes adicionando-se PMA (200nM) ($p < 0.05$).

Elevando a concentração de glicose para 16.7 mM e mantendo PMA 200 nM (**Fig 9B**), o aumento do grupo NP em relação ao grupo LP na presença de apenas glicose 16.7mM foi de 2.06 vezes e com o acréscimo de PMA foi de 1.5 vezes ($p < 0.05$). Nesta condição os valores absolutos de secreção de insulina continuaram sendo maiores nas ilhotas NP ($p < 0.05$), porém a resposta relativa foi maior nas ilhotas LP, mostrando uma melhora na secreção quando utilizamos concentrações supralimíares de glicose.

As **Figs. 10A e 10B** ilustram a imunohistoquímica de pâncreas de ratos submetidos a dieta NP e LP. As figuras demonstraram uma diminuição no conteúdo da enzima PKC α

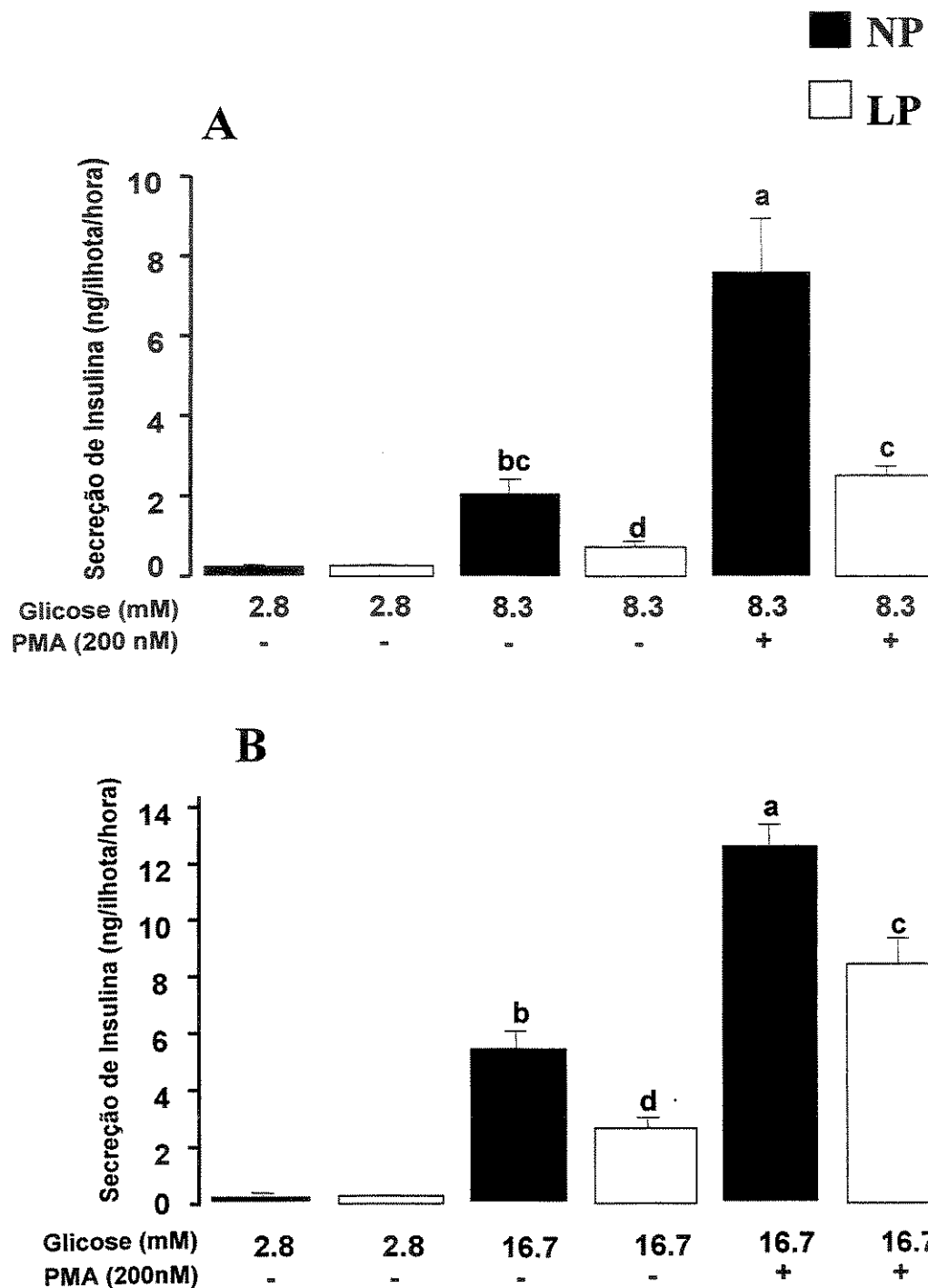
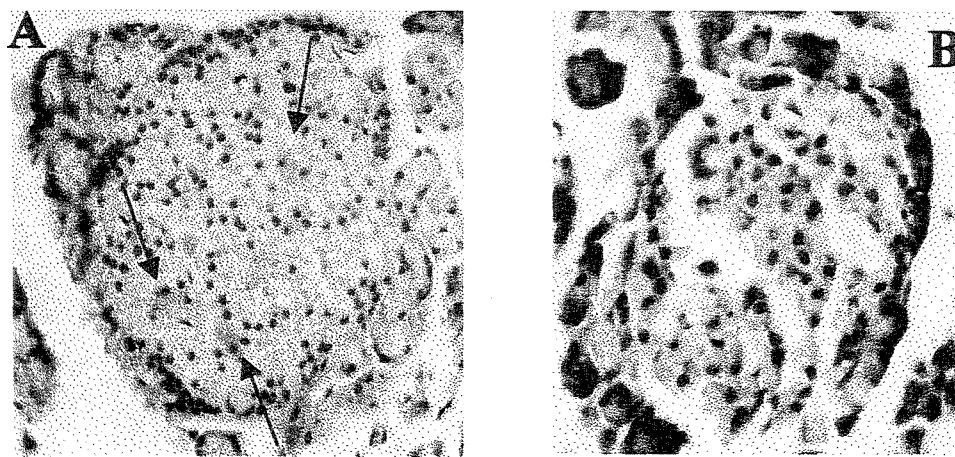


Fig. 9A e 9B — Efeito do PMA (200nM) sobre a secreção de insulina por ilhotas isoladas de ratos em presença de 8.3 e 16.7 mM de glicose. Foram incubadas em Krebs contendo 2.5 mM de Ca^{++} durante 1h. As barras indicam média \pm se; n=20. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$).



Figs. 10A e 10B – Imunohistoquímica de pâncreas de ratos Wistar machos mostrando ilhota de rato NP (Fig.10A) e LP (Fig.10B), indicando a presença da enzima PKC α nas ilhotas. (Aumento de 100 vezes). Setas indicam marcação por imunoperoxidase revelando uma maior concentração da enzima PKC α ..

