

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Ana Paula Gameiro Cappelli

**“Modulação da secreção de insulina por estresse oxidativo induzido em ilhotas pancreáticas de animais submetidos à desnutrição protéica”**

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Ana Paula Gameiro Cappelli 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**

**C173m**

Cappelli, Ana Paula Gameiro

Modulação da secreção de insulina por estresse oxidativo induzido em ilhotas pancreáticas de animais submetidos à restrição protéica / Ana Paula Gameiro Cappelli. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro.

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

1. Superóxido dismutase. 2. Glutathione peroxidase. 3. Catalase. 4. Água oxigenada. 5. Reação de oxidação-redução. I. Carneiro, Everardo Magalhães, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Oxidative stress modulation of insulin secretion in protein undernourished rats' pancreatic islet.

**Palavras-chave em inglês:** Superoxide dismutase; Glutathione peroxidase; Catalase; Hydrogen peroxide; Oxidation-reduction reaction.

**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:** 11/12/2009.

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

Data da Defesa: 11/12/ 2009

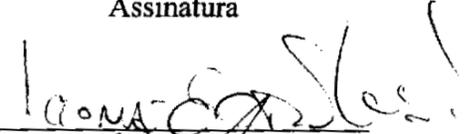
**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro (Orientador)



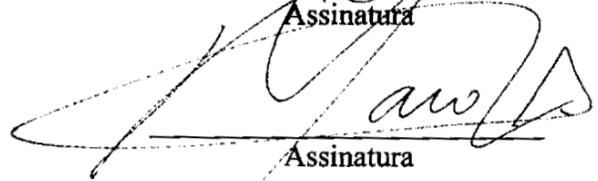
Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira



Assinatura

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni



Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chysostomo Werneck



Assinatura

Profª. Dra. Eliana Pereira de Araújo



Assinatura

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por tornarem  
possíveis as minhas conquistas.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me colocado no mundo com saúde e determinação.

A minha mãe que sempre esteve ao meu lado dando suporte para que eu pudesse chegar onde estou hoje.

Ao meu pai que sempre me orientou para que eu seguisse pelo melhor caminho possível.

Ao meu irmão que a cada vez que me chamava de burra, me incentivava a provar que ele estava errado.

Ao Prof. Everardo Magalhães Carneiro por abrir as portas do laboratório para mim e por ter confiado e acreditado que eu podia crescer e me tornar uma pessoa capaz de adquirir o título de mestre em biologia funcional e molecular, na área de fisiologia.

Ao Prof. Antônio Carlos Boschero e Prof<sup>a</sup> Helena C. de Oliveira pela disposição em ajudar e exemplo de dedicação.

Ao Prof. Dr. Luiz Fabrício Stoppiglia que ajudou, acompanhou e me ensinou conhecimentos básicos para que eu pudesse terminar minhas iniciações científicas e tivesse capacidade para desenvolver um mestrado.

Ao Prof. Dr. Claudio Cesar Zoppi que teve papel fundamental para o término do meu mestrado, me ajudando, não só profissionalmente, mas como amigo.

Ao Prof. Dr. Leonardo Reis Silveira que sempre esteve disposto a ajudar, tirar dúvidas e contribuir para que meu trabalho tivesse bons resultados.

Aos meus companheiro(a)s e amigo(a)s de trabalho que sempre estiveram dispostos a me ajudar, as vezes não na hora que eu queria, mas sempre acabavam ajudando, tanto nas pesquisas mas também em questões emocionais. Obrigada por terem acreditado em mim e me dado força para que eu conseguisse terminar meu mestrado.

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

A FAPESP pela concessão da bolsa de estudo.

“No final tudo dá certo, se não deu certo ainda, é porque ainda não chegou ao final.”

# SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Desnutrição.....	15
1.2 Secreção de insulina.....	17
1.3 Radicais livres.....	18
1.4 Estresse oxidativo.....	22
1.5 Estresse oxidativo na ilhota.....	23
1.6 Sistema de defesa antioxidante.....	24
1.7 Os sistemas antioxidantes na ilhota.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Caracterização do modelo experimental.....	33
3.2 Avaliação do estado nutricional.....	33
3.3 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT).....	34
3.4 Isolamento de ilhotas.....	34
3.5 Secreção Estática de Insulina.....	34
3.6 Western blotting.....	35
3.7 Atividade enzimática.....	36
3.8 Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1 Caracterização do modelo de desnutrição protéica.....	39
4.1.1 Parâmetros antropométricos ingestão alimentar e hídrica.....	39
4.1.2 Parâmetros bioquímicos.....	41
4.1.3 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT).....	42
4.1.4 Conteúdo protéico das enzimas antioxidantes (Western Blotting).....	43

<b>4.1.5 Atividade das enzimas antioxidantes.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.6 Secreção estática de insulina.....</b>	<b>45</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1 Secreção de insulina, desnutrição protéica e estado redox.....</b>	<b>56</b>
<b>5.2 Sistema antioxidante enzimático.....</b>	<b>57</b>
<b>5.3 Secreção estática de insulina estimulada por glicose.....</b>	<b>58</b>
<b>6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>62</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>74</b>
<b>8.1 Anexo I.....</b>	<b>75</b>
Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	76
<b>8.2 Anexo II.....</b>	<b>77</b>
Manuscrito submetido à revista PlosOne.....	78

## Índice de figuras e tabelas

**Figura 1.** (A) Peso corpóreo de ratos Wistar machos controle (NP) e desnutrido (LP) entre os 21 e 81 dias de vida e (B) área abaixo das curvas de evolução de peso (n = 12). Os valores são a média ± EPM. \* diferença significativa. P < 0,05. Teste “t” student.

**Figura 2.** Ingesta alimentar (A) e hídrica (B) relativa de ratos Wistar machos controle (NP) e desnutrido (LP) acompanhados por 60 dias (n = 12). Os valores são a média ± EPM. Para todos os grupos experimentais. Teste “t” student.

**Figura 3.** Glicemia durante o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) (A) e área abaixo da curva glicêmica (B) de ratos controle (NP) e desnutridos (LP), n = 9-10. Resultados expressos como média ± EPM. \* diferença significativa. P < 0.05 (Teste “t” student).

**Figura 4.** Conteúdo protéico em ilhotas de ratos controle (NP) e desnutridos (LP): da superóxido dismutase 1 (SOD1) (A); catalase (CAT) (B); glutathione peroxidase 1 (GPx1) (C). Os dados foram normalizados pela  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ -TUB) (n = 5-9). Valores representam média ± EPM (Teste “t” student).

**Figura 5.** Atividade das enzimas antioxidantes em ilhotas de ratos controle (NP) e desnutridos (LP). Superóxido dismutase 1 (SOD1) (A); catalase (CAT) (B); glutathione peroxidase 1 (GPx1) (C), (n = 4). Valores representam média ± EPM. \* representa diferença significativa. P < 0.05 (Teste “t” student).

**Figura 6.** Secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP) e desnutrido (LP). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com ou sem 10  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos. Após a retirada do meio de pré-incubação, as ilhotas foram expostas durante 1 hora à solução de Krebs contendo 2.8, 11 e 22.2 mM de glicose (n = 12- 45). Média  $\pm$  EPM. \* representa diferença estatística, para as mesmas condições, em relação ao grupo controle. P < 0.05 (Teste “t” student).

**Figura 7.** Secreção estática de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP) e desnutridos (LP). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com ou sem 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos (Pré-inc). Após a retirada do meio de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 22.2 mM de glicose (Inc) com ou sem 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora (n = 6). Média  $\pm$  EPM. \* representa diferença estatística em relação ao respectivo controle. P < 0.05 (ANOVA one-way e student- Newman-Keuls test).

**Figura 8.** Percentual da secreção máxima de insulina (NP) por ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP - barra branca), NP + 150 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (barra xadrez), desnutrido (LP – barra preta) e LP + 150 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (barra listrada). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com ou sem 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas durante 1 hora à solução de Krebs contendo 2.8, 8.3, 22.2 e 33.3 mM de glicose (n = 6-18). Média  $\pm$  EPM. \* representa diferença significativa comparada com o grupo controle para cada condição de glicose.

**Figura 9.** Secreção estática de insulina, percentual da secreção em relação ao controle e percentual da secreção máxima (figuras 9A, B e C respectivamente) de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP) e desnutridos (LP). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com 0, 10, 100, 150, 200, 250 ou 300  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 22.2 mM de glicose por 1 hora (n = 7-20). Média  $\pm$  EPM. \* representa diferença estatística em relação ao G2.8 do mesmo grupo experimental. # representa diferença estatística entre os grupos. P < 0.05 (ANOVA one-way e student- Newman-Keuls test).

**Figura 10.** Secreção estática de insulina, percentual da secreção em relação ao controle e percentual da secreção máxima (figuras 10A, B e C respectivamente) de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP) e desnutridos (LP). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com 0, 10, 100, 150, 200, 250 ou 300  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 33 mM de glicose por 1 hora (n = 6 - 8). Média  $\pm$  EPM. \* representa diferença estatística em relação ao G2.8 do mesmo grupo experimental. # representa diferença estatística entre os grupos. P < 0.05 (ANOVA one-way e student- Newman-Keuls test).

**Figura 11.** Secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP) e desnutrido (LP). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com ou sem 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na ausência ou presença de 10 mM de NAC e na presença de 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 10 mM de NAC durante 30 minutos. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas durante 1 hora à solução de Krebs contendo 2.8 ou 33.3 mM de glicose (n = 6-12). Média  $\pm$  EPM. Os símbolos diferentes representam diferença significativa dentro do mesmo grupo. P < 0.05. (ANOVA one-way e student- Newman-Keuls test e Teste “t” student)

**Tabela 1.** Valor Absoluto do peso corpóreo, coração, fígado, baço, rim, gordura retroperitoneal e gordura perigonadal de ratos controle (NP) e desnutridos (LP) tratados durante 60 dias.

**Tabela 2.** Valor Relativo do peso do coração, fígado, baço, rim, gordura peritoneal e gordura gonadal de ratos controle (NP) e desnutridos (LP) tratados durante 60 dias.

**Tabela 3.** Proteínas totais, albumina, glicose e insulina plasmática de ratos controles (NP) e desnutridos (LP) tratados durante 60 dias.

## RESUMO

A desnutrição protéica promove redução da secreção de insulina devido inúmeras alterações moleculares nas células B pancreáticas. Recentemente foi demonstrado que o estado redox pode modular a secreção de insulina em condições fisiológicas. No entanto, a correlação entre as alterações no estado redox e na secreção de insulina em ratos submetidos à desnutrição protéica não é conhecida. Assim, nosso objetivo foi avaliar o impacto do estresse oxidativo na secreção de insulina em ilhotas de ratos desnutridos. Ratos machos Wistar foram tratados com dieta normoprotéica (NP-17%) ou hipoprotéica (LP-6%) por 60 dias. Após isolamento das ilhotas, foi medida atividade e o conteúdo protéico das enzimas antioxidantes SOD, GPx e a CAT. Para a secreção estática de insulina, as ilhotas foram pré-incubadas em 5.6 mM de glicose (GLI) com ou sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na ausência ou presença de n-acetil cisteína (NAC) e posteriormente incubadas em diferentes concentrações de GLI. Observamos aumento da atividade da SOD (21.18±2.1-30.5±2 μmoles/min/mg proteína NP-LP respectivamente), redução na CAT (9±1.2-5.22±0.73 μmoles/min/mg proteína NP-LP respectivamente) e nenhuma alteração na GPx em ilhotas de ratos desnutrido comparada com ilhotas de ratos controle. Apesar de observarmos tendência de aumento no conteúdo protéico das enzimas antioxidantes em LP, não houve diferença significativa de nenhuma das enzimas. A secreção de insulina de ratos LP que ficaram expostas a 33mM de glicose na incubação, retornou a níveis basais (GLI 2.8 mM) quando pré-incubado com 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto para as ilhotas de ratos controle foi necessário a adição de 300 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na pré-incubação para retornar aos níveis basais. Na presença de 10 mM de NAC + 150 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante a pré-incubação, e posterior incubação em 33 mM de glicose, observou-se redução significativa da secreção de NP e aumento em LP. Estes resultados sugerem que as ilhotas pancreáticas de ratos desnutridos pré tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e posteriormente expostas a altas concentrações de glicose, são mais sensíveis ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possivelmente devido à capacidade reduzida de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROS).

**Palavras- chave:** Superóxido dismutase, Glutathiona peroxidase, Catalase, peróxido de hidrogênio, balanço redox.

## ABSTRACT

Protein malnutrition induces pancreatic B-cells molecular alterations, reducing insulin secretion. It has been recently demonstrated that redox status may control insulin secretion under physiological conditions. However, protein malnutrition effects in redox modulation of insulin secretion is unknown. Thus, our aim was to evaluate oxidative stress impact upon insulin secretion in isolated islets from protein undernourished rats. Male Wistar rats were treated with normoproteic diet (NP-17%) or with a low protein diet (LP-6%) for sixty days. After islets isolation, it was measured antioxidant enzymes SOD, GPX and CAT activities and protein content. For insulin secretion measurement, islets were pre-incubated with glucose 5.6 (GLI) mM with or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the presence and absence of N-acetyl-cisteyne (NAC) and after that islets were incubated with different GLI concentration. SOD and CAT activities were significantly increased (21.18±2.1-30.5±2 μmoles/min/mg protein for NP-LP respectively) and decreased (9±1.2-5.22±0.73 μmoles/min/mg protein for NP-LP respectively) respectively, whereas GPX did not show any alteration. Despite a tendency of increase in the LP protein content of antioxidant enzymes, no significant differences were observed. When incubated with glucose 33mM, LP insulin secretion returned to baseline values (GLI 2.8 mM) when it was pre-incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM, whereas NP islets returned to baseline levels when pre-incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 μM. When islets were pre-incubated with NAC 10 mM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM and further incubated with glucose 33 mM, insulin secretion was reduced in NP, whereas in LP it was increased. Taken together, these data suggest that pancreatic islets from undernourished rats when pre-treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thereafter challenged with high glucose concentrations are more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, probably due to their lower capacity to detoxify reactive oxygen species (ROS).

**Key words:** Superoxide Dismutase, Glutathione peroxidase, Catalase, hydrogen peroxide, redox status.

## Lista de abreviaturas

$\alpha$ -Tub –  $\alpha$ -tubulina

ADP – Adenosina difosfato

AGL – Ácidos graxos livres

AIN – Instituto americano de nutrição

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

Anova – Análise de variância

ATP – Trifosfato de adenosina

$\text{Ca}^{2+}$  - Íon cálcio

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

CAT - Catalase

$\text{Cu}^{2+}$  - Íon cobre

Cu-Zn SOD – superóxido dismutase dependentes de cobre/zinco

DAG - Diacilgliceol

DNA- Ácido desoxirribonucléico

DSB - Quebras duplas - "*double strand break*"

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

$\text{Fe}^{2+}$  - Íon ferro II

$\text{Fe}^{3+}$  - Íon ferro III

GLI - Glicose

GLUT2 – Transportador de glicose 2

GO – Glutathione oxidase

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione

GSIS – Secreção de insulina estimulada por glicose

GSSG – Glutathione dissulfeto

$\text{H}_2\text{O}$  – Água

$\text{H}_2\text{O}_2$  - Peróxido de hidrogênio

HO<sup>-</sup> - Ânion hidroxila  
HO<sup>•</sup> - Radical hidroxila  
INS-1 – Linhagem tumoral de célula B de rato  
IP<sub>3</sub> – Inositol 1, 4, 5 trifosfato  
K<sub>ATP</sub> – Canal de potássio dependente de ATP  
L<sup>•</sup> - Radical alquila  
LDL - Lipoproteína de baixa densidade  
LO<sup>•</sup> - Alcoxila  
LOO<sup>•</sup> - Peroxila  
LP - animais submetidos à dieta hipoprotéica (6% de proteína)  
Mn-SOD – Superóxido dismutase dependente de manganês  
NAC – n-acetil-cisteína  
NADP<sup>+</sup> – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)  
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)  
NO<sup>•</sup> - Óxido nítrico  
NP- animais submetidos à dieta normoprotéica (17% de proteína)  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Ânion superóxido  
O<sub>2</sub> – Oxigênio molecular  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Radical ânion superóxido  
OONO<sup>-</sup> - Peroxinitrito  
PKA – Proteína quinase A  
PKC - Proteína quinase C  
RNA – Ácido ribonucléico  
Se<sup>2+</sup> - Íon selênio  
-SH - Grupos sulfidrilas  
SOD – Superóxido dismutase  
-SS - Pontes dissulfeto  
SSB - Quebras simples - "*single strand break*"  
TPx - Tioredoxina peroxidase  
TSH - Tioredoxina  
UCP2 – Proteína desacopladora 2  
ZDF - Ratos Zucker obesos e diabéticos

## **1. INTRODUÇÃO**

As células B pancreáticas têm sua atividade secretora de insulina fortemente vinculada ao metabolismo de glicose e outros substratos energéticos, que resultam num aumento da concentração intracelular de ATP (Malaisse *et al.*, 1990). A produção de ATP inicia-se na via glicolítica e a fosforilação oxidativa complementa o processo, acionando a maturação e transporte dos grânulos de insulina até a membrana (Fujimoto *et al.*, 2007).

Durante o curso do metabolismo mitocondrial, cerca de 2 a 5% do oxigênio consumido e reduzido de forma univalente, dão origem ao radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (Halliwell & Gutteridge, 1999). Em condições patológicas, como o diabetes mellitus tipo 1, as células B não conseguem degradar o montante de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas, levando a apoptose dessas células (Tiedge *et al.*, 1997). No diabetes mellitus tipo 2, a glicosilação não-enzimática de proteínas plasmáticas e seu reconhecimento por macrófagos alimenta um processo crônico de estresse oxidativo, que pode levar ao mal funcionamento das células B e perda da capacidade de secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) (Graham *et al.*, 1993).

A restrição protéica causa prejuízo na secreção de insulina causando danos na célula B como diminuição da massa e aumento na produção de EROs devido à baixa capacidade antioxidante (Mann *et al.*, 1975 ; Parra *et al.*, 1975; Latorraca *et al.*, 1998 ; Filiputti *et al.*, 2008).

Apesar do imenso número de trabalhos relacionando o estresse oxidativo com mal-funcionamento das células B, existem raríssimos estudos executados em ilhotas de Langerhans avaliando o quanto das modificações na secreção de insulina na desnutrição é devido ao estresse oxidativo. Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar como o estresse oxidativo influencia a secreção de insulina de animais submetidos à restrição protéica.

## **1.1 Desnutrição**

Em função de um grande número de pessoas na Europa terem sido afetadas pela fome no pós-guerra, a desnutrição tornou-se alvo de estudos epidemiológicos. Após estudos realizados por Willians *et al.* (1933) a desnutrição passou a ser conhecida como marasmo (desnutrição calórico-protéica causada principalmente por privação de carboidratos) e kwashiokor (desnutrição protéica causada por alimentação deficiente em

proteínas) (Williams, 1933). As duas definições podem ainda se somar no marasmokwashiokor, causado por alimentação deficiente em calorias e pobre em proteínas (Golden, 2002).

O interesse na desnutrição como modelo experimental deve-se ao fato de ela estar ligada à alteração de toda a fisiologia do organismo para adaptá-lo à carência de nutrientes como, por exemplo, redução da secreção dos hormônios GH, IGF-1 e 2, aumento na secreção de cortisol, hiper-captação de  $\text{Fe}^{2+}$  pelos tecidos, etc (Albrecht, 1995). Ainda, em populações pobres do Brasil e outros países, o marasmo é uma realidade. A diferença de custos e disponibilidade de alimentos pobres ou ricos em proteínas também tende a criar populações inteiras exibindo características do kwashiokor, como alta deposição de gordura no fígado, perda significativa de massa muscular e retardo de crescimento (Fuchs, 2005).

Atualmente, é sabido que o kwashiokor, provocado pela carência de aminoácidos na dieta, predispõe o organismo a uma alta atividade de transaminases, a fim de restringir a fuga de nitrogênio, assim como modificação de atividade de proteínas como a mTOR, que liga o metabolismo de aminoácidos à expressão gênica. O kwashiokor também é acompanhado de uma reação inflamatória sistêmica, a despeito da hipercortisolemia. Algumas hipóteses foram propostas para explicar esse fenômeno. Uma delas é que a desnutrição induz uma maior susceptibilidade a agentes infecciosos ou endotoxinas como a aflatoxina B1, relativamente comum nos cereais consumidos por algumas populações estudadas e portadoras de lesões hepáticas (Hendrickse, 1988). Outra teoria é a de que os desnutridos teriam menor capacidade antioxidante, devido à carência de aminoácidos sulfonados, que são limitantes à formação de glutathione (GSH) e todas as enzimas tiólicas relacionadas. Curiosamente, o kwashiokor causa anomalias no transporte de eletrólitos nos rins e no intestino (Darmon, 1993), diminuindo a concentração plasmática de  $\text{Se}^{2+}$ , um íon essencial à atividade da enzima varredora (tiol-dependente) glutathione peroxidase (GPx). Outra teoria, ainda, enfoca as deficiências no ciclo de gama-glutamyl, através do qual a glutathione (GSH) é sintetizada e fornece grupamentos gama-glutamyl para a detoxificação de compostos xenobióticos eletrofilicos, através da enzima glutathione-S-transferase (Wu *et al.*, 2004). As três teorias têm, em sua base, que o organismo desnutrido tem problemas ao conviver com compostos xenobióticos, microorganismos ou o estresse oxidativo inerente da respiração celular.

## 1.2 Secreção de insulina

Em resposta a elevados níveis de nutrientes no sangue, as células B liberam insulina para manter a homeostase glicêmica. A disfunção nessa resposta secretória é considerada um dos fatores que causam a Diabetes Mellitus tipo 2. (Weyer *et al.*, 1999; Eizirik *et al.*, 2008). Dentro de cada célula B, a insulina é armazenada em grânulos. Quando os níveis de glicose extracelular se elevam, a glicose entra na célula B através de uma proteína transportadora de glicose chamada GLUT2. A glicose é rapidamente metabolizada aumentando a razão ATP/ADP (Kennedy *et al.*, 1999; Malaisse & Sener, 1987) causando o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e consequente despolarização da célula B (Cook & Hales, 1984; Meglasson & Matschinsky, 1986). A despolarização da membrana induz abertura de canais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) sensíveis a voltagem, aumentando a concentração de cálcio intracelular (Rorsman *et al.*, 2000; Safayhi *et al.*, 1997; Satin & Cook, 1985). O aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) ativa a maquinaria de exocitose dos grânulos de insulina, promovendo a fusão desses grânulos à membrana plasmática e resultando na secreção de insulina. Um efeito secundário da elevação da  $[Ca^{2+}]_i$  é a ativação da adenil ciclase e fosfolipase C que agindo sobre substrato específico, a adenil ciclase gera AMP cíclico (AMPC), enquanto que a fosfolipase C gera diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato ( $IP_3$ ). O  $IP_3$  promove a liberação do cálcio armazenado no retículo endoplasmático, a proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) promovem a fosforilação de proteínas que amplificam o sinal para o processo secretório de insulina (Flatt, 1996; Maechler *et al.*, 2006; Henquin *et al.*, 2006).

A importância do ATP na secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) já é muito bem esclarecida, porém outros fatores metabólicos, tais como o NADPH, malonil-CoA, DAG e glutamato parecem ser importantes para esse mecanismo (MacDonald *et al.*, 2005; Maechler *et al.*, 2006).

Em adição, o estudo realizado por Leloup e colaboradores (2009), revelou que as espécies reativas de oxigênio são fundamentais para o processo de GSIS, embora não se saiba ao certo como elas participam desse processo.

Estudos realizados em nosso laboratório mostram que o animal com restrição protéica (LP) possui, entre outras alterações, menor resposta das ilhotas de Langerhans à maioria dos secretagogos de insulina quando comparados a animais controle (Latorraca

*et al.*, 1998). Sabe-se que o animal submetido à restrição calórica possui menor desacoplamento mitocondrial, carbonilação de proteínas e peroxidação lipídica do que um animal controle, de forma que os efeitos da carência de GSH possa ser equilibrada por uma menor geração de EROs (Sohal *et al.*, 1994). Em seres humanos e animais, a suplementação com antioxidantes contendo grupamentos -SH como, por exemplo, o n-acetil-cisteína (NAC) pode resultar em maior eficiência no balanço redox, aumentando os níveis de glutathione nos tecidos, podendo ser convertido para cisteína intracelularmente ou agindo como um regulador redox da célula (Fuchs, 2005; Li *et al.*, 2002).

Uma parte dos carbonos introduzidos no metabolismo pela glicose pode ser destinada à formação de gama-glutamyl-cisteína, um precursor importante da glutathione (Brennan *et al.*, 2003). Isso faz pensar em um alto requerimento de glutathione total, e que a razão GSH/GSSG (normalmente >10) esteja alta no interior da célula B ou que a glutathione esteja de alguma forma relacionada à síntese de insulina, sem que se saiba, atualmente, de uma conexão precisa entre o sistema varredor e a secreção de insulina. Parte da GSH sérica está, por exemplo, relacionada ao transporte de aminoácidos através da membrana plasmática (Sen, 1997). Em animais desnutridos, não só a GSH sérica está diminuída, mas também há queda na razão NADPH/NADP<sup>+</sup> em células do fígado (Albrecht & Pélissier, 1995).

