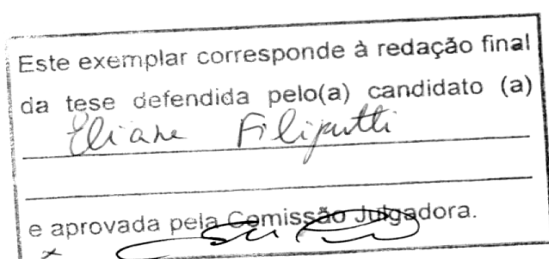




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Eliane Filiputti

**Regulação da Secreção de Insulina em
Ilhotas de Langherhans de Ratos
Submetidos à Restrição Protéica e
Suplementados com Leucina.**



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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

2006

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

F478r

Filiputti, Eliane

Regulação da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans de ratos submetidos à restrição protéica e suplementados com leucina / Eliane Filiputti. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

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

1. Desnutrição. 2. Leucina. 3. Langerhans, Ilhotas de. 4. Glicose. 5. Cálcio. I. Carneiro, Everardo Magalhães. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Regulation of insulin secretion in islets from rats submitted a low protein diet and leucine supplementation.

Palavras-chave em inglês: Malnutrition; Leucine; Islands of Langerhans; Glucose; Calcium.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Everardo Magalhães Carneiro, Ângelo Rafael Carpinelli, José Camillo Novello, Carla Roberta de Oliveira Carvalho, Mario Abdala Saad.

Data da defesa: 13/03/2006.

Data da Defesa: 13/03/2006

Banca examinadora:



Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro (Orientador)



Prof. Dr. Ângelo Rafael Carpinelli



Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho



Prof. Dr. José Camillo Noyello



Prof. Dr. Mario José Abdala Saad

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Prof. José Barreto Campello Carvalheira

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Resumo

Suspeita-se que a desnutrição intra-uterina e pós-natal produzam mudanças morfológicas e funcionais no pâncreas endócrino e em tecidos periféricos, que se traduzem em insulinopenia e resistência à insulina. Baseado nessas complicações avaliou-se neste trabalho a regulação da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans de ratos e camundongos submetidos à restrição protéica e suplementados com leucina. A suplementação com leucina não modificou hábitos alimentares, ingestão hídrica e o peso corpóreo dos animais em estudo, mas alterou parâmetros bioquímicos importantes como glicose (G), ácidos graxos (AGL) em animais desnutridos. A fosforilação do receptor de insulina (IR) e de seu substrato (IRS-1) foi modificada em fígado e músculo levando a uma melhoria na homeostasia glicêmica em ratos desnutridos. O metabolismo de glicose em ilhotas de ratos controle e desnutridos teve redução após suplementação. O potencial de membrana das células B foi restaurado, o movimento de cálcio citoplasmático e a secreção de insulina estimulada por G e leucina apresentaram aumentados em ilhotas de ratos e camundongos desnutridos. Alterações ocorreram também no perfil eletroforético de proteínas citoplasmáticas após suplementação com leucina em ilhotas de ratos. Expressão gênica e protéica de proteínas chaves na cascata de sinalização de insulina como IR, IRS-1, PI3K, mTOR e S6K-1 se alteraram em resposta à suplementação com leucina em ilhotas de ratos desnutridos, favorecendo vias de crescimento, em especial o aumento da

PI3K a qual resultou em aumento de sua atividade em ilhotas de ratos controle e desnutridos. Por fim, podemos concluir que a suplementação com leucina promoveu modulação da sensibilidade periférica em fígado e músculo de maneira tecido específica. Isto confere uma regulação da homeostase glicêmica de maneira distinta entre animais controle e desnutridos suplementados. Além disso, direcionam para que os sinais metabólicos produzidos pela leucina devam promover seus efeitos, em ilhotas de Langerhans, via dois sensores: a GDH que controla a glutaminólise, e por outro lado está a PI3K que deve exercer seu papel ativando vias envolvidas com a síntese protéica através da mTOR. Estes dois sensores devem atuar sinergicamente participando do rearranjo da concentração citosólica dos íons cálcio, principalmente em ilhotas de animais desnutridos que foram suplementados com leucina.

ABSTRACT

We think that intra-uterine malnutrition and after birth produce morphological and changes in endocrine pancreas and in peripheric tissue that translate insulinopenia and insulin resistance. Based on these complications we have evaluated in this work the insulin secretion regulation in Langerhans islets from rats and mice fed a low protein diet and supplemented with leucine. The leucine supplementation hasn't changed the diet in the hybrid ingest and body weight but has changed important biochemistry standards as glucose (G) and FFA in malnutrition animals. The insulin receptor phosphorylation and its substract have been changed in liver and muscle leading to an increase in glicemic homeostase in malnutrition rats. The glucose metabolism in control and malnutrition rats' islets had one reduction after supplementation. B cells potential membranes were restored; the cytoplasmatic calcium movement and insulin secretion were stimulated by glucose and leucine. They have showed an increased in islets of control and malnourished rats and mice islets. Some alterations have also occurred in the cytoplasmatic protein eletrophoretic profile after leucine supplementation in rats islets. The genetic and protein expression from key enzymes in the insulin cascade signalization as: IR; IRS-1; PI3K; mTOR and S6K-1 have altered in leucine supplementation answer in malnutrition islets rats favoring growth pathways specially PI3K increase which resulted in an increasement of control and malnutrition rats islets activity. In the end we can conclude

that the leucine supplementation has promoted peripheral sensibilization in liver and muscle in specific tissue manner. This confirms one glycaemic homeostasis regulation in distinct manner among control and malnutrition both supplemented animals. Furthermore they lead the metabolic signals produced by leucine should promote their effects in Langerhans islets through sensor ways: GDH which controls glutaminolysis and on the other hand is PI3K that should do its role activating growth pathways through mTOR. These two sensors should work in synergism participating in cytosolic concentration changes of calcium ions mainly in malnutrition animals' islets, which were supplemented.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1 - INTRODUÇÃO.....	2
1.1 – Desnutrição e Diabetes.....	2
1.2 – A Secreção de Insulina.....	5
1.3 – Vias de Sinalização, Síntese protéica e Secreção de Insulina.....	7
2 - OBJETIVO.....	12
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 - Animais e Dietas.....	14
3.2 - Procedimentos experimentais.....	18
4 – Análise Estatística.....	33

5 - RESULTADOS.....	35
5.1 – Caracterização do Modelo Experimental.....	35
5.2 – Avaliação da fosforilação em Tirosina do IR e IRS-1.....	42
5.3 – Volume da Ilhota, Perfil Eletroforético e Oxidação de Nutrientes.....	43
5.4 - Secreção de Insulina em Presença de Glicose.....	50
5.5 – Potencial de Membrana em Repouso e Movimento de Cálcio.....	57
5.6 – Proteínas Envolvidas na Cascata de Sinalização de Insulina em Ilhotas de Langerhans.....	63
6 - DISCUSSÃO.....	78
6.1 – Avaliação do Estado Nutricional e Sensibilidade Periférica.....	78
6.2 – Mecanismo de Secreção de Insulina e Vias de Controle.....	81

6.3 – Suplementação com Leucina e Alterações Fisiológicas.....	87
6.4 – Suplementação com Leucina e Vias de Sinalização em Ilhotas.....	89
7 - CONCLUSÃO.....	94
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca⁺²]_i - Concentração de cálcio intracelular

¹²⁵I – Isótopo do Iodo

⁴⁵Ca – Isótopo do Cálcio

AC - Adenilato ciclase

AMP_c - Monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA - Análise de Variância

ATP - Trifosfato de adenosina

B – Célula beta

AKT/ PKB – Proteína Kinase B

Ca⁺²_(L) - Canais de cálcio sensíveis a voltagem

CCh – Carbamilcolina

DAG - Diacilglicerol

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

G – Glicose

GLUT-4 – Transportador de glicose 4

IP3 - 1,4,5 inositol trifosfato

IR – Receptor de insulina

IRS – Substrato do receptor de insulina

K⁺ - Potássio

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

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

KOH - Hidróxido de potássio

NP – Animais Normoprotéicos

NPL – Animais Normoprotéicos Suplementados com Leucina

LP – Animais Hipoprotéicos

LPL – Animais Hipoprotéicos Suplementados com Leucina

M3 - Receptor muscarínico subtipo M3

MLCK - Quinase da cadeia leve da miosina.

mTOR – alvo de rapamicina em células de mamífero

Na₂SO₄ - Sulfato de sódio.

NP – Animal Normoprotéico

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

PHAS-I – Proteína fosforilada regulada pela insulina

IR – Receptor de Insulina

IRS-1 – Substrato do Receptor de Insulina 1

PKA - Proteína quinase A

PKC α - Proteína quinase C alfa

PLC - Fosfolipase C

PLC β 1 – Fosfolipase C beta 1

PMA – Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

PI3K – Fosfoinositol 3-quinase

SDS - Duodecil sulfato de sódio

AOA – ácido aminooxiacético

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução da massa corpórea

Figura 2 – Relação entre consumo alimentar e massa corpórea

Figura 3 – Consumo hídrico diário

Figura 4 – Proteína fecal

Figura 5 – Porcentagem de gordura abdominal, retro-peritoneal e epididimal em relação ao peso corpóreo

Figura 6 – Avaliação da fosforilação em tirosina de IR em fígado

Figura 7 – Avaliação da fosforilação em tirosina de IRS-1 em fígado

Figura 8 – Avaliação da fosforilação em tirosina do IR em músculo sóleo

Figuras 9 – Avaliação da fosforilação do IRS-1 em músculo sóleo

Figuras 10 – Determinação do volume celular

Figura 11 – Perfil eletroforético em ilhotas

Figura 12 – Oxidação de glicose

Figura 13 – Oxidação de leucina

Figura 14 – Oxidação de glutamina

Figura 15 - Secreção estática de insulina em ilhotas de ratos na presença de 8,3; 11,1; 16,7 e 22,2 mM de glicose

Figura 16A – Secreção estática de insulina em ilhotas de camundongos na presença de 3; 8,3; 11,1; 16,7 e 22,2 mM de glicose

Figura 17 – Secreção estática de insulina em ilhotas de ratos na presença de 2,8 mM de glicose, 20 mM de leucina e 20 mM de arginina

Figura 18 – Secreção estática de insulina em ilhotas de ratos na presença de 16,7 mM de glicose e 5 mM de ácido aminooxiacético (AOA)

Figura 19 – Potencial de membrana intracelular – Pach Clamp – em ilhotas de camundongos

Figura 20 – Dosagem de cálcio intracelular em ilhotas de camundongos

Figura 21 – Western Blot da proteína IR

Figura 22 – Western Blot da proteína IRS-1.

Figura 23 – RT-PCR da proteína Akt.

Figura 24A – RT-PCR da proteína PI3K.

Figura 24B – Western Blot da proteína PI3K.

Figura 24C – Atividade da proteína PI3K.

Figura 25A – RT-PCR da proteína mTOR.

Figura 25 B – Western Blot da proteína mTOR.

Figura 26A – RT-PCR da proteína S6K-1.

Figura 26B – Western Blot da proteína S6K-1.

Figura 27 – RT-PCR da proteína PHAS-I.

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Parâmetros bioquímicos dos animais NP, NPL, LP e LPL

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição das dietas

Quadro 2 - Mistura de Vitaminas

Quadro 3 - Mistura de minerais

Aos meus pais

Luiz Filiputti e Ondina Batista Filiputti

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luiz Filiputti e Ondina Batista Filiputti pela ternura e amor que conduziram minha educação e formação, pelos ensinamentos éticos e preciosos, mesmo que de vez em quando eles tenham sido duros ou não compreendidos por mim no momento apropriado. Amo vocês.

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

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

Aos Professores Dr. Ângelo Rafael Carpinelli, Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho, Dr. José Camillo Novello, Dr. Mario José Abdala Saad, Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva, Dr. José Barreto Campello Cavalheira e Dr. Marcos Hikari Toyama pela participação na banca examinadora e pelo carinho, respeito e admiração.

Aos amigos Thierry, Fabrício, Kleber, Luiz Fernando, Eliana, Morgana, Amon, Letícia, Daniel, Emerielle, Andressa, Kelly, Maria Lúcia, Patrícia, Vanessa, Helena Barbosa, Helena Raposo, Alessandro e Gabriel pela colaboração e carinho.

Ao Prof. Dr. Francisco Martins Bermudo e Dra. Josefina Maria Vegara do Instituto de Bioingenieria – Depto de Biologia Aplicada – Universidade Miguel Hernandez – Alicante – Espanha pela ajuda na confecção dos protocolos de Patch Clamp e dosagem de cálcio citoplasmático.

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

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

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

À CAPES, FAPESP e CNPQ pelo apoio financeiro .

Muito Obrigada

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Desnutrição e Diabetes

Desde a antigüidade reconhece-se o papel do hábito alimentar no desenvolvimento do *diabetes mellitus*. Tradicionalmente, a redução do peso e a baixa ingestão de energia são associados a uma menor incidência e prevalência do diabetes. Nos países desenvolvidos, o padrão de vida sedentário associado à alimentação hipercalórica, pobre em fibras e rica em proteínas, gorduras saturadas e carboidratos simples têm contribuído para o rápido aumento da incidência de *diabetes mellitus* do tipo 2 (**Rao, 1988; Moura & Passos, 2005; Stumvoll et al 2005**). Essa forma de *diabetes mellitus* é geralmente acompanhada de obesidade, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e resistência à insulina, amplamente conhecida por “Síndrome X” (**Reaven, 1988; Fernandez-Twinn et al, 2003; Heywood et al, 2004; Moura & Passos, 2005; Stumvoll et al, 2005**).

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 (**Fernandez-Twinn et al, 2003; Heywood et al, 2004**). Presume-se que a desnutrição intra-uterina e durante o primeiro ano de vida produzam mudanças morfológicas e funcionais no pâncreas, fígado, tecido muscular e tecido adiposo, que se traduzem em insulinopenia e resistência à insulina. Quando a resistência à insulina é agravada pela obesidade, inatividade física ou idade, o pâncreas não consegue suprir os requerimentos aumentados de insulina levando a alterações na homeostase glicêmica. O padrão de anormalidades metabólicas e funcionais depende da fase da vida em que a desnutrição ocorre, do tipo e da intensidade da carência nutricional (**Heywood et al, 2004**).

Evidências de que a desnutrição pode ser diabetogênica vêm de estudos que mostram intolerância à glicose, insulinopenia e resistência à insulina em animais (**Heard & Turner, 1967; Swenne et al., 1987**) e em seres humanos

(Cook, 1967; Becker et al, 1972; Smith et al, 1975) desnutridos. Mais recentemente vários grupos de pesquisa, em particular o nosso, tem caracterizado que a desnutrição afeta a capacidade secretória das ilhotas de Langerhans de maneira progressiva e irreversível. Soma-se a isso mudanças também na expressão de genes envolvidos com a produção e secreção de insulina em animais que passaram por um período de restrição protéica (Carneiro et al, 1995; Reis et al, 1997; Latorraca et al, 1998 a e b; Cherif et al 2001; Ferreira et al, 2003 e 2004, Araújo et al, 2004; Delguingaro-Augusto et al, 2004).

Em função da manifestação de intolerância à glicose, insulinopenia e resistência à insulina apresentado por pessoas com desnutrição crônica, em 1985 a Organização Mundial de Saúde incorporou a categoria de *diabetes mellitus* associada à desnutrição na classificação de diabetes (Who, 1985). Foram introduzidas duas variações da síndrome diabética associadas à desnutrição crônica: 1) diabetes do tipo J, semelhante ao diabetes tipo 1 pelo seu início abrupto e numa idade bastante precoce, caracterizado por deficiência de insulina, resistência periférica a esse hormônio e ausência de cetose; 2) diabetes pancreático tropical, presente em indivíduos severamente desnutridos, acompanhado por sinais de pancreatite, como macrocalcificações pancreáticas e hiperamilasemia, e falência da produção de insulina (Rao, 1988). Porém, na nova classificação da **American Diabetes Association 2006**, a desnutrição não está classificada como fator causal desta síndrome. Dentro desta classificação temos as endocrinopatias como fator etiológico, na qual a desnutrição poderia ser enquadrada, pois provoca alterações substanciais na homeostase hormonal induzindo mudanças em diversas funções celulares e teciduais que podem repercutir no desbalanço da regulação glicêmica do organismo (Fernandez-Twinn, et al 2003; Heywood et al, 2004; Moura & Passos, 2005; Stumvoll et al, 2005). Diante disso, acreditamos que a desnutrição deva ter um papel relevante no desenvolvimento ou no curso de aparecimento do Diabetes tipo 2.

No *diabetes mellitus* tipo 2, possivelmente relacionado com desnutrição, o comprometimento da secreção de insulina parece desempenhar um papel central na etiopatogenia. Ao avaliarmos a insulinopenia no organismo desnutrido, pelo menos quatro possibilidades devem ser consideradas: 1) a redução do número de

células B pancreáticas; 2) o defeito funcional das células B pancreáticas; ou 3) a combinação da redução do número de células B com alterações funcionais das células B remanescentes, através de mudanças na expressão gênica e protéica ; 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, 1998 a, b; Ferreira et al, 2003 e 2004; Araújo et al 2004; Delguingaro-Augusto et al, 2004**). Observamos que a restrição protéica determina a redução do peso absoluto, mas não do peso relativo do pâncreas (**Latorraca et al, 1998 a**). Quanto à morfologia, verificamos células B com volume reduzido; com menos grânulos secretores, tendo muitos deles aspecto de grânulos secretores imaturos; células B com degenerações mitocondriais e com indícios de permeabilidade celular diminuída (**Carneiro, 1996**). Ao avaliarmos a capacidade funcional das ilhotas de ratos desnutridos, observamos comprometimento da secreção de insulina estimulada por aminoácidos; perda do padrão bifásico de secreção; sensibilidade à glicose diminuída, representada por uma curva dose-resposta glicose-insulina deslocada para a direita. Mediante estímulos com diferentes concentrações de glicose, essas ilhotas apresentaram captação de ^{45}Ca menor do que as ilhotas controle. Portanto, defeito na mobilização do íon Ca^{2+} parece contribuir para as alterações secretórias verificadas em ilhotas de ratos desnutridos (**Carneiro et al, 1995; Latorraca et al, 1998b, 1999**).

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

Observações anteriores demonstraram que animais alimentados com uma dieta hipoprotéica (8% de proteína) adquiriram uma severa intolerância à glicose comparados àqueles que receberam uma dieta normoprotéica (20% de proteína). O período de restrição protéica, a que passam esses animais, tem sua atividade enzimática hepática permanentemente alterada, incluindo àquelas enzimas de

primordial importância na homeostase glicêmica (**Ozanne et al, 1996**). Observa-se que há uma diminuição na enzima glicoquinase (GK) e um aumento da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) – enzimas chaves para a glicólise e gliconeogênese, respectivamente. Pode-se sugerir, com isso, que a desnutrição conduza a uma reprogramação da atividade enzimática hepática associada com a homeostase da glicose a qual pode levar a uma mudança na regulação da produção de glicose do fígado. Inúmeros trabalhos têm documentado que no *diabetes mellitus* não dependente de insulina há um aumento da produção hepática de glicose. Uma explicação possível é que ocorra redução na habilidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose (**DeFronzo, Bonadonna & Ferrannini, 1992**).

Muito há que se estudar para obtenção de um panorama mais completo do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no comprometimento da secreção insulínica da célula B pancreática na desnutrição. É provável que, a exemplo do que ocorre em modelos animais de diabetes tipo 2, alterações ultraestruturais na inervação da célula B (**Diani et al., 1983**), nos níveis de neuropeptídeos (**Bailey & Flatt, 1988**) ou na ação de neurotransmissores como a acetilcolina (**Holst, 1992**) e mudanças na expressão de gênica e protéica (**Ferreira et al, 2003 e 2004, Araújo et al, 2004; Delguingaro-Augusto et al, 2004**) possam contribuir para a supressão da secreção de insulina em animais desnutridos.

1.2 - A Secreção de Insulina

A secreção de insulina estimulada por glicose se inicia com o reconhecimento e subsequente metabolização do nutriente pelas células B, gerando um ou diversos sinais que levam à redução da condutância ao K^+ . Essa diminuição provoca um acúmulo relativo do referido cátion nas células B, com conseqüente despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem. O influxo de Ca^{2+} e o aumento do Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) ativa a maquinaria exocitótica, resultando na secreção de insulina. Um efeito secundário da elevação do $[Ca^{2+}]_i$ é a ativação da adenil ciclase e fosfolipase C (PLC) que, agindo sobre substratos específicos, geram AMP cíclico (AMPC), diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP_3) (**Henquin et al, 2006**). Estes

amplificam o sinal de $[Ca^{2+}]_i$ pelo efeito de liberação dos estoques celulares e por promover a fosforilação de proteínas que sensibilizam o processo secretório ao cálcio. As enzimas adenil ciclase e fosfolipase C são diretamente ativadas por receptores de membrana específicos para hormônios e neurotransmissores **(Flatt, 1996; Maechler et al, 2006; Henquin et al, 2006)**.

A secreção de insulina pelas células B pancreáticas é modulada por vários nutrientes, neurotransmissores e hormônios peptídicos, não sendo a glicose o único nutriente insulínico capaz de promover a secreção de insulina acima de seus níveis fisiológicos. Muitos nutrientes, entre eles os ácidos graxos, aminoácidos e cetoácidos influenciam a secreção de insulina tão bem como a glicose **(Gao et al, 2003; Maechler et al, 2006; Yang et al, 2006)**. Com isso as ilhotas de Langerhans podem ser conhecidas como “sensoras de energia”, as quais simultaneamente integram a sinalização de muitos nutrientes e moduladores, secretando insulina de acordo com as necessidades do organismo.

Como salientamos, outros nutrientes podem alterar a permeabilidade ao K^+ e estimular a secreção de insulina **(Floyd et al, 1963; Henquin & Meissner, 1981; Blacher et al, 1989)**, demonstrou-se que leucina e arginina aumentam a secreção de insulina tanto *in vivo* como *in vitro*. Esses aminoácidos, através da alteração dos fluxos iônicos, modificam o potencial de membrana das células B, influenciando, assim, a permeabilidade ao cálcio **(Henquin, 1980; Herchuelz et al, 1984; Blacher et al, 1989 & Sener et al, 1990)**. Mais recentemente nós demonstramos que leucina regula atividade das enzimas glicocinase e da ATP sintase **(Yang et al, 2006)**.

Leucina, aminoácido destaque deste projeto, e seu derivado KIC reduzem a permeabilidade aos íons K^+ em células B pancreáticas, com magnitude idêntica àquela observada por glicose. Ela é capaz de estimular e potencializar a secreção de insulina por dois diferentes mecanismos: via transaminação da leucina formando α -cetoisocaproato (KIC) e via de ativação alostérica da glutamato desidrogenase (GDH) causando a oxidação do glutamato em α -cetoglutarato (α -KG), ambas as vias geram intermediários do ciclo de Krebs gerando ATP, conseqüente influxo de cálcio e liberação de insulina **(Changhong et al, 2002; Zhiyong et al, 2003)**.

Em células B, GDH é uma enzima chave no controle da secreção de insulina **(Sener & Malaisse, 1980)** e alterações tanto em seu conteúdo protéico como de sua atividade podem influenciar drasticamente na capacidade de secreção das células B **(Carobbio et al, 2004; Maechler et al, 2006)**. Favorável a isto está a descrição na literatura, em humanos, de hiperinsulinismo congênito caracterizado por hipoglicemia e hiperamonemia. Esta síndrome é causada por excesso de atividade da GDH, a qual oxida glutamato para α -KG, considerado um potente regulador da secreção de insulina. **(Stanley et al, 1998; Magge et al 2004)**. Produtos do metabolismo da leucina em células B podem também ativar fatores regulatórios da tradução e como consequência ativar a proliferação celular, dentre eles podemos citar: mTOR, PHAS-I e S6K-1 **(Xu et al, 2001; Lewis et al, 2006; Kimball et al, 2006)** como visto no *esquema 1*.

Leucina pode gerar sinais metabólicos semelhantes aos da glicose e, por sua vez, também bloquear os canais de potássio da membrana celular (K_{ATP}) e nuclear (K_{ATP})_n e, assim, modular as funções nucleares após induzir aumento na $[Ca^{2+}]_n$ e expressão gênica. Um sinergismo entre os produtos do metabolismo da leucina e o da glicose pode existir e, com isto, permitir um controle fino na expressão gênica, principalmente do gene c-myc em célula B, responsável pelo metabolismo de glicose, sinais nucleares de cálcio e função nuclear **(Quesada et al, 2002)**. A insulina, através da via PI3K, exerce um controle autócrino em células B e em outros tipos celulares, modulando a migração dos canais de cálcio voltagem dependentes para membrana celular e os níveis de cálcio do citosol **(Aspinwall et al, 2000; Harrington et al 2004; Viard et al 2004)**. É possível que haja uma conexão entre os sinais metabólicos gerados pela leucina, glicose e, possivelmente, pela insulina liberada por estes agentes insulínótropicos no interstício e a consequente interação com seu receptor, em células das ilhotas de Langerhans **(Araujo et al, 2002)**. Diante disso, tanto os sinais metabólicos, como a insulina podem, através das diferentes vias abordadas, controlar a atividade dos K_{ATP} , da concentração citoplasmática de cálcio $[Ca^{2+}]_i$, da $[Ca^{2+}]_n$, da expressão gênica, da proliferação celular e, por último, participar do controle nuclear da produção de insulina.

1.3 – Vias de sinalização, Síntese Protéica e Secreção de Insulina

A insulina coordena a homeostase da glicose nos tecidos periféricos controlando sua própria produção e secreção pelas células B pancreáticas **(Araujo et al, 2003; Navarro-Tableros et al, 2004; Ohsugi et al, 2005)**. Recentes estudos têm demonstrado sinergismo entre os efeitos da insulina e aminoácidos regulando a síntese protéica. Insulina e fatores de crescimento estão associados ao aumento da massa das células B e são controlados pela via de sinalização da fosfoinositol 3-quinase (PI3K). Importante proteína relacionada com essa via é a Akt ou proteína quinase B (PKB), a qual depois de ativada, fosforila uma gama de alvos intracelulares que estão envolvidos com crescimento e sobrevivência celular e inibição da apoptose. Ainda, promove translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática em tecido periférico, regula a síntese protéica, metabolismo de glicogênio e a progressão do ciclo celular **(Bernal-Mizrachi et al, 2001; Georgakis & Younes 2006)**.

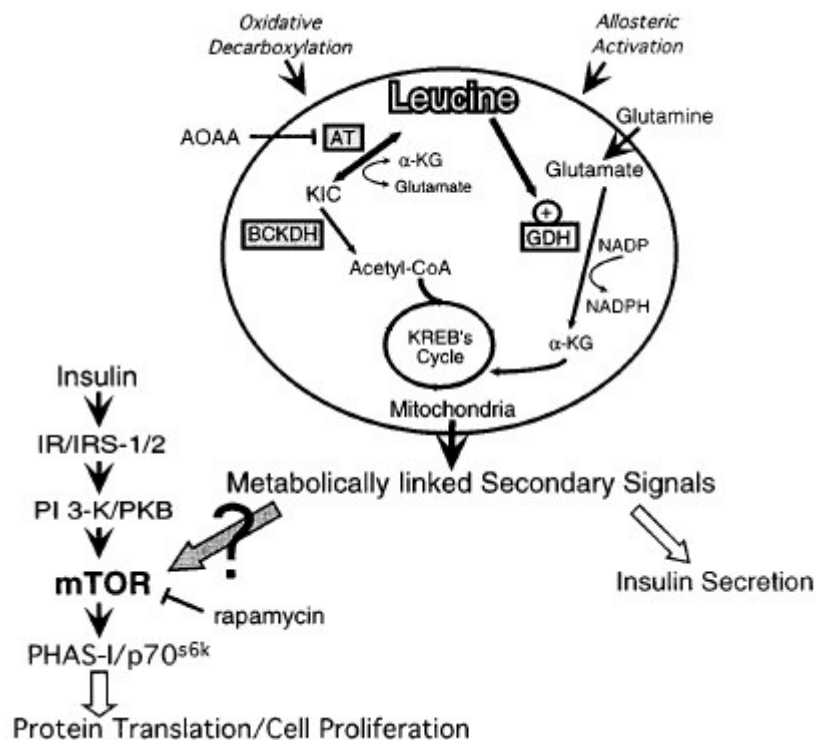
Outra proteína relacionada à família da Akt é a mTOR, proteína alvo da rapamicina em células de mamíferos, sensível à nutrientes e relacionada com a regulação de amplas respostas metabólicas. Ela é modulada por aminoácidos, regulando a biogênese ribossomal **(Dennis et al, 2001)**. Essa proteína regula e fosforila a atividade de outra proteína de extrema importância na via de sinalização: S6K-1, efetor da via PI3K. Ela tem a importante função de controlar a síntese protéica relacionando inúmeros fatores de transcrição **(Sherwood et al, 1999, Lewis et al, 2006; Kimball et al, 2006)**.