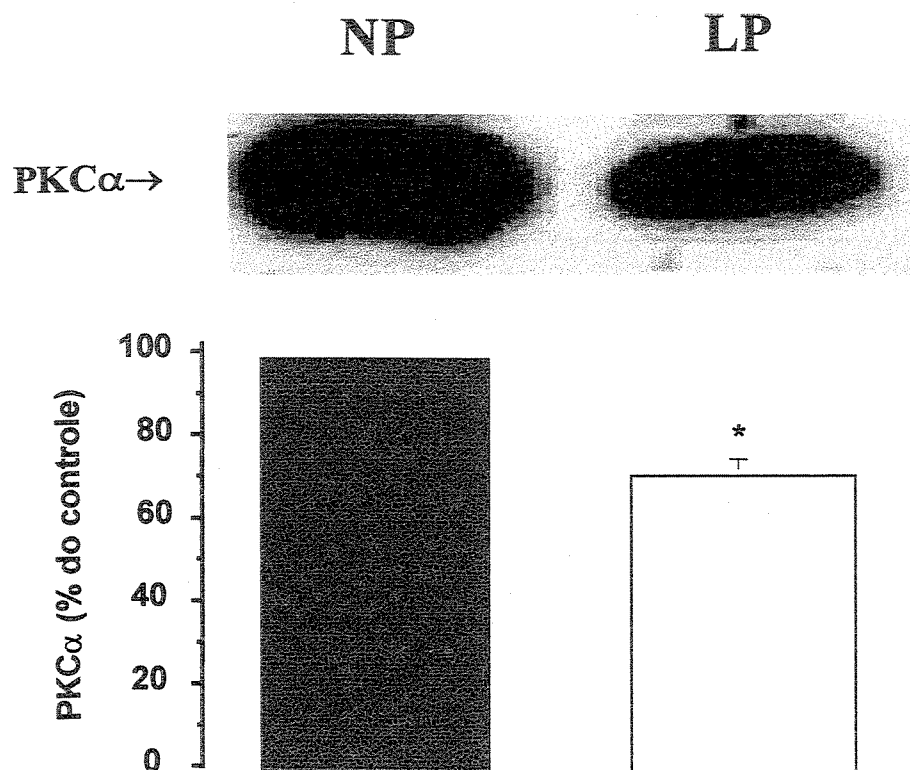
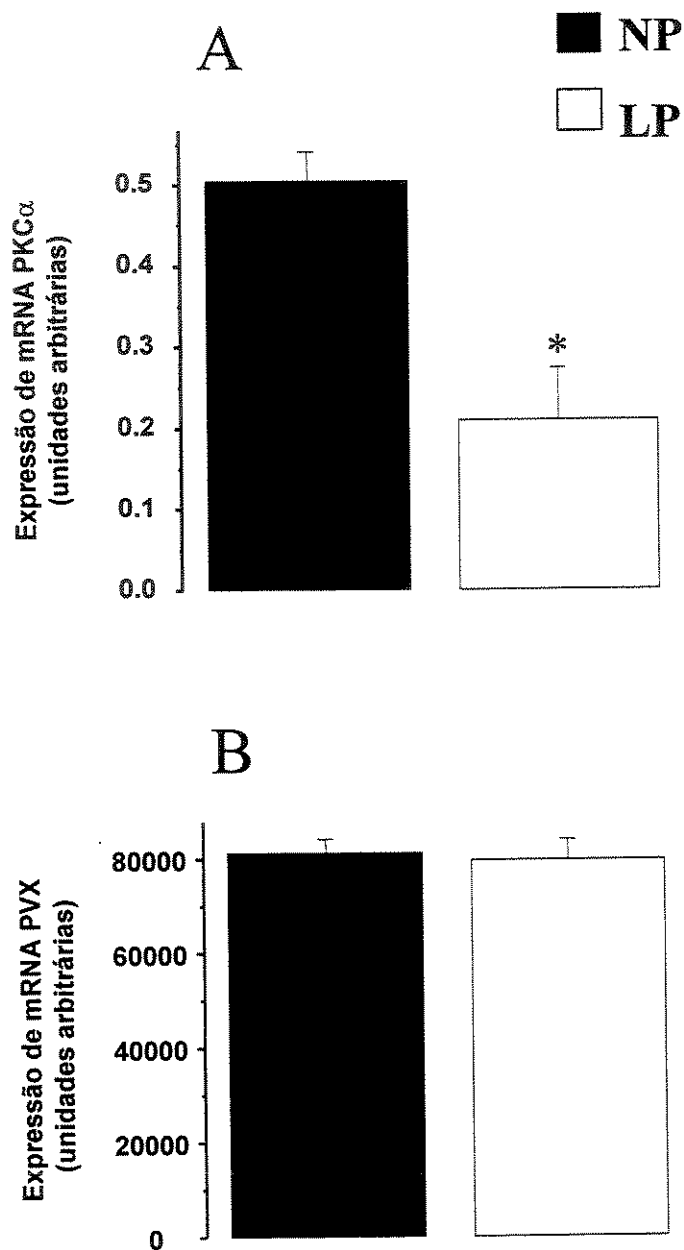


Fig. 11 - Quantificação da enzima PKC α por densitometria das bandas do gel de poliacrilamida em ilhotas isoladas de ratos incubadas por 2,5 h em meio contendo 8.3mM de glicose. * Indica diferença significativa ($p<0.05$; $n=6$).

em ilhotas de provenientes de ratos LP. Verificamos ainda a quantidade desta enzima pela técnica de Western Blotting (**Fig.11**) e a densitometria das bandas revelou que a enzima realmente estava reduzida em aproximadamente 30% em ilhotas provenientes de ratos LP ($p<0.05$).

Com a redução da expressão da enzima PKC α , analisamos ainda se estas alterações poderiam ou não ser transcricionais. Verificamos então a quantidade de mRNA para a enzima PKC α em ambos os grupos de ilhotas e foi constatado uma redução também na quantidade de mRNA para a enzima em questão nas ilhotas provenientes de animais LP (**Fig.12A**) ($p<0.05$). A **Fig.12B** representa o mRNA do vírus que foi utilizado para a normalização dos resultados obtidos no RT-PCR para a enzima PKC α .

Sabendo que a restrição protéica estava diminuindo a transcrição e a expressão da enzima PKC α importante na modulação colinérgica da secreção de insulina, verificamos ainda a expressão da enzima PLC β 1 que também estava reduzida nas ilhotas provenientes de animais LP (**Fig. 13**).



Figs. 12A e 12B – Expressão do mRNA da enzima PKC α isolado de ilhotas de Ratos Wistar machos incubadas por 2,5 h em meio contendo 8.3 mM de glicose. Os níveis de mRNA foram semiquantificados através da técnica de RT-PCR (**Fig.12A**). A intensidade das bandas da enzima PKC α , obtidas por densitometria, foram normalizados pela expressão do vírus PVX (**Fig.12B**). As barras indicam média \pm se; n=5. * Indica diferença significativa ($p < 0.05$).

