

FACULDADE PERNAMBUCANA DE SAÚDE

**ALTERAÇÕES SECRETÓRIAS DE INSULINA NA
DESNUTRIÇÃO PROTEICA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS.**

CHRISTIANE BRAGA MOTA JACOB
FABIANO FERREIRA
AGOSTO, 2019

FACULDADE PERNAMBUCANA DE SAÚDE

**ALTERAÇÕES SECRETÓRIAS DE INSULINA NA
DESNUTRIÇÃO PROTEICA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade Pernambucana de Saúde, como parte dos requisitos básicos para a conclusão do curso de Medicina dos acadêmicos Christiane Braga Mota Jacob e Fabiano Ferreira, sob orientação de Juliany Silveira Braglia Cesar Vieira.

CHRISTIANE BRAGA MOTA JACOB
FABIANO FERREIRA
AGOSTO, 2019

ALTERAÇÕES SECRETÓRIAS DE INSULINA NA DESNUTRIÇÃO PROTEICA.

Christiane Braga Mota Jacob¹

Fabiano Ferreira¹

Juliany Silveira Braglia Cesar Viera²

¹Acadêmicos de Medicina da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS).

²Fisioterapeuta pela UDESC, Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia) pela UFPE, Doutora em Nutrição pela UFPE, Pós-doutoranda pelo IMIP, Coordenadora de Tutor do 1º e 7º períodos da graduação em Fisioterapia da FPS. Membro do colegiado e do núcleo docente estruturante do curso de graduação em fisioterapia da FPS. Coordenadora adjunta do Mestrado Profissional em Educação na Área de Saúde Pernambucana de Saúde (FPS).

RESUMO

A restrição proteica nos estágios iniciais da vida provoca diversas alterações no pâncreas endócrino, dentre essas alterações estão a redução da secreção de insulina e a alteração de várias enzimas-chave. Os mecanismos envolvidos nessas alterações ainda não estão completamente elucidados, mas podem estar relacionados a alterações nas vias de sinalização que potencializam a secreção de insulina na presença de glicose. Sabe-se que a regulação da secreção de insulina estimulada por glicose pode ser modulada pela ativação parassimpática que, por sua vez, ativa receptores muscarínicos e, conseqüentemente, as enzimas fosfolipase C beta 1 (PLC β 1) e proteína quinase C (PKC). Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da desnutrição proteica sobre a secreção de insulina estimulada pelo carbacol (CCh) que é um análogo da acetilcolina. Mais ainda, foi avaliada a expressão gênica da PLC β 1 em ilhotas de ratos desnutridos. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, um grupo controle tratado com dieta normoproteica (NP 17% de proteína) e outro grupo desnutrido tratado com dieta hipoproteica (LP 6% de proteína). Após dois meses de desnutrição, os animais foram sacrificados para o início dos experimentos. Ilhotas pancreáticas isoladas destes animais foram utilizadas para protocolos de análise de secreção estática de insulina e da expressão gênica para a proteína PLC β 1. Os resultados demonstraram que a dieta LP reduziu, significativamente, a massa corpórea dos animais, a albuminemia e a quantidade de proteínas séricas em torno de 20%, 15% e 20% respectivamente. Quando comparada às ilhotas NP, a resposta secretória de insulina pelas ilhotas LP foi 40% menor em ilhotas estimuladas com 8.3 mM de glicose e 25% menor no estímulo com 8.3 mM de glicose + Carbacol (100 μ M). A técnica de Western Blotting revelou níveis reduzidos da enzima PLC β 1 em aproximadamente 25% no grupo LP (p<0.05). Nossos resultados sugerem que a restrição proteica diminuiu os níveis da PLC β 1 o que permitiu explicar, pelo menos em parte, a diminuição na resposta secretória encontrada na estimulação com glicose e CCh em ilhotas provenientes de animais LP.

Palavras-chave: dieta hipoproteica, ilhotas, carbacol, insulina, PLC β 1.

