

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Thiago Martins Batista

“Modulação do mecanismo de secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos submetidos à restrição protéica e suplementados com taurina”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)

THIAGO MARTINS BATISTA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Thiago Martins Batista".

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

Campinas, 2009

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

B32m

Batista, Thiago Martins

Modulação do mecanismo de secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos submetidos à restrição protéica e suplementados com taurina / Thiago Martins Batista . – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro.

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

1. Desnutrição. 2. Dieta com restrição de proteínas. 3. Taurina. 4. Insulina - Secreção. 5. Langerhans, Ilhotas de. I. Carneiro, Everardo Magalhães. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Insulin secretion mechanisms in pancreatic islets of protein-restricted rats supplemented with taurine.

Palavras-chave em inglês: Malnutrition; Protein-restricted diet; Taurine; Insulin – Secretion; Islands of Langerhans.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Everardo Magalhães Carneiro, Leonardo dos Reis Silveira, Márcio Alberto Torsoni.

Data da defesa: 02/07/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro (Orientador)



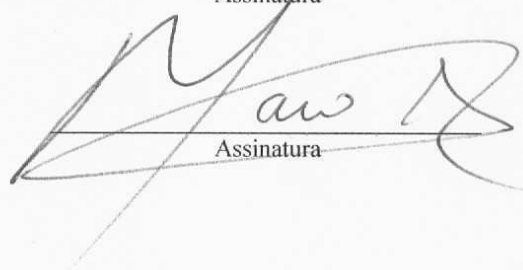
Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira



Assinatura

Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni



Assinatura

Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Assinatura

Profª. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Assinatura

Campinas, 2 de julho de 2009

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais e irmã por todo apoio e compreensão em todas minhas decisões.

Ao prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro por abrir as portas do laboratório e por toda a orientação valiosa e disposição para fazer experimentos.

Aos que contribuíram diretamente para a idealização e realização desse trabalho: Rosane, Andressa, Priscilla e Camila.

Aos demais companheiros de trabalho por toda assistência, orientação e momentos de descontração.

Aos funcionários do departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia que de alguma forma sempre contribuíram para o andamento do trabalho.

A todos os companheiros de rock n'roll de Brasília: Marcelo, Guilherme, Pedro, Kaduzick, Ricardo, Thiago. Vocês são demais!!!

Aos colegas de graduação, especialmente galera Rins: Marcelo, Mariana, Cecília, Tatiane, Clara e Raquel.

Ao prof. Dr. Fernando Fortes de Valência da Universidade de Brasília por ajudar no início de tudo isso.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

Up the irons!!!

Sumário

| | |
|---|------|
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT | xv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Secreção de insulina | 2 |
| 1.2 Desnutrição e secreção de insulina | 6 |
| 1.3 Taurina e secreção de insulina | 8 |
| 2. OBJETIVOS | 10 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 12 |
| 3.1 Animais, dieta e suplementação | 13 |
| 3.2 Procedimentos Experimentais | 18 |
| 3.2.1 Avaliação de parâmetros biométricos e bioquímicos | 18 |
| 3.2.2 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose | 20 |
| 3.2.3 Isolamento de ilhotas pancreáticas de ratos | 20 |
| 3.2.4 Secreção estática de insulina | 20 |
| 3.2.5 Western Blotting | 21 |
| 3.2.6 Registro de movimentos citoplasmáticos de íons Ca^{2+} em ilhotas de Langerhans | 22 |
| 3.3 Análise Estatística | 23 |
| 4. RESULTADOS | 24 |
| 4.1 Caracterização do Modelo Experimental | 25 |
| 4.1.1 Parâmetros biométricos | 25 |
| 4.1.2 Parâmetros bioquímicos plasmáticos | 27 |
| 4.1.3 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT) | 29 |
| 4.2 Secreção de insulina | 33 |
| 4.2.1 Secreção estática de insulina estimulada por glicose | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.2 Secreção estática de insulina potencializada por carbacol..... | 35 |
| 4.3 Vias de sinalização: expressão protéica em ilhotas de ratos..... | 36 |
| 4.4 Registro de movimentos citoplasmáticos de íons Ca²⁺ em ilhotas de Langerhans..... | 40 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 43 |
| 5.1 Caracterização do modelo experimental..... | 44 |
| 5.2 Secreção de insulina..... | 46 |
| 5.3 Vias de sinalização..... | 49 |
| 5.4 Movimento citoplasmático de íons Ca²⁺..... | 53 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 56 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 58 |
| 8. ANEXOS..... | 67 |

Lista de abreviaturas

α -Tub - α -tubulina

Ach - Acetilcolina

AGLs - Ácidos graxos livres

AIN - Instituto americano de nutrição

Akt/PKB - Proteína quinase B

Anova - Análise de variância

ATP - Trifosfato de adenosina

C - Grupo experimental controle

Ca^{2+} - Íon cálcio

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

Cch - Carbacol

CNA - Comprimento naso-anal

COL - Colesterol

CT30 - Grupo experimental controle suplementado com taurina por 30 dias

CT90 - Grupo experimental controle suplementado com taurina por 90 dias

D - Grupo experimental desnutrido

DAG - Diacilglicerol

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DT30 - Grupo experimental desnutrido suplementado com taurina por 30 dias

DT90 - Grupo experimental desnutrido suplementado com taurina por 90 dias

DTT - Dithiothreitol

GLUT-2 - Transportador de glicose 2

GLUT-4 - Transportador de glicose 4

GTP - Trifosfato de guanosina

IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina

IGFBP - Proteína de ligação ao IGF

IP_3 - Inositol 1, 4, 5 trifosfato

IP_3R - Receptor de inositol 1, 4, 5 trifosfato

ipGTT - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
IRS-1 - Substrato 1 do receptor de insulina
 K^+ - Íon potássio
 K_{ATP} - Canal de potássio dependente de ATP
M3 - Receptor muscarínico 3
NFS - Proteínas de fusão sensíveis à N-etilmaleimida
p85- Subunidade regulatória da PI3K de 85 kDa
PC - Fosfatidilcolina
PDX-1 - Fator homeobox pancreático-duodenal
PE - Fosfatidiletanolamina
PI3K - Fosfatidil inositol 3-quinase
PKA - Proteína quinase A
PKC - Proteína quinase C
PLC - Fosfolipase C
PMA - Miristato acetato de fórbol
RE - Retículo endoplasmático
S6K-1 - Quinase de proteína ribossomal S6
SDS - Duodecil sulfato de sódio
SERCA - Ca^{2+} - ATPase do retículo sarco(endo)plasmático
SNAP - Proteínas solúveis ligantes ao fator sensível à N-etilmaleimida
SNAP-25 - Proteína sinaptossomal associada de 25kDa
SNARE - Receptores de proteínas solúveis ligantes ao fator sensível à N-etilmaleimida
VAMP-2- Proteína associada à membrana vesicular isoforma 2

Lista de figuras

Fig. 1 (a) Peso corpóreo de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30) e 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30) e 90 dias (DT90) acompanhados por 12 semanas. $n = 5$ para todos os grupos experimentais. **(b)** Média \pm EPM da área abaixo das curvas (AAC) de ganho de peso. * indica diferença estatística em relação a C. $P < 0.001$ (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Fig. 2 Taurina circulante no plasma de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30) e 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30) e 90 dias (DT90). Média \pm EPM. $n = 4$ para todos os grupos experimentais. # indica diferença estatística em relação a C. * indica diferença estatística em relação a D. $P < 0.05$ (Teste t de Student).

Fig. 3 (a) Glicemia média \pm EPM de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30) após a administração intraperitoneal de 2g de glicose/Kg de peso, $n = 5-9$. **(b)** Média \pm EPM da área abaixo da curva (AAC) da glicemia dos grupos experimentais. * indica diferença estatística em relação a C. $P < 0.05$. (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Fig. 4 (a) Glicemia média \pm EPM de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90) após a administração intraperitoneal de 2g de glicose/Kg de peso, $n = 7-9$. **(b)** Média \pm EPM da área abaixo da curva (AAC) da glicemia dos grupos experimentais. * indica diferença estatística em relação a C. $P < 0.05$. (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Fig. 5 Secreção estática de insulina de ratos **(a)** controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30), **(b)** desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6mM de glicose durante 1 h. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 2.8, 8.3, 16.7 e 22.2 mM de glicose por 1 h, $n = 10$. **(c)** valores representam a média \pm EPM. * indica diferença estatística em relação a C para cada concentração de glicose. $P < 0.05$ (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Fig. 6 Secreção estática de insulina de ratos (a) controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), (b) desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6mM de glicose durante 1 h. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 2.8, 8.3, 11.1, 16.7 e 22.2 mM de glicose por 1 h, n = 6-10. (c) valores representam a média ± EPM. * indica diferença estatística em relação a C para cada concentração de glicose. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Fig.7 Secreção estática de insulina de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6mM de glicose durante 1 h. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 11.1 mM de glicose e 100µM de carbacol por 1 h, n = 12. Os valores representam a média ± EPM. * indica diferença estatística em relação a C. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Fig. 8 Expressão protéica do receptor muscarínico M3 em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). Os dados de M3 foram normalizados pela α -tubulina e expressos em porcentagem do controle. Valores representam média ± EPM da análise densitométrica das bandas (n = 5). * indica diferença estatística em relação a C. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Fig. 9 Expressão protéica da PLC β 2 em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). Os dados de PLC β 2 foram normalizados pela α -tubulina e expressos em porcentagem do controle. Valores representam média ± EPM da análise densitométrica das bandas (n = 4). P > 0.05 (ANOVA Two-Way).

Fig. 10 Expressão protéica da Serca 3 em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). Os dados de Serca 3 foram normalizados pela α -tubulina e expressos em porcentagem do controle. Valores representam média ± EPM da análise densitométrica das bandas (n = 6). * indica diferença estatística em relação a C. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Fig. 11 Expressão protéica da Sintaxina 1 em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). Os dados de Sintaxina 1 foram normalizados pela α -tubulina e expressos em porcentagem do controle. Valores representam média ± EPM da análise densitométrica das bandas (n = 5). * indica diferença estatística em relação a C. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Fig. 12 (a) Mudanças na razão de fluorescência para cálcio intracelular em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). As ilhotas foram pré-incubadas em meio RPMI1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS) por 4 h. Em seguida foram incubadas por 2h em presença de solução de Krebs com 2µM de fura-2 AM. Após esse período, as ilhotas foram colocadas na câmara de perfusão e expostas a 3mM de glicose (G3) e 16.7mM (G16.7) quando indicado pelas barras superiores. **(b)** Análise da amplitude das oscilações.

Valores representam média \pm EPM da ΔF (n = 4-8). * indica diferença estatística em relação a C. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Fig. 13 Mudanças na razão de fluorescência para cálcio intracelular em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). As ilhotas foram pré-incubadas em meio RPMI1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS) por 4 h. Em seguida foram incubadas por 2h em presença de solução de Krebs com 2 μ M de fura-2 AM. Após esse período, as ilhotas foram colocadas na câmara de perfusão e expostas solução de Krebs contendo 11.1mM de glicose, 10mM de EGTA, 250 μ M de diazoxida e livre de cálcio. Quando indicado, as ilhotas foram expostas à mesma solução acrescida de 100 μ M de carbacol. **(a)** Traços representativos da ΔF (340/380). **(b)** Análise da amplitude dos picos e **(c)** área abaixo da curva (AAC). Valores representam média \pm EPM (n = 6-7). * indica diferença estatística em relação a C. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Lista de tabelas

Tab. 1 Composição das dietas

Tab. 2 Composição da mistura de vitaminas (AIN-93G-VX)

Tab. 3 Composição da mistura de minerais (AIN-93G-MX)

Tab. 4 Comprimento naso-anal (CNA), peso do fígado, baço, coração, rins, gordura retroperitoneal e da gordura periepididimal de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30) e 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30) e 90 dias (DT90) acompanhados por 12 semanas.

Tab. 5 Proteínas totais, albumina, glicemia, insulina plasmática, ácidos graxos livres e colesterol de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30) e 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30) e 90 dias (DT90) mantidos em jejum por 12 horas.

Resumo

A desnutrição ainda é um problema de saúde pública que afeta principalmente países em desenvolvimento e sua prevalência chega a ser crescente em algumas áreas. Vários estudos obtiveram êxito em correlacionar a má nutrição em estágios iniciais de vida com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 na vida adulta. No modelo de desnutrição pós desmame verifica-se menor secreção de insulina estimulada por glicose e outros agentes insulíntricos bem como menor expressão de várias proteínas envolvidas com a funcionalidade da célula β . Estudos realizados por nosso grupo e outros laboratórios mostram que a suplementação de camundongos com taurina aumenta a secreção de insulina além de regular o influxo de íons Ca^{2+} para as células β , etapa crucial para o processo secretório. Para avaliar os efeitos da taurina sobre animais desnutridos, utilizamos ratos wistar, machos com 21 dias de vida. Os animais receberam dieta contendo 17% de proteína (normoprotéica) (C) ou 6% de proteína (hipoprotéica) (D). Animais C e D receberam suplementação com taurina a 2,5% na água de beber por 30 dias (CT30 e DT30) ou 90 dias (CT90 e DT90). Em seguida avaliamos parâmetros biométricos e bioquímicos, tolerância à glicose, secreção de insulina estimulada por glicose e pelo agonista colinérgico carbacol, expressão de proteínas envolvidas no controle da secreção de insulina e, finalmente, registramos os movimentos citoplasmáticos de íons Ca^{2+} após estímulo com glicose e carbacol. Verificamos que a restrição protéica retardou o crescimento dos animais além de reduzir a concentração plasmática de proteínas totais (C = $6,81 \pm 0,04$; CT30 = $7,15 \pm 0,54$; CT90 = $6,87 \pm 0,19$; D = $5,35 \pm 0,24$; DT30 = $5,37 \pm 0,28$; DT90 = $5,70 \pm 0,09$ g/dl; n = 3-5) e albumina (C = $3,20 \pm 0,11$; CT30 = $3,41 \pm 0,02$; CT90 = $3,18 \pm 0,05$; D = $2,74 \pm 0,07$; DT30 = $2,49 \pm 0,09$; DT90 = $2,67 \pm 0,04$ g/dl; n = 5-9) sem efeito da suplementação com taurina. Os animais D se mostraram mais tolerantes à glicose e a suplementação com taurina por 90 dias restaurou parcialmente a tolerância desses animais (C = 30249 ± 2682 ; CT30 = 37255 ± 6691 ; CT90 = 29365 ± 2257 ; D = 16916 ± 1609 ; DT30 = 18791 ± 2859 ; DT90 = 23425 ± 3856 AAC; n = 5-9). Nesse trabalho mostramos que a suplementação com taurina corrige a hipoinsulinemia verificada em animais desnutridos alimentados (C = $4,97 \pm 0,34$; CT90 = $3,56 \pm 0,52$; D = $1,39 \pm 0,10$; DT90 = $3,31 \pm 0,70$ ng/ml; n = 5-8) bem como a responsividade de ilhotas isoladas a concentrações crescentes de glicose. Verificamos também que a taurina normaliza a secreção

de insulina potencializada pelo carbacol (C = $9,4 \pm 0,8$; CT90 = $12,4 \pm 0,7$; D = $6,4 \pm 0,5$; DT90 = $9 \pm 0,7$ ng/ml; n = 12). As respostas secretórias foram observadas em conjunto com a regulação da expressão das proteínas SERCA3 (C = 100 ± 21 ; CT90 = 174 ± 17 ; D = 96 ± 90 ; DT90 = 149 ± 11 % do C; n = 6), receptor muscarínico M3 (C = 100 ± 24 ; CT90 = 155 ± 80 ; D = 51 ± 10 ; DT90 = 108 ± 14 % do C; n = 5) e syntaxina 1 (C = 100 ± 30 ; CT90 = 92 ± 40 ; D = 50 ± 12 ; DT90 = 77 ± 11 % do C; n = 5) que participam do controle de diferentes etapas do processo de secreção de insulina. Por fim, verificamos que a suplementação com taurina melhorou o padrão de oscilação de íons Ca^{2+} após estímulo com glicose. Concluímos então que a suplementação com taurina por 90 dias restaura a sensibilidade das ilhotas à glicose e ao carbacol possivelmente pela regulação do fluxo de cálcio para as células β bem como pela modulação da expressão de proteínas que controlam o processo de secreção de insulina.

Abstract

Malnutrition still is a public health issue, especially in developing countries. Many studies correlate malnourishment during early life and the development of cardiovascular disease and type 2 Diabetes Mellitus on latter stages. Animal models of malnutrition reveal impaired insulin secretion stimulated by glucose and other insulinotropic agents as well as lower expression of key proteins for β cell function. The literature shows that taurine supplementation increases insulin secretion and regulates calcium dynamics on β cells. Male, 21 days old, wistar rats received diet containing 17% (C) or 6% (D) of protein. Both groups received taurine supplementation on the drinking water for 30 (CT 30 and DT 30) and 90 (CT90 and DT 30) days. Next we assessed biometric and biochemical parameters, glucose tolerance, glucose and carbachol-stimulated insulin secretion, protein expression of muscarinic M3 receptor, Phospholipase C β 2, SERCA3, Syntaxin 1 and, finally, we registered cytoplasmic Ca^{2+} after stimulus with glucose and carbachol. Protein restricted rats showed lower body weight, plasma proteins (C = $6,81 \pm 0,04$; CT30 = $7,15 \pm 0,54$; CT90 = $6,87 \pm 0,19$; D = $5,35 \pm 0,24$; DT30 = $5,37 \pm 0,28$; DT90 = $5,70 \pm 0,09$ g/dl; n = 3-5), albumin (C = $3,20 \pm 0,11$; CT30 = $3,41 \pm 0,02$; CT90 = $3,18 \pm 0,05$; D = $2,74 \pm 0,07$; DT30 = $2,49 \pm 0,09$; DT90 = $2,67 \pm 0,04$ g/dl; n = 5-9) and increased glucose tolerance (C = 30249 ± 2682 ; CT30 = 37255 ± 6691 ; CT90 = 29365 ± 2257 ; D = 16916 ± 1609 ; DT30 = 18791 ± 2859 ; DT90 = 23425 ± 3856 AUC; n = 5-9). Taurine supplementation had no effect upon nutritional status parameters and partially restored glucose tolerance and insulinemia to C levels. Taurine increased secretory response to glucose and carbachol (C = $9,4 \pm 0,8$; CT90 = $12,4 \pm 0,7$; D = $6,4 \pm 0,5$; DT90 = $9 \pm 0,7$ ng/ml; n = 12). It also increased protein expression of M3 receptor (C = 100 ± 24 ; CT90 = 155 ± 80 ; D = 51 ± 10 ; DT90 = 108 ± 14 % of C; n = 5), SERCA 3 (C = 100 ± 21 ; CT90 = 174 ± 17 ; D = 96 ± 90 ; DT90 = 149 ± 11 % of C; n = 6) and syntaxin 1 (C = 100 ± 30 ; CT90 = 92 ± 40 ; D = 50 ± 12 ; DT90 = 77 ± 11 % of C; n = 5). Finally, taurine supplementation for 90 days improved Ca^{2+} dynamics when the islets were stimulated with glucose. In conclusion, these data show that taurine supplementation restores secretory responsiveness to glucose and carbachol possibly

through Ca^{2+} dynamics modulation and increased expression of key proteins for insulin secretion.