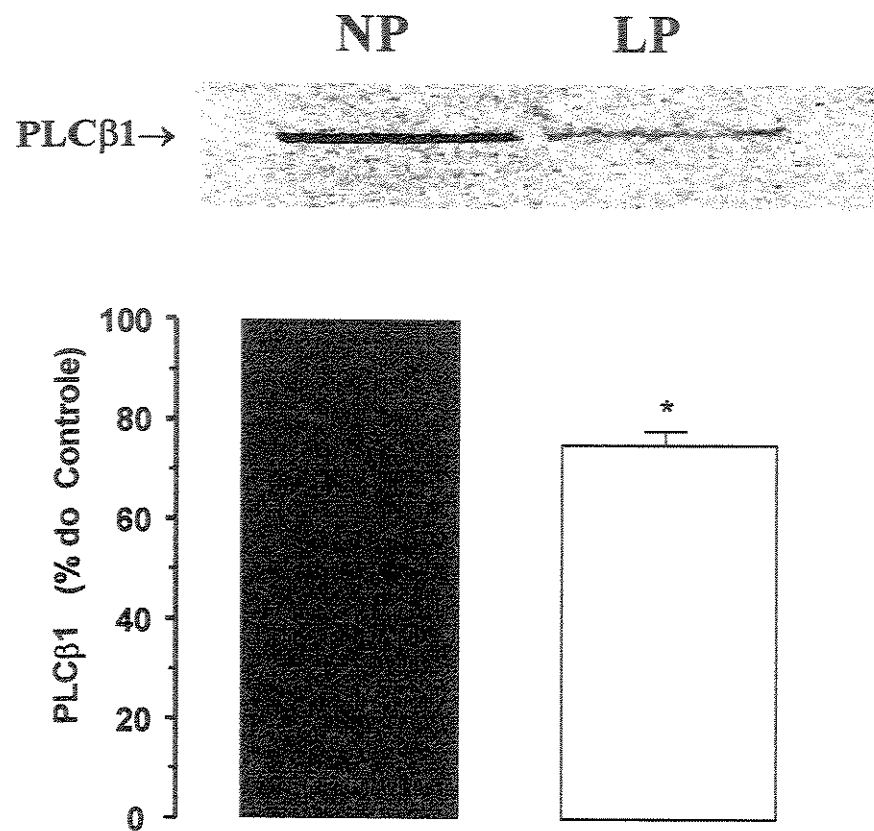


Fig. 13 - Quantificação da enzima PLCβ1 por densitometria das bandas do gel de poliacrilamida em ilhotas isoladas de ratos incubadas por 2,5 h em meio contendo 8.3mM de glicose. * Indica diferença significativa ($p<0.05$; $n=4$).

V - DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Modelo Experimental e Parâmetros Bioquímicos.

Ratos jovens, mantidos dos 21 aos 90 dias com dieta contendo 6% de proteína apresentaram características observadas na desnutrição infantil e nos modelos experimentais de desnutrição (WEINKOVE, WEINKOVE & PIMSTONE, 1976; HEARD et al, 1977; CHAVES, 1985), tais como: baixo peso corporal, hipoalbuminemia, teores elevados de glicogênio e gordura hepática (Figs. 1A e 1B e Tab. I). A ausência de sinais de edema não surpreendeu, tendo em vista a dificuldade anteriormente relatada por outros pesquisadores em produzir edema em ratos (WIDOWSON & McCANCE, 1957; WEINKOVE, WEINKOVE & PINSTONE, 1976; CARPINELLI, 1978). É difícil atribuir todas as diferenças observadas entre os ratos LP e NP exclusivamente à diferença na quantidade de proteína da dieta. Embora ambas as dietas sejam isocalóricas, a dieta LP possui um alto teor de carboidratos (para que as calorias sejam mantidas com a retirada de proteína), o que deve ser levado em consideração.

Nossos resultados mostraram uma diminuição na concentração sérica de proteínas nos ratos submetidos a restrição protéica, que confirmaram dados da literatura que mostrou que a desnutrição em ratos poderia causar uma diminuição na albumina sérica (LUNN & AUSTIN, 1983; WIKES et al. 1996). Ratos mantidos por 7 meses com dieta hipoprotéica a partir dos 21 dias apresentaram diminuição de 25% na concentração sérica de proteínas (OKITOLONDA, BRICHARD & HENQUIN, 1990). CLAYESSENS et al., 1990, encontraram uma diminuição nos níveis de proteína plasmática em animais submetidos a uma dieta contendo 6% de proteína durante três semanas.

A diminuição na insulina sérica em ratos LP, foi também constatada em nossos experimentos (**Tab. I**) e é explicada baseando-se em trabalhos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, que demonstraram uma diminuição da massa de células beta, diminuição da metabolização de nutrientes (glicose e aminoácidos), alterações morfológicas e funcionais das ilhotas pancreáticas e/ou uma diminuição na captação de cálcio pelas células beta nas ilhotas provenientes de ratos LP (CARNEIRO et al., 1995, CARNEIRO et al., 1996, LATORRACA et al., 1998a,b). Os ratos LP, apesar de apresentarem baixos níveis de insulina sérica no período alimentado, apresentaram uma glicemia normal quando comparados aos ratos NP. É possível sugerir que os animais LP possuam uma maior sensibilidade ao hormônio insulina. Na literatura é possível encontrar trabalhos que sustentam a idéia de que a desnutrição acarreta uma maior sensibilidade ao referido hormônio (CRACE, 1990; LATORRACA et al., 1998a,b).

Houve também uma elevação na quantidade de AGLs sérico (**Tab. I**) nos ratos LP, resultado este em acordo com trabalhos publicados por outros autores (KUMAR, DEO & RAMALINGASWANI, 1972; LATORRACA et al., 1998a). Uma possível explicação é que a insulina, um dos mais potentes inibidores da lipase hormônio sensível do tecido adiposo, estando diminuída em ratos LP, estaria aumentando os níveis de ácidos graxos livres no sangue.

O glicogênio hepático mais elevado em ratos LP (**Tab. I**) também foi demonstrado em nossos experimentos. O aumento de AGLs poderia estar influenciando a síntese de glicogênio, uma vez que o aumento dos níveis de AGLs pode suprimir a glicólise e favorecer a síntese de glicogênio (PROIETTO et al., 1999). Mais ainda, ratos desnutridos avaliados com 28 semanas de vida apresentaram 32% de aumento do glicogênio hepático em relação aos controles (OKITOLONDA et al., 1987; CLAYESSENS et al., 1990). Este

aumento pode ser causado ainda pela ineficácia do hormônio glucagon e/ou menor atividade de diversas enzimas, dentre elas a Glicose 6-fosfatase (GALDINO et al., 2000).

Avaliamos a gordura hepática e observamos um aumento nos ratos LP quando comparada a ratos NP (Tab. I). Estes dados podem ser confirmados por autores que obtiveram os mesmos resultados em seus experimentos (ALLEYNE et al., 1972; KUMAR, DEO & RAMALINGASWANI, 1972; TRINDADE, NOBREGA & TONETE, 1986). Devido a menor secreção de insulina e conseqüente aumento de AGLs no sangue dos ratos LP, estaria ocorrendo um maior fluxo destes AGLs para o fígado e provavelmente a chegada de lipídios no fígado estaria maior que a saída, gerando um acúmulo (LEWIS & FELDMAN, 1964). Outra hipótese é que o aumento de carboidratos na dieta hipoprotéica poderia estar sobrecarregando o fígado, pois parte destes carboidratos se depositariam como glicogênio e parte como lipídios (TRINDADE, NOBREGA & TONETE, 1986). Mais ainda poderia estar ocorrendo alterações na liberação dos lipídios hepáticos, devido a redução de proteínas transportadoras (lipoproteínas) cuja síntese é sensível à restrição protéica. (KUMAR, DEO & RAMALINGASWANI, 1972).

5.2 - Secreção de insulina, estímulos colinérgicos e efluxo de cálcio.

A modulação neural das funções das células B é importante para assegurar uma perfeita homeostase da glicose. Numerosos estudos, usando diferentes modelos experimentais, têm demonstrado que acetilcolina aumenta a liberação de insulina agindo diretamente sobre os receptores muscarínicos, (subtipo M_3) das células B (WOODS & PORTE, 1974; HERMANS, SCHMEER & HENQUIN, 1986; BOSCHERO et al, 1995; BORDIN et al, 1995). Esses receptores muscarínicos estão acoplados a uma fosfolipase C e

tem seu efeito mediado por proteína G (HENQUIN & NENQUIN, 1988; SANTOS & ROJAS, 1989; VERCHERE, KWAK & BROWN, 1991; BOSCHERO et al, 1995).