### **1.3 Radicais livres**

Radicaís livres são definidos como toda molécula, altamente reativa, que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica. Esta configuração faz dos radicaís livres moléculas altamente instáveis, de meia-vida curta e quimicamente muito reativas (Halliwell & Gutteridge, 1992).

Os radicaís livres são formados durante processos fisiológicos de oxidação, podendo ser produzidos no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas celulares (Halliwell & Gutteridge, 1999).

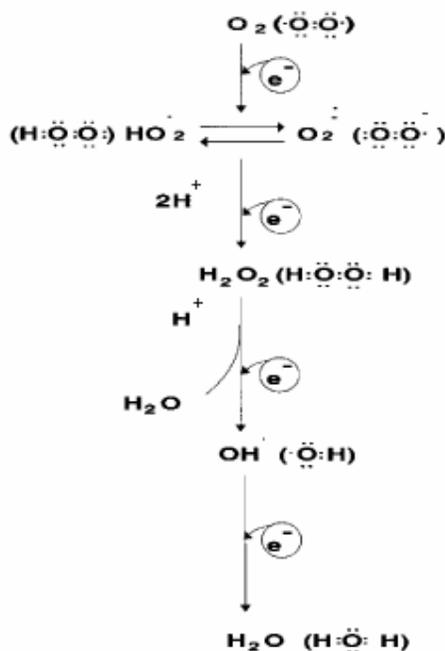
Em condições fisiológicas, os radicaís livres participam da sinalização celular, dos processos de fagocitose e também estão envolvidos na síntese de algumas proteínas (Halliwell & Gutteridge, 1999). Por outro lado, condições de estresse, no qual ocorre

um desbalanço redox, aumentando os níveis de espécies reativas de oxigênio, podem provocar reações em cadeia causando danos a um grande número de moléculas.

Na natureza existem duas importantes substâncias geradoras de radicais livres: o oxigênio no estado fundamental ( $O_2$ ) e o óxido nítrico ( $NO^*$ ) (Rover Júnior *et al.*, 2001). Durante o metabolismo, tais substâncias podem gerar componentes altamente reativos denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERN).

A utilização da energia proveniente de nutrientes pelo processo de fosforilação oxidativa, deve-se a presença de oxigênio. Embora o oxigênio seja um elemento vital para a sobrevivência dos organismos aeróbicos, uma pequena fração do seu consumo mitocondrial dá origem às espécies reativas de oxigênio (Vannucchi *et al.*, 1998).

Na cadeia respiratória, ocorre a redução tetravalente do oxigênio molecular, através da aquisição de 4 elétrons com consequente produção de 2 moléculas de água. Neste processo são gerados intermediários e cerca de 2-5% do  $O_2$  pode dar origem à formação de EROs como descrito abaixo:

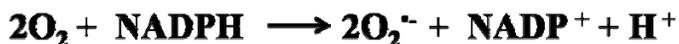


**Esquema 1:** Redução tetravalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ) na mitocôndria até a formação de água ( $H_2O$ ). Várias espécies reativas de  $O_2$  são formadas no processo (Adaptado de Cohen MV, 1989).

Outras formas reativas do oxigênio de importância biológica podem ser formadas por reduções parciais do oxigênio, dando origem às espécies reativas: radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ) (Halliwell & Gutteridge, 1990; Silveira, 2004).

As EROs são de grande interesse na área biológica. A evolução do conhecimento sobre os radicais livres de oxigênio no meio biológico foi gradativa. A formação de EROs foi inicialmente descrita por McCord & Fridovich (1968), quando demonstraram a formação do  $O_2^{\cdot-}$ , pela ação de enzimas e, posteriormente, a identificação de vias metabólicas geradoras de tais espécies (Turrens & Boveris, 1980), a detecção de efeitos celulares e teciduais deletérios quando os radicais livres alcançavam concentrações elevadas no meio fisiológico (Freeman & Crapo, 1982), e a associação do envolvimento de radicais livres ou deles derivados em vias de sinalização celular (Pi *et al.*, 2007).

Após a primeira redução da molécula de oxigênio é formado o  $O_2^{\cdot-}$ , sendo a EROs mais comum nas células (Boveris, 1998). O  $O_2^{\cdot-}$  é formado, sobretudo, através da cadeia transportadora de elétrons ou pela ação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos durante a atividade bactericida (Diaz *et al.*, 1998). A enzima NADPH oxidase, presente em células fagocitárias, produz radical superóxido durante a fagocitose (Oga, 2003), conforme segue na reação abaixo:



**Reação 1:** Formação de radical superóxido pela NADPH oxidase.

A ação oxidante do radical superóxido é considerada irrelevante. Seu potencial tóxico está relacionado à sua capacidade de gerar outras espécies de maior reatividade, como o radical hidroxila e o peroxinitrito (Misra & Fridovich, 1972; Barreiros *et al.*, 2006).

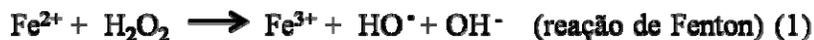
O  $H_2O_2$  não é considerado um radical livre, pois não apresenta elétrons desemparelhados na última camada eletrônica. No entanto, o  $H_2O_2$  participa da reação que produz o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ) (Esquema 1).

Além disso, o peróxido de hidrogênio é capaz de permear membranas celulares e pode reagir com membranas eritrocitárias e com proteínas ligadas ao ferro ( $Fe^{2+}$ ). Esta propriedade possibilita a ocorrência de reações com alvos biológicos em compartimentos distantes do seu local de formação (Scott *et al.*, 1991). Assim, o  $H_2O_2$  é

altamente tóxico para as células e esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro, como ocorre, por exemplo, na hemocromatose transfusional (Eaton, 1991).

O HO• é o mais reativo dentre as espécies reativas de oxigênio no meio biológico e, em teoria, pode oxidar qualquer molécula biológica. Assim, é provável que o radical reaja nas proximidades dos sítios onde foi gerado (Halliwell & Gutteridge, 1990). Dessa forma, se o radical hidroxila for produzido próximo ao DNA, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. O radical hidroxila pode também inativar várias proteínas (enzimas e transportadores de membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) ou pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (Halliwell & Gutteridge, 1986).

Os radicais HO• podem ser gerados tanto na cadeia de transporte de elétrons como também podem ser gerados através das reações de Fenton e a de Haber-Weiss, descritas a seguir:



**Reação 2:** Formação de radical hidroxila segundo reação de Fenton (Equação 1).  
Formação de radical hidroxila segundo reação de Haber- Weiss (Equação 2).

O ferro é o principal catalisador nas reações de oxidação de biomoléculas. No entanto, tanto o ferro como o cobre participam de processos oxidativos e podem catalisar a reação de Haber- Weiss (Vannucchi *et al.*, 1998 ; Barreiros *et al.*, 2006 ; De Souza, 2008).

As espécies reativas de oxigênio podem se combinar com outros átomos, formando ainda outras espécies reativas, como as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Dentre as principais ERN, podemos citar o óxido nítrico (NO•) e o peroxinitrito (OONO•). O NO• que é uma espécie reativa centrada no átomo de nitrogênio, apresenta meia vida de 1 a 10 segundos e desempenha importantes funções no organismo humano como vasorrelaxamento dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, regulação da pressão sanguínea basal, potencialização da transmissão

sináptica a longo prazo, microcirculação medular e glomerular e processos patológicos (Adams, 1996). O NO<sup>•</sup> pode reagir com as EROs, principalmente com o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, gerando peroxinitrito e outros produtos, que são muito tóxicos por causar nitração de proteínas e induzir a peroxidação lipídica (Carreras *et al.*, 1994; Giasson *et al.*, 2002).

#### **1.4 Estresse oxidativo**

Em condições fisiológicas, a geração de EROs é proporcional a capacidade antioxidante da célula. O desbalanço redox gerado pelo acúmulo dessas espécies reativas ou pela deficiência na capacidade antioxidante da célula leva ao chamado estresse oxidativo (Cerqueira *et al.*, 2007; Travacio & Lesuy, 1996).

O estresse oxidativo pode resultar de situações que aumentam a produção de radicais livres, diminuem os níveis de enzimas antioxidantes ou pela instalação de ambos, simultaneamente (Bondy & Le Bel 1993; Cadenas & Davies, 2000).

O estresse oxidativo causa danos celulares como prejuízos à estrutura das biomoléculas de DNA, RNA, carboidratos, lipídios e proteínas, além de outros componentes celulares. O RNA citoplasmático e o DNA mitocondrial são os dois alvos mais sensíveis ao ataque oxidativo (Miranda, 2000).

Os danos oxidativos gerados pelos EROs nas bases do DNA podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucleicos ou, muitas vezes, podem levar à formação de quebras em uma das cadeias do DNA (quebras simples - SSB "single strand break") ou quebras em posições aproximadamente simétricas nas duas cadeias do DNA (quebras duplas - DSB "double strand break"). Além disso, quebras simples podem gerar quebras duplas durante a replicação celular. Dessa forma ocorrem mutações celulares e alteração da síntese protéica (Berra *et al.*, 2006).

A peroxidação de lipídios pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lípidos insaturados das membranas celulares gerando, principalmente, radical alquila (L<sup>•</sup>), alcoxila (LO<sup>•</sup>) e peroxila (LOO<sup>•</sup>), levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (Benzie, 1996). As alterações causadas nas membranas pela peroxidação lipídica interferem na permeabilidade da membrana, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias

tóxicas à célula, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extra-celular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os aminoácidos que compõem as proteínas são susceptíveis a reações com EROs. A oxidação de um ou mais aminoácidos pode romper as estruturas secundárias e terciárias das proteínas, aumentando sua hidrofobicidade por exposição dos aminoácidos do seu interior. O radical hidroxila é particularmente proteotóxico, pois pode reagir com o carbono  $\alpha$  de qualquer aminoácido, alterando a função biológica das proteínas (Ryter, 1990; Zoppi, 2004). A oxidação de proteínas por radicais livres pode também determinar sua degradação a peptídeos e eventualmente a seus respectivos aminoácidos (Halliwell & Gutteridge, 1999; Zoppi, 2004).

### **1.5 Estresse oxidativo na ilhota**

Newsholme e colaboradores (2007) revisaram a produção de espécies reativas nas células B, que ocorrem principalmente no citosol pela enzima NADPH oxidase e pelo vazamento de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial.

A enzima NADPH oxidase encontra-se na membrana plasmática das células B e é ativada via proteína quinase C. A NADPH oxidase reduz diretamente a molécula de oxigênio formando ânion superóxido (Oliveira *et al.*, 2003).

Na cadeia respiratória, pode ocorrer escape de elétrons os quais são capturados por moléculas de oxigênio circulantes. Quando o oxigênio é reduzido univalentemente, transforma-se em  $O_2^{\bullet-}$ , que é um radical livre. Quando o  $O_2^{\bullet-}$  é reduzido por mais um elétron ocorre formação de  $H_2O_2$ . A captação de um elétron adicional rompe a molécula de  $H_2O_2$ , produzindo  $HO^-$  (pouco reativo) e  $HO^{\bullet}$  (que constitui uma das espécies mais reativas que se conhece).

O aumento de glicose na célula B ativa o complexo NADPH oxidase, aumentando a produção de  $O_2^{\bullet-}$  no citosol da célula e o fluxo de elétrons na cadeia respiratória, possibilitando um maior escape de elétrons e consequentemente, aumento da formação de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  na mitocôndria. O aumento da formação desses EROs pode causar desbalanço redox na célula levando a uma condição de estresse oxidativo (Newsholme *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo está associado ao estado diabético (Yu, 1994). No diabetes tipo 1, a participação das EROs na disfunção das células B inicia-se por reações

autoimunes e por ação de citocinas inflamatórias (Rabinovitch, 1998). Animais diabéticos tipo 1, induzido por aloxana, são exemplos de como os radicais livres estão envolvidos com o diabetes experimental. Depois da captação pelas células B através do transportador de glicose GLUT2, a aloxana induz a geração de EROs por reação redox cíclica com formação de ácido dialúrico. Isto leva a uma necrose seletiva nas células B (Lenzen, 2008). A suplementação com antioxidantes, como SOD e vitamina E, removem eficientemente os oxidantes protegendo contra a ação diabetogênica da aloxana (Fischer & Hamburger, 1980; Slonim *et al.* 1983).

No diabetes tipo 2, a hiperglicemia induz a geração do  $O_2^{\bullet-}$  pela mitocôndria em células endoteliais e inicia um ciclo vicioso de reações oxidativas decorrentes do diabetes (Nishikawa *et al.*, 2000). Bindokas *et al.* (2003), medindo diretamente a concentração de superóxido em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos Zucker obesos e diabéticos (ZDF), modelo experimental de diabetes tipo 2, revelou que a geração de EROs está acoplada ao metabolismo mitocondrial e perturbação na função mitocondrial. O excesso de EROs prejudica a síntese de insulina (Droge, 2002; Evans *et al.*, 2003; Robertson, 2003) e ativa vias apoptóticas (Evans *et al.*, 2002; Mandrup-Poulsen, 2001), levando ao desenvolvimento do diabetes.

Tendo em vista dados da literatura acerca da ação das EROs nas células B, estas parecem estar sempre em um ténue limiar entre a sinalização da secreção da insulina e o dano intracelular que induz o desenvolvimento do diabetes (Leloup *et al.*, 2009). Nesse sentido, o papel dos antioxidantes intracelulares é de fundamental importância para o controle da ação de tais espécies.

## **1.6 Sistema de defesa antioxidante**

Apesar de o organismo produzir normalmente espécies reativas, estas são inativadas por mecanismos de defesas eficientes, a fim de combater a ação deletéria das EROs.

Os sistemas de defesa antioxidantes podem ser divididos em dois tipos: enzimáticos e não enzimáticos (Nordberg & Arner, 2001).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é constituído principalmente por 4 enzimas: Superóxido dismutase (SOD), Glutaciona Peroxidase (GPx)/Glutaciona Redutase (GR) e a Catalase.

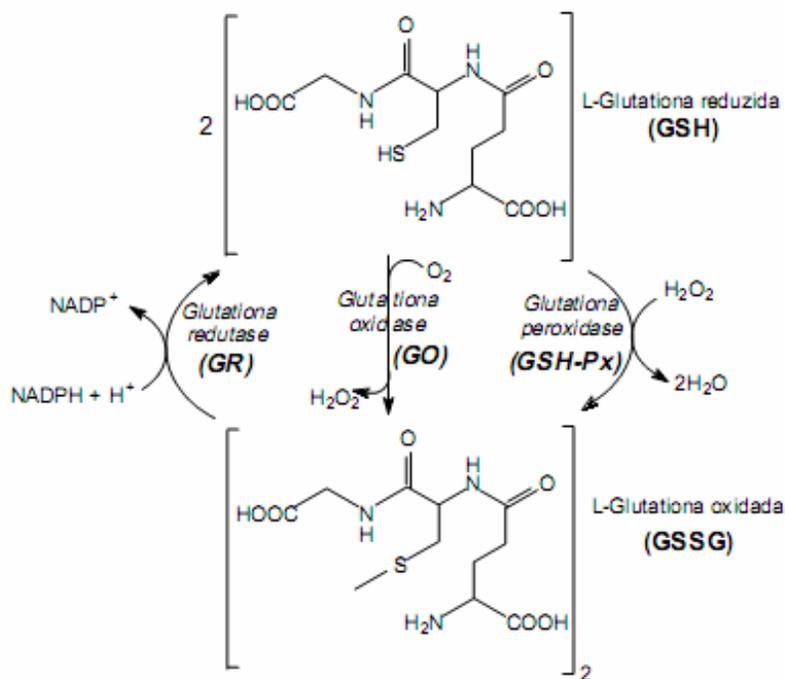
A SOD é a primeira enzima antioxidante a agir contra o  $O_2^{\bullet-}$ . As principais formas da SOD são as dependentes de cobre-zinco (Cu-Zn SOD), que atuam no citosol, e as dependentes de manganês (Mn-SOD), que atuam na mitocôndria (Yu, 1994; Halliwell & Gutteridge, 1999). Essa enzima age transformando o  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  e oxigênio ( $O_2$ ) (Reação 3).



**Reação 3:** Reação de dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ .

A atividade enzimática de GPx é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares (Meister & Anderson, 1983; Cohen & Hochstein, 1963).

Outra enzima que age conjuntamente com a GPx é a enzima glutathiona redutase (GR) (Meister & Anderson, 1983). Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutathiona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona (Esquema 2) (Meister & Anderson, 1983; De Souza, 2008).



**Esquema 2:** Interconversão de glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR) (Meister, & Anderson, 1983).

A catalase controla os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  através de sua degradação, formando  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (Yu, 1994) (Reação 4).



**Reação 4:** Degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$

Por outro lado, o sistema de defesa antioxidante não enzimático é composto por moléculas de baixo peso molecular com capacidade de proteger determinados alvos biológicos contra a oxidação. Tais moléculas podem ter origem endógena ou podem ser obtidas através da dieta (Sies, 1993). Dentre estas moléculas estão as vitaminas A, E e C e também a glutatona (GSH), que atua como potente antioxidante (Zoppi, 2004).

Para serem consideradas antioxidantes, as substâncias têm que apresentar pelo menos uma das três propriedades: supressão da formação de radicais livres (por quelação de metais ou por inibição de enzimas geradoras de radicais livres), eliminação ou desativação de radicais livres com formação de um produto estável, ou participação em processos de reparo de danos oxidativos (Bourne & Rice-Evans, 1999; Ribeiro *et al.*, 2005; De Souza, 2008).

Estas moléculas antioxidantes atuam na detoxificação das EROs, doando elétrons de suas moléculas para as moléculas dos radicais livres formados sem, no entanto, se transformarem em radicais reativos (Halliwell & Gutteridge, 1999). As vitaminas atuam de forma conjunta e em diferentes compartimentos intracelulares. Com características lipossolúveis, as vitaminas A e E se localizam inseridas nas membranas celulares, enquanto a vitamina C, por ser hidrossolúvel, atua no citosol e ainda participa na reoxidação das vitaminas lipossolúveis (Packer, 1997; Ji, 1999; Zoppi, 2004).

Dentre os antioxidantes endógenos, a GSH, um tripeptídeo  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, exerce importante papel no sistema de defesa antioxidante (Meister &

Anderson, 1983). Presente na maioria das células, a GSH tem sua capacidade redutora determinada pelo grupamento sulfidrila da cisteína. Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima GR, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (Gilbert & Mc Lean, 1990; De Souza, 2008).

### **1.7 Os sistemas antioxidantes na ilhota**

O NADPH, gerado na via das pentoses, geralmente está associado à redução de tióis (Filosa *et al.*, 2003). Porém, nas ilhotas de Langerhans, o fluxo da via das pentoses é menor comparado a outros tecidos. Desta forma, a célula B gera NADPH, principalmente, através das lançadeiras dependentes de piruvato, como a piruvato-citrato, isocitrato- $\alpha$ -cetoglutarato e piruvato-malato e também através de aminoácidos como glutamina, glutamato e, principalmente, leucina (MacDonald *et al.*, 2005).

Existem, portanto, enzimas que utilizam NADH ou NAD(P)H cujo equilíbrio cinético permite a conversão de uma forma em outra. Quando não consumidos no citosol, NADPH e NADH são transportados pelo envoltório mitocondrial por um sistema de lançadeiras, mantendo em equilíbrio as concentrações citoplasmáticas e mitocondriais. Além de facilitar o transporte de substâncias redutoras dentro da célula, sabe-se que tais lançadeiras são fundamentais ao metabolismo de glicose pela célula B (Dukes *et al.*, 1994).

As células B possuem sistemas antioxidantes, como aqueles que utilizam glutatona, que protegem contra os efeitos danosos das EROs. Aminoácidos, como a L-cisteína, são usados para a síntese de glutatona (Rasilainen *et al.*, 2002). Outro aminoácido sulfonado derivado da cisteína, a L-aurina, também pode proteger células B contra o  $H_2O_2$  e derivados, como o ácido hipoclorídico (Cherif *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 1998).

Por outro lado, a catalase utiliza um sítio ativo contendo  $Fe^{3+}$ , e outras enzimas ou mesmo proteínas que associam-se a íons como  $Cu^{2+}$  e adquirem atividade peroxidase nas concentrações altas de peróxido encontradas dentro da célula. Algumas dessas proteínas sofrem carbonilação e deaminação como resultado de reações com EROs, sendo inativadas e assim, preservando enzimas-chave na célula B (Akagawa *et al.*, 2002).

A relação entre a atividade metabólica na célula B e sua menor proteção enzimática contra EROs talvez se deve ao fato de estas EROs agirem como reguladores da metabolização de glicose. Ao interagirem com proteínas, as EROs causam oxidação de resíduos de cisteína e de sítios ativos contendo metais de transição regulando assim, enzimas-chaves para a produção de ATP, como a fosfofrutoquinase e a aconitase (Tsuura *et al.*, 1998).

Sabe-se que o acúmulo de certos metabólitos no citosol da célula B dá origem a EROs (Takahashi *et al.*, 2004). A interação dessas EROs com substâncias redutoras comumente origina o  $\text{OH}\cdot$  e o  $\text{O}_2\cdot^-$  (Neyens & Baeyens, 2003). A célula B expressa MnSOD na matriz mitocondrial e CuZnSOD no citosol, que convertem o  $\text{O}_2\cdot^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Na matriz mitocondrial, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é degradado ou difunde-se para o citosol. Tanto a inibição do efluxo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela produção citoplasmática (Oliveira *et al.*, 1999) como o influxo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno na célula facilitam a oxidação de tióis das membranas mitocondriais, o que provoca a abertura de poros na membrana mitocondrial interna (Kowaltowski *et al.*, 2001), a ativação da proteína UCP2 e o desacoplamento da produção de ATP pelo ciclo de Krebs (Echtay *et al.*, 2002). Gerando menos ATP, a célula passa a ter resposta diminuída a secretagogos como a glicose (Sakai *et al.*, 2003). Pelos poros abertos na membrana mitocondrial, ocorre entrada de líquido e vazamento para o citoplasma de citocromo C, iniciando a fragmentação do DNA nuclear por caspases, levando a célula à morte (Kowaltowski *et al.*, 2001).

Muitos são os trabalhos que associam a inativação de EROs com proteção da GSIS, em ilhotas isoladas ou *in vivo* (Welsh *et al.*, 1994, Kaneto *et al.*, 1999, Xu *et al.*, 1999).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  atravessa membranas lipídicas e as junções celulares na ilhota de Langerhans (Salvador *et al.*, 2001), podendo ser degradado na célula B, em outras células, ou mesmo no plasma por proteínas como a catalase (CAT), tioredoxina (TSH), tioredoxina peroxidase (TPx) ou o sistema glutationa/glutationa peroxidase (GPx). A célula B apresenta MnSOD, TSH, TPx, GSH e GPx na matriz mitocondrial, além de tióis reativos na membrana mitocondrial externa, que participam da reação  $2\text{RSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow \text{RSSR} + 2\text{H}_2\text{O}$  (Powis & Montfort, 2001). Há alguns anos levantou-se a hipótese de que a catalase também pudesse fazer uso de NADPH em baixas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma vez que a molécula da enzima possui um sítio para a ligação deste (Putnam *et al.*, 2000). Nesse caso, as elevadas concentrações de NAD(P)H encontradas na célula B favoreceriam esse tipo de reação, além de propiciar a comunicação entre os diversos

sistemas antioxidantes que podem funcionar em sinergismo (Robertson *et al.*, 2003; Nagababu *et al.*, 2003).

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1 OBJETIVO GERAL**

Apesar do imenso número de trabalhos relacionando o estresse oxidativo com mal-funcionamento das células B, existem raríssimos estudos em ilhotas de Langerhans avaliando o efeito do estresse oxidativo na secreção de insulina de ratos desnutridos. Desta forma este trabalho teve por objetivo responder a seguinte pergunta: A desnutrição protéica poderia alterar o estado redox na célula B?

A hipótese adotada foi que a desnutrição altera o balanço redox da célula B diminuindo a secreção de insulina.

## **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar:

- Peso corpóreo dos ratos;
- Peso dos órgãos;
- Ingesta alimentar e hídrica;
- Parâmetros bioquímicos para avaliação do estado nutricional;
- Tolerância à glicose;
- Quantificação do conteúdo protéico (SOD, CAT e GPx);
- Atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx);
- Secreção de insulina.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 Caracterização do modelo experimental

#### Animais e dieta:

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

**a) Controle (NP):** ratos que receberam dieta (confeccionada no laboratório) contendo 17% de proteína por todo o período experimental (30 a 90 dias), de acordo com a AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993).

**b) Desnutridos (LP):** ratos que receberam dieta (confeccionada no laboratório) contendo 6% de proteína por todo o período experimental (30 a 90 dias), de acordo com a AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993).

Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (6 animais por gaiola) sob condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de  $22 \pm 2$  °C. Durante todo o período experimental tiveram livre acesso à água e alimentos.

#### Peso corpóreo

O peso corpóreo de ratos controle (NP) e desnutridos (LP) foi avaliado semanalmente por um período de 60 dias.

#### Consumo alimentar e hídrico

O consumo alimentar e hídrico dos ratos foi verificado três vezes por semana. Os valores encontrados foram divididos pelo número de animais de cada caixa e o consumo relativo foi obtido dividindo o consumo pelo peso médio de cada grupo referente à semana avaliada.