Introdução

1. Introdução

1.1 Secreção de insulina

O pâncreas endócrino é uma glândula única, composta por quatro principais tipos de células distribuídas por toda a porção exócrina. Essas células estão agregadas em “ilhas” denominadas ilhotas de Langerhans. São geralmente ovais e a distribuição das células endócrinas dentro de uma ilhota é similar na maioria dos mamíferos (**Kulkarni, 2004**). Cada ilhota consiste de um aglomerado central (núcleo) de células β com um manto de células α e/ou δ ou um manto de células δ e PP. Estima-se que humanos adultos tenham aproximadamente 2 milhões de ilhotas (2% do peso do pâncreas). Em roedores cada ilhota é composta por 2.000 a 4.000 células, das quais 70 a 80% são células β , produtoras de insulina, 5% são células δ , produtoras de somatostatina, e 15 a 20% são células α produtoras de glucagon ou células PP, produtoras de polipeptídeo pancreático, a depender da localização no pâncreas (**Orci, 1985**).

A secreção de insulina estimulada por glicose inicia-se com o reconhecimento e subsequente metabolismo do nutriente pelas células β , gerando um ou diversos sinais que levam à redução da condutância ao potássio (K^+). A diminuição da condutância ao K^+ provoca um acúmulo relativo do referido cátion nas células β , com consequente despolarização da membrana e abertura dos canais de cálcio (Ca^{2+}) sensíveis à voltagem. O influxo de Ca^{2+} e o consequente aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) ativa a maquinaria exocitótica, resultando na secreção de insulina (**Ashcroft *et al.*, 1994**).

Após sua síntese no retículo endoplasmático, as moléculas de insulina sofrem modificações adicionais, como remoção do peptídeo C, e são estocadas em vesículas para posterior liberação por exocitose. A liberação dos grânulos de insulina é um processo bastante regulado e envolve a ação orquestrada de várias classes de proteínas. Dentre elas, estão as proteínas de fusão sensíveis à N-etilmaleimida (NFS), as proteínas solúveis ligantes a NFS (SNAP), os receptores de SNAP (SNARE) e as proteínas com atividade GTPase da família Rab (**Rorsman & Renstrom, 2003**).

A família SNARE pode ser subdividida em t-SNARE e v-SNARE. As proteínas t-SNARE, representadas principalmente pela Sintaxina e SNAP-25, se situam na porção da membrana plasmática onde o grânulo de insulina será fusionado. A VAMP, também conhecida como sinaptobrevina, é uma v-SNARE que se encontra inserida na membrana do grânulo de insulina. Durante o processo de exocitose as t-SNARE e v-SNARE se encontram formando um complexo heterotetramérico conhecido como trans-SNARE. A formação desse complexo aproxima o grânulo de insulina da membrana plasmática-alvo por meio de movimentos que se assemelham ao fechamento de um zíper, gerando a força necessária para que o grânulo entre em contato com a membrana plasmática até o momento da fusão entre as duas membranas (**Sudhof & Rothman, 2009**).

A liberação dos grânulos de insulina deve ser finamente regulada para que não haja secreção desse hormônio em momentos em que não haja necessidade. Sabe-se que o influxo de Ca^{2+} por canais dependentes de voltagem constitui o gatilho para que os grânulos sejam secretados. Dessa forma, proteínas com afinidade de ligação pelo Ca^{2+} acoplam o influxo desse íon com a liberação dos grânulos de insulina. A sinaptotagmina é uma proteína com 15 isoformas já descritas que possui dois domínios de ligação ao Ca^{2+} (C2A e C2B), sendo a principal candidata a sensor de Ca^{2+} para o processo de fusão vesicular. Quando o Ca^{2+} entra na célula, ele se liga à sinaptotagmina que por sua vez reverte a ação inibidora de outras proteínas reguladoras que se encontravam associadas ao complexo trans-SNARE, permitindo que o processo de fusão se complete (**Sudhof & Rothman, 2009**). Em células β , as sinaptotagminas VII e IX já foram associadas com a exocitose dos grânulos de insulina enquanto as isoformas I e II parecem não ter relevância para a liberação desse tipo de grânulo (**Gerber & Sudhof, 2002; Sugita et al., 2002; Gauthier & Wollheim, 2008**). Além da secreção de insulina, a sinaptotagmina VII também possui um papel central no controle da secreção de glucagon pelas células α pancreáticas (**Gustavsson et al., 2009**).

A integridade da maquinaria exocitótica é fundamental para o funcionamento adequado da célula β . Um estudo conduzido em ratos diabéticos Goto-Kakizaki, verificou que a redução na secreção de insulina era acompanhada da menor expressão das proteínas da família SNARE: SNAP-25 e sintaxina 1. O tratamento das ilhotas desses animais com adenovírus carregando as sequências da SNAP-25 e sintaxina 1 foi

capaz de melhorar significativamente a resposta secretória desse tecido frente estímulo com 22.2 mM de glicose (Nagamatsu *et al.*, 1999). A menor expressão de VAMP-2 e sinaptotagmina III também já foi documentada no mesmo modelo animal (Zhang *et al.*, 2002).

Além do Ca^{2+} proveniente do meio extracelular, o Ca^{2+} depositado no retículo endoplasmático (RE) participa na regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Gilon *et al.*, 1999). O RE possui receptores de inositol- 1,4,5-trifosfato (IP_3), um segundo mensageiro gerado a partir da hidrólise de lipídios de membrana pela enzima fosfolipase C (PLC), e quando esses receptores são ativados, ocorre a liberação de Ca^{2+} do lúmen do RE para o citossol (Gilon & Henquin, 2001). A reposição do Ca^{2+} no interior no RE é feito por uma família de ATPases do retículo sarcoendoplasmático, as SERCAs (Chen *et al.*, 2003). Ilhotas pancreáticas expressam tanto a SERCA 2b quanto três isoformas de SERCA 3 (a,b e c) (Varadi *et al.*, 1996) e a menor atividade da SERCA 3 já foi documentada em ratos tornados diabéticos por injeção de streptozotocina durante a fase neonatal (Levy *et al.*, 1998), em ratos diabéticos Goto-Kakizaki (Varadi *et al.*, 1996), e em ratos 90% pancreatectomizados (Jonas *et al.*, 1999).

A secreção de insulina pode ser modulada por vários nutrientes, neurotransmissores e hormônios peptídicos. Nutrientes como ácidos graxos, aminoácidos e cetooácidos podem influenciar a secreção de insulina tão bem quanto a glicose (Gao *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Um *et al.*, 2004). Com relação às ações dos aminoácidos sobre a secreção de insulina, foi verificado que estes podem reduzir a permeabilidade ao K^+ e estimular a secreção de insulina (Floyd *et al.*, 1963; Henquin & Meissner, 1981; Blachier *et al.*, 1989). Foi demonstrado que leucina e arginina aumentam a secreção de insulina tanto *in vivo* como *in vitro* por alteração dos fluxos iônicos e modificação do potencial de membrana das células β , influenciando assim a permeabilidade ao Ca^{2+} (Henquin, 1980; Herchuelz *et al.*, 1984; Blachier *et al.*, 1989; Sener *et al.*, 1990; Dura *et al.*, 2002).

Além dos nutrientes, o sistema nervoso possui um papel de destaque sobre a regulação da secreção de insulina. As ilhotas de Langerhans são inervadas por terminações derivadas do nervo vago que possuem a acetilcolina (Ach) como neurotransmissor. A Ach se liga a receptores muscarínicos acoplados à proteína G,

levando à ativação da PLC que por sua vez hidrolisa lipídios de membrana, produzindo IP₃ e o diacilglicerol (DAG). O IP₃, como já descrito, estimula a liberação de Ca²⁺ do RE que, juntamente com o DAG, ativa a proteína quinase C (PKC), uma serina/treonina quinase envolvida na fosforilação de elementos da maquinaria exocitótica, aumentando, assim, sua sensibilidade ao Ca²⁺ (**Gilon & Henquin, 2001**). A estimulação colinérgica mediada pela Ach é dependente de glicose e seus efeitos aparecem em concentrações entre 5 e 7 mM de glicose e se mantêm até a concentração máxima efetiva de 30 mM (**Hermans et al., 1987**).

Dentro da família de receptores muscarínicos (M1 – M5), os subtipos M1 e M3 são expressos em ilhotas de Langerhans (**Boschero et al., 1995; Duttaroy et al., 2004**), mas somente o M3 tem relevância sobre a secreção de insulina (**Gautam et al., 2007**). O papel do receptor M3 sobre a secreção de insulina foi avaliado em estudos realizados em camundongos *knockout* para esse receptor em todo o organismo (**Duttaroy et al., 2004**) ou somente nas células beta (**Gautam et al., 2006**). Esses estudos mostram a ausência de resposta secretória frente estimulação com agonistas colinérgicos, além da ausência de produção de fosfatidilinositol. A ocorrência da segunda fase da secreção de insulina encontrada em humanos e ratos, mas não em camundongos, já foi atribuída a elementos da via colinérgica. Foi verificado que ilhotas de camundongos quando estimuladas com agonistas colinérgicos, ésteres de forbol (ativadores da PKC) ou substâncias que elevam os níveis de DAG, apresentaram a segunda fase da secreção de insulina que não era evidente quando somente a glicose era utilizada como agente insulínico. Essas diferenças entre espécies foram atribuídas, em parte, à menor expressão das isoformas $\delta 1$ e $\beta 1$ da PLC das ilhotas de camundongos em relação às de ratos (**Zawalich et al., 1995**). Além do efeito sobre a secreção de insulina, o receptor M3 também tem papel regulador sobre a homeostase glicêmica. Camundongos deficientes do receptor em todos os tecidos apresentam reduzido peso corpóreo, menor glicemia e níveis circulantes de insulina além de maior tolerância à glicose (**Duttaroy et al., 2004**).

1.2 Desnutrição e secreção de insulina

A desnutrição é um termo genérico ao qual se associa uma série de doenças decorrentes da escassez dietética de nutrientes. Dependendo da intensidade, podem ser observadas desde pequenas alterações metabólicas de efeito adaptativo até falência orgânica generalizada e irreversível. Os primeiros relatos clínicos de doenças associadas à desnutrição datam da década de 30 e se referem ao Kwashiokor, atribuído à deficiência de proteínas, e ao Marasmo, associado à deficiência total de alimentos (**Fagundes et al., 2007**).

A desnutrição protéica ainda atinge grandes contingentes populacionais e, principalmente nos países em desenvolvimento, se manifesta durante a fase gestacional e seu principal sinal clínico é o baixo peso ao nascer (**Villar et al., 1982; Post et al., 1996**). A associação entre desnutrição e prevalência de doenças durante a infância, como infecções, está bem documentada (**Pelletier, 1994**).

Ao longo das décadas, vários estudos vem mostrando uma correlação positiva entre baixo peso ao nascer e o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2 na vida adulta (**Rao, 1988; Hales & Barker, 1992**). Em 1992, Hales & Barker criaram a hipótese do fenótipo econômico que postula a ativação de uma reprogramação *in utero*, mediante restrição nutricional durante a gestação, levando ao retardo no desenvolvimento de órgãos e tecidos como rins, tecido muscular e pâncreas endócrino em favorecimento de órgãos vitais como o cérebro. Essas adaptações poderiam repercutir, na vida adulta, no desenvolvimento de doenças renais, hipertensão arterial, redução na massa de células β e resistência à insulina.

Teorias mais recentes correlacionam alterações no sistema de sinalização dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) (**Cianfarani et al., 1999**). Estudos conduzidos em crianças que sofreram retardo de crescimento intrauterino mostram redução na concentração circulante de IGF-1 e insulina e aumento de IGFBPs, proteínas que se ligam aos IGFs e reduzem sua biodisponibilidade, ao nascer. Verificou-se, em seguida, normalização de todos esses fatores durante o primeiro trimestre de vida pós-natal. A partir disso, postulou-se que a resistência à insulina seria um mecanismo de

proteção desenvolvido pelos tecidos para prevenir uma hipoglicemia secundária ao restabelecimento desses hormônios. A restauração dos IGFs circulantes poderia ser responsável pelo crescimento compensatório - *catch up growth* - apresentado por crianças que sofreram retardo de crescimento intrauterino (**Leger et al., 1996; Cianfarani et al., 1998; Cianfarani et al., 1999**).

Tanto a fase de crescimento intrauterina quanto os estágios iniciais de vida são fundamentais para o desenvolvimento e maturação do pâncreas endócrino (**Remacle et al., 2007**). Estudos conduzidos em fetos que passaram por restrição protéica durante a fase de gestação, verificaram menor tamanho e vascularização das ilhotas (**Snoeck et al., 1990**), menor taxa de replicação devido à alterações em proteínas envolvidas no ciclo celular (**Petrik et al., 1999**) e maior taxa de apoptose (**Boujendar et al., 2002**), e quando as ilhotas desses animais foram removidas do meio metabolicamente desfavorável e cultivadas por 7 dias em meio com disponibilidade adequada de nutrientes, essas características ainda estavam presentes (**Dahri et al., 1995**). Todas essas evidências sugerem que distúrbios no meio intrauterino, como no caso da restrição protéica, podem comprometer permanentemente os desenvolvimento e função das ilhotas pancreáticas.

Em nosso âmbito, temos estudado o papel da desnutrição fetal e infantil na determinação desta síndrome usando o modelo experimental animal de restrição protéica na vida intra-uterina, lactação e após desmame, avaliando os seus efeitos sobre a secreção e ação da insulina na vida adulta (**Latorraca et al., 1998; Ferreira et al., 2003; Araujo et al., 2004; Ferreira et al., 2004**).

Nosso grupo de estudos tem demonstrado que a restrição protéica modifica o mecanismo de secreção de insulina alterando a resposta secretória para glicose, aminoácidos, potássio e agentes potencializadores da secreção (**Ferreira et al., 2003; Araujo et al., 2004; Filiputti et al., 2008**). Dentre os mecanismos propostos para a menor responsividade dessas células estão: menor expressão de glicoquinase (**Desai et al., 1995**), PDX-1 (**Arantes et al., 2002; Martin et al., 2004**), glicerolfosfato desidrogenase (**Rasschaert et al., 1995**), PKA α (**Milanski et al., 2005**), PKC α (**Ferreira et al., 2003**) e S6K-1 (**Filiputti et al., 2008**), menor mobilização de íons cálcio (**Latorraca et al., 1999**) e alterações no processo de extrusão dos grânulos de insulina (**Cherif et al., 2001**).

1.3 Taurina e secreção de insulina

A taurina é um pequeno aminoácido que está presente em altas concentrações tanto no interior das células como no plasma de mamíferos. Esse aminoácido é obtido pela ingestão de carne, peixe e leite, mas também pode ser biossintetizado a partir de metionina e cisteína. Tem importância em processos biológicos tais como desenvolvimento do sistema nervoso e retina, modulação do Ca^{2+} , estabilização de membranas, reprodução, imunidade e pode também funcionar como um osmólito para regular o volume celular (**Aerts & Van Assche, 2002**).

Evidências indicam que o mecanismo de ação da taurina possa ocorrer pela combinação do aminoácido com vários tipos de canais iônicos, transportadores e enzimas. Estudos demonstraram que a taurina exerce algumas de suas ações inibindo canais K_{ATP} (potássio dependentes de ATP) no músculo esquelético (**Tricarico et al., 2000**) e em fibras cardíacas (**Satoh, 1996**). Além disso, nas células miocárdicas, a taurina apresenta-se como um agonista para a entrada de Ca^{2+} e da corrente retificadora de K^+ em baixas concentrações intracelulares de cálcio, e como um antagonista inibindo o influxo de Ca^{2+} e a corrente retificadora de K^+ em elevadas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (**Satoh, 1998**).

No pâncreas a concentração de taurina está compartimentalizada em células da ilhota contendo glucagon e somatostatina, sugerindo que a liberação de taurina possa ser necessária para que ocorra uma eficiente modulação do processo de secreção de insulina em células β (**Bustamante et al., 2001**). Em hiperglicemia a taurina aumenta a secreção de insulina (**Kaplan et al., 2004**) e a sensibilidade à insulina (**Nakaya et al., 2000; Tsuboyama-Kasaoka et al., 2006**). Porém o mecanismo de sua ação sobre a homeostase glicêmica, bem como sobre o pâncreas endócrino, não está totalmente compreendido.

O efeito da suplementação com aminoácidos sobre a secreção de insulina em animais desnutridos também já foi evidenciada por outros grupos de estudo. Segundo Cherif *et al.*, (1998) ilhotas de fetos de ratos fêmeas que foram submetidas à restrição protéica durante a gestação, apresentaram redução da secreção de insulina estimulada por diferentes nutrientes. A suplementação com o aminoácido taurina durante a prenhez retoma a secreção de insulina a valores semelhantes ao do controle, normaliza a

proliferação celular das ilhotas de Langerhans destes fetos (Kalbe *et al.*, 2005) e a insulinemia destes animais na vida adulta (Merezak *et al.*, 2004). Em fetos e neonatos desnutridos, a suplementação com taurina restaura a síntese de DNA e reduz a apoptose, normalizando a massa de células β nos filhotes possivelmente pelo aumento da imunorreatividade ao IGF-II (fator de crescimento semelhante à insulina), evidenciada nestes animais (Boujendar *et al.*, 2002).