Em presença de concentrações fisiológicas de cálcio, a acetilcolina induz despolarização da membrana das células B, podendo resultar em um influxo de Na^+ e/ou Ca^{2+} na célula (COOK, CRILL & PORTE, 1981; HENQUIN et al, 1988; SANTOS & ROJAS, 1989; HUGHES, CHALK & ASHCROFT, 1990 & GILON & HENQUIN, 1993). Acúmulo intracelular de Na^+ pode mobilizar Ca^{2+} de estoques distintos daqueles sensíveis ao IP_3 . Finalmente, a geração de diacilglicerol, como um produto do aumento do turnover do fosfatidil inositol, ativa a PKC, aumentando assim a secreção de insulina (HENQUIN et al, 1988; PRENTKI & MATISCHINSKY, 1987). Baseado na literatura, avaliamos em ilhotas provenientes de animais hipoprotéicos a liberação de insulina durante 1h frente a concentrações crescentes de CCh (Fig. 2), agonista semelhante a acetilcolina que apresenta uma meia vida mais longa que este hormônio. Esta droga é de grande valor para o estudo da resposta colinérgica em ilhotas de Langerhans (SHIRVAN, POLLARD & HELDMAN, 1991; BOSCHERO et al, 1995). CCh potencializou a secreção de insulina com maior intensidade nas ilhotas de ratos NP que nas ilhotas de ratos LP.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente que a secreção de insulina, estimulada por glicose, está comprometida neste modelo experimental, onde observou-se um deslocamento para a direita da curva dose resposta a esse agente insulínico em relação ao grupo controle (CARNEIRO et al., 1995).

Quando foram adicionados glicose 8.3 mM e concentrações crescentes de CCh ($0,1\mu\text{M}$ - $1000\mu\text{M}$), verificamos que a EC_{50} das ilhotas dos animais LP foi de 4.64 ± 0.98 e que a EC_{50} das ilhotas dos animais NP foi de 2.15 ± 0.70 . Este resultado demonstrou que a

restrição protéica, a que foram submetidos esses animais, além de comprometer a resposta secretória à glicose, também interferiu com as vias envolvidas na potencialização induzida por CCh. Uma crítica que poderia surgir frente a esta conclusão, seria o tempo em que estas ilhotas ficaram exposta ao carbacol (1h), pois poderia estar induzindo um falso resultado, já que as ilhotas acumulam diversas substâncias no meio onde se encontram, sendo estas substâncias inibitórias ou estimulatórias sobre a secreção de insulina. Em função disto, verificamos a secreção de insulina minuto a minuto em 8.3 e 16.7 mM de glicose em presença de CCh (Fig. 3A, 3B, 5A e 5B) e observamos o mesmo comportamento. As ilhotas de ratos LP tiveram um menor incremento na secreção de insulina quando comparadas às ilhotas de ratos NP.

O cálcio ionizado é um dos sinais mais comuns de transdução de sinais para as células e, diferentemente de outros segundos mensageiros, é requerido para a manutenção da vida, e sua permanência livre no citosol, por períodos prolongados, pode levar a morte celular. Ions cálcio não sofrem transformação como outras moléculas consideradas segundos mensageiro; assim, a célula regula os níveis intracelulares de cálcio através de vários ligantes e compostos especializados na sua liberação para o citosol (CLAPHAM, 1995).

A monitoração do efluxo do ^{45}Ca de ilhotas previamente marcadas revela que a glicose e outros secretagogos, exerce um duplo efeito sobre seu efluxo (HERCHUELZ, COUTURIER & MALAISSE, 1980). Primariamente provoca uma queda inicial, seguida de um aumento na taxa do efluxo do isótopo (TENGHOLM, HELMAN & GYLFE, 1999). Essa queda inicial do efluxo de ^{45}Ca poderia ser consequência de uma real redução na taxa de efluxo ou de um aumento na recaptação do ^{45}Ca por organelas intracelulares. O aumento secundário corresponde aos processos de troca $^{40}\text{Ca}/^{45}\text{Ca}$ que reflete a taxa de entrada do

$^{40}\text{Ca}^{2+}$ nas células das ilhotas (MALAISSE, BRISSON & BAIRD, 1973; GYLFE & HELLMAN, 1978; HERCHUELZ & MALAISSE, 1978; KIKUCHI et al 1978; BOSCHERO et al, 1990; TENGHOLM, HELMAN & GYLFE, 1999).

Diante deste princípio avaliamos a permeabilidade do referido íon em presença de diferentes concentrações de glicose acrescida de CCh (100 μM), (Fig 4A, 4B, 6A e 6B). As Ilhotas provenientes de ratos LP, expostas a CCh em presença de 8.3 mM de glicose, foram capazes de mobilizar mais cálcio que as ilhotas de ratos NP. Apesar deste aumento no efluxo de cálcio, as ilhotas de ratos LP não conseguiram secretar quantidades de insulina semelhante às ilhotas de ratos NP. Em 16.7 mM de glicose observamos que as ilhotas provenientes de ratos NP responderam elevando seu efluxo de cálcio e igualando-se ao grupo LP (Fig. 5A, 5B, 6A e 6B). As ilhotas de ratos NP responderam de forma mais eficaz em 16.7 mM de glicose, enquanto as ilhotas de ratos LP não conseguiram responder de forma similar, pois o efluxo de cálcio nas ilhotas de ratos LP atingiu seu máximo em 8.3 mM de glicose. Este resultado sugere que o sistema de mobilização de cálcio nas ilhotas de ratos LP estão operando com sua capacidade total em 8.3 mM de glicose, enquanto que as ilhotas de ratos NP estão com o sistema menos sobrecarregado e são capazes de aumentar seu efluxo em presença de 16.7 mM de glicose. Este comportamento das ilhotas de ratos LP nos sugere ainda que há uma necessidade de grandes quantidades de íon cálcio para que estas ilhotas possam secretar insulina, mesmo que esta secreção não se iguale à secreção das ilhotas de ratos NP.

Mensageiros intracelulares também regulam a secreção de insulina pela célula B. A PKC é um segundo mensageiro ativado durante a quebra dos fosfoinosítídeos (METZ, 1988). O mecanismo preciso pelo qual a ativação da proteína quinase C (PKC) estimula a

secreção de insulina não está ainda esclarecido, mas sabe-se que a ativação dessa proteína está relacionada com a alteração do fluxo de K^+ e de Ca^{2+} nas células B e em outros tecidos (WOLLHEIM et al., 1988; MALAISSE et al., 1985; BERGGREN, ARKHANMMAR & NILSSON, 1989; JONES, PERSAUD & HOWELL, 1991).

Ativadores exógenos da PKC, tais como ésteres de forbol (TPA ou PMA) ou análogos do diacilglicerol, estimulam a translocação desta proteína quinase em ilhotas de ratos (EASOM et al., 1989; PERSAUD et al., 1989b). TPA em concentrações nanomolares estimula as PKCs, que por sua vez estimulam a secreção de insulina, demonstrando o papel fundamental desta quinase na regulação da secreção do hormônio (BERGGREN, ARKHAMMAR & NILSSON, 1989).

Observamos que os valores absolutos da secreção de insulina, estimuladas por 1 h, em presença de 8.3 ou 16.7 mM de glicose na presença ou ausência de PMA (200nM) foram mais altos nas ilhotas provenientes de ratos NP quando comparadas às ilhotas de ratos LP (Fig.9A e 9B). As Fig.9A e 9B mostraram também a secreção relativa de insulina, isto é, a condição estimulada com PMA em relação ao seu respectivo basal (8.3 ou 16.7 mM de glicose). Em 8.3 mM de glicose as ilhotas NP apresentaram uma secreção de insulina relativa maior que as ilhotas LP. Quando aumentamos a concentração de glicose para 16.7mM, as ilhotas de ratos LP passaram a apresentar uma secreção relativa maior que as NP. Este comportamento poderia indicar que em concentrações supralimíares de glicose (16.7 mM), a maquinaria exocitótica, incluindo a enzima PKC, é capaz de responder mais eficientemente ao PMA. Mesmo com o sistema altamente responsivo, as ilhotas de ratos LP não conseguiram secretar quantidades absolutas de insulina semelhantes às aquelas secretadas pelas ilhotas NP.