### 3.2 Avaliação do estado nutricional

#### Avaliações Bioquímicas

Amostras de sangue foram obtidas por via caudal e centrifugadas a 1.800 rpm por 15 minutos em 4°C. O plasma foi separado e utilizado para a dosagem de proteínas totais e albumina com o kit PROtal (Laborlab), adaptado para microensaio e insulina

por radimunoensaio (Scott *et al.*, 1981). A glicemia foi analisada utilizando glicosímetro (Accu-Check Advantage II).

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

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

### **3.4 Isolamento de ilhotas**

Os animais foram sacrificados por decapitação. Após uma incisão abdominal e oclusão da extremidade do ducto biliar comum, foi inserida uma cânula através de uma incisão na parte proximal (hepática) neste ducto. Foi injetado através do ducto pancreático cerca de 10 mL/animal de solução 0,8 mg/mL para animais controle e 0.7 mg/mL de colagenase tipo V para animais desnutridos. Retirado o pâncreas, o órgão foi mantido por cerca de 20 min a 37 °C para digestão. O material foi lavado repetidamente com solução de Hanks (em mM: 137 NaCl, 5.4 KCl, 4.2 NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 MgSO<sub>4</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>) contendo 5.6 mM de glicose e 0.5 g/L de albumina. Por decantação, as ilhotas foram separadas e coletadas manualmente sob lupa por uma pipeta siliconizada.

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

As ilhotas coletadas foram transferidas para placas de cultura com 24 reservatórios contendo 1 mL de solução de Krebs-Hepes (KRBH) (em mM: 115 NaCl, 10 NaHCO<sub>3</sub>, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes) pH 7.4 suplementada com 0,3% de albumina bovina (m/v) e 5,6 mM de glicose com 0, 10, 100, 150, 200, 250 ou 300 µM de peróxido de hidrogênio e com ou sem 10 mM de n-acetil-L-cisteína (NAC). Em todos os experimentos 5 ilhotas foram colocadas em cada reservatório. A seguir, as placas foram mantidas por 30 min a 37 °C em ambiente controlado (gaseificado com 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>). A solução foi rapidamente removida e substituída por nova solução

de incubação contendo 2,8, 8,3, 11, 22 ou 33 mM de glicose com ou sem peróxido de hidrogênio. Após 60 min de incubação, as placas foram resfriadas em banho de gelo e o sobrenadante removido, transferido para tubos de ensaio e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (Scott *et al.*, 1981; Tanaka *et al.*, 2002).

### **3.6 Western blotting**

O conteúdo protéico foi avaliado pela técnica de “Western blotting”. As ilhotas foram rompidas e homogeneizadas por sonicação com 3 pulsos de 4 segundos com 30 segundos de intervalo entre os pulsos (VirSoni 60). Os extratos foram centrifugados a  $15.000 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min para remoção do material insolúvel. As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DTT 10 mM, e fervidas em banho seco por 5 min. Aliquotas contendo 30  $\mu\text{g}$  de proteína foram aplicadas em SDS-PAGE (10% Tris acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose de  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  (BioRad). Esta foi incubada por 2 h em solução bloqueadora de leite desnatado (5%) para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários policlonais: anti-catalase (Sigma), anti-superóxido dismutase 1 (Abcam), anti-glutationa peroxidase 1 (Abcam) e com o anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ -tubulina (Cell Signaling). O anticorpo da superóxido dismutase 1, catalase, e da  $\alpha$ -tubulina foram diluídos 1:1000 em BSA 3% e 1:625 para o anticorpo da anti-glutationa peroxidase 1. Após o tempo de incubação, as membranas foram lavadas e em seguida incubadas com anticorpo secundário conjugado com horseradish peroxidase (Invitrogen), diluído 1:10000 em leite em pó desnatado 5%, por 2h. Foi utilizada solução basal (trisma base 10 mM pH: 7,5, 150 mM NaCl e 0.05% tween 20) para as lavagens e diluições. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para a determinação auto-radiografia das bandas por quimioluminescência. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation).

### 3.7 Atividade enzimática

#### Catalase (CAT)

Os ensaios para dosagem da atividade da catalase foram conduzidos segundo Aebi (1984), adicionando-se as amostras de ilhotas a tampão fosfato 50 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM. A queda nos valores de absorvância do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi seguida por 30 segundos a 240 nm, segundo a reação:



Para o cálculo da atividade desta enzima na ilhota foi utilizada a equação  $A = E \cdot c \cdot l$ ; onde A é a absorvância da amostra, E = 13.600 M.min<sup>-1</sup>, c é a concentração de ácido tiobis (2-nitrobenzóico) e l é o caminho ótico da cubeta. A leitura da absorvância em um determinado intervalo de tempo nos permite determinar a sua diferença e nos fornece a velocidade da reação enzimática catalisada pela enzima catalase. O valor de coeficiente de extinção Molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 43,6 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. (Andersen *et al.*, 1997).

#### Superóxido dismutase (SOD)

Neste ensaio foi empregado o método descrito por Winterbourn *et al.* (1975), onde as ilhotas foram colocadas em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,4), sonicadas e centrifugadas a 12000 rpm a 4°C. Foram adicionados a 20 µg de proteína da amostra, 150 µL da solução de hipoxantina (0,1 mM), xantina oxidase (0,07 U) e nitrobluetetrazolium (NBT - 0,6 mM) (Winterbourn *et al.*, 1975). As absorvâncias foram lidas a 560 nm em leitor de ELISA. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

#### Glutationa peroxidase (GPx)

As ilhotas foram colocadas em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,4), sonicadas e centrifugadas a 12000 rpm, a 4°C, por 15 min. A 20 µg de proteína da amostra, foram adicionados 150 µL de solução de glutatona reduzida (10 mM), NADPH (4 mM) e GR

(1U) e 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25 mM), de acordo com método de Yoshikawa *et al.*, (1993). A absorvância foi determinada a 365 nm, entre 1 e 10 min em leitor de ELISA.

### **3.8 Análise Estatística**

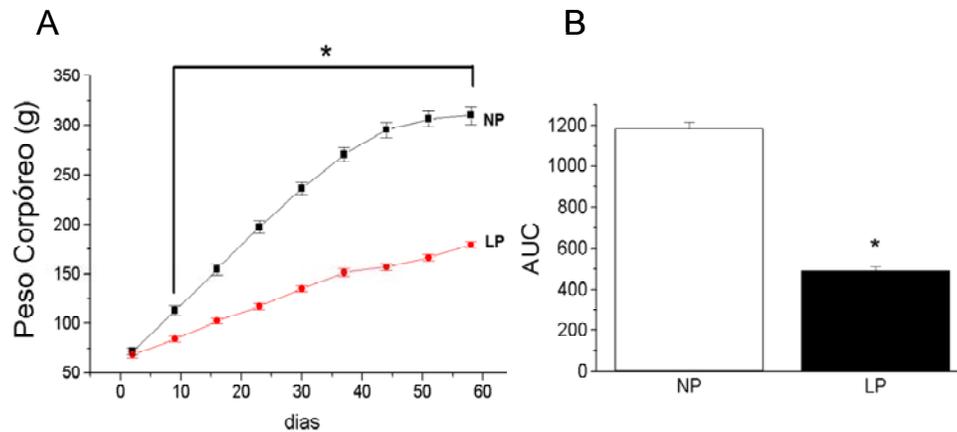
Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão e foram aplicados os testes “t” student e ANOVA utilizando o teste *post hoc* de Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi de  $p < 0.05$ .

## **4. RESULTADOS**

## 4.1 Caracterização do modelo de desnutrição protéica

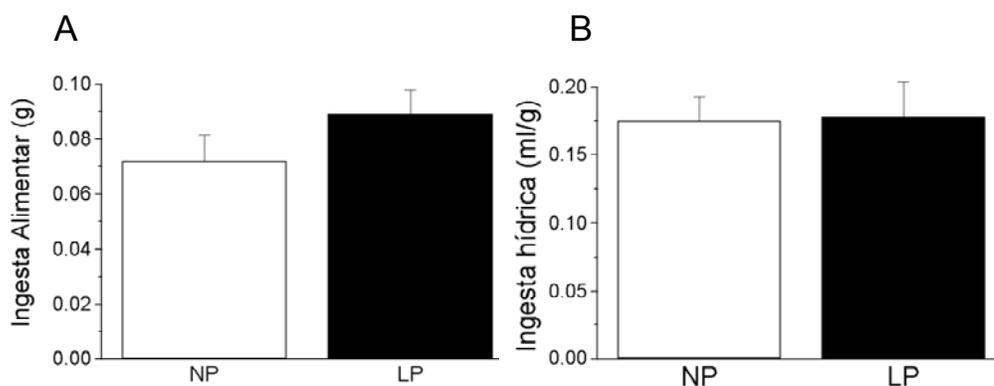
### 4.1.1 Parâmetros antropométricos, ingesta alimentar e hídrica

A figura 1 mostra o peso corpóreo ao longo do período experimental de ratos controle (NP) e desnutrido (LP). Observa-se que o grupo desnutrido apresentou ganho de peso aproximadamente 50% menor do que o grupo controle.



**Fig.1** - (A) Peso corpóreo de ratos Wistar machos controle (NP) e desnutrido (LP) entre os 21 e 81 dias de vida e (B) área abaixo das curvas de evolução de peso (n = 12). Os valores são a média  $\pm$  EPM. \* diferença significativa.  $P < 0,05$ . Teste “t” student.

O consumo alimentar relativo (Figura 2A) bem como o consumo hídrico relativo (Figura 2B) não apresentaram diferença significativa entre os grupos NP e LP.



**Fig.2** – Ingesta alimentar (A) e hídrica (B) relativa de ratos Wistar machos controle (NP) e desnutrido (LP) acompanhados por 60 dias (n =12). Os valores são a média ± EPM. Para todos os grupos experimentais. Teste “t” student.

Ao final do período experimental, os ratos foram sacrificados e os órgãos removidos e pesados. A tabela 1 mostra o valor absoluto do peso corpóreo, coração, fígado, baço, rim, gordura retroperitoneal e gordura perigonadal de ratos NP e LP.

**Tab.1** - Valor Absoluto do peso corpóreo, coração, fígado, baço, rim, gordura retroperitoneal e gordura perigonadal de ratos controle (NP) e desnutridos (LP) tratados durante 60 dias.

	NP	LP
<b>Massa Corpórea (g)</b>	451.7 ± 12.173	262.7 ± 17.473 *
<b>Coração (g)</b>	1.237 ± 0.019	0.854 ± 0.026 *
<b>Fígado (g)</b>	17.193 ± 0.781	7.717 ± 0.462 *
<b>Baço (g)</b>	0.986 ± 0.036	0.648 ± 0.041 *
<b>Rim (g)</b>	2.592 ± 0.056	1.39 ± 0.050 *
<b>Gordura Perigonadal (g)</b>	9.252 ± 0.511	3.34 ± 0.234 *
<b>Gordura Retroperitoneal (g)</b>	9.556 ± 0.494	3.854 ± 0.780 *

1 Valores representam média ± EPM, n = 10.

2 \* representa diferença estatística, P < 0.05 (Teste “t” student).

Pode-se observar que os animais desnutridos apresentam redução do valor absoluto do peso de todos os tecidos estudados em relação aos animais controle (Tabela 1). Porém, quando observa-se o peso relativo verifica-se que o peso do rim não apresentou diferença significativa entre os grupos NP e LP indicando que os órgãos estão proporcionais ao tamanho do animal. No entanto, o peso relativo do fígado e das gorduras perigonadal e retroperitoneal mostrou-se reduzido. Por outro lado os pesos do coração e do baço apresentaram-se aumentados nos ratos desnutridos. (tabela 2).

**Tab.2** - Valor Relativo do peso do coração, fígado, baço, rim, gordura peritoneal e gordura gonadal de ratos controle (NP) e desnutridos (LP) tratados durante 60 dias.

	NP	LP
<b>Coração</b>	0.275 ± 0.008	0.335 ± 0.018 *
<b>Fígado</b>	3.854 ± 0.248	3.074 ± 0.258 *
<b>Baço</b>	0.219 ± 0.008	0.253 ± 0.017 *
<b>Rim</b>	0.576 ± 0.127	0.551 ± 0.039
<b>Gordura Perigonadal</b>	2.045 ± 0.087	1.346 ± 0.139 *
<b>Gordura Retroperitoneal</b>	2.118 ± 0.097	1.239 ± 0.123 *

<sup>1</sup> Valores representam média ± EPM, n = 10.

<sup>2</sup> \* representa diferença estatística, P < 0.05 (Teste "t" student).

#### 4.1.2 Parâmetros bioquímicos

Na tabela 3 pode-se observar que os valores de proteína total, albumina plasmática e insulina em jejum se mostraram reduzidas nos ratos desnutridos.

**Tab. 3** - Proteínas totais, albumina, glicose e insulina plasmática de ratos controles (NP) e desnutridos (LP) tratados durante 60 dias.

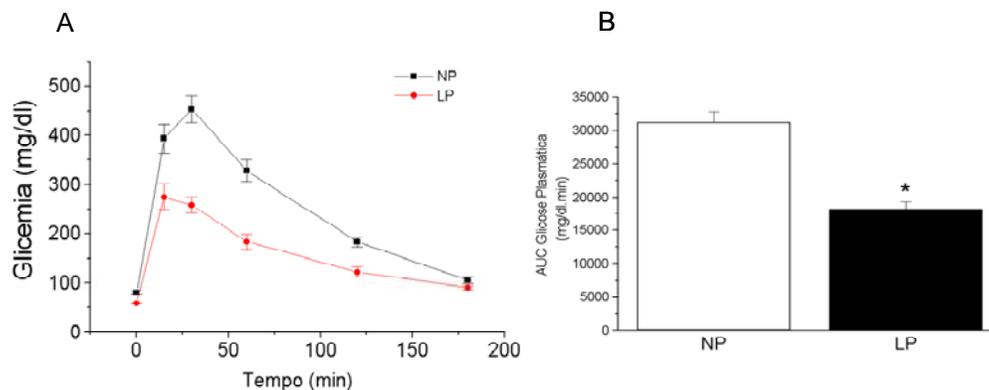
	<b>NP</b>	<b>LP</b>
<b>Proteína total alimentado (g/dl)</b>	6,69 ± 0,21	5,78 ± 0,22 *
<b>Proteína total jejum (g/dl)</b>	7,77 ± 0,33	6,55 ± 0,34 *
<b>Albumina alimentado (g/dl)</b>	2,89 ± 0,05	2,72 ± 0,09 *
<b>Albumina jejum (g/dl)</b>	2,98 ± 0,10	2,65 ± 0,08 *
<b>Glicose jejum (mg/dl)</b>	69 ± 1.88	65.69 ± 2.00
<b>Insulina jejum (ng/ml)</b>	1,04 ± 0,12	0,71 ± 0,13

1 Valores representam média ± EPM. Para Proteína total alimentado n = 9, proteína total jejum n = 5-6, albumina alimentado n = 9, albumina jejum n = 10, glicose jejum n = 13, insulina jejum n = 8-10.

2 \* representa diferença estatística, P < 0.05 (Teste "t" student).

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

Para investigar a tolerância à glicose nos ratos NP e LP foi realizado o ipGTT aos 90 dias. Após a administração de 2g de glicose/Kg de peso na cavidade intraperitoneal do animal, a glicemia foi medida ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos). A figura 3a mostra as curvas glicêmicas de animais NP e LP. É possível observar uma maior queda da glicemia no grupo LP comparada ao grupo NP. O aumento da tolerância à glicose apresentada pelo grupo LP pôde ser evidenciado pela menor área abaixo da curva (figura 3b).

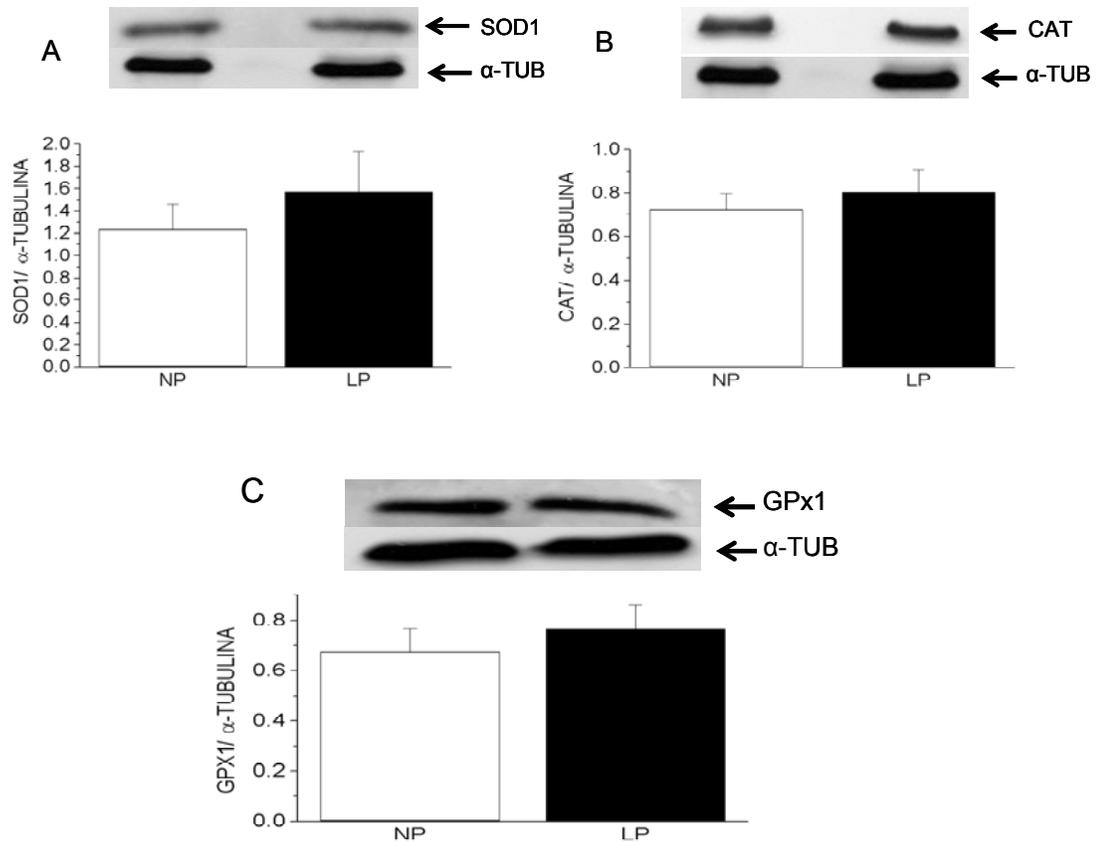


**Fig. 3** - Glicemia durante o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) (A) e área abaixo da curva glicêmica (B) de ratos controle (NP) e desnutridos (LP), n = 9-10. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. \* diferença significativa.  $P < 0.05$  (Teste “t” student).

#### 4.1.4 Conteúdo protéico de enzimas antioxidantes (Western Blotting)

Após caracterização do modelo experimental, investigou-se o sistema enzimático antioxidante em ilhotas isoladas. Inicialmente quantificou-se a conteúdo protéico e, em seguida, foram analisadas as respectivas atividades enzimáticas.

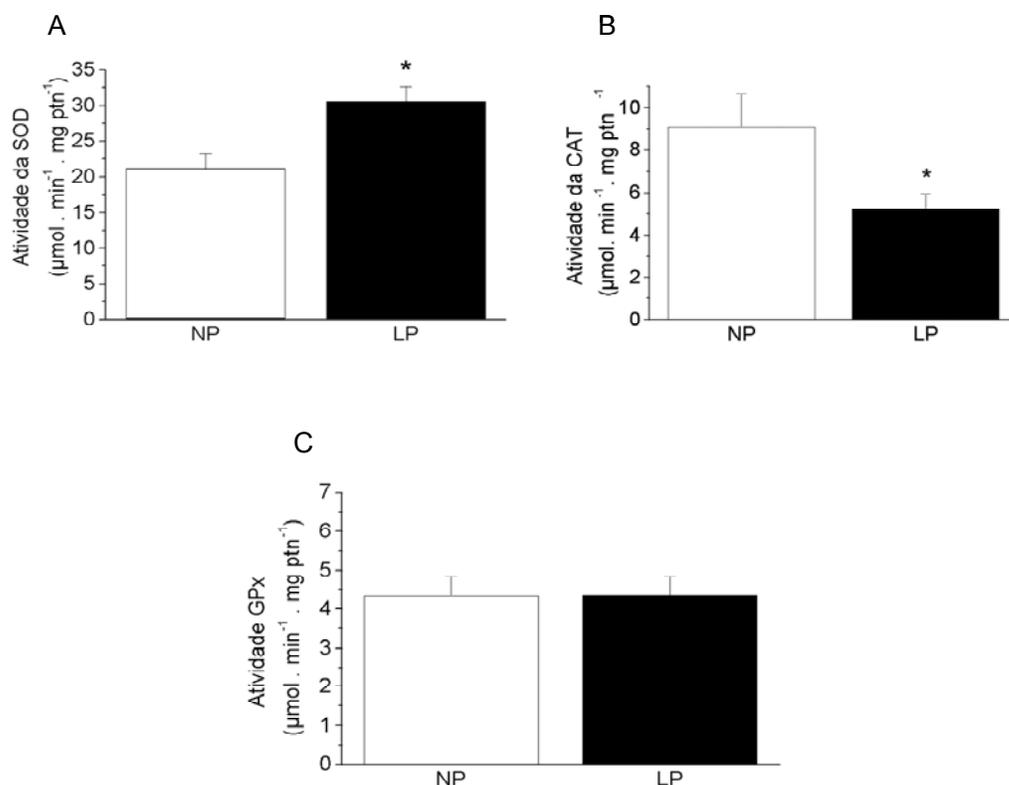
Analisando o conteúdo protéico das enzimas antioxidantes superóxido dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase 1 (GPx1) (figura 4A, 4B e 4C, respectivamente), observamos que não houve diferença significativa entre os grupos NP e LP.



**Fig. 4** – Conteúdo protéico em ilhotas de ratos controle (NP) e desnutridos (LP): da superóxido dismutase 1 (SOD1) (A); catalase (CAT) (B); glutathiona peroxidase 1 (GPx1) (C). Os dados foram normalizados pela  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ -TUB) (n = 5-9). Valores representam média  $\pm$  EPM (Teste “t” student).

#### 4.1.5 Atividade das enzimas antioxidantes

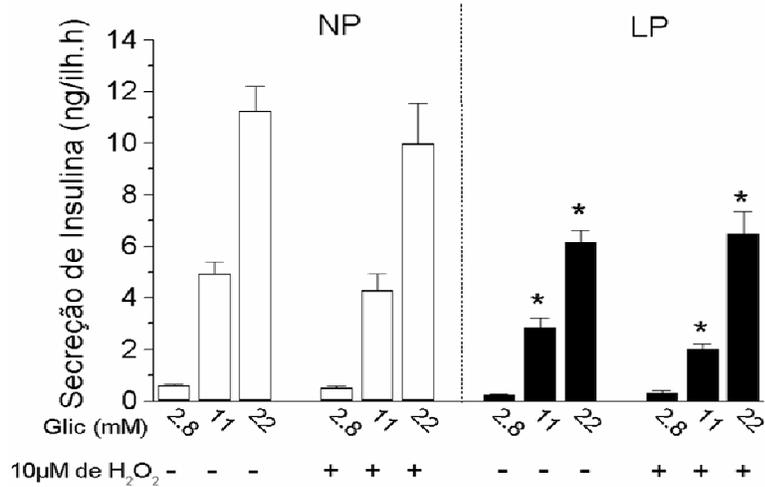
Diferentemente dos resultados obtidos do conteúdo protéico, observou-se um aumento da atividade da SOD1 (figura 5A) e uma diminuição na atividade da CAT (figura 5B) no grupo de animais LP em relação aos grupos NP. Já a atividade da GPx1 não apresentou diferença significativa entre os grupos (figura 5C).



**Fig. 5** – Atividade das enzimas antioxidantes em ilhotas de ratos controle (NP) e desnutridos (LP). Superóxido dismutase 1 (SOD1) (A); catalase (CAT) (B); glutatona peroxidase 1(GPx1) (C), (n = 4). Valores representam média ± EPM. \* representa diferença significativa. P < 0.05 (Teste “t” student).