Estudos de expressão gênica pela técnica de *microarray* em ilhotas de Langerhans mostraram que 10% dos 10.346 genes avaliados sofreram modulação pela restrição protéica. Entre os processos celulares em que esses genes se agrupavam, estavam: proliferação celular, produção de energia, defesa antioxidante e metabolismo mitocondrial. A expressão de todos os genes modulados pela restrição protéica foi normalizada mediante suplementação com taurina (Reusens *et al.*, 2008).

Estudos desenvolvidos pelo nosso laboratório fornecem evidências que corroboram com a idéia de que este aminoácido está relacionado com a regulação da secreção das células β e homeostase glicêmica. O tratamento *in vivo* e *in vitro* de ilhotas de Langerhans com a taurina aumenta a sensibilidade das células β à glicose, e promove uma maior expressão do fator de transcrição de ilhotas de Langerhans (PDX-1) em núcleos destas células (Carneiro *et al.*, 2008). O PDX-1 tem importância no desenvolvimento pancreático em animais experimentais e em humanos. Ele pode regular a transcrição de genes como GLUT-2 e glicoquinase, e sua mutação está relacionada com anormalidades na função das células β e aparecimento de diabetes em humanos e em camundongos (Macfarlane *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2000). Outro estudo conduzido com camundongos suplementados com taurina mostra o aumento da secreção de insulina estimulada por glicose e pelo aminoácido leucina. Nas ilhotas desses animais também foi verificado aumento da captação de íons Ca^{2+} bem como expressão protéica da subunidade β_2 do canal de cálcio voltagem-dependente. Esses animais apresentaram, ainda, maior concentração circulante de glucagon bem como maior secreção desse hormônio quando as ilhotas foram estimuladas com 0,5 mM de glicose sugerindo que além da célula β , a taurina também possa modular a função das células α pancreáticas (Ribeiro *et al.*, 2009).

Objetivos

2. Objetivos

Sabe-se que a restrição protéica, em modelos animais, promove menor secreção de insulina e acredita-se que essa redução seja decorrente do comprometimento do mecanismo secretório.

Estudos de nosso laboratório e outros grupos apontam para uma função moduladora da taurina sobre a função do pâncreas endócrino. Esses achados sugerem que esse aminoácido possa regular o fluxo de íons Ca^{2+} para a célula β bem como alterar expressão de proteínas fundamentais para a funcionalidade dessas células, resultando no aumento da secreção de insulina.

Baseado nessas evidências sugerimos que a suplementação com taurina possa ser uma estratégia eficaz para amenizar as alterações produzidas pela restrição protéica. Para isso, temos como objetivos:

- Realizar a caracterização biométrica e bioquímica de ratos submetidos à restrição protéica pós-desmame e suplementados com taurina.
- Verificar a secreção de insulina estimulada por glicose e em presença do agente colinérgico carbacol em ilhotas isoladas.
- Identificar os eventos moleculares e funcionais envolvidos com a secreção de insulina em ilhotas de Langerhans dos diferentes grupos estudados.

Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

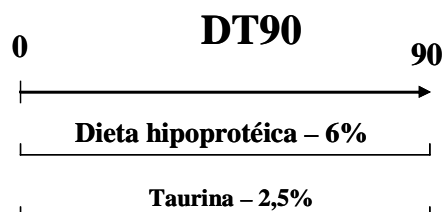
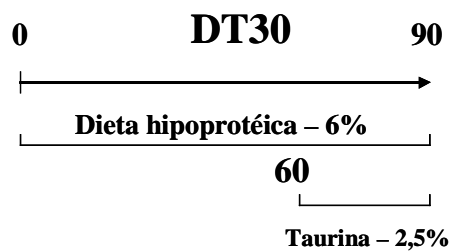
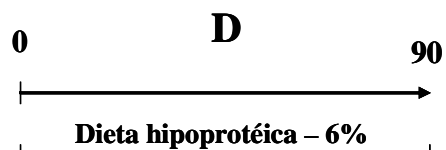
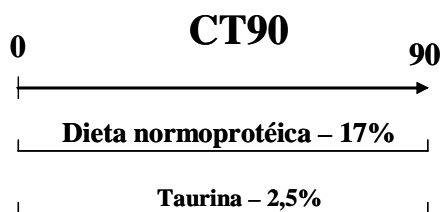
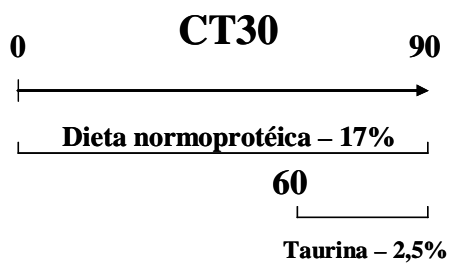
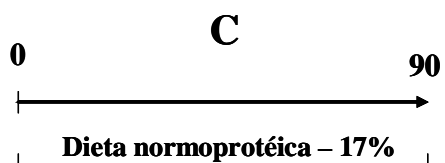
3.1 Animais, dieta e suplementação

Ratos Wistar machos com 21 dias de vida provenientes do Biotério Central - UNICAMP foram separados em 6 grupos experimentais:

- a) **Controle (C)**: os animais receberam dieta contendo 17% de proteína por todo o período experimental (90 dias).
- b) **Controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30)**: os animais receberam dieta contendo 17% de proteína por todo o período experimental e foram suplementados com taurina a 2,5% na água de beber 60 dias após o início da dieta.
- c) **Controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90)**: os animais receberam dieta contendo 17% de proteína por todo o período experimental e foram suplementados com taurina a 2,5% na água de beber desde o início da dieta.
- d) **Desnutridos (D)**: os animais receberam dieta contendo 6% de proteína por todo o período experimental
- e) **Desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30)**: os animais receberam dieta contendo 6% de proteína por todo o período experimental e foram suplementados com taurina a 2,5% na água de beber 60 dias após o início da dieta.
- f) **Desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90)**: os animais receberam dieta contendo 6% de proteína por todo o período experimental e foram suplementados com taurina a 2,5% na água de beber desde o início da dieta.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola) sob condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Desenho Experimental



As dietas, mistura de vitaminas e de sais minerais (Tab. 1, 2 e 3) foram preparadas no Departamento de Fisiologia e Biofísica da Unicamp. As dietas seguem as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93) para roedores em fase de crescimento, gravidez e lactação (Reeves *et al.*, 1993).

Tab. 1 - Composição das dietas

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

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

Tab. 2 – Composição da mistura de vitaminas (AIN-93G-VX)

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

Tab. 3 – Composição da 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 Avaliação de parâmetros biométricos e bioquímicos

Peso corpóreo

O peso corpóreo de ratos controle (C), controles suplementados com taurina por 30 dias (CT30) e 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30) e 90 dias (DT90) foi avaliado semanalmente por um período de 12 semanas.

Proteínas totais e albumina plasmática

Aproximadamente 500µl de amostras de sangue foram obtidas por via caudal e centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos em 4°C. O plasma foi separado e 2 µl foram utilizados para a dosagem de proteínas totais e albumina com o kit PROtal (Laborlab), adaptado para microensaio.

Insulina plasmática

Aproximadamente 500µl de amostras de sangue foram obtidas por via caudal e centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos a 4°C. O plasma foi separado e 50-100 µl foram utilizados para a dosagem de insulina por radioimunoensaio (**Scott *et al.*, 1981**).

Ácidos graxos livres

A concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGLs) foi determinada através de um kit de ensaio enzimático colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Wako[®]; Richmond, USA). Os AGLs em presença de ATP, coenzima A (CoA) e acil-CoA-sintetase formam ésteres tiois CoA (Acil-CoA), que são oxidados pela Acil-CoA oxidase e formam peróxido de hidrogênio. Este, por sua vez, em presença de

peroxidase permite a condensação oxidativa do B-hidroxietil anilina com 4-aminoanfipirina em um composto de cor púrpura. Os reagentes foram adicionados a 4 µl de plasma seguido por leitura espectrofotométrica em 550 nm. A concentração plasmática de AGLs foi determinada com base em uma curva padrão.

Colesterol

A concentração plasmática de colesterol (COL) foi determinada através de um kit de ensaio enzimático colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Roche/Hitachi[®]; Indianapolis, USA). O método baseia-se na hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol estearase formando colesterol que por sua vez é oxidado formando colest-4-en-3-one e peróxido de hidrogênio. Em presença de peroxidase, o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminofenazona e 4-clorofenol formando um produto de cor avermelhada (reação de Trinder). Os reagentes foram adicionados a 2 µl de plasma seguido por leitura espectrofotométrica em 492 nm. A concentração plasmática de COL foi determinada com base em uma curva padrão.

Análise automática de aminoácidos livres no plasma

O plasma dos animais foi desproteínizado usando uma solução orgânica composta por metanol, TCA e acetonitrila de água na proporção 1:1 (v/v). O plasma foi incubado a temperatura ambiente (20°C) por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3800 x g por 3 minutos e alíquotas de 200µl foram misturadas ao tampão de lítio (pH 2.2) na proporção 1:1 (v/v) (Pharmacia).

A análise dos aminoácidos foi realizada em sistema de derivatização pós-coluna usando reagente de ninhidrina e a mistura dos aminoácidos livres foi realizada em uma coluna de troca iônica da Pharmacia. A eluição dos aminoácidos foi realizada usando um gradiente “step wise” de tampão de lítio em diferentes valores de pH e molaridade, indicados pelo sistema Biochrom 20 Plus (Pharmacia).

3.2.2 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)

Os animais foram mantidos em jejum por 12 h e após a verificação da glicemia de jejum (tempo 0) com o aparelho Accu-Check Advantage II, uma solução de glicose a 50% (2,0 g/Kg de peso corpóreo) foi administrada por injeção intraperitoneal. Em seguida, a glicemia foi verificada nos tempos 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos.

3.2.3 Isolamento de ilhotas pancreáticas de ratos

Os animais 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 de uma cânula de polietileno, foi injetada solução de Hanks adicionada de 0,8mg/ml de colagenase para os animais controle e de 0,7mg/ml para o desnutridos o 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. Em seguida, os fragmentos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 23 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 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.

3.2.4 Secreção Estática de Insulina

As ilhotas coletadas foram transferidas para placas de cultura com 24 reservatórios contendo 0,5 ml de solução de Krebs contendo 0,3% de albumina bovina (m/v) e 5,6 mM de glicose. Em todos os experimentos foram colocadas 5 ilhotas em cada

reservatório. A seguir, as placas foram mantidas em ambiente gaseado com mistura carbogênica a 37°C por 60 minutos. A solução de pré-incubação foi removida e substituída por solução de Krebs contendo 2.8, 8.3, 16.7 e 22.2 mM de glicose. Em outra série de experimentos, os mesmos procedimentos foram realizados sendo que após a remoção das solução de pré-incubação, foi adicionado Krebs contendo 11.1mM de glicose ou 11.1mM + 100µM de carbacol. Após 60 min de incubação as placas foram resfriadas em banho de gelo e o sobrenadante foi removido, transferido para tubos Eppendorf e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (Scott *et al.*, 1981).

3.2.5 Western Blotting

A expressão das proteínas foi avaliada pela técnica de “Western blotting”. As ilhotas foram rompidas e homogeneizadas por sonicação com 6 pulsos de 5 s com 5 s de intervalo entre os pulsos (VirSoni 60). Os extratos foram centrifugados a 15.000 g, 4° C por 15 min para remoção do material insolúvel. As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DDT 10 mM, e fervidas em banho seco por 5 min. Alíquotas contendo 30µg de proteína foram aplicadas no SDS-PAGE (10% Tris acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45µm (BioRad). Esta foi incubada por 2 h em solução bloqueadora (TBS/Tween-20 0,05% + leite em pó desnatado 5%) para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários policlonais: anti-M3 (Sigma, M0194 – 1:2000), anti-SERCA3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-26507 – 1:500), anti-PLCβ2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-9018 – 1:1000), e com os anticorpos monoclonais anti-sintaxina 1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-12736 – 1:1000) e anti-α-tubulina (Sigma, T6199 – 1:1000). Todos os anticorpos foram diluídos em TBS/T acrescido de 3% de BSA. Após o tempo de incubação, os anticorpos primários foram removidos e se fez a lavagem das membranas. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Invitrogen),

diluído 1:10000 em TBS/T acrescido de leite desnatado 5%, por 2 h. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para auto-radiografia. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation). Todas as lavagens foram feitas três vezes em TBS/T por aproximadamente 5 min.

3.2.6 Registro de movimentos citoplasmáticos de íons Ca^{2+} em ilhotas de Langerhans

Grupos de aproximadamente 50 ilhotas foram lavadas em solução de Krebs e incubadas em 2 ml de Krebs 5.6 mM de glicose em presença de $1\mu\text{M}$ fura-2/AM dissolvido em DMSO (0,1%). As ilhotas foram mantidas em estufa gaseada com mistura carbogênica (95% O_2 / 5% CO_2) à 37°C por 60 min. Após a incubação com o fura, as ilhotas foram aderidas em lâminas de vidro com polyisina e transferidas para uma câmara de perfusão em presença de diferentes secretagogos. As ilhotas foram perfundidas com Krebs 3mM de glicose até a estabilização do sistema. Após esse período, as mesmas foram estimuladas durante aproximadamente 25 minutos com glicose 16.7mM. Nos experimentos com carbacol, as ilhotas foram perfundidas por Krebs sem cálcio contendo 11.1mM de glicose, 10mM de EGTA e $250\mu\text{M}$ de diazoxida. Em seguida, as ilhotas foram perfundidas pela mesma solução acrescida de $100\mu\text{M}$ de carbacol. As imagens das oscilações de cálcio foram captadas usando aparelhagem adequada. As ondas excitatórias de 340 e 380 nm foram selecionadas por uma fonte de luz de xenônio e a emissão foi de 510 nm. A mudança no cálcio citoplasmático foi detectada como uma mudança na proporção F340/F380 (Quesada *et al.*, 2002).

3.3 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e erro padrão. Os resultados referentes às leituras densitométricas do Western Blotting foram expressos como porcentagem em relação ao controle. O teste estatístico utilizado foi Anova de duas vias (Anova two-way), onde foram avaliados os efeitos da dieta e da suplementação com taurina, assim como a interação entre esses fatores. O post hoc adotado foi o de Newman-Keuls. Quando indicado, foi realizado o teste t de *Student* para evidenciar diferença estatística somente entre dois grupos. O nível de significância adotado para todas as análises foi $p < 0.05$.

Resultados

4. Resultados

4.1 Caracterização do modelo experimental

4.1.1 Parâmetros biométricos

Dentre os parâmetros gerais para a caracterização do modelo experimental, foram avaliados: evolução do peso corpóreo e peso dos órgãos.

A fig.1a mostra a curva de crescimento dos grupos experimentais estudados. A análise das curvas e da área abaixo delas (fig. 1b) permite observar o crescimento significativamente reduzido dos animais que receberam dieta contendo 6% de proteína. A suplementação com taurina não influenciou a evolução do peso em nenhum dos grupos suplementados.

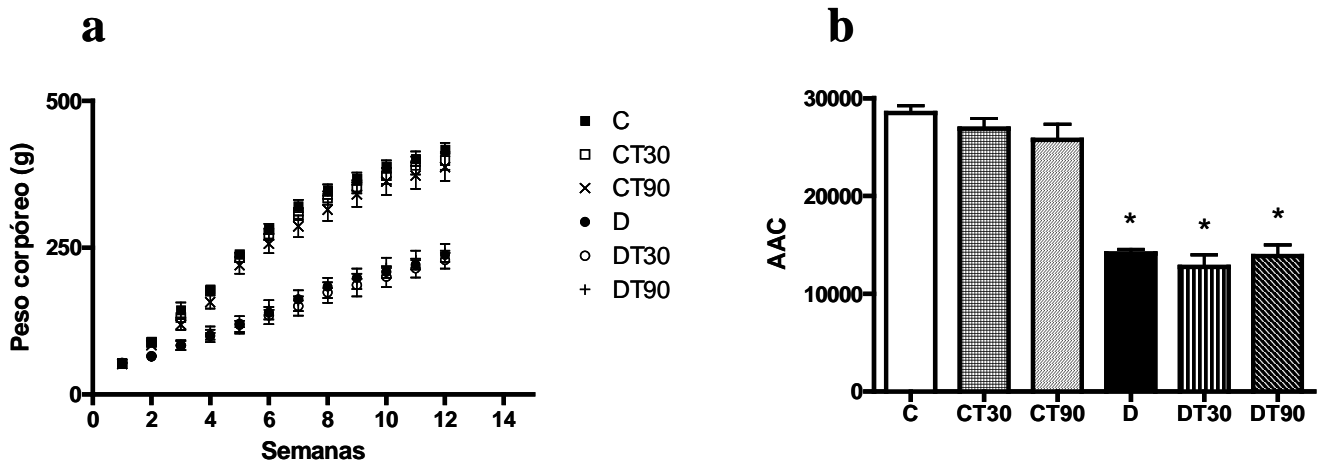


Fig. 1 (a) Peso corpóreo de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30) e 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30) e 90 dias (DT90) acompanhados por 12 semanas. $n = 5$ para todos os grupos experimentais. **(b)** Média \pm EPM da área abaixo das curvas (AAC) de ganho de peso. * indica diferença estatística em relação a C. $P < 0.001$ (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Ao final do período experimental, os animais foram sacrificados e os órgãos foram removidos e pesados (tab. 4).