Da mesma forma, quando analisamos a secreção de insulina minuto a minuto, em presença de PMA e CCh, as ilhotas de ratos NP continuaram secretando mais insulina que as ilhotas LP (**Fig.7A e 7B**). Com estes resultados sugerimos que há possibilidade de alterações na enzima PKC em ilhotas provenientes de ratos LP, uma vez que estes potencializadores não foram capazes de estimular a secreção de insulina em ilhotas LP comparadas ao grupo NP.

Várias isoformas de PKCs são encontradas na célula beta, sendo que a isoforma dominante entre as PKCs clássicas (dependentes de cálcio e sensíveis a DAG) é a PKC α (ARKHAMMAR et al., 1994; GANESAN et al., 1990; ZAITSEV et al., 1995). As PKCs são responsáveis por diminuir os níveis de cálcio citoplasmático em células beta, modulando os canais de cálcio voltagem dependentes (Ca_v) (NAKAMURA et al., 2001). Baseado nestes dados da literatura, avaliamos o efluxo do ⁴⁵Ca em presença de PMA, nas ilhotas em estudo (**Figs. 8A, 8B**) e observamos que as ilhotas LP foram mais hábeis em aumentar a taxa efluxo do referido isótopo somente quando associou-se 100nM de PMA e 100 μ M de CCh (**Figs. 8A e 8B**). Esta resposta pôde mais uma vez, nos sugerir alterações na enzima PKC, pois como já mencionado anteriormente, existe uma relação entre PKC e diminuição do influxo de cálcio para o citosol da célula beta (NAKAMURA et al., 2001).

Desta forma pode-se sugerir que a PKC, estando diminuída em ilhotas de ratos LP, seria responsável, pelo menos em parte, pelo aumento do efluxo de cálcio.

5.3 – Expressão de enzimas fundamentais na estimulação colinérgica

Com base em resultados obtidos até o momento realizou-se experimentos para verificar se a quantidade de PKC α das ilhotas LP poderia estar alterada. Pela técnica de imunohistoquímica em pâncreas isolado foi verificado uma redução dos níveis de PKC α em ilhotas de ratos LP (Figs. 10A e 10B). Quantificamos a enzima por Western Blotting e encontramos uma redução de 30% na quantidade de proteína nas ilhotas provenientes de animais LP (Fig. 11B).

Confirmada a diminuição da expressão da PKC α verificamos se o problema da diminuição da expressão da enzima poderia ser transcricional. Para isto realizamos o RT-PCR para a enzima em questão e obtivemos uma diminuição também nos níveis de mRNA (Fig. 12A), mostrando que a transcrição do gene que codifica a enzima PKC α está diminuída.

As PKCs tem capacidade de fosforilar as PLCs e diminuir sua atividade quando esta última está sendo estimulada por cálcio (LITOSCHI, 1996). Baseado nesta informação uma hipótese seria que as PLCs (dependentes de cálcio) estariam mais ativas, uma vez que a diminuição da PKC α levaria a um maior influxo de cálcio e a uma menor fosforilação das PLCs. Com a maior ativação das PLCs os níveis de DAG e IP3 também estariam aumentados, levando a uma maior mobilização de cálcio do retículo para o citoplasma. Estes eventos poderiam explicar o maior efluxo de cálcio encontrado em ilhotas provenientes de ratos LP estimuladas com CCh.

Sabendo da relação existente entre as PKCs e as PLCs verificamos ainda a expressão da PLC β 1, já que detectamos redução nos níveis da PKC α em ilhotas de ratos

LP. Para nossa surpresa também encontramos uma diminuição no conteúdo da PLC β 1, que é a principal enzima envolvida na quebra de fosfolipídios durante a estimulação muscarínica (Fig. 13A).

Diante dos resultados encontrados, a redução das enzimas PKC α e PLC β 1 comprometeu a secreção de insulina potencializada por CCh e PMA em presença de glicose. Frente a esta situação, as células B das ilhotas provenientes de animais LP poderiam estar mobilizando mais cálcio para tentar normalizar o processo secretório (uma vez que estas enzimas, entre outras, são dependentes de cálcio). Na prática não é o que ocorre, pois mesmo aumentando os níveis de cálcio, as ilhotas de ratos LP não foram capazes de secretar valores absolutos semelhantes às ilhotas de ratos NP, indicando que este mecanismo compensatório não foi suficiente para suprir a deficiência das enzimas PKC α e PLC β 1 entre outras possíveis alterações ocasionadas pela restrição protéica.

Pode-se especular que a quantidade de proteínas que o animal recebeu durante seu desenvolvimento foi fundamental para o controle da expressão gênica de diversas enzimas, dentre elas enzimas relacionadas com a cascata de eventos que culminam com a secreção de insulina. Estas alterações podem ser vistas como alterações adaptativas ao estresse nutricional ao qual o animal foi submetido, e possivelmente teria o objetivo de manter a homeostase do animal.

As alterações no conteúdo das enzimas PKC α e PLC β 1, apresentada neste modelo experimental, permitiram explicar, pelo menos em parte, a pobre resposta secretória e o maior efluxo de cálcio encontrado em ilhotas de ratos LP, frente a potencialização com CCh e PMA em presença de glicose.

Desta forma ratos submetidos a restrição protéica tiveram seu conteúdo enzimático comprometido, incluindo enzimas envolvidas no processo de secreção de insulina estimulada por glicose e potencializada por CCh. A longo prazo é possível que estas alterações possam contribuir para distúrbios na homeostase glicêmica do animal.

VI – CONCLUSÃO

6 - CONCLUSÃO

O período de restrição protéica a que os animais foram submetidos, conferiu uma redução de enzimas chave ($PKC\alpha$ e $PLC\beta 1$) no processo de secreção de insulina estimulada por glicose e potencializada por CCh. Isto poderia explicar em parte a redução absoluta da secreção de insulina e o aumento do efluxo de cálcio apresentado neste modelo experimental.

REFERÊNCIAS

- Alleyne, G. A. O., Trust, P. M., Flores, H., Robinson, H. (1972). Glucose tolerance and insulin sensitivity in malnourished children. **Br J Nutr** 27: 585-92.
- Angelis, R., Fisiologia de nutrição. São Paulo: Edart., 285p, 1977.
- Arkhammar, P., Juntti-Berggren, L., Larsson, O., Welsh, M., Nanberg, E., Sjöholm, A., Kohler, M., Berggren, P. O. (1994). Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the beta-cell voltage-activated Ca^{2+} channels. **J Biol Chem** 269(4): 2743-9.
- Ashcroft, F. M. (1988). Adenosine triphosphate sensitive K^{+} channels. **A Rev Neurosc** 11: 97-118.
- Ashcroft, F. M., Harrison, D. E., Ashcroft, S. J. H. (1984). Glucose induces close of single potassium channels in isolated rat pancreatic B cells. **Nature** 312: 446-48.
- Bailey, C. J., Flatt, P. R. (1988). The enteroinsular axis in models of hyperinsulinaemic and hypoinsulinaemic diabetes. In: *Frontiers in Diabetes Research: Lessons from Animal Diabetes* (2) 217-24 [Ed: Shafrir, E., Renold, A. E.]. Chichester: John Libbey.
- Bansal S. K., Jaiswal A. S., Kathayat R., Basir S. F., Misra U. K. (1996). Effect of dietary manipulation on translocation of protein kinase C activity in various tissues. **Indian J Exp Biol Mar** 34(3): 197-200.
- Becker, D.J., Pimstone, B.L., Hansen, J. D. L., Hendricks, S. (1971). Insulin secretion in protein-calorie malnutrition. Quantitative abnormalities and response to treatment. **Diabetes** 20: 542-51.
- Berggren, P. O., Arkhammar, P., Nilsson, T. (1989). Activation of protein kinase C assists insulin producing cells in recovery from raised cytoplasmic Ca^{2+} by stimulating Ca^{2+} efflux. **Biochem Biophys Res Commun** 165(1): 416-21.