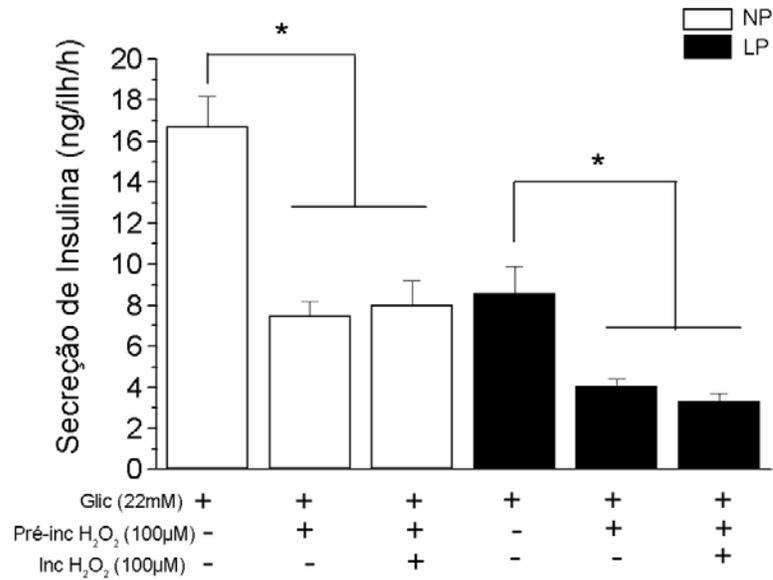
#### 4.1.6 Secreção estática de insulina

Após 8 semanas recebendo dieta normoprotéica (NP - 17%) e dieta hipoprotéica (LP – 6%), os animais tiveram as ilhotas isoladas e submetidas à secreção estática de insulina. Durante o período de pré-incubação (30 minutos) as ilhotas foram expostas a 5.6 mM de glicose com ou sem 10 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após esse período de pré-incubação, as ilhotas ficaram expostas por 1 hora em tampão contendo diferentes concentrações de glicose (2.8, 11 e 22 mM), conforme observado na figura 6. Observa-se que o grupo LP apresentou menor secreção de insulina em relação ao grupo NP. Além disso, a exposição a 10 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não prejudicou a secreção de insulina quando comparada ao mesmo grupo sem o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



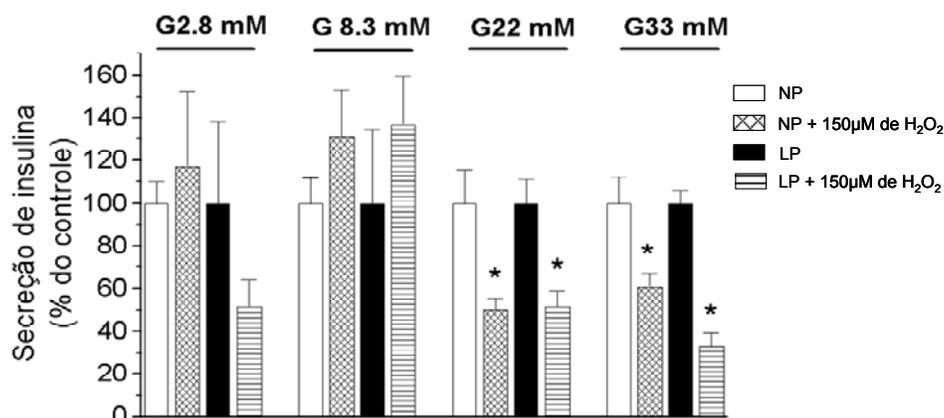
**Fig. 6** - Secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP) e desnutrido (LP). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com ou sem 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos. Após a retirada do meio de pré-incubação, as ilhotas foram expostas durante 1 hora à solução de Krebs contendo 2.8, 11 e 22.2 mM de glicose (n = 12- 45). Média ± EPM. \* representa diferença estatística, para as mesmas condições, em relação ao grupo controle. P < 0.05 (Teste “t” student).

A figura 7 mostra a secreção de insulina de ilhotas que foram pré-incubadas por 30 min com 5.6 mM de glicose, com ou sem 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em seguida incubadas com 22 mM de glicose, com ou sem 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Observa-se que as ilhotas expostas a 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram uma redução na secreção de insulina, quando comparadas com o grupo NP correspondente (sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Porém, não houve diferença significativa na secreção de insulina entre as ilhotas expostas a 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 ou 90 minutos.



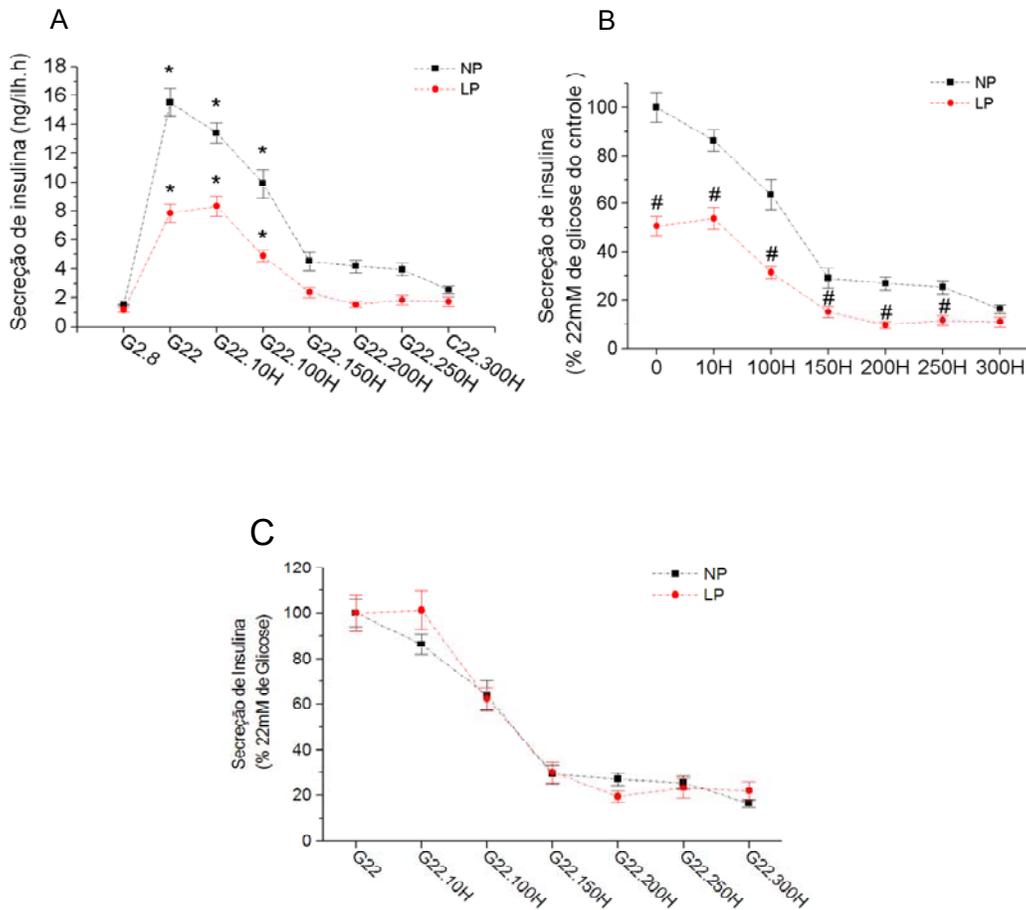
**Fig. 7** - Secreção estática de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP) e desnutridos (LP). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com ou sem 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos (Pré-inc). Após a retirada do meio de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 22.2 mM de glicose (Inc) com ou sem 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora (n = 6). Média ± EPM. \* representa diferença estatística em relação ao respectivo controle. P < 0.05 (ANOVA one-way e student- Newman-Keuls test).

A figura 8 mostra o percentual da secreção de insulina de ilhotas de ratos NP e LP (em função do grupo NP). As ilhotas foram pré-incubadas com 5.6 mM de glicose com ou sem 150 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, em seguida, incubadas por 1 hora em presença de diferentes concentrações de glicose (2.8, 8.3, 22 e 33 mM). Observa-se que as ilhotas que ficaram expostas a 150 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e alta glicose (22 e 33 mM) tiveram uma redução na secreção de insulina quando comparadas ao mesmo grupo que não foi exposto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Fig. 8** – Percentual da secreção máxima de insulina (NP) por ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP - barra branca), NP + 150µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (barra xadrez), desnutrido (LP – barra preta) e LP+ 150µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (barra listrada). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com ou sem 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas durante 1 hora à solução de Krebs contendo 2.8, 8.3, 22.2 e 33.3 mM de glicose (n = 6-18). Média ± EPM. \* representa diferença significativa comparada com o grupo controle para cada condição de glicose.

A figura 9 mostra a secreção de insulina, percentual da secreção em relação ao NP e percentual da secreção máxima (figuras 9A, B e C respectivamente) em ilhotas de animais controle e desnutrido que ficaram expostas a 5.6 mM de glicose e diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 10, 100, 150, 200, 250 e 300 µM) durante 30 min e incubadas com 2.8 ou 22 mM de glicose por 1h. Observa-se que tanto a secreção das ilhotas de animais controle quanto de animais desnutridos expostas a alta glicose e concentrações acima de 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> retornam a valores basais (2.8 mM de glicose) (figura 9A). A secreção dos animais LP é menor em relação ao grupo NP em todas as condições, exceto, em ilhotas que ficaram expostas a alta glicose (22 mM) e alta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 µM) (figura 9B). A figura 9C mostra que a secreção de insulina modulada pelo estado redox, nas ilhotas pancreáticas, foi similar entre os grupos NP e LP.



**Fig. 9** - Secreção estática de insulina, percentual da secreção em relação ao controle e percentual da secreção máxima (figuras 9A, B e C respectivamente) de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP) e desnutridos (LP). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com 0, 10, 100, 150, 200, 250 ou 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 30 minutos. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 22.2 mM de glicose por 1 hora ( $n = 7-20$ ). Média  $\pm$  EPM. \* representa diferença estatística em relação ao G2.8 do mesmo grupo experimental. # representa diferença estatística entre os grupos.  $P < 0.05$  (ANOVA one-way e student-Newman-Keuls test).

Tendo em vista o perfil de queda similar dos grupos em 22 mM de glicose, resolvemos então aumentar o grau de toxicidade utilizando 33 mM de glicose. A figura 10 mostra a secreção de insulina, percentual da secreção em relação ao controle e percentual da secreção máxima (figuras 10A, B e C respectivamente) de ilhotas pré-incubadas em 5.6 mM de glicose e diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0, 10, 100, 150, 200, 250 e 300  $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos e incubadas com 33 mM de

glicose por 1h. Observou-se que a secreção das ilhotas dos animais desnutridos quando expostos a 33 mM de glicose e concentrações acima de 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> retorna a secreção basal (2.8 mM de glicose) já nos animais NP a secreção de insulina só retorna a valores basais quando expostas a 33 mM de glicose e concentrações maiores que 300  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 10A). A secreção dos animais LP é menor em relação ao grupo controle em todas as condições (figura 10 B). A figura 10 C mostra que as ilhotas dos ratos LP possuem menor capacidade de manutenção no balanço redox, reduzindo a secreção de insulina quando expostas a 33 mM de glicose e a partir de 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

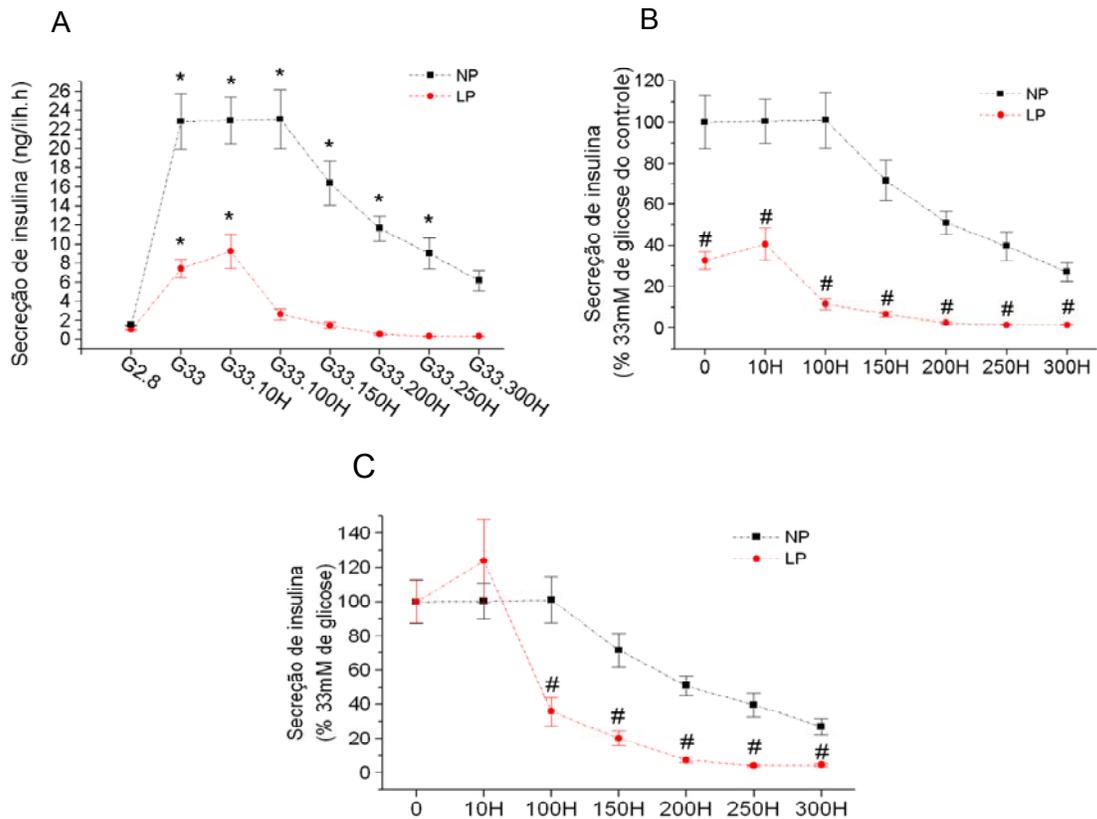
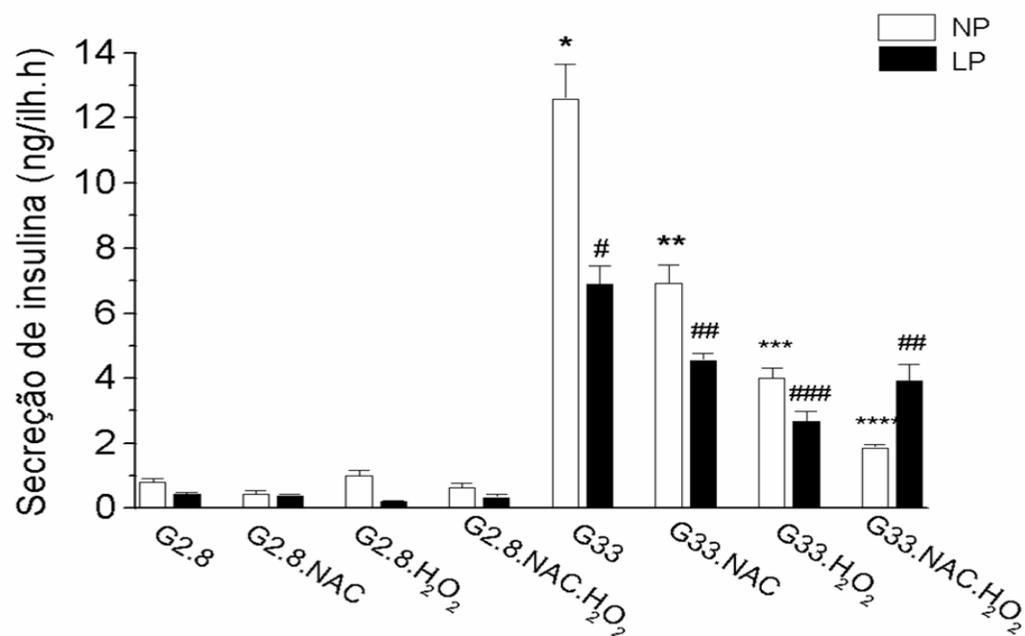


Fig. 10 - Secreção estática de insulina, percentual da secreção em relação ao controle e percentual da secreção máxima (figuras 10A, B e C respectivamente) de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP) e desnutridos (LP). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com 0, 10, 100, 150, 200, 250 ou 300  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas à solução de Krebs contendo 33 mM de glicose por 1 hora (n = 6 -8). Média  $\pm$  EPM. \* representa diferença estatística em relação ao G2.8 do mesmo grupo experimental. # representa diferença estatística entre os grupos. P < 0.05 (ANOVA one-way e student-Newman-Keuls test).

A partir desses resultados, resolvemos verificar o balanço redox dessas ilhotas utilizando então,  $H_2O_2$  e N-acetil-cisteína (NAC). Para isso, as ilhotas isoladas de ratos controle e desnutrido foram pré-incubadas por 30 minutos em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose, na ausência ou presença de 150  $\mu M$   $H_2O_2$ , na ausência ou presença de 10 mM de NAC, ou na presença de ambos (150  $\mu M$   $H_2O_2$  + 10 mM de NAC). Após este período, a solução foi retirada e as ilhotas foram incubadas durante 1 hora em solução Krebs contendo 2.8 ou 33.3 mM de glicose (Figura 11). Observou-se que ilhotas expostas a 33mM de glicose, tanto de animais LP como animais NP, apresentaram uma diminuição na secreção de insulina quando expostas ao  $H_2O_2$ , ou NAC, ou na presença dos dois tratamentos. A secreção de insulina das ilhotas dos ratos controle incubadas com  $H_2O_2$  + NAC foi menor quando comparado à secreção das ilhotas expostas a apenas um dos tratamentos. Por outro lado, a presença de NAC restabeleceu parcialmente a secreção de insulina em ilhotas de animais LP expostas a 150  $\mu M$   $H_2O_2$ .



**Fig.11** – Secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (NP) e desnutrido (LP). As ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5.6 mM de glicose com ou sem 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na ausência ou presença de 10 mM de NAC e na presença de 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 10 mM de NAC durante 30 minutos. Após a retirada do líquido de pré-incubação, as ilhotas foram expostas durante 1 hora à solução de Krebs contendo 2.8 ou 33.3 mM de glicose (n = 6-12). Média  $\pm$  EPM. Os símbolos diferentes representam diferença significativa dentro do mesmo grupo. P < 0.05 (ANOVA one-way e student-Newman-Keuls test e Teste “t” student).

## **5. DISCUSSÃO**

---

Tendo em vista que a modulação da secreção de insulina pelas EROs tem sido descrita em condições fisiológicas e, considerando-se a hipótese de que animais submetidos à restrição protéica teriam menor capacidade antioxidante, nosso objetivo foi avaliar quanto das modificações na secreção de insulina na desnutrição é devido ao desbalanço redox.

Em acordo com resultados prévios de nosso laboratório, os parâmetros gerais mostram que o protocolo de desnutrição foi eficiente nos animais utilizados neste estudo, induzindo as alterações gerais esperadas. Assim, os animais LP tiveram um ganho de peso aproximadamente 50% menor do que os grupos NP, característica observada na desnutrição infantil e em modelos experimentais de desnutrição (Ferreira *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Filiputti, 2006; Filiputti *et al.*, 2008). A redução do ganho de peso na desnutrição tem sido relacionada a alterações funcionais e morfológicas, principalmente no pâncreas exócrino e no epitélio entérico, que comprometem a digestão e absorção de nutrientes (Torun *et al.*, 1994). Dessa forma, a ingestão inadequada de proteínas retarda o crescimento e pode levar o organismo a redução do aproveitamento alimentar (Manzano, 2001; Marcondes, 1976). O baixo peso corporal, relacionado à redução na absorção do alimento, em animais submetidos à desnutrição protéica é um fenômeno bastante relatado na literatura (Latorraca *et al.*, 1998; Pennington *et al.*, 2001). A diferença de peso corporal entre os animais LP e NP, provavelmente, foi desencadeada pela diferença no teor protéico da dieta, uma vez que as dietas tinham o mesmo conteúdo energético e o consumo alimentar e hídrico relativo não diferiu entre os grupos.

A ingesta alimentar absoluta dos animais LP apresentou-se diminuída em relação aos animais NP em estudos realizados com ratos machos submetidos à dieta hipoprotéica (6%) durante a fase intra-uterina e no período de lactação. (Latorraca *et al.*, 1998). Em outros estudos, utilizando o mesmo modelo experimental de desnutrição, Filiputti (2006) descreve o consumo relativo alimentar aumentado em ratos desnutridos por 3 meses. Já em nosso estudo, o consumo alimentar e hídrico não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais quando normalizados pelo peso, embora tenha ocorrido uma tendência do consumo alimentar dos ratos LP em superar o consumo dos ratos NP. O fato de acompanharmos a ingesta alimentar apenas por 60 dias, pode ser o motivo de não termos observado um aumento significativo na ingesta do grupo LP em relação ao grupo NP (Filiputti, 2006).

De maneira geral, tanto em humanos quanto em animais, a desnutrição é responsável por efeitos adversos na homeostase de diversos órgãos e tecidos como fígado, pâncreas, músculo dentre outros (Fagundes *et al.*, 2009). Os níveis circulantes de ácidos graxos livres (AGL) são mais elevados em animais LP, o que ajuda a explicar o menor peso relativo da gordura perigonadal e retroperitoneal encontrado em nossos animais, uma vez que esses AGLs podem ser provenientes da quebra dos triglicerídeos nos adipócitos (Filiputti *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2003).

No que diz respeito ao peso dos órgãos e tecidos avaliados, especificamente em relação ao baixo peso relativo do fígado, sabe-se que, para a manutenção de sua homeostase, o organismo prioriza a perda da massa hepática com quadros de hipoplasia e atrofia, em vez de alterar sua função. A desnutrição associa-se à perda de massa hepática para garantir a disponibilidade de energia a órgãos importantes, como coração e cérebro (Guzmán-Silva *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 1995). Especialmente em fases iniciais da vida, a desnutrição é capaz de produzir impactos severos, levando inclusive a distúrbios cardiovasculares (Loss *et al.*, 2007). Loss e colaboradores (2007) descrevem um aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos Fischer machos submetidos à restrição protéica. Sabe-se que o aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca podem levar a uma hipertrofia cardíaca, o que justificaria o aumento da massa desse órgão (Penitente *et al.*, 2007).

O baço é o maior órgão linfático e faz parte do sistema retículo-endotelial, participando dos processos de hematopoiese e hemocaterese. Tem importante função imunológica de produção de anticorpos e linfócitos, protegendo contra infecções, e a esplenectomia determina capacidade reduzida na defesa contra alguns tipos de infecção (Cadili *et al.*, 2008). O kwashiokor é acompanhado de uma reação inflamatória sistêmica, a despeito da hipercortisolemia, cuja origem é disputada entre várias teorias. Uma delas é a maior susceptibilidade dos desnutridos a agentes infecciosos ou endotoxinas como a aflatoxina B1, relativamente comum nos cereais consumidos por algumas populações estudadas e portadoras de lesões hepáticas (Hendrickse, 1988), fato que explicaria o aumento do baço.

Embora a redução do peso corpóreo possa ser utilizada como um indicativo básico de desnutrição (Lucas, 1998), outros fatores característicos de um quadro de desnutrição foram apresentados em nossos resultados, tais como: baixos níveis de albumina plasmática, proteínas totais e insulina em jejum de acordo com dados já muito

bem estabelecidos pelo nosso grupo de pesquisa (Ferreira *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Filiputti, 2006; Filiputti *et al.*, 2008).

A maior tolerância à glicose apresentada por ratos desnutridos também foi constatada em outros estudos, semelhantes ao nosso, no qual foram utilizados ratos submetidos à desnutrição (5% de proteína) comparados a ratos controle (15% de proteína) (Okitolonda *et al.*, 1987; Escriva *et al.*, 1991). Diante desses parâmetros é possível afirmar que a ração composta de 6% de proteína é eficaz na promoção de um quadro de desnutrição experimental que se assemelha ao quadro de desnutrição humana.

### **5.1 Secreção de insulina, desnutrição protéica e estado redox**

A secreção de insulina é controlada por nutrientes e também por aspectos hormonal, neural e farmacológico. A glicose é conhecida na literatura como sendo o principal estimulador da secreção de insulina (Gembal *et al.*, 1992). A ativação das vias glicolítica e oxidativas pela glicose tem sido muito bem documentada resultando na geração de ATP, o qual é um importante sinalizador na transdução de sinal da célula B (Bindokas, 2003; Pi *et al.*, 2007). Apesar do aumento na razão ATP/ADP ser conhecida como o principal sinal mitocondrial, estudos demonstram que a regulação da secreção de insulina pode não ser restrita ao aumento na síntese de ATP, e experimentos indicam que fatores mitocondriais envolvidos no acoplamento estímulo/secreção induzido por glicose são necessários, entretanto esses mecanismos ainda não são conhecidos (Maechler *et al.*, 1998). MacDonald *et al.* (2005) reuniram uma série de evidências que demonstram o papel desempenhado por intermediários metabólicos produzidos na mitocôndria ou após sua cataplerose e posterior metabolização no citosol, tais como: malonil-CoA, NADPH e DAG que também atuam na regulação da secreção de insulina. Em adição, outros estudos mostram ainda, que as EROs, principalmente as produzidas na mitocôndria, são sinais obrigatórios para que a secreção de insulina ocorra (Leloup *et al.*, 2009).

## 5.2 Sistema antioxidante enzimático

As células B possuem um sistema antioxidante enzimático a fim de manter a capacidade catalítica e converter  $O_2\cdot^-$  em  $H_2O_2$  e este em água e  $O_2$  (Gurgul *et al.*, 2004). A expressão e atividade dessas enzimas antioxidantes, em ilhotas pancreáticas de animais roedores, apresentam-se bastante reduzidas comparadas a outros tecidos (Grankvist *et al.*, 1981; Tiedge *et al.*, 1998). Estudos que mensuraram a atividade destas enzimas em ilhotas de ratos Wistar revelaram níveis em ordem decrescente das atividades da Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, catalase e GPx respectivamente (Tonooka, 2007; Theys, 2009). Apesar da atividade das enzimas antioxidantes em ilhotas pancreáticas, estímulos agudos de 60 minutos induzidos por 16.7 mM de glicose, embora tragam um componente de toxicidade, induzindo a produção de EROs, também resultam em pronto aumento na atividade da SOD e da GPx. Em adição, a atividade da SOD aumenta proporcionalmente em relação à concentração de glicose e a secreção de insulina, o que parece resultar em uma eficiente modulação do estado redox intracelular (Oliveira *et al.*, 1999). Em conjunto, estes dados demonstram que o estado redox intracelular também regula a secreção de insulina. Assim, as ilhotas pancreáticas parecem possuir um controle fino deste balanço, através do aumento na produção de  $H_2O_2$  em paralelo a elevação da atividade da GPx, tendo em vista que o desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante pode resultar em efeitos deletérios indesejáveis, levando a queda de função e conseqüente redução na secreção de insulina (Newsholme, 2007).

Embora o controle redox da secreção de insulina em condições fisiológicas já possua um considerável corpo de evidências, tal modulação ainda não foi investigada em animais submetidos à restrição protéica. Como já descrito anteriormente, a restrição protéica leva a redução na secreção de insulina, e um dos motivos dessa redução pode ser o desequilíbrio redox.

Neste sentido, nossos resultados não mostraram diferenças no conteúdo protéico de nenhuma das enzimas antioxidante (SOD, CAT e GPx) entre o grupo NP e LP, mostrando que o conteúdo protéico dos animais que foram submetidos à restrição protéica não foi alterada. Por outro lado, quando comparado o conteúdo protéico das enzimas antioxidantes somente no grupo controle, Tonooka *et al.* (2007) descreve que a SOD é maior que a CAT que por sua vez é maior que a GPx, no entanto, nossos

resultados não mostraram diferenças entre o conteúdo protéico da CAT e da GPx, provavelmente pelo fato de utilizarmos ilhotas frescas para verificar a expressão protéica, enquanto no trabalho de Tonooka *et al.* (2007), as ilhotas ficaram incubadas por 48h em 5.6 mM de glicose.

A GPx oferece uma proteção mais eficiente do que a CAT na célula B em baixas concentrações intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porém a CAT é mais eficiente do que a GPx na proteção contra altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tiedge *et al.*, 1998; Eaton, 1991). Portanto, em situações onde o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está presente em altas concentrações nas células, a CAT vai ser a principal responsável pela sua detoxificação.

Por outro lado, nossos dados demonstraram que a desnutrição protéica modificou o perfil da atividade das enzimas antioxidantes sem, contudo, alterar o conteúdo protéico dessas enzimas. O grupo de animais LP apresentou um aumento da atividade da SOD e diminuição da atividade da CAT quando comparados a animais NP. Esses resultados sugerem que os animais LP estariam mais susceptíveis a um desbalço redox em relação aos animais NP, principalmente em condições que induzam altas concentrações de EROs. O aumento na produção de EROs, aliado a redução na atividade da CAT pode induzir diversas alterações metabólicas e funcionais. Dentre essas alterações, observa-se menor secreção de insulina em animais desnutridos (Guegul *et al.*, 2004).

Foi demonstrado um aumento da atividade de enzimas antioxidantes em eritrócitos, sugerindo que a expressão protéica dessas enzimas possa não ser o único aspecto determinante da atividade das mesmas (Zoppi *et al.*, 2003). Dessa maneira, nossos resultados vão de acordo com Tauler *et al.* (1999) e sugerem que intervenções na atividade de enzimas antioxidantes podem se dar por interações diretas das EROs com a estrutura protéica da enzima.

### **5.3 Secreção de insulina estimulada por glicose**

A secreção de insulina de animais LP apresentou-se diminuída quando comparada a secreção de insulina de animais NP (Reis *et al.*, 1997). Estudos realizados por nosso grupo mostraram que ratos desnutridos apresentam uma redução da expressão de PDX-1, das proteínas quinases A e C, diminuição do influxo de cálcio, e de mRNA de

insulina, entre outros fatores, que participam do processo secretório de insulina, o que explica, ao menos em parte, a diminuição da secreção de insulina neste modelo experimental (Ferreira *et al.*, 2003). No entanto, os aspectos metabólicos relacionados à redução observada na secreção de insulina em animais submetidos à restrição protéica ainda não foram devidamente investigados.

Tendo em vista a redução na atividade da CAT no grupo de ratos LP, decidimos investigar o efeito de concentrações crescentes de glicose e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na secreção da insulina.

Neste sentido, a exposição a 10 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não prejudicou a secreção de insulina estimulada por diferentes concentrações de glicose em nenhum dos grupos. Acreditamos que 10 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não tenha sido suficiente para induzir um estresse oxidativo na célula B em nenhuma condição de glicose. Em estudos previamente realizados em células INS-1 e ilhotas de camundongos foi observado que baixas concentrações de peróxido de hidrogênio (1- 4 µM) são essenciais para a sinalização intracelular, enquanto que altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são prejudiciais a secreção de insulina quando expostas posteriormente a altas concentrações de glicose (Pi *et al.*, 2007). Leuloup *et al.* (2009), demonstram ainda que o aumento da secreção de insulina quando estimulado por alta concentração de glicose é acompanhada pela formação de EROs, e essas espécies são fundamentais para a secreção de insulina.

No entanto, na presença de alta concentração de glicose (22 ou 33 mM) e alta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM), as ilhotas de ambos os grupos, secretaram significativamente menos insulina em comparação às ilhotas de animais dos mesmos grupos incubadas na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com 22 e 33 mM de glicose, revelando a presença de um desequilíbrio redox em tais condições nos dois grupos. Além da presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alta concentração de glicose, durante um período de 30 minutos, provoca danos nas células B devido à toxicidade da glicose e à sua inerente geração de EROs (Pi *et al.*, 2007). Tais condições já haviam sido demonstradas, em ilhotas de ratos neonatos, por nosso grupo (Stoppiglia *et al.*, 2008).

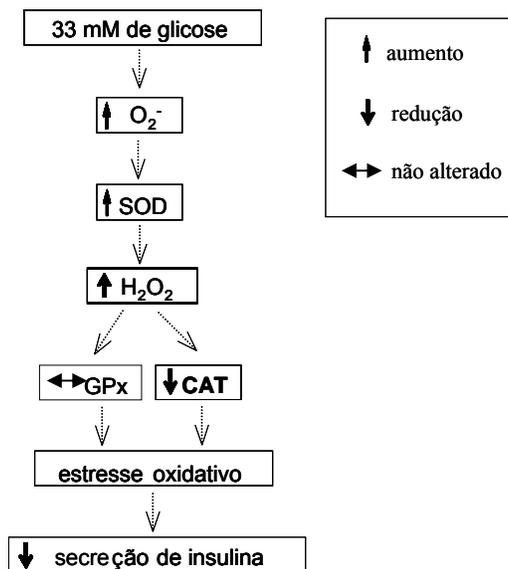
Ao analisarmos a secreção de insulina induzida por 22 mM de glicose e concentração crescente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, percebemos que, embora haja uma progressiva redução na secreção, tanto no grupo NP quanto no LP, os dois grupos tiveram sua secreção reduzida aos níveis basais na mesma condição, isto é, a partir de 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, quando observamos o perfil de decaimento da secreção de insulina, não

observamos diferença entre os grupos. Portanto, nesta condição o sistema antioxidante parece responder de forma semelhante entre os grupos, e a diferença observada na secreção de insulina entre os animais NP e LP, se deve provavelmente a outros fatores que não o estado redox.

Por outro lado, os animais LP mostraram-se mais susceptíveis a exposição ao  $H_2O_2$  em 33 mM de glicose, sugerindo uma maior produção de EROs aliada a uma menor capacidade antioxidante nesta condição, prejudicando o balanço redox das ilhotas e diminuindo a secreção de insulina. Assim, observamos que ilhotas de animais LP quando expostas a 33 mM de glicose, tiveram sua secreção reduzida a níveis basais já na presença de 100  $\mu M$  de  $H_2O_2$ , enquanto as ilhotas do grupo NP somente apresentaram o mesmo nível de redução em 300  $\mu M$  de  $H_2O_2$ . Em adição, o perfil de decaimento da secreção de insulina foi diferente entre os grupos, tendo o grupo LP apresentado uma queda mais acentuada em relação ao NP. Portanto, estes dados revelam que o desbalanço redox afeta a secreção de insulina em animais LP somente em condições de altos níveis de oxidantes e alta glicose.

A maior susceptibilidade dos animais desnutridos é reforçada pelos dados de secreção de insulina de ilhotas incubadas com o potente antioxidante N-acetil-cisteína (NAC). Verificamos que, enquanto a secreção das ilhotas do grupo NP sofreu redução quando expostas a 10 mM de NAC + 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$ , o grupo LP, nesta condição, teve sua secreção aumentada em relação as ilhotas expostas a só  $H_2O_2$ . Em acordo com nossos dados, estudos realizados em células INS-1 mostram que a exposição à alta concentração de glicose aumenta a secreção de insulina e que na presença de 0.4 mM de NAC a secreção é reduzida (Bindokas *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2002). A redução na secreção de insulina na presença de 10 mM de NAC, sugere que a capacidade antioxidante nas ilhotas do grupo NP aumenta demasiadamente, varrendo uma quantidade muito grande de EROs a ponto de prejudicar a sinalização desempenhada por tais espécies na secreção de insulina (Leloup *et al.*, 2009). Já a melhora na secreção de insulina encontrada em ratos desnutridos na presença de 10 mM de NAC + 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$ , pode ser explicada pelo fato de estes apresentarem uma capacidade antioxidante menos eficaz em condições de elevada quantidade de EROs intracelular e, ao adicionar 10 mM de NAC, este age auxiliando na remoção de tais espécies mantendo uma quantidade adequada para sinalização da secreção de insulina, mantendo a homeostase do sistema redox.

Embora ainda seja necessária investigar quais os motivos desta maior susceptibilidade ao estresse oxidativo em animais desnutridos, sugerimos que em 33 mM de glicose mais 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , a CAT parece ter ação fundamental para manutenção do estado redox em ilhotas (esquema 3). Nessas condições a CAT atua de forma mais intensa devido a sua baixa afinidade pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Eaton, 1991). Conforme nossos resultados, em ilhotas sem tratamento, a atividade da SOD mostra-se aumentada enquanto a atividade da CAT está reduzida em animais desnutridos aumentando a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dentro das ilhotas. A hipótese de uma ação fundamental da CAT na manutenção do estado redox é reforçada pelos nossos dados de percentual máximo da secreção de insulina induzida por 22 mM de glicose e 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , onde não observamos diferença no perfil de queda da secreção de insulina entre os grupos. É possível, que em 22 mM de glicose mais 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  a principal enzima responsável pela detoxificação seja a GPx, a qual não teve sua capacidade alterada pela desnutrição protéica e portanto não tenha sido observada diferença no perfil de queda da secreção de insulina entre os grupos. Outra possibilidade é que a CAT apesar de ter a atividade diminuída em animais desnutridos, nessa condição consiga remover uma quantidade suficiente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para que não haja acúmulo dessa molécula a ponto de oferecer um estresse oxidativo à célula, mantendo o perfil de queda da secreção de insulina igual ao animal controle.



**Esquema 3**– Esquema representativo da hipótese, demonstrando o desbalanço entre produção e remoção de EROs em animais desnutridos expostos a alta glicose.

## **6.CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

Nossos dados sugerem que os animais desnutridos estão mais susceptíveis ao estresse oxidativo, resultando em menor secreção de insulina principalmente em condições de alta produção de EROs. Este desbalanço está provavelmente associado à menor capacidade do sistema antioxidante enzimático na ilhota pancreática desses animais.

Baseado nos dados obtidos neste trabalho pretendemos investigar futuramente:

- O estado redox em animais desnutridos por 45 dias e recuperados, por 60 dias, com dieta hiperlipídica;
- O efeito da suplementação com antioxidantes na secreção de insulina em ratos desnutridos.

## **7. REFERÊNCIAS**

- Adams HR.** Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 209, n. 7, p. 1297-302, 1996
- Aebi H. Catalase. In: **Methods in Enzymology**, Orlando FL: Academic, 1984
- Akagawa M, Suyama K.** Oxidative deamination by hydrogen peroxide in the presence of metals, **Free Radic. Res.** v. 36, p.13-21, 2002
- Albrecht R, Pélissier MA.** About the oxidative stress status in children with kwashiorkor, **Food Chem. Toxicol.** v. 33, n. 12, p. 1081-1083, 1995
- Andersen HR, Nielsen JB, Nilsen F, Grandjean P.** Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. **Clin. Chem.** v. 43, n. 4, p. 562-568, 1997
- Barreiros ALBS, David JM, David JP.** Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova** v. 29, n.1, p. 113-23, 2006
- Benzie IF.** Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **Int. J. Food. Sci. Nutr.** v. 47, n. 3, p. 233-61, 1996
- Berra CM, Menck CFM, Di Mascio P.** Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. **Quim. Nova** v. 29, n. 6, p.1340-1344, 2006
- Bindokas VP, Kuznetsov A, Sreenan S, Polonsky RS, Roe MW, Philipson LH.** Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 9796–9801, 2003
- Bondy SC, LE BEL CP.** The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Radical Biology and Medicine** v. 14, n. 6, p. 633-642, 1993
- Bourne LC, Rice-Evans CA.** Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. **Methods in Enzymology** v. 299, p. 91-106, 1999
- Boveris A.** Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues **Medicina (B. Aires)** v. 58, n. 4, p. 350-356, 1998
- Brennan L, Corless M, Hewage C, Malthouse JPG, McClenaghan NH, Flatt PR, Newsholme P.** <sup>13</sup>C NMR analysis reveals a link between L-glutamine metabolism, D-glucose metabolism and  $\gamma$ -glutamyl cycle activity in a clonal pancreatic beta cell line, **Diabetologia** v. 46, p. 1512-1521, 2003
- Cadenas E, Davies KJ.** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine** v. 29, n. 3-4, p. 222-230, 2000.
- Cadili A, de Gara C.** Complications of splenectomy **Am J Med.** v. 121, n.5, p. 371-5, 2008
- Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, Poderoso JJ, Boveris A.** Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. **FEBS Lett** v. **341**, n. **1**, p. 65-8, 1994
- Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto A.** Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova** v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007
- Cohen G. & Hochstein P.** Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry** v. **2**, p. 1420-8, 1963
- Cohen MV.** Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med** v. 111, p. 918-931, 1989
- Cook DL & Hales CN.** Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. **Nature** v. 311, p. 271-273, 1984

- Cunningham C, Tipton KF, Dixon F.** Conversion of taurine into N-chlorotaurine (taurine chloramine) and sulphoacetaldehyde in response to oxidative stress, **Bioch. J.** v. 330, p. 939-945, 1998
- Cherif H, Reusens B, Ahn MT, Hoet JJ, Remacle C.** Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet, **J. Endoc.** v. 159, p. 341-348, 1998
- Darmon N, Pélissier MA, Hevman M, Albrecht R, Desiens JF.** Oxidative stress may contribute to the intestinal dysfunction of weanling rats fed a low protein diet, **J. Nutr.** v. 123, n. 6, p. 1068-1075, 1993
- De Souza JC.** Atividade Antioxidante in vitro e in vivo de suco de uva e da Norbixina. **Tese de Mestrado.** Curso de pós graduação FEA: Alimentos e nutrição, UNICAMP, 2008
- Diaz J, et al.** References intervals for four biochemistry analyttes in plasma for evaluating oxidase stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clinical Chemistry** v. 44, n. 10, p. 2215-2217, 1998
- Dröge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.** v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002
- Dukes ID, McIntyre MS, Mertz RJ, Philipson LH, Roe MW, Spencer B, Worley III JF.** Dependence on NADH produced during glycolysis for  $\beta$ -cell glucose signaling, **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 10979-10982, 1994
- Eaton JW:** Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. **J. Lab. Clin. Med.** v. 118, p. 3-4, 1991
- Echtay K, Roussel D, St-Pierre J, Jekabson MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Claphan JC, Brand M.** Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins, **Nature** v. 415, p. 96-99, 2002
- Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M.** The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. **Endocr Rev.** v. 29, n. 1, p. 42-61, 2008
- Escriva F, Kergoat M, Bailbé D, Pascual-Leone AM, Portha B.** Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. **Diabetologia** v. 34, n. 8, p. 559-64, 1991
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM.** Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? **Diabetes** v. 52, n. 1, p. 1-8, 2003
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM.** Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr Rev.** v. 23, n. 5, p. 599-622, 2002
- Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Santos-Silva AP, Oliveira ED, Trevenzoli IH, Casimiro-Lopes G, Nogueira-Neto JF, Lisboa PC.** Temporal Evaluation of Body Composition, Glucose Homeostasis and Lipid Profile of Male Rats Programmed by Maternal Protein Restriction During Lactation. **Horm Metab Res.** 2009 (no prelo)
- Ferreira F, Barbosa HCL, Stoppiglia LF, Delghingaro – Augusto V, Pereira EA, Boschero AC and Carneiro EM.** Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA alpha expression **J. Nutr.** v. 134, p. 63-67, 2004
- Ferreira F, Filiputti E, Arantes VC, Stoppiglia LF, Araújo RP, Delghingaro – Augusto V, Latorraca MQ, Toyama MH, Boschero AC, Carneiro EM.** 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.** v. 133, n. 3, p. 695-9, 2003
- Filiputti E, Ferreira F, Souza KLA, Stoppiglia LF, Arantes VC, Boschero AC and Carneiro EM.** Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. **Life Sci.** v. 82, n. 9-10, p. 542-8, 2008
- Filiputti E. **Regulação da Secreção de Insulina em Ilhotas de Langherhans de Ratos Submetidos à Restrição Protéica e Suplementados com Leucina.** 2006. 103f. Tese Doutorado. Curso de pós-graduação BFM: Fisiologia, UNICAMP, Campinas, 2006
- Filosa S, Fico A, Paglialunga F, Balestrieri M, Crooke A, Verde P, Abrescia P, Bautista JM, Martini G.** Failure to increase consumption through the pentose phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress, **Bioch. J.** v. 370, p. 935-943, 2003
- Fischer LJ, Hamburger SA.** Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator. **Diabetes.** v. 29, n. 3, p. 213-6, 1980
- Flatt PR. Hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. In: Williams JCPaG. **Textbook of Diabetes.** Oxford: Blackwell, 1996. p. 91-97
- Freeman BA, Crapo JD.** Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab Invest.** v. 47, n. 5, p. 412-26, 1982
- Fuchs GJ.** Antioxidants for children with kwashiorkor, **BMJ** v. 330, p. 1095–1096, 2005
- Fujimoto S, Nabe K, Takehiro M, Shimodahira M, Kajikawa M, Takeda T, Mukai E, Inagaki N, Seino Y.** Impaired metabolism-secretion coupling in pancreatic beta-cells: role of determinants of mitochondrial ATP production. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 77: Suppl 1: S2-10, 2007.
- Gembal M, Gilon P, Henquin JC.** Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells. **J Clin Invest** v. 89, p. 1288–1295, 1992
- Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ.** The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radic Biol Med.** v. 32, n. 12, p. 1264-75, 2002
- Gilbert HF, Mc Lean VM.** Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology.** v. 63, p. 69-172. 1990
- Golden MHN.** The development of concepts of malnutrition, **J. Nutrition.** v. 132, n. 7, p. 2117S-2122S, 2002
- Graham A, Hogg N, Kalynaraman B, O'Leary V, Darley – Ushmar V, Moncada S.** Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor, **Fed. Eur. Biochem. Soc.** v. 330, p. 181-185, 1993
- Granvist K, Markund SL, Taljedal IB.** CuZn- superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. **Biochem J.** v. 199, p. 393-398, 1981
- Gurgul E, Lortz S, Tiedge M, Jorns A, Lenzen S.** Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive

- oxygen species and proinflammatory cytokines. **Diabetes**. v. 53, p. 2271–2280, 2004
- Guzmán-Silva MA, Wanderley AR, Macedo VM, Boaventura GT.** Recuperação da desnutrição em ratos mediante rações adicionadas ou não de suplemento alimentar e de vitaminas e minerais durante o período de crescimento. **Rev. Nutr.** v. 17, n. 1, p. 59-69, 2004
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE.** Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **J. Lab. Clin. Med.** v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992
- Halliwell B. & Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine.** 2<sup>a</sup> ed. Oxford Clarendon Press, 1999
- Halliwell B. & Gutteridge JMC.** Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 246, n. 2, p. 501-14, 1986
- Halliwell B. & Gutteridge JMC.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Method. Enzymol.** v. 186, p. 1-85, 1990
- Hendrickse RG.** Kwashiorkor and aflatoxins, **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** v. 7, p. 633-635, 1988
- Henquin JC, Nenquin M, Stiernet P, Ahren B.** In vivo and in vitro glucose-induced biphasic insulin secretion in the mouse: pattern and role of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and amplification signals in B-cells. **Diabetes**. v. 55, p. 441-451, 2006
- Ji LL.** Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 222, n. 3, p. 283-92, 1999
- Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitami Y, Umayahara Y, Hanafusa H, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M.** Beneficial effects of antioxidants in diabetes - possible protection of pancreatic  $\beta$ -cells against glucose toxicity, **Diabetes** v. 48, p. 2398-2406, 1999
- Kennedy HJ, Rafiq I, Pouli AE, Rutter GA.** Glucose enhances insulin promoter activity in MIN6 beta-cells independently of changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and insulin secretion. **Biochem J.** v. 342, n. Pt 2, p. 275-80, 1999
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE.** Mitochondrial permeability transition and oxidative stress, **FEBS Letters** v. 495, p. 12-15, 2001
- Latorraca MQ, Reis MAB, Carneiro EM, Mello MAR, Velloso LA, Saad MJA, Boschero AC.** Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats, **J. Nutr.** v. 128, p. 1643–1649, 1998
- Leloup C, Cuzin CT, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, Colombani AL, Ktorza A, Casteilla L, Pénicaud L.** Mitochondrial Reactive Oxygen Species Are Obligatory Signals for Glucose-Induced Insulin Secretion. **Diabetes** v. 58, n. 3, p. 673-681, 2009
- Lenzen S.** The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia.** v. 51, n. 2, p. 216-26, 2008
- Li J, Wang H, Storner GD, Bray TM.** Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein-malnourished mice, **J. Nutr. Biochem.** v. 13, p. 625–633, 2002
- Loss IO, Fernandes LG, Martins CDD, Cardoso LM, Silva ME, Dias-da-Silva V, Moraes MFD, Chinca Junior DA.** Baroreflex dysfunction in rats submitted to protein restriction. **Life Sci.** v. 81, p. 944-950, 2007
- Lucas A.** Programming by early nutrition: an experimental approach, **J.Nutr.** v. 128, p. 401S-406S, 1998

- MacDonald MJ, Fahien LA, Brown LJ et al.** Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 288, p. E1-E15, 2005
- Maechler P, Wollheim CB.** Role of mitochondria in metabolism-secretion coupling of insulin release in the pancreatic  $\beta$ -cell. **Biofactors.** v. 8, p. 255–262, 1998
- Maechler P, Carobbio S, Rubi B.** In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. **The Internal Journal of Biochemistry & Cell Biology** v. 38, p. 696-709, 2006
- Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Rasschaert J, Zähler D, Sener A, Davies DR, et al.** The fuel concept for insulin release: regulation of glucose phosphorylation in pancreatic islets, **Bioch. Soc. Trans.** v. 18, p. 107-108, 1990
- Malaisse WJ, Sener A.** Glucose-induced changes in cytosolic ATP content in pancreatic islets. **Biochim Biophys Acta.** v. 927, n. 2, p. 190-5, 1987
- Mandrup-Poulsen T.** beta-cell apoptosis: stimuli and signaling. **Diabetes** v. 50 Suppl 1, p. S58-63, 2001
- Mann MD, Becker DJ, Pimstone BL et al.** Potassium supplementation, serum immunoreactive insulin concentrations and glucose tolerance in protein-energy malnutrition. **Br. J. Nutr.** v. 33, p. 55-61, 1975
- Manzano AMC.** Hipoalbuminemia en diálisis: es marcador de desnutrición o de inflamación? **La Revista de Investigación Clínica** v. 53, n. 2, p. 152-8, 2001
- Marcondes E. **Desnutrição.** São Paulo: Savier, 1976
- McCord JM, Fridovich I.** The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **Journal of Biological Chemistry.** v. 243, n. 21, p. 5753- 5760, 1968
- Meister A, Anderson ME.** Glutathione. **Annual Review of Biochemistry.** v. 52, p. 711-60, 1983
- Meglasson MD, Matschinsky FM.** Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. **Diabetes Metab Rev.** v. 2, n. 3-4, p. 163-214, 1986
- Miranda S, et al.** The Role of Oxidative Stress in the Toxicity Induced by Amyloid Beta-Peptide in Alzheimer's Disease. **Progress in Neurobiology.** v. 62, n. 6, p. 633-648, 2000
- Misra HP, Fridovich I.** The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry.** v. 247, n. 10, p. 3170- 3175, 1972
- Nagababu E, Chrest FJ, Rifkind JM.** Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase, **Biochim. Bioph. Acta** v. 1620, p. 211-217, 2003
- Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R.** Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. **J Physiol.** v. 15, n. 583(Pt 1), p. 9-24, 2007
- Neyens E, Baeyens J.** A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique, **J. Hazard Mater.** v. 98, p. 33-50, 2003
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M.** Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature.** v. 404, n. 6779, p. 787-90, 2000
- Nordberg J, Arnér ES.** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med.** v. 31, n. 11, p. 1287-312, 2001

- Oga Z. **Fundamentos de toxicologia**. 2ª ed. Atheneu, São Paulo, 2003
- Okitolonda W., Brichard SM., Henquin JC.** Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. **Diabetologia** v. 30, n. 12, p. 946-51, 1987
- Oliveira HR, Curi R, Carpinelli AR.** Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. **Am J Physiol.** v.276, n. 2 Pt 1, p. C507-10, 1999
- Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR et al.** Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. **Diabetes** v. 52, p. 1457-1463, 2003
- Packer L.** Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. **J. Sports Sci.** v. 15, p. 353-363, 1997
- Parra A, Klish W, Cuellar A et al.** Energy metabolism and hormonal profile in children with edematous protein-calorie malnutrition. **J Pediatr** v. 87, p. 307-314, 1975
- Parra MO, Hernandez-Blasquez FJ, Souza e Silva RAP, Silva JRMC, Peduto L, Soares MM, et al.** Reduction of liver mass due to malnutrition in rats. Correlation with emaciation of animals and size of organs not inserted in the portal system., **São Paulo Med** v. 113, n. 3, p. 903-9, 1995
- Penitente AR, Fernandes LG, Cardoso LM, Silva ME, Pedrosa ML, SilvaAL, Haibara AS, Moraes MFD, Júnior DAC.** Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. **Life Sciences** v. 81, p. 609–614, 2007
- Pennington, S.N., Pennington, J.S.; Ellington, L.D., Carver, F.M., Shibley Junior, J.A., Jeansonne, N.; Lynch, S.A., Roberson, L.A., Miles, D.S., Wormington, E.P., Means, L.W.** The effect of maternal malnutrition during pregnancy in the rat on the offspring's weight, glucose uptake, glucose transporter protein levels and behaviors., **Nutrition Research, Tarrytown** v. 21, p. 755-69, 2001
- Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S.** Reactive Oxygen Species as a Signal in Glucose-Stimulated Insulin Secretion **Diabetes** v. 56, n. 7, p. 1783-91, 2007
- Powis G, Montfort WR.** Properties and biological activities of thioredoxins, **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** v. 30, p. 421–55, 2001
- Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA.** Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism, **J. Mol. Biol.** v. 296, p. 295-309, 2000
- Rabinovitch A.** An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Metab Rev** v. 14, n. 2, p. 129-51, 1998
- Rasilainen S, Nieminen JM, Levonen AL, Otonkosky T, Lapatto R.** Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide, **Bioch. Pharm.** v. 63, p. 1297-1304, 2002
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr.,** 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.** v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993
- Reis MAB, Carneiro EM, Mello MAR, Boschero AC, Saad MJA and Velloso LA.** 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.** v. 127, n. 3, p. 403-10, 1997

- Ribeiro SMR, et al.** A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005
- Robertson RP, Harmon JH, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H.** Glucose toxicity in  $\beta$ -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection, **Diabetes** v. 62, p. 581-587, 2003
- Rorsman P, Eliasson L, Renström E, Gromada J, Barg S, Göpel S.** The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. **News Physiol Sci**. v. 15, p. 72-77, 2000
- Rover Júnior L, et al.** Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova** v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001
- Ryter SW, Pacifici RE and Davies KJA.** Constitutive and inducible repair systems in oxidative stress. In: **Biological Oxidation Systems**. New York: Academic Press, 1990
- Safayhi H, Haase H, Kramer U, Bihlmayer A, Roenfeldt M, Ammon HP, Froschmayr M, Cassidy TN, Morano I, Ahlijanian MK, Striessnig J.** L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical characterization and phosphorylation in RINm5F cells. **Mol Endocrinol** v. 11, n. 5, p. 619-29, 1997
- Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M, Araki E.** Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells, **Bioch. Bioph. Res. Comm.** v. 1, p. 216-222, 2003
- Salvador A, Souza J, Pinto R.** Hydroperoxyl, superoxide and pH gradients in the mitochondrial matrix: a theoretical assessment, **Free Radic. Biol. Med.** v. 10, p. 1208-1215, 2001
- Satin LS, Cook DL.** Voltage-gated  $Ca^{2+}$  current in pancreatic B-cells. **Pflugers Arch.** v. 404, n. 4, p. 385-7, 1985
- Scott MD, Lubin BH, Zuo L, Kuypers FA.** Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **J Lab Clin Med.** v. 118, n. 1, p. 7-16, 1991
- Scott, AM., Atewter, I., Rojas, E, A.** method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans, **Diabetologia** v. 21, n. 5, p. 470-5, 1981
- Sen CK.** Nutritional biochemistry of cellular glutathione, **J. Nutr. Biochem.** v. 8, p. 660-672, 1997
- Sies H.** Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993
- Silveira LR.** Considerações Críticas e Metodológicas na Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em Células Musculares Durante Contrações. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia.** v. 48, n. 6, p. 812-822, 2004
- Slonim AE, Surber ML, Page DL, Sharp RA, Burr IM.** Modification of chemically induced diabetes in rats by vitamin E. Supplementation minimizes and depletion enhances development of diabetes. **J Clin Invest.** v. 71, n. 5, p. 1282-8, 1983
- Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Foster MJ, Lal H.** Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in mouse, **Mech. Ageing Dev.** v. 74, n. 1-2, p. 121-133, 1994

- Stoppiglia LF, Rezende LF, Cappelli APG, Ferreira F, Boschero AC.** Altered NAD(P)H production in neonatal rat islets resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Life Sciences.** v. 83, n. 21-22, p. 709-716, 2008
- Takahashi H, Tran P, Leroy E, Harmon JS, Tanaka Y, Robertson RP.** D-Glyceraldehyde causes production of intracellular peroxide in pancreatic islets, oxidative stress, and defective beta cell function via non-mitochondrial pathways, **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 37316-37323, 2004
- Tanaka Y, Tran P, Harmon J, Robertson RP.** A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 99, p. 12363–12368, 2002
- Tauler P, Gimeno I, Aguiló A, Guix MP, Pons A.** Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery. **Pflügers Archiv.** v. 438, p. 782-87, 1999
- Theys N, Clippe A, Bouckenooghe T, Reusens B, Remacle C.** Early low protein diet aggravates unbalance between antioxidant enzymes leading to islet dysfunction. **Plos One** v. 4, n. 7, p. e6110, 2009
- Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S.** Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells, **Diabetes** v. 46, p. 1733-1742, 1997
- Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S.** Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5 F cells against the toxicity of reactive oxygen species. **Diabetes** v. 47, p. 1578- 1585, 1998
- Tonooka N, Oseid E, Zhou H, Harmon JS, Robertson RP.** Glutathione peroxidase protein expression and activity in human islets isolated for transplantation. **Clin Transplant** v. 21, p. 767–772, 2007
- Torun B, Chew F. Protein energy malnutrition. In: Shils, ME; Olson JA.; Hike M. **Modern nutrition in health and disease.** 8<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994
- Travacio M. & Lesuy S.** Antioxidant enzymes and their modifications under oxidative stress conditions. **J. Bras. Assoc. Adv. Sci.** v. 48, n. ½, p. 9-13, 1996
- Tsuura Y, Ishida H, Shinomura T, Nishimura M, Seino Y.** Endogenous nitric oxide inhibits glucose-induced insulin secretion by suppression of phosphofruktokinase activity in pancreatic islets, **Biochem. Biophys. Res. Com.** v. 252, p. 34-38, 1998
- Turrens JF, Boveris A.** Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J.** v. 191, n. 2, p. 421-7, 1980
- Vannucchi H, et al.** Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina (Ribeirão Preto).** v. 31, n. 1, p. 31-44, 1998
- Welsh N, Margulis B, Bendtzen K, Sandler S.** Liposomal delivery of antioxidant enzymes protects against hydrogen peroxide - but not interleukin-1β-induced inhibition of glucose metabolism in rat pancreatic islets, **J. Endocr.** v. 143, p. 151-156, 1994
- Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE.** The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **J Clin Invest** v. 104, p. 787–794, 1999
- Williams CD.** A nutritional disease of childhood associated with a maize diet, **Arch. Dis. Child.** v. 8, p. 423–433, 1933

- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW.** The estimation of red cell superoxide dismutase activity. **J. Lab. Clin. Med.** v. 85, n. 2, p. 337-341, 1975
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND.** Glutathione metabolism and its implications for health, **J. Nutr.** v.134, p. 489-492, 2004
- Xu B, Moritx JT, Epstein PN.** Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse beta cells, **Free Radic. Biol. Med.** v. 27, p. 830-837, 1999
- Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Iinuma S, Ichikawa H, Yasuda M, Takahashi S, Kondo M.** Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. **Gut..** v. 34, n. 6, p. 732-7, 1993
- Yu BP.** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.** v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994
- Zoppi CC.** **Efeitos do treinamento e do “overtraining” no metabolismo oxidativo, enzimas antioxidantes e HSP72 em diferentes fibras musculares.** 2004. 100f. Tese de Doutorado. Curso de pós-graduação BMF: Bioquímica, UNICAMP, 2004
- Zoppi CC, Neto JA, Catanho FO, Goulart LF, Motta E, Moura N, Macedo DV.** Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva, **Rev. paul. Educ. Fís.** v. 17, n. 2, p. 119-30, 2003





**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

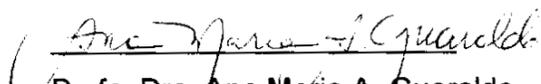
**CERTIFICADO**

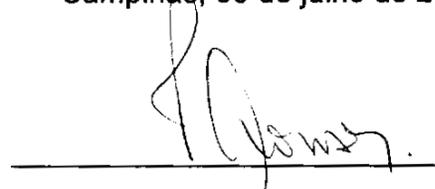
Certificamos que o Protocolo nº **1895-1**, sobre "**Modulação da secreção de insulina por estresse oxidativo induzido em ilhotas pancreáticas como resultado de desnutrição proteica**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro / Ana Paula Gameiro Cappelli**, está de acordo com 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/Unicamp em **06 de julho de 2009**.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **1895-1**, entitled "**Modulation of insulin secretion induced by oxidative stress in pancreatic islet as result of protein restriction diet**", 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 **July 6, 2009**.

Campinas, 06 de julho de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva



1     **SHORT-TERM PROTEIN MALNUTRITION DISRUPTS RAT GLUCOSE-INDUCED**  
2     **INSULIN RELEASE BY INTRACELLULAR REDOX SIGNALING MECHANISM**

3     Ana Paula G. Cappelli<sup>1</sup>, Claudio C. Zoppi<sup>1</sup>, Thiago M. Batista<sup>1</sup>, Flávia M.M de Paula<sup>1</sup>,  
4     Amon Trevisan<sup>1</sup>, Priscilla M. R. da Silva<sup>1</sup>, Everardo M. Carneiro<sup>1</sup>

5     Department of Anatomy, Cellular Biology and Physiology and Biophysics,  
6     Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP,  
7     Brazil.

8  
9  
10    Running Title: Redox status insulin secretion

11    Ana Paula G. Cappelli and Claudio Cesar Zoppi contributed equally to the present  
12    work.

13

14

15    Corresponding author:

16    Dr. Everardo M. Carneiro:

17    Department of Anatomy, Cellular Biology and Physiology, Institute of Biology, State

18    University of Campinas (UNICAMP). P.O. Box 6109, Campinas, SP.

19    CEP: 13083-970, Brazil. Tel.: +55 19 3521 6203; Fax: +55 19 3521 6185.

20    E-mail address: emc@unicamp.br

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30 **Abstract**

31 **Background:** Protein malnutrition reduces glucose-induced insulin secretion (GIIS), in  
32 addition, it has been recently demonstrated that pancreatic beta cells ( $\beta$ -cells) redox  
33 status is directly involved in GIIS control. However, GIIS redox signaling under protein  
34 undernourishment remains unclear. **Methodology/Principal findings:** After weaning,  
35 21-days-old male Wistar rats were submitted to a normal-protein-diet (17%-protein,  
36 NP) or to a low-protein-diet (6%-protein, LP) for sixty days. Pancreatic islets were  
37 isolated and CuZn-superoxide dismutase (SOD1), Se-glutathione peroxidase (GPx1)  
38 and catalase (CAT) messenger RNA (mRNA) as well as enzymatic antioxidant  
39 activities were quantified. Islets were also pre-incubated in medium containing glucose  
40 (5.6 mM), (10-300  $\mu$ M) hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and/or (10 mM) N-acetylcysteine  
41 (NAC). The pre-incubation was followed by the incubation with crescent glucose  
42 concentrations, for GIIS measurement. Protein malnutrition induced significant ( $p<0.05$ )  
43 SOD1 activity ( $21.18\pm 2.1$ - $30.5\pm 2$   $\mu$ moles.  $\text{min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$  for NP-LP respectively),  
44 and 20% mRNA content increase. On the other hand, CAT activity decreased ( $9\pm 1.2$ -  
45  $5.22\pm 0.73$   $\mu$ moles/min/mg protein for NP-LP respectively) despite a twofold CAT  
46 mRNA significant ( $p<0.05$ ) increase. Total GIIS was in most conditions approximately  
47 50% lower in LP, and the observed decay profile after increased oxidant challenges  
48 were similar in both groups until islets were pre-incubated with  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M), followed  
49 by incubation with glucose 33.3 mM, when LP showed significantly ( $p<0.05$ ) higher  
50 rates of decrease, reaching baseline GIIS values. NP GIIS showed the same effect  
51 only when pre-incubated with 300  $\mu$ M of  $H_2O_2$ . In addition, when islets were pre-  
52 incubated with NAC 10 mM, the higher GIIS decrease in LP was attenuated.  
53 **Conclusion and significance:** GIIS redox signaling was reinforced by our data and it  
54 was also evidenced that early life protein malnutrition alters pancreatic islets redox  
55 control, reducing GIIS by enhanced susceptibility to oxidative stress.

56

57

58

59

60

61

62

## 63 **Introduction**

64           Insulin release is known to be tightly coupled to ATP production. Briefly, the  
65 canonical theory of glucose-induced insulin secretion (GIIS) states that when blood  
66 glucose rises, islet  $\beta$ -cells stimulate ATP synthesis. ATP acts on ATP-dependent  $K^+$   
67 channels leading to membrane depolarization. This process is followed by opening of  
68 voltage-sensitive calcium channel; increasing cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration and insulin  
69 exocytosis [1]. Although not yet fully understood, the discovery of ATP-independent  $K^+$   
70 channels mechanisms, gave rise to several speculations about how glucose  
71 metabolism could regulate GIIS in addition to the solely ATP enhancement effect [2].  $\beta$ -  
72 cells posses elevated rates of anaplerotic flux via pyruvate carboxilation [3]. Some  
73 pyruvate cycling pathways have been demonstrated to be coupled with insulin release  
74 [4-12] and despite the well known metabolic coupling factor (MCF) role displayed by  
75 ATP, emerging evidence point for other pyruvate cycling-induced MCFs production;  
76 such as NADPH, malonyl-CoA, glutamate and GTP, which in turn might somehow  
77 control GIIS [3,4].

78           In addition, it has been recently demonstrated that GIIS is also regulated  
79 specifically by mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production [13],  
80 suggesting an important role of  $\beta$ -cells intracellular redox state in this process. In  
81 agreement, Oliveira and co-workers [14], showed that antioxidant enzymes including  
82 superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) were up regulated  
83 shortly after a glucose challenge, providing additive evidence for a GIIS redox  
84 modulation.

85           Early protein undernourishment reduces insulin release in response to glucose  
86 and to other secretagogues [15-19]. Recently, our group reported reduced expression  
87 of signaling proteins such as, protein kinase A and protein kinase C, during protein  
88 malnutrition [20,21]. Several genes involved in insulin production/secretion  
89 mechanisms have also their expression altered [22]. It was demonstrated that calcium

90 uptake and insulin mRNA content were also reduced in undernourished rats [23-25]. In  
91 addition,  $\beta$ -cells from rats fed with protein-deficient diet have decreased expression of  
92 Akt, mTOR and p70s6k [26].

93 Similarly to obesity, intra-uterine and early life protein malnutrition leads to the  
94 development of metabolic syndrome and diabetes in adult life [27] and this effect could  
95 be attributed to mitochondrial malfunction-induced altered redox status [28]. Indeed, it  
96 was demonstrated that fetal and adult  $\beta$ -cells from low protein fed rats are more  
97 susceptible to oxidative stress [29,30].

98 However, it is unknown if GIIS redox modulation is altered in protein  
99 malnourished rats. Theys and colleagues [28] reported altered antioxidant enzymes  
100 activity in offspring of intra-uterine and early life low-protein-fed rats, predisposing  
101 pancreatic islets dysfunction.

102 Based on the above statement, we tested the hypothesis of altered intracellular  
103 redox state imposed by an isocaloric-low protein diet (6% of protein) would lead to  
104 disruption in GIIS. Thus, isolated pancreatic islets were pre-incubated for 30 minutes  
105 with glucose 5.6 mM plus crescent  $H_2O_2$  concentrations (range: 10-300  $\mu$ M), with or  
106 without N-acetylcysteine (NAC) 10 mM. After 30 minutes of pre-incubation the content  
107 was removed and islets were quickly incubated for 60 minutes with crescent glucose  
108 concentration ranging from 2.8 to 33.3 mM. It was observed that GIIS profile was  
109 markedly altered. On the other hand, this alteration was blunted when islets were pre-  
110 incubated with NAC, suggesting a low-protein-diet impairment of adequate redox  
111 balance during this process.

112

## 113 **Results**

### 114 **Body weight and blood analysis**

115 As shown in Table 1 low protein fed rats (LP-6%) showed remarkable  
116 differences compared to normal protein fed control group (NP-17%). LP exhibited 50%

117 lower body weight, effect that was accompanied by reduced fast and fed total blood  
118 protein and blood albumin concentration. Fast blood insulin and glycaemia were not  
119 different between groups, however, LP showed a twofold higher glucose tolerance, as  
120 shown by ipGTT area under the curve values. Taken together these results are in  
121 agreement with previous report from our group and others [18,20,21,26], indicating that  
122 the model employed here of protein undernourishment was effective.

### 123 Antioxidant enzymatic mRNA and activities

124 After sixty days of protein malnourishment, it was detected altered mRNA  
125 content and activities specifically in superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in  
126 LP islets, whereas glutathione peroxidase (GPX) mRNA and activity remained  
127 unaltered (Figures 1 and 2 A, B and C respectively). LP SOD and CAT mRNA content  
128 showed 1.2 and 2 fold increase respectively. In contrast, whereas SOD activity was in  
129 agreement with mRNA results showing a significant ( $p<0.05$ ) higher activity as  
130 compared to NP islets, CAT activity was near 50% significantly ( $p<0.05$ ) lower than  
131 control values.

132 Based on these findings, it was deduced that LP islets would produce higher  
133 amounts of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) due to the elevated SOD activity; however it was  
134 possible that LP islets were not able to deal with high amounts of produced ROS since  
135 it was detected lower CAT activity. Thus, we exposed isolated islets to high oxidant  
136 challenging conditions and observed their functional capacity, measuring insulin  
137 release.

### 138 Oxidant challenging conditions in GIIS

139 We investigated the profile of redox imbalance upon GIIS control in NP and LP.  
140 When NP and LP islets were pre-incubated with  $H_2O_2$  (150  $\mu$ M), and further incubated

141 with glucose (22.2 mM and 33.3 mM), it was observed a decrease in the percent of  
142 insulin release in both groups (Figure 3).

143 Figure 4 shows total insulin secretion, percent to NP insulin secretion and from  
144 maximum secreted insulin by each group (A, B and C respectively). When islets from  
145 NP and LP groups were pre-incubated with increased  $H_2O_2$  concentrations and  
146 incubated with glucose 22.2 mM, it was observed that GIIS of both groups, when pre-  
147 exposed to  $H_2O_2$  concentrations above 150  $\mu M$ , returned to baseline levels (incubation  
148 with glucose 2.8 mM) (Figure 4A). Insulin secretion is lower in LP at all conditions  
149 exception made to the condition of  $H_2O_2$  300  $\mu M$  (Figure 4B). GIIS fall profile was the  
150 same in NP and LP (Figure 4C). Based on these findings which suggest no alterations  
151 between groups concerning redox status at each condition, we decided to enhance  
152 islets challenges and conducted the same experiments at higher glucose concentration  
153 (33 mM).

154 Thus, when islets where pre-incubated with  $H_2O_2$ , and further challenged with  
155 glucose 33.3 mM, LP GIIS returned to baseline levels (incubation with glucose 2.8 mM)  
156 when it was previously pre-incubated with  $H_2O_2$  100  $\mu M$ , whereas NP showed the same  
157 behavior only at  $H_2O_2$  300  $\mu M$  (Figure 5A). The absolute values of LP GIIS was lower  
158 than NP at all conditions as well (Figure 5B), and as showed by figure 5C, LP insulin  
159 fall profile is more evident, reaching significant ( $p < 0.05$ ) values already at  $H_2O_2$  100  
160  $\mu M$ .

161 Interestingly, when the experiments were performed at the same condition  
162 above described, however, at absence of  $H_2O_2$ , NAC was observed to markedly reduce  
163 GIIS in both NP and LP groups, providing evidence of altered redox control of GIIS at  
164 this condition. The pre-incubation with NAC (10 mM) corroborates with the GIIS redox  
165 modulation proposal as it altered NP and LP insulin release (Figure 6). At conditions  
166 that did not induce GIIS return to baseline levels, NAC reduced GIIS in both groups,  
167 however, at the condition that induced LP GIIS return to baseline (pre-incubation with

168 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM plus incubation with glucose 33.3 mM), NAC significantly enhanced  
169 (p<0.05) GIIS as compared to the same condition without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pre-incubation.

## 170 **Discussion**

171 There is extensive amount of data demonstrating the evolvement of K<sub>ATP</sub>  
172 channels in GIIS, however, this mechanism does not explain the entire metabolic  
173 regulation of β-cells insulin secretion. Evidence of mitochondrial  
174 anaplerotic/cataplerotic pathways in the generation of metabolic coupling factors which  
175 may regulate insulin secretion is at constant growth [3,31].

176 In addition, a huge amount of knowledge regarding redox imbalance and  
177 oxidative stress-induced β-cells dysfunction leading to several diseases including  
178 metabolic syndrome and diabetes, conditions which, β-cells are constantly exposed to  
179 fuel excess and glucolipidtoxicity, is available [32-34]. Despite the already known β-  
180 cells oxidative stress-induced harmful effects, Leloup and colleagues [13] provided  
181 direct evidence to physiological mitochondrial-produced ROS in GIIS control. These  
182 findings, associated with low β-cells antioxidant capacity, suggest that β-cells redox  
183 regulation toward a more oxidized state is very important to GIIS.

184 Protein malnutrition induces β-cells molecular and anaplerotic control of GIIS  
185 alterations, which may lead to the reduction in insulin secretion [19,35]. Nevertheless,  
186 information regarding redox status in protein undernourished rats concerning GIIS  
187 control is still scarce.

188 Antioxidant enzymes activity has been shown to be altered in isolated  
189 pancreatic islets, three months after birth in intrauterine protein malnourished rats,  
190 predisposing imbalanced redox status [28]. In addition, ROS and ATP content have  
191 been reported to be respectively increased and decreased in male offspring of protein  
192 undernourished mothers, leading to the enhancement in UCP2 expression [35]. B-cells  
193 UCP2 expression enhancement was previously associated with the maintenance of

194 redox status in regular fed condition, by reducing superoxide radical production,  
195 although this effect is followed by reduced insulin secretion [36]. Thus, taken together  
196 these findings suggest that protein malnutrition alters  $\beta$ -cells redox status, which might  
197 compromise GIIIS.

198 In this sense, here we tested for the first time, the redox control of GIIIS in  
199 protein undernourished rats, by pre-incubating isolated islets with oxidants and  
200 antioxidants substances followed by the incubation with high glucose concentrations,  
201 after a protocol of early protein malnourishment.

### 202 Antioxidant enzymes mRNA content and activities

203 The exposure to a stimulating glucose challenge acutely increase SOD and  
204 GPX activities [14] demonstrating pancreatic islets capacity to maintain adequate redox  
205 balance. However, in the present study, we have shown that protein malnutrition alters  
206 antioxidant enzymes mRNA content and activities.

207 In this sense, SOD and CAT seem to be the more sensible enzymes to protein  
208 malnutrition, since GPX mRNA and activity did not show any alteration. Enhanced SOD  
209 activity response might be related to higher levels of ROS production in male  
210 undernourished rats [28]. In addition, CAT mRNA has also shown to reach significantly  
211 higher values in LP, which in turn, corroborates with the above statement. However,  
212 despite elevated mRNA levels CAT demonstrated lower activity as compared with NP.  
213 This effect could be related to post-transcriptional regulation of protein synthesis  
214 alterations-induced by protein undernourishment, which has been previously  
215 demonstrated to have a time-dependent effect upon antioxidant enzymes mRNA and  
216 activities [28].

217 Most of our results agree with previous report which showed altered SOD and  
218 CAT mRNA and activities whereas the same variables regarding GPx remained  
219 relatively unaltered in three-month-old-protein malnourished rats [28]. In contrast, the

220 relative changes and absolute activities as well as CAT mRNA content observed in our  
221 group of malnourished rats did not reproduce the effects observed in the  
222 aforementioned study, and this might reflect differences in treatment employed by both  
223 investigations. Therefore, further studies are needed to investigate the differences in  
224 antioxidant enzymes, namely CAT and SOD mRNA and activities, alterations profile  
225 responses to intra-uterine and post-weaning protein malnutrition.

226 Our data, therefore, show that post-weaning protein malnutrition, although  
227 apparently less severe than intra-uterine model, also induces imbalance between the  
228 two enzymatic antioxidant scavenger systems SOD and the subsequent  $H_2O_2$   
229 detoxifying systems CAT and GPX. This clearly points toward protein malnutrition-  
230 induced impaired islets redox balance and consequently altered GIIS signaling.

### 231 Protein malnutrition and GIIS redox modulation

232 The insulin secretion values reported here, showed near 50% reduction in LP  
233 GIIS, which is in agreement with other reports [20,21,26]. In a recent review, we  
234 collected available information concerning the molecular and metabolic alterations  
235 induced by protein malnutrition such as: reduced insulin mRNA, PDX-1 and protein  
236 kinases A and C expression, calcium influx, glucose oxidation and anaplerotic capacity;  
237 which taken together may partially explain this observed reduction in low-protein-fed  
238 state GIIS [37]. However, the redox control of GIIS under protein undernourishment  
239 status remained unclear.

240 Previous studies reported the need of ROS generation for adequate insulin  
241 secretion. Indeed, it was demonstrated in INS-1 cell line and mice islets that  $H_2O_2$  is  
242 essential to stimulate GIIS [38]. In addition, Leloup and co-workers [13] demonstrated  
243 that the increase in GIIS at high glucose concentration is accompanied by the rise in  
244 mitochondrial ROS production and, this production seems to be mandatory to insulin  
245 secretion signaling.

246           Based on the insulin secretion redox control and the reduction in CAT activity  
247 induced by protein malnutrition, we investigated the effect of pre-exposing isolated  
248 pancreatic islets to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in GIIS from early life protein malnourished rats. In addition to  
249 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pre-incubation oxidant effect, long term high glucose exposition, leads to  
250 pancreatic islets damage due to glucotoxicity-induced ROS production [38]. Indeed, the  
251 stressful characteristic of this condition was already reported by our group in neonate  
252 rat pancreatic islets [39]. In this sense, here we demonstrated that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pre-incubation  
253 concentrations until 100 µM plus incubation with high glucose (22.2 or 33.3 mM), did  
254 not alter insulin secretion profile between NP and LP islets, evidencing that LP islets  
255 are able to handle even with high oxidant challenges. However, pre-incubation with  
256 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM) followed by high glucose concentrations incubation, reduced  
257 significantly GIIS as compared to intra-group glucose but without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pre-incubation,  
258 showing imbalanced redox status in both NP and LP.

259           Increased LP islets oxidative stress susceptibility at glucose 33.3 mM incubation  
260 might be due to higher ROS production associated with this condition, in addition to the  
261 observed reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying capacity, which in turn, seems to alter redox status  
262 maintenance and impair adequate GIIS signaling.

263           Thus it was observed that LP islets when pre-incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM,  
264 followed by the incubation with glucose 33.3 mM was enough to reduce GIIS to  
265 baseline values, whereas NP islets showed the same response only at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM  
266 pre-incubation condition. In addition, GIIS decay was significantly different between  
267 groups, being LP fall more pronounced. Therefore, these data reveals that redox  
268 unbalance impairs protein malnourished rats' islets only at high oxidant challenges.

269           The higher LP susceptibility to redox unbalance is reinforced by islets insulin  
270 secretion data when pre-incubated with NAC. It was demonstrated that the pre-  
271 incubation with NAC (10 mM) reduced NP islets insulin secretion, whereas LP showed  
272 improved GIIS in a condition where it was previously abolished. The observed

273 reduction in GIIIS in both groups when pre-incubated with NAC, suggests that when  
274 antioxidant capacity rises excessively, redox insulin secretion signaling is blunted. On  
275 the other hand, the attenuation observed in LP insulin secretion fall might be due to  
276 enhanced antioxidant capacity provided by NAC, ensuring adequate ROS content,  
277 coupling redox balance and GIIIS signaling maintenance.

278 Our data of antioxidant enzymes activities support the statement that LP redox  
279 imbalance induced by the pre-incubation with  $H_2O_2$  (150  $\mu$ M), followed by the  
280 incubation with glucose (33.3 mM), might be due CAT activity downregulation. Indeed,  
281 CAT have a pivotal role in  $H_2O_2$  scavenging at high concentrations according to its  
282 lower affinity with  $H_2O_2$  when compared to GPx [40], which in turn, did not show altered  
283 activity in LP islets. Therefore, it suggests that while ROS production remained only at  
284 GPx detoxifying range, it was not observed alterations in GIIIS profile between groups.  
285 However, when ROS production overwhelmed GPx capacity and reached CAT range,  
286 LP group demonstrated higher susceptibility to redox-unbalance-impairment of GIIIS.

287 In conclusion, our data suggest that short-term early life protein malnourishment  
288 induces reduction in redox GIIIS signaling only at extreme oxidant challenges, elicited  
289 here by high  $H_2O_2$  pre-incubation followed by high glucose incubation, probably due to  
290 lower antioxidant scavenging capacity. However, the chronically lifetime effect of the  
291 reduced antioxidant capacity-induced by protein deficient diets leading to adult life  $\beta$ -  
292 cells dysfunction deserves further investigations, and follow-up studies are required to  
293 answer the remaining questions.

## 294 **Material and Methods**

### 295 Ethics Statement

296 All the experiments described herein were approved by the State University of  
297 Campinas Committee for Ethics in Animal Experimentation and performed according to  
298 the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication no. 85-23, revised 1985).

### 299 Animals and diet

300 Soon after weaning male Wistar rats (21 day-old) from the breeding colony at  
301 UNICAMP were housed at 24°C on a 12 h light/dark cycle. Rats were maintained in  
302 collective cages (five per cage), separated into two groups of isocaloric diets and  
303 treated for 8 weeks with: normo-protein diet (NP) – (17% protein) and low-protein diet  
304 (LP) – (6% protein) and water ad libitum. The two isocaloric diets were prepared  
305 according to AIN-93 guidelines [41] and are detailed in Table 2.

### 306 Body weight

307 Body weight was measured weekly in a digital scale weighting machine from  
308 the beginning to the end of the experiment.

### 309 Blood sample collection

310 Blood samples were collected from the tail in heparinized eppendorf tubes.  
311 Plasma was obtained by centrifugation at 1,800 rpm at 4° C, unless otherwise stated.  
312 After that, plasma samples were kept at -80°C until further analysis.

### 313 Islets isolation

314 After 8 weeks of treatment, animals were sacrificed by decapitation. After an  
315 abdominal incision, common bile and duodenum duct was obstructed; a catheter was  
316 introduced into the bile duct close to the liver. Ten ml of type V collagenase (Sigma, St.  
317 Louis, MO, USA) (0.8 mg/ml for NP and 0.7 mg/ml for LP) was injected into the duct to  
318 distend the pancreas. Pancreas with collagenase was laid down into a tube and placed

319 in 37°C water bath to allow pancreas digestion of the exocrine tissue. After washed  
320 several times with Hank's balanced solution (in mM: 137 NaCl, 5.4 KCl, 4.2 NaHCO<sub>3</sub>,  
321 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 MgSO<sub>4</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4), containing glucose 5.6 mM  
322 and albumin 0.5 g/l, islets were isolated one by one by hand picking. After isolated,  
323 groups of approximately 300 freshly isolated islets were pelleted by centrifugation and  
324 then resuspended in 50 to 100 µL of homogenization buffer containing protease  
325 inhibitors, as previously described [42] for enzyme activity assays. The islets were then  
326 sonicated for 15 seconds (Sonics & Materials, Newtown, CT, USA), and total protein  
327 content was determined by the Bradford method.

#### 328 Biochemical measurements

329 Plasma total protein and albumin were measured using specific kit PROtal  
330 (Laborlab, Sao Paulo, Brazil). Glycaemia was measured using the hand held  
331 glycosimeter Accu-Check Advantage II (Roche Ltd., Basel, Switzerland).

#### 332 Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT)

333 Before ipGTT rats were maintained in a fasted state for 12 hours. After fasting  
334 glycaemia was measured, 2 ml/Kg of a 50% (w/v) glucose solution was administrated  
335 intraperitoneally. Glycaemia was then measured at 15, 30, 60, 120 e 180 minutes after  
336 glucose infusion. Glucose tolerance was estimated by the area under the curve  
337 calculation.

#### 338 RNA extraction and antioxidant enzymes quantitative real-time polymerase 339 chain reaction

340 Freshly isolated islets were sonicated (Sonics & Materials, Newtown, CT, USA)  
341 in TRIzol reagent (InVitrogen, São Paulo, Brazil) for 30 s. After being cleared of debris  
342 by centrifugation at 6000 x g, total RNA was isolated according to the manufacturer's

343 guidelines and quantified by a spectrophotometer. The integrity of RNA was verified by  
344 agarose gel electrophoresis. Complementary DNA was prepared using 3 µg of total  
345 RNA and a reverse transcriptase. The primers used in the experiments were the  
346 standard TaqMan brand (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The genes  
347 analyzed were SOD1 (GenBank NM 017050.1), GPX1 (GenBank NM 030826.3), CAT  
348 (GenBank NM 012520.1). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)  
349 (GenBank NM 017008) was used as a house keeping gene. Real-time polymerase  
350 chain reaction was carried out in the StepOne polymerase chain reaction cycler  
351 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The polymerase chain reaction conditions  
352 were 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95° for 10 s and 60°C for 45 s. Real-  
353 time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied  
354 Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### 355 Antioxidant enzymes activity assays

356 After sonication (Sonics & Materials, Newtown, CT, USA), islets homogenates  
357 were centrifuged at 15000 x g, during 15 min at 4° C. The supernatant was decanted  
358 and assayed for SOD1, GPx1 and CAT. CAT activity was measured photometrically in  
359 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) by monitoring the decrease in absorbance at 240 nm  
360 after the addition of 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [43]. SOD1 and GPx1 activities were measured by  
361 ELISA. SOD1 was measured adding 20 µg of protein to 150 µl of hypoxanthine (0,1mM),  
362 xanthine oxidase (0.07 U) and nitrobluetetrazolium (0,6mM), absorbance was recorded  
363 at 560 nm, according to Winterbourn et al. [44]. GPx1 was measured adding 20 µg of  
364 protein to 150 µl of reduced glutathione (10 mM), NADPH (4 mM), glutathione  
365 reductase (1 U) and 20 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 mM), absorbance was recorded at 365 nm,  
366 according to Yoshikawa et al. [45].

#### 367 Static insulin secretion

368           Groups of five islets were placed in 24 well plates containing 1 ml of Krebs-  
369 Hepes (KRBH) solution (final concentration in mM: 115 NaCl, 10 NaHCO<sub>3</sub>, 5 KCl, 1  
370 MgCl<sub>2</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 15 Hepes, 5.6 glucose and 0,3% bovine albumin (w/v), pH 7.4) and  
371 pre-incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0, 10, 100, 150, 200, 250 and 300 μM. In addition, islets were  
372 also pre-incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM plus NAC 10 mM. Perifusate solutions were  
373 gassed for 30 minutes with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After 30 minutes this solution  
374 was quickly removed and replaced by the same KRBH solution and incubated with  
375 glucose 2.8, 8.3, 11, 22.2 or 33.3 mM for 60 min. After 60 min of incubation, the plates  
376 were chilled in ice bath and supernatant was transferred to tubes and stored at -20°C  
377 for posterior insulin measurement. Insulin concentration in all samples was measured  
378 by RIA using rat insulin as standard, <sup>125</sup>I-labelled bovine insulin as the radioactive  
379 tracer and guinea-pig anti-porcine insulin serum as the antibody [46].

### 380   **Statistical analysis**

381           Results are expressed as means ± SEM. Statistical analyses were performed  
382 with help of Statistic 6.0 for Windows software, using Student-t-test and One-way  
383 ANOVA with student-Newman-Keuls post-hoc test. P values of less than 0.05 were  
384 considered statistically significant.

### 385   **References**

- 386 1) Aguilar-Bryan L Nichols CG Wechsler SW Clement JP 4th Boyd AE 3rd et al. (1995)  
387 Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin  
388 secretion. Science 268, 423–426.  
389
- 390 2) Szollosi A Nenquin M Aguilar-Bryan L Bryan J Henquin JC (2007) Glucose  
391 stimulates Ca<sup>2+</sup> influx and insulin secretion in 2-week-old beta-cells lacking ATP-  
392 sensitive K<sup>+</sup> channels. J Biol Chem 282(3): 1747-1756.  
393

- 394 3) MacDonald MJ Fahien LA Brown LJ Hasan NM Buss JD et al. (2005) Perspective:  
395 emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin  
396 secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(1): E1-15.  
397
- 398 4) Stark R Pasquel F Turcu A Pongratz RL Roden M et al. (2009)  
399 Phosphoenolpyruvate cycling via mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase  
400 links anaplerosis and mitochondrial GTP with insulin secretion. *J Biol Chem*.  
401 284(39): 26578-26590.  
402
- 403 5) Ronnebaum SM Ilkayeva O Burgess SC Joseph JW Lu D et al. (2006) A pyruvate  
404 cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase  
405 regulates glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 281(41): 30593-30602.  
406
- 407 6) Jensen MV Joseph JW Ilkayeva O Burgess S Lu D et al. (2006) Compensatory  
408 responses to pyruvate carboxylase suppression in islet beta-cells. Preservation of  
409 glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 281(31):22342-22351.  
410
- 411 7) MacDonald MJ (1995) Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in  
412 pancreatic islets: further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J Biol*  
413 *Chem* 270(34):20051-20058.  
414
- 415 8) Guay C Madiraju SR Aumais A Joly E Prentki M (2007) A role for ATP-citrate lyase,  
416 malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion. *J*  
417 *Biol Chem* 282(49): 35657-35665.  
418
- 419 9) Schuit F De Vos A Farfari S Moens K Pipeleers D et al. (1997) Metabolic fate of  
420 glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol*  
421 *Chem* 272(30): 18572-18579.  
422
- 423 10) Farfari S Schulz V Corkey B Prentki M (2000) Glucose-regulated anaplerosis and  
424 cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle  
425 in insulin secretion. *Diabetes* 49(5): 718-726.  
426
- 427 11) Fransson U Rosengren AH Schuit FC Renström E Mulder H (2006) Anaplerosis via  
428 pyruvate carboxylase is required for the fuel-induced rise in the ATP:ADP ratio in rat  
429 pancreatic islets. *Diabetologia* 49(7): 1578-1586.

430

431 12) Hasan NM Longacre MJ Stoker SW Boonsaen T Jitrapakdee S et al. (2008)  
432 Impaired anaplerosis and insulin secretion in insulinoma cells caused by small  
433 interfering RNA-mediated suppression of pyruvate carboxylase. *J Biol Chem*  
434 283(42):28048-28059.

435

436 13) Leloup C Cuzin CT Magnan C Karaca M Castel J et al. (2009) Mitochondrial  
437 Reactive Oxygen Species Are Obligatory Signals for Glucose-Induced Insulin  
438 Secretion. *Diabetes* 58(3):673-681.

439

440 14) Oliveira HR Curi R Carpinelli AR (1999) Glucose induces an acute increase of  
441 superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. *Am J Physiol* 276(2  
442 Pt 1): C507-510.

443

444 15) Latorraca MQ Reis MA Carneiro EM Mello MA Velloso LA et al. (1998) Protein  
445 deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of  
446 insulin action in rats. *J Nutr* 128(10): 1643-1649.

447

448 16) Milanski M Arantes VC Ferreira F de Barros Reis MA Carneiro EM et al. (2005)  
449 Low-protein diets reduce PKAalpha expression in islets from pregnant rats. *J Nutr*  
450 135(8): 1873-1878.

451

452 17) Araujo EP Amaral ME Filiputti E De Souza CT Laurito TL et al. (2004) Restoration of  
453 insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression  
454 of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Endocrinol* 181: 25-38.

455

456 18) Filiputti E Ferreira F Souza KLA Stoppiglia LF Arantes VC et al. (2008) Impaired  
457 insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal  
458 kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. *Life Sci.* 82(9-10):  
459 542- 548.

460

461 19) Silva PRM Filiputti E Zoppi CC Silveira LR Quesada I et al. (2009) Leucine  
462 supplementation enhances glutamate dehydrogenase expression and restores  
463 glucose-induced insulin secretion in protein malnourished rats. *Metabolism*  
464 DOI:10.1016/j.metabol.2009.10.014.

465

- 466 20) Ferreira F Filiputti E Arantes VC Stoppiglia LF Araújo RP et al. (2003) Decreased  
467 cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is  
468 associated with reduced protein kinase calpha expression. J Nutr 133(3): 695-699.  
469
- 470 21) Ferreira F Barbosa HCL Stoppiglia LF Delghingaro – Augusto V Pereira EA  
471 Boschero AC et al. (2004) Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low  
472 protein diet is associated with a reduced PKA alpha expression J Nutr 134(1): 63-  
473 67.  
474
- 475 22) Delghingaro-Augusto V Ferreira F Bordin S do Amaral ME Toyama MH *et al.* (2004)  
476 A low protein diet alters gene expression in rat pancreatic islets. J Nutr 134(2): 321-  
477 327.  
478
- 479 23) Carneiro EM Mello MAR Gobatto CA Boschero AC (1995) Low protein diet impairs  
480 glucose-induced insulin secretion from and <sup>45</sup>Ca uptake by pancreatic rat islets. J  
481 Nutr Biochem 6: 314- 318.  
482
- 483 24) Latorraca MQ Carneiro EM Mello MA Boschero AC (1999) Reduced insulin  
484 secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is  
485 associated with a diminished calcium uptake. J Nutr Biochem 10 (1): 37-43.  
486
- 487 25) de Barros Reis MA Arantes VC Cunha DA Latorraca MQ Toyama MH *et al.* (2008)  
488 Increased L-CPT-1 activity and altered gene expression in pancreatic islets of  
489 malnourished adult rats: a possible relationship between elevated free fatty acid  
490 levels and impaired insulin secretion. J Nutr Biochem 19(2): 85-90.  
491
- 492 26) Filiputti E Rafacho A Araujo EP Silveira LR Trevisan A et al. (2009) Augmentation of  
493 insulin secretion by leucine supplementation in malnourished rats: Possible  
494 involvement of PI3K/mTOR pathway. Metabolism DOI:  
495 10.1016/j.metabol.2009.09.007.  
496
- 497 27) Remacle C Dumortier O Bol V Goosse K Romanus P et al. (2007) Intrauterine  
498 programming of the endocrine pancreas. Diabetes Obes Metab.9 Suppl 2: 196-209.  
499

- 500 28) Theys N Clippe A Bouckenooghe T Reusens B Remacle C (2009) Early low protein  
501 diet aggravates unbalance between antioxidant enzymes leading to islet  
502 dysfunction. *PLoS One*. 4(7): e61110.  
503
- 504 29) Merezak S Hardikar AA Yajnik CS Remacle C Reusens B (2001) Intrauterine low  
505 protein diet increases fetal beta-cell sensitivity to NO and IL-1 beta: the protective  
506 role of taurine. *J Endocrinol* 171(2): 299-308.  
507
- 508 30) Merezak S Reusens B Renard A Goosse K Kalbe L et al. (2004) Effect of maternal  
509 low-protein diet and taurine on the vulnerability of adult Wistar rat islets to cytokines.  
510 *Diabetologia* 47(4): 669–675.  
511
- 512 31) Maechler P Carobbio S Rubi B (2006) In beta-cells, mitochondria integrate and  
513 generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell Biol* 38(5-  
514 6): 696-709.  
515
- 516 32) Li N Frigerio F Maechler P (2008) The sensitivity of pancreatic beta-cells to  
517 mitochondrial injuries triggered by lipotoxicity and oxidative stress. *Biochem Soc*  
518 *Trans.* 36(Pt 5): 930-934.  
519
- 520 33) Lenzen S (2008) Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans*  
521 36(Pt3): 343-347.  
522
- 523 34) Poitout V Robertson RP (2008) Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell  
524 dysfunction. *Endocr Rev* 29(3): 351-366.  
525
- 526 35) Theys N Bouckenooghe T Ahn MT Remacle C Reusens B (2009) Maternal low  
527 protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in  
528 the adult rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* DOI:  
529 10.1152/ajpregu.00280.2009.  
530
- 531 36) Chan CB Saleh MC Koshkin V Wheeler MB (2004) Uncoupling protein 2 and islet  
532 function. *Diabetes* 53 Suppl 1:S136-42.  
533
- 534 37) Zoppi CC Silveira LR Oliveira CAM Boschero AC Curi R et al. Insulin release,  
535 peripheral insulin resistance and muscle contraction capacity in protein malnutrition:

- 536 A role of tricarboxylic acid cycle anaplerosis. *Br J Nutr* DOI:  
537 10.1017/S0007114509993060  
538
- 539 38) Pi J Bai Y Zhang Q Wong V Floering LM et al. (2007) Reactive Oxygen Species as  
540 a Signal in Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes* 56(7): 1783-1791.  
541
- 542 39) Stoppiglia LF Rezende LF Cappelli AP Ferreira F Boschero AC (2008) Altered  
543 NAD(P)H production in neonatal rat islets resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Life Sci* 83(21-22): 709-  
544 716.  
545
- 546 40) Eaton JW (1991) Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen  
547 peroxide: mysteries of the bestiary. *J Lab Clin Med* 118: 3-4.  
548
- 549 41) Reeves PG Nielsen FH Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory  
550 rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee  
551 on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123(11):1939-1951.  
552
- 553 42) Amaral ME Ueno M Carvalheira JB Carneiro EM Velloso LA et al. (2003) Prolactin-  
554 signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-  
555 signaling pathway. *Horm Metab Res* 35: 282-289.  
556
- 557 43) Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126.  
558
- 559 44) Winterbourn CC Hawkins RE Brian M Carrell RW (1975) The estimation of red cell  
560 superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85(2): 337-341.  
561
- 562 45) Yoshikawa T Naito Y Kishi A Tomii T Kaneko T et al. (1993) Role of active oxygen,  
563 lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury  
564 induced by indomethacin in rats. *Gut*. 34(6): 732-737.  
565
- 566 46) Scott AM. Atewter I Rojas E (1981) A method for the simultaneous measurement of  
567 insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans.  
568 *Diabetologia* 21(5): 470-475.  
569

## 570 **Acknowledgements**

571 Authors acknowledge here FAPESP and CNPq for the financial support. A.P.G.  
572 Cappelli and C.C. Zoppi are recipient of FAPESP Masters Degree (Proc. 06/58822-2)  
573 and CNPq Post-Doctoral (Proc. 150541/2009-0) Scholarships respectively.

574

575

576

577

### 578 **Figure Legends**

579 Figure 1. SOD1, CAT and GPX1 messenger RNA (mRNA) (A, B and C respectively) in  
580 isolated islets from control (NP, 17% protein) and low-protein-fed rats (LP, 6% protein).  
581 Values are presented as mean  $\pm$  SEM (n=5-9) normalized by the internal control  
582 (GAPDH) from two independent experiments.

583 Figure 2. SOD1, CAT and GPX1 activities (A, B and C respectively) in isolated islets  
584 from control (NP, 17% protein) and low-protein-fed rats (LP, 6% protein). Values are  
585 presented as mean  $\pm$  SEM (n=4). \* p < 0.05 (Student's-t-Test).

586 Figure 3. Isolated pancreatic islets static insulin secretion from control (NP, 17%  
587 protein) and low-protein-fed (LP, 6% protein) rats. Islets were pre-incubated in Krebs-  
588 Ringer solution containing glucose 5.6 mM with or without 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 minutes.  
589 After pre-incubation, islets were incubated for 60 minutes in Krebs-Ringer solution  
590 containing glucose 2.8, 11 e 22.2 mM. Values are presented as mean  $\pm$  SEM (n=12-  
591 45). \*p<0.05 (Student's-t-Test) compared to NP for the same condition.

592 Figure 4. Isolated pancreatic islets static insulin secretion, percent from control and  
593 percent from maximal insulin secretion (A, B and C respectively) in NP and LP rats.  
594 Islets were pre-incubated in Krebs-Ringer solution containing glucose 5.6 mM with  
595 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 10, 100, 150, 200, 250 and 300  $\mu$ M) for 30 minutes. After pre-incubation, islets

596 were incubated for 60 minutes in Krebs-Ringer solution containing glucose 22.2 mM.  
597 Values are presented as mean  $\pm$  SEM (n=7-20). \*p<0.05 (ANOVA one-way and  
598 student- Newman-Keuls post-hoc test) compared to glucose 2.8 mM condition from the  
599 same experimental group.

600 Figure 5. Isolated pancreatic islets static insulin secretion, percent from control and  
601 percent from maximal insulin secretion (A, B and C respectively) in NP and LP rats.  
602 Islets were pre-incubated in Krebs-Ringer solution containing glucose 5.6 mM with  
603 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 10, 100, 150, 200, 250 and 300  $\mu$ M) for 30 minutes. After pre-incubation, islets  
604 were incubated for 60 minutes in Krebs-Ringer solution containing glucose 33.3 mM.  
605 Values are presented as mean  $\pm$  SEM (n=6-8). \*p<0.05 (ANOVA one-way with student-  
606 Newman-Keuls post-hoc test) compared to glucose 2.8 mM condition from the same  
607 experimental group.

608 Figure 6. Isolated pancreatic islets static insulin secretion from control (NP, 17%  
609 protein) and low-protein-fed (LP, 6% protein) rats. Islets were pre-incubated in Krebs-  
610 Ringer solution containing glucose 5.6 mM with or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150  $\mu$ M and NAC 10  
611 mM for 30 minutes. After pre-incubation, islets were incubated for 60 minutes in Krebs-  
612 Ringer solution containing glucose 2.8 and 33.3 mM. Values are presented as mean  $\pm$   
613 SEM (n=6-12). Different symbols indicate statistical significance (p<0.05) (Student's-t-  
614 Test and ANOVA one-way with Student-Newman-Keuls post-hoc test) among different  
615 conditions.

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628 **Tables**

629 Table 1. Growth and blood parameters.

	<b>NP</b>	<b>LP</b>
<b>Body weight (g)</b>	<b>451.7 : 12.173</b>	<b>262.7 : 17.473 *</b>
<b>Fast total protein (g/dl)</b>	<b>7,77 : 0,33</b>	<b>6,55 : 0,34 *</b>
<b>Fed albumin (g/dl)</b>	<b>2,89 : 0,05</b>	<b>2,72 : 0,09 *</b>
<b>Fast albumin (g/dl)</b>	<b>2,98 : 0,10</b>	<b>2,65 : 0,08 *</b>
<b>Fast glucose (mg/dl)</b>	<b>69 : 1.88</b>	<b>65.69 : 2.00</b>
<b>Fast insulin (ng/ml)</b>	<b>1,04 : 0,12</b>	<b>0,71 : 0,13</b>
<b>AUC ipGTT (mg/dl.min)</b>	<b>31228.33 : 1577.47</b>	<b>18145.5 : 1231.99 *</b>

630

631 Values are presented as mean  $\pm$  SEM for body weight (n=10), fed total plasma protein

632 (n=9), fast total plasma protein (n=5-6), fed albumin (n=9), fast albumin (n=10), fast

633 glycaemia(n=13), fast insulin (n=8-10) and ipGTT area under the curve (AUC) (n= 9-

634 10). \* p &lt; 0.05 (Student's-t-Test).

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645 Table 2. Detailed 17% normal protein (NP) and 6% low protein (LP) diets composition.

<b>Ingredient</b>	<b>Normal protein (17% protein) (g/kg)</b>	<b>Low protein (6% protein) (g/kg)</b>
<b>Casein (84% protein)</b>	<b>202.0</b>	<b>71.5*</b>
<b>Cornstarch</b>	<b>397.0</b>	<b>480.0*</b>
<b>Dextrinised cornstarch</b>	<b>130.5</b>	<b>159.0*</b>
<b>Sucrose</b>	<b>100.0</b>	<b>121.0*</b>
<b>Soybean oil</b>	<b>70.0</b>	<b>70.0</b>
<b>Fiber</b>	<b>50.0</b>	<b>50.0</b>
<b>Mineral mix **</b>	<b>35.0</b>	<b>35.0</b>
<b>Vitamin mix **</b>	<b>10.0</b>	<b>10.0</b>
<b>L-Cystine</b>	<b>3.0</b>	<b>1.0</b>
<b>Choline chlorydrate</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>

646

647 \*Difference between the two isocaloric diets.

648 \*\* For detailed composition see Reeves et al., 1993.

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661 Table 3. Real time RT-PCR primers used for mRNA quantification.

mRNA	Genbank code	Primer sequences	Product size	Annealing Temperature (C°)	Cycles
SOD1	NM 017050.1	Fw: 5'-TGAAGAGAGGCATGTTGGAGA - 3'	147	60	40
		Rv: 5'-TCATCTTGTTCCTCGTGGACC- 3'			
GPX1	NM 030826.3	Fw: 5'-CCCTCAAGTATGTCCGACCC- 3'	105	60	40
		Rv: 5'-GCAGGAAGGTAAAGAGCGGG- 3'			
CAT	NM 012520.1	Fw: 5'-GATGAAGCAGTGAAGGAGC- 3'	154	60	40
		Rv: 5'-TGCCATCTCGTCGGTGAA A- 3'			
GAPDH	NM 017008	Fw: 5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG- 3'	97	60	40
		Rv: 5'-AACCTGGTCCTCAGTGTAGCCC- 3'			

662 Fw: Forward; Rv: Reverse.

663

664

665

666

667

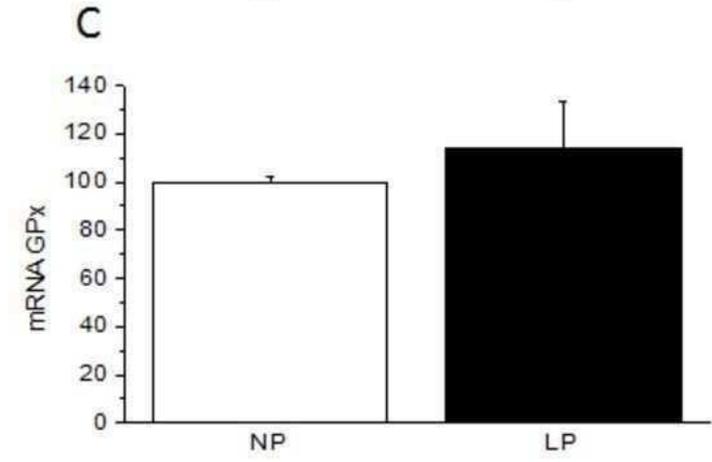
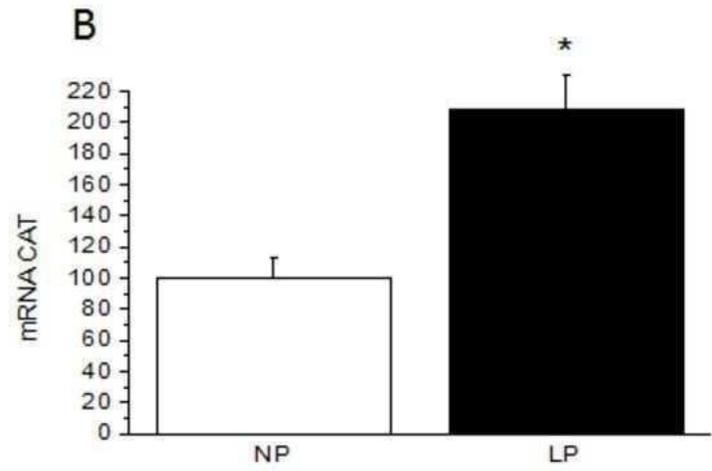
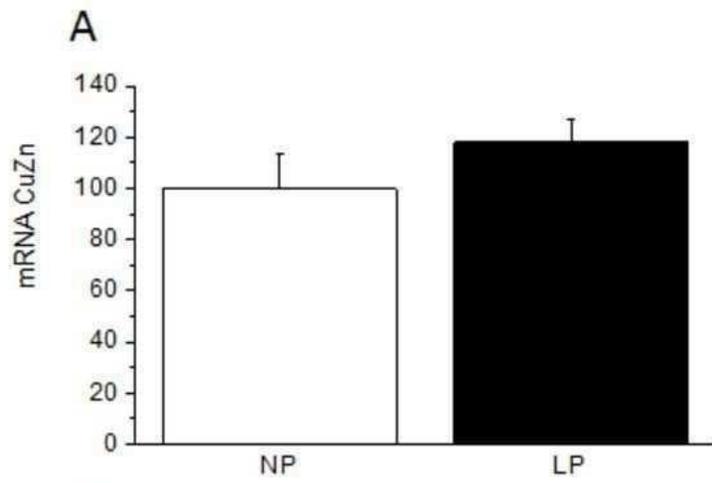
668

669

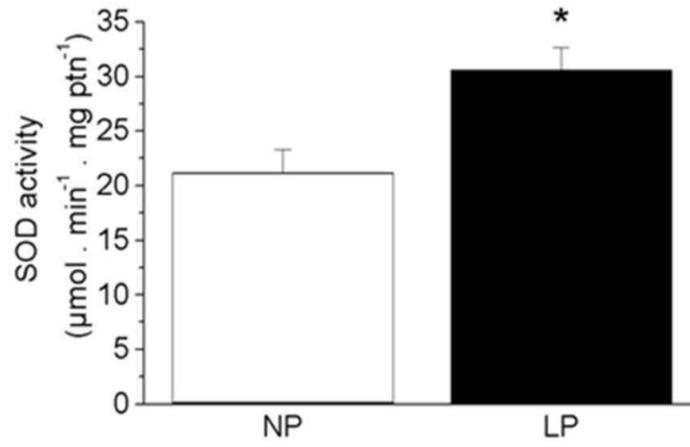
670

671

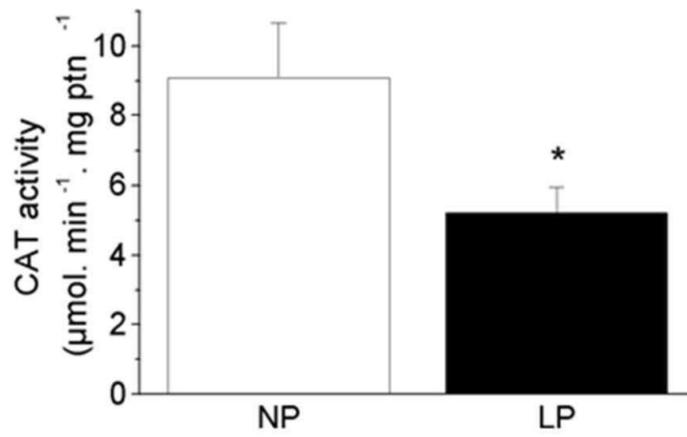
672



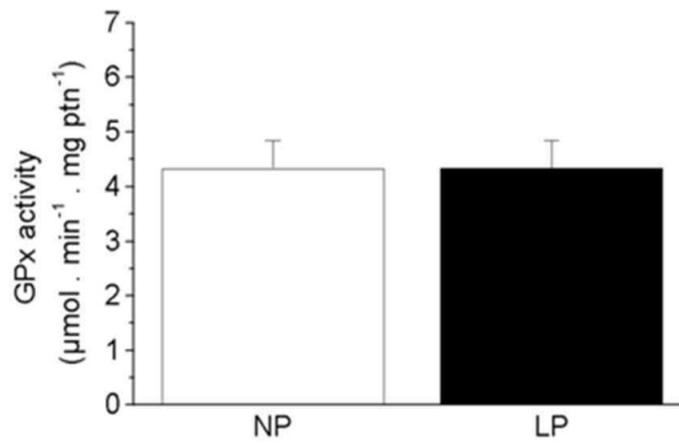
A

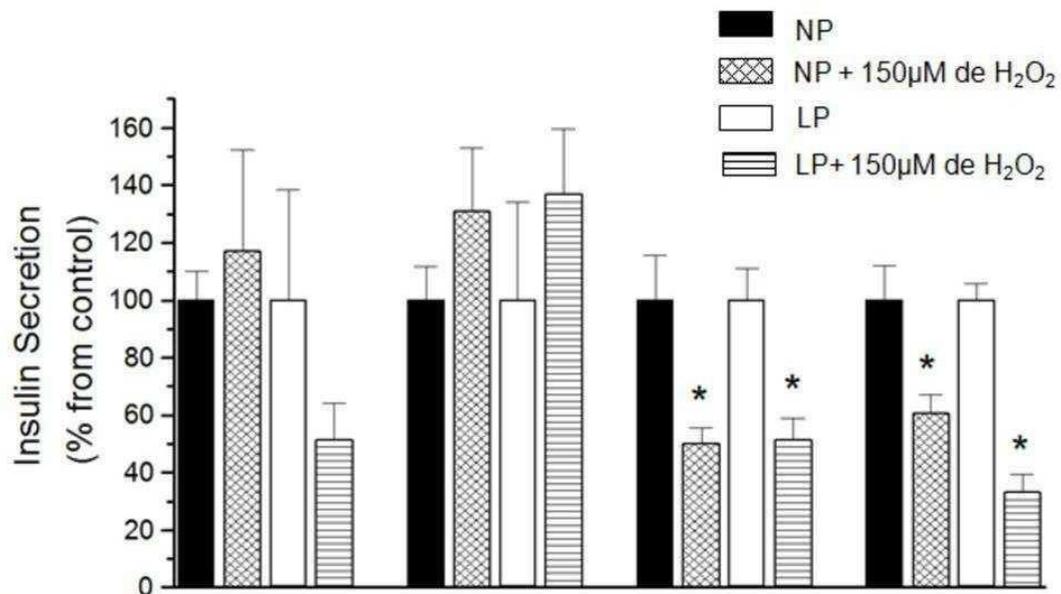


B



C

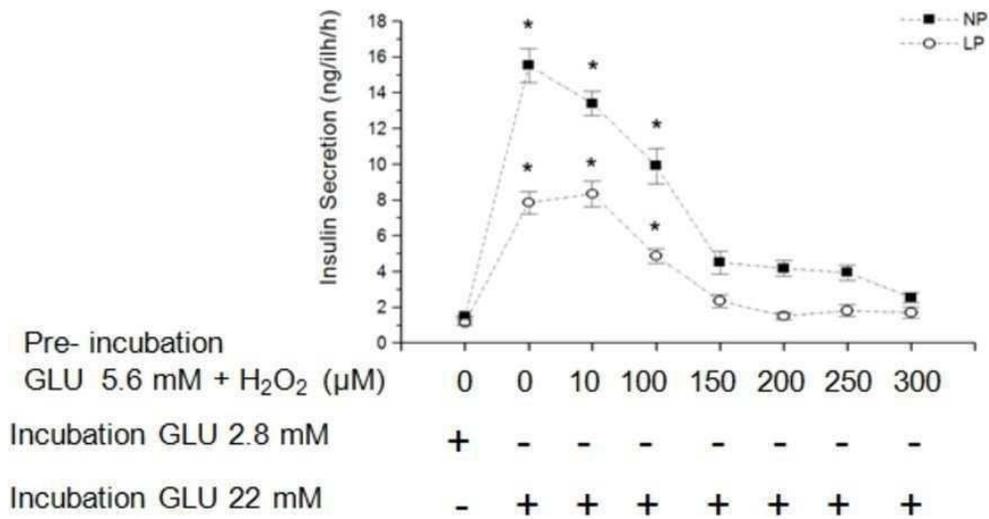




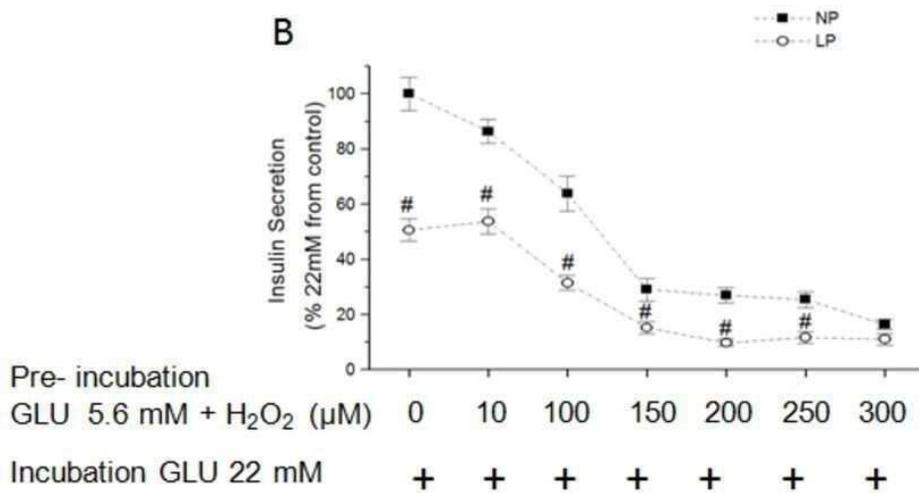
Incubation

GLU 2.8 mM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU 8.3 mM	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU 22 mM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
GLU 33 mM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

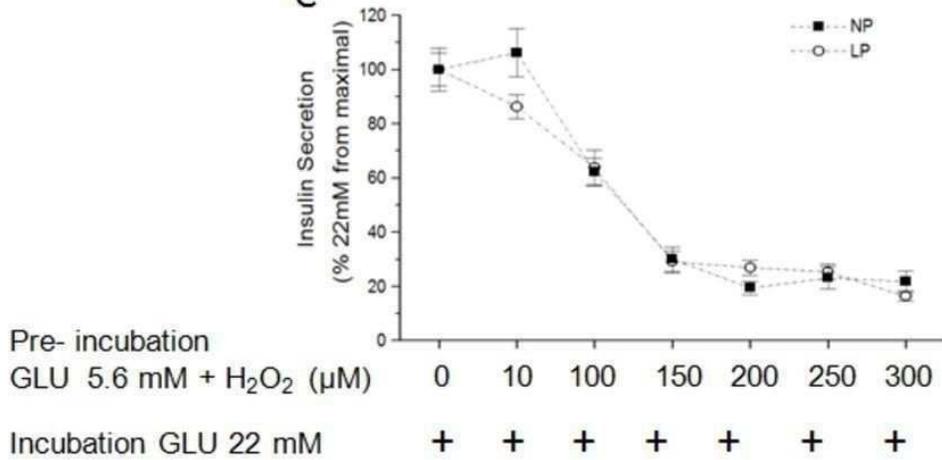
**A**



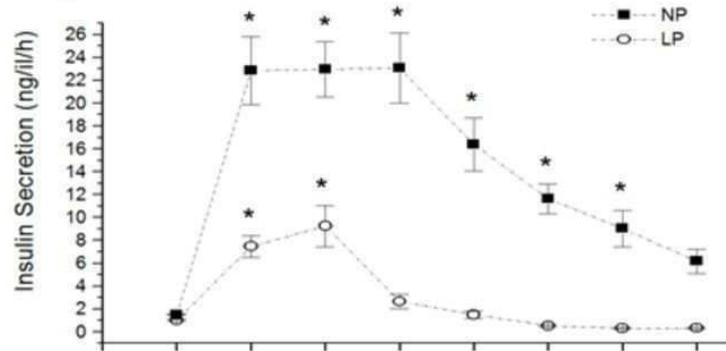
**B**



**C**

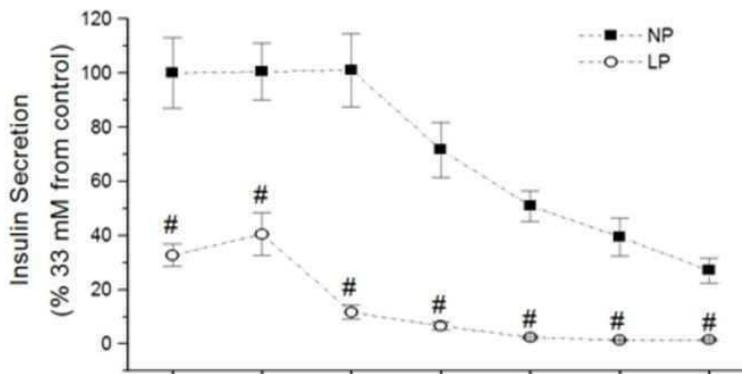


**A**



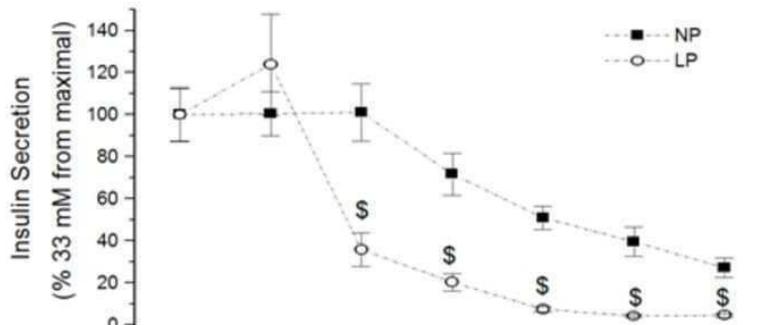
Pre-incubation  
 GLU 5.6 mM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μM) 0 0 10 100 150 200 250 300  
 Incubation GLU 2.8 mM + - - - - - - -  
 Incubation GLU 33 mM - + + + + + + +

**B**

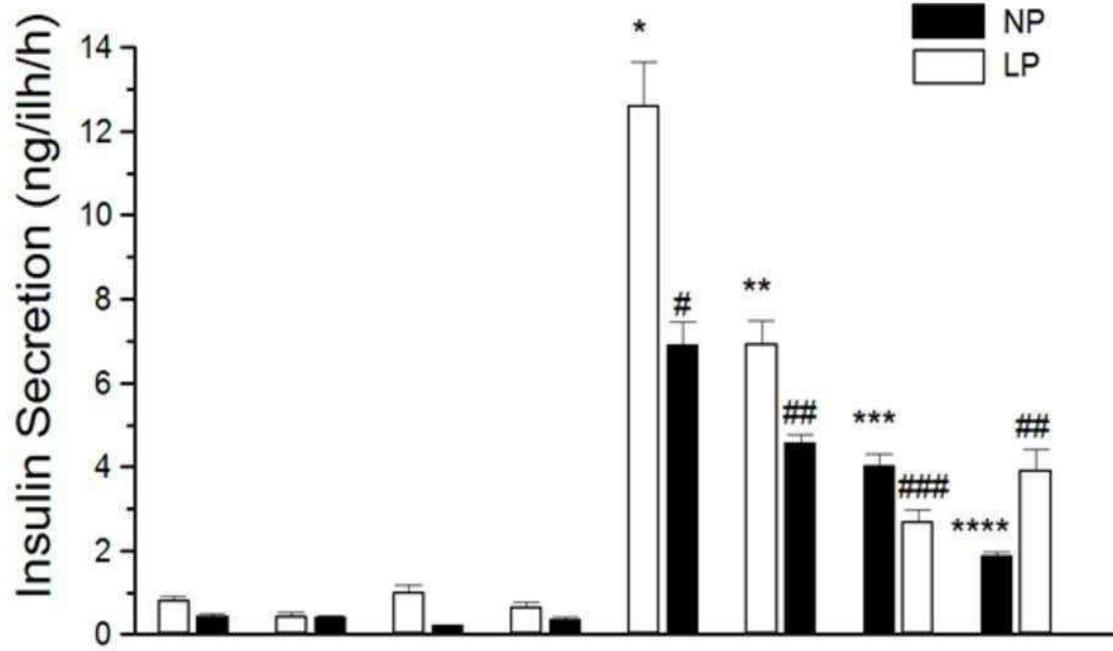


Pre-incubation  
 GLU 5.6 mM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μM) 0 10 100 150 200 250 300  
 Incubation GLU 33 mM + + + + + + +

**C**



Pre-incubation  
 GLU 5.6 mM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μM) 0 10 100 150 200 250 300  
 Incubation GLU 33 mM + + + + + + +



Pre-incubation

150µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - - - - + + + + - - - - + + + +

10mM de NAC - - + + - - + + - - + + - - + +

Incubation

GLU 2.8 mM + + + + + + - - - - - - - -

GLU 33 mM - - - - - - + + + + + + + +

	<b>NP</b>	<b>LP</b>
<b>Body weight (g)</b>	<b>451.7 : 12.173</b>	<b>262.7 : 17.473 *</b>
<b>Fast total protein (g/dl)</b>	<b>7,77 : 0,33</b>	<b>6,55 : 0,34 *</b>
<b>Fed albumin (g/dl)</b>	<b>2,89 : 0,05</b>	<b>2,72 : 0,09 *</b>
<b>Fast albumin (g/dl)</b>	<b>2,98 : 0,10</b>	<b>2,65 : 0,08 *</b>
<b>Fast glucose (mg/dl)</b>	<b>69 : 1.88</b>	<b>65.69 : 2.00</b>
<b>Fast insulin (ng/ml)</b>	<b>1,04 : 0,12</b>	<b>0,71 : 0,13</b>
<b>AUC ipGTT (mg/dl.min)</b>	<b>31228.33 : 1577.47</b>	<b>18145.5 : 1231.99 *</b>

<b>Ingredient</b>	<b>Normal protein (17% protein) (g/kg)</b>	<b>Low protein (6% protein) (g/kg)</b>
Casein (84% protein)	202.0	71.5*
Cornstarch	397.0	480.0*
Dextrinised cornstarch	130.5	159.0*
Sucrose	100.0	121.0*
Soybean oil	70.0	70.0
Fiber	50.0	50.0
Mineral mix **	35.0	35.0
Vitamin mix **	10.0	10.0
L-Cystine	3.0	1.0
Choline chlorydrate	2.5	2.5

mRNA	Genbank code	Primer sequences	Product size	Annealing Temperature (C°)	Cycles
SOD1	NM_017050.1	Fw: 5'-TGAAGAGAGGCATGTTGGAGA - 3' Rv: 5'-TCATCTGTTTCTCGTGGACC- 3'	147	60	40
GPX1	NM_030826.3	Fw: 5'-CCCTCAAGTATGTCCGACCC- 3' Rv: 5'-GCAGGAAGGTAAAGAGCGGG- 3'	105	60	40
CAT	NM_012520.1	Fw: 5'-GATGAAGCAGTGAAGGAGC- 3' Rv: 5'-TGCCATCTCGTCGGTGAA A- 3'	154	60	40
GAPDH	NM_017008	Fw: 5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG- 3' Rv: 5'-AACCTGGTCCTCAGTGTAGCCC- 3'	97	60	40