Tab. 4 Comprimento naso-anal (CNA), peso do fígado, baço, coração, rins, gordura retroperitoneal e da gordura periepididimal de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30) e 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30) e 90 dias (DT90) acompanhados por 12 semanas^{1,2}

| | C | CT30 | CT90 | D | DT30 | DT90 |
|------------------------------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| CNA (cm) | 22,53±0,82 | 23,28±0,24 | 23,25±0,25 | 21,10±0,90 | 21,33±0,41 | 20,85±0,65 |
| Fígado (g) | 13,24±1,22 | 13,79±0,95 | 15,51±2,42 | 8,13±0,86* | 10,1±0,15* | 9,19±1,51* |
| Baço (g) | 0,95±0,042 | 1,02±0,08 | 1,05±0,08 | 0,63±0,06* | 0,77±0,04* | 0,66±0,05* |
| Coração (g) | 1,22±0,04 | 1,33±0,06 | 1,30±0,01 | 0,90±0,07* | 1,00±0,04* | 0,88±0,08* |
| Rins (g) | 2,76±0,11 | 2,68±0,19 | 2,93±0,38 | 1,57±0,16* | 1,84±0,12* | 1,73±0,16* |
| Gordura Retroperitoneal (g) | 20,8±0,30 | 15,6±2,79 | 15,6±5,50 | 4,56±1,23* | 5,29±0,42* | 5,83±1,32* |
| Gordura Periepididimal (g) | 14,63±3,60 | 12,64±1,7 | 14,27±3,08 | 3,42±1,02* | 4,69±0,27* | 4,27±0,79* |

1 Valores representam média ± EPM, n = 5.

2 * indica diferença estatística em relação a C. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Podemos observar na tabela 4 que nenhum dos grupos experimentais diferiu quanto ao comprimento naso-anal enquanto que todos os órgãos e compartimentos avaliados se mostraram reduzidos nos animais desnutridos, estando de acordo com os dados de peso corpóreo obtidos. Também não foi verificada influência da suplementação com taurina sobre os parâmetros avaliados.

4.1.2 Parâmetros bioquímicos plasmáticos

Para a caracterização bioquímica do modelo experimental foram avaliadas: proteínas totais, albumina, glicose, insulina, ácidos graxos livres e colesterol plasmático (tab. 5). Também foram verificados os níveis plasmáticos de taurina (fig. 2).

Tab. 5 Proteínas totais, albumina, glicemia, insulina plasmática, ácidos graxos livres e colesterol de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30) e 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30) e 90 dias (DT90) mantidos em jejum por 12 horas.^{1,2}

| | C | CT30 | CT90 | D | DT30 | DT90 |
|--------------------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Proteína total (g/dl) | 6,81 ± 0,04 | 7,15 ± 0,54 | 6,87 ± 0,19 | 5,35 ± 0,24* | 5,37 ± 0,28* | 5,70 ± 0,09* |
| Albumina (g/dl) | 3,20 ± 0,11 | 3,41 ± 0,02 | 3,18 ± 0,05 | 2,74 ± 0,07* | 2,49 ± 0,09* | 2,67 ± 0,04* |
| Glicose (mg/dl) | 79,11 ± 3,42 | 76,50 ± 8,08 | 76,30 ± 4,03 | 63,75 ± 3,38 | 72,20 ± 8,73 | 69,14 ± 5,90 |
| Insulina (ng/ml) | 1,30 ± 0,17 | 1,18 ± 0,23 | 1,48 ± 0,23 | 0,83 ± 0,14 | 0,97 ± 0,32 | 1,09 ± 0,21 |
| Insulina # (ng/ml) | 4,97 ± 0,34 | - | 3,56 ± 0,52 | 1,39 ± 0,10* | - | 3,31 ± 0,70 |
| Ácidos Graxos Livres (mmol/l) | 0,82 ± 0,08 | - | 0,69 ± 0,11 | 1,21 ± 0,14* | - | 1,20 ± 0,16* |
| Colesterol (mg/dl) | 56,60 ± 2,731 | - | 51,80 ± 3,69 | 55,00 ± 1,81 | - | 46,80 ± 1,49 |

Valores obtidos com os animais no estado alimentado

1 Valores representam média ± EPM. Para proteína total n = 3-5, albumina n = 5-9, glicose n = 7-9, insulina jejum n = 5-9, insulina alimentado n = 5-8, ácidos graxos livres n = 5, colesterol n = 5.

2 Letras distintas representam diferença estatística, P < 0.05 (ANOVA two-way pós teste de Newman-Keuls).

Tanto as proteínas totais quanto a albumina plasmática se mostraram reduzidas nos animais desnutridos sem haver influência da suplementação com taurina. A glicemia, a insulina plasmática e o colesterol total de jejum não diferiram em nenhum dos grupos experimentais. Os ácidos graxos livres plasmáticos foram maiores nos animais que receberam a dieta hipoprotéica sem a influência da suplementação com taurina. No estado alimentado, verificamos redução da insulina plasmática nos animais D em relação a C. A suplementação com taurina aumentou a insulinemia somente nos animais DT90, havendo interação desse fator com a restrição protéica.

A análise dos níveis plasmáticos de taurina (fig. 2) não revelou diferença entre os grupos C e D. Tanto os animais suplementados por 1 mês (CT30 e DT30), quanto os suplementados por 3 meses (CT90 e DT90) mostraram um aumento significativo nos níveis circulantes desse aminoácido.

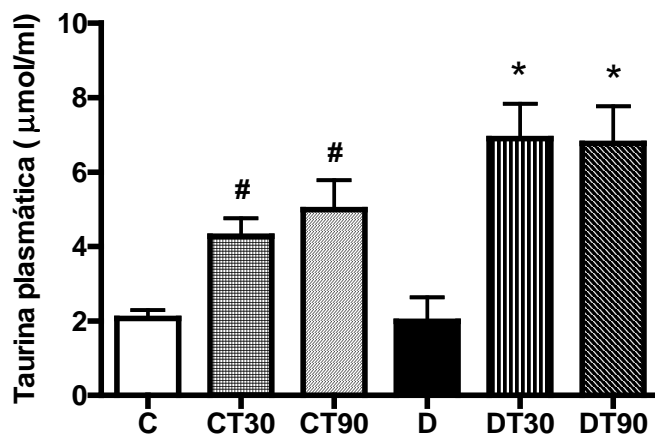


Fig. 2 Taurina circulante no plasma de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30) e 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30) e 90 dias (DT90). Média \pm EPM. $n = 4$ para todos os grupos experimentais. # indica diferença estatística em relação a C. * indica diferença estatística em relação a D. $P < 0.05$ (Teste t de Student).

Esse resultado mostra que a suplementação com taurina a 2,5% na água de beber tanto por 30, quanto por 90 dias, foi suficiente para elevar a quantidade circulante desse aminoácido, sugerindo que as diferenças encontradas entre os grupos suplementados por 30 e 90 dias não se devem à eficiência da suplementação, mas sim, ao tempo de tratamento e ao momento em que o aminoácido foi implementado.

4.1.3 Teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT)

Para investigar diferenças de tolerância a glicose, foi feito um ipGTT no qual 2g de glicose/Kg de peso foi administrada na cavidade intraperitoneal dos animais. A fig. 3a mostra as curvas glicêmicas de animais controle, controle suplementados por 30 dias, desnutridos e desnutridos suplementados por 30 dias. Em ambos os grupos de desnutridos, é possível observar uma queda mais rápida da glicemia do que nos grupos controle. A maior tolerância dos desnutridos pode ser evidenciada pela área abaixo das curvas (fig. 3b) que foi significativamente menor nos grupos D e DT30. A suplementação com taurina por 30 dias não influenciou a resposta dos animais frente à carga de glicose administrada.

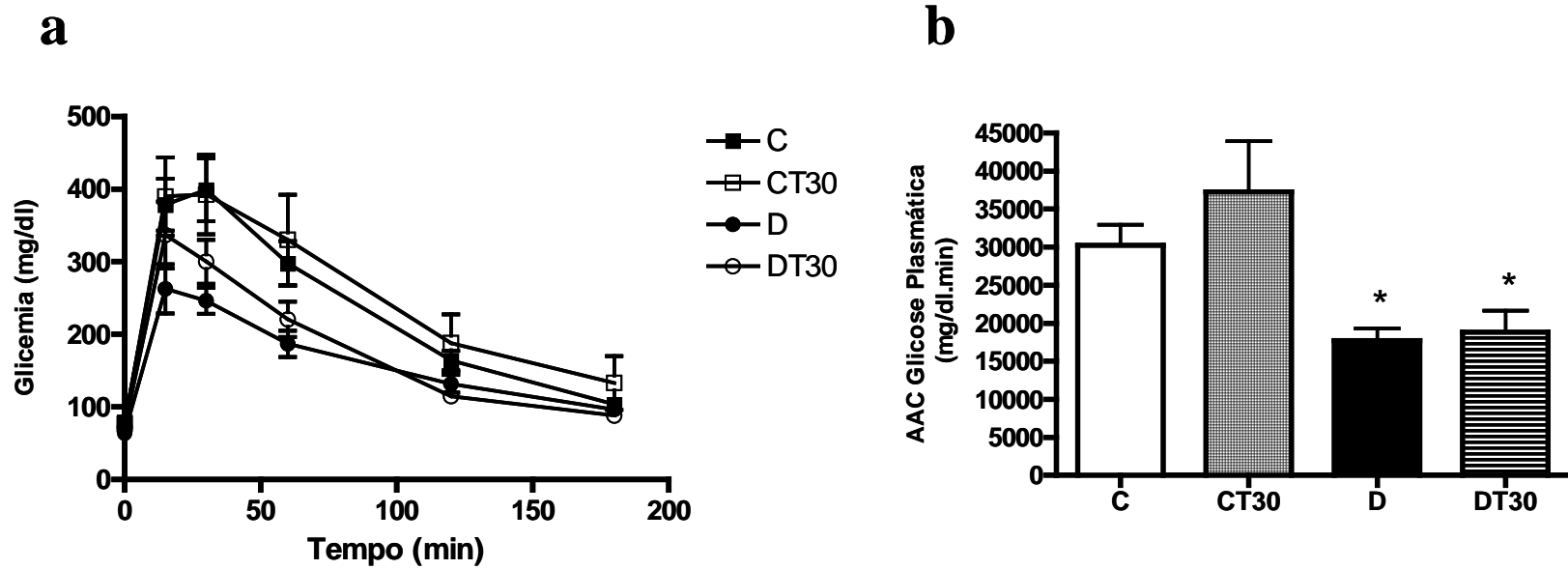


Fig. 3 (a) Glicemia média \pm EPM de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30) após a administração intraperitoneal de 2g de glicose/Kg de peso, n = 5-9. **(b)** Média \pm EPM da área abaixo da curva (AAC) da glicemia dos grupos experimentais. * indica diferença estatística em relação a C. $P < 0.05$. (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

As curvas glicêmicas dos animais suplementados por 90 dias são mostradas na fig. 4a. Nesse caso a curva do grupo DT90 se aproxima dos controles enquanto o grupo D permanece abaixo. Esse perfil é evidenciado pela área abaixo da curva (fig. 4b) do grupo DT90 que se mostra em um nível intermediário entre o grupo D e os controles.

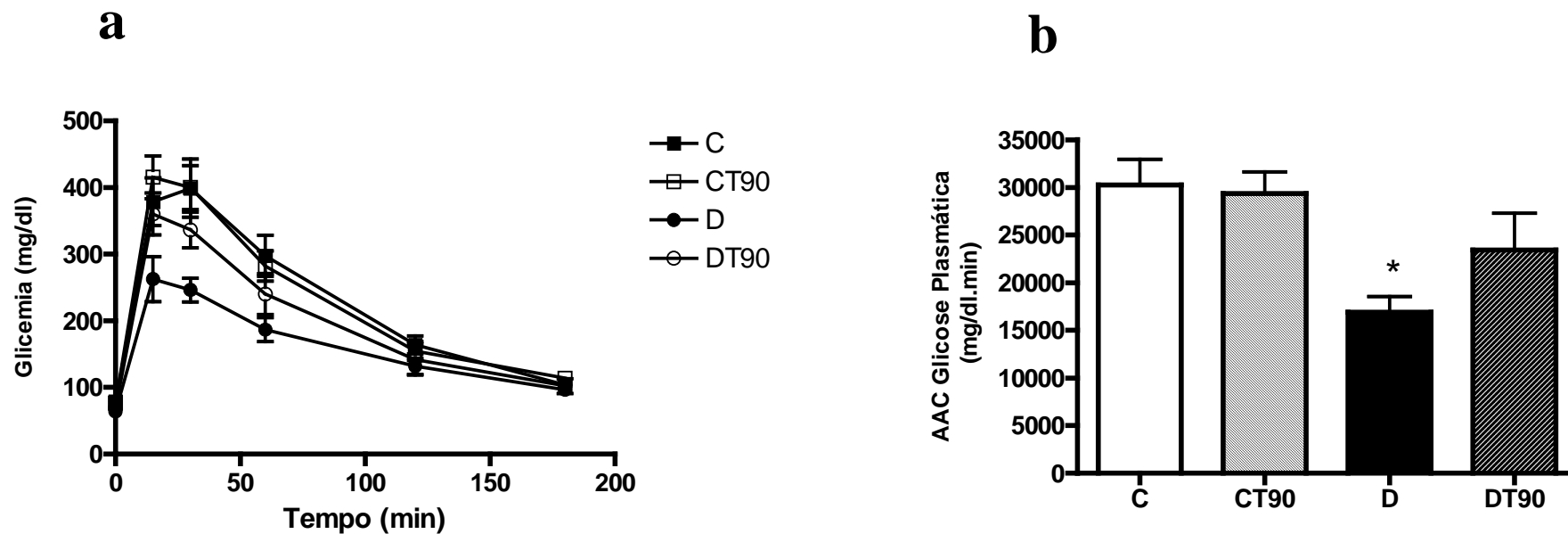


Fig. 4 (a) Glicemia média \pm EPM de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90) após a administração intraperitoneal de 2g de glicose/Kg de peso, n = 7-9. **(b)** Média \pm EPM da área abaixo da curva (AAC) da glicemia dos grupos experimentais. * indica diferença estatística em relação a C. $P < 0.05$. (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

4.2 Secreção de insulina

4.2.1 Secreção estática de insulina estimulada por glicose

Após a caracterização do modelo experimental, conduzimos uma série de experimentos com o objetivo de verificar a secreção de insulina estimulada por diferentes concentrações de glicose. A fig. 5 mostra a secreção de insulina de ilhotas pancreáticas de ratos controle, controle suplementados com taurina por 30 dias, desnutridos e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias quando estimuladas com 2.8, 8.3, 16.7 e 22.2 mM de glicose. Em 2.8 mM não houve diferença entre os grupos experimentais enquanto que, a partir de 8.3 mM, os animais desnutridos e desnutridos suplementados apresentaram secreção de insulina reduzida em relação aos animais controle e controle suplementados com taurina. Nesses grupos, houve somente o efeito da dieta, uma vez que a suplementação com taurina por 30 dias não foi suficiente para modificar a secreção de insulina em nenhuma das concentrações de glicose avaliadas.

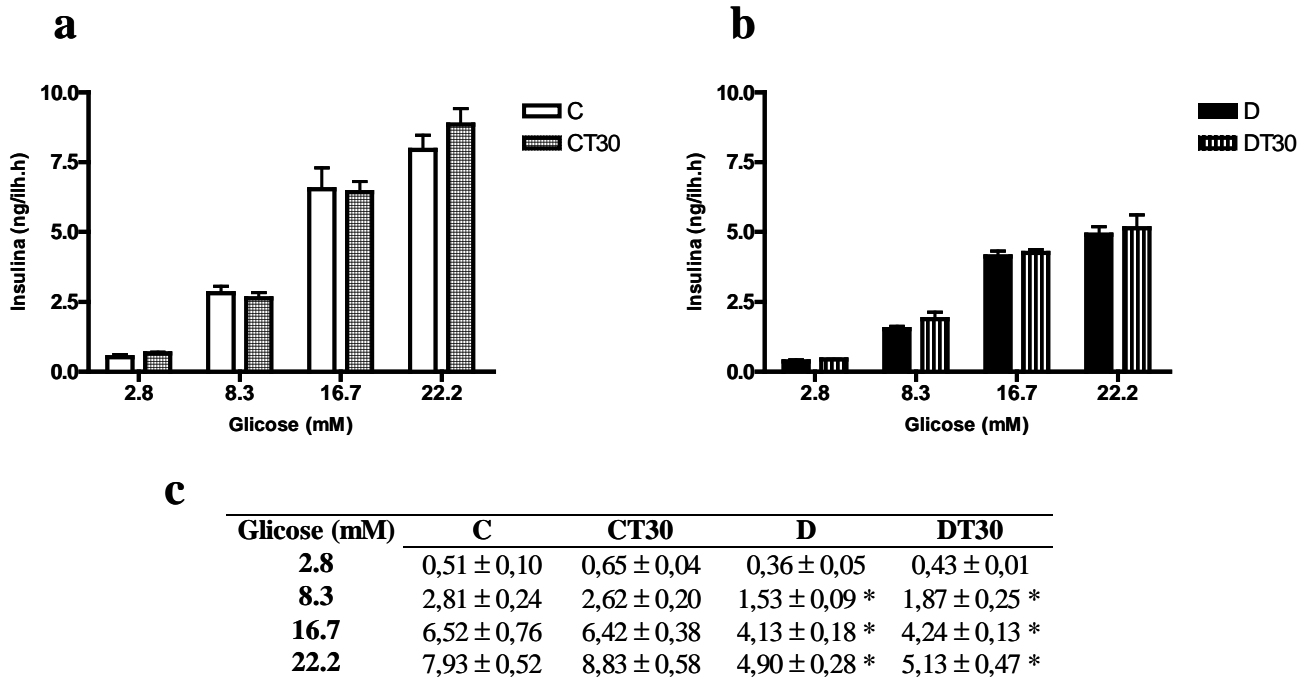


Fig. 5 Secreção estática de insulina de ratos (a) controle (C), controle suplementados com taurina por 30 dias (CT30), (b) desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 30 dias (DT30). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6mM de glicose durante 1 h. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 2.8, 8.3, 16.7 e 22.2 mM de glicose por 1 h, n = 10. (c) valores representam a média ± EPM. * indica diferença estatística em relação a C para cada concentração de glicose. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

A secreção de insulina de ilhotas pancreáticas de ratos controle, controle suplementados com taurina por 90 dias, desnutridos e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias, quando estimuladas por 2.8, 8.3, 11.1, 16.7 e 22.2 mM de glicose, está ilustrada na figura 6. Novamente as ilhotas dos animais não apresentaram diferença de secreção quando expostas à baixa glicose (2.8 mM). À medida que a concentração de glicose foi aumentando, os animais desnutridos apresentaram secreção de insulina reduzida em relação aos controles.