- Berthoud, H. R., Bereiter, D. A., Trimble, E. R., Siegel, E. G., Jeanrenaud, B. (1981). Cephalic phase, reflex insulin secretion. Neuroanatomical and physiological characterization. **Diabetologia** 20 Suppl: 393-401.
- Bordin, S., Boschero, A. C., Carneiro, E. M., Atwater, I. (1995). Ionic mechanisms involved in regulation of insulin secretion by muscarinic agonists. **J Membrane Biol** 148: 177-84.
- Boschero, A. C., Bordin, S., Herchuelz, A., Lebrun, P. (1990). Effects of glucose on ^{45}Ca outflow, cytosolic Ca^{2+} concentration and insulin release from freshly isolated and cultured adult rat islets. **Cell Calcium** 11: 603-9.
- Boschero, A. C., Glasman, M. S., Carneiro, E. M., Bordin, S., Paul, I., Rojas, E., Atwater, I. (1995). Potentiation of glucose-induced insulin from rat pancreatic islets by oxotremorine-m involves M3 muscarinic cholinergic receptor. **Am J Physiol** 268(2 Pt 1): E336-42.
- Boyd, A. E. III, Bryan, L. A., Bryan, J., Kunze, D. L., Moss, L., Nelson, D. A., Rajan, A. S., Raef, H., Xiang, H., Yaney, G. C. (1991). Sulfonylurea signal transduction. **Rec Prog. Horm Res** 47: 299-317.
- Brown, A. M., Birnbaumer, L. (1988). Direct G-protein gating of ion channels. **Am J Physiol** 254: 401-10.
- Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Gobatto, C. A., Boschero, A. C. (1995). Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and ^{45}Ca uptake by pancreatic rat islets. **J Nutr Biochem** 6: 314-18.
- Carneiro, E. M. (1996). Participação dos íons Ca^{2+} e K^{+} no processo de acoplamento estímulo/secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos submetidos à

- dieta deficiente em proteína. **Tese de Doutorado**. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP.
- Carpinelli, A. R. (1978). Estudo da secreção de insulina e da homeostase glicêmica em ratos desnutridos. **Tese de Doutorado**. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, USP.
- Caterral, W. A., Epstein, P. N. (1992). Ions channels. **Diabetologia** 35: 223-33.
- Caterral, W. A. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annu Rev Biochem** 64: 493-531.
- Chaves, N. Nutrição básica e Aplicada. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 1985.
- Chay, T. R. (1987). The effects of inactivator of calcium channels by intracellular Ca^{2+} ions bursting pancreatic β -cells. **Cell Biophys** 11: 77-90.
- Christensen N. J. (1979). Catecholamines and diabetes mellitus. **Diabetologia** 16: 211-24.
- Claeyenssens, S., Lavoinne, A., Fresl-Ragot, M., Bois-Joyeux, B., Chanez, M., Peret, J. (1990). Metabolic changes in rats fed a low protein diet during post-weaning growth. **Metabolism** 39: 676-81.
- Clapham, D. E. (1995). **Calcium Signaling** Cell 80: 259-68.
- Cook, D. L., Hales, C. N. (1984). Intracellular ATP directly blocks K^{+} channel in pancreatic beta cells. **Nature** 311: 271-73.
- Cook, D. L., Crill, W. E., Porte, D. (1981). Glucose and acetylcholine have different effects on the pacemaker potential of pancreatic islet cells. **Diabetes** 30: 558-61.
- Cook, G. C. (1967) Glucose tolerance after kwashiorkor. **Nature** 215: 1295-6.
- Crace, C. J. (1990). Protein-Energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. **Diab Metabol** 16: 484-91.

- Dahri, S., Snoeck, A., Reusens-Billen, B., Remacle, C., Hoet, J. J. (1991). Islets function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. **Diabetes** 40(2): 115-20.
- Diani, A. R., Peterson, T., Gilchrist, R. J. (1983). Islet innervation of nondiabetic and diabetic Chinese hamsters. Acetylcholinesterase histochemistry and norepinefrine fluorescence. **J Neur Trans** 56: 223-38.
- Doumas, B. T., Watson, W. A., Biggs, H. G. (1971). Albumin standards and measurements of serum albumin with bromocresol green. **Clin Chim Acta** 31: 87-96.
- Easom, R. A., Hughes, J. H., Landt, M., Wolf, B. A., Turk, J., McDaniel, M. L. (1989). Comparison of effects of phorbol esters and glucose on protein kinase C activation and insulin secretion in pancreatic islets. **Biochem J** 264: 27-33.
- Flatt, P. R. (1996). Hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. **In: Textbook of Diabetes**, 9.1-9.7 [Ed: Pickup, J. C., Williams, G]. Oxford: Blackwell.
- Fredholm, B. B., Dunér-Engstrom, M., Fastbom, J., Hu, P. S., Der Ploeg, I. V. (1991) Role of G protein, cyclic AMP, and ion channel in the of transmitter release by adenosine. **Ann N Y Acad Sci** 276-88.
- Gagerman, E., Idahl, L. A., Meissner, H. P., Täljdal, I. B. (1978). Insulin release, cGMP, cAMP, and membrane potential in acetylcholine-stimulated islets. **Am J Physiol** 235: E493-E500.
- Galdino, R., Almeida, C. C. S., Luciano, E., Mello, M. A. R. (2000). Protein malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to exercise-training. **Nutrition Research** 20: 527-35.

- Ganesan, S., Calle, R., Zawulich, K., Smallwood, J. I., Zawulich, W. S., Rasmussen, H. (1990). Glucose-induced translocation of protein kinase C in rat pancreatic islets. **Proc Natl Acad Sci U S A** 87(24): 9893-7.
- Garrett, R. H., Charles, C. M. (1995). **Biochemistry**. Editora: Copyright, 1100p.
- Gepts, W., Lecompt, P. M. (1981). The pancreatic islets in diabetes. **Am J Med** 70: 105-9.
- Gilon, P., Henquin, J. C. (1993). Activation of muscarinic receptors increases the concentration of free Na^+ in mouse pancreatic B-cells. **FEBS Letters** 315: 353-6.
- Grapengiesser, E., Gylfe, E., Hellman, B. (1989). Three types of cytoplasmic Ca^{2+} oscillations in stimulated pancreatic B-cells. **Arch Biochem Biophys** 268: 404-7.
- Grodsky, G. M. (1989). A new phase of insulin secretion. How will it contribute to our understanding of β cell function? **Diabetes**, 38: 673-8.
- Grodsky, G. M. (1996). Kinetics of insulin secretion: current implications. In: Diabetes Mellitus, 12-20. [Ed: Le Roith, D., Taylor, S. I., Olefsky, J. M.]. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Gylfe, E., Hellman, B. (1978). Calcium and pancreatic-cell function: Mobilisation of glucose sensitive ^{45}Ca from perfused islets rich in β -cells. **Biochim Biophys Acta** 436: 249-57.
- Hadescov, C. J. (1980). Mechanism of glucose induced insulin secretion. **Physiol Rev** 60: 442-509.
- Hales, C. N., Barker, D. J. P. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia** 35: 595-601.
- Heard, C. R. C., Turner, M. R. (1967). Glucose tolerance and related factors in dogs fed diets of suboptimal protein value. **Diabetes** 16: 96-107.