O sinergismo entre insulina e aminoácidos regula a síntese protéica em ilhotas de Langerhans, modulando passos importantes desde a ligação do mRNA até a sua tradução. Eles exercem seus efeitos através da fosforilação da S6K-1 e da proteína fosforilada regulada por insulina (PHAS-I), a partir da via sinalizadora da PI3K. Os aminoácidos mais importantes que estão envolvidos com esta via são os de cadeia ramificada – leucina, isoleucina e valina das quais o produto de metabolismo induzem sinais que ativam a mTOR. Essa interação entre aminoácidos e mTOR levam à proliferação celular em linhagem de células B, RINm5F e outros tecidos **(Xu et al, 2001; Kimball et al, 2006)**.

A sinalização promovida por nutrientes, através da mTOR, começa pela ativação da S6K-1. A sua fosforilação é dada pela Akt, a qual requer PI3K. Em

células que expressam receptores de insulina, a ocorrência da fosforilação de S6K-1 é induzida por este hormônio e sua eficiência é aumentada em presença de aminoácidos **(Hara et al, 1998, Kimball et al, 2006)**. A fosforilação do IR/ IRSs ou PI3K e a ativação da Akt através da insulina podem também ocorrer independente da modulação dos aminoácidos, sugerindo que ambos os sinais estimulatórios da mTOR podem utilizar vias completamente distintas. O papel regulatório dos aminoácidos envolvendo processos celulares é de extrema importância, pois além de exercer controle sobre a síntese protéica em músculo, **(Lewis et al, 2006)** podem também inibir a proteólise em fígado e, ainda, estimular a síntese protéica induzida por glicose em células B pancreáticas. Todos esses eventos são dependentes da ativação desta proteína sensível a rapamicina **(Tremblay & Marette, 2001; Georgakis & Younes, 2006; Lewis et al, 2006; Kimball et al, 2006)**.

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



Xu et al, 2001

Esquema 1: Modelo Proposto para o papel da leucina na sinalização mitogênica. α-KG, α-cetoglutarato; AOA, ácido aminooxiacético; AT, aminotransferase; BCKDH, ácido α-cetoglutarato desidrogenase de cadeia longa; GDH, glutamato desidrogenase; IR, receptor de insulina; IRS, substrato do receptor de insulina; S6K-1 Kinase; PKB, proteína kinase B.

Objetivos

2- OBJETIVOS

Estudar a regulação da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas de ratos submetidos à restrição protéica e após a suplementação com leucina

Avaliar participação das proteínas chaves da cascata de sinalização da insulina na modulação do processo de secreção e produção de insulina em ilhotas isoladas.

Verificar participação das proteínas chaves da cascata de sinalização da insulina em tecidos periféricos de ratos submetidos à restrição protéica após suplementação com leucina.

Materiais e Métodos

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais e Dieta:

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, com 21 dias de vida, provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Os ratos foram distribuídos em quatro grupos experimentais:

a) Controle (normoprotéico - NP): ratos alimentados dos 21 dias até a idade adulta (90dias) com dieta contendo 17% de proteína.

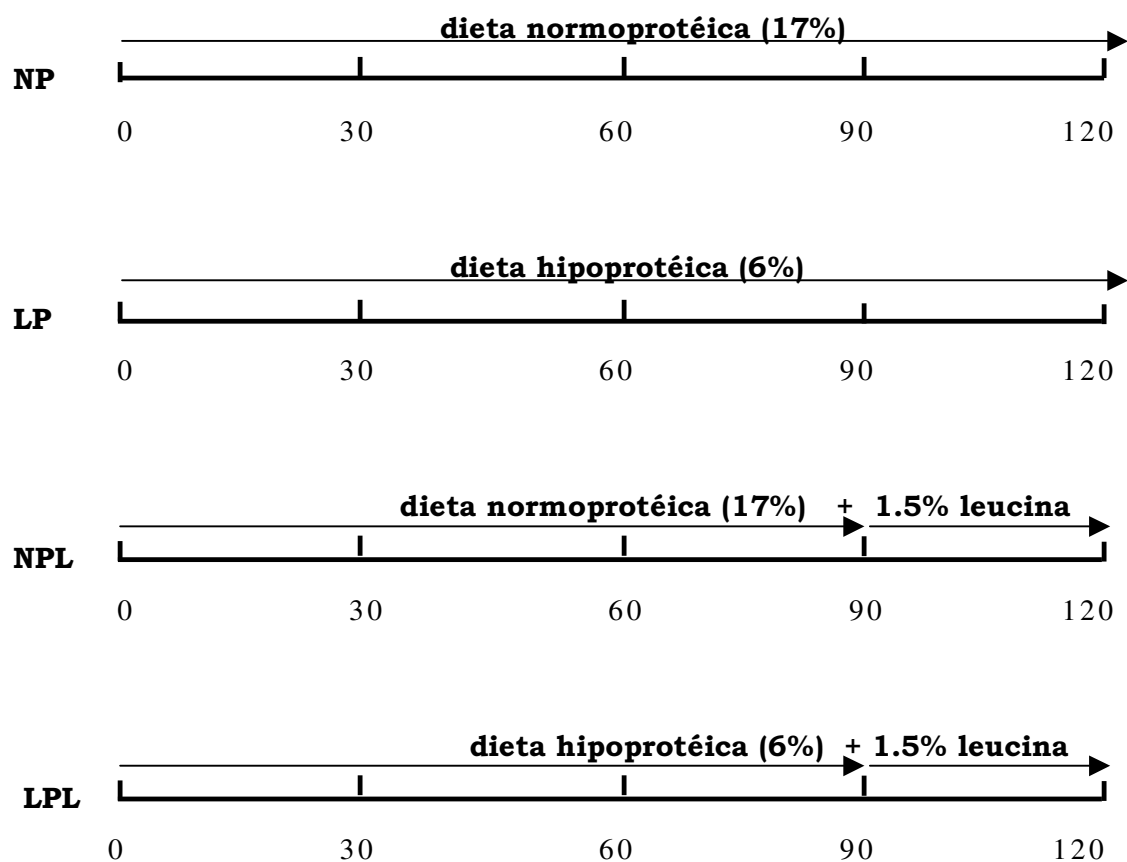
b) Desnutridos (hipoprotéico - LP): ratos alimentados dos 21 dias até a idade adulta (90dias) com dieta contendo 6% de proteína.

c) Controle - Suplementado (NPL): ratos alimentados dos 21 dias até a idade adulta (90dias) com dieta contendo 17% de proteína e dos 90 até os 120 dias com adição de 1,5% de leucina administrado via oral na água para beber.

d) Desnutrido – Suplementado (LPL): ratos alimentados dos 21 dias até a idade adulta (90dias) com dieta contendo 6% de proteína e dos 90 até os 120 dias com adição 1,5% de leucina administrado via oral na água para beber.

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

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

**Quadro 1 - Composição das Dietas**

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

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

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

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

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

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

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

3.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 – Caracterização do Modelo Experimental por Gaiola Metabólica

a) Controle do Ganho de Massa Corpórea

Após o período de desnutrição (21 aos 90 dias) os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, onde se obteve as pesagens durante 30 dias (90 aos 120 dias). Os animais foram pesados todos os dias.

b) Consumo Alimentar

O consumo alimentar também foi realizado pesando-se dia a dia tanto a dieta controle (NP) quanto a dieta do desnutrido (LP).

c) Consumo Hídrico

A água e a solução de leucina (1.5%) foram trocadas dia a dia e medidas no mesmo período de 30 dias.

d) Porcentagem de Gordura Total

As gorduras abdominal, retro-peritoneal e epididimal foram coletadas após sacrifícios dos animais e pesadas para a obtenção da porcentagem de gordura total no final do experimento.

e) Nitrogênio Fecal

As fezes excretadas pelos grupos em estudo foram inicialmente desprezadas nos três primeiros dias da fase de indução à desnutrição e posteriormente coletadas a cada 4 dias durante todo experimento, com o auxílio de pinças e placas de Petri, previamente identificadas. Para secagem foram levadas à estufa ventilada, marca Fanem, com temperatura controlada a 50°C,

por 12 horas. Posteriormente, as mesmas foram colocadas em peneiras para limpeza de pêlos e resíduos de rações, pesadas em balança semi-analítica, marca Marte, modelo A500, com precisão de 0,01g e moídas em moinho manual para cereais, marca Alpha Export, até a obtenção de um pó fino e homogêneo. As fezes, depois de moídas, foram encaminhadas ao Laboratório de Físico-Química do Departamento de Ciência, Tecnologia de Alimentos e Nutrição Básica para dosagem de nitrogênio fecal, através do método Micro-Kjeldahl (**ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984**).

3.2.2 - 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 insulina por radioimunoensaio (**Scott et al. 1981**), glicose (**Trinder 1969**), proteínas totais (**Wolfson et al. 1948**), albumina e AGL (**Doumas et al. 1971**).

3.2.3 – 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)

3.2.4 – 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 3 mL a -20 °C para posterior determinação de insulina por radioimunoensaio como descrito adiante.

3.2.5 – Albumina Sérica

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

3.2.6 – Conteúdo Total de Insulina por Ilhota

Após o isolamento das ilhotas por digestão com collagenase, grupos de 20 ilhotas foram coletadas em 0,25 mL de água deionizada e sonificadas por 30 s. Alíquotas de 25 µL de homogeneizado foi adicionado a 975 µL de tampão fosfato contendo albumina bovina (10 mg/mL), estocada a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio.

3.2.7 – Imunoprecipitação

Em experimentos que se desejava verificar a fosforilação do IR e IRS-1 pequenos fragmentos do músculo sóleo e do fígado foram isolados e homogeneizados em tampão específico contendo Tris base a 100 mM, EDTA a 10 mM, pirofosfato de sódio a 10 mM, fluoreto de sódio a 100 mM, ortovanadato de sódio a 10 mM, PMSF a 2 mM (diluído em álcool etílico), Triton X 100 a 1% e 0,1 mg/mL de aprotina a 4°C, foi retirado o sobrenadante para imunoprecipitação com anticorpos anti-IR e anti-IRS-1 (Santa Cruz), em volume fixo de 10 µL por amostra. Os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica (1,0 mg de proteína total por amostra).

As amostras foram incubadas por 12 a 14 horas, a 4°C acrescentando-se a seguir proteína-A Sepharose (50 µL) por 2 horas a 4°C. Os imunocomplexos foram lavados três vezes com tampão Tris-salina e suspensos com tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 minutos e então submetidas a eletroforese em SDS-PAGE em gel bifásico como descrito acima para o Western Blot. Os processos de transferência e *immunoblotting* seguem as

etapas descritas anteriormente. Nos experimentos de imunoprecipitação, os anticorpos utilizados foram anti-fosfotirosina (UBI).

3.2.8 - Isolamento de Ilhotas Pancreáticas

Animais dos respectivos grupos (NP, LP, NPL e LPL) 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 para o grupo NP e NPL 0,9 mg/mL e para o grupo LP e LPL 0,7 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. Em seguida, os fragmentos foram incubados em banho-maria a 37°C durante aproximadamente 25 minutos. Após o período de incubação, o tubo foi agitado manualmente por aproximadamente 1 minuto ou até a obtenção de mistura de viscosidade homogênea. O conteúdo foi transferido para um becker e o material lavado com solução de Hanks 4 vezes para a remoção da 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.

3.2.9 – Volume da Ilhota

O volume das ilhotas pancreáticas avaliada através da determinação da oxidação da $^3\text{H}_2\text{O}$. Ilhotas foram isoladas como descrito acima. Grupos de 50 ilhotas/grupo foram colocadas no interior de eppendorffs abertos e inserida em vials de cintilação aos quais foram adicionados solução de Krebs 2,8 mM de glicose. Os vials foram selados e mantidos por 1 hora a 37°C sob agitação constante. Passado esse período, foi adicionado no interior de cada eppendorff 200 µL de HCl 1N para que o processo fosse parado. Foi adicionado 200 µL de

Hidróxido de hiamina no interior dos vials para a captação do $^{14}\text{CO}_2$ liberado pelas ilhotas. Esses vials permaneceram, então, por mais 1 hora sob agitação constante a 4°C. As ilhotas foram lavadas com solução de Krebs a 4 °C por 2 vezes, dissolvidas com adição de Trizol e a solução resultante teve sua radiação medida. Os resultados foram expressos em nL H₂O/ ilhota/ hora.

3.2.10 – Perfil Eletroforético

O sistema eletroforético utilizado seguiu o método utilizado por Schagger e Von Jagow (1997). A placa de poliacrilamida foi feito de modo descontínuo, apresentando um gel de corrida a 10%, preparada a partir de uma solução estoque de acrilamida: bisacrilamida estoque de (40%T/ 6%/ C) e tamponada com tampão (Gel Buffer, Tris-HCl, pH 8,45, SDS 0,4%). A essa camada foi adicionado o gel de concentração de 5% de acrilamida e tamponado com “Gel Buffer”. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas SE 600 (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de peso molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,075M; pH 6,8; 10% de Glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). A concentração das amostras foi ajustada para 3 µg/ µL, sendo aplicado em cada poço 15 µL. A corrida eletroforética foi realizada a 12 mA por placa. Os géis foram corados em solução de Coomassie Blue 0,05% a 37 °C (o excesso de corante foi removido em ácido acético 7%).

3.2.11 – Metabolismo de Glicose, Leucina e Glutamina

A oxidação de leucina nas ilhotas isoladas foi avaliada através da determinação da oxidação da D-[U- ^{14}C]glicose, L-[U- ^{14}C]leucina e L-[U- ^{14}C]glutamina em $^{14}\text{CO}_2$ (**Malaisse et al., 1974**). Para isso, grupos de 30 ilhotas foram coletas e transferidas para tubos de ensaio com volume aproximado de 0,7 mL contendo solução de Krebs 2,8 mM de glicose para a oxidação com a hexose e leucina marcada e 8,3 mM glicose para glutamina. A seguir o meio de coleta foi descartado sendo introduzido 75 µL de meio de incubação Krebs contendo 16,7 mM de glicose, 2,8 mM glicose acrescido de 20 mM de leucina e 2.8 mM glicose

acrescido 10 mM de glutamina e traços de D-[U-¹⁴C]glicose, L-[U-¹⁴C]leucina e L-[U-¹⁴C]glutamina, (10 µCi/ml), respectivamente para cada condição em estudo. Paralelamente, preparou-se para cada condição experimental, 3 tubos-controle que receberam os respectivos meios de incubação com a glicose, leucina e glutamina marcada, porém sem as ilhotas (correspondeu ou BG). Os tubos de ensaio foram introduzidos em frascos maiores (suportes), hermeticamente fechados com tampas de borracha e incubados durante 120 min a 37 °C sob constante agitação, sendo o pH 7,4 equilibrado com carbogênio durante os primeiros 10 min.

Após o período de incubação, foram adicionados aos tubos de ensaio 0,1 ml de uma solução de HCl a 1 N, para interromper a oxidação, e 0,25 ml de hiamina nos frascos suportes para a captação do ¹⁴CO₂ liberado no meio. Para que todo o ¹⁴CO₂ liberado no meio fosse captado pela hiamina, os frascos suportes foram agitados durante 60 min à temperatura ambiente. Após este período, os tubos contendo as ilhotas e os controles foram descartados. Foram preparados também, 3 frascos denominados MAX, onde se introduziu 1,0 µl dos respectivos meios de incubação. Todos os frascos receberam 10 ml de líquido de cintilação e a radioatividade de cada frasco foi medida em um contador de radiação beta.

Através da equação:

$$F = \frac{\{G\} \times 10^{-3}}{30 \times \text{cpm (MAX)}}$$

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

Na equação:

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

30 = número de ilhotas em cada tubo de ensaio

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

3.2.12 - 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 carbogênio). O pH da solução foi ajustado em 7,4 pela injeção desse gás. Inicialmente as ilhotas foram incubadas por 90 min com soluções contendo glicose, aminoácido (leucina) e potássio na presença e ausência de Ácido Oxalacético. Após os 90 min de incubação, as placas foram resfriadas em banho de gelo e o sobrenadante removido, transferido para tubos de ensaio e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (Scott et al. 1981).

3.2.13 - Dosagem de Insulina

A insulina secretada durante os diferentes experimentos *in vitro* foi determinada por radioimunoensaio. Para isso foi transferido 0,1 mL das amostras desconhecidas (em duplicata) as quais receberam a seguir 0,2 mL de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com ¹²⁵I (traçador) em tampão fosfato pH 7.4, acrescido de NaCl 0,9 % e albumina 0,5 %. Em seguida foram preparados os seguintes controle:

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

3.2.14 – Isolamento de Ilhotas de Camundongo e Cultura de Células B

Ilhotas de Langerhans de camundongos adultos machos (Swiss), dos quatros grupos experimentais, mortos por deslocamento cervical foram isoladas como escrito previamente por **Lenmark, 1974**. Após a digestão do pâncreas com colagenase (colagenase A, Boehringer Mannheim, Germany) em banho-maria a 37 °C, ilhotas foram separadas por centrifugação e coletadas sob lupa, em seguidas formas utilizadas para os estudos de secreção estática de insulina e cálcio citoplasmático. Quando necessário, as células foram separada das ilhotas como previamente descrito por **Ripoll et al, 1996**. Essas células então foram centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura (RPMI 1640 suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 100 IU/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de streptomicina e 5,6 mM de glicose) e colocadas em placas de cultura. Essas células permaneceram em incubadora 37 °C, em uma atmosfera umidificada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 , permaneceram, então, 24 horas em cultura até o procedimento final, quando foram utilizadas para o registro do potencial de membrana.

3.2.15 – Registro do Potencial de Membrana de Repouso em Células B

Para medir o potencial de membrana de maneira mais precisa possível em uma situação de repouso, utilizamos a técnica de “Patch-clamp” (**Neher et al 1976**), usando a configuração de “Whole-cell” ou célula inteira e passando posteriormente ao modo de “current-clamp” ou fixação de corrente. Para chegar a configuração “Whole-cell” realizamos primeiro a configuração “Cell-attached” que consiste na realização de um selo entre a membrana celular da célula B e o eletrodo de registro o qual não produz dano para a membrana ou a integridade celular. Em seguida aplicamos uma pressão negativa para romper o fragmento de membrana que delimita as bordas da pipeta ou eletrodo, proporcionando assim a comunicação entre o interior da pipeta e o meio intracelular. Assim se permitiu medir correntes que atravessam a totalidade da membrana da célula B.

Uma vez estabelecida a configuração “Whole-cell” sob o modo de voltagem fixa “Voltage-clamp”, com cuidado, foi mudado a corrente para “current-clamp” ou corrente fixada em $I=0$. O valor do potencial, no osciloscópio, que se observa imediatamente depois do estabelecimento da configuração “Whole-cell” constitui o valor do potencial de membrana de repouso da células B dos grupos em estudo.

Os eletrodos de registro foram fabricados com capilares de vidro de borosilicato GC150-15 de 1.5mm O.D. x 0.86 mm I.D. de paredes, sem filamento. De marca CLARK ELETROMEDICAL INSTRUMENTS. Estes capilares foram estirados em um estirador de dois tempos MECANEX BB-CH, cujo parâmetros foram ajustados para obter uma resistência de 6-15 Ω .

3.2.16 – Dosagem de Cálcio Citoplasmático

Ilhotas isoladas foram incubadas por 1 h a 37 °C em solução de Krebs contendo 2,5 mmol/L de CaCl_2 e suplementado com 5,6 mM de glicose e 3% albumina. A solução foi constantemente gaseada com uma mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2 com o pH final de 7,4. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi monitorado com Fura-2 como previamente descrito (**Valdeomillos et al, 1993**).

3.2.17 - Extração de RNA Total

RNA total foi extraído de cerca de 800-1000 ilhotas através da adição de 1,0 ml de reagente Trizol (GIBCO BRL - Life Technologies). As ilhotas foram homogenizadas em vortex e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µl de clorofórmio foram adicionados e as amostras vigorosamente homogeneizadas durante 15 seg. Após incubação de 3 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. O volume correspondente à fase aquosa foi transferido para outro tubo e o RNA precipitado através da adição de 500 µl de álcool isopropílico, seguido de 10 min de incubação à temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12.000 g durante 15 min a 4 °C foi realizada, o precipitado obtido foi lavado em seguida com 1ml de etanol 75%, centrifugado a 7500 g por 10 min a 4 °C e, posteriormente, lavado com 1 ml de etanol 100%. O etanol foi descartado e o pellet parcialmente seco em estufa a 37 °C. As amostras foram ressuspensas em 30 µl de água previamente tratada com DEPC.

A integridade do RNA obtido foi verificada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante para visualização das unidades ribossomais 28 e 18S após coloração com brometo de etídeo, e a quantificação do mesmo foi obtida através de leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm em aparelho Genequant (Pharmacia Biotech).

3.2.18 – Obtenção de cDNA a Partir de RNA Total

A reação da transcriptase reversa foi realizada a 42 °C durante 50 min, em 20 µl de uma mistura contendo 2,0 µg de RNA total, 10mM de dNTP mix, 40 U/µl de inibidor de RNase, 0,1M de DTT, 5X first-strand buffer, 0,5 µg/ml de oligo dT e 200 U da enzima Super Script II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL – Life Technologies).

3.2.19 – RT-PCR

O cDNA resultante foi amplificado com os "primers": sense e antisense:

Sense da **AKT-1** – 5'-CCT CAA GTA CTC ATT CCA GAC-3'

Antisense da **AKT-1** - 5'-CTC ATA CAC ATC TTG CCA CAC-3'

Sense da **PI3K-110** – 5'-TCT CCT CTC ATT ACA CCA ACC-3'

Antisense da **PI3K-110** - 5'-TGC TCT AGG TTT TCC CCA TCA-3'

Sense da **mTOR** – 5'-CAA AGA GAA GGG TAT GAA-3'

Antisense da **mTOR** - 5'-CCA TCA AGT CTC TGC AAC-3'

Sense da **PHAS-I** – 5'-CTG CTC TGC CTT CCA TTT TGT-3'

Antisense da **PHAS-I** - 5'-GGT GGG AAA TGA AGA AAG GGA-3'

Sense da **S6K-1** – 5'-TTT ATG CCT TTC AGA CCG GTG-3'

Antisense da **S6K-1** - 5'-GTG AGG TAG GGA GGC AAA TTA-3'

A PCR foi realizada em 12,5 µl de uma mistura contendo tampão da Taq polimerase, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de cada desoxinucleosídeo trifosfato, 2,5 U/µl de Taq DNA polimerase, 10 pmol de "primer" sense, 10 pmol de "primer" antisense, e cDNA. Alíquotas de 5 µl do produto da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% preparado em tampão TBE. Após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) o gel foi fotografado sob luz UV, quantificado em aparelho Eagle Eye II.

3.2.20 - Western Blotting

Para detectar o nível de expressão celular do Receptor de Insulina (IR), do seu substrato (IRS-1), das proteínas da cascata de sinalização de insulina PI3K-p85, mTOR e p70^{S6K} foi empregada a metodologia de Western Blot. Grupos de 500 ilhotas recém-isoladas e incubadas por 2,5 horas em Krebs contendo 8.3 mM de glicose foram centrifugados rapidamente e o sobrenadante desprezado. A seguir, foram adicionados 200µL de tampão específico para imunoprecipitado. As ilhotas foram então politronizadas nesta solução, por aproximadamente 10s, e o homogeneizado 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. As proteínas relacionadas ao estudo foram detectadas na membrana de Nitrocelulose por incubação por 2h, à temperatura ambiente, com anticorpo monoclonal específico anti-IR e anti-IRS-1, (Santa Cruz, diluição 1:500 (IR e IRS-1) em TBS com 3% de leite desnatado). Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo conjugado com peroxidase HPB (diluição 1:5000 ou 2 µg/mL em tampão TBS). A reação com peroxidase foi detectado por autoradiografia, logo após a reação com o kit Comercial Super Signal da Pierce.

3.2.21 – Atividade da PI3K

Após o isolamento as ilhotas foram divididas em grupos de 800, estimuladas ou não com insulina e submetidas a extração protéica em 200 µl de tampão contendo Hepes 50 mM pH 7,4, NaCl 137 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 2 mM, PMSF 2 mM, aprotinina 2 mg/ml, leupeptinina 5 mg/ml, benzamidina 10 mM, glicerol 10%, NP-40 1%, dd H₂O 27,8 % **(Tremblay & Marrete, 2001)**. As ilhotas foram então homogeneizadas com pipeta e colocadas no gelo por 30 minutos, sendo a seguir centrifugadas por 15 min, à 12.000 rpm em centrífuga Eppendorf refrigerada. O sobrenadante foi retirado e realizaram-se a quantificação e normalização protéicas. Em seguida, as amostras contendo 1,0

mg de proteínas totais foram submetidas à imunoprecipitação com 15 µl de anticorpo específico (IRS1), *overnight* à 4°C, sendo a seguir adicionado 120 µl de proteína A Sepharose (previamente lavada como descrita a seguir) e mantidas sob agitação contínua à 4°C durante 2 horas. Então as amostras foram centrifugadas por 3 min à 12.000 rpm e descartado o sobrenadante.

Em seguida as amostras foram lavadas três vezes, em cada tampão descrito abaixo, com o volume de 1,0 ml cada vez.

Tampão A: PBS 0,1 M, pH 7,4, NP-40 1%, 100 µM Na₃VO₄.

Tampão B: Tris 100 mM, pH 7,5, LiCl₂ 500 mM, Na₃VO₄ 100 µM, H₂O 89% qsp.

Tampão C: Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Na₃VO₄ 100 µM, H₂O 96% qsp.

Após as lavagens os *pellets* foram secos com pipeta e re-diluídos em 50 µl do tampão C, sem ortovanadato, adicionando-se então, 10 µl de MgCl₂ 100 mM e 10 µl de inositol fosfato (PI) (2 mg/ml) sonificado anteriormente durante 1 min no gelo na seguinte solução: 10 mM de Tris, pH 7,5 e EGTA 1 mM.

Inicia-se então a reação, adicionando às amostras 5 µl de solução contendo o seguinte: 30µl de ATPγ ³²P, 10 µl de MgCl (100 mM), 4,4 µl de ATP 10 mM e 5,6 µl de H₂O. A reação será interrompida após 10 min com 180 µl do seguinte tampão: 2,0 ml de HCl, 8,0 ml de clorofórmio, 8,0 ml de metanol.

As amostras foram centrifugadas sendo removida a fase orgânica inferior, que foi aplicada nas placas (cerca de 50 µl de cada amostra) de TLC previamente tratadas com oxalato de potássio a 1%. A placa foi, então, inserida em um frasco contendo o seguinte tampão de corrida: 120 ml de CHCl₃, 94 ml de CH₃OH, 22,6 ml de H₂O e 2,4 ml de NH₄OH. Depois de aproximadamente 4 horas de corrida, a placa foi exposta a um filme de RX e depois de 24 horas este foi revelado de forma convencional e a análise feita através de densitometria digital.

A proteína A Sepharose utilizada no experimento de determinação da atividade da PI3 quinase associada a IRS1 foi lavada da seguinte forma: tomou-se o conteúdo total do frasco e transferiu-se para um tubo de polietileno de 50 ml. Centrifugou-se por 15 min a 4°C e retirou-se o sobrendante, adicionado igual volume de 1% BSA em PBS 0,1 M, pH 7,4. Incubou-se por 30 min à 4°C e re-diluiu-se a 50% (volume/ volume) em PBS 0,1 M, pH 7,4.

Análise Estatística

4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. Nos resultados referentes ao Western Blotting, através de densitometria, foi utilizado o ANOVA de duas vias, no qual o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Com relação aos dados obtidos nas secreções estáticas foi utilizada análise de variância (análise de variância, com duas variáveis, a saber, 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 $p < 0,05$.

Resultados

5 – RESULTADOS

5.1 – Caracterização do Modelo Experimental

A **Fig. 1** representa o ganho de massa corpórea durante 120 dias sendo que dos 21 aos 90 dias os animais passaram por um período de restrição protéica (LP). Entre o 90º e 120º dias receberam uma solução de leucina a 1,5%, na água de beber. Durante o período de desnutrição a pesagem foi feita de dois em dois dias, enquanto que durante a suplementação essa pesagem foi realizada dia a dia. A partir da quarta semana todos os grupos aumentaram sua massa corpórea, porém, nos grupos LP e LPL o ganho de peso foi menor comparado aos NP e NPL e essa diferença permaneceu durante todo o período em estudo. Constatou-se, assim, que os animais dos grupos NP, NPL, LP e LPL cresceram continuamente durante todo o período de experimentação, sendo que a adição de leucina não provocou alteração no padrão de crescimento. Quando tratou-se dos camundongos também observou-se comportamento semelhante ao apresentado pelos grupos de ratos em relação a evolução corporal

A **Fig. 2** representa a relação do consumo alimentar pela massa corpórea dos ratos dos quatro grupos em estudo. Pode-se observar que os grupos NPL, LP e LPL demonstraram aumento no consumo alimentar em relação ao grupo NP, sendo que os grupos desnutridos aumentaram consideravelmente esse consumo em relação aos grupos controles. Também foi medido o consumo hídrico por grama de massa corpórea nesse período (**Fig. 3**) constatando-se que não houve diferença significativa entre os grupos em estudo. Finalizando a caracterização do modelo de suplementação verificou-se redução significativa da quantidade de nitrogênio fecal eliminada nos grupos LP e LPL, quando comparados aos grupos NP e NPL (**Fig. 4**) e também se não observou diferenças na porcentagem de gordura abdominal, retro-peritoneal e epididimal nos grupos em estudo (**Fig. 5**).