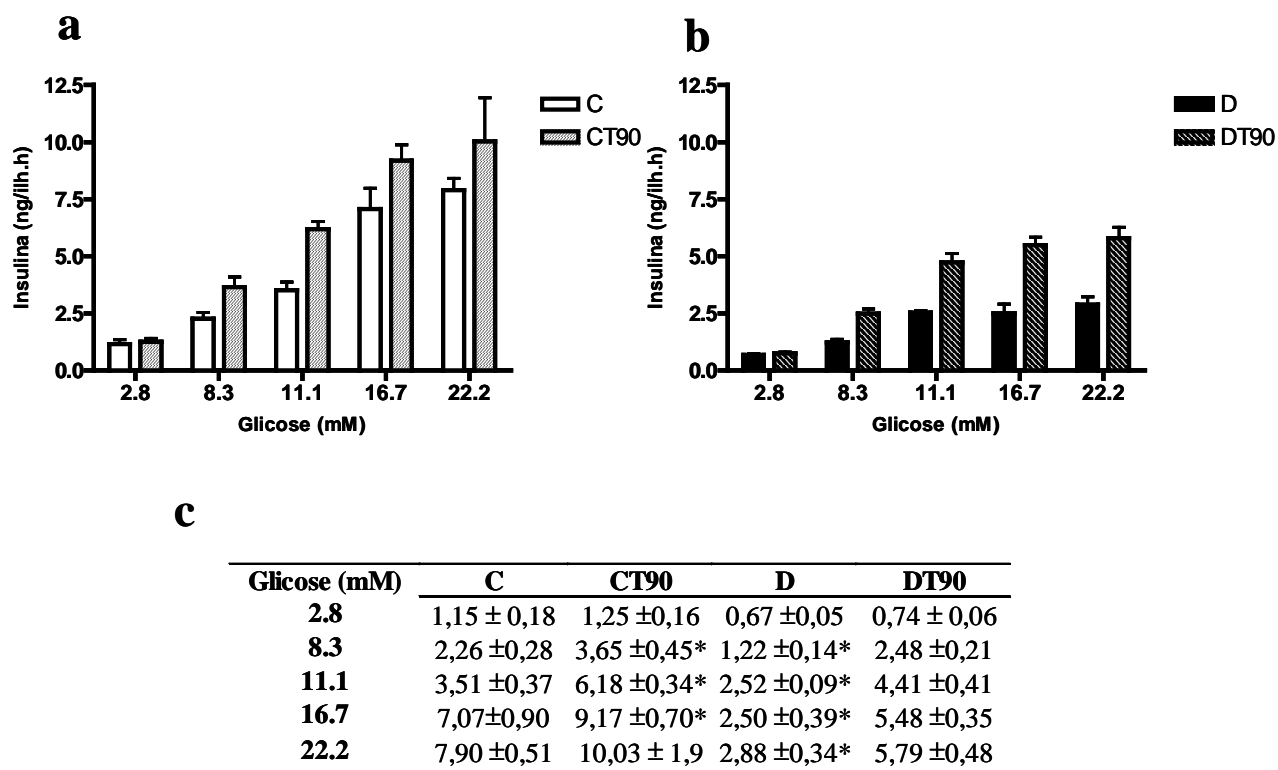


Fig. 6 Secreção estática de insulina de ratos (a) controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), (b) desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6mM de glicose durante 1 h. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 2.8, 8.3, 11.1, 16.7 e 22.2 mM de glicose por 1 h, n = 6-10. (c) valores representam a média ± EPM. * indica diferença estatística em relação a C para cada concentração de glicose P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Nesse caso, foi observado o efeito da suplementação com taurina. No grupo CT90 houve um aumento da secreção de insulina, em relação ao C, nas concentrações de 8.3, 11.1 e 16.7 mM. Os animais desnutridos suplementados com taurina por 3 meses apresentaram um aumento significativo na secreção de insulina, em relação ao grupo D, nas concentrações 8.3, 11.1 e 16.7 mM, retornando ao nível do C. Na concentração mais alta de glicose (22.2 mM), verifica-se somente o efeito do fator dieta, sendo que os animais CT90 não tiveram maior secreção que C e o grupo DT90 se encontrou em nível intermediário entre C e D.

Como o efeito da suplementação com taurina sobre a secreção de insulina foi mais marcante em animais suplementados por 90 dias (CT90 e DT90), resolvemos seguir com as demais investigações da influência da taurina somente nesses animais.

4.2.2 Secreção estática de insulina potencializada por carbacol

Em seguida, resolvemos investigar o papel da via colinérgica em potencializar a secreção induzida pela glicose e sua modulação pela restrição protéica e a suplementação com taurina. Verificamos, então, a secreção de insulina na presença de 11.1mM de glicose e 100 μ M de carbacol (Cch), um agonista colinérgico que se liga a receptores de acetilcolina mimetizando seu efeito. A fig. 7 mostra que os animais do grupo D tiveram menor secreção de insulina em relação ao C. Tanto os animais CT90 quanto DT90, responderam ao carbacol de maneira significativa sendo que a secreção de insulina do grupo DT90 foi a mesma apresentada pelos animais C.

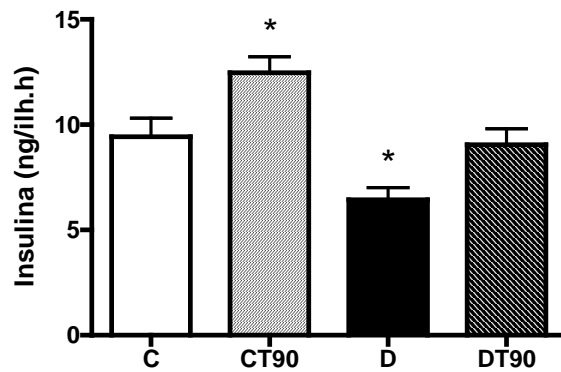


Fig.7 Secreção estática de insulina de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6mM de glicose durante 1 h. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 11.1 mM de glicose e 100 μ M de carbacol por 1 h, n = 12. Os valores representam a média \pm EPM. * indica diferença estatística em relação a C. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

4.3 Vias de sinalização: expressão protéica em ilhotas de ratos

Com o objetivo de identificar os eventos responsáveis pelas alterações na secreção de insulina produzidas pela dieta hipoprotéica e os passos envolvidos na modulação exercida pela suplementação com taurina, conduzimos experimentos para verificar a expressão de proteínas importantes para a funcionalidade da célula beta.

Frente aos resultados obtidos de secreção de insulina potencializada por carbacol, resolvemos também verificar se havia diferença na expressão de alguma proteína envolvida na regulação colinérgica da secreção de insulina. Dessa forma, investigamos a expressão do receptor muscarínico M3, alvo da acetilcolina e primeiro elemento da via de estimulação colinérgica. Como ilustrado na fig. 8, os animais do grupo D tiveram expressão reduzida desse receptor em relação ao C. O grupo CT90 teve um aumento significativo em sua expressão, assim como DT90 que retornou aos níveis de expressão do C. Verificamos então que tanto a dieta hipoprotéica quanto a suplementação com taurina podem modular a expressão do receptor M3. A correlação entre a expressão do M3 com o perfil obtido nos estudos de secreção de insulina sugere a importância dessa etapa inicial sobre a modulação colinérgica da secreção de insulina.

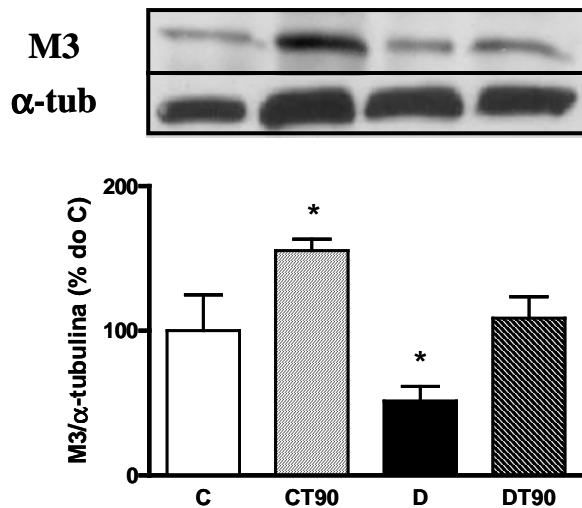


Fig. 8 Expressão protéica do receptor muscarínico M3 em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). Os dados de M3 foram normalizados pela α -tubulina e expressos em porcentagem do controle. Valores representam média \pm EPM da análise densitométrica das bandas ($n = 5$). * indica diferença estatística em relação a C. $P < 0.05$ (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Ainda considerando a via colinérgica, investigamos a expressão da PLC β 2 (fig. 9), enzima que hidrolisa lipídios de membrana, levando ao acúmulo citossólico de IP $_3$ e DAG. Nesse ponto não encontramos diferença de expressão entre os grupos experimentais, ressaltando a importância da regulação da expressão do receptor M3 sobre a sensibilidade das ilhotas a agonistas colinérgicos.

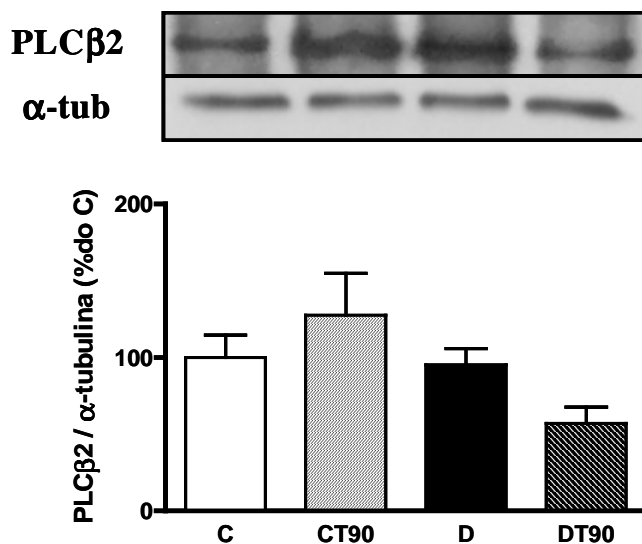


Fig. 9 Expressão protéica da PLCβ2 em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). Os dados de PLCβ2 foram normalizados pela α-tubulina e expressos em porcentagem do controle. Valores representam média ± EPM da análise densitométrica das bandas (n = 4). P > 0.05 (ANOVA Two-Way).

Além do influxo de cálcio extracelular para a célula β mediado pelos canais de cálcio voltagem-dependentes, fase crucial para a exocitose dos grânulos de insulina, o retículo endoplasmático também possui um papel na regulação dos níveis citossólicos de cálcio (Gilon *et al.*, 1999). Sabe-se que as Ca²⁺-ATPases do retículo sarcoendoplasmático (SERCAs) possuem um papel regulador sobre o movimento intracelular de íons Ca²⁺ (Arredouani *et al.*, 2002). Decidimos, portanto, verificar a expressão da SERCA 3 nos grupos experimentais para ver se sua expressão era modulada pelos fatores dieta e suplementação com taurina e se havia alguma correlação com os resultados de secreção de insulina obtidos. A fig. 10 mostra que houve somente um efeito da suplementação com taurina sobre a abundância de SERCA 3. Os animais C e D não mostraram diferença entre si quanto à expressão dessa proteína, enquanto que CT90 e DT90 tiveram um aumento significativo.

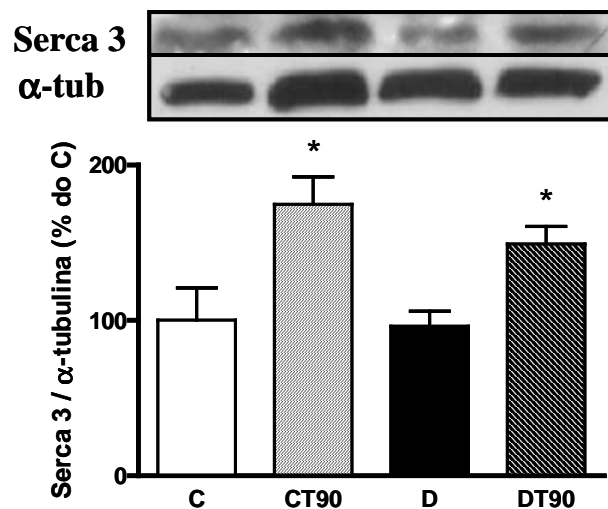


Fig. 10 Expressão protéica da Serca 3 em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). Os dados de Serca 3 foram normalizados pela α -tubulina e expressos em porcentagem do controle. Valores representam média \pm EPM da análise densitométrica das bandas (n = 6). * indica diferença estatística em relação a C. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Finalmente, investigamos a influência da restrição protéica e suplementação com taurina sobre a Sintaxina 1, proteína envolvida na extrusão dos grânulos de insulina, fase final do processo secretório. A fig. 11 mostra que a expressão de Sintaxina 1 foi reduzida nos animais D e normalizada nos animais DT90.

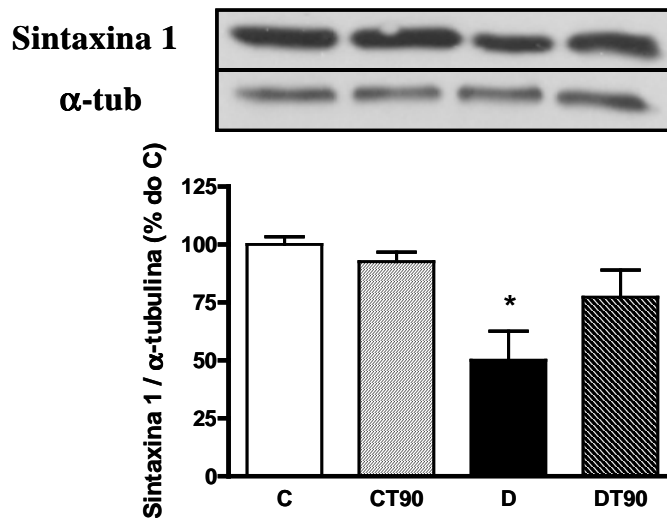


Fig. 11 Expressão protéica da Sintaxina 1 em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). Os dados de Sintaxina 1 foram normalizados pela α -tubulina e expressos em porcentagem do controle. Valores representam média \pm EPM da análise densitométrica das bandas (n = 5). * indica diferença estatística em relação a C. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

4.4 Registro de movimentos citoplasmáticos de íons Ca^{2+} em ilhotas de Langerhans

Tendo em vista a importância dos movimentos de cálcio para a secreção de insulina, decidimos registrar as oscilações citoplasmáticas de cálcio em ilhotas dos grupos C, CT90, D e DT90 frente à estimulação com 16.7mM de glicose .

Assim como ilustrado na fig. 12a, tanto a dieta hipoprotéica, quanto a suplementação com taurina produziram alterações no padrão oscilatório exibido pelas ilhotas. Verificam-se em animais do grupo D oscilações mais rápidas em relação ao C e no grupo DT90 houve uma redução da velocidade dessas oscilações, se aproximando ao padrão apresentado pelos animais C. A alteração do padrão oscilatório ficou mais evidente entre os grupos C e CT90. Nesse caso, ficou claro que a suplementação com taurina promoveu ondas lentas com oscilações rápidas em seu topo, condizente com o padrão de ondas mistas. Uma análise subjetiva também nos permite observar uma redução no tempo entre as oscilações nos grupos que receberam suplementação com

taurina. A fig. 12b mostra a análise da amplitude das oscilações obtidas em cada grupo experimental. Nesse caso, verificamos somente o efeito da dieta com os animais D e DT90 mostrando oscilações com menor amplitude que os animais C e CT90.

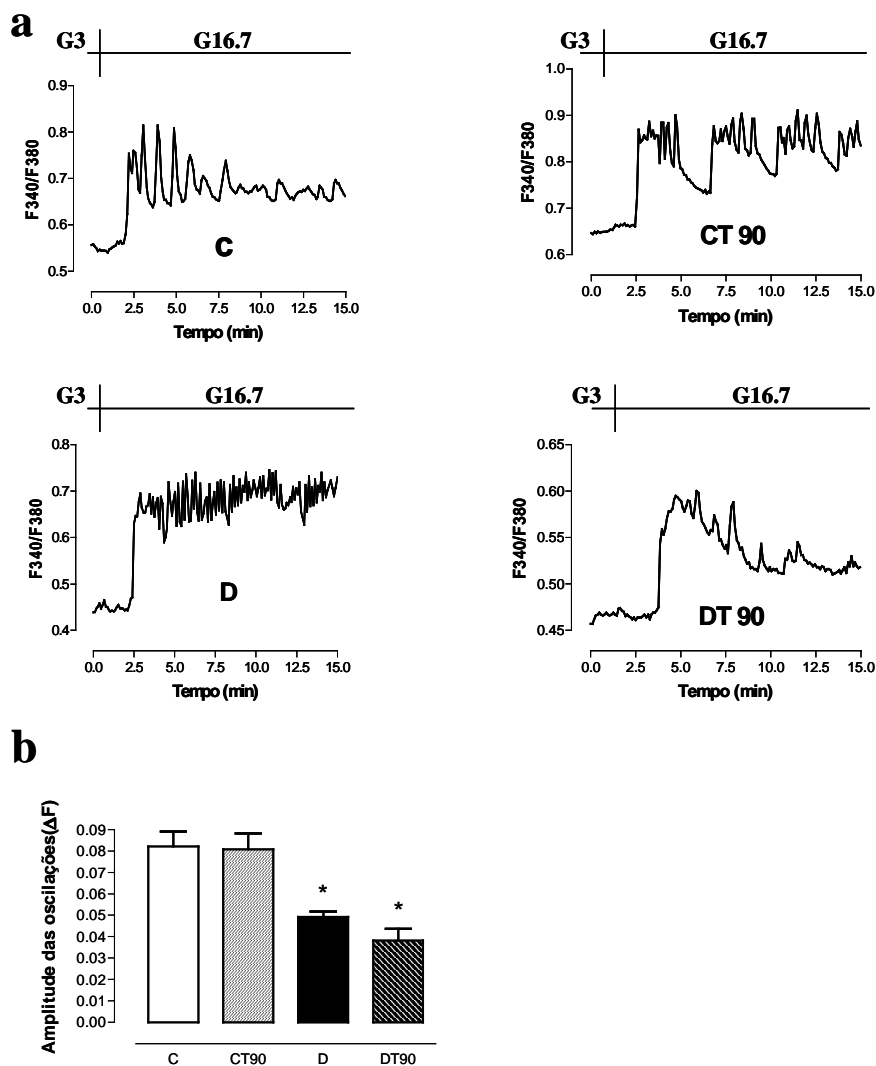


Fig. 12 (a) Mudanças na razão de fluorescência para cálcio intracelular em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). As ilhotas foram pré-incubadas em meio RPMI1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS) por 4 h. Em seguida foram incubadas por 2h em presença de solução de Krebs com $2\mu\text{M}$ de fura-2 AM. Após esse período, as ilhotas foram colocadas na câmara de perfusão e expostas a 3 mM de glicose (G3) e 16.7 mM (G16.7) quando indicado pelas barras superiores. (b) Análise da amplitude das oscilações. Valores representam média \pm EPM da ΔF ($n = 4-8$). * indica diferença estatística em relação a C. $P < 0.05$ (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Além do cálcio extracelular, os depósitos de cálcio do retículo endoplasmático também possuem um papel importante na secreção de insulina estimulada por glicose e outros secretagogos que podem sinalizar para a liberação desses estoques (Zawalich *et al.*, 1995). Resolvemos, então, investigar a capacidade de liberação de cálcio do retículo endoplasmático nas ilhotas dos grupos experimentais. Para tanto, as ilhotas receberam estímulo de 11.1mM de glicose e 100µM de carbacol em solução de Krebs sem cálcio contendo EGTA (10mM) e diazoxida (250µM). A fig. 13a mostra curvas representativas do pico de cálcio emitido com a estimulação com carbacol. Nas figs. 13 b e c podemos observar a análise da amplitude dos picos e da área sob a curva, respectivamente. Nesse experimento houve somente o efeito da dieta hipoprotéica com os animais D e DT90 apresentando menor amplitude e área sob a curva em relação aos grupos C e CT90.