- Heard, C. R. C., Franji, S. M., Wright, P. M., McCartney, P. R. (1977). Biochemical characteristics of different forms of protein-energy malnutrition: an experimental model using young rats. **Br J Nutr** 37: 1-21.
- Henquin, J. C., Nenquin, M. (1988). The muscarinic receptor subtype in mouse pancreatic B-cells. **FEBS Lett** 236: 89-92.
- Henquin, J. C., Garcia, M. C., Bozem, M., Hermans, M. P., Nenquin, M. (1988). Muscarinic control of pancreatic β -cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium-influx. **Endocrinol** 122: 2134-42.
- Herchuelz, A., Malaisse, W. J. (1978). Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: dissociation between calcium and insulin release. **J Physiol** 283: 409-24.
- Herchuelz, A., Couturier, E., Malaisse, W. J. (1980). Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: glucose-induced calcium exchange. **Am J Physiol** 238: 96-103.
- Hermans, M. P., Schmeer, W., Henquin, J. C. (1986). Why is acetylcholine a potentiator and not an initiator of insulin release? **Diabetologia** 29: 548A-549A.
- Holst, J. J. (1992) Role of classical and peptidergic neurotransmitters in insulin secretion. **In: Nutrient Regulation of Insulin Secretion**, 23-39. [Ed: Flatt, P. R.]. London: Portland Press Ltd.
- Huang, P.K. (1989). The mechanism of protein kinase C activation. **Trend Biochem Sci** 12(11): 425-31.
- Hughes, S. J., Chalk, J. G., Ashcroft, S. J. H. (1990). The role of cytoplasmic free Ca^{2+} and protein kinase C in acetylcholine induced insulin release in the clonal B-cell line, HIT-T15. **Biochem J** 267: 227-32.

- Hunter, M., Lopes, A. G., Boulpapep, E. I., Giebisch, G. (1984). Single-channel recordings of calcium-activated K^+ channel in the apical membrane of rabbit cortical collecting tubules. **Proc Nat Acad Sci** 81: 4237-39.
- Jones, P. M., Persuaud, S. J., Howell, S. L. (1991). Protein kinase C and the regulation of insulin secretion from pancreatic B cells. **J Mol Endocr** 6: 121-7.
- Kathayat R., Jaiswal A. S., Basir S. F., Bansal S. K. (1997). Dietary protein deficiency induced changes in protein kinase C activity and phospholipid metabolism in rat hepatocytes. **Indian J Exp Biol Sep** 35(9): 972-6.
- Kikuchi, M., Wollheim, C. B., Cuended, G. S., Renold, A. E., Sharp, G. W. G. (1978). Studies on the dual effects of glucose on ^{45}Ca efflux from isolated rat islets. **Endocrinol** 102: 1339-49.
- Kukuljan, M., Gonçalves, A. A., Atwater, I. (1991). Charybdotoxin-sensitive $K_{(\text{Ca})}$ channel is not involved in glucose-induced electrical activity in pancreatic β -cells. **J Mem Biol** 119: 187-95.
- Kumar, V., Deo, M. G., Ramalingaswami, V. (1972). Mechanism of fatty liver in protein deficiency. **Gastroenterology** 62: 445-51.
- Latorraca, M. Q., Carneiro, E. M., Boschero, A. C., Mello, M. A. R. (1998a). Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. **Br J Nutr** 80: 291-7.
- Latorraca, M. Q., Reis, M. A. B., Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Velloso, L. A., Saad, M. J. A., Boschero, A. C. (1998b). Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. **J Nutr** 128: 1643-9.

- Latorraca, M. Q., Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Boschero, A. C. (1999). Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with a diminished calcium uptake. **J Nutr Biochem** 10: 37-43.
- Leahy, J. L. (1996). Detrimental effects of chronic hyperglycemia on the pancreatic β -cell. In: Diabetes Mellitus, 103-13. [Ed: Le Roith, D., Taylor, S. I., Olefsky, J. M.]. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Lewis, E. M., Feldman, R. S. (1964). The depressive effect of chlordiazepoxide on a negative incentive. **Psychopharm** 6(2): 143-50.
- Litosch, I. (1996). Protein kinase C inhibits the Ca^{2+} -dependent stimulation of phospholipase C-beta 1 in vitro. **Rec Sig Trans** 6(2): 87-98.
- Lunn, P. G., Austin, S. Differences in nitrogen metabolism between protein and energy deficient rats with similary restricted growth rates (1983). **Ann Nutr Metab** (27) 242-51.
- Malaisse, W. J., Brisson, G. R., Baird, L. E. (1973). Stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. Effect of glucose on ^{45}Ca efflux from perfused islets **Am J Physiol** 224: 389-94.
- Malaisse, W. J., Dufrane, S., Mathias, P. C. F., Carpinelli, A. R., Malaisse-Lagae, F., Garcia-Morales, P., Valverde, I., Sener, A. (1985). The coupling of metabolic to secretory events in pancreatic islets. The possible role of glutathion reductase. **Biochim Biophys Acta** 844: 256-264.
- Marty, A. (1981). Ca^{+2} -dependent K^{+} channel with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. **Nature** 291: 497-500.

- Mathias, P. C. F., Carpinelli, A. R., Billaudel, B., Garcia-Morales, P., Valverde, I., Malaisse, W. J. (1985). Cholinergic stimulation of ion fluxes in pancreatic islets. **Biochem Pharmacol** 43: 3451-7.
- McCleskey, M. C., Fox, A. P., Feldman, D., Tisien, R. W. (1986). Different types of calcium channels. **J Exp Biol** 124: 177-90.
- Mello, M. A. R., Cury, L. (1989). Circulating thyroid hormone levels in young pregnant rats and their fetuses. Effects of malnutrition. **Ann Nutr Metab** 33: 181-7.
- Metz, S. A. (1988). Is protein kinase C required for physiologic insulin release? **Diabetes** 37: 3-7.
- Minami, K., Fukuzawa, K., Nakaya, Y. (1993). Protein kinase C inhibits the Ca^{2+} -activated K^{+} -Channel of cultured coronary artery smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun** 15:263-269.
- Morris, A. P., Gallacher, D. V., Lee, J. A. C. (1986). A large conductance, voltage and calcium-activated K^{+} channel in the basolateral membrane of rat enterocytes. **FEBS Lett** 206: 87-92.
- Nair, S. C., Toshkov I. A., Yaktine, A. L., Barnett T. D., Chaney W. G., Birt D. F. (1995). Dietary energy restriction-induced modulation of protein kinase C zeta isozyme pancreas. **Mol Carcinog** 14(1): 10-5.
- Nakamura, J., Suda, T., Ogawa, Y., Takeo, T., Suga, S., Wakui, M. (2001). Protein kinase C-dependent and -independent inhibition of Ca^{2+} influx by phorbol ester in rat pancreatic beta-cells. **Cell Signal** 13(3): 199-205.
- Nenquin, M., Awouters, P., Mathot, F., Henquin, J. C. (1984). Distinct effects of acetylcholine and glucose on ^{45}Ca and ^{86}Rb efflux from mouse pancreatic islets. **FEBS Lett** 176: 457-61.

- Newsholme, E. A., Leech, A. R. (1984). In: Biochemistry for the medical sciences. [Ed: John W.]. Sons. 952p.
- Nowycky, M. C., Fox, A. P., Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. **Nature** 316: 440-3.
- Okitolonda, W., Brichard, S. M., Henquin, J. C. Repercutions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat (1987). **Diabetologia**, v.30, p.946-951.
- Persaud, S., Jones, P. M., Sugden, D., Howell, S. L. (1989). Traslocation of protein kinase C in rat islets of langerhans: effects of a phorbol ester, carbacol and glucose. **FEBS Letters**, 245: 80-84.
- Petersen, O. H., Findlay, Z. (1987). Electrophysiology of the pancreas. **Physiol Rev** 67: 1054-116.
- Prentki, M. Matschinsky, F. M. (1987). Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. **Physiol Rev** 67: 1185.
- Powley, T. L. (1977). The ventromedial hypothalamic syndrome, satiety, and a cephalic phase hypothesis. **Psychol Rev** 84(1): 89-126.
- Proietto, J., Filippis, A., Nakhla, C., Clark, S. (1999). Nutrient-induced insulin resistance. **Mol Cell Endocrinol** 151(1-2): 143-9.
- Rajan, A. S., Hill, R. S., Boyd III, A. E.(1989). Effect of rise in cAMP levels in Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels in Hit cells: second-messenger synarchy in β -cells. **Diabetes** 38: 874-80.
- Rajan, A. S., Aguilar-Bryan, L., Nelson, D. A., Yaney, G. C., Hsu, W. H., Kunze, D. L., Boyd III, A. E. (1990). Ion channels and insulin secretion. **Diabetes Care** 13: 340-67.

Rao, R. H. (1988). Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence?
Endocrine Rev. 9: 67-87.

Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes** 37: 1595-1607.

Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey, C. G. Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: report of the American Institute of Nutrition ad hoc working committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J Nutr** 123: 1939-51.

Santos, R. M., Rojas, E. (1989). Muscarinic receptor modulation of glucose electrical activity in mouse pancreatic B-cell. **FEBS Lett** 249: 411-17.

Sener, A., Blacher, J., Rasschaert, J., Malaisse, W. J. (1990). Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release: comparison with histidine-induced insulin release. **Endocrinol** 127:107-113.

Shils, M. E., Olson, J. A., Shike, M. (1994). **In: Modern nutrition in health and disease.** [Ed: Lea & Febiger]. Philadelphia: USA, 923p.

Shirvan, M. H., Pollard, H. B., Heldman, E. (1991). Mixed nicotinic and muscarinic features of cholinergic receptor coupled to secretion in bovine chromaffin cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88(11): 4860-4.

Smith, S. R., Edgar, P. J., Pozefsky, T., Chetri, M. K., Prout, T. E. (1975). Insulin secretion and glucose tolerance in adults with protein-calorie malnutrition. **Metabol** 24: 1073-84.

Sturgess, N. C, Ashford, M. L. J, Carrington, C. A., Hales, C. N. (1986). Single channel recordings of potassium currents in an insulin-secreting cell line. **J Endocr** 109: 201-7.

Sutter, B. C. J. (1982). Regulation hormonale de la secretion de l'insuline. **J Physiol (Paris)** 78: 119-30.

- Swenne, I., Crace, C. J., Milner, R. D. G. (1987). Persistent impairment of insulin secretory response to glucose in adult rats after limited period of protein-calorie malnutrition early life. **Diabetes** 36: 454-8.
- Teff, K. L., Engelman, K. (1996). Oral sensory stimulation improves glucose tolerance in humans: effects on insulin, C-peptide, and glucagon. **Am J Physiol** 270 (6 Pt 2): R1371-9.
- Tengholm, A., Hellman, B., Gylfe, E. (1999). Glucose regulation of free Ca^{2+} in the endoplasmic reticulum of mouse pancreatic beta cells. **J Biol Chem** 274(52): 36883-90.
- Trinidad, L. Q., Christophe, M., Bernard, P. (1998). Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired β -Cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. **Endocrinol** 139(8): 3382-9.
- Trindade, C. E. P., Nóbrega, F. J., Tonete, S. S. Q. (1986). Repercussões metabólicas da desnutrição protéico-calórica. In: Desnutrição intra-uterina e pós-natal. [Ed: Nóbrega, F. J.]. São Paulo: Panamed editorial.
- Trinder, P. (1969) Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J Clin Path** 22: 158-61.
- Verchere, C. B., Kwok, Y. N., Brown, J. C. (1991). Modulation of acetylcholine-stimulated insulin release by glucose and gastric inhibitory polypeptide. **Pharmacol** 42: 273-82.
- Weinkove, C., Weikove, E. A., Pimstone, B. L (1976). Glucose tolerance and insulin release in malnourished rats. **Clin Sci Mol Med** 50: 153-63.
- Who Study group on diabetes mellitus (1985). **Who Tech Rep Ser** 53: 12.
- Widowson, E. M., McCance, R. A. (1957). Effect of low protein diet on chemical composition of the bodies and tissues of young rats. **Br J Nutr** 11: 198-206.

- Wikes, L. J., Fiorotto, M., Burrin, D. G., Del Rosario, M., Frazer, M. E., Pond, W. G., Jahoor, F. (1996). Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. **J Nutr** (126) 1481-8.
- Wollheim, C. B., Dunne, M. J., Peter-Riesch, B., Bruzzone, R., Pozzan, T., Petersen, T. (1988). Activators of protein kinase C depolarize insulin-secreting cells closing K^+ channels. **Embo J** 7: 2443-9.
- Wollhiem, C. B., Sharp, G. W. G. (1981). Regulation of insulin release by calcium. **Physiol Rev** 61: 914-73.
- Woods, S. C., Porte, D. (1974). Neural control of the endocrine pancreas. **Physiol Rev** 54: 595-9.
- Zaitsev, S. V., Efendic, S., Arkhammar, P., Bertorello, A. M., Berggren, P. O. (1995). Dissociation between changes in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration and insulin secretion as evidenced from measurements in mouse single pancreatic islets. **Proc Natl Acad Sci U S A** 92(21): 9712-6.
- Zavaroni, I., Bonini, L., Fantuzzi, M., Dall'aglio, E., Passeri, M., Reaven, G. M. (1994). Hyperinsulinaemia, obesity, and syndrome X. **J Intern Med** 235(1): 51-6.
- Zawalich, W. S. (1988) Modulation of insulin secretion from β -cells by phosphoinositide-derived second-messenger molecules. **Diabetes** 37:137-41.

APÊNDICE

Resultados das análises estatísticas (ANOVA).

	G.L.	F	P
Fig 3B			
1- Estado Nutricional	1	63.5601	0.000004
2 – Droga (CCH)	1	117.0422	0.000001
3 – Interação	1	15.7344	0.001871

Fig 5B			
1- Estado Nutricional	1	52.12836	0.000011
2 – Droga (CCH)	1	54.39481	0.000009
3 – Interação	1	6.70071	0.023720

Fig 7B			
1- Estado Nutricional	1	22.5848	0.000015
2 – Droga (TPA)	1	31.85235	0.000001
3 – Interação	1	0.25897	0.612865

Fig 9A			
1- Estado Nutricional	1	64.28529	0.000000
2 – Droga (TPA)	3	12.09343	0.000051
3 – Interação	3	0.19481	0.898891

Fig 9B			
1- Estado Nutricional	1	16.78264	0.000442
2 – Droga (TPA)	3	11.00929	0.000111
3 – Interação	3	7.29340	0.001315