A caracterização dos parâmetros bioquímicos revelou aumento das concentrações de ácidos graxos séricos nos animais dos grupos LP e LPL quando comparado ao grupo controle (NP). A quantidade total de proteína estava diminuída nos dois grupos que foram suplementados. Por outro lado a glicemia de jejum foi menor somente no grupo de animais LPL em relação aos grupos LP,

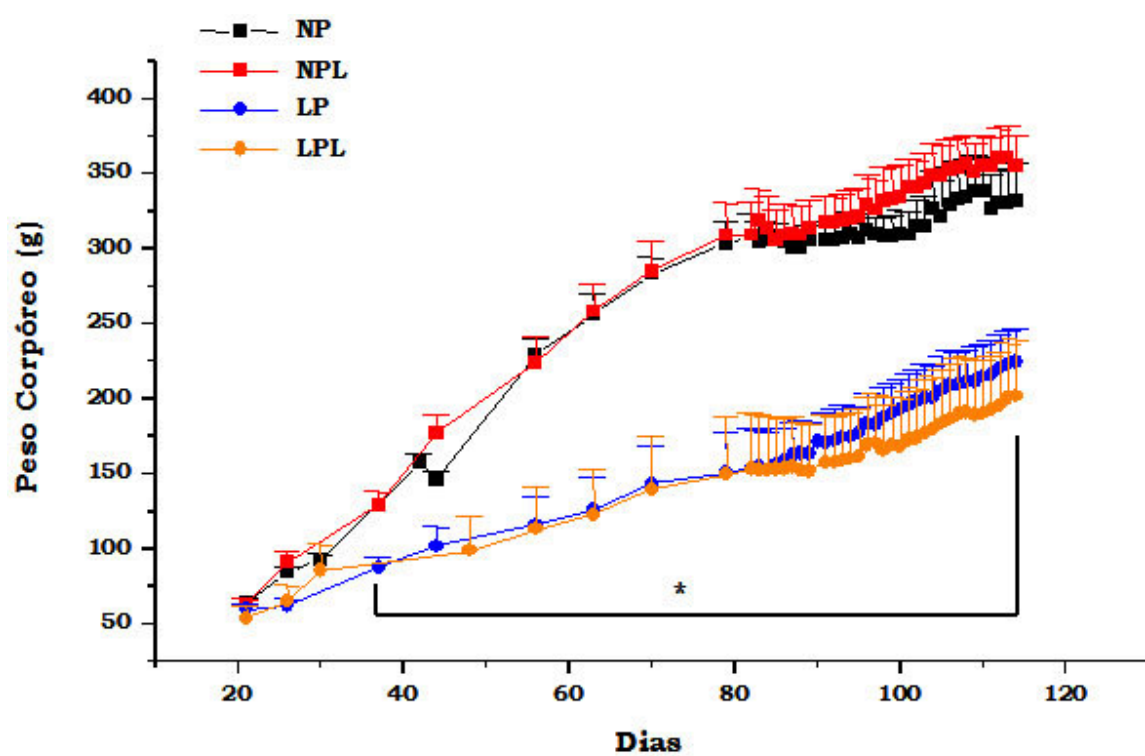


Fig. 1 – Evolução da massa corpórea de ratos Wistar machos NP, LP, NPL, LPL entre os dias 21 aos 120 dias de vida. As barras indicam a média \pm se. * Representa diferença significativa comparada ao grupo NP ($p < 0,05$).

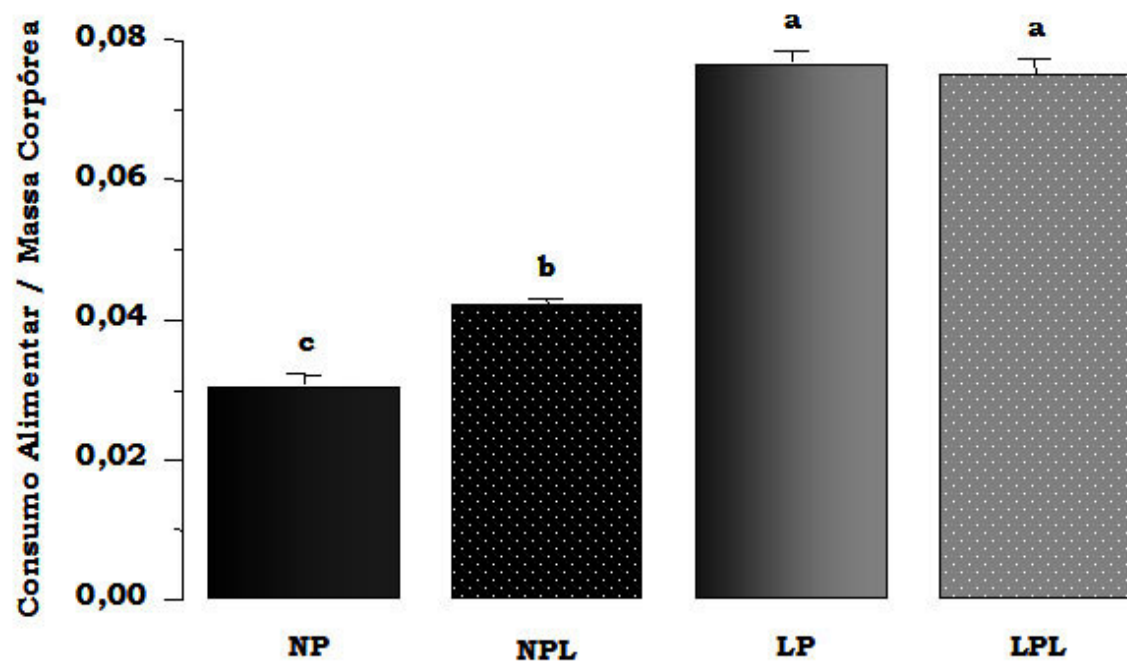


Fig. 2 – Relação entre consumo alimentar e a massa corpórea em ratos Wistar machos NP (n=4), LP (n=4), NPL (n=4) e LPL (n=4). Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$.

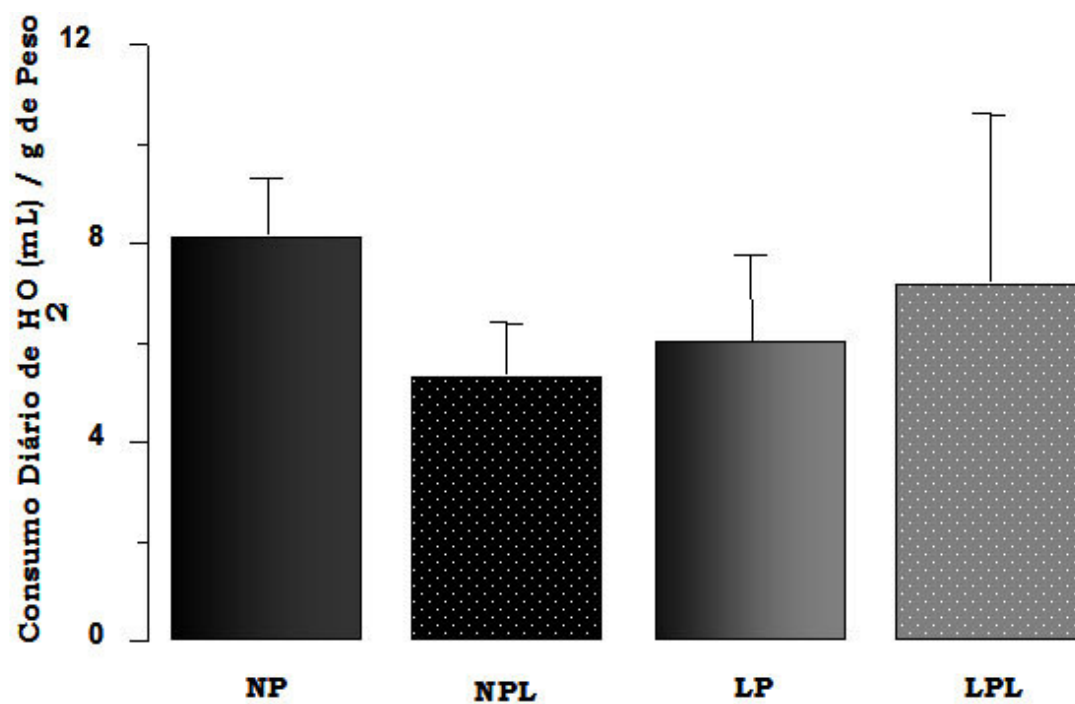


Fig. 3 - Consumo hídrico diário em ratos Wistar machos NP (n=4), LP (n=4), NPL (n=4) e LPL (n=4).

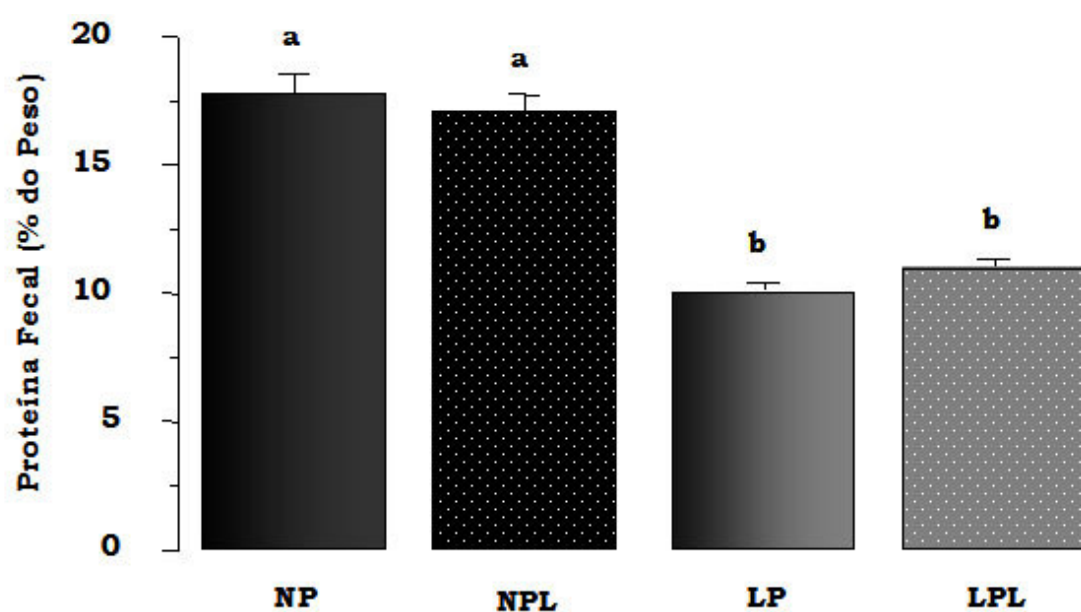


Fig. 4 – Proteína fecal em ratos Wistar machos NP (n=4), LP (n=4), NPL (n=4) e LPL (n=4). Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$.

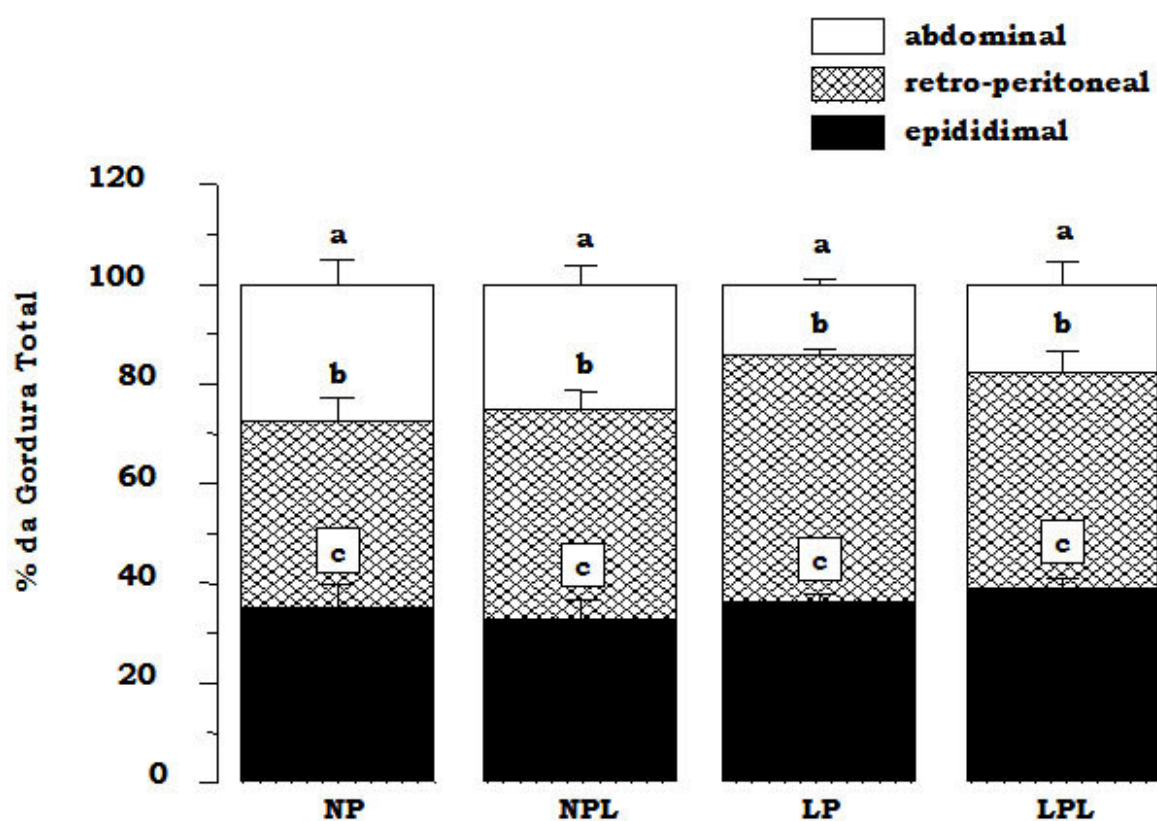


Fig. 5 – Porcentagem de gordura abdominal, retro-peritoneal e epididimal em relação ao peso corpóreo, em ratos Wistar machos NP, LP, NPL e LPL. (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

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

	NP	LP	NPL	LPL
Proteínas totais Jejum (g/dl)	4,6 ± 0,05	2,8 ± 0,6*	4,3 ± 1,1	3,6 ± 0,3*
Albumina Jejum (g/dl)	3,6 ± 0,1	3,4 ± 0,1*	3,13 ± 0,16*	3,08 ± 0,26*
Glicose Jejum (mg /dl)	125 ± 7	128,0 ± 14	124,6 ± 10	109,9 ± 4*
AGL Jejum (mM)	0,3 ± 0,01	0,5 ± 0,09*	0,84 ± 0,18*	0,8 ± 0,18*
Insulina Jejum (ng/mL)	0,95 ± 0,13	0,72 ± 0,18	1,7 ± 0,18*	1,5 ± 0,18*
Conteúdo Total de Insulina(ug/ilhota)	0,45 ± 0,16	0,46 ± 0,12	0,46 ± 0,06	0,42 ± 0,13

Resultados expressos como média \pm se; n=10. * Diferença significativa comparada ao grupo NP (P < 0,05).

NP e NPL. Por último verificou-se redução da albumina sérica em LP, LPL e NPL comparado ao grupo NP e aumento de insulina plasmática de jejum nos grupos NPL e LPL. Avaliou-se, ainda, o conteúdo de insulina por ilhota onde não observou diferenças entre os grupos estudados (**Tab. I**).

5.2 – Avaliação da Fosforilação em Tirosina do IR e IRS-1

Na **Fig. 6** se determina a fosforilação do IR em fígado, no qual na ausência da insulina houve um aumento significativo da fosforilação deste receptor em 1,6 vezes para o NPL e 3,5 vezes para o LPL comparados, respectivamente, com NP e LP. Quando houve a injeção de insulina, todos os grupos responderam aumentando a fosforilação do receptor, mas não houve diferença significativa entre os grupos NP e NPL; LP e LPL. Mas houve um aumento de 1,16 vezes para o grupo LP em relação ao grupo NP após a injeção de insulina, também pode-se observar o aumento da fosforilação de 1,17 vezes do grupo LPL em relação ao grupo NPL ($p < 0,05$).

Na **Fig. 7** observa-se a fosforilação do IRS-1 em fígado onde na ausência de insulina não houve aumento significativo da fosforilação do mesmo em NPL e LPL quando comparado com NP e LP, respectivamente. Porém LP e LPL apresentaram um aumento significativo da fosforilação do IRS-1 quando comparado NP e NPL. Na presença de insulina, houve um aumento da fosforilação do IRS-1 em todos os grupos, mas esse aumento foi de 1,32 vezes maior em LP e 1,61 vezes maior em LPL comparados com NP e NPL, respectivamente. Houve uma diminuição da fosforilação deste IRS-1 quando administramos insulina entre os grupos NP (1,45 vezes) em relação ao grupo NPL; LP (1,19 vezes) em relação ao grupo LPL ($p < 0,05$).

A **Fig. 8** representa a fosforilação do receptor de insulina em músculo sóleo onde se pode observar, na ausência de insulina, uma diminuição da fosforilação de 4,2 vezes em NPL comparado com NP. No grupo LPL observamos uma redução de 2,76 vezes comparado ao grupo LP e por fim o grupo LPL apresentou um aumento de 2,13 vezes comparado com NPL. Já na presença de insulina o grupo NPL apresentou uma diminuição de 2,25 vezes comparado ao grupo NP, o grupo

LPL apresentou redução de 1,14 vezes em relação ao grupo LP, porém apresentou aumento de 1,98 vezes quando comparado ao grupo NPL ($p < 0,05$).

Na **Fig. 9** determinou-se a fosforilação do IRS-1 em músculo sóleo onde pode-se observar, na ausência de insulina, o grupo NPL houve um aumento significativo de 4,63 vezes em relação ao grupo NP; o grupo LPL teve um aumento da fosforilação do IRS1 de 3,11 vezes em relação ao grupo LP e o grupo LPL teve um aumento de 1,37 vezes em comparação com o grupo NPL. Em presença de insulina houve um aumento de 1,09 vezes na fosforilação do grupo NPL comparando com o grupo NP; o grupo LPL e LP não tiveram diferença significativa, mas tiveram um aumento dessa fosforilação em função do estímulo com insulina. Por fim, o grupo LPL teve um aumento significativo de 1,23 vezes em relação ao grupo NPL ($p < 0,05$).

5.3 – Volume da Ilhota, Perfil Eletroforético e Oxidação de Nutrientes

Para determinar o tamanho da ilhota dos animais em estudo (NP, NPL, LP e LPL) utilizou-se a metodologia com água triciada. Nosso resultado indica que não houve diferenças significativas entre os quatro grupos estudados. Existiu uma nítida tendência de redução do volume em ilhotas dos grupos LP, LPL, NPL, porém através desta metodologia não foi possível diferenciar estatisticamente estes grupos do controle. Talvez este comportamento possa ser explicado pela variabilidade no tamanho e forma das ilhotas apresentadas como podemos observar durante o processo de coleta **fig. 10**.

Na **fig. 11** pode-se observar o perfil eletroforético de proteínas. A amostra NP indica uma distribuição de bandas de massa superior a 100 KDa, há componentes de baixo peso e com grande concentração protéica na região correspondente dos 30 aos 16 KDa, aproximadamente. Esse perfil eletroforético se modifica quando adicionamos a amostra NPL, a qual possui uma concentração maior de proteínas na faixa dos 45 aos 21 KDa. A amostra LP foi a que apresentou uma redução na concentração de bandas e com uma faixa concentrada entre os 14 e 17 KDa. Após a suplementação com leucina o perfil eletroforético dos desnutridos (LPL) se apresentou diferente dos LP, com o

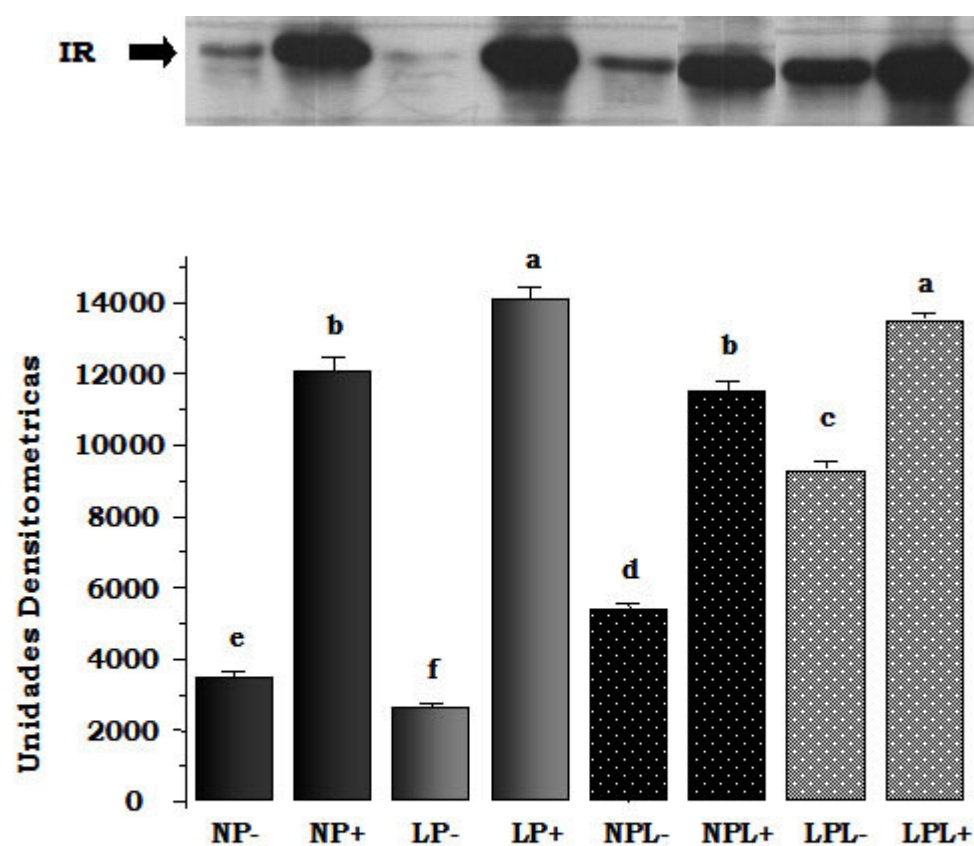


Fig. 6 - Avaliação da fosforilação em tirosina de IR em fígado de ratos Wistar machos NP (n=4) , LP (n=4) , NPL (n=4) e LPL (n=4). O fígado foi retirado sem estímulo com insulina (-) e 30 segundos após a injeção de insulina (+). Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$.

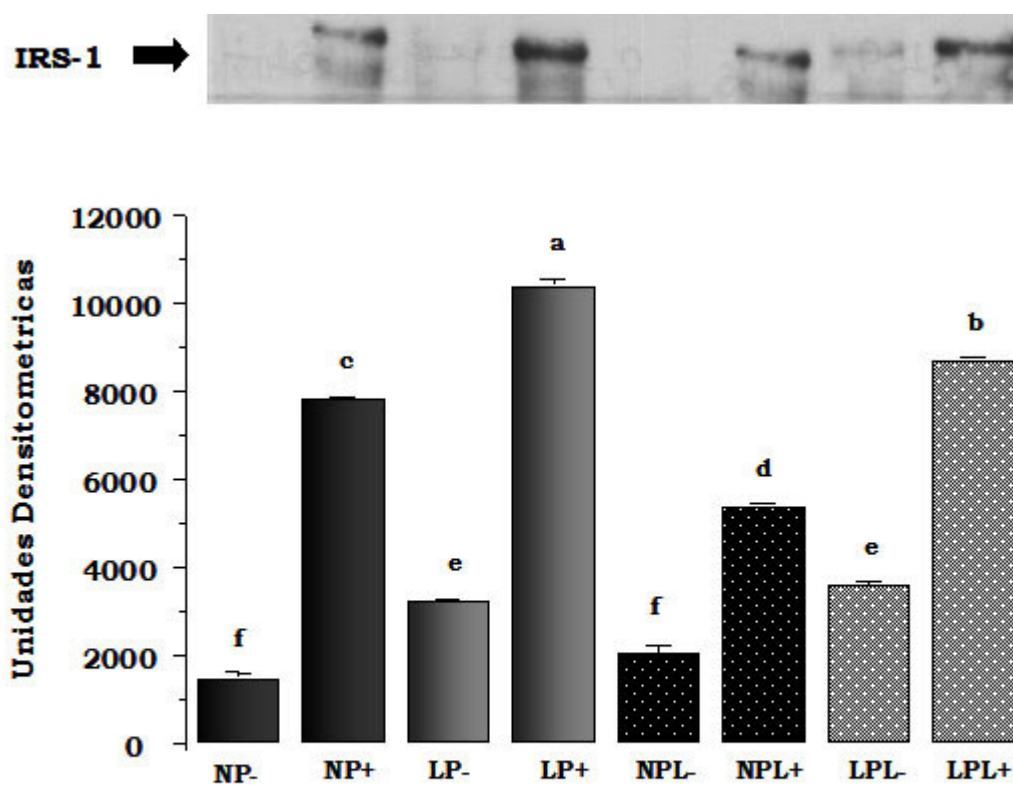


Fig. 7 – Avaliação da fosforilação em tirosina de IRS-1 em fígado de ratos Wistar machos NP (n=4) , LP (n=4) , NPL (n=4) e LPL (n=4). O fígado foi retirado sem estímulo com insulina (-) e 30 segundos após a injeção de insulina (+). Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$.

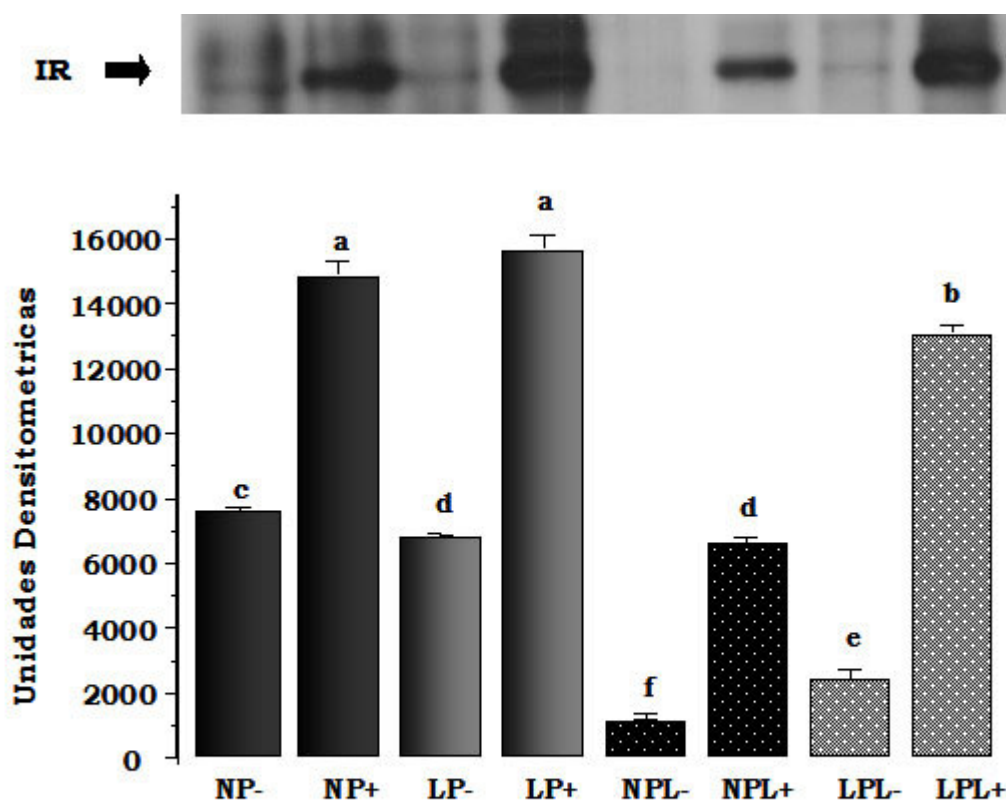


Fig. 8 - Avaliação da fosforilação em tirosina de IR em músculo sóleo de ratos Wistar machos NP (n=4) , LP (n=4) , NPL (n=4) e LPL (n=4). O músculo foi retirado sem estímulo com insulina (-) e 90 segundos após a injeção de insulina (+). Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$.