ABSTRACT

The protein restriction in early stages of life causes several changes in endocrine pancreas, among these alterations are reduction in insulin secretion and changes several enzymes. The mechanisms involved in these changes are not yet completely elucidated, but may be related to changes in signaling pathways that potentiate insulin secretion in presence of glucose. The effects of carbamylcholine (CCh) on insulin secretion were studied in pancreatic islets from rats maintained on a normal (17%; NP) or low (6%; LP) protein diet. Isolated islets were incubated for 1 h in solution containing glucose, with or without carbamylcholine (CCh). The CCh-induced insulin secretion was higher in NP compared to LP islets. Western blotting revealed that the PLC β 1 contents of LP islets were 25% lower than in NP islets ($P < 0.05$). In conclusion, a reduced expression of PLC β 1 may be involved in the decreased insulin secretion by islets from LP rats following CCh stimulation. Our results indicated a possible relationship between a low protein diet and a reduction of PLC β 1 expression. These alterations in PLC β 1 may be partly responsible for the decreased insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet.

Key words: low protein diet, islets, carbamylcholine, insulin and PLC β 1.

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição, apesar de estar diminuindo ao longo das últimas décadas, ainda é um problema grave em algumas nações ao redor do globo terrestre. Deficiências proteicas e energéticas normalmente ocorrem juntas, embora possa haver a predominância de uma sobre a outra. Quando se manifestam de forma severa, podem desencadear síndromes clínicas denominadas “Kwashiorkor” e “Marasmo”.

O Kwashiorkor é resultante de ingestão insuficiente de proteínas e o Marasmo da deficiência energética como um todo¹. A desnutrição pode desencadear alterações na criança e repercutir no surgimento de doenças durante a juventude e também na idade adulta². No que se refere às repercussões da desnutrição na vida adulta, estudos epidemiológicos realizados na última década na Europa, América do Norte e em países em desenvolvimento mostraram forte associação entre o baixo peso ao nascer em crianças e patologias crônicas como diabetes melito, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial sistêmica e obesidade na vida adulta³.

Mais ainda, alterações no padrão de secreção de insulina encontradas em animais experimentais submetidos à restrição proteica parecem desempenhar uma função central na etiopatogenia do diabetes melito⁴. Avaliando a insulinopenia encontrada no animal desnutrido, pelo menos quatro possibilidades devem ser consideradas: 1) a redução do número de células β pancreáticas; 2) o defeito funcional das células β pancreáticas; 3) a combinação entre redução do número de células β e alterações funcionais das células β remanescentes; 4) alteração no sistema autônomo que inerva as ilhotas⁵.

Ademais, a restrição proteica durante 70 dias em ratos Wistar determinou a redução do peso absoluto, mas não do peso relativo do pâncreas⁶. Quanto à morfologia, a literatura evidenciou células β com volume reduzido e com número menor de grânulos de insulina, vários dos quais imaturos. Observou-se, ainda, células β com degenerações mitocondriais e com indícios de permeabilidade celular diminuída⁷.

O aumento na secreção de insulina estimulada pela via autonômica ou via endócrina induzida por mecanismos sensoriais e não pela absorção dos nutrientes são denominadas respostas cefálicas da secreção de insulina. Estas respostas são divididas em três etapas: 1- Sensorial (olfato, gustação, visão, e estímulos mecânicos); 2- Integração dos sinais aferentes (hipotálamo ventro-medial); 3- Eferente (impulsos nervosos) que vão culminar com a liberação de neurotransmissores, incluindo a acetilcolina⁵. A quantidade de insulina secretada

na fase cefálica é de extrema importância fisiológica, uma vez que indivíduos que perderam a fase cefálica da secreção de insulina apresentaram alterações na sua tolerância à glicose⁸.