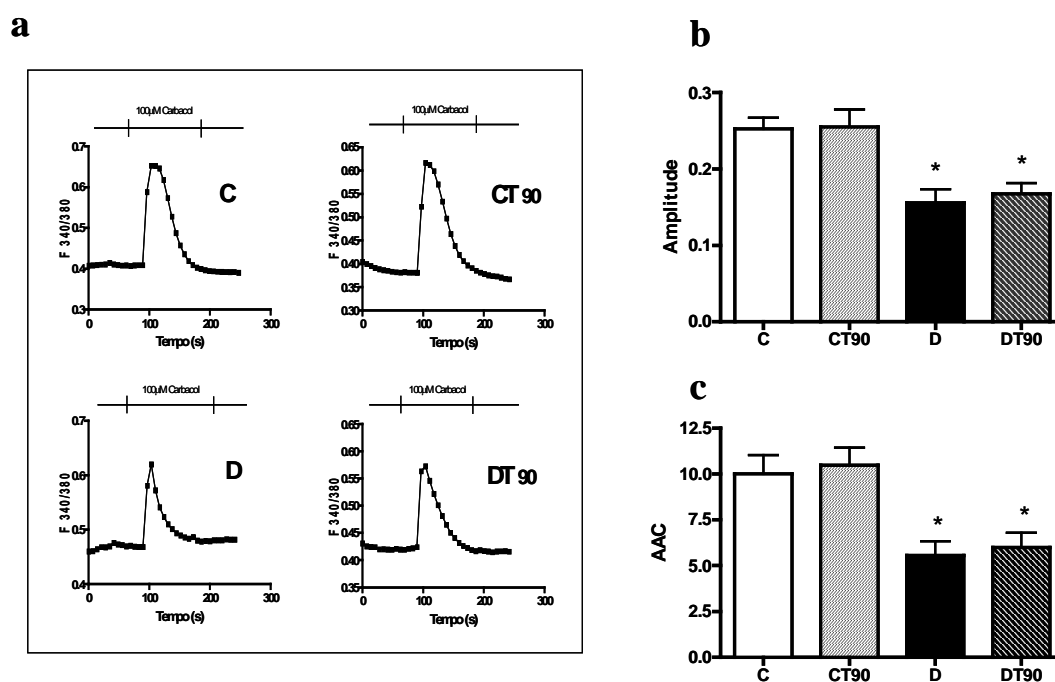


Fig. 13 (a) Mudanças na razão de fluorescência para cálcio intracelular em ilhotas de ratos controle (C), controle suplementados com taurina por 90 dias (CT90), desnutridos (D) e desnutridos suplementados com taurina por 90 dias (DT90). As ilhotas foram pré-incubadas em meio RPMI1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS) por 4 h. Em seguida foram incubadas por 2h em presença de solução de Krebs com 2µM de fura-2 AM. Após esse período, as ilhotas foram colocadas na câmara de perfusão e expostas a solução de Krebs contendo 11.1 mM de glicose, 10 mM de EGTA, 250 µM de diazoxida e livre de cálcio. Quando indicado, as ilhotas foram expostas à mesma solução acrescida de 100 µM de carbacol. **(b)** Análise da amplitude dos picos e **(c)** área abaixo da curva (AAC). Valores representam média ± EPM (n = 6-7). * indica diferença estatística em relação a C. P < 0.05 (ANOVA Two-Way e pós teste de Newman-Keuls).

Discussão

5. Discussão

5.1 Caracterização do modelo experimental

Iniciamos nosso estudo avaliando a influência da restrição protéica sobre parâmetros biométricos e bioquímicos, e se a suplementação com taurina modificaria algum desses parâmetros. Também avaliamos o efeito desses dois fatores sobre a tolerância a glicose.

Verificamos que somente a restrição protéica influenciou a evolução do peso corpóreo dos animais (fig. 1), produzindo uma redução significativa que se intensificou ao longo do período experimental juntamente com redução no peso de todos os órgãos e compartimentos corpóreos avaliados (tab. 4). A redução do crescimento corpóreo é uma das características visuais mais marcantes em animais desnutridos e já foi bem documentada em trabalhos que utilizaram restrição protéica pós-desmame (**Okitolonda et al., 1987; Ferreira et al., 2003; Ferreira et al., 2004; Filiputti et al., 2008**). Outros modelos de desnutrição (intrauterina e durante a lactação) podem produzir efeitos ainda mais marcantes sobre o peso corpóreo de animais submetidos à restrição protéica (**Latorraca et al., 1998; Fagundes et al., 2007**).

As análises bioquímicas plasmáticas (tab. 5) revelaram menor quantidade de albumina e proteínas totais circulantes nos animais que receberam dieta hipoprotéica. Clinicamente a albumina circulante constitui um item fundamental na avaliação do estado nutricional (**Pencharz, 2008**) e a redução de seus valores já foi verificada em modelos de desnutrição (**Ferreira et al., 2003; Ferreira et al., 2004; de Arruda Oliveira et al., 2008; Filiputti et al., 2008**). Em jejum, verificamos que todos os animais apresentam a mesma glicemia e insulinemia. A literatura traz dados de insulinemia que variam desde redução significativa em animais desnutridos até valores semelhantes de insulina plasmática entre os desnutridos e seus controles (**Okitolonda et al., 1987; Ferreira et al., 2003; Ferreira et al., 2004; de Arruda Oliveira et al., 2008**). Essas variações podem ser influenciadas por diferenças entre os protocolos experimentais adotados.

No estado alimentado, verificamos que os animais D apresentam redução na insulina plasmática e a suplementação com taurina corrigiu essa redução nos animais DT90. Esse resultado mostra que quando há uma demanda maior, embora fisiológica, os animais desnutridos não conseguem secretar a mesma quantidade de insulina que o grupo C. A hipoinsulinemia durante o estado alimentado encontrada nos animais D já foi documentada por Reis *et al.*, (2008) e essa situação também foi reproduzida em experimentos conduzidos com ilhotas isoladas expostas a crescentes concentrações de glicose.

Sabe-se que a insulina age no tecido adiposo, por meio da ligação em seu receptor, promovendo maior translocação de GLUT 4 e, conseqüentemente, maior captação de glicose. A sinalização da insulina também inibe as vias relacionadas com lipólise e estimula a lipogênese pela modulação de enzimas chaves para esse processo como: ácido graxo sintase e glicerolfosfato desidrogenase (Spiegelman & Flier, 1996). Considerando esses efeitos anti-lipolíticos da insulina, a hipoinsulinemia encontrada no grupo D pode, em parte, explicar a maior concentração de ácidos graxos livres encontrados no plasma desses animais. Alterações na resposta periférica a insulina também podem contribuir pra esse achado. Holness *et al.*, (1998) mostram que ratos fêmea grávidas desnutridas apresentam menor supressão das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres após infusão de insulina. Em outra série de experimentos conduzidos em adipócitos isolados dos mesmos animais confirma-se o menor efeito anti-lipolítico da insulina, além de maior lipólise estimulada por noradrenalina. Outro estudo realizado com adipócitos da prole de ratos fêmeas submetidas a restrição protéica também mostra menor efeito da insulina sobre a supressão da lipólise. Após estimulação com insulina verificou-se também menor atividade tanto da fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K), quanto da PKB/AKT, duas enzimas-chaves que compõem a via de sinalização da insulina (Ozanne *et al.*, 2000). Maior atividade do sistema nervoso simpático bem como maior nível circulante de catecolaminas também já foram descritos em animais submetidos a restrição protéica (Leon-Quinto *et al.*, 1997; Leon-Quinto *et al.*, 1998).

Verificamos, portanto, que a desnutrição produz importante alteração em parâmetros de estado nutricional e a suplementação com taurina, independente do período

de duração, não influencia o curso dessas modificações, com exceção da preservação da concentração plasmática de insulina no estado alimentado.

Após realização de um ipGTT (figs. 3 e 4), verificamos maior tolerância a glicose nos animais D, efeito já documentado em outros estudos com animais submetidos a restrição protéica (**Escriva *et al.*, 1991**). Para que os desnutridos, que possuem secreção de insulina reduzida, apresentem a mesma glicemia de jejum que os animais controle, sugere-se uma maior sensibilidade a insulina nesses animais, assim como proposto em outros estudos que demonstraram maior fosforilação em tirosina do receptor de insulina (IR), do substrato do receptor de insulina – 1 (IRS-1) (**Filiputti *et al.*, 2006**) e maior associação desta última com a subunidade de 85kDa (p85) da PI3K em músculo e fígado de ratos submetidos ao mesmo protocolo de desnutrição (**Reis *et al.*, 1997**). No grupo de desnutridos suplementados com taurina por 90 dias, observamos uma tendência desses animais a se comportarem da mesma maneira que os controles, mostrando que a taurina possivelmente não atue somente nos mecanismos de secreção de insulina mas tenha um papel regulador sobre a homeostase glicêmica nesse modelo animal.

A restrição protéica produz, portanto, alterações expressivas no estado nutricional dos animais, refletidas pela redução do crescimento corpóreo e de órgãos, pela redução de proteínas totais e albumina plasmáticas e pelo aumento dos ácidos graxos circulantes, sem efeito da suplementação com taurina. Os animais desnutridos apresentaram ainda hipoinsulinemia no estado alimentado e aumento compensatório da tolerância a glicose, efeitos corrigidos pela suplementação com taurina.

5.2 Secreção de insulina

Nos experimentos de secreção de insulina utilizando ilhotas isoladas verificamos menor resposta das ilhotas dos animais D em todas as concentrações estimulatórias de glicose testadas (figs. 5 e 6). Estudos realizados por nosso grupo e por outros laboratórios vem mostrando o impacto da restrição protéica sobre a funcionalidade das ilhotas de Langerhans. Hoje sabemos que etapas fundamentais para a secreção de insulina, envolvendo o metabolismo e a função da célula β , se encontram modificadas em animais que sofreram restrição protéica em algum momento da vida. Entre os mecanismos

propostos para a menor responsividade dessas células estão: menor expressão de glicocinase (Desai *et al.*, 1995), PDX-1 (Arantes *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2004), glicerolfosfato desidrogenase (Rasschaert *et al.*, 1995), PKA α (Milanski *et al.*, 2005), PKC α (Ferreira *et al.*, 2003) e S6K-1 (Filiputti *et al.*, 2008), menor mobilização de íons cálcio (Latorraca *et al.*, 1999) e alterações no processo de extrusão dos grânulos de insulina (Cherif *et al.*, 2001).

A suplementação com taurina foi capaz de aumentar a secreção de insulina tanto nos animais controle quanto nos desnutridos (fig. 6). Esse efeito foi verificado somente nos animais que receberam suplementação juntamente com o início da dieta (CT90 e DT90). Com base nesses resultados e nos achados de Cherif *et al.* (1998), em que é verificada a recuperação da secreção de insulina em ilhotas de fetos de ratos fêmeas prenhes suplementadas com taurina a 2,5% durante o período de gestação, sugerimos que a taurina exerça uma ação protetora sobre os possíveis danos no mecanismo de secreção de insulina estabelecidos no quadro de desnutrição protéica em ratos. Tanto a fase de crescimento intrauterina quanto os estágios iniciais de vida são fundamentais para o desenvolvimento e maturação do pâncreas endócrino (Remacle *et al.*, 2007). Estudos conduzidos em fetos que passaram por restrição protéica durante a fase de gestação, verificaram menor tamanho e vascularização das ilhotas (Snoeck *et al.*, 1990), menor taxa de replicação devido a alterações em proteínas envolvidas no ciclo celular (Petrik *et al.*, 1999) e maior taxa de apoptose (Boujendar *et al.*, 2002). E quando as ilhotas desses animais foram removidas do meio metabolicamente desfavorável e cultivadas por 7 dias em meio com disponibilidade adequada de nutrientes, essas características ainda estavam presentes (Dahri *et al.*, 1995). Todas essas evidências sugerem que distúrbios no meio intrauterino, como no caso da restrição protéica, podem comprometer permanentemente o desenvolvimento e função das ilhotas pancreáticas.

Nesse trabalho podemos observar que com o início da suplementação com taurina no animal ainda na fase de desmame, obteve-se maior preservação da funcionalidade das ilhotas de Langerhans de ratos desnutridos. Reusens *et al.* (2008), utilizando técnicas de microarray, verificaram que ilhotas de fetos de ratos fêmeas submetidas à restrição protéica durante a gestação apresentaram alteração na expressão de 10% dos 10.346 genes estudados. Entre os genes modulados, se encontram marcadores de processos

fundamentais para as células beta como: proliferação celular, produção de energia, defesa antioxidante e metabolismo mitocondrial. A redução da expressão de genes envolvidos na proliferação celular e defesa antioxidante podem explicar observações anteriores de maior suscetibilidade a citocinas e menor taxa de proliferação celular (**Petrik *et al.*, 1999**; **Merezak *et al.*, 2004**). No mesmo estudo foi verificado, ainda, que a suplementação com taurina normalizou todos os genes estudados em relação aos animais que receberam dieta normoprotéica. Dessa forma, podemos concluir que além da série de funções fisiológicas já atribuídas a taurina (**Huxtable, 1992**), a regulação da expressão gênica parece ser um importante mecanismo pelo qual esse aminoácido consegue modular a função das células beta.

Além da secreção de insulina estimulada por glicose, observamos menor resposta das ilhotas de animais desnutridos quando estimuladas com carbacol e a suplementação com taurina aumentou a resposta à estimulação colinérgica tanto das ilhotas controle quando das provenientes de animais desnutridos (fig. 7). Estudos conduzidos em ratos submetidos a restrição protéica mostram uma alteração do funcionamento do sistema nervoso autonômico. Foi registrada menor atividade de fibras nervosas parassimpáticas e maior atividade de fibras simpáticas, juntamente com maiores níveis circulantes de catecolaminas em animais desnutridos (**Leon-Quinto *et al.*, 1997**; **Leon-Quinto *et al.*, 1998**). Testes clínicos conduzidos em crianças desnutridas também revelaram distúrbios do sistema nervoso autonômico (**Bedi *et al.*, 1999**). Além da menor responsividade a glicose, nosso estudo mostra menor resposta dos animais desnutridos a estimulação colinérgica, sugerindo o comprometimento de elementos dessa via nesses animais. Verificamos, ainda, que a suplementação com taurina foi capaz de normalizar a secreção nos animais que receberam dieta hipoprotéica (DT90). A menor resposta secretória de ilhotas isoladas de ratos desnutridos frente ao carbacol, encontrada nesse trabalho, também foi descrita em ratos desnutridos pós-desmame (**Ferreira *et al.*, 2003**) e durante a fase de lactação (**Gravena *et al.*, 2007**).

Verificamos então menor resposta secretória em ilhotas de animais que sofreram restrição protéica e a suplementação com taurina mostrou-se uma estratégia eficaz para restabelecer a funcionalidade desse tecido.

5.3 Vias de sinalização

Iniciamos nossos estudos moleculares investigando a expressão protéica de elementos que compõem a via colinérgica de potencialização da secreção de insulina. Nossos resultados mostram modulação tanto da restrição protéica quanto da suplementação com taurina sobre a expressão do receptor muscarínico M3 (fig. 8) e a expressão da PLC β 2 (fig. 9), passo seguinte da via, não foi modulada por nenhum dos 2 fatores.

Entre os tipos de receptores muscarínicos, o receptor M3 certamente é o mais relevante para o controle da secreção de insulina. Estudos de deleção desse receptor mostram redução expressiva da secreção de insulina estimulada por agonistas colinérgicos acompanhada da menor produção de fosfatidilinositol, um subproduto da sinalização do M3 (**Boschero *et al.*, 1995; Duttaroy *et al.*, 2004; Gautam *et al.*, 2006; Gautam *et al.*, 2007**).

Além de controlar a secreção de insulina, o receptor M3 tem um papel importante na regulação da homeostase glicêmica. Camundongos deficientes desse receptor apresentam reduzido peso corpóreo, maior tolerância a glicose, maior sensibilidade a insulina e níveis circulantes reduzidos desse hormônio (**Yamada *et al.*, 2001; Duttaroy *et al.*, 2004**). Esses efeitos se assemelham às características apresentadas por animais submetidos a restrição protéica (**Picarel-Blanchot *et al.*, 1995; Filiputti *et al.*, 2008**) sendo possível que nesse modelo experimental, a sinalização do M3 também esteja prejudicada de maneira sistêmica. Dados de nosso grupo também mostram a redução de expressão do receptor M3 em camundongos submetidos a restrição protéica e que a suplementação com leucina normalizou a expressão dessa proteína, assim como a resposta secretória frente ao carbacol (**Amaral, 2008**).