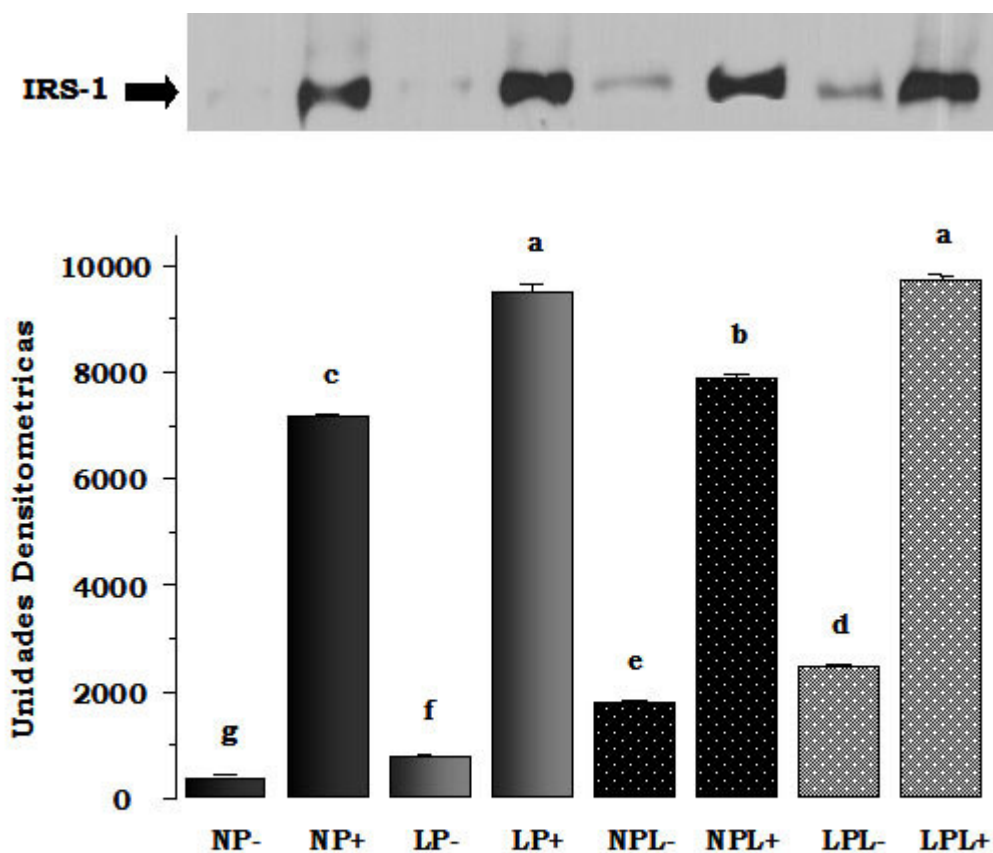


Fig. 9 – Avaliação da fosforilação em tirosina de IRS-1 em músculo sóleo de ratos Wistar machos NP (n=4), LP (n=4), NPL (n=4) e LPL (n=4). O músculo foi retirado sem estímulo com insulina (-) e 90 segundos após a injeção de insulina (+). Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$.

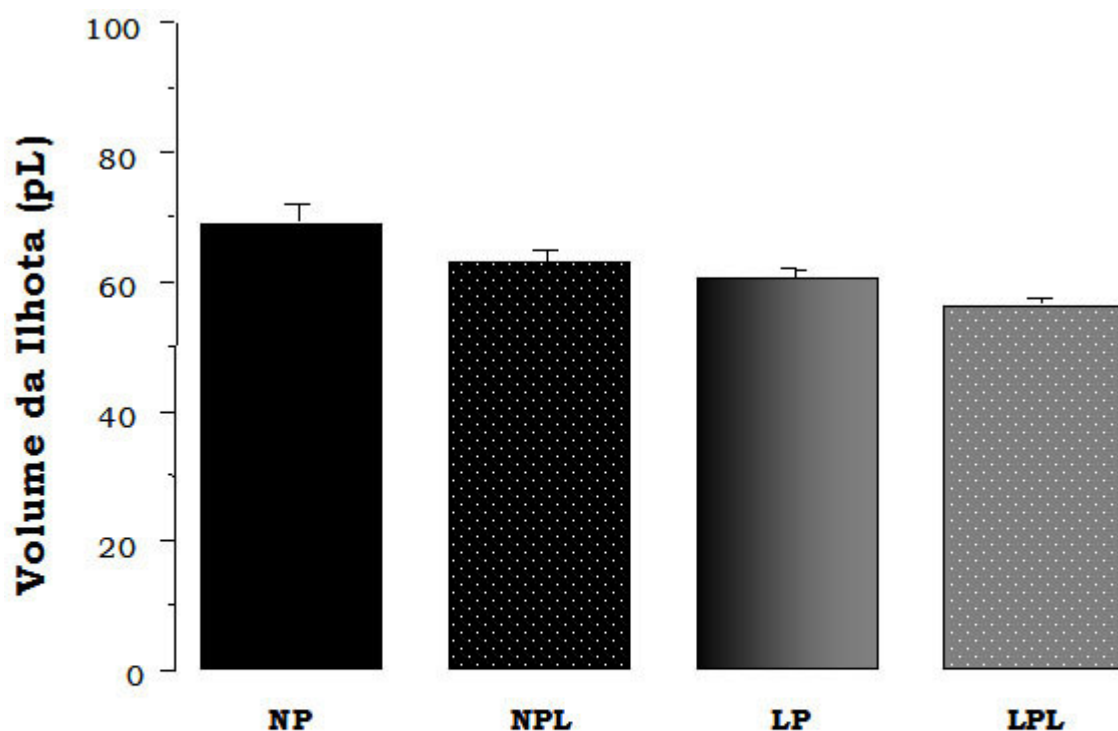


Fig. 10 – Determinação do volume celular em ilhotas de ratos Wistar machos NP (n=12) , LP (n=12) , NPL (n=12) e LPL (n=12). As ilhotas foram incubadas em meio contendo 2,8 mM de glicose e traços de D-U-14C glicose, durante 120 min. Após esse período o $^{14}\text{CO}_2$ liberado pelas ilhotas foi avaliado através de cintilação líquida. As barras indicam as médias \pm se; $p < 0,05$

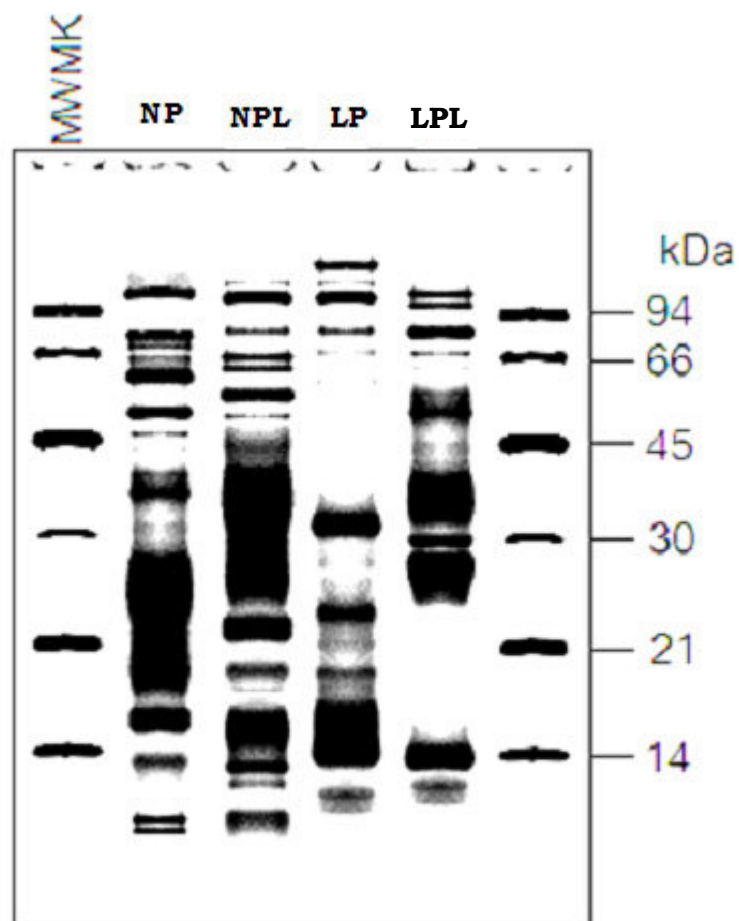


Fig. 11 - Perfil eletroforético em ilhotas de ratos Wistar machos NP (n=12), LP (n=12), NPL (n=12) e LPL (n=12).

aparecimento de mais bandas eletroforéticas e com maior concentração protéica na faixa dos 45 e 22 KDa.

Na **Fig. 12** observamos a oxidação de 16,7 mM de glicose em ilhotas de animais NP, NPL, LP e LPL. As ilhotas NP apresentaram maior metabolismo deste nutriente quando comparado aos demais grupos em estudo. O grupo de ilhotas NP apresentou uma utilização de glicose 1,38 vezes maior que o grupo de ilhotas NPL e LP. As ilhotas do grupo LPL tiveram uma diminuição de 0,5 vezes em relação ao grupo LP ($p < 0,05$).

Além de glicose outro agente insulínico importante é a leucina, onde na **fig. 13** observou-se a oxidação desse importante aminoácido em ilhotas provenientes de animais dos grupos NP, NPL, LP e LPL. Não se verificou diferenças estatísticas entre os grupos em estudo. Também foi avaliada a oxidação de glutamina, representado pela **fig. 14** onde também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos em estudo.

5.4 – Secreção de Insulina em Presença de Glicose.

A **Fig. 15A** representa o efeito de crescentes concentrações de glicose (8,3; 11,1; 16,7 e 22,2 mM) sobre a secreção de insulina em ilhotas isoladas de animais NP e LP, incubadas durante 60 min em solução de Krebs. A liberação de insulina (valores absolutos) foi significativamente maior nas ilhotas provenientes dos animais NP quando comparadas às ilhotas isoladas dos animais LP. Em presença de 11,1 mM glicose (G 11,1), este aumento foi de 1,65 vezes maior em ilhotas provenientes de animais NP em relação às ilhotas dos animais LP. Quando aumentou-se a concentração de glicose para 16,7 mM e 22,2 mM os respectivos aumentos na liberação de insulina, do grupo NP sobre o grupo LP, foi de 1,2 e 1,6 vezes ($p < 0,05$). A **Fig. 15B** demonstra o efeito das mesmas concentrações de glicose sobre a secreção de insulina, estas agora medidas no grupo de ilhotas de ratos NPL e LPL. Pode-se observar um aumento significativo da secreção de insulina dos grupos suplementados com leucina (NPL e LPL) em relação aos seus respectivos controles (NP e LP), mantendo-se o mesmo perfil secretório do grupo de animais desnutridos em relação aos controles. Em G 16,7 o aumento foi de

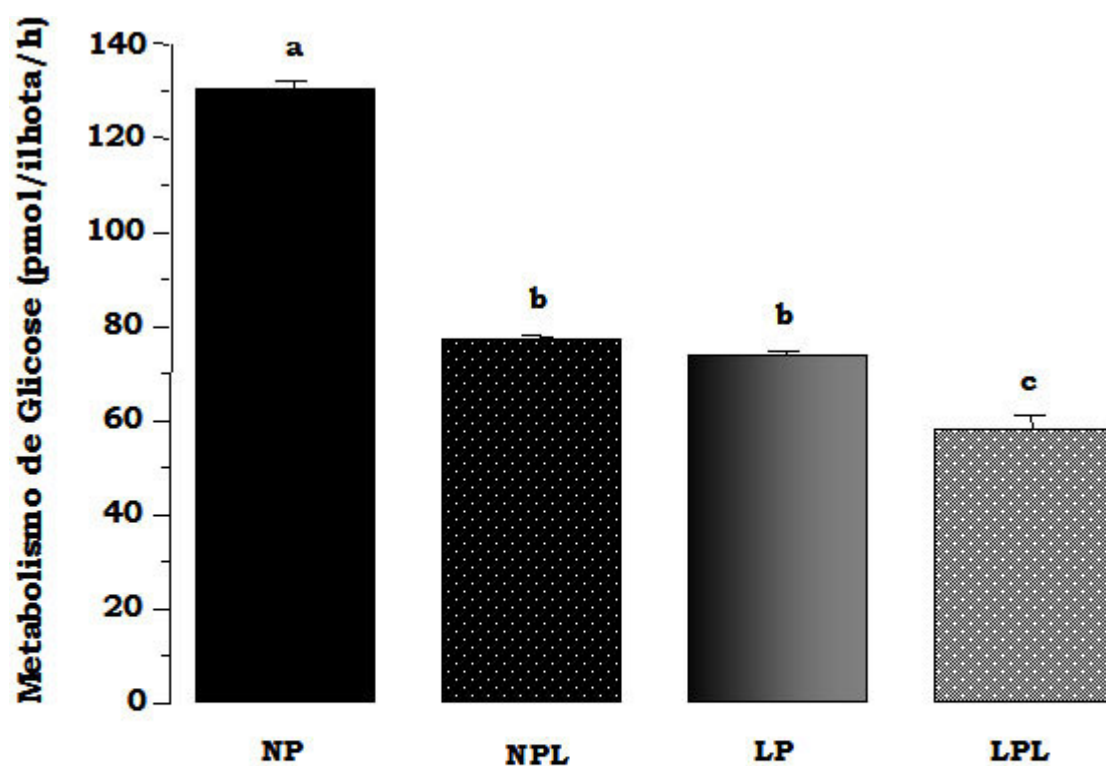


Fig. 12 – Oxidação de glicose em ilhotas de ratos Wistar machos NP (n=12) , LP (n=12) , NPL (n=12) e LPL (n=12). As ilhotas foram incubadas em meio contendo 16,7 mM de glicose e traços de D-U-14C glicose, durante 120 min. Após esse período o $^{14}\text{CO}_2$ liberado pelas ilhotas foi avaliado através de cintilação líquida. As barras indicam as médias \pm se (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

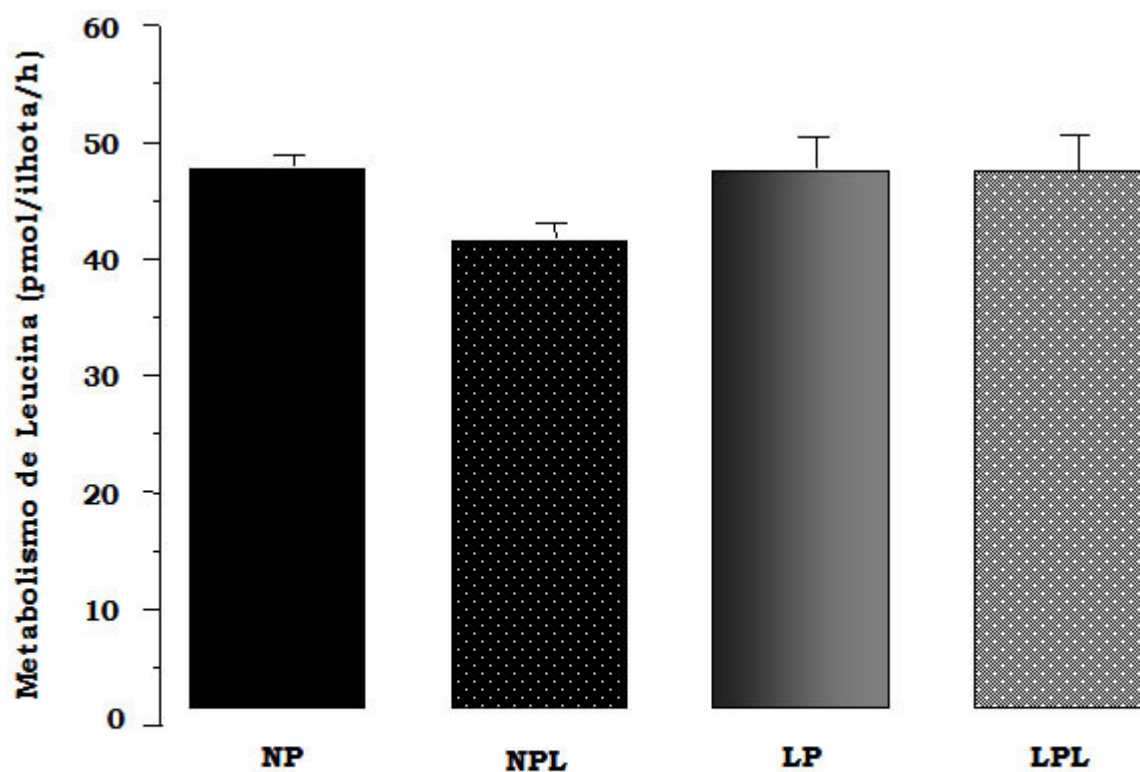


Fig. 13 – Oxidação de leucina em ilhotas de ratos Wistar machos NP (n=12) , LP (n=12) , NPL (n=12) e LPL (n=12). As ilhotas foram incubadas em meio contendo 2,8 mM de glicose e traços de D-U-14C leucine, durante 120 min. Após esse período o $^{14}\text{CO}_2$ liberado pelas ilhotas foi avaliado através de cintilação líquida. As barras indicam as médias \pm se; $p < 0,05$.

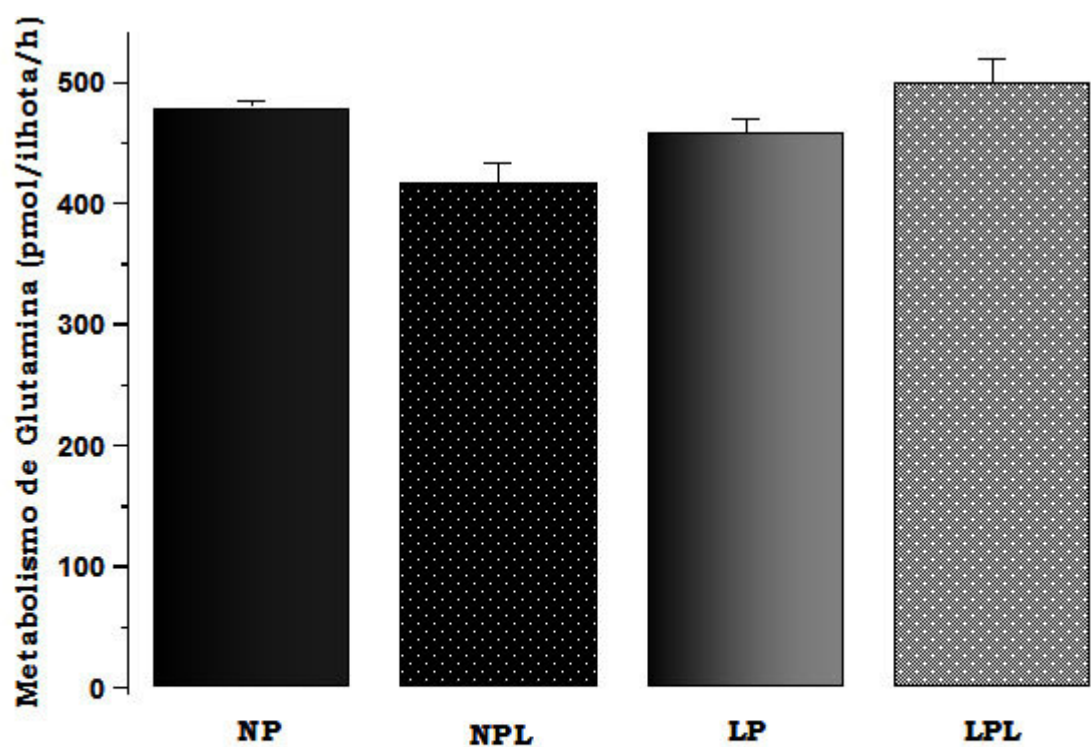


Fig. 14 – Oxidação de glutamina em ilhotas de ratos Wistar machos NP (n=12) , LP (n=12) , NPL (n=12) e LPL (n=12). As ilhotas foram incubadas em meio contendo 2,8 mM de glicose e traços de D-U-14C glutamina, durante 120 min. Após esse período o $^{14}\text{CO}_2$ liberado pelas ilhotas foi avaliado através de cintilação líquida. As barras indicam as médias \pm se; $p < 0,05$.

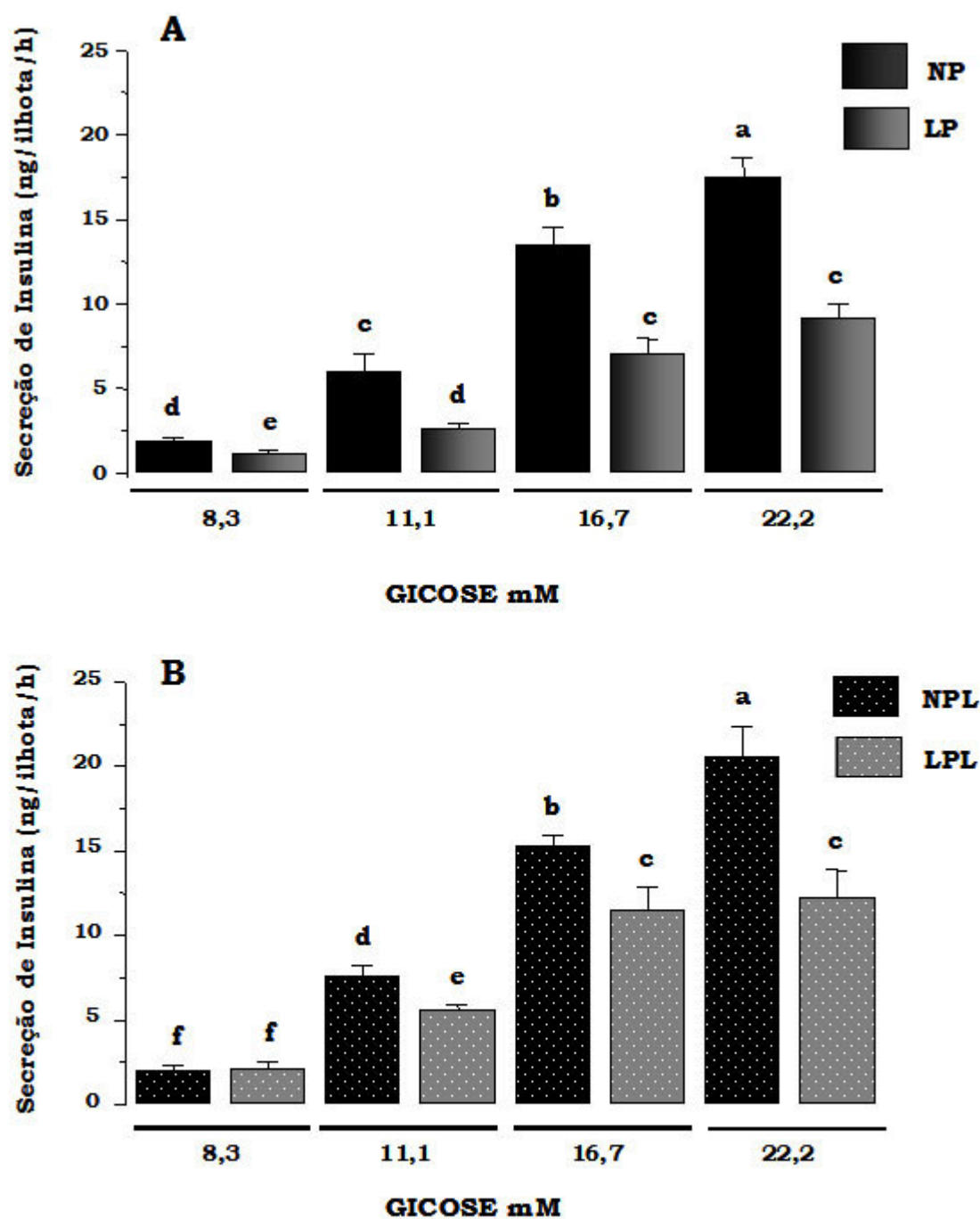


Fig. 15 – Secreção de insulina estimulada por 8,3 mM, 11,1mM, 16,7 mM e 22,2 mM de glicose em ilhotas de Langerhans de ratos dos grupos NP (n=6) , LP (n=6) , NPL (n=6) e LPL (n=6). As ilhotas foram incubadas por 1 hora em 37 C em diferentes concentrações de glicose . As barras indicam as médias \pm se. Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$.

Secreção de insulina induzida por glicose em camundongos

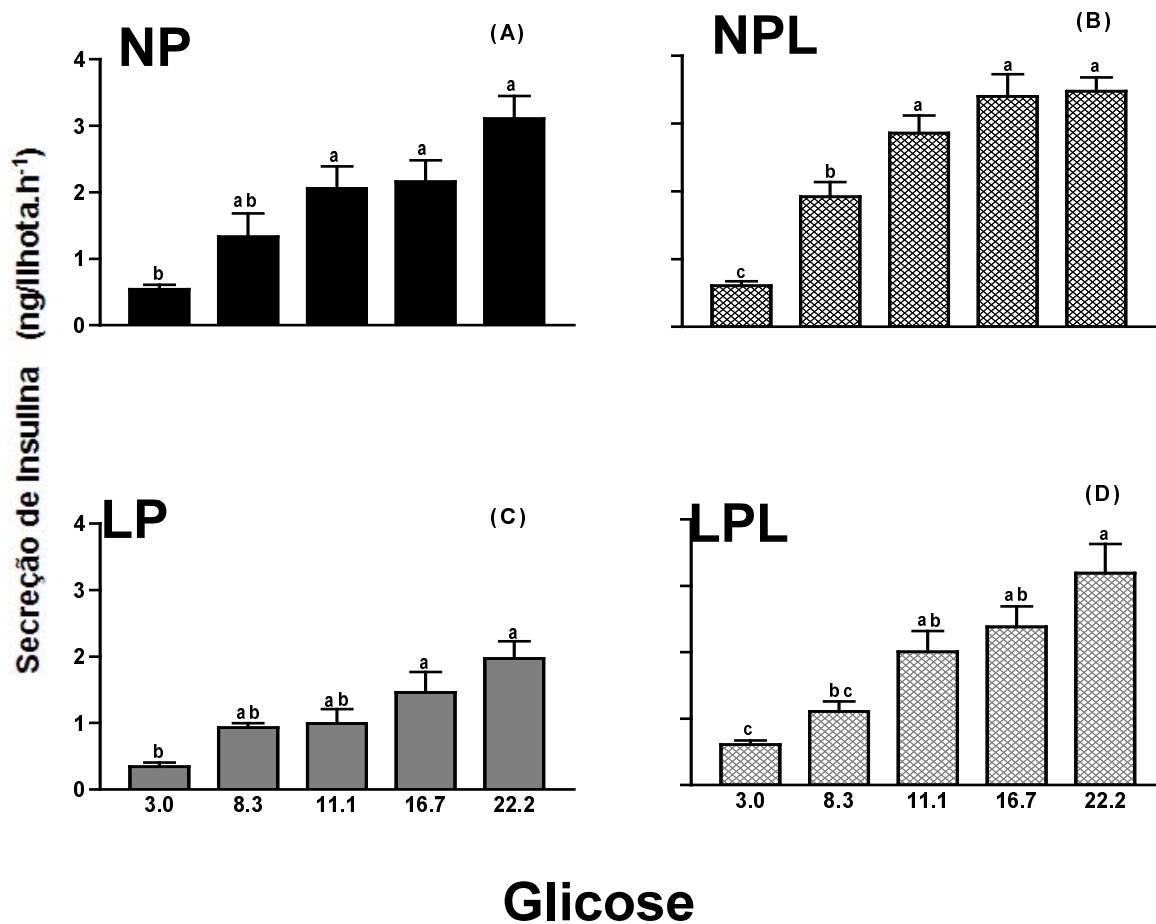


Fig. 16 – Efeito da suplementação com leucina na secreção de insulina em ilhotas de Langerhans de camundongos NP (n=12), LP (n=12), NPL (n=12) e LPL (n=12). Grupos de 5 ilhotas foram incubadas por 1 h a 37 C em solução de Krebs contendo diferentes concentrações de glicose. As barras indicam as médias \pm se. Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$.

1,89 vezes no grupo NPL comparado ao grupo LPL. O aumento da secreção de insulina também ocorreu quando adicionamos G 22,2 em 1,15 vezes, referente às ilhotas do grupo NPL em relação ao LPL ($p < 0,05$).

A **fig. 16** representa a curva dose resposta à glicose (3; 8,3; 11,1; 16,7 e 22,2 mM) sobre a secreção de insulina em ilhotas isoladas de camundongos NP, NPL, LP e LPL. Houve um aumento da secreção de insulina em presença de crescentes concentrações desta hexose em todos os grupos. Observou-se que o incremento da secreção de insulina foi menor nos grupos LP e LPL em relação aos grupos NP e NPL, respectivamente. Houve um aumento da secreção de insulina em ilhotas de camundongos que foram suplementados com leucina. Apresentando um padrão semelhante ao que foi observado com ilhotas de ratos.

Observou-se na **fig. 17** o efeito da concentração de 2,8 mM de glicose, na presença de 20 mM de leucina e 20 mM de arginina sobre a secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos dos grupos NP, NPL, LP e LPL. Quando se adicionou 20 mM de leucina houve aumento da secreção de insulina em todos os grupos em estudo, mas o incremento da secreção de insulina foi menor nos grupos LP e LPL quando comparados aos respectivos controles NP e NPL. O mesmo ocorreu quando se adicionou 20 mM de arginina, houve aumento da secreção de insulina em todos os grupos mas LP e LPL sofreram redução da secreção de insulina comparados aos controles NP e NPL. A suplementação com leucina promoveu aumento significativo na secreção de insulina tanto no grupo NPL quanto no LPL comparados com NP e LP, respectivamente.

A **fig. 18** representa a porcentagem de redução da secreção de insulina em presença de 16,7 mM (G16,7) de glicose e 5 mM de ácido aminooxiacético (AOA). O 100% representa a secreção de insulina em presença de G16,7 nos grupos NP, NPL, LP e LPL e a partir desse ponto calculou-se as respectivas reduções da secreção de insulina nos mesmos grupos. Observou-se, então, redução significativa da secreção de insulina em presença do AOA, comparados ao G16,7. Todos os grupos tiveram o mesmo perfil de redução de secreção de insulina em presença do AOA, não observando diferença significativa entre os grupos em estudo.

5.5 – Potencial de Membrana em Repouso e Movimento de Cálcio

Na **Fig. 19**, observa-se o potencial de membrana de repouso dos quatros tipos de células B em estudo. Para comparar o potencial de membrana estas células foram avaliadas sob “Current clamp” ou corrente fixa, imediatamente após entrar em configuração “Whole-cell” ou célula inteira. O potencial de membrana das células B LP foram significativamente diferentes quando comparados com os grupos NP, NPL e LPL. Após suplementação com leucina, à célula B proveniente do grupo LPL restaurou seu potencial de membrana semelhante à célula B NP. Por último, o tratamento com Leucina não foi capaz de alterar o potencial de membrana em célula B, NPL.

Mudanças na concentração citoplasmática de cálcio ($[Ca^{+2}]_i$) são mostradas, em ilhotas de Langerhans de camundongo, na **Fig.20**. Em ilhotas NP o aumento de 3 para 11.1 mM de G produziu uma inicial e pequena redução na $[Ca^{+2}]_i$ seguido de um transiente pico com uma frequência constante de oscilações na $[Ca^{+2}]_i$. Quando a concentração de glicose foi elevada para 16.7 mM de G, as oscilações na $[Ca^{+2}]_i$ foram de duração mais amplas, porém com frequência constante até o final da perfusão. Quando a concentração de glicose foi modificada de 3 para 11.1 mM, ilhotas do grupo LP exibiram um aumento na $[Ca^{+2}]_i$ com menor magnitude quando comparada com aquelas mostradas em NP, com rápidas oscilações de pequena amplitude. Sobre 16,7 mM de G o padrão de rápidas oscilações foi mantido, porém com oscilações de menor amplitude que em 11,1 mM de G.

Após suplementação com leucina, ilhotas NPL mostraram, em 11,1 mM G, um padrão de oscilações de alta amplitude na $[Ca^{+2}]_i$, quando comparado as ilhotas NP. Entretanto quando se alterou para 16,7 mM de G, observou-se oscilações lentas e de maior amplitude, duração e frequência constante na $[Ca^{+2}]_i$. Já, com ilhotas LPL, o padrão de oscilações da $[Ca^{+2}]_i$ foi semelhante ao verificado com o grupo de ilhotas NP. Então, com a elevação de G de 3 para 11,1, produziu uma pequena redução na $[Ca^{+2}]_i$, um rápido e transiente aumento seguida de periódicas oscilações de frequência rápida. Quando a glicose foi aumentada para 16,7 mM, houve aumento na $[Ca^{+2}]_i$ com magnitude maior do que aquela apresentada por ilhotas LP e semelhante as ilhotas NP, entretanto a

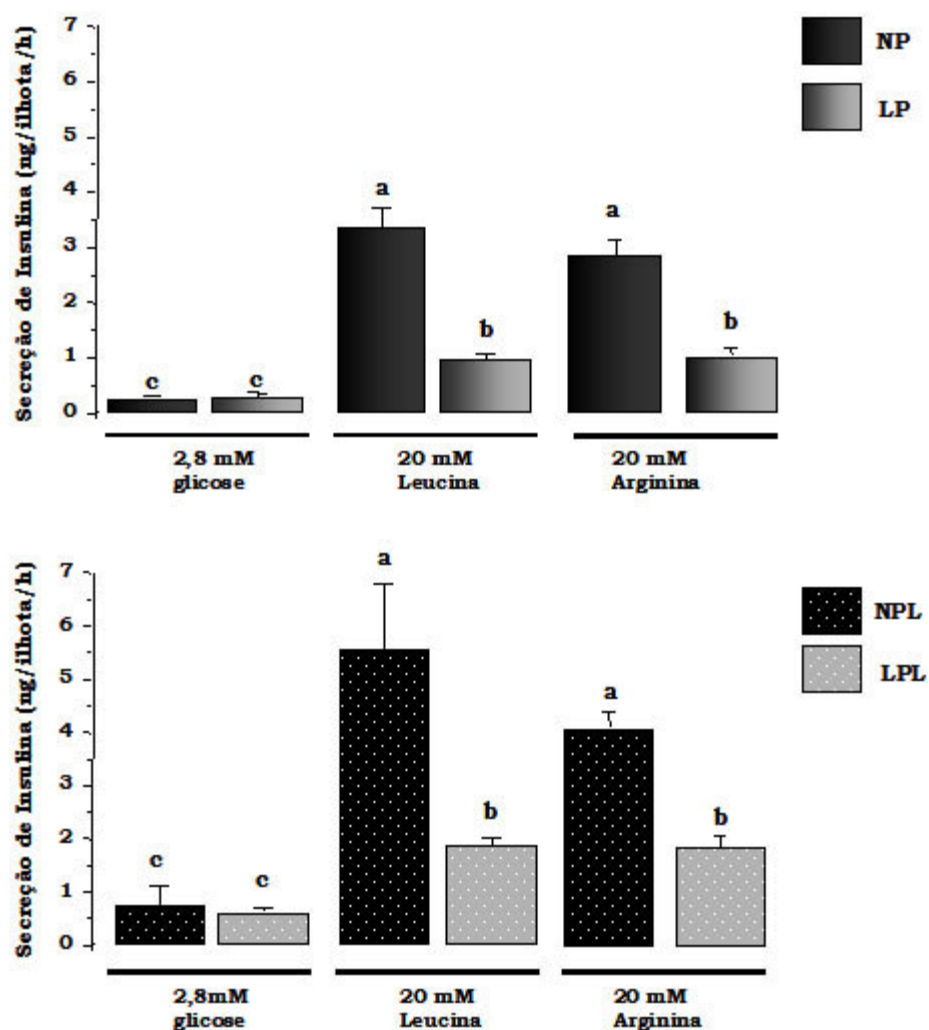


Fig. 17 - Secreção de insulina estimulada por 2,8 mM de glicose, 20 mM de leucina e 20 mM de arginina em ilhotas de Langerhans de ratos dos grupos NP (n=12), LP (n=12), NPL (n=12) e LPL (n=12). As ilhotas foram incubadas por 1 hora em 37 °C em diferentes concentrações de glicose. As barras indicam as médias \pm se. Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$.

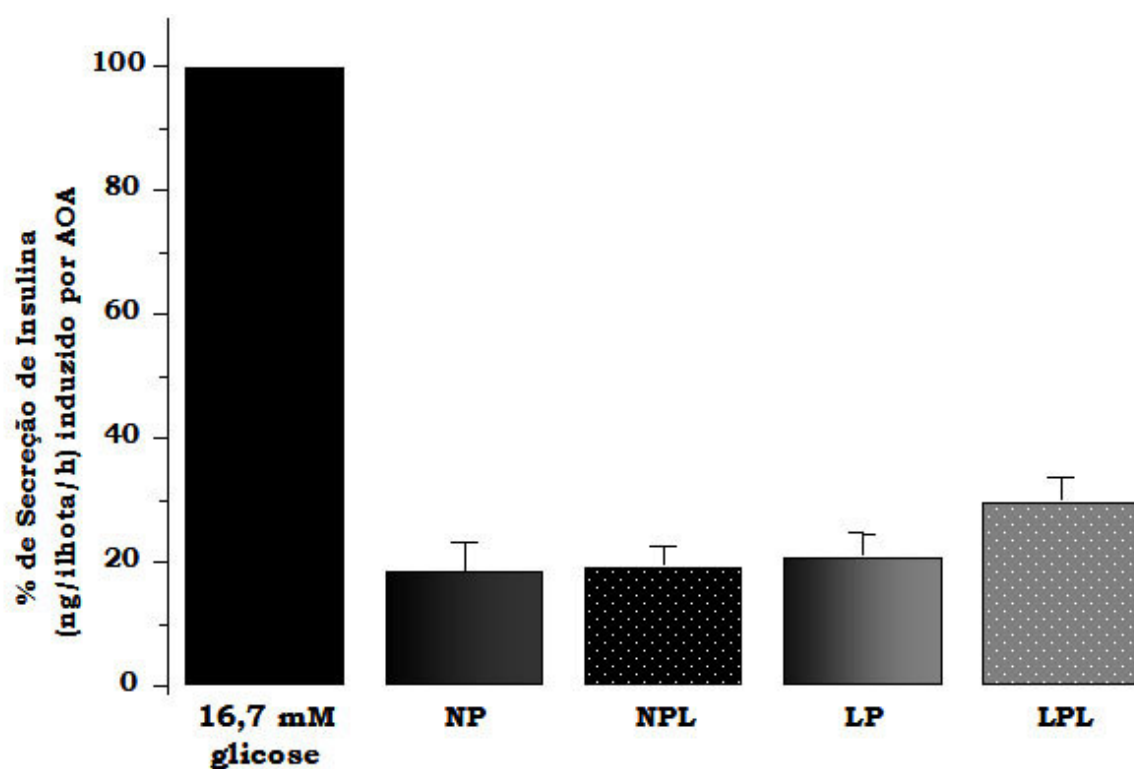


Fig. 18 – Efeito do ácido aminooxiacético (5 mM) na porcentagem de secreção de insulina estimulada por 16,7 mM de glicose em ilhotas de Langerhans de ratos dos grupos NP (n=12) , LP (n=12) , NPL (n=12) e LPL (n=12). As ilhotas foram incubadas por 1 hora em 37 °C em diferentes concentrações de glicose . As barras indicam as médias \pm se. $p < 0,05$.

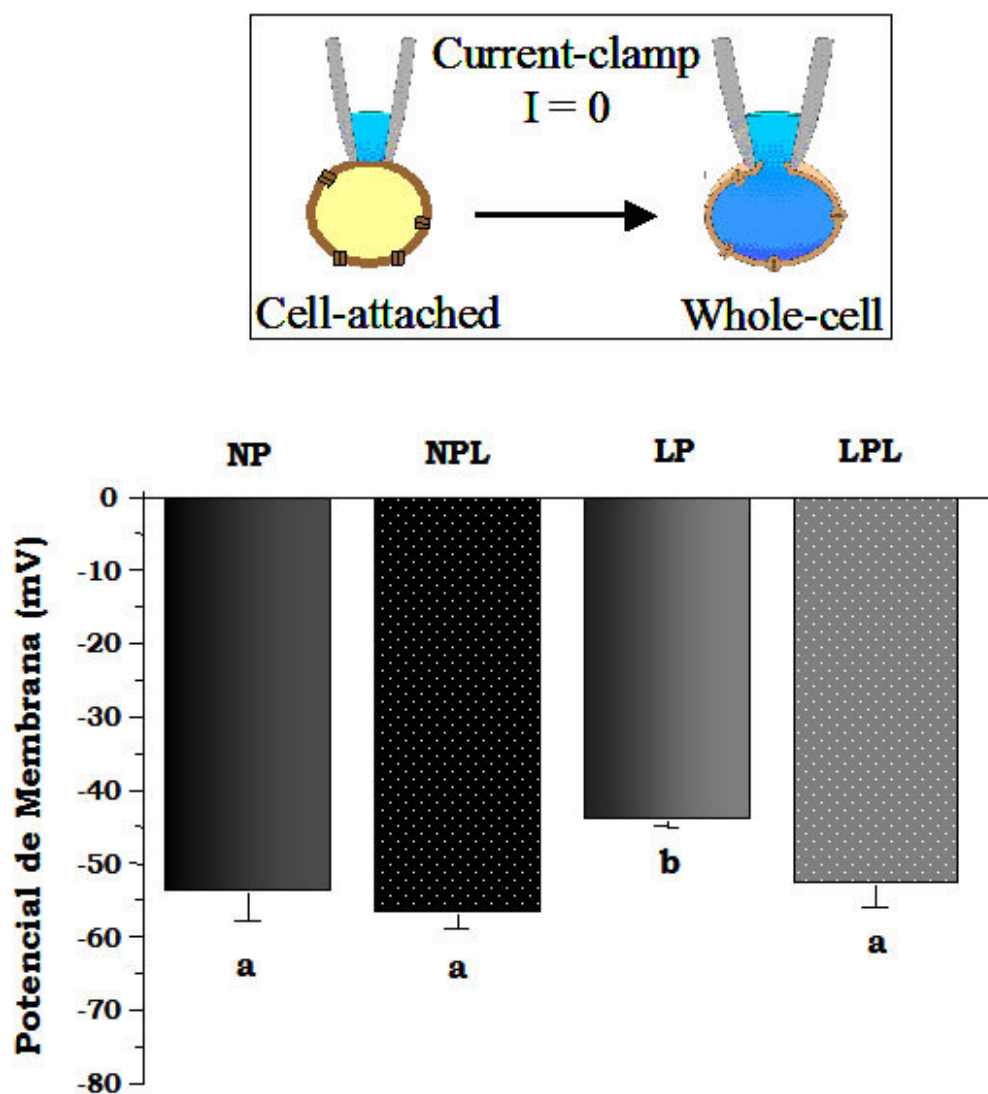


Fig. 19 - Efeito da suplementação com leucina no potencial de membrana intracelular em célula B pancreáticas de camundongos NP (n=12) , LP (n=12) , NPL (n=12) e LPL (n=12). As ilhotas foram incubadas por 1 hora em 37 C em diferentes concentrações de glicose . As barras indicam as médias \pm se. Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$.

CÁLCIO CITOPLASMÁTICO

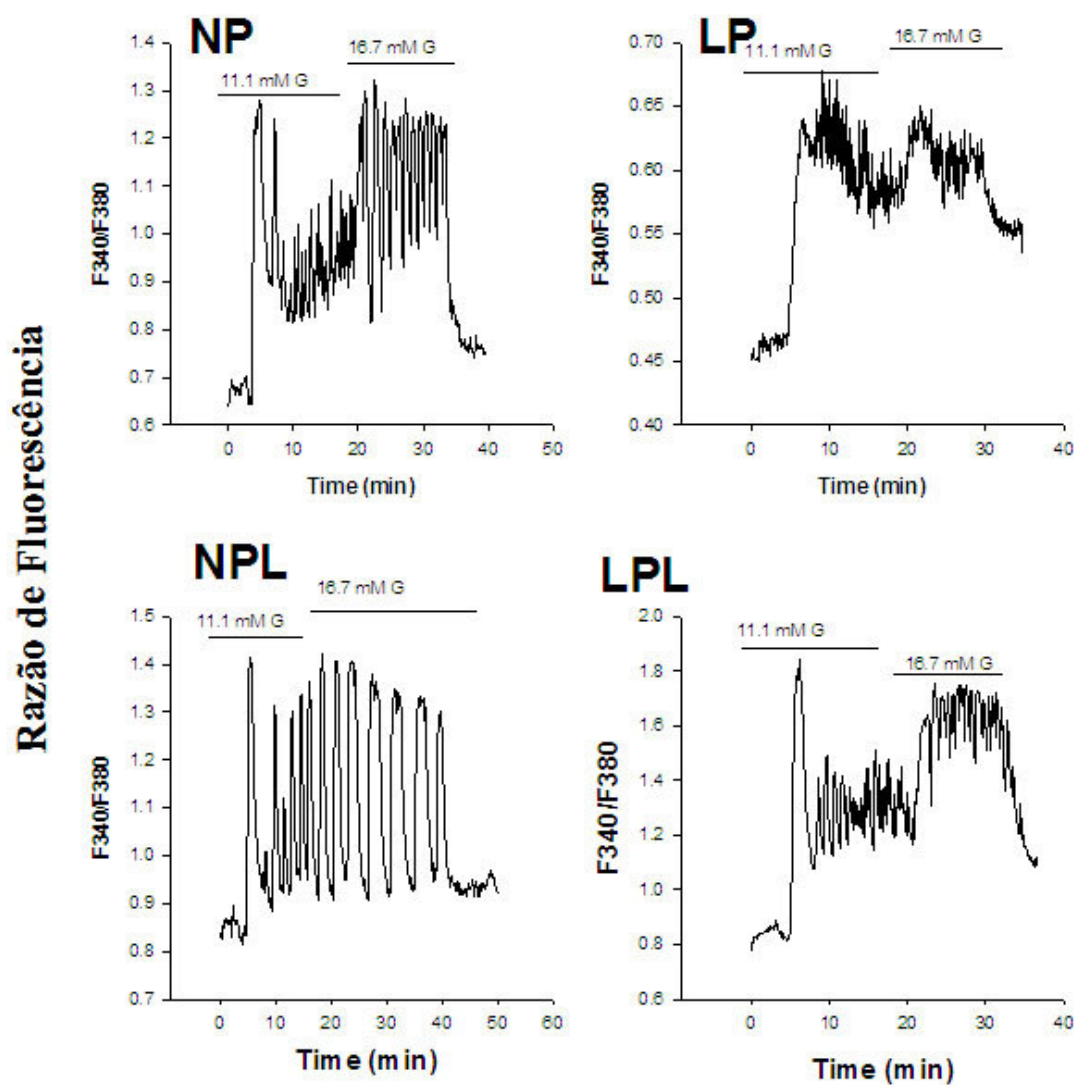


Fig. 20 – Mostra mudanças na razão de fluorescência para cálcio intracelular em ilhotas de camundongos NP (n=15), LP (n=10), NPL (n=16) e LPL (n=12). As ilhotas foram incubadas por 2 hora em 37 °C em presença de solução de Krebs com 2 μ M de fura 2AM. Após este período as ilhotas foram colocadas na câmara de perfusão com diferentes concentrações de glicose. As figuras são de um registro representativo do número de ilhotas indicada acima.

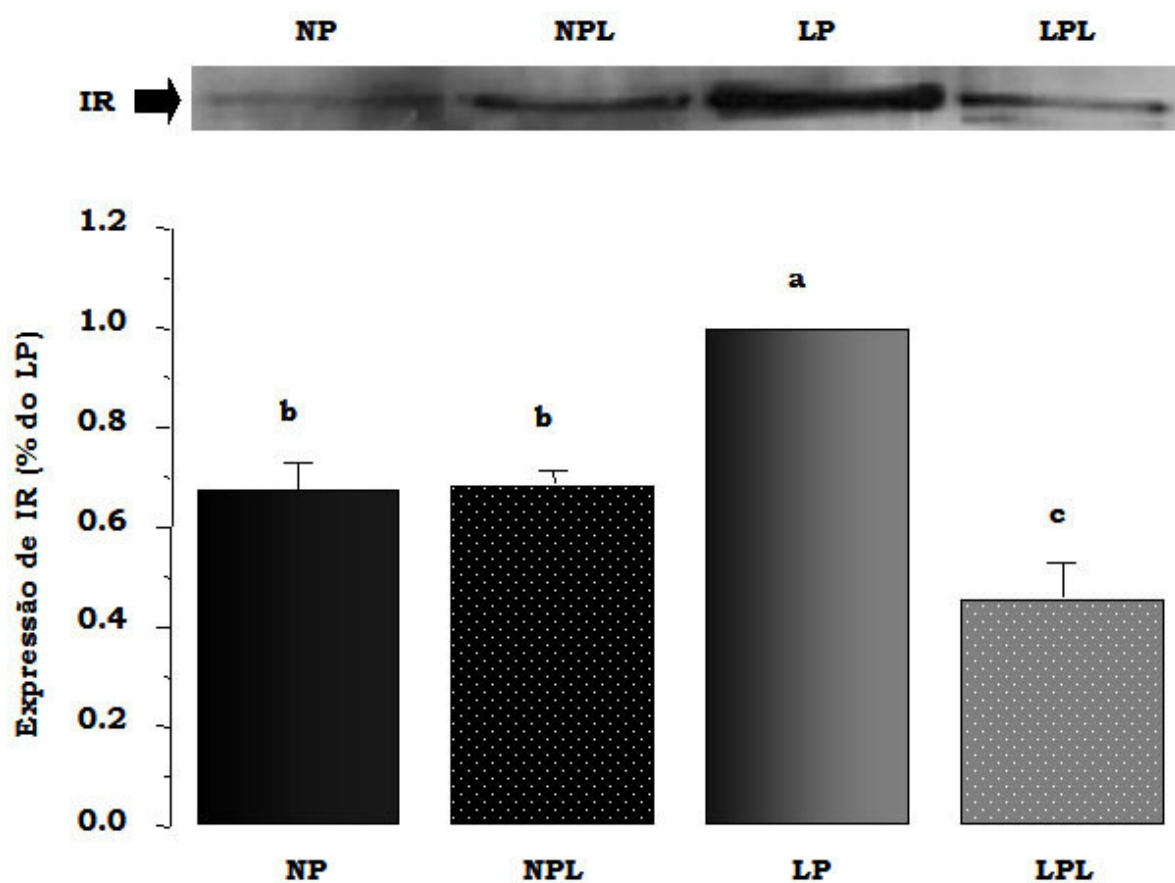


Fig. 21 – Mostra quantificação da proteína IR por densitometria das bandas do gel de poliacrilamida em ilhotas isoladas de ratos wistar machos NP (n=4) , LP (n=4) , NPL (n=4) e LPL (n=4). Os resultados foram expressos em média \pm se. (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

amplitude das oscilações da $[Ca^{+2}]_i$ foi reduzida, porém a frequência foi aumentada quando comparada com ilhotas NP.

5.6 – Proteínas Envolvidas na Cascata de Sinalização de Insulina em Ilhotas de Langherans

Na **Fig. 21** realizou-se quantificação do receptor de insulina (IR) utilizando a técnica de Western Blotting e a densitometria das bandas, as quais revelaram um aumento de 20%, aproximadamente, dessas proteínas em ilhotas provenientes de animais LP, comparado aos grupos NP e NPL. Quando se suplementou o grupo desnutrido (LPL) observou-se uma diminuição de 30% de proteína do receptor, comparado ao grupo LP, e de 15% comparado aos grupos NP e NPL. Ao contrário do IR, o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) apresentou diminuição de aproximadamente 30% nos grupos LP e LPL comparados aos respectivos NP e NPL na **Fig. 22**. Deste modo, parece que somente a restrição protéica promoveu mudanças na quantidade desta proteína.

Na **fig. 23** representou-se a expressão do mRNA da enzima Akt pela técnica de PCR constatando, assim, uma diminuição do mRNA dessa enzima em ilhotas dos grupos LP comparado aos grupos NP e NPL, porém o grupo LPL apresentou aumento do mRNA em relação ao grupo LP mas não conseguiu atingir os níveis dos respectivos grupos NP e NPL ($p < 0,05$). Por razões técnicas e de tempo não foi possível verificar a comprovação se esta expressão gênica reduzida em LP é aumentada, após suplementação com leucina, em LPL, correlaciona-se com aumento da proteína Akt. Porém será de primordial importância sua quantificação para comprovar seu papel em ilhotas de animais desnutridos.

A expressão do mRNA da PI3K, uma proteína envolvida na cascata de sinalização de insulina e responsável pela ativação das subseqüentes mTOR e S6K-1, foi avaliada pela técnica de PCR e os resultados obtidos constam na **Fig. 24A**. Observou-se diminuição do conteúdo desse mRNA nos animais provenientes do grupo LP e LPL em relação ao grupo controle (NP). Não houve um aumento significativo entre os grupos NPL e NP e tão pouco entre os grupos LP e LPL ($p < 0.05$). Na **Fig. 24B** verifica-se a quantificação da proteína PI3K, as quais revelaram aumento de 20% aproximadamente, dessa proteína, em ilhotas

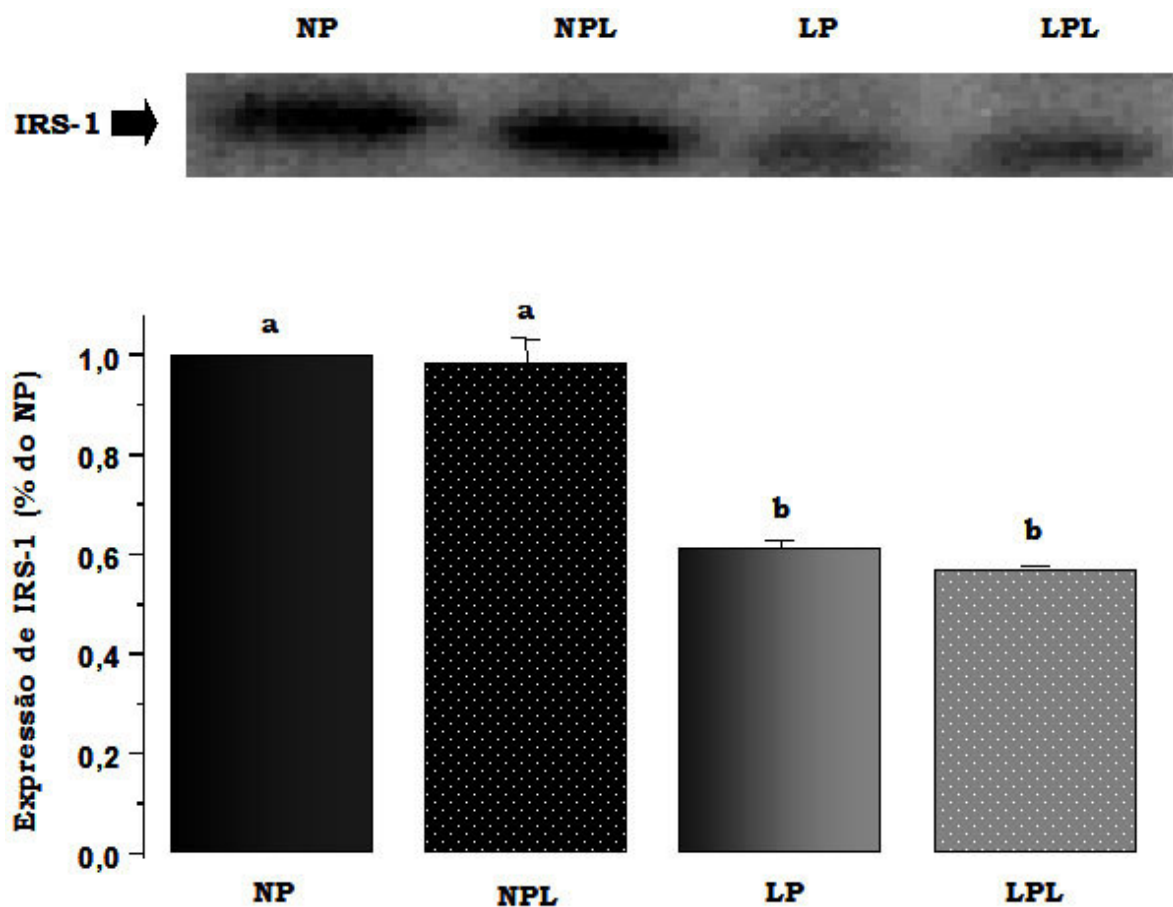


Fig. 22 – Mostra quantificação da proteína IRS-1 por densitometria das bandas do gel de poliacrilamida em ilhotas isoladas de ratos wistar machos NP (n=4) , LP (n=4) , NPL (n=4) e LPL (n=4). Os resultados foram expressos em média \pm se. (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

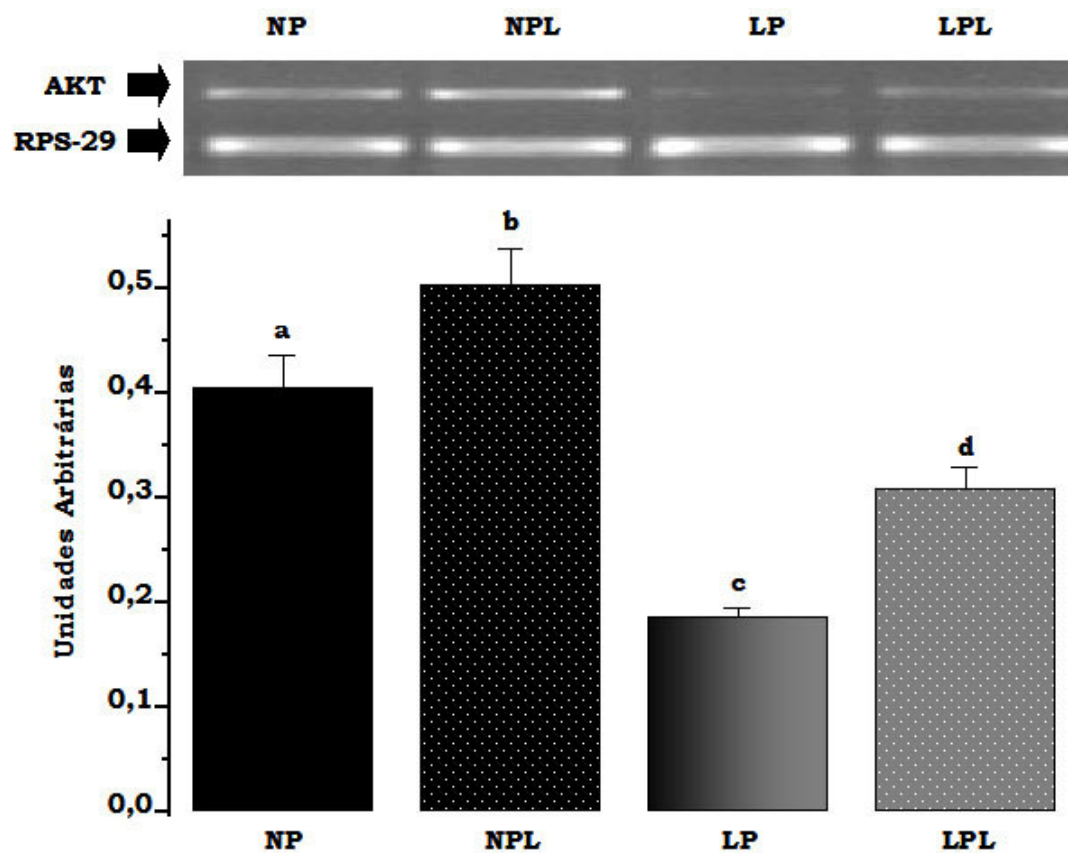


Fig. 23 – Mostra expressão do mRNA da AKT (PKB) em ilhotas de ratos Wistar machos NP (n=12), LP (n=12), NPL (n=12) e LPL (n=12). Os resultados foram expressos em média \pm se (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

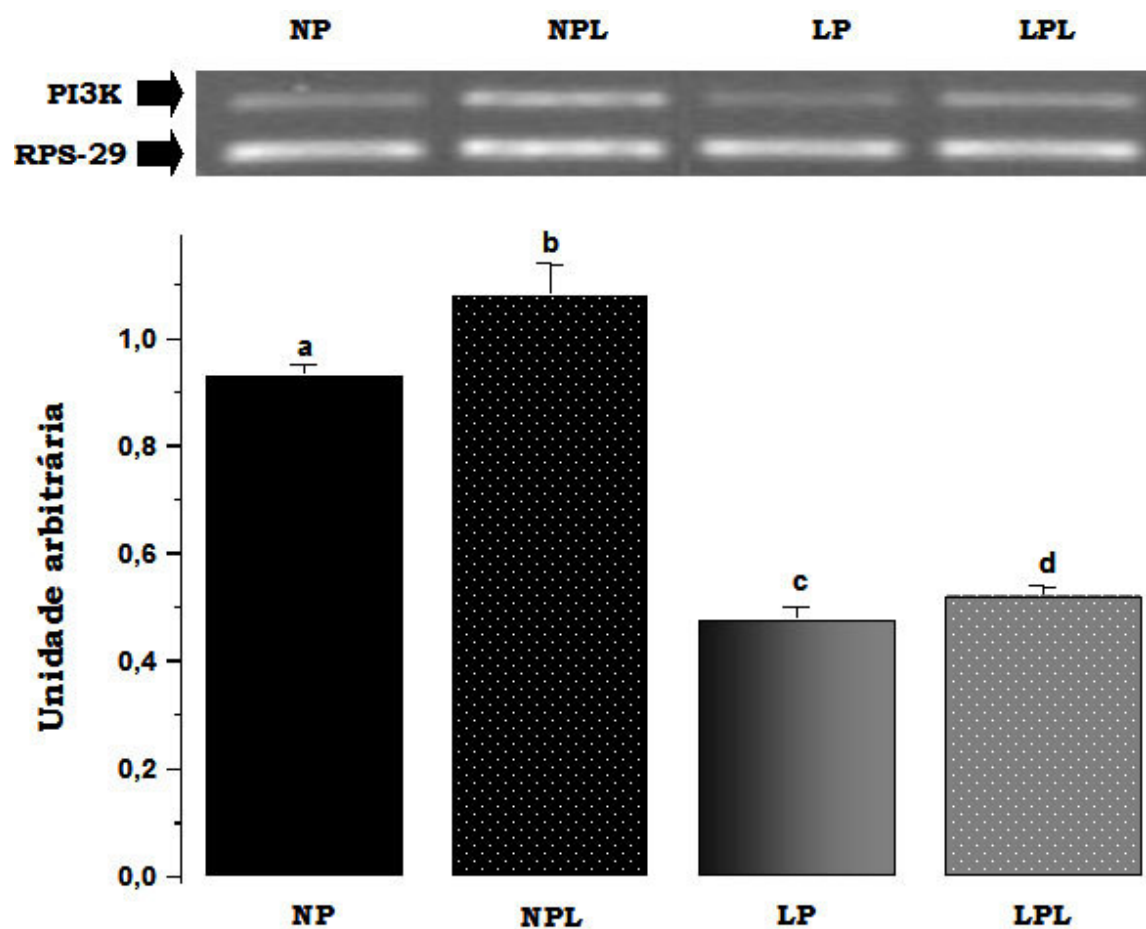


Fig. 24A – Mostra a expressão do mRNA da PI3k em ilhotas de ratos Wistar machos NP (n=12), LP (n=12), NPL (n=12) e LPL (n=12). Os resultados foram expressos em média \pm se. (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

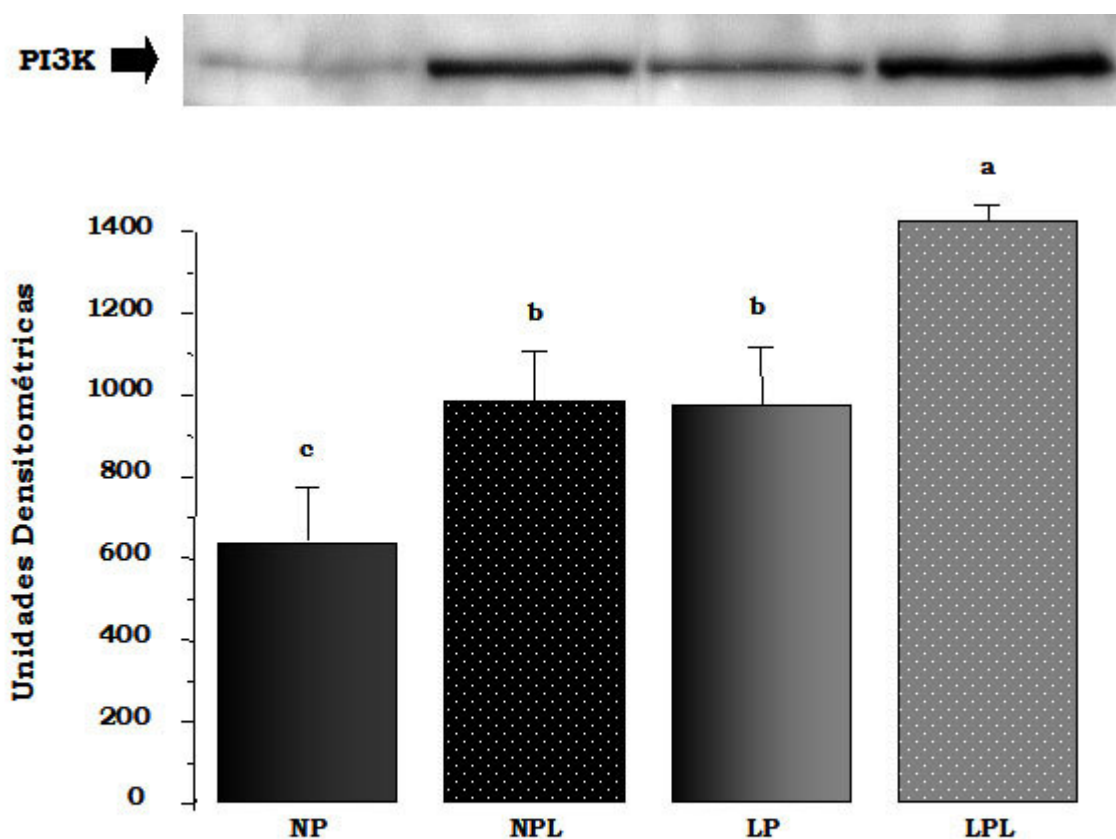


Fig. 24B – Mostra a quantificação da proteína PI3K por densitometria das bandas do gel de poliacrilamida em ilhotas de ratos wistar machos NP (n=4), LP (n=4), NPL (n=4) e LPL (n=4). Os resultados foram expressos em média \pm se. (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

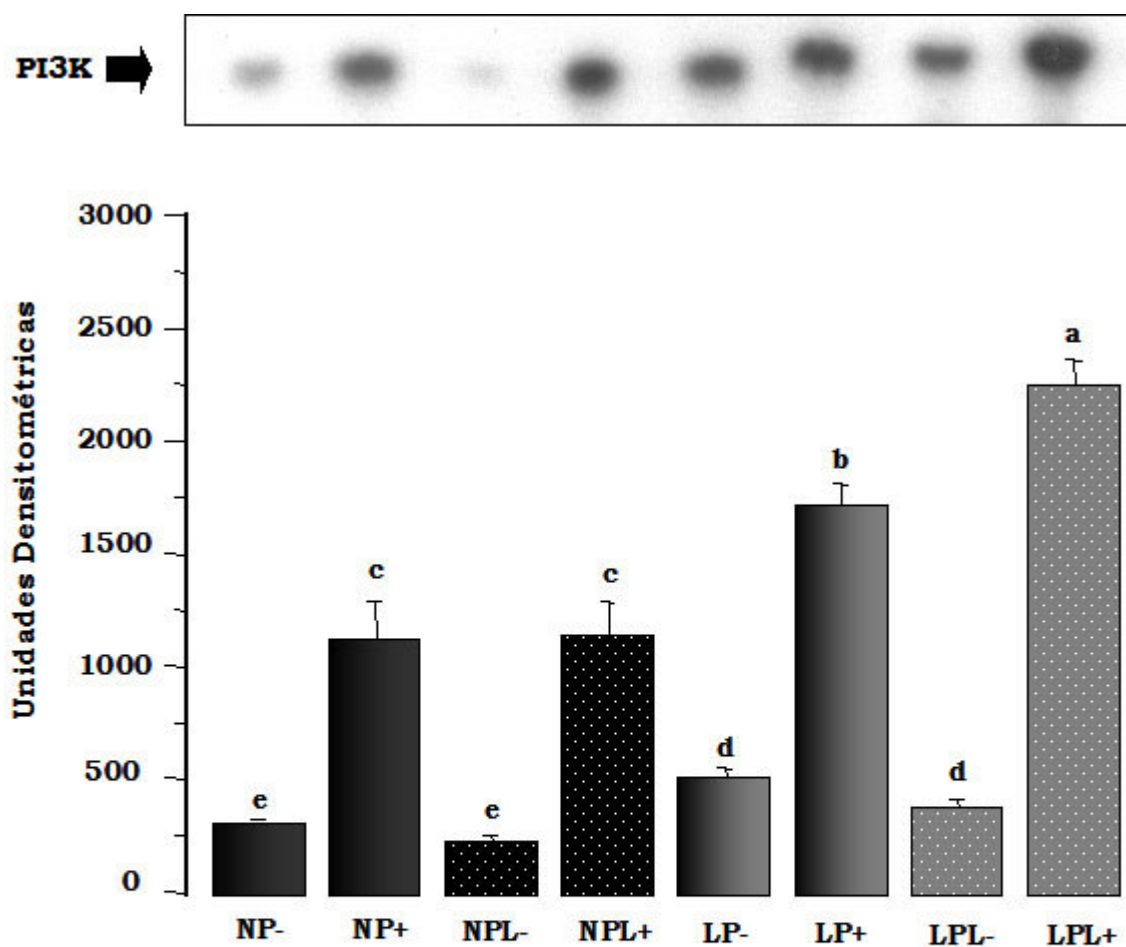


Fig. 24C – Avaliação da fosforilação em tirosina de IRS-1 associado a PI3Kinase em ilhotas de ratos Wistar machos NP (n=4), LP (n=4), NPL (n=4) e LPL (n=4). As ilhotas foram incubadas sem estímulo de insulina (-) e 5 min após a injeção de insulina (+). Essas ilhotas foram sonicadas em tampão de extração para atividade da PI3K e submetido a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1. (Letras diferentes representam diferenças significativas $p < 0,05$).

provenientes de animais LP comparado com ilhotas provenientes de animais NP. Quando os animais foram suplementados com leucina, verifica que o grupo LPL obteve de proteína desta enzima em torno de 27% comparado ao grupo de ilhotas LP e em torno de 60% quando a comparação foi com ilhotas NP ($p < 0.05$). Outro fato importante é que a suplementação com leucina proporcionou aumento da expressão protéica em ilhotas NPL, a qual ficou com níveis semelhantes às ilhotas LP, porém sendo significativamente menores que o grupo LPL.

A **Fig. 24C** representa a atividade da PI3K. Quando comparamos NP e NPL não observamos diferença significativa da atividade da enzima, contudo, pode-se observar um aumento de 1,6 vezes em ilhotas de animais LP e LPL sem o estímulo com insulina, e quando se estimulou com insulina houve um aumento de 1,4 vezes no LP e 1,8 vezes no LPL quando comparados ao NP estimulado com insulina ($p < 0.05$). Existe uma correlação direta entre o aumento do conteúdo protéico da enzima com sua maior atividade em ilhotas de animais LP e LPL. Já o aumento protéico da enzima, observado em ilhotas NPL, não foi correspondido com aumento de atividade da PI3K nessas ilhotas.

A expressão do mRNA da mTOR foi avaliada pela técnica de PCR e os resultados obtidos constam na **Fig. 25A**. Observou-se diminuição do conteúdo desse mRNA em ilhotas de animais provenientes do grupo LP em relação ao grupo controle (NP). Após suplementação com leucina o grupo de ilhotas LPL restaurou seu conteúdo de mRNA, semelhante ao grupo NP e não ocorreu aumento significativo entre os grupos NPL e NP ($p < 0.05$). Na **Fig. 25B** observou-se a quantificação da proteína mTOR, as quais revelaram a diminuição de 20% aproximadamente, dessa proteína em ilhotas provenientes de animais LP comparado com ilhotas provenientes de animais NP e NPL, havendo um aumento de 27% quando suplementamos os animais LP, ou seja o grupo de ilhotas LPL comparado ao grupo de ilhotas LP ($p < 0.05$). O grupo de ilha LPL restaurou seu conteúdo protéico da mTor, apresentando uma relação direta com a expressão gênica dessa enzima neste modelo experimental.

A expressão do mRNA da p70^{S6K} foi avaliada pela técnica de PCR e os resultados obtidos constam na **Fig. 26A**. Observou-se diminuição do conteúdo desse mRNA nos animais provenientes do grupo LP e LPL em relação ao grupo controle (NP). Não houve um aumento significativo entre os grupos NPL e NP e

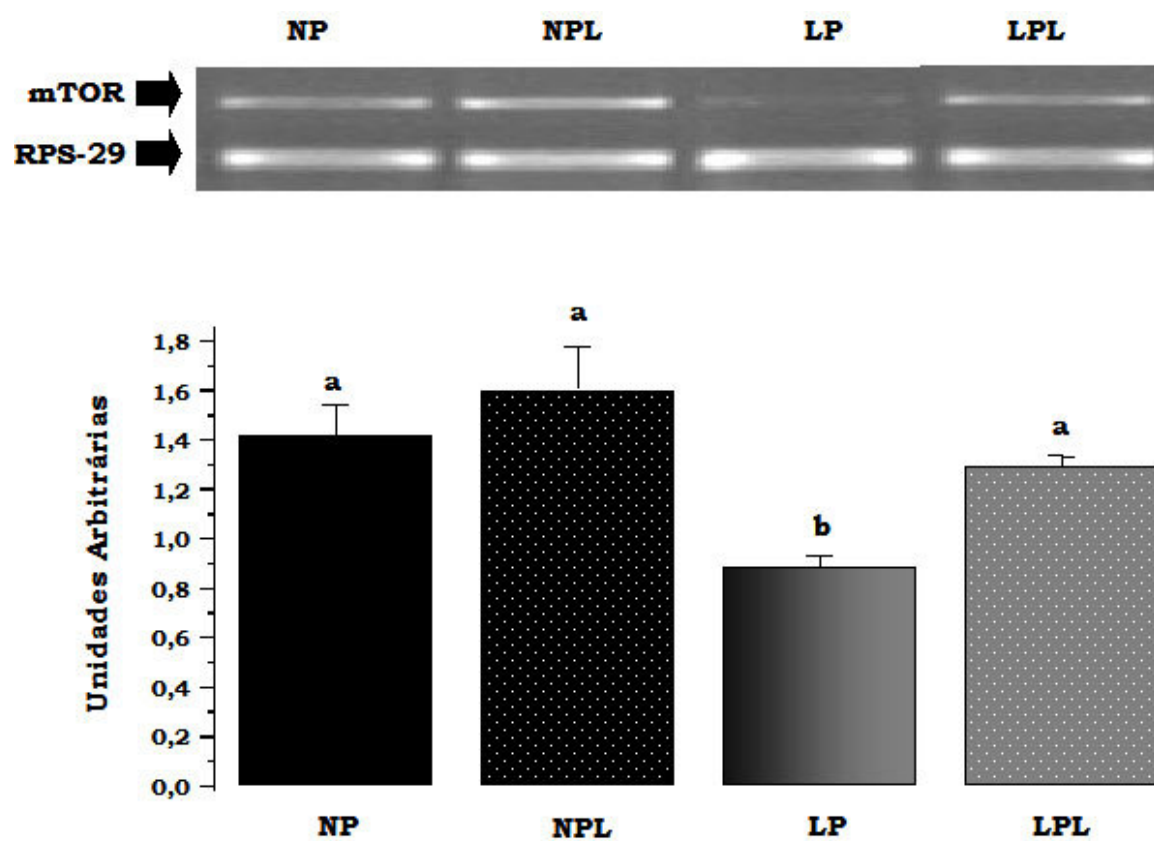


Fig. 25A – Mostra a expressão do mRNA da mTOR em ilhotas de ratos Wistar machos NP (n=11), LP (n=11), NPL (n=11) e LPL (n=11). Os resultados foram expressos em média \pm se. (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

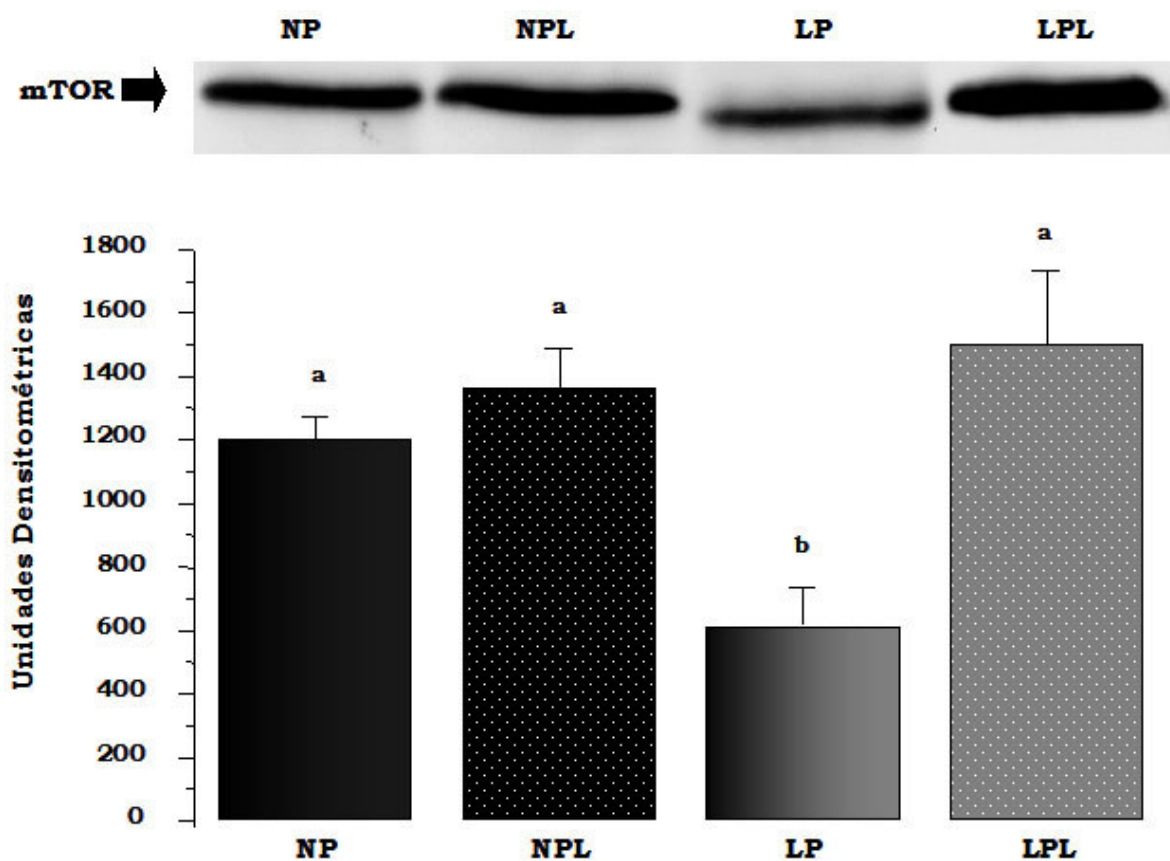


Fig. 25B – Verificamos a quantificação da proteína mTOR por densitometria das bandas do gel de poliacrilamida em ilhotas isoladas de ratos wistar machos NP (n=4) , LP (n=4) , NPL (n=4) e LPL (n=4). Os resultados foram expressos em média \pm se. (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

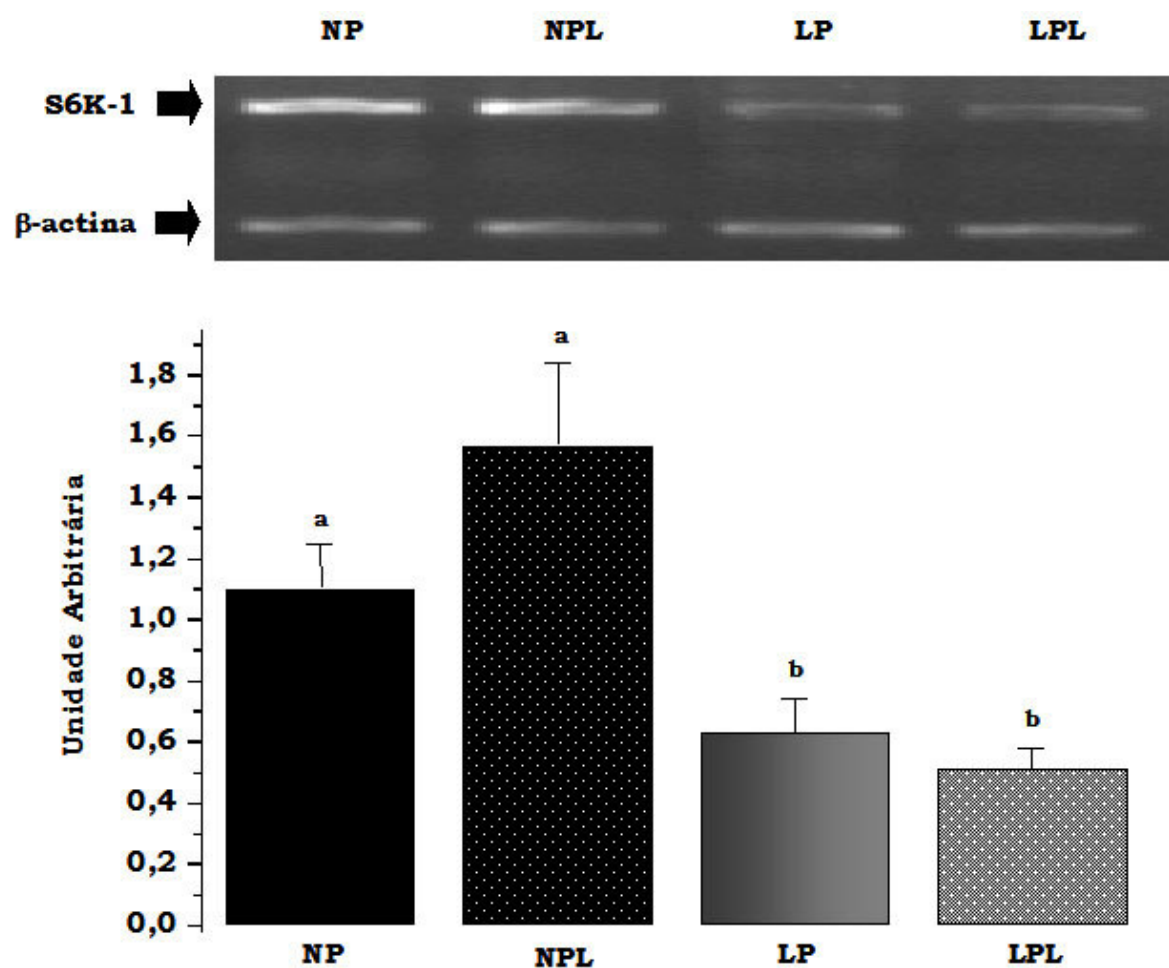


Fig. 26A – Mostra a expressão do mRNA da S6K-1 em ilhotas de ratos Wistar machos NP (n=8), LP (n=8), NPL (n=8) e LPL (n=8). Os resultados foram expressos em média \pm se. (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

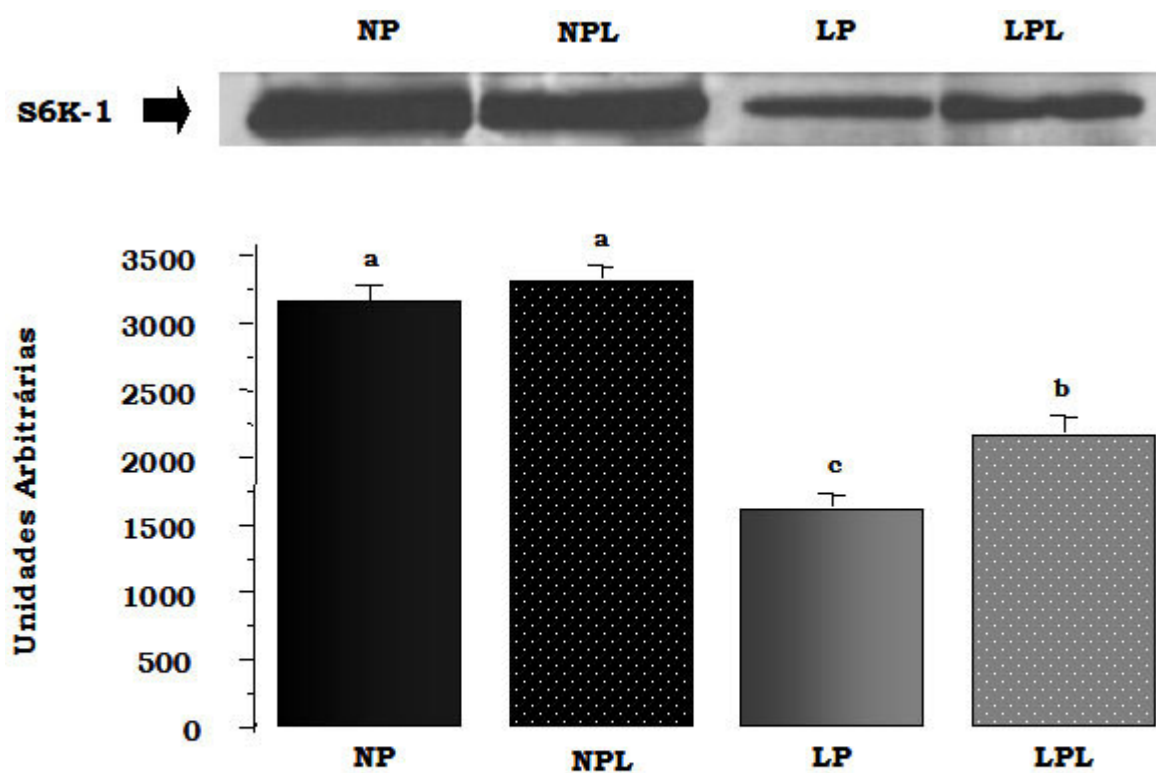


Fig. 26B - Quantificação da proteína S6K-1 por densitometria das bandas do gel de poliácridamida em ilhotas de ratos wistar machos NP (n=4), LP (n=4), NPL (n=4) e LPL (n=4). Os resultados foram expressos em média \pm se. (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

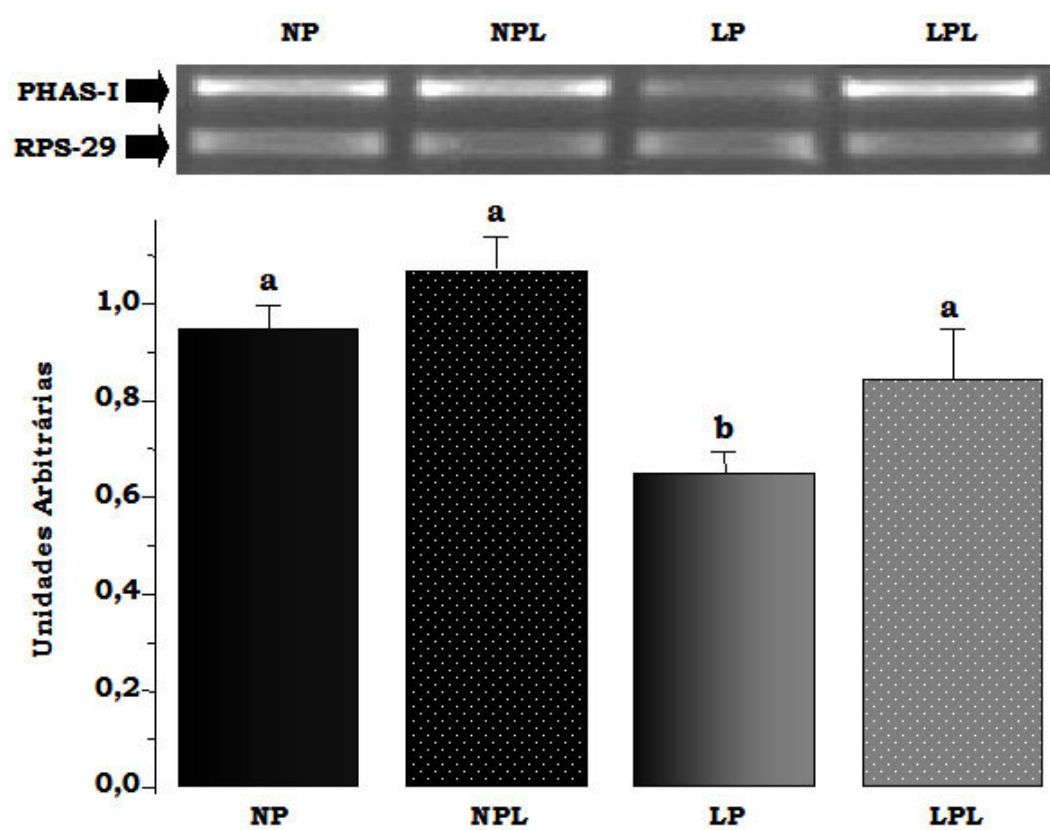


Fig. 27 – Mostra a expressão do mRNA da PHAS-I em ilhotas de ratos Wistar machos NP (n=12), LP (n=12), NPL (n=12) e LPL (n=12). Os resultados foram expressos em média \pm se. (Letras diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,05$).

tampouco entre os grupos LP e LPL ($p < 0.05$). Na **Fig. 26B** observou-se a quantificação da proteína S6K-1, as quais revelaram a diminuição de 48% aproximadamente, dessa proteína, em ilhotas provenientes de animais LP comparado com ilhotas provenientes de animais NP e NPL, havendo um aumento de 27% quando suplementamos os animais LP, ou seja, o grupo de ilhotas LPL comparado ao grupo de ilhotas LP ($p < 0.05$), entretanto, este aumento não foi possível fazer com que as ilhotas LPL apresentasse níveis semelhantes às controle (NP e NPL).

Por último, avaliou-se a expressão gênica da enzima PHAS-I detectada pela técnica de PCR nos grupos de ilhotas NP, NPL, LP e LPL, **Fig 27**. Os resultados indicam que houve uma diminuição significativa do mRNA da PHAS-I no grupo LP comparado aos grupos NP e NPL, porém quando suplementou-se esse grupo (LPL) com leucina, obteve-se aumento significativo da expressão gênica dessa enzima quando comparado ao grupo LP, mas não foi possível atingir os níveis dos respectivos controles NP e NPL ($p < 0,05$). A exemplo da Akt, não foi possível verificar a comprovação se esta expressão gênica reduzida em LP e aumentada após suplementação com leucina, em LPL, correlaciona-se com aumento do conteúdo protéico. Porém, será de primordial relevância sua quantificação para clarear seu papel em ilhotas de animais desnutridos.

Discussão

6 – Discussão

6.1 – Avaliação do Estado Nutricional e Sensibilidade Periférica

Observou-se que ratos mantidos dos 21 aos 120 dias de idade com dieta contendo 6% de proteína e dos 90 aos 120 dias de idade suplementados com solução de leucina apresentaram características semelhantes às de desnutrição infantil e modelos experimentais de desnutrição (**Tab I**) tais como: redução da massa corporal e dos níveis de proteínas e aumento de ácidos graxos livres no plasma (**Weinkove et al, 1976; Heard et al, 1977; Lunn & Austin, 1983; Okitolonda et al., 1990; Clayessens et al., 1990, Wikes et al. 1996 e Ferreira et al, 2003 e 2004; Lewis et al, 2006**).

Existem amplas evidências de que a sinalização exercida pelos aminoácidos é de grande importância para os processos fisiológicos. É bem conhecido que uma infusão de aminoácidos, *in vivo*, aumenta a síntese protéica no músculo induzido por insulina (**Garlick & Grant, 1988; Kimball & Jeffersom, 2006**). Atualmente, sabe-se que este efeito se deve, em parte, pelo controle da sinalização intracelular exercida por esses nutrientes, pois, após uma dieta rica em proteína, as respostas anabólicas em humanos, ratos e camundongos, estão acompanhadas de aumento da fosforilação da 4E-BPI e da S6K-1 em fígado e músculo, proteínas estas que sabidamente estão envolvidas com síntese protéica e crescimento celular (**Shah et al, 2000; Balage et al, 2001**). Inibição farmacológica da produção de insulina em ratos previne o efeito anabólico dos aminoácidos, e em especial da leucina, indicando que aminoácidos e insulina são requeridos para que haja um balanço positivo de nitrogênio observadas em experimentos *in vitro* (**Balage et al, 2001**). Similarmente, em humanos, leucina e insulina agem sinergicamente em estimular a fosforilação da S6K-1 em músculo, e como consequência aumento da síntese protéica (**Greiwe et al, 2001**).

O modelo experimental de restrição protéica, estabelecido por esse grupo de pesquisa, confere aos animais as características clássicas de desnutrição. Mais recentemente demonstramos redução da secreção de insulina estimulada por glicose e também por aminoácidos. Esta redução se deve, em parte, a mudanças no padrão de expressão de proteínas chaves do processo secretório

(Ferreira et al 2003 e 2004). Neste modelo de restrição protéica, ainda, demonstrou-se que as ilhotas de Langerhans apresentam redução da proteína S6K-1 e níveis de leucina plasmáticos **(Filiputti, E 2003)**. Baseados nestes resultados, na relevância destas proteínas para o processo de secreção de insulina e do anabolismo protéico neste modelo de restrição protéica, suplementou-se os animais por um período de 30 dias com leucina, no intuito de observar se estas alterações poderiam ser recuperadas e/ou atenuadas, bem como os mecanismos envolvidos neste processo.

Para a caracterização desse modelo experimental houve a necessidade de manter os animais, durante um mês, confinados em gaiolas metabólicas e medidos, após isso, consumo alimentar, consumo hídrico, e o teor de nitrogênio eliminado nas fezes. Em estudos prévios, pesquisadores demonstraram que em animais controle e suplementados com leucina não houve diferença significativa em ganho de peso, em ingesta alimentar e tão pouco em ingesta hídrica, semelhante aos resultados encontrados por **Lynch et al, 2002**. Os resultados encontrados aqui estão condizentes com esse trabalho, ressaltando que o ganho de peso nos animais LP e LPL foi significativamente menor que NP e NPL **(Fig. 1)**. Estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa já haviam confirmado essas observações **(Ferreira et al, 2003)**.

Nossos resultados também confirmam que os grupos LP e LPL têm uma ingesta alimentar maior que os respectivos NP e NPL, ou seja, possivelmente a falta de proteínas na dieta faz com que esses grupos tentem reverter o quadro de privação protéica ingerindo maior quantidade calórica **(Fig. 2)**, porém esta tentativa não reverte a taxa de crescimento nestes animais. Recentemente, **Um et al, 2004** relatou que a ausência da proteína S6K-1 protege contra a obesidade induzida por dieta e idade enquanto aumenta a sensibilidade à insulina, concluindo que a perda de gordura pelos animais deficientes dessa proteína se dá pela rápida oxidação no tecido adiposo marrom e/ou músculo e que, possivelmente, isso ocorra, pois a obesidade está ligada diretamente a via de fosforilação oxidativa.

Em nosso trabalho observamos que apesar da ingesta alimentar estar, aproximadamente, duas vezes maior em animais desnutridos, **Fig 2**, os quais possuem níveis diminuídos de S6K-1, isso não provocou o acúmulo de gordura

abdominal, retro-peritoneal e epididimal (**Fig. 5**), confirmando a observação de que a ausência e/ou redução da S6K-1 pode alterar a via de oxidação rápida desses triglicérides e/ou outros metabólitos. Outro fato importante que merece destaque é que a suplementação com leucina induziu aumento de consumo alimentar somente em animais NPL. Aqui devemos salientar que a restrição protéica a que foram submetidos os animais LP já induz um comportamento alimentar que supera o possível controle pela leucina dos hormônios envolvidos no controle da ingesta. Também podemos observar que a ingesta hídrica foi similar entre os quatro grupos em estudo, concluindo, com isso, que a adição de leucina na água não provocou diferença em seu comportamento de ingestão hídrica (**Fig. 2**). Por último, quantificamos o nitrogênio fecal nos grupos em estudos, nos quais se observou uma diminuição do conteúdo deste elemento em animais LP e LPL (**Fig. 4**). Isso deve ocorrer por conta da diminuição da ingestão de proteínas oriundas de uma dieta deficiente da mesma e por uma maior assimilação de nitrogênio neste modelo de desnutrição.

Um fato importante foi que a suplementação com leucina proporcionou mudanças no perfil dos parâmetros bioquímicos, tais como redução dos níveis de albumina sérica, glicose e insulina plasmática, aumento de proteínas em animais LP. Este padrão bioquímico pode sugerir aumento de síntese protéica nestes animais após tratamento com este aminoácido (**tab. I**), similar aos resultados encontrados por **Karlsson et al, 2004**. Podemos destacar, ainda, que tanto o grupo controle como desnutrido e suplementado apresentaram elevação de AGL e de insulina plasmática e, também, apresentaram crescimento (aumento da massa corpórea) praticamente durante todo tempo experimental (**fig. 1**). A associação destes parâmetros favorece a hipótese de que o tratamento com leucina deve induzir síntese protéica quando comparado com seus respectivos controles.

Talvez se nos animais desnutridos sua exposição à leucina fosse estendida por um período mais prolongado, poderíamos verificar mudanças somáticas importantes através da avaliação da massa corpórea. Porém, o que sugere nossos dados é que ocorra mudança no perfil das proteínas solúveis essenciais para os processos fisiológicos e, neste caso, voltados para manutenção do acoplamento, estímulo e secreção de insulina induzida por nutrientes e de proteínas envolvidas

na sinalização insulínica tecido específica, com o intuito de manter a homeostase glicêmica.

Em nosso modelo experimental, verificamos que a suplementação com leucina promoveu aumento tanto da sensibilidade periférica (**Figs. 6, 7, 8 e 9**) como dos níveis de insulina plasmáticos frente a diferentes nutrientes, e em especial a leucina, pesando ao final para a melhoria da homeostase glicêmica, uma vez que observamos redução da glicemia de jejum (**Tab I**). Outro fato importante, que ainda podemos especular, consiste no possível rearranjo da composição de gordura corporal dos animais desnutridos (**Fig. 5**). Observamos que o tratamento com leucina produz uma tendência de remodelação deste compartimento corporal aproximando-os dos animais controle e/ou LPL, a despeito da não uniformização da massa corpórea entre animais controle e desnutridos. Novamente, o aumento da insulina plasmática, aumento da sensibilidade periférica a insulina, redução da glicemia e possível aumento da síntese protéica podem explicar estas mudanças.

6.2 - Mecanismo de Secreção Insulina e Vias de Controle

O mecanismo de secreção de insulina é estimulado por nutrientes, hormônios e diferentes estímulos nervosos. Aminoácidos constituem um grupo importante de nutrientes que exercem múltiplas funções no controle do processo secretório, agindo como substrato e reguladores das vias metabólicas. Também se destaca o papel em regular a síntese protéica e inibir proteólise celular. Aminoácidos também podem ativar vias de sinalização em células B com conseqüente crescimento e proliferação no pâncreas endócrino (**Meijer & Dubblhuis, 2004**). Dentre eles podemos destacar a leucina que é capaz de estimular e potencializar a secreção de insulina por dois diferentes mecanismos: via transaminação da leucina formando α -cetoisocaproato (KIC) e via de ativação alostérica da glutamato desidrogenase (GDH) causando a oxidação do glutamato em α -cetoglutarato (α -KG) ambas as vias geram intermediários do ciclo de Krebs gerando ATP, influxo de cálcio e conseqüente aumento da secreção de insulina (**Changhong et al, 2002; Zhiyong et al, 2003**).

Além deste efeito direto da leucina sobre o metabolismo celular das células B é descrito também que aminoácidos, nestas mesmas células, promovem aumento da produção de insulina através da proliferação celular das células B, como observado de fato em camundongos Knockout para S6K-1 (**Pende et al, 2000; McDaniel et al, 2002**).

Em nosso estudo, a suplementação com leucina promoveu uma mudança no perfil protéico das proteínas solúveis das ilhotas de Langerhans LPL e NPL, (**Fig 12**), porém o volume das ilhotas permaneceu semelhante (**Fig.10**). O metabolismo de glicose foi reduzido em ilhotas que sofreram suplementação, porém tanto o metabolismo de leucina como a glutamina permaneceram inalterados nos grupos em estudo. A redução do metabolismo observado, tanto em ilhotas LPL como em NPL, sugere que o mecanismo de ação predominante da leucina em estimular a secreção de insulina seja pela ativação alostérica da GDH. Estudos recentes tem caracterizado que a ativação da GDH, e também a glutaminólise, é o processo pelo qual leucina regula ambos o influxo de cálcio e o mecanismo de secreção de insulina em células B (**Gao, et al 1999; Zhiyong et al, 2003; Carobbio et al, 2004; Maechler et al, 2006**). Esta afirmação foi comprovada quando se utilizou o análogo de leucina (BCH) substância não metabolizada que induz ativação da GDH em células B.

Em ilhotas de Langerhans o metabolismo de glicose aumenta a formação de GTP (um inibidor da GDH) e reduz o conteúdo de ADP (ativador da GDH), (**Detimary, et al 1996**). Nós encontramos redução em torno de 50% do metabolismo de glicose em ilhotas de animais LP, isto se deve, em parte, ao efeito da restrição protéica a que foram submetidos estes animais. Esta característica culminou com redução significativa do mecanismo de secreção induzida por esta hexose. Após suplementação com leucina, observamos redução da oxidação de glicose tanto em ilhotas LPL como em NPL, porém esta redução foi muito mais intensa no grupo controle em comparação ao grupo desnutrido (**Fig. 12**). Mudanças no metabolismo da glicose podem ter reflexos na sensibilidade da GDH para leucina (**Gao et al, 2003**). Nosso resultado comprova esta afirmação, pois observamos redução da oxidação da glicose, tanto em LPL como em NPL.

Outro ponto favorável à hipótese de que a ativação alostérica da GDH, em ilhotas LPL e NPL, é via preferencial utilizada pela leucina para estimular a

secreção de insulina em ilhotas de Langerhans foi que a taxa de oxidação deste nucleotídeo, como da glutamina, foi a mesma nos grupos em estudo (**Fig. 13 e 14**), pois se transaminação fosse predominante, possivelmente, teríamos aumento da taxa de oxidação da leucina em animais suplementados. Outro ponto favorável ao papel da GDH reside no fato de pacientes que apresentam mutação do gene que codifica a expressão protéica desta enzima, neles observamos hiperinsulinismo associado a hiperamonemia, demonstrando que aumento da quantidade ou atividade da enzima pode gerar aumento na capacidade secretória em células B (**Stanley et al, 1988; Changhong et al, 2003 e 2004; Magge et al, 2004**).

Para demonstrar a eficiência da suplementação de leucina sobre a função das ilhotas de Langerhans quantificamos a secreção de insulina induzida por crescentes concentrações de glicose (**Fig. 15 e 16**). O tratamento com leucina foi capaz de aumentar a secreção de insulina em ambos NPL e LPL, a despeito de uma redução da oxidação dessa hexose, quando foi utilizado como agente insulínico. Seja em ilhotas de ratos como de camundongo desnutridos, leucina foi eficaz em corrigir a capacidade secretória destas ilhotas, principalmente em concentrações acima de 11.1 mM de glicose. É fato de que desnutrição confere alterações celulares irreversíveis, principalmente no tecido endócrino pancreático (**Ferreira et al, 2003, 2004; Delguingaro-Augusto et al, 2004**). Entretanto, com a suplementação conseguimos restaurar o processo secretório, por outro lado não houve aumento do conteúdo de insulina (**Tab.I**), sugerindo que o efeito da leucina seja predominantemente em vias metabólicas envolvidas no processo secretório.

A secreção de insulina estimulada por glicose inicia-se com o reconhecimento e subsequente metabolização do nutriente pelas células B, gerando um ou diversos sinais que levam à redução da condutância ao K^+ . A diminuição da condutância ao K^+ provoca um acúmulo relativo do referido cátion nas células B, com consequente despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem. O influxo de Ca^{2+} e o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ ativa a maquinaria exocitótica, resultando em secreção de insulina (**Henquin et al, 2006**). Um efeito secundário da elevação do $[Ca^{2+}]_i$ é a ativação da adenil ciclase e fosfolipase C (PLC), que agindo sobre substratos específicos, geram AMP cíclico

(AMPC), diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP_3). Estes amplificam o sinal de $[Ca^{2+}]_i$ pelo efeito de liberação dos estoques celulares e por promover a fosforilação de proteínas que sensibilizam o processo secretório ao cálcio (**Flatt 1996**).

Através de experimentos eletrofisiológicos, Path Clamp, nós demonstramos - em células provenientes de ilhotas de camundongos desnutridos - que a desnutrição altera o potencial de membrana das células B, deixando estas células mais despolarizadas quando comparadas com células controle (**Fig.18**). Seguramente esta característica contribui para redução da secreção de insulina apresentada por este modelo. Após suplementação com leucina, as células de animais LP restauraram o potencial de membrana para valores semelhantes às células controle. Então, leucina induz redução na utilização da glicose através da diminuição de sua oxidação, favorecendo a ativação da GDH e restaura o potencial de membrana em células B de animais LP. Resta-nos a pergunta: será que estas características produzem também alterações no movimento de cálcio nestas ilhotas?

O movimento de cálcio em ilhotas de camundongo é usado como um sensor do metabolismo celular, pois existe uma correlação direta entre o aumento da concentração de nutrientes metabolizáveis e $[Ca^{2+}]_i$. Nós testamos esta hipótese e observamos que a desnutrição gerou mudança no movimento de cálcio em ilhotas de Langerhans quando induzidas por concentrações crescentes de glicose, correlacionando com a pobre secreção de insulina apresentada por estas ilhotas (**Fig. 19**). A suplementação com leucina corrigiu esta deficiência no movimento de cálcio, promovendo um perfil semelhante às ilhotas controle. Fato interessante foi que o tratamento com leucina também modificou o movimento de cálcio em ilhotas de animais NPL. A princípio, este dado nos levaria a pensar que o aumento do metabolismo poderia explicar tal comportamento, porém, observamos que em NPL e LPL leucina induziu redução da oxidação da glicose.

Recentemente tem sido documentado que KIC, mas não leucina, fecha os canais de potássio ATP sensíveis, em células B de *ob/ob* por uma ação direta (**Branstrom, et al, 1998**). Talvez aqui, a transaminação da leucina/ KIC poderia favorecer um efeito do KIC em modular os canais de potássio e induzir influxo de cálcio. Um estudo mais recente demonstra que leucina up-regula a glicoquinase

gerando aumento nos níveis de NAD(P)H e ATP síntase, elevando os níveis de ATP. A combinação destes fatores leva ao aumento $[Ca^{2+}]_i$ e secreção de insulina em cultura de células B de ratos **(Yang et al, 2006)**, porém mais dados são necessários para suportar esta idéia de que KIC modula os (K^{+}_{ATP}) .

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

Leucina, foco de interesse deste projeto e seu derivado KIC, reduzem a permeabilidade aos íons K^{+} em células B pancreáticas, com magnitude idêntica àquela observada por glicose. Porém, o mecanismo pelo qual leucina e KIC estimulam a secreção de insulina ainda permanece obscuro **(Li et al, 2004)**. Em nosso modelo experimental foi demonstrado que a secreção de insulina induzida agudamente por leucina está prejudicada. A suplementação crônica com leucina conferiu melhora no processo de secreção de insulina quando se utilizou esse agente insulínico tanto em ilhotas LPL como em NPL **(Fig. 17)**. Quando utilizamos agudamente, em ilhotas LP, arginina, um aminoácido que age predominantemente despolarizando a membrana celular, observamos diminuição na secreção de insulina em presença desse nutriente catiônico. Esta redução pode ocorrer devido a alterações na população de canais da membrana ou pela atividade dos mesmos, determinado pelo potencial de membrana, vide **Fig 19 e 17**. Quando se suplementa com leucina, observamos aumento na secreção de insulina em ambos os grupos, NLP e LPL e ainda corrigindo a deficiência secretória apresentada pelo grupo LP, frente a estes estímulos. Aqui obtivemos aumento de secreção de insulina semelhante ao estímulo com glicose, porém por mecanismo distinto desta hexose, favorecendo assim a hipótese de que a ativação da GDH pode ter uma ação primordial neste modelo de suplementação.

Nós utilizamos em ilhotas o ácido aminooxiacético (AOA), verificou-se que este ácido foi capaz de inibir a secreção de insulina induzida por glicose nos quatro grupos estudados. AOA foi usado para testar o papel da transaminação na

glutaminólise. Este ácido marcadamente inibe a estimulação que o KIC exerce na $[Ca^{2+}]_i$ e diminui a secreção de insulina de ilhotas isoladas (**Malaisse et al 1982; Zhiyong et al, 2003**). O bloqueio da transaminação pelo AOA em presença de glicose, e conseqüente redução da secreção de insulina em todos os grupos estudados, favorecem a hipótese de que a via de ação da leucina pode ser predominantemente pela ativação da GDH.

O bloqueio da transaminação pelo AOA mantém ativada a conversão de glutamato a α -cetoglutarato e este proporciona substrato para o ciclo de Krebs promovendo aumento da ATP/ADP. A importância desta via pode ser caracterizada porque o percentual de redução é o mesmo em ilhotas controle quando comparada aos grupos desnutridos e suplementados. Como o estímulo utilizado foi glicose e esta promove aumento do GTP e conseqüente diminuição do ADP, isto levaria a uma inibição da GDH. Em nosso modelo o tratamento com leucina induz uma marcante redução do metabolismo desta hexose (**Fig. 12**), pesando para menor modulação da GDH pela glicose, favorecendo maior ativação da enzima nas ilhotas pelo tratamento crônico com leucina. Entretanto em presença de estímulo agudo com glicose, o AOA foi potente em inibir a secreção de insulina em todos os grupos.

Como AOA é um potente bloqueador da transaminase e glicose um forte inibidor da GDH explicam a marcante redução de insulina apresentada em todos os grupos estudados. Novamente podemos sugerir que leucina deve, predominantemente, utilizar a ativação alostérica da GDH, na qual a glutamina se transforma em glutamato em α -cetoglutarato e este, por sua vez, entra no ciclo de Krebs e produção de ATP gerando sinais metabólicos, os quais culminam com a secreção de insulina (**Xu et al, 2001**). Estudos recentes indicaram que a quantidade de glutamato presente nas ilhotas pancreáticas está na ordem de 210 pmol/ilhota, ou seja, as ilhotas podem ficar de 3 a 4 horas utilizando glutamato como combustível mitocondrial (**MacDonald et al, 2003**).

Até o momento destacamos o papel de a leucina agir como secretagogo de insulina, porém pode também exercer a função de nutriente que regula a síntese protéica em adipócitos e outros tecidos, atuando por mecanismos que são independentes da insulina, ou em associação com a mesma (**Lynch et al 2003; Meijer & Dubbelhuis, 2004**).

Insulina e aminoácidos demonstram exercer seus efeitos através da fosforilação de elementos reguladores da tradução via ativação da PHAS-I e S6K-1 através da ativação pela mTOR. A proteína mTOR fosforila a S6K-1 que, por sua vez, fosforila a proteína ribossomal S6, a qual está correlacionada com mRNAs que codificam proteínas ribossomais e fatores de elongação traducionais e conseqüentemente, aumento da síntese protéica em diferentes tecidos **(Xu et al, 2001)**. É de conhecimento geral que a desnutrição pode estar relacionada com a diminuição da massa da célula B, esta alteração é um dos múltiplos fatores que ocasionam a diminuição da secreção de insulina em ilhotas de animais LP **(Latorraca et al, 1998)**. Trabalhos recentes demonstraram que camundongos Knockout da S6K-1 apresentaram redução da massa de células B, com conseqüente diminuição dos níveis de insulina. **(Pende et al, 2000)**. Esse dado da literatura é de fundamental importância, uma vez que nossos resultados revelaram uma diminuição na expressão gênica e protéica da S6K-1 **(fig. 25 A e B)**, o que poderia justificar em parte a redução da secreção de insulina em ilhotas de animais LP. Existe alguma relação entre a suplementação com leucina e ativação de vias de crescimento em ilhotas de Langerhans?

6.3 - Suplementação com Leucina e Alterações Fisiológicas

Com o intuito de esclarecer esta pergunta, verificamos na literatura evidências de que as vias de sinalização exercidas por aminoácidos, como demonstrado em ilhotas de Langerhans, têm grande importância fisiológica. As vias de sinalização exercidas por aminoácidos, em músculo e fígado, estão reduzidas com a idade, provavelmente por uma diminuição na afinidade metabólica para leucina favorecendo a perda de proteína do organismo com o envelhecimento **(Dardevet et al, 2000)**. O efeito de aminoácidos em modular o metabolismo da glicose, neste caso, não é muito claro. *In vivo*, o aumento da concentração de aminoácidos na veia porta durante o período de transição jejum-alimentado é suficiente para aumentar o volume das células do fígado e estimular síntese de glicogênio **(Meijer, 2000)**.

Leucina, em particular, estimula aumento do transporte de glicose em músculo isolado de ratos por uma via dependente da PI3k, mecanismo independente da

rapamicina (**Nishitani et al, 2000**). Aminoácidos não são somente importantes metabólitos intermediários, mas também podem agir como moléculas sinalizadoras com um efeito insulina-like. Os mecanismos envolvidos incluem a via de sinalização dependente da mTOR e, também, a habilidade de alguns aminoácidos em aumentar o volume celular. Além disso, em células B os aminoácidos podem estimular de maneira indireta (**Fig. 15 e 16**) e diretamente (**Fig.19**) a produção e a secreção de insulina e com isto aumentar as propriedades anabólicas celulares.

Em animais LP, tanto *in vivo* como *in vitro*, apresentam uma incapacidade de secretar insulina frente a uma carga de glicose (**Cherif et al, 2001; Ferreira et al, 2003; Delguingaro-Augusto et al, 2004**). Este animais tem que normalizar sua glicemia através do aumento da sensibilidade periférica ao hormônio insulina e, portanto, aumento da atividade do IR e IRS1 em destaque em fígado e músculo (**fig. 6, 7 8 e 9**). Através destas características apresentam uma capacidade de reduzir a glicose plasmática do que os animais NP ou NPL, como podemos observar na **Tab. I**. Então para que a homeostase de glicose seja mantida neste grupo de animais em função da baixa capacidade secretória, eles têm que modular sua sensibilidade periférica ao hormônio insulina.

Quando os animais são tratados com leucina observamos uma mudança no comportamento dos níveis basais de insulina. Este aminoácido promove um aumento dos valores basais de insulina nos dois grupos de animais (NPL e LPL) quando comparado com os grupos NP e LP. Isto em parte se deve ao efeito insulínico deste aminoácido, como discutido anteriormente.

Nos animais NPL como os LPL, os níveis basais de insulina já seriam suficientes para restabelecer os níveis glicêmicos após a carga de glicose, sendo assim, o pâncreas endócrino não necessitaria secretar mais insulina para promover a homeostase desta hexose. Porém, os animais NP possuem uma capacidade adicional em promover aumento da secreção de insulina quando estes estão diante de agentes insulínicos que exigem a participação de toda maquinaria enzimática celular envolvida no processo de secreção deste hormônio. Esta característica confere aos animais NPL uma capacidade de estimular a secreção de insulina em relação ao controle, após uma carga de glicose. Já os LPL

estão com o mecanismo de secreção em nível próximo de seu limite secretório promovido pela administração diária de leucina.

Este fato produz uma queda rápida da glicose plasmática e promove um controle da glicemia de maneira distinta ao que ocorre nos animais NP e NPL. Para que este menor nível de insulina seja capaz de reduzir a glicose plasmática de maneira mais rápida, existe a necessidade de que aumente a atividade dos elementos que compõe a cascata de sinalização deste hormônio em diferentes tecidos **(Greiwe et al, 2001)** como comprovado nas **figs. 6, 7, 8 e 9**.

Outro fato que destacamos é que a suplementação, além de aumentar a insulina basal, pode favorecer que a insulina seja desativada mais precocemente nos tecidos-alvo, para evitar um possível papel proteolítico produzido pela administração de aminoácidos isolados, bem como, pela presença de níveis altos de insulina em organismos que passaram por carência protéica em determinados momentos de seu desenvolvimento **(Kadowaki & Kanazawa, 2003)**. Esta característica em associação com a incapacidade de secretar insulina quando comparada ao NP frente à glicose **(Ferreira et al, 2003 e 2004)**, pode ser um fator de prejuízo para estes animais durante seu processo de envelhecimento, podendo com isto gerar possíveis problemas metabólicos, como já demonstramos, em estudos anteriores, redução de PKC, PKA, IR, IRS-1, mTOR e S6K-1 em ilhotas de Langerhans. Estas alterações estão acompanhadas de prejuízo do processo de secreção de insulina e no controle autócrino e parácrino, culminando com a baixa resposta a diferentes agentes insulinoatrópicos **(Araújo et al, 2002; Ferreira et al 2003 e 2004; Filiputti et al, 2006)**. Diante disso a administração de leucina é benéfica para animais LP, porém o tempo, bem como as concentrações a serem utilizadas são parâmetros fundamentais para um controle fino da homeostase glicêmica.

6.4 – Suplementação com Leucina e Vias de Sinalização em Ilhotas

Leucina, em particular, estimula aumento do transporte de glicose em músculo isolado de ratos por uma via dependente da PI3k, mecanismo independente da rapamicina **(Nishitani et al, 2000)**. Além de importantes metabólitos intermediários, os aminoácidos agem como moléculas sinalizadoras com um

efeito insulina-like. Os mecanismos envolvidos incluem a via de sinalização dependente da mTOR. Além disso, em células B os aminoácidos podem estimular a produção de insulina aumentando as propriedades anabólicas celulares.

A desnutrição protéica está associada à redução na secreção de insulina pelas células B pancreáticas e alteração na sensibilidade a esse hormônio em tecidos periféricos que são, em geral, contrabalanceados por uma homeostase glicêmica **(Reis et al, 1997)**. Humanos e modelos animais, que foram alimentados com dieta hipoprotéica por um período prolongado podem desenvolver um desequilíbrio glicêmico levando ao diabetes ou a intolerância à glicose **(Hales e Barker, 2001)**. Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que o tratamento *in vitro* de ilhotas pancreáticas de ratos controle, onde se adicionou um oligonucleotídeo antisense direcionado contra a expressão de mRNA de IRS-1, promoveu um aumento significativo na secreção de insulina induzida por glicose **(Araújo et al, 2002)**.

Com base nesses dados, avaliamos a expressão protéica do IR nas ilhotas dos ratos dos quatro grupos animais NP, NPL, LP e LPL **(Fig. 21)** e observamos que houve aumento na expressão dessa proteína em ilhotas de animais LP, devido a restrição protéica a que foram submetidos. Porém, quando esses animais foram suplementados (LPL) houve uma diminuição, significativa, dessa proteína em valores semelhantes aos das ilhotas proveniente aos animais NP e NPL. Provavelmente, isso deve, em parte, ao aumento da insulinemia oriunda da suplementação com leucina **(Tab. I)** e também da geração de sinais metabólicos produzidos pela leucina no citosol das células da ilhota. Seguindo essa mesma linha de investigação, observamos também que a quantidade protéica do IRS-1 se apresentou reduzida em LP e LPL **(Fig. 22)**. Em função do aumento da quantidade protéica do IR induzido pela desnutrição, os níveis de IRS1 se mantiveram reduzido. Já a suplementação com leucina parece não exercer interferência no conteúdo protéico nos dois grupos em estudo LPL e NPL. Resta ainda especular um possível efeito da leucina em modular a atividade tanto do IR como do IRS1, a exemplo que ocorreu em músculo e fígado.

Por outro lado, nos resta ainda lembrar que, a população de IR e IRS-1 nos diferentes tipos celulares da ilhota **(Araújo et al 2002)** é diferente e pode sofrer modulação distinta tanto da quantidade como de sua atividade influenciando o

controle parácrino e autócrino da ilhotas. Recentemente **Araújo et al (2004)** trataram as ilhotas pancreáticas de ratos desnutridos com insulina exógena e observaram um aumento da atividade da PI3K associada ao IRS-1 e IRS-2. Por outro lado, embora a expressão do IRS-1 esteja consideravelmente diminuída em ilhotas de animais LP, essas células respondem com aumento da sinalização molecular induzida por insulina. Resultados similares foram descritos em modelos animais de resistência à insulina e, aparentemente, a indução da fosforilação em tirosina dos substratos do IR, pela insulina, reflete com maior propriedade a ativação dessa via particular do que uma simples medida da expressão protéica específica (**Kahn & Saad, 1992; Bezerra et al, 2000; Bertelli et al, 2003**).

Seguindo neste mesmo raciocínio nós encontramos após suplementação com leucina aumento da expressão gênica, protéica e da atividade da enzima PI3K em ilhotas de animais NPL e LPL (**Fig. 23 A, B e C**). Em músculo leucina é capaz de induzir síntese protéica tanto em ratos jovens como velhos, através da indução do aumento fator transcricional 4E-BP1. Este aumento foi dependente da elevação dos níveis plasmáticos de insulina induzidos pela suplementação pela leucina, esta via é dependente da PI3K, mTOR e S6K-1 (**Anthony et al, 2000; Dardevet et al 2002**). A exemplo do que ocorre em músculo de animais suplementados, nós encontramos aumento da expressão gênica e protéica da mTor e da S6K-1 e aumento da expressão gênica da PHAS-I, em ilhotas de LPL, ficando inalterados em ilhotas provenientes de NPL. O conjunto dos dados encontrados sugere que a leucina através da via de sinalização da PI3K, esteja induzindo aumento de expressão de proteína relacionada ao mecanismo de secreção de insulina. Favorável a esta hipótese está a disposição eletroforética das proteínas solúveis citoplasmáticas (**Fig. 11**), o conteúdo e a secreção de insulina mostrada na (**Tab I**), a liberação de insulina quando o estímulo foi glicose, leucina, arginina e AOA (**Fig. 15, 16, 19 e 20**).

O aumento da expressão gênica, protéica e da atividade da PI3K é um indicativo de que a suplementação e em especial a leucina seja o responsável em modular a atividade da via, pois observamos aumento de secreção tanto em NPL como em ilhotas LPL, porém somente aumento da expressão protéica da S6K-1 em ilhotas LPL. Esta informação correlaciona com achados anteriores onde demonstramos

redução de PKC, PKA, IR, IRS1, mTOR e S6K-1 em ilhotas de Langerhans e estas alteração estão acompanhadas de prejuízo do processo de secreção culminando com a baixa resposta a diferentes agentes insulíntricos (**Araújo et al, 2002; Ferreira et al 2003 e 2004; Filiputti et al, 2006**). Por último, existem evidências de que a PI3K está envolvida com o movimento de cálcio em células B de camundongos e em linhagem de células β TC3 (**Aspinwall et al, 2000**), possivelmente liberando cálcio do retículo endoplasmático, sendo esse efeito mediado pelo IRS-1. Além disso, também encontrou-se dados na literatura que relaciona a PI3K com a mobilização dos canais de cálcio voltagem-dependentes para a membrana celular em linhagem de células transfectadas com as subunidades catalíticas dessa enzima, expressando PI3K γ (**Viard et al, 2004**).

Em nosso estudo verificamos que a suplementação com leucina promoveu aumento da expressão gênica, protéica e da atividade da PI3K em ilhotas LPL e NPL, porém manteve inalterado os níveis protéicos de IRS-1. Também observamos aumento do movimento de cálcio (**Fig 18**) nos grupos submetidos ao tratamento com leucina com maior liberação de insulina. Diferente dos resultados encontrados por **Aspinwall et al, 2000** nós observamos aumento da quantidade protéica e da atividade da PI3K, mas sem mudanças nas concentrações protéicas de IRS-1 (**Fig. 22**). Contudo, observou-se aumento das oscilações de cálcio nesses grupos. Estes achados sinalizam para a hipótese de que os sinais metabólicos gerados pela leucina devam produzir seus efeitos em parte via PI3K e esta, por sua vez, deve participar do rearranjo da concentração citosólica dos íons cálcio, principalmente em ilhotas LPL. Sugere, ainda, que esse efeito não é mediado por IRS-1, uma vez que não observamos mudanças em seu conteúdo protéico, após o tratamento com leucina.

Conclusão

7 - CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados encontrado neste trabalho, após suplementação com leucina, sinaliza para uma modulação da sensibilidade dos tecidos periféricos, como fígado e músculo, de maneira tecido específica. Isto confere uma regulação da homeostase glicêmica de maneira distinta entre animais NPL e LPL. Destaca-se aqui o papel exercido por sinais gerados pela leucina regulando a atividade tanto do IR como IRS-1.

No pâncreas endócrino observa-se aumento da liberação de insulina em ilhotas em NPL e recuperação da capacidade secretória das ilhotas LPL. Estes achados direcionam para que os sinais metabólicos produzidos pela leucina devam promover seus efeitos, via dois sensores a GDH que em parte controla a glutaminólise e por outro lado está a PI3K que deve exercer seu papel ativando vias envolvida com a síntese protéica, através da mTOR e uma possível ação, dessa enzima na mobilização de cálcio dos estoques intracelulares. Estes dois sensores devem atuar sinergicamente participando ainda do rearranjo da concentração citosólica dos íons cálcio, principalmente em ilhotas LPL, com amplificação de sua capacidade secretória.

Referências Bibliográficas

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araujo E. P., Amaral M. E. C., Filiputti, E., Souza C.T., Laurito, T. L., Augusto, V. D., Saad M. J. A, Boschero, A C., Velloso, L. A, Carneiro, E. M. (2004) Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. **Journal of Endocrinology** **181**: 25-38.
- Araujo E. P., Amaral M. E., Souza C.T., Bordin S., Ferreira F., Saad M. J. Boschero A C., Magalhaes E. C., Velloso L A. (2003) Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. **FEBS Lett** **531(3)**: 437-42.
- Aspinwall, C. A., Quian, W-J, Roper, M. G., Kulkarni, R. N., Kahn, C. R., Kennedy, R. T. (2000) Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca⁺⁺ stores in insulin-stimulated insulin secretion in B-cells. **JBC** **125**: issue 29, 22331-22338.
- Bailey, C.J. & Flatt, P.R. (1988) The enteroinsular axis in models of hyperinsulinaemic and hypoinsulinaemic diabetes. **In Frontiers in Diabetes Research: Lessons from Animal Diabetes**, vol. 2, pp.217-224 [E. Shafrir and A.E. Renold, editors]. Chichester: John Libbey.
- Balage, M., Sinuald, S., Prod'homme, M., Dardevet, D., Vary, T. C., Kimball, S. R., Jefferson, L. S., Grizard, J. (2001) Amino acids and insulin are both required to regulate assembly of the eIF4E. eIF4E complex in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** **281**: E565-E574.
- Becker, D. J., Pimstone, B. L., Hansen, J. D. L., Hendricks, S. (1972) Insulin secretion in protein-calorie malnutrition. 1. Quantitative abnormalities and response to treatment. **Diabetes** **20**: 542-551.
- Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C. M., Permutt, M., A., (2001) Islet beta cell expression of constitutively active Aky1/PKB α induces striking hypertrophy, hyperplasia and hyperinsulinemia. **JCI** **108**: 1631-1638.
- Bezerra, R. M., Ueno, M., Silva, M. S., Tavares, D. Q., Carvalho, C. R., Saad, M. J. (2000) A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. **Journal of Nutrition** **130**: 1531 – 1535.

- Bertelli, D. F., Ueno, M., Amaral, M. E., Toyama, M. H., Carneiro, E. M., Marangoni, S., Carvalho, C. R., Saad, M. J., Velloso, L. A, Boschero, A C. (2003) Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. **Am J Physiol Endocrinol Metab** **284**: E679 – E687.
- Blacher, F., Mourtada, A., Sener, A., Malaisse, W. J. (1989) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release uptake of metabolized and nonmetabolized cation amino acids by pancreatic islets. **Endocrinol** **24**: 134-141.
- Brown, A. M., Birnbaumer, L. (1988) Direct G-protein gating of ion channels. **Am J Physiol** **254**: 401-410
- Bruhat, A., Fafournoux, P., Jousse, C. (2000). Amino acid regulation of gene expression. **Biochem J** **351**: 1-12.
- Bruhat, A., Fafournoux, P. (2001). Recent advances on molecular mechanisms involved in amino acid control of gene expression. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** **4**: 439-43.
- Carneiro, E. M. (1996) Participação dos íons Ca^{2+} e K^{+} no processo de acoplamento estímulo/ secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos submetidos à dieta deficiente em proteína. **Tese de Doutorado**. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas.
- Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Gobatto, C. A., Boschero, A. C. (1995) Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and ^{45}Ca uptake by pancreatic rat islets. **J Nutr Biochem** **6**: 314-318.
- Cherif, H., Reusens, B., Dahri, S. and Remacle, C. (2001). A protein-restricted diet during pregnancy alters in vitro insulin secretion from islets of fetal Wistar rats. **J Nutr** **131**: 1555-9.
- Cook, G. C. (1967) Glucose tolerance after kwashiorkor. **Nature** **215**: 1295-1296.
- Dardevet, D., Sornet, C., Balage, M., Grizard, J. (2000) Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. **J Nutr.** **133**: 2630-2635.
- DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C., Ferrannini, E., (1992) Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* **15**(3):318-68.

- Delghingaro-Augusto, V., Ferreira F, Bordin S, Do Amaral ME, Toyama MH, Boschero AC, Carneiro EM. (2004) A Low Protein Diet Alters Gene Expression in Rat Pancreatic Islets. **J Nutr** **134**: 321-327.
- Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, Kozma, S. C., Thomas, G. (2001) Mammalian TOR: A homeostatic ATP sensor. *Science* 294: 1102-1105.
- Diani, A. R., Peterson, T., Gilchrist, R. J. (1983) Islet innervation of nondiabetic and diabetic Chinese hamsters.I Acetylcholinesterase histochemistry and norepinefrine fluorescence. **J Neur Trans** **56**: 223-238.
- Fernandez-Twinn, D. S., Ozanne, S. E., Ekizoglou, S., Doherty, C., James, L., Gusterson, B., Hales, C. N. (2003). The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. **British Journal of Nutrition** **90**: 815-822.
- Ferreira, F., Filiputti, E., Arantes, V. C., Stoppiglia, L. F., Araújo, E. P., Delghingaro-Augusto, V., Latorraca, M. Q., Toyama, M. H., Boschero, A. C., Carneiro, E. M. (2003) Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by Islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced Protein Kinase C α expression. **Journal Nutrition** **133**: 695-699.
- Ferreira, F., Barbosa, H. C. L., Stoppiglia, L. F., Delghingaro-Augusto, V., Araújo, E. P., Boschero, A. C., Carneiro, E. M. (2004) Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA α expression. **Journal Nutrition** **134**: 63-67.
- Filiputti, Eliane (2003) Modulação colinérgica da secreção de insulina em presença de leucina em ilhotas de ratos submetidos à desnutrição protéica. **Tese de Mestrado** Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas.
- Filiputti, E., Ferreira, F., Stoppiglia, L. F., Arantes, V. C., Boschero, A. C., Carneiro, E. M. (2006). Paper submitted in The Journal of Nutrition.
- Flatt, P. R. (1996) Hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. **In: Textbook of Diabetes**, 2nd ed, pp.9.1-9.7 [J.C. Pickup and G. Williams, editors]. Oxford: Blackwell.
- Floyd, J. C., Fajans, S. S., Knoff, R. F. Conn, J. W. (1963) Evidence that insulin release is the mechanism for experimentally-induced leucina hypoglycemia in man. **J Clin Invest** **42**: 1714-1719.

- Gao, Z., Young, R. A., Li, G., Najafi, H., Buettger, C., Sukumvanich, S. S., Wong, R. K., Wolf, B. A., Matschinsky, F. M. (2003). Distinguishing features of leucine and α -ketoisocaproate sensing in pancreatic β -cells. **Endocrinology** **144**(5): 1949-1957.
- Garlick, P. J. & Grant, I. (1988) Amino acid infusion increased the sensitivity of muscle protein synthesis in vivo to insulin. Effect of branched-chain amino acids. **Biochemical Journal** **254**: 579-584.
- Georgakis, G. V., Younes, A. (2006). From rapa nui rapamicina: targeting PI3K/ Akt/ mTOR for cancer therapy. **Expert Rev Anticancer Ther.** **6**(1): 131-40.
- Gepts, W., Lecompt, P. M. (1981) The pancreatic islets in diabetes. **Am J Med** **70**: 105-109.
- 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.
- Greiwe, J. S., Knorr, G., McDaniel, M. L., Semenkovich, C. F. (2001) Leucine and insulin activate p70S6 Kinase through different pathways in human skeletal muscle. **Am. J. Physiol** **281**: E466-E471.
- Grodsky, G. M. (1996) Kinetics of insulin secretion: current implications. **In: Diabetes Mellitus**, pp.12-20 [Le Roith, D., Taylor, S.I & Olefsky, J.M. eds.]. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Hales, C. N., Barker, D. J. P. (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia** **35**: 595-601.
- Harrington, L. S., Frindlay, G. M., Lamb, R. F. (2005). Restraining PI3K: mTOR signaling goes back to the membrane. **TRENDS in Biochemical Sciences** **30**(1): 35-42.
- Heard, C. R. C., Turner, M. R. (1967) Glucose tolerance and related factors in dogs fed diets of suboptimal protein value. **Diabetes** **16**: 96-107.
- Henquin, J-C. (1980) Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islet cells. **Biochem J** **186**: 541-550.
- Henquin, J-C. Garcia, M. C., Bozem, M., Hermans, M. P., Nenquin, M. (1988) Muscarinic control of pancreatic β -cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium-influx. **Endocrinology** **122**: 2134-2142.

- Henquin, J-C. Meissner, H. P. (1981) Effects of amino acids on membrane potential and ^{86}Rb fluxes in pancreatic β -cells. **Am J Physiol** **240**: 245-252.
- Henquin, J-C., Nenquin, M., Stiernet, P., Ahren, B. (2006). In vivo and in vitro glucose-induced biphasic insulin secretion in the mouse: pattern and role of cytoplasmatic Ca^{2+} and amplifications signals in β -cells. **Diabetes** **55**: 441-451.
- Herchuelz, A., Lebrun, P., Boscherio, A. C., Malaisse, W. J. (1984) Mechanism of arginine-stimulated Ca^{2+} influx into pancreatic B cell. **Am J Physiol** **246**: 38-43.
- Heywood W. E., Mian, N., Milla, P. J., Lindley, K. J. (2004). Programming of defective rat pancreatic β -cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods. **Clinical Science** **107**: 37-45.
- Holemans, K., Alerts, L., Van Assche, F. A., (2003). Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. **J Soc Gynecol Investig** **10(7)**: 392-399.
- Holst, J. J. (1992) Role of classical and peptidergic neurotransmitters in insulin secretion. **In: Nutrient Regulation of Insulin Secretion**, pp. 23-39 [P.R. Flatt, editor]. London: Portland Press Ltd.
- Kadowaki, M. & Kanazawa T. (2003) Amino acids as regulators of proteolysis. **J Nutr** **133**: 2052S-2056S.
- Kahn, C. R. & Saad, M. J. (1992) Alteration in insulin receptor and substrate phosphorylation in hipertensive rats. **Journal of the American Society of Nephrology** **3**: S69 – S77.
- Karlsson, H. K. R., Nilsson, P. A, Nilsson, J., Chibalin, A V., Zierath, J. R., Blomstrand, E. (2004) Branched-chain amino acids increase p70S6K phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab** **287**: E1 – E7.
- Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2006). New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. **Am J Clin Nutr** **83(suppl)**: 500S-7S
- Latorraca, M. Q., Carneiro, E. M., Boscherio, A. C., Mello, M.A R. (1998a) Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. **Br J Nutr** **80**: 291-297.

- Latorraca, M. Q., Reis, M. A. B., Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Velloso, L. A., Saad, M. J. A., Boschero, A. C. (1998b) Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. **J Nutr** **128**: 1643-1649.
- Leahy, J. L. (1996) Detrimental effects of chronic hyperglycemia on the pancreatic β -cell. **In: Diabetes Mellitus**, pp.103-113 [Le Roith, D., Taylor, S.I & Olefsky, J.M. eds.]. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Lewis, M. I., Bodine, S. C., Kamangar, N., Xu, X., Da, X., Fournier, M. (2006). Effect of severe short-term malnutrition on diaphragm muscle signal transduction pathway influencing protein turnover. **Article in press J Appl Physiol**. Doi: 10.1152
- Li, C., Najafi, H., Daikhin, Y., Nissim, I. B., Collins, H. W., Yudkoff, M., Matschinsky, F. M., Stanley, C. A. (2003). Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. **JBC** **278**(5): 2853-2858.
- Li, C., Buettger, C., Kwagh, J., Matter, A., Daikhin, Y., Nissim, I. B., Collins, H. W., Yudkoff, M., Stanley, C. A., Matschinsky, F. M. (2004). A signaling role of glutamine in insulin secretion. **JBC** **279**(14): 13393-13401.
- Lynch, C. J., Hutson, S. M., Patson, B. J., Vaval, A., Vary, T. C. (2002) Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. **Am J. Physiol Endocrinol Metab** **283**: E824 – E835
- Lynch, J. C., Halle, B., Fujii, H., Vary, T. C., Wallin, R., Damuni, Z., Hutson, T. C. (2003) Potential role of leucine metabolism in the leucine-signaling pathway involving mTOR. **Am J Physiol Endocrinol Metab** **285**: E854-E863.
- Maechler, P., Carobbio, S., Rubi, B. (2006). In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. **The Internal Journal of Biochemistry & Cell Biology, Article in press BC-2138**
- Magge, S. N., Shyng, S-L., MacMullen, C., Steinkrauss, L., Ganguly, A., Kats, L. E. L., Stanley, C. A. (2004). Familial leucine-sensitive hypoglycemia of infancy due to a dominant mutation of the β -cell sulfonylurea receptor. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** **89**(9): 4450-4456.

- Mathias, P. C. F., Carpinelli, A. R., Billaudel, B., Garcia-Morales, P., Valverde, I., Malaisse, W. J. (1985) Cholinergic stimulation of ion fluxes in pancreatic islets. **Biochem Pharmacol** **43**: 3451-3457.
- Meijer, A. J. & Dubbelhuis, P. F. (2004) Amino acid signalling and the integration of metabolism. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **313**: 397-403.
- Meijer, A. J. (2000) Hepatocyte swelling: techniques and effects on metabolism. In Berry M. N., Edwards, A. M. (Eds.), The hepatocyte review, **Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands** 147-167.
- McDaniel, M. L., Marshall, C. A., Pappan, K. L., Knorr, G. (2002) Metabolic and autocrine regulation of the mammalian target of rapamycin by pancreatic beta-cells. **Diabetes** **51**: 2877-2885.
- Moura, E. G., Passos, M. C. F., (2005). Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. **Bioscience Reports** **25**: 251-69
- Navarro-Tableros, V., Sanches-Soto, M. C., Garcia, S., Hiriart, M. (2004). Autocrine regulation of single pancreatic beta cell survival. **Diabetes** **53(8)**: 2018-23.
- Nenquin, M., Awouters, P., Mathot, F., Henquin, J. C (1984) Distinct effects of acetylcholine and glucose on ⁴⁵Ca and ⁸⁶Rb efflux from mouse pancreatic islets. **FEBS Lett** **176**: 457-461.
- Nishitani, S., Matsumura, T., Fujitani, S., Sonaka, I., Miura, Y., Yagasaki, K. (2002) Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscle of rats. **Biochem Res Commun** **209**: 693-696.
- Ohnogi, M., Cras-Meneur, C., Zhou, Y., Bernal-Mizrachi, E., Johnson, J. D., Luciani, D. S., Polonsky, K. S., Permutt, M. A. (2005). Reduced expression of the insulin receptor in mouse insulinoma (MIN6) cells reveals multiple roles of insulin signaling in gene expression, proliferation, insulin content and secretion. **JBC** **280(6)**: 4992-5003.
- Ozanne, S. E., Smith, G. D., Tinker, J. and Hales, C. N. (1996). Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. **Am J Physiol** **270**: E559-64.
- Pende, M., Kozma, S. C., Jaquet, M., Oorschot, V., Burcelin, R., Marchand-Brustel, Y. L., Klumperman, J., Thorens, B., Thomas, G. (2000).

- Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta cell size in S6K1-deficient mice. **Nature** **408**: 994-997.
- Quesada, I., Rovira, J. M., Martin, F., Rovhe, E., Nadal, A, Soria, B. (2002). Nuclear KATP channels trigger nuclear Ca(2+) transients that modulate nuclear function. **PNAS** **99 (14)**: 9544-9.
- Rajan, A. S., Hill, R. S., Boyd III, A. E.(1989) Effect of rise in cAMP levels in Ca²⁺ influx through voltage-dependent Ca²⁺ channels in Hit cells: second-messenger synarchy in β -cells. **Diabetes** **38**: 874-880.
- Rao, R. H. (1988) Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence? **Endocrine Rev.** **9**: 67-87.
- 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.
- Reaven, G. M. (1988) Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes** **37**: 1595-1607.
- Reis, M. A., Carneiro, E. M., Mello, M. A, Boschero, S C., Saad, M. J., Velloso, L. A, (1997) Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein-deficient rats. **Journal of Nutrition** **127**: 403 – 410.
- Sener, A., Blacher, J., Rasschaert, J., Malaisse, W. J.(1990) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release: comparison with histidine-induced insulin release. **Endocrinology** **127**: 107-113.
- Shah, O. J., Anthony, J. C., Kimball, S. R., Jefferson, L. S. (2000) 4E-BP1 and S6K: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** **279**: E715-E729.
- Sherwood, D. J., Dufresne, S. D., Markuns, J. F., Cheathan, B., Moller, D. E., Aronson, D., Goodyer, L. J. (1999). Differential regulation of MAP kinase, p70S6K and Akt by contraction and insulin in rat skeletal muscle. *Am Physiol Soc* **276**: 870-878.
- Smith, S. R., Edgar, P. J., Pozefsky, T., Chetri, M. K., Prout, T. E. (1975) Insulin secretion and glucose tolerance in adults with protein-calorie malnutrition. **Metabolism** **24**: 1073-1084.

- Stanley, C. A., Lineu, Y. K., Hsu, B. Y., Burlina, A. B., Greenberg, C. R., Hopwood, N. J., Perlman, K., Rich, B. H., Zammarchi, E., Ponez, M. (1998). Hyperinsulinism and hiperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. **N Engl J Med.** **338 (19)**: 1352-7.
- Stumvoll, M. S., Goldstein B. J., van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet** **365**: 1333-1346.
- 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**: 454-458.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2006). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care** **26(suppl 1)**: S5-S20.
- Tremblay, F. & Marette, A. (2001) Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70S6K Kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. **JBC** **276(41)**: 31042-60.
- Um, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P. R., Kosma, S. C., Auwerx, J., Thomas, G. (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. **Nature** **431**: 200 – 205.
- Viard, P., Butcher, A. J., Halet, G., Davies, A., Nürnberg, B., Heblich, F., Dolphin, A. C. (2004). PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the membrane. **Nature Neuroscience** **7(9)**: 939-946.
- Who Study Group On Diabetes Mellitus (1985) **Who Tech. Rep. Ser** **53**: 12.
- Wollhiem, C. B., Sharp, G. W. G. (1980) Regulation of insulin release by calcium. **Physiol Rev** **61**: 914-973.
- Xu, G., Kwon, G., Cruz, W. S., Marshall, C. A. and McDaniel, M. L. (2001). Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mTOR-signaling pathway by pancreatic beta-cells. **Diabetes** **50**: 353-60.
- Yang, J., Wong, R. K., Park, M., Wu, J., Cook, J. R., York, D. A., Deng, S., Markmann, J., Naji, A., Wolf, B. A., Gao, Z. (2006). Leucine regulation of glucokinase and ATP synthase sensitizes glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. **Diabetes** **55(1)**: 193-201.

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