O carbacol, como um homólogo estrutural da acetilcolina, pode ligar-se a receptores muscarínicos existentes nas células beta e exercer efeitos similares à acetilcolina. Após a ligação desse fármaco aos receptores muscarínicos (subtipo M3) da célula beta, a respectiva proteína Gq será ativada e, esta última, que tem a capacidade de clivar GTP, libera uma de suas três subunidades que por sua vez vai estimular a PLC β 1. Quando ativada, a PLC β 1 hidrolisa fosfolipídios de membrana, liberando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). O DAG permanece na membrana, e o IP₃ liberado é responsável pela mobilização de íons cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma, estes íons ligam-se ao DAG, um complexo essencial para a ativação da proteína quinase C (PKC) é, então, formado^{8,9,10}. A PKC ativada fosforila elementos fundamentais na exocitose dos grânulos de insulina, aumentando a secreção do conteúdo granular para o meio extracelular⁹.

Estudos recentes evidenciaram alterações na quantidade de diversas enzimas fundamentais no processo de secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos submetidos à restrição proteica^{11,12}. Com base nestas informações, é de fundamental importância continuar o estudo da fase cefálica da secreção de insulina e, portanto, da via colinérgica da secreção de insulina em modelos desnutridos.

Um estudo mais detalhado da quantidade de enzimas envolvidas no processo secretório durante a desnutrição proteica pode contribuir para o melhor entendimento das alterações secretórias encontradas na restrição proteica. Mais ainda, o estudo específico e detalhado da via da PLC β 1 contribuirá para o melhor entendimento da relação entre dieta, alterações da fase cefálica e patologias, reforçando o conceito de que a desnutrição em fases críticas de desenvolvimento aumenta o risco de doenças crônicas como o diabetes melito. Espera-se que a restrição proteica em fases precoces da vida provoque, na fase adulta do animal, alterações nos níveis enzimáticos e, conseqüentemente, nos mecanismos de estímulo-secreção da insulina.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da desnutrição proteica sobre a secreção de insulina estimulada pelo carbacol (CCh) que é um análogo da acetilcolina. Mais ainda, foi avaliada também a expressão gênica da PLC β 1 em ilhotas de ratos desnutridos.

2. MÉTODOS

2.1 Animais e Dietas

Estudo experimental com procedimentos de acordo com os padrões sugeridos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com a comunidade internacional. Esse estudo seguiu também as diretrizes estabelecidas pelo Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. A pesquisa foi realizada na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal de Universidade Federal de Pernambuco, protocolo número 23076.042290/2019.

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar (n= 20), com 21 dias de vida, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE (DFF-UFPE). Os ratos foram distribuídos em dois grupos experimentais:

a) **Controle:** 10 ratos alimentados do 21º dia até a idade adulta (90º dia) com dieta contendo 17% de proteína (**NP**).

b) **Desnutridos:** 10 ratos alimentados do 21º dia até a idade adulta (90º dia) com dieta contendo 6% de proteína (**LP**).

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 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Durante todo o período experimental tiveram livre acesso à água e as respectivas dietas.

As dietas cujas composições encontram-se descritas no **Quadro 1**, foram preparadas no Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da UFPE. A dieta **NP** segue as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93) para roedores nas fases de crescimento, gravidez e lactação.

Quadro 1 - Composição das dietas Normoproteica (NP) e Hipoproteica (LP).

<i>Ingredientes (g/Kg)</i>	NP (17% de proteína) g/Kg	LP (6% de proteína) g/Kg
Caseína (84% de proteína)*	202	71,5
Amido	397	480
Dextrina	130,5	159
Sacarose	100	121
L-cisteína	3	1
Fibra (microcelulose)	50	50
Óleo de soja	70	70
Mistura de Minerais AIN93G**	35	35
Mistura de Vitaminas AIN93G**	10	10
Cloridrato de colina	2,5	2,5

*Valores corrigidos em função do conteúdo da quantidade de proteína desejada.

** Composição detalhada¹³.

2.2 Dosagem dos parâmetros bioquímicos no soro dos animais

2.2.1 Proteína Sérica

O soro dos ratos foi coletado e a concentração de proteína foi determinada usando métodos enzimáticos colorimétricos (Merck – Diagnostic Darmstadt Germany).

2.2.2 Albumina sérica

A concentração de albumina sérica foi determinada através do método colorimétrico do verde de bromocresol. Foram adicionados a 0,02 ml de soro, 5,0 ml de reagente de cor, contendo solução de verde de bromocresol 0,6 mM, tampão succinato 0,1 M, surfactante não-iônico 30%, pH 4,0. As absorvâncias foram avaliadas a 630 nm e as concentrações determinadas através de uma curva de calibração de albumina¹⁵.

2.3 Isolamento de Ilhotas, Secreção e Dosagem de Insulina

2.3.1 Isolamento de ilhotas pancreáticas

Dez animais de cada grupo foram sacrificados por decapitação, totalizando 20 ratos. Após incisão abdominal e oclusão da extremidade do ducto biliar comum, foi inserida uma cânula através de uma pequena incisão na parte proximal (hepática) deste ducto. Através da cânula de polietileno, foi injetada solução de Hanks enriquecida com 2,8 mM de glicose e colagenase 1 mg/ml, que promoveu a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi excisado e dissecado de gorduras, da maioria do tecido vascular e dos gânglios linfáticos. A seguir, foi reduzido a fragmentos pequenos que foram transferidos para um tubo de ensaio contendo Hanks e colagenase (Boehringer Mannheim Biochemicals, USA). Em seguida, os fragmentos foram incubados em banho-maria a 37°C durante aproximadamente 18 minutos. Após o período de incubação, o tubo foi agitado manualmente por aproximadamente 1 minuto ou até a obtenção de mistura com viscosidade homogênea. O conteúdo foi transferido para um Becker e o material foi lavado com solução de Hanks 4 vezes para a remoção da colagenase, das enzimas digestivas liberadas durante a incubação e também dos fragmentos celulares.

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

2.3.2 - Secreção estática de insulina

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

minutos em meio contendo 5,6 mM de glicose. A solução foi rapidamente removida e substituída por nova solução de incubação contendo glicose (8.3 mM) ou glicose + ativador da proteína quinase C (Glicose 8.3 mM + CCh 100 μ M). Após 60 minutos de incubação, as placas foram resfriadas em banho de gelo e o sobrenadante removido, transferido para tubos de ensaio e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio.

2.3.3 Dosagem da insulina

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

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

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

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

sendo a radiação dos mesmos avaliada diretamente. Com base 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*”.

2.4 Western Blotting

Para detectar o nível de expressão celular da PLC β 1 foi empregada a metodologia de Western Blotting. Grupos de 500 ilhotas recém-isoladas e incubadas por 2,5 horas em Krebs contendo 8.3 mM de glicose ou Glicose 8.3 mM + CCh 100 μ M. A seguir, foram adicionados 200 μ L de Coquetel Anti-protease. As ilhotas foram então politronizadas nesta solução, por aproximadamente 10s, e o homogeneizado foi centrifugado a 3000g por 10min.

O precipitado foi desprezado e foi feita a dosagem proteica 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.

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

Após transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em solução Tris Salina (TBS) (Trisma base 1M, NaCl 5M, Tween 20 0.5%) *overnight* à 4°C. A PLC β 1 foi detectada na membrana de Nitrocelulose por incubação por 2h, à temperatura ambiente, com anticorpos monoclonais específicos anti-PLC β 1 (Sta Cruz, diluição 1:500 em TBS com 3% de leite desnatado). Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo (diluição 1:1000 em TBS com 3% de leite desnatado) seguido de exposição por 2h à temperatura ambiente com proteína A marcada com I¹²⁵ (diluição 1:1000 em TBS com 1% de leite desnatado). O complexo anticorpo- [I¹²⁵] proteína A foi detectado por autorradiografia.

2.5 Procedimento Estatístico

Os resultados da **Tabela I** e das **Figuras 1A, 1B e 3** foram expressos em média e erro padrão e foi aplicado o teste t (Student) para amostras independentes. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$. Os resultados da secreção de insulina (**Figura 2**) foram expressos em média e desvio padrão e analisados por análise de variância a dois fatores (ANOVA two-way), seguido de teste de comparação múltipla de médias. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$. Os dados foram analisados pelo software Statsoft, Tulsa, OK.

3 RESULTADOS

Os ratos mantidos do 28º ao 90º dia com a dieta LP apresentaram redução significativa da albuminemia em 15% quando comparados ao grupo NP (**Tab. I**). Os níveis séricos de proteína total também foram reduzidos em 20% em relação ao grupo NP ($p < 0.05$).

A **Fig. 1A** ilustra a massa corpórea entre os grupos NP e LP mostrando que não houve diferença significativa entre os grupos até a quinta semana de tratamento experimental. As diferenças começaram a ser observadas a partir da 8ª semana, quando os animais NP apresentaram um aumento significativo de 20% da massa corpórea ao serem comparados aos animais LP ($p < 0.05$). Pode-se visualizar, ainda, na **Fig. 1B**, a velocidade do ganho de massa corpórea, mostrando que a velocidade de crescimento do grupo NP foi maior que a velocidade de crescimento do grupo LP. O grupo NP atingiu a velocidade máxima de crescimento na 7ª semana, enquanto o grupo LP, somente na 8ª semana. Ademais, observou-se ainda, que o grupo NP apresentou uma velocidade de crescimento aproximadamente duas vezes maior em relação ao grupo LP na sétima semana.

Na **Fig. 2**, avaliou-se a secreção estática de insulina por ilhotas provenientes de animais NP e LP, perfundidas durante 60 min em 8.3 mM de glicose na presença ou ausência do agonista muscarínico CCh 100 μ M. Ambos os grupos de ilhotas responderam com uma elevação na secreção de insulina, mas o incremento na secreção deste hormônio foi significativamente maior no grupo NP ($p < 0.05$).

A **Fig. 3** demonstrou diminuição no conteúdo da enzima PLC β 1 em ilhotas de provenientes de ratos LP quando comparada ao grupo NP ($p < 0.05$).

4 DISCUSSÃO

Os ratos utilizados nos experimentos, mantidos do 21º ao 90º dia com dieta LP, apresentaram características semelhantes às observadas na desnutrição infantil e em diversos modelos experimentais com roedores submetidos à restrição proteica¹⁴.

Os resultados mostraram diminuição na massa corporal e nas concentrações séricas de albumina e proteínas plasmáticas no grupo LP, esses dados corroboram com a literatura que também evidenciou baixos níveis de albumina e proteína sérica em roedores desnutridos^{15, 16, 17, 18, 19, 20}. Esses resultados comprovaram que o protocolo de desnutrição foi eficiente em desnutrir os ratos do grupo LP.

Uma vez que o protocolo de desnutrição foi efetivo, avaliou-se, em ilhotas isoladas provenientes de animais hipoproteicos, a secreção de insulina em 8.3 mM de glicose em presença ou ausência de CCh 100 µM e observou-se que as ilhotas isoladas de ratos LP secretaram menos insulina em presença de análogos da acetilcolina (ACh) quando comparadas às ilhotas provenientes de animais NP. Esse resultado sugere que a dieta LP pode ter alterado a cascata enzimática da ACh-PLCβ1-PKC em ilhotas provenientes de ratos LP. Desta forma, pode-se inferir que a dieta hipoproteica que o animal recebeu durante seu desenvolvimento modulou vias importantes que, por sua vez, alteraram a secreção de insulina pelas ilhotas LP. Ademais, é provável que a desnutrição tenha alterado diversas enzimas-chave relacionadas à cascata de eventos que culminaram com a redução da secreção de insulina no grupo LP.

Com base nos resultados obtidos até o momento, foram realizados experimentos para verificar se a expressão da enzima PLCβ1 (proteína envolvida na via da sinalização da ACh-PKC) das ilhotas LP poderia realmente estar alterada. Nesse sentido quantificou-se a expressão gênica da enzima PLCβ1 pela técnica de Western Blotting e foi encontrada uma significativa redução na expressão gênica dessa proteína nas ilhotas LP.

As alterações no conteúdo da enzima PLCβ1, apresentadas neste modelo experimental, permitiram explicar, pelo menos em parte, a menor secreção de insulina pelas ilhotas de animais LP quando estimuladas pelo CCh em presença de glicose. Concluindo, a restrição proteica em fases iniciais da vida pode desencadear alterações na expressão de enzimas-chave no processo secretório de insulina e promover, em fases mais tardias do desenvolvimento, alterações na homeostase glicêmica do animal.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O período de restrição proteica a que os animais foram submetidos alterou significativamente o peso desses e, também, os seus parâmetros bioquímicos sanguíneos, demonstrando que o protocolo de desnutrição utilizado foi efetivo. A desnutrição proteica alterou também a expressão da enzima PLC β 1 envolvida no processo secretório de insulina. Isso poderia explicar, pelo menos em parte, um dos mecanismos biomoleculares envolvidos nesse processo traduzido pela redução absoluta da secreção de insulina pelas ilhotas LP quando estimuladas com CCh em presença de glicose. Fica evidente, portanto, que a dieta LP em fases precoces do desenvolvimento induziu modificações na expressão gênica de enzimas-chave no processo secretório de insulina. Nesse sentido, sugere-se a realização de mais experimentos nessa área de estudo, objetivando a elucidação de outras alterações envolvidas na redução da secreção de insulina em modelos experimentais de desnutrição proteica.

6 REFERÊNCIAS

1. Singh P, Seth A. Indian Pediatr. 2017 Sep 15;54(9):763-764. From Kwashiorkor to Edematous Malnutrition.
2. C. G. Victora, L. Adair, C. Fall et al., “Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital,” *The Lancet*, vol. 371, no. 9609, pp. 340–357, 2008.
3. Barker DJ, Gelow J, Thornburg K, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. (2010). The early origins of chronic heart failure: impaired placental growth and initiation of insulin resistance in childhood. *Eur J Heart Fail*. 12(8):819-25.
4. Souza, D. F.; et al. A low-protein diet during pregnancy alters glucose metabolism and insulin secretion. *Cell Biochem Funct*. 2012; 30: 114–121.
5. Leon-Quinto, T., C. Magnan, et al. (1998). “Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired B-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat.” *Endocrinology* 139(8): 3382-9.
6. Latorraca, M. Q., Reis, M. A. B., Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Velloso, L. A., Saad, M. J. A., Boschero, A. C. (1998b). Protein deficiency and nutritional recovery

- modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J Nutr* 128: 1643-9.
7. Carneiro, E. M. (1996). Participação dos íons Ca^{2+} e K^+ no processo de acoplamento estímulo/secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos submetidos à dieta deficiente em proteína. *Tese de Doutorado*. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP.
 8. Güemes A, Herrero P, Bondia J, Georgiou P. Modeling the effect of the cephalic phase of insulin secretion on glucose metabolism. *Med Biol Eng Comput*. 2019; 57(6):1173-1186.
 9. Wei, Y., Tae, N., Tatsuya F., Hiroyoshi, H., Takao, S., Yasuharu, S & Ighiro N. (2000) Synergism of protein kinase A, protein kinase C, and Myosin Light-Chain Kinase in the secretory Cascade of the pancreatic B-cell. *Diabetes* 49: 945-52.
 10. Marin, Leonardo; et al. Nutritional recovery from low protein diet during pregnancy does not restore the kinetics of insulin secretion and Ca^{2+} or alterations in the cAMP/PKA and PLC/PKC pathways in islets from adult rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2018; 43(12):1257-1267.
 11. Lippo, B.S.; et al. Low-protein diet disrupts the crosstalk between the PKA and PKC signaling pathways in isolated pancreatic islets. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015; 26(5):556-62.
 12. Chalvon-Demersay, Tristan; et al. Low-protein diet induces, whereas high-protein diet reduces hepatic FGF21 production in mice, but glucose and not amino acids up-regulate FGF21 in cultured hepatocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 36 (2016) 60–67.
 13. 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.
 14. Chaves, N. Nutrição básica e Aplicada. Rio de Janeiro, *Guanabara Koogan*, 1985.
 15. Reis, M. A.; et al. Increased L-CPT-1 activity and altered gene expression in pancreatic islets of malnourished adult rats: a possible relationship between elevated

- free fatty acid levels and impaired insulin secretion. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 19 (2008) 85–90.
16. Filiputti, Eliane; et al. Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. *Life Sciences*. 82 (2008) 542–548.
17. Rafacho A.; et al. Reduced pancreatic β -cell mass is associated with decreased FoxO1 and Erk1/2 protein phosphorylation in low-protein malnourished rats. *Braz J Med Biol Res*. October 2009, Volume 42(10) 935-941.
18. Soriano, S.; Reduced Insulin Secretion in Protein Malnourished Mice Is Associated with Multiple Changes in the β -Cell Stimulus-Secretion Coupling. *Endocrinology*. August 2010, 151(8):3543–3554.
19. Milanski M, Arantes VC, Ferreira F, de Barros Reis MA, Carneiro EM, Boschero AC, Collares-Buzato CB, Latorraca MQJ. Low-protein diets reduce PKA alpha expression in islets from pregnant rats. *Nutr*. 2005 Aug;135(8):1873-8.
20. V, Ferreira F, Bordin S, do Amaral ME, Toyama MH, Boschero AC, Carneiro EM.J; A low protein diet alters gene expression in rat pancreatic islets. *Delghingaro-Augusto Nutr*. 2004 Feb;134(2):321-7.

Tabela I - Parâmetros bioquímicos avaliados nos ratos NP e LP.

Parâmetros	NP	LP
Proteínas séricas totais (g/dl)	5,0 ± 0,2	4,0 ± 0,3*
Albumina sérica (g/dl)	3,5 ± 0,1	3,0 ± 0,1*

Resultados expressos como média \pm se ; n=10. * Diferença significativa ($p < 0.05$).

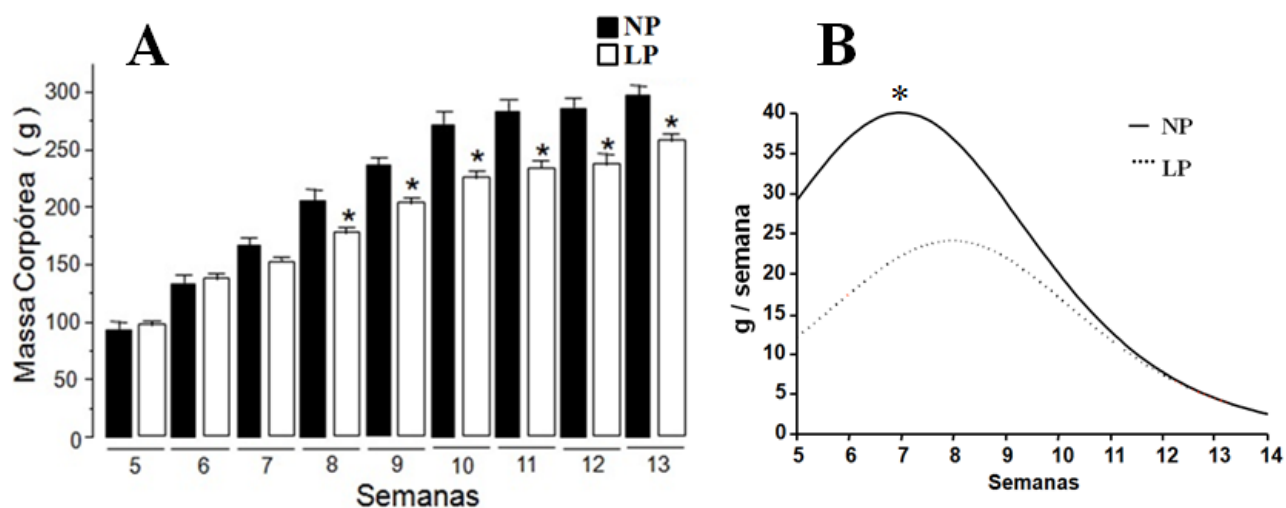


Fig. 1A- Ganho de massa corpórea de ratos machos Wistar de 28 dias Normoprotéicos (■, n=15) e Hipoprotéicos (□, n=15), avaliado ao longo de oito semanas. Valores expressos em média \pm se. **Fig. 1B** – Velocidade de ganho de massa corpórea de ratos machos Wistar ao longo de oito semanas. * Diferença significativa ($p < 0.05$).

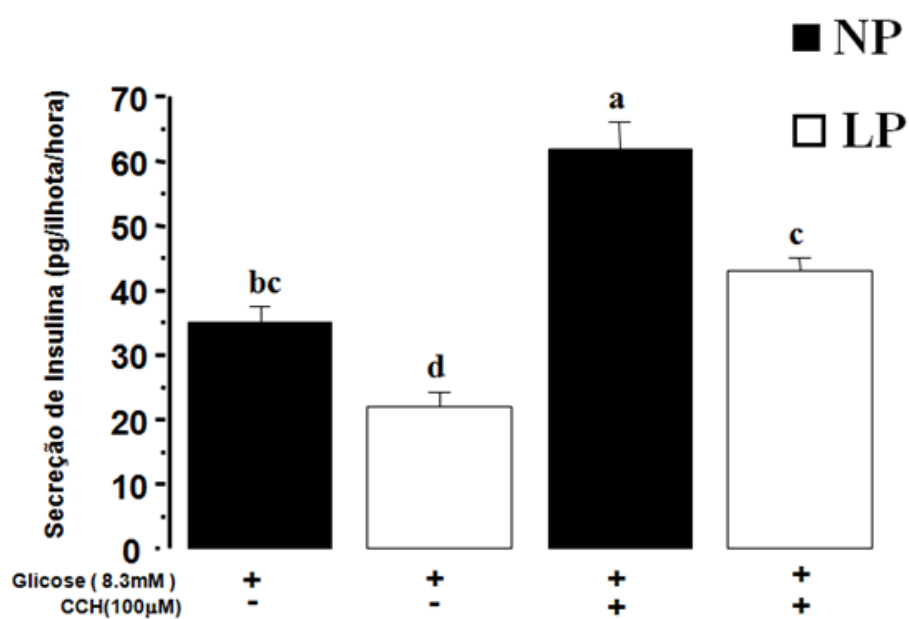


Fig. 2 – Efeito do estimulador CCH (100 µM) na secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos Wistar machos incubadas por 1 h em solução de Krebs contendo 2.5 mM de Ca⁺⁺, em presença de 8.3 mM de glicose. As barras indicam a média ± se; n=15. Letras diferentes representam diferença significativa (p < 0.05).

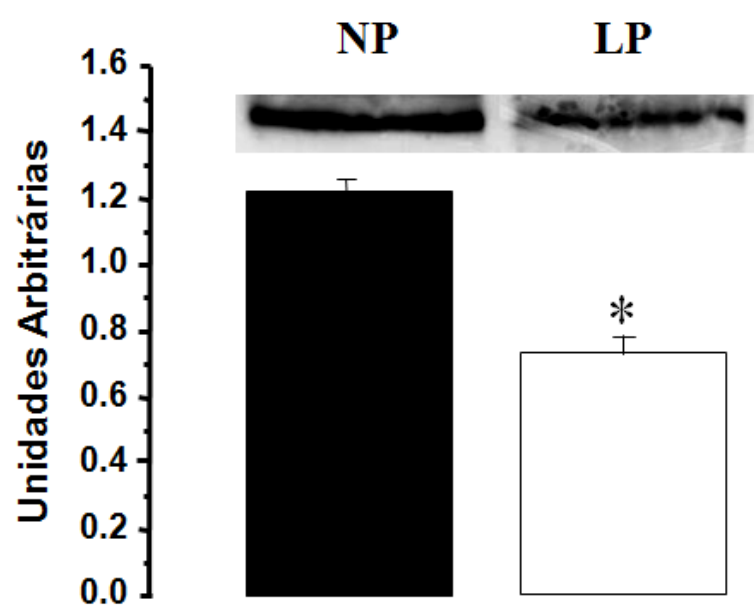


Fig.3 - Quantificação da enzima PLC β 1 por densitometria das bandas do gel de poliacrilamida em ilhotas isoladas de ratos. As barras indicam a média \pm se; n=5.
* Diferença significativa ($p < 0.05$).