Até o momento já foram documentados três grupos de PLC (β , γ e δ) que ainda se dividem em subgrupos. Todas os tipo de PLC catalisam a hidrólise de lípidios de membrana. Porém cada grupo possui uma maneira distinta de ativação. Acredita-se que, em células beta, a produção de IP₃ e DAG induzida por agonistas colinérgicos seja mediada pela PLC β . No entanto, não se sabe qual subtipo (β 1, β 2 ou β 3) se encontra ancorada ao receptor muscarínico (**Gilon & Henquin, 2001**). Em nosso estudo, não encontramos diferença na expressão da PLC β 2 em nenhum dos grupos experimentais.

Ferreira et al (2003), mostram menor expressão da PKC α e PLC β 1 juntamente com reduzida secreção de insulina estimulada por carbacol e PMA, um ativador da PKC, em ratos submetidos a restrição protéica pós-desmame. Esses resultados sugerem que a PLC β 1 possivelmente tenha maior importância sobre a estimulação colinérgica da secreção de insulina.

A literatura carece de dados sobre a interação da taurina com elementos da via colinérgica em células beta. Sabe-se que em células neuronais, a ativação de receptores colinérgicos potencializa o efluxo celular de taurina (Foster *et al.*, 2009). Esses achados têm relevância para o controle do volume celular em condições de estresse osmótico, uma das funções fisiológicas já atribuídas a taurina (Huxtable, 1992). Takii et al (2006) mostram que as células beta quando expostas a meio hipotônico, aumentam seu volume celular. Esse aumento ativa correntes de cátions que levam à despolarização da membrana e à abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes com conseqüente secreção de insulina. O papel fisiológico dessa relação do efluxo de taurina com receptores muscarínicos e se existe algum efeito sobre a secreção de insulina ainda deve ser melhor esclarecida. Outra forma de a taurina modular a sinalização colinérgica é pela modificação da composição da membrana plasmática. Hamaguchi et al. (1991), trabalhando com coração de ratos, descobriram que a taurina é capaz de inibir a atividade de metiltransferases que catalisam a metilação de fosfolipídios de membrana. Esse efeito resulta no aumento da razão entre fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilcolina (PC), alterando a fluidez da membrana e a atividade de proteínas ancoradas nessa estrutura. A taurina pode, portanto, alterar a proporção de produtos finais das fosfolipases associadas à estimulação colinérgica bem como de outros intermediários que compõem a via.

Além do aumento da expressão do receptor M3, outros dados de nosso grupo também mostram o aumento da expressão da PLC β em ilhotas de camundongos suplementados com taurina a 2% na água de beber (Ribeiro, 2009). O aumento da expressão de proteínas que compõem a via colinérgica parece ser, portanto, um dos mecanismos pelos quais a suplementação com taurina aumenta a secreção de insulina potencializada pelo carbacol.

O IP₃ derivado da hidrólise de lipídios de membrana se liga em seus receptores (IP₃Rs) na membrana do retículo endoplasmático que por sua vez promovem o efluxo do

cálcio reticular (**Gilon & Henquin, 2001**). Após liberação de Ca^{2+} , esse íon é captado de volta às cisternas reticulares por transporte ativo mediado pelas Ca^{2+} -ATPases do retículo sarcoendoplasmático (SERCAs). Em ilhotas de Langerhans se identificam a SERCA 2b e três isoformas de SERCA 3 (a, b e c) (**Varadi et al., 1996; Chen et al., 2003**). Em nosso estudo observamos que a suplementação com taurina aumentou a expressão da SERCA 3 nas ilhotas dos animais CT90 e DT90 (fig. 10).

Sabe-se que em modelos animais de diabetes tipo 2, a resposta das oscilações de cálcio induzidas por glicose se encontram reduzidas (**Marie et al., 2001**). A menor atividade da SERCA 3 já foi documentada em ratos tornados diabéticos por injeção de streptozotocina durante a fase neonatal (**Levy et al., 1998**), em ratos diabéticos Goto-Kakizaki (**Varadi et al., 1996**), em ratos 90% pancreatectomizados (**Jonas et al., 1999**) e em camundongos *db/db*, a atividade tanto da SERCA 2 quanto SERCA 3 se mostraram reduzidas (**Roe et al., 1994**).

Além da função de captação de cálcio para o retículo, as SERCAs também já foram relacionadas com a regulação dos movimentos de cálcio induzidos por despolarização. Ilhotas de camundongos, quando estimuladas com 6-8mM de glicose, apresentam um padrão misto de oscilações de cálcio, caracterizadas por oscilações rápidas no topo de oscilações lentas. Beauvois et al (**2006**) verificaram que em ilhotas de camundongos *knockout* para a SERCA3 (SERCA3 *-/-*) esse padrão é perdido. As variações do potencial de membrana também foram registradas nos dois tipos de ilhotas (selvagem e SERCA3 *-/-*) e observou-se sincronia dessas variações com o padrão oscilatório apresentado. Evidencia-se, então, o papel da SERCA3 na modulação tanto da atividade elétrica quanto no padrão oscilatório de íons Ca^{2+} em ilhotas de Langerhans.

O papel direto da SERCA 3 sobre a secreção de insulina ainda deve ser melhor estabelecido e, no entanto, é importante ressaltar a relevância do retículo endoplasmático sobre a síntese, modificações e dobramentos de proteínas e que todos esses processos são afetados pela $[\text{Ca}^{2+}]$ dentro dessa organela (**Guest et al., 1997; Corbett & Michalak, 2000; Eizirik et al., 2008**).

Estudos realizados com linhagens de células β pancreáticas de camundongos não responsivas a glicose (MIN6-m14) mostram que a incapacidade dessas células de secretarem insulina se deve à concentração constitutivamente alta de cálcio no espaço

citossólico e quando esses níveis foram corrigidos pelo tratamento com nifedipina, um bloqueador de canais de cálcio voltagem-dependentes, a resposta secretória dessas células foi restaurada (**Minami et al., 2002**). Esses resultados ressaltam a importância de se manter uma concentração ótima de cálcio intracelular seja por trocas com o meio extracelular, seja pelo armazenamento no retículo endoplasmático.

Finalmente, testamos a hipótese de a taurina exercer seus efeitos sobre a secreção de insulina pela modulação de elementos que compõem a etapa final do processo secretório, a extrusão dos grânulos contendo insulina.

A extrusão dos grânulos de insulina bem como a expressão de proteínas que compõem a maquinaria exocitótica se encontram reduzidos em ilhotas de humanos com diabetes tipo 2 (**Ostenson et al., 2006**) e em modelos animais de diabetes (**Nagamatsu et al., 1999**). Entre essas proteínas está a syntaxina 1, uma proteína pertencente à família de receptores de proteínas solúveis ligantes a proteínas de fusão sensíveis a N-etilmaleimida (SNARE). Essa proteína se encontra ancorada à membrana plasmática e se associa à SNAP-25, outra proteína da família SNARE, que quando se associam à VAMP, localizada no grânulo contendo insulina, permitem o ancoramento desses grânulos e posterior exocitose de seu conteúdo (**Ozanne et al., 2000**). Um estudo realizado com células beta isoladas e permeabilizadas mostrou que o tratamento com anticorpos anti-SNAP-25 e anti-syntaxina 1, reduziram a exocitose dos grânulos contendo insulina (**Vikman et al., 2006**). Em nosso estudo, verificamos menor expressão da syntaxina 1A nas ilhotas dos animais D e recuperação no grupo DT90 (fig. 11). **Cheriff et al. (2001)**, já sugeriram que um dos possíveis mecanismos pelos quais a restrição protéica reduz a secreção de insulina seria o comprometimento de elementos da maquinaria de extrusão.

Em nosso trabalho mostramos que tanto a sinalização colinérgica quanto a extrusão de grânulos contendo insulina possam estar comprometidos nos animais desnutridos e a suplementação com taurina foi capaz de normalizar esses eventos. Adicionalmente, a taurina pode influenciar a dinâmica de cálcio dentro da célula β ao aumentar a expressão de ATPases mediadoras da captação ativa de Ca^{2+} para o interior do retículo endoplasmático. Estudos de genômica e proteômica em ilhotas de animais submetidos à restrição protéica apontam para o comprometimento de uma série de elementos estruturais e sinalizadores que culminam na redução da funcionalidade das

células β desses animais (Sparre *et al.*, 2003; Reusens *et al.*, 2008). Visto o amplo espectro de possibilidades abertas por esses estudos, a identificação dos principais eventos moleculares modulados pela restrição protéica torna-se uma importante, porém desafiadora, tarefa para a melhor compreensão da regulação nutricional da expressão gênica e protéica.

5.4 Movimento citoplasmático de íons Ca^{2+}

A etapa final de nossa análise sobre o efeito da restrição protéica sobre a funcionalidade das ilhotas de Langerhans e a influência da suplementação com taurina consistiu no registro dos movimentos citoplasmáticos de íons Ca^{2+} após estímulo com glicose (fig. 12) e carbacol (fig. 13). De uma maneira geral, a glicose (16.7 mM) induziu oscilações de cálcio que foram mais freqüentes nas ilhotas dos animais D. A suplementação com taurina promoveu redução na frequência dessas oscilações nos animais DT90 enquanto que as ilhotas dos animais CT90 apresentaram um padrão de oscilações mistas. A amplitude das oscilações foi menor em ambos os grupos de animais desnutridos.

Os movimentos de cálcio na célula beta, oriundos da despolarização da membrana plasmática que ocorre em função do fechamento dos canais de K^+ dependentes de ATP, constituem um ponto de convergência para o acoplamento entre os sinais metabólicos gerados pela glicólise com a exocitose dos grânulos de insulina (Ashcroft & Rorsman, 1989). O influxo de cálcio para a célula beta ocorre principalmente via canais de cálcio voltagem-dependentes e obedece a um padrão oscilatório que pode se apresentar de duas formas: lento e rápido. Um terceiro padrão misto caracterizado por oscilações rápidas superpostas em ondas lentas também pode ser observado (Valdeolmillos *et al.*, 1989). Em humanos já foi visto que a secreção de insulina ocorre de forma pulsátil e quando esse hormônio é administrado dessa forma em indivíduos diabéticos, seu efeito hipoglicemiante é mais eficiente (Paolisso *et al.*, 1988). A secreção pulsátil de insulina é acompanhada por oscilações sincrônicas de cálcio intracelular (Gilon & Henquin, 1995). O padrão de oscilações lentas de cálcio se correlacionam melhor com a dinâmica de secreção de insulina observada em humanos (Lang *et al.*, 1979; Nadal *et al.*, 1994) e a

perda desse padrão já foi associada com o desenvolvimento de diabetes mellitus (**O'Rahilly et al., 1988**). Dessa forma podemos associar as oscilações apresentadas pelos animais suplementados com taurina com um padrão mais fisiológico em comparação com o apresentado pelos animais que receberam somente a dieta hipoprotéica. O efeito da taurina de reduzir a frequência das oscilações de cálcio bem como de aumentar sua amplitude já foi descrito em ilhotas de camundongos que receberam suplementação desse aminoácido (**Carneiro et al., 2008**). Esse último efeito, no entanto, não ficou evidente em nossos registros.

Após a avaliação do perfil oscilatório promovido pela glicose, avaliamos a capacidade das ilhotas de liberarem cálcio do retículo endoplasmático após estimulação com carbacol. Podemos observar o efeito da restrição protéica produzindo um pico de liberação com menor área e amplitude sem efeito da suplementação com taurina. Esses resultados sugerem que os estoques de cálcio em animais que receberam dieta hipoprotéica podem estar reduzidos. Esse achado deve, no entanto, ser analisado com cautela, visto que em nosso estudo e em outros relatos da literatura (**Ferreira et al., 2003**) fica evidenciado o comprometimento de elementos da via colinérgica em animais desnutridos. Dessa forma, a menor liberação encontrada nos desnutridos poderia ser devida à menor expressão do receptor M3, porém se esse fosse o caso, os animais tratados com taurina deveriam apresentar maior liberação de cálcio visto que houve melhoria na expressão desse receptor nesses animais bem como na secreção de insulina potencializada por carbacol.

Uma possibilidade seria a suplementação com taurina influenciar também eventos posteriores a liberação de cálcio, como a expressão de PKC, PKA ou em proteínas envolvidas diretamente no processo de extrusão dos grânulos de insulina. Nesse trabalho mostramos que animais desnutridos têm menor expressão de syntaxina 1, sugerindo comprometimento do mecanismo de extrusão de grânulos e esse efeito foi corrigido pela suplementação com taurina. Dados de nosso laboratório mostram, ainda, o aumento da expressão da PKA em ilhotas de camundongos suplementados com taurina a 2% na água de beber (**Ribeiro, 2009**).

Nossos resultados mostram que a suplementação com taurina foi capaz de normalizar os movimentos de cálcio observados em animais desnutridos além de produzir

uma mudança adicional no padrão oscilatório nas ilhotas dos animais CT90, ressaltando a capacidade desse aminoácido de interagir com a dinâmica do fluxo celular de íons Ca^{2+} que talvez seja funcionalmente mais relevante do que o tamanho dos estoques intracelulares de Ca^{2+} .

Conclusões

6. Conclusões

Com os resultados obtidos, podemos concluir que a restrição protéica pós-desmame influencia no desenvolvimento da massa corpórea bem como de órgãos e tecidos e a hipoinsulinemia encontrada no estado alimentado foi corrigida pela suplementação com taurina. A taurina também corrigiu parcialmente a maior tolerância compensatória a glicose exibida pelos animais desnutridos.

A suplementação com taurina por 90 dias normalizou, ainda, a sensibilidade das ilhotas dos animais desnutridos a glicose e agentes potencializadores da secreção e seu efeito sobre a secreção de insulina também se manifestou em animais que receberam dieta normoprotéica.

O efeito da suplementação com taurina sobre a funcionalidade da célula β pode ser explicada pelo aumento da expressão das proteínas SERCA3, receptor muscarínico M3 e Sintaxina 1 bem como pela mudança no padrão oscilatório de íons Ca^{2+} que sugerem maior influxo e conseqüentemente maior resposta secretória.

Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

- Aerts L & Van Assche FA (2002) Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period. *J Perinat Med* **30**, 281-286.
- Arantes VC, Teixeira VP, Reis MA, Latorraca MQ, Leite AR, Carneiro EM, Yamada AT & Boschero AC (2002) Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. *J Nutr* **132**, 3030-3035.
- Araujo EP, Amaral ME, Filiputti E, De Souza CT, Laurito TL, Augusto VD, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA & Carneiro EM (2004) Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Endocrinol* **181**, 25-38.
- Arredouani A, Guiot Y, Jonas JC, Liu LH, Nenquin M, Pertusa JA, Rahier J, Rolland JF, Shull GE, Stevens M, Wuytack F, Henquin JC & Gilon P (2002) SERCA3 ablation does not impair insulin secretion but suggests distinct roles of different sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+) pumps for Ca(2+) homeostasis in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **51**, 3245-3253.
- Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Ammala C, Bokvist K & Rorsman P (1994) Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* **55 Suppl**, 54-65.
- Ashcroft FM & Rorsman P (1989) Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* **54**, 87-143.
- Beauvois MC, Merezak C, Jonas JC, Ravier MA, Henquin JC & Gilon P (2006) Glucose-induced mixed [Ca²⁺]_i oscillations in mouse beta-cells are controlled by the membrane potential and the SERCA3 Ca²⁺-ATPase of the endoplasmic reticulum. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C1503-1511.
- Bedi M, Babbar R, Chakrabarty AS & Sachdev HP (1999) Comparative study of autonomic nervous system activity in malnourished and normal children in India. *Ann Trop Paediatr* **19**, 185-189.
- Blachier F, Mourtada A, Sener A & Malaisse WJ (1989) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Uptake of metabolized and nonmetabolized cationic amino acids by pancreatic islets. *Endocrinology* **124**, 134-141.
- Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E & Atwater I (1995) Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol* **268**, E336-342.
- Boujendar S, Reusens B, Merezak S, Ahn MT, Arany E, Hill D & Remacle C (2002) Taurine supplementation to a low protein diet during foetal and early postnatal life restores a normal proliferation and apoptosis of rat pancreatic islets. *Diabetologia* **45**, 856-866.
- Bustamante J, Lobo MV, Alonso FJ, Mukala NT, Gine E, Solis JM, Tamarit-Rodriguez J & Martin Del Rio R (2001) An osmotic-sensitive taurine pool is localized in rat pancreatic islet cells containing glucagon and somatostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E1275-1285.

- Carneiro EM, Latorraca MQ, Araujo E, Beltra M, Oliveras MJ, Navarro M, Berna G, Bedoya FJ, Velloso LA, Soria B & Martin F (2008) Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *J Nutr Biochem*.
- Chen L, Koh DS & Hille B (2003) Dynamics of calcium clearance in mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* **52**, 1723-1731.
- Cherif H, Reusens B, Ahn MT, Hoet JJ & Remacle C (1998) Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet. *J Endocrinol* **159**, 341-348.
- Cherif H, Reusens B, Dahri S & Remacle C (2001) A protein-restricted diet during pregnancy alters in vitro insulin secretion from islets of fetal Wistar rats. *J Nutr* **131**, 1555-1559.
- Cianfarani S, Germani D & Branca F (1999) Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **81**, F71-73.
- Cianfarani S, Germani D, Rossi P, Rossi L, Germani A, Ossicini C, Zuppa A, Argiro G, Holly JM & Branca F (1998) Intrauterine growth retardation: evidence for the activation of the insulin-like growth factor (IGF)-related growth-promoting machinery and the presence of a cation-independent IGF binding protein-3 proteolytic activity by two months of life. *Pediatr Res* **44**, 374-380.
- Corbett EF & Michalak M (2000) Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem Sci* **25**, 307-311.
- Dahri S, Reusens B, Remacle C & Hoet JJ (1995) Nutritional influences on pancreatic development and potential links with non-insulin-dependent diabetes. *Proc Nutr Soc* **54**, 345-356.
- de Arruda Oliveira E, Gomes Cheim LM, Veloso RV, Arantes VC, Reis MA, Carneiro EM, Boschero AC & Latorraca MQ (2008) Nutritional recovery with a soybean flour diet improves the insulin response to a glucose load without modifying glucose homeostasis. *Nutrition* **24**, 76-83.
- de Barros Reis MA, Arantes VC, Cunha DA, Latorraca MQ, Toyama MH, Carneiro EM & Boschero AC (2008) Increased L-CPT-1 activity and altered gene expression in pancreatic islets of malnourished adult rats: a possible relationship between elevated free fatty acid levels and impaired insulin secretion. *J Nutr Biochem* **19**, 85-90.
- Desai M, Crowther NJ, Ozanne SE, Lucas A & Hales CN (1995) Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans* **23**, 331-335.
- Dura E, Jijakli H, Zhang HX, Oguzhan B, Sener A & Malaisse WJ (2002) Insulinotropic action of amino acids at their physiological concentrations: I. Experiments in incubated islets. *Int J Mol Med* **9**, 527-531.
- Duttaroy A, Zimlikli CL, Gautam D, Cui Y, Mears D & Wess J (2004) Muscarinic stimulation of pancreatic insulin and glucagon release is abolished in m3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Diabetes* **53**, 1714-1720.
- Eizirik DL, Cardozo AK & Cnop M (2008) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* **29**, 42-61.
- Escriva F, Kergoat M, Bailbe D, Pascual-Leone AM & Portha B (1991) Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. *Diabetologia* **34**, 559-564.

- Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trevenzoli IH, Garcia RM & Lisboa PC (2007) Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr* **98**, 922-928.
- Ferreira F, Barbosa HC, Stoppiglia LF, Delghingaro-Augusto V, Pereira EA, Boschero AC & Carneiro EM (2004) Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA α expression. *J Nutr* **134**, 63-67.
- Ferreira F, Filiputti E, Arantes VC, Stoppiglia LF, Araujo EP, Delghingaro-Augusto V, Latorraca MQ, Toyama MH, Boschero AC & Carneiro EM (2003) Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase calpha expression. *J Nutr* **133**, 695-699.
- Filiputti E, Ferreira F, Souza KL, Stoppiglia LF, Arantes VC, Boschero AC & Carneiro EM (2008) Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. *Life Sci* **82**, 542-548.
- Floyd JC, Jr., Fajans SS, Knopf RF & Conn JW (1963) Evidence That Insulin Release Is the Mechanism for Experimentally Induced Leucine Hypoglycemia in Man. *J Clin Invest* **42**, 1714-1719.
- Foster DJ, Vitvitsky VM, Banerjee R, Heacock AM & Fisher SK (2009) Muscarinic receptor regulation of osmosensitive taurine transport in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* **108**, 437-449.
- Gao Z, Young RA, Li G, Najafi H, Buettger C, Sukumvanich SS, Wong RK, Wolf BA & Matschinsky FM (2003) Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* **144**, 1949-1957.
- Gautam D, Han SJ, Duttaroy A, Mears D, Hamdan FF, Li JH, Cui Y, Jeon J & Wess J (2007) Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor in beta-cell function and glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab* **9 Suppl 2**, 158-169.
- Gautam D, Han SJ, Hamdan FF, Jeon J, Li B, Li JH, Cui Y, Mears D, Lu H, Deng C, Heard T & Wess J (2006) A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. *Cell Metab* **3**, 449-461.
- Gauthier BR & Wollheim CB (2008) Synaptotagmins bind calcium to release insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E1279-1286.
- Gerber SH & Sudhof TC (2002) Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S3-11.
- Gilon P, Arredouani A, Gailly P, Gromada J & Henquin JC (1999) Uptake and release of Ca²⁺ by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic Ca²⁺ concentration triggered by Ca²⁺ influx in the electrically excitable pancreatic B-cell. *J Biol Chem* **274**, 20197-20205.
- Gilon P & Henquin JC (1995) Distinct effects of glucose on the synchronous oscillations of insulin release and cytoplasmic Ca²⁺ concentration measured simultaneously in single mouse islets. *Endocrinology* **136**, 5725-5730.
- Gilon P & Henquin JC (2001) Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* **22**, 565-604.

- Gravena C, Andreazzi AE, Mecabo FT, Grassioli S, Scantamburlo VM & Mathias PC (2007) Protein restriction during lactation alters the autonomic nervous system control on glucose-induced insulin secretion in adult rats. *Nutr Neurosci* **10**, 79-87.
- Guest PC, Bailyes EM & Hutton JC (1997) Endoplasmic reticulum Ca²⁺ is important for the proteolytic processing and intracellular transport of proinsulin in the pancreatic beta-cell. *Biochem J* **323** (Pt 2), 445-450.
- Gustavsson N, Wei SH, Hoang DN, Lao Y, Zhang Q, Radda GK, Rorsman P, Sudhof TC & Han W (2009) Synaptotagmin-7 is a principal Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-induced glucagon exocytosis in pancreas. *J Physiol* **587**, 1169-1178.
- Hales CN & Barker DJ (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**, 595-601.
- Hamaguchi T, Azuma J & Schaffer S (1991) Interaction of taurine with methionine: inhibition of myocardial phospholipid methyltransferase. *J Cardiovasc Pharmacol* **18**, 224-230.
- Hansen L, Urioste S, Petersen HV, Jensen JN, Eiberg H, Barbetti F, Serup P, Hansen T & Pedersen O (2000) Missense mutations in the human insulin promoter factor-1 gene and their relation to maturity-onset diabetes of the young and late-onset type 2 diabetes mellitus in caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 1323-1326.
- Henquin JC (1980) Metabolic control of potassium permeability in pancreatic islet cells. *Biochem J* **186**, 541-550.
- Henquin JC & Meissner HP (1981) Effects of amino acids on membrane potential and 86Rb⁺ fluxes in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol* **240**, E245-252.
- Herchuelz A, Lebrun P, Boschero AC & Malaisse WJ (1984) Mechanism of arginine-stimulated Ca²⁺ influx into pancreatic B cell. *Am J Physiol* **246**, E38-43.
- Hermans MP, Schmeer W & Henquin JC (1987) Modulation of the effect of acetylcholine on insulin release by the membrane potential of B cells. *Endocrinology* **120**, 1765-1773.
- Holness MJ, Fryer LG, Priestman DA & Sugden MC (1998) Moderate protein restriction during pregnancy modifies the regulation of triacylglycerol turnover and leads to dysregulation of insulin's anti-lipolytic action. *Mol Cell Endocrinol* **142**, 25-33.
- Huxtable RJ (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* **72**, 101-163.
- Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patane G, Laybutt R, Bonner-Weir S & Weir GC (1999) Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* **274**, 14112-14121.
- Kalbe L, Leunda A, Sparre T, Meulemans C, Ahn MT, Orntoft T, Kruhoffer M, Reusens B, Nerup J & Remacle C (2005) Nutritional regulation of proteases involved in fetal rat insulin secretion and islet cell proliferation. *Br J Nutr* **93**, 309-316.
- Kaplan B, Karabay G, Zagyapan RD, Ozer C, Sayan H & Duyar I (2004) Effects of taurine in glucose and taurine administration. *Amino Acids* **27**, 327-333.
- Kulkarni RN (2004) The islet beta-cell. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 365-371.
- Lang DA, Matthews DR, Peto J & Turner RC (1979) Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *N Engl J Med* **301**, 1023-1027.

- Latorraca MQ, Carneiro EM, Mello MA & Boschero AC (1999) Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with a diminished calcium uptake. *J Nutr Biochem* **10**, 37-43.
- Latorraca MQ, Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, Velloso LA, Saad MJ & Boschero AC (1998) Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J Nutr* **128**, 1643-1649.
- Leger J, Noel M, Limal JM & Czernichow P (1996) Growth factors and intrauterine growth retardation. II. Serum growth hormone, insulin-like growth factor (IGF) I, and IGF-binding protein 3 levels in children with intrauterine growth retardation compared with normal control subjects: prospective study from birth to two years of age. Study Group of IUGR. *Pediatr Res* **40**, 101-107.
- Leon-Quinto T, Adnot P & Portha B (1997) Alteration of the counterregulatory hormones in the conscious rat after protein-energy restriction. *Diabetologia* **40**, 1028-1034.
- Leon-Quinto T, Magnan C & Portha B (1998) Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology* **139**, 3382-3389.
- Levy J, Zhu Z & Dunbar JC (1998) The effect of glucose and calcium on Ca²⁺-adenosine triphosphatase in pancreatic islets isolated from a normal and a non-insulin-dependent diabetes mellitus rat model. *Metabolism* **47**, 185-189.
- Li C, Buettger C, Kwagh J, Matter A, Daikhin Y, Nissim IB, Collins HW, Yudkoff M, Stanley CA & Matschinsky FM (2004) A signaling role of glutamine in insulin secretion. *J Biol Chem* **279**, 13393-13401.
- Macfarlane WM, Frayling TM, Ellard S, Evans JC, Allen LI, Bulman MP, Ayres S, Shepherd M, Clark P, Millward A, Demaine A, Wilkin T, Docherty K & Hattersley AT (1999) Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J Clin Invest* **104**, R33-39.
- Marie JC, Bailbe D, Gylfe E & Portha B (2001) Defective glucose-dependent cytosolic Ca²⁺ handling in islets of GK and nSTZ rat models of type 2 diabetes. *J Endocrinol* **169**, 169-176.
- Martin MA, Fernandez E, Pascual-Leone AM, Escriva F & Alvarez C (2004) Protein calorie restriction has opposite effects on glucose metabolism and insulin gene expression in fetal and adult rat endocrine pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E542-550.
- Merezak S, Reusens B, Renard A, Goosse K, Kalbe L, Ahn MT, Tamarit-Rodriguez J & Remacle C (2004) Effect of maternal low-protein diet and taurine on the vulnerability of adult Wistar rat islets to cytokines. *Diabetologia* **47**, 669-675.
- Milanski M, Arantes VC, Ferreira F, de Barros Reis MA, Carneiro EM, Boschero AC, Collares-Buzato CB & Latorraca MQ (2005) Low-protein diets reduce PKA α expression in islets from pregnant rats. *J Nutr* **135**, 1873-1878.
- Minami K, Yokokura M, Ishizuka N & Seino S (2002) Normalization of intracellular Ca²⁺ induces a glucose-responsive state in glucose-unresponsive beta-cells. *J Biol Chem* **277**, 25277-25282.
- Nadal A, Valdeolmillos M & Soria B (1994) Metabolic regulation of intracellular calcium concentration in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Am J Physiol* **267**, E769-774.

- Nagamatsu S, Nakamichi Y, Yamamura C, Matsushima S, Watanabe T, Ozawa S, Furukawa H & Ishida H (1999) Decreased expression of t-SNARE, syntaxin 1, and SNAP-25 in pancreatic beta-cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets: restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion. *Diabetes* **48**, 2367-2373.
- Nakaya Y, Minami A, Harada N, Sakamoto S, Niwa Y & Ohnaka M (2000) Taurine improves insulin sensitivity in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* **71**, 54-58.
- O'Rahilly S, Turner RC & Matthews DR (1988) Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* **318**, 1225-1230.
- Okitolonda W, Brichard SM & Henquin JC (1987) Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. *Diabetologia* **30**, 946-951.
- Orci L (1985) The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. The Minkowski lecture 1973 revisited. *Diabetologia* **28**, 528-546.
- Ostenson CG, Gaisano H, Sheu L, Tibell A & Bartfai T (2006) Impaired gene and protein expression of exocytotic soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor complex proteins in pancreatic islets of type 2 diabetic patients. *Diabetes* **55**, 435-440.
- Ozanne SE, Dorling MW, Wang CL & Petry CJ (2000) Depot-specific effects of early growth retardation on adipocyte insulin action. *Horm Metab Res* **32**, 71-75.
- Paolisso G, Sgambato S, Torella R, Varricchio M, Scheen A, D'Onofrio F & Lefebvre PJ (1988) Pulsatile insulin delivery is more efficient than continuous infusion in modulating islet cell function in normal subjects and patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **66**, 1220-1226.
- Pelletier DL (1994) The potentiating effects of malnutrition on child mortality: epidemiologic evidence and policy implications. *Nutr Rev* **52**, 409-415.
- Pencharz PB (2008) Assessment of protein nutritional status in children. *Pediatr Blood Cancer* **50**, 445-446; discussion 451.
- Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ & Hill DJ (1999) A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* **140**, 4861-4873.
- Picarel-Blanchot F, Alvarez C, Bailbe D, Pascual-Leone AM & Portha B (1995) Changes in insulin action and insulin secretion in the rat after dietary restriction early in life: influence of food restriction versus low-protein food restriction. *Metabolism* **44**, 1519-1526.
- Post CL, Victora CG, Barros FC, Horta BL & Guimaraes PR (1996) [Infant malnutrition and obesity in two population-based birth cohort studies in southern Brazil: trends and differences]. *Cad Saude Publica* **12 Suppl 1**, 49-57.
- Quesada I, Rovira JM, Martin F, Roche E, Nadal A & Soria B (2002) Nuclear KATP channels trigger nuclear Ca(2+) transients that modulate nuclear function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9544-9549.
- Rao RH (1988) Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence? *Endocr Rev* **9**, 67-87.

- Rasschaert J, Reusens B, Dahri S, Sener A, Remacle C, Hoet JJ & Malaisse WJ (1995) Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. *Endocrinology* **136**, 2631-2634.
- Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC, Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-1951.
- Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, Boschero AC, Saad MJ & Velloso LA (1997) Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein-deficient rats. *J Nutr* **127**, 403-410.
- Remacle C, Dumortier O, Bol V, Goosse K, Romanus P, Theys N, Bouckennooghe T & Reusens B (2007) Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* **9 Suppl 2**, 196-209.
- Reusens B, Sparre T, Kalbe L, Bouckennooghe T, Theys N, Kruhoffer M, Orntoft TF, Nerup J & Remacle C (2008) The intrauterine metabolic environment modulates the gene expression pattern in fetal rat islets: prevention by maternal taurine supplementation. *Diabetologia* **51**, 836-845.
- Ribeiro RA, Bonfleur ML, Amaral AG, Vanzela EC, Rocco SA, Boschero AC & Carneiro EM (2009) Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes Metab Res Rev* **25**, 370-379.
- Roe MW, Philipson LH, Frangakis CJ, Kuznetsov A, Mertz RJ, Lancaster ME, Spencer B, Worley JF, 3rd & Dukes ID (1994) Defective glucose-dependent endoplasmic reticulum Ca²⁺ sequestration in diabetic mouse islets of Langerhans. *J Biol Chem* **269**, 18279-18282.
- Rorsman P & Renstrom E (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **46**, 1029-1045.
- Satoh H (1996) Direct inhibition by taurine of the ATP-sensitive k⁺ channel in guinea pig ventricular cardiomyocytes. *Gen Pharmacol* **27**, 625-627.
- Satoh H (1998) Cardiac actions of taurine as a modulator of the ion channels. *Adv Exp Med Biol* **442**, 121-128.
- Scott AM, Atwater I & Rojas E (1981) A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* **21**, 470-475.
- Sener A, Blachier F, Rasschaert J & Malaisse WJ (1990) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release: comparison with histidine-induced insulin release. *Endocrinology* **127**, 107-113.
- Snoeck A, Remacle C, Reusens B & Hoet JJ (1990) Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* **57**, 107-118.
- Sparre T, Reusens B, Cherif H, Larsen MR, Roepstorff P, Fey SJ, Mose Larsen P, Remacle C & Nerup J (2003) Intrauterine programming of fetal islet gene expression in rats--effects of maternal protein restriction during gestation revealed by proteome analysis. *Diabetologia* **46**, 1497-1511.
- Spiegelman BM & Flier JS (1996) Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* **87**, 377-389.

- Sudhof TC & Rothman JE (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* **323**, 474-477.
- Sugita S, Shin OH, Han W, Lao Y & Sudhof TC (2002) Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca(2+) sensors with distinct Ca(2+) affinities. *Embo J* **21**, 270-280.
- Takii M, Ishikawa T, Tsuda H, Kanatani K, Sunouchi T, Kaneko Y & Nakayama K (2006) Involvement of stretch-activated cation channels in hypotonically induced insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C1405-1411.
- Tricarico D, Barbieri M & Camerino DC (2000) Taurine blocks ATP-sensitive potassium channels of rat skeletal muscle fibres interfering with the sulphonylurea receptor. *Br J Pharmacol* **130**, 827-834.
- Tsuboyama-Kasaoka N, Shozawa C, Sano K, Kamei Y, Kasaoka S, Hosokawa Y & Ezaki O (2006) Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity. *Endocrinology* **147**, 3276-3284.
- Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J & Thomas G (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* **431**, 200-205.
- Valdeolmillos M, Santos RM, Contreras D, Soria B & Rosario LM (1989) Glucose-induced oscillations of intracellular Ca²⁺ concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett* **259**, 19-23.
- Varadi A, Molnar E, Ostenson CG & Ashcroft SJ (1996) Isoforms of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase are differentially expressed in normal and diabetic islets of Langerhans. *Biochem J* **319** (Pt 2), 521-527.
- Vikman J, Ma X, Hockerman GH, Rorsman P & Eliasson L (2006) Antibody inhibition of synaptosomal protein of 25 kDa (SNAP-25) and syntaxin 1 reduces rapid exocytosis in insulin-secreting cells. *J Mol Endocrinol* **36**, 503-515.
- Villar J, Belizan JM, Spalding J & Klein RE (1982) Postnatal growth of intrauterine growth retarded infants. *Early Hum Dev* **6**, 265-271.
- Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX & Wess J (2001) Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* **410**, 207-212.
- Zawalich WS, Zawalich KC & Kelley GG (1995) Regulation of insulin release by phospholipase C activation in mouse islets: differential effects of glucose and neurohumoral stimulation. *Endocrinology* **136**, 4903-4909.
- Zhang W, Khan A, Ostenson CG, Berggren PO, Efendic S & Meister B (2002) Down-regulated expression of exocytotic proteins in pancreatic islets of diabetic GK rats. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 1038-1044.

Anexos

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

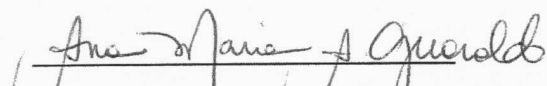
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1278-1, sobre "**Modulação do mecanismo de síntese e secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos e ratos submetidos à restrição protéica e suplementados com taurina**", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro / Thiago Martins Batista, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 28 de maio de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1278-1, entitled "**Insulin synthesis and secretion mechanisms in pancreatic islets of protein-restricted mice and supplemented with taurine**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 28, 2007.

Campinas, 28 de maio de 2007.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva