

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Expressão do GLUT2, glicoquinase e hexoquinase e suas repercussões no metabolismo de glicose em ilhotas isoladas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica

Denise de Fátima Ignácio Souza

Cuiabá-MT,
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Expressão do GLUT2, glicoquinase e hexoquinase e suas repercussões no metabolismo de glicose em ilhotas isoladas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de mestre.

Orientanda: Denise de Fátima Ignácio Souza
Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Queiroz Latorraca
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Vanessa Cristina Arantes

Cuiabá-MT,
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

S729e Souza, Denise de Fátima Ignácio
Expressão do GLUT2, glicocinase e hexocinase e suas repercussões no metabolismo de glicose em ilhotas isoladas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica / Denise de Fátima Ignácio Souza. – 2008.
xiii, 42p. : il. ; color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Ciências Médicas, Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2008.

“Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Queiroz Latorraca”.

“Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Cristina Arantes”.

CDU – 613.2.038:57.082.2

Índice para Catálogo Sistemático

1. Dieta hipoprotéica
2. Metabolismo de glicose – Ratas prenhes
3. Restrição protéica – Ratas prenhes
4. Secreção de insulina – Ilhotas pancreáticas – Ratas
5. Animais de laboratório

NÃO SEI

**“Não sei... se a vida é curta ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
Se não tocamos o coração das pessoas.**

Muitas vezes basta ser:

**Colo que acolhe,
 Braço de envolve,
 Palavra de conforta,
 Silêncio que respeita,
 Alegria que contagia,
 Lágrima que corre,
 Olhar que acaricia,
 Desejo que sacia,
 Amor que promove.**

**E isso não é coisa de outro mundo,
 É o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela não seja curta,
Nem longa demais, mas que seja intensa,
Verdadeira, pura... Enquanto dura.”**

“Feliz daquele que transfere o que sabe, e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

À minha filha Leticia pelo companheirismo, por compartilhar o amor pela ciência e pela profissão, por sua dedicação e comprometimento que tornaram possível este trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pelas oportunidades e pela família abençoada que me deste.

Aos meus pais Nirceu Ignácio e Gessy Martins Ignácio e irmãs Maria Regina e Ana Lúcia pelo amor e incentivo incondicionais. Meu eterno amor e gratidão.

Ao meu esposo Célio, minhas filhas e minha sobrinha Camila, pelos momentos de certeza que me proporcionaram, compreendendo a ausência e incentivando acima de qualquer coisa. Especialmente à minha filha Celina pela dedicação, carinho e paciência nas aulas de inglês e tradução dos “*papers*”.

À Profª Drª Márcia Q. Latorraca pela dedicação fraterna, pelas horas de descanso cedidas gentilmente, pela paciência e tolerância, pelo riso fácil e sincero e principalmente pela generosidade em partilhar conhecimento, sabedoria e profissionalismo, serei para sempre grata.

À Profª Drª Vanessa C. Arantes que co-orientou e enriqueceu este trabalho com suas importantes avaliações e criteriosas sugestões e, sobretudo, mostrou-se sempre disposta nos momentos de dúvidas.

À Profª Drª Marise A. de B. Reis e ao Profº Drº Roberto V. Veloso, pela ajuda constante e transmissão de seus conhecimentos em todas as etapas deste trabalho, trazendo riqueza de detalhes e alegria ao longo dos dias

Ao Profº Drº Luiz Fabrizio Stoppiglia pela incrível prontidão na elaboração dos protocolos experimentais e disponibilidade em qualquer momento.

À Profª Drª Maria Salete F. Martins, Profª Drª Maria Helena G. G. da Silva pela convivência agradável e disposição sempre.

Ao Prof.º Drº Everardo M. Carneiro por sempre ter contribuído conosco dando valiosas sugestões, fornecendo reagentes, acompanhando o desenvolver dos resultados e a conferência do manuscrito e ao Prof.º Drº Antonio C. Boscheró por ceder seu laboratório para a realização de algumas análises e pela revisão do manuscrito.

À Sílvia Regina de L. Reis, colega, amiga, comadre e companheira de experimentos, estudos, experiências e sorrisos durante toda minha jornada profissional.

À Nauale H. Fares e Maristela Milanski, queridas amigas, colegas de mestrado e companheiras de trabalho.

Aos colegas do Mestrado em Ciências da Saúde, especialmente à Ana Flávia M. Pessoa e Cristiana B. dos S. Saltaviera pelos agradáveis encontros e auxílio nos experimentos.

Aos amigos do LABA, especialmente ao Celso R. Afonso pela amizade agradável, convivência e apoio diários.

Às alunas de Iniciação Científica ("Lelês"), às que já passaram e às que ainda estão no laboratório, que de alguma forma auxiliaram e acompanharam todas as etapas dessa dissertação.

Aos amigos da UNIMED Cuiabá (Pióter, Ildete, Simone e Marina) pelos risos constantes, compreensão e incentivo durante o desenvolver deste trabalho.

A Sra. Iraci pelo sorriso acolhedor de todos os dias.

Ao CNPq e à FAPEMAT pelo apoio financeiro para a realização do estudo.

SUMÁRIO

ABSTRACT	IX
RESUMO	X
1.0 INTRODUÇÃO	13
2.0 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Mecanismos de acoplamento estímulo-secreção de insulina induzida por glicose</i>	14
2.2 <i>Gestação e alterações no mecanismo de acoplamento-estímulo secreção de insulina</i>	16
2.3 <i>Restrição protéica e alterações no mecanismo de acoplamento-estímulo secreção de insulina</i>	17
3.0 OBJETIVOS	19
3.1 <i>Objetivo geral</i>	19
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	19
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 <i>Animais</i>	20
4.2 <i>Composição das dietas</i>	20
4.3 <i>Procedimentos Experimentais</i>	21
4.4 <i>Isolamento de ilhotas pancreáticas</i>	22
4.5 <i>Secreção estática de insulina</i>	22
4.6 <i>Expressão protéica por Western Blot</i>	22
4.7 <i>Metabolismo de Glicose</i>	23
4.7.1 <i>Captção de 2-Deoxy-D-glicose</i>	23
4.7.2 <i>Utilização e Oxidação de Glicose</i>	23
4.8 <i>Determinações Bioquímica e Hormonal</i>	24
4.8.1 <i>Glicose</i>	24

<u>4.8.2 Insulina</u>	24
<i>4.9 Análise Estatística</i>	25
5.0 RESULTADOS	26
<i>5.1 Perfil nutricional</i>	26
<i>5.2 Secreção estática de insulina</i>	26
<i>5.3 Metabolismo de glicose</i>	27
<i>5.4 Expressão protéica por Western Blotting</i>	30
6.0 DISCUSSÃO	31
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas (g/Kg).....	21
Tabela 2 – Ingestão alimentar, peso corporal final e concentrações séricas de glicose e insulina em ratas prenhes e não prenhes que receberam dieta controle ou hipoprotéica.....	22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Curva dose-resposta da secreção de insulina por ilhotas de ratas CNP, CP (A) HPNP e HPP (B). Grupos de 5 ilhotas foram incubados com diferentes concentrações de glicose por 90min. Os valores representam a média \pm SD de três experimentos independentes, expressos em porcentagem da secreção máxima de insulina. (Teste LSD, $p < 0,05$)..... 28
- Figura 2. Taxa de captação (A e B), utilização (C e D) e oxidação (E e F) em 2,8 e 8,3 mmol/L de glicose por ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP. Valores representam média \pm SD de seis *pools* de 20 ilhotas de cada grupo. * Valores médios diferentes em relação às não prenhes. £ Valores médios em relação às controles. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $p < 0,05$ 30
- Figura 3. Expressão protéica de GLUT2 (A), Glicoquinase (B) e Hexoquinase (C) em ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP. Cinqüenta microgramas de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida (10%) e eletrotransferidas a 120V por 2h. Valores expressos em média \pm SD. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $p < 0,05$ 31

LISTA DE ABREVIATURAS

CNP	Grupo controle não prenhe
CP	Grupo controle prenhe
HPNP	Grupo hipoprotéico não prenhe
HPP	Grupo hipoprotéico prenhe
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
GCK	Glicoquinase
HXK	Hexoquinase
α	Alfa
β	Beta
kDa	Quilodalton
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
BSA	Soro de Albumina Bovina
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano

ABSTRACT

We investigated the effect of protein restriction during pregnancy on insulin secretion, the expression of GLUT2, glucokinase and hexokinase as well as glucose uptake, glucose utilization and oxidation rates in pancreatic islets. Adult control non-pregnant (CNP) and control pregnant (CP) rats were fed a normal-protein diet (17%), whereas low-protein non-pregnant (LPNP) and low-protein pregnant (LPP) rats were fed a low-protein diet (6%) for 15 d. Islets from pregnant rats exhibited the dose-response curves to glucose shifted to the left compared to islets from non-pregnant rats. The half-maximal response (EC_{50}) from LPP group was lower in relation to other groups. Glucokinase and GLUT2 expression levels were lower in islets from LPP group compared to the other groups. Hexokinase level was lower in LPP than in the CP and CNP islets and pregnancy increased its expression only in CP islets. In both 2.8 and 8.3 mmol/L glucose pregnant rats had increased glucose uptake, but the magnitude the increase in the glucose uptake in response to pregnancy was lower in the islets from LPP rats than in islets from CP rats. At 2.8mmol/L glucose LPP and CP islets exhibited equivalent glucose utilization, whereas in 8.3 mmol/L glucose uptake was higher in LPNP and LPP than in CNP and CP islets. In 2.8 mmol glucose/L, pregnancy produced increase in the islet glucose oxidation rate, but in greater degree in CP than in LPP group. In 8.3mmol/l glucose, the glucose oxidation in islets from LPNP rats was significantly higher in relation to islets from CNP rats. Pregnancy reduced glucose oxidation rate in islets from LPP rats and enhanced in islets from CP, but the rate of glucose oxidation did not differ between these groups. Thus, our results suggest that the alterations in the expression of GLUT2, glucokinase and hexokinase did not impair glucose metabolism and did not correlate with the glucose sensitivity degree seen in the islets from all groups. The shift the dose-response curve to glucose appears to require secondary events to these metabolic and molecular alterations.

Key words: low protein diet, pregnancy, glucose metabolism, islets

RESUMO

Este trabalho avaliou o efeito da restrição protéica durante a prenhez sobre a secreção de insulina, a expressão do GLUT2, GCK e HXK bem como as taxas de captação, utilização e oxidação de glicose em ilhotas pancreáticas. Foram avaliadas ratas Wistar (90 dias) prenhes e não prenhes submetidas à dieta hipoprotéica (HPP e HPNP) ou controle (CP e CNP) do 1º ao 15º dia de prenhez. Aos 15 dias, ilhotas foram isoladas para determinação da secreção de insulina em resposta à glicose, das taxas de captação, utilização e oxidação de glicose e a expressão do GLUT2, GCK e HXK por *Western Blot*. Ilhotas de ratas prenhes exibiram curva dose-resposta da secreção de insulina em resposta à glicose deslocada para a esquerda em comparação às ilhotas de ratas não prenhes. A concentração de glicose que promoveu metade da resposta máxima de secreção de insulina (EC_{50}) do grupo HPP foi menor em relação a todos os outros grupos. As expressões protéicas do GLUT2 e da GCK foram menores em ilhotas do grupo HPP em comparação à todos os outros grupos. Os níveis protéicos de HXK foram menores nos grupos HPNP e HPP do que nas ilhotas dos grupos CNP e CP e a prenhez aumentou sua expressão apenas no grupo CP. Nas concentrações de glicose de 2,8 e 8,3mmol/L, as ratas prenhes apresentaram aumento na captação de glicose, mas a magnitude desse aumento em resposta à prenhez foi menor em ilhotas do grupo HPP do que em ilhotas do grupo CP. Em 2,8mmol/L de glicose ilhotas de ratas HPP e CP exibiram taxa de utilização de glicose similar, enquanto em 8,3mmol/L desse substrato a captação foi maior nos grupos HPNP e HPP do que em ilhotas de ratas CNP e CP. Em 2,8mmol/L de glicose a prenhez produziu aumento na taxa de oxidação de glicose, mas em maior grau no grupo CP do que no grupo HPP. Aumentando a concentração para 8,3mmol/l de glicose, a oxidação desse substrato em ilhotas HPNP foi significativamente maior em relação a ilhotas de ratas CNP. A prenhez reduziu a taxa de oxidação de glicose em ilhotas de ratas alimentadas com dieta hipoprotéica e aumentou em ilhotas de ratas controles, mas a taxa de oxidação de glicose não diferiu entre os grupos HPP e CP. Assim, esses resultados sugerem que as alterações na expressão protéica do GLUT2, GCK e HXK não prejudicaram o metabolismo de glicose e não se correlacionaram com as mudanças na sensibilidade à glicose vista em todos os grupos. O deslocamento da curva dose-resposta parece requerer eventos secundários a essas alterações metabólicas e moleculares.

Palavras chave: dieta hipoprotéica, prenhez, metabolismo de glicose, ilhotas

1. INTRODUÇÃO

A concentração sérica de insulina, *in vivo*, é regulada de maneira imediata por nutrientes circulantes, especialmente pela glicose. É ainda, direta ou indiretamente, modulada por hormônios, neurotransmissores e agentes farmacológicos (1). Esse controle multifatorial permite que a célula beta secrete insulina em quantidade e tempo adequados, mantendo a homeostasia de nutrientes em diferentes situações fisiológicas (2).

A gravidez é um estado fisiológico caracterizado por aumento da demanda da insulina, resultante da hiperfagia e da redução da sensibilidade periférica a esse hormônio (3,4). Para garantir o suprimento adequado de insulina e a homeostase glicêmica, as ilhotas pancreáticas exibem, no curso da gravidez, aumento gradual da secreção quando estimuladas com glicose (5). Em roedores, ocorre aumento de cerca de quatro vezes na liberação total de insulina no décimo quinto dia de prenhez. Além disso, ocorre redução do limiar de estimulação da secreção de insulina pela glicose, que atinge 3,25 mmol/L entre o décimo segundo e décimo quinto dia de prenhez (6). O lactogênio placentário e a prolactina têm sido considerados os fatores primordiais envolvidos nas mudanças adaptativas do pâncreas endócrino durante a gravidez (7,8).

Em qualquer fase da vida, a restrição protéica promove alterações significativas na morfologia e na função das células beta pancreáticas, que se traduzem por diminuição da capacidade de secretar insulina (9). A diminuição da secreção de insulina tem sido relacionada a alterações em diferentes passos no mecanismo de secreção (10,11,12).

Na gravidez e na restrição protéica, as adaptações das células beta pancreáticas resultam, ao menos em parte, de alterações nas taxas de captação e de metabolismo da glicose. Considerando que GLUT2, Glicoquinase e Hexoquinase regulam esses passos e que a restrição protéica e a gravidez os modulam de maneira oposta, o presente estudo avaliou o efeito da restrição protéica durante a prenhez sobre a expressão dessas proteínas e suas repercussões no metabolismo da glicose.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mecanismos de acoplamento estímulo-secreção de insulina induzida por glicose

A glicose é o agente estimulador da secreção de insulina mais potente, pelo menos nos mamíferos onívoros, porém o mecanismo preciso e os fatores que estão envolvidos no processo secretório não estão completamente entendidos (13).

Propõe-se que a secreção de insulina estimulada pela glicose dependa de seu metabolismo pelas células beta pancreáticas e do conseqüente aumento na relação ATP/ADP (2).

Em mamíferos, os dois primeiros passos do metabolismo da glicose são o seu transporte e a sua fosforilação, realizados, respectivamente, por uma família de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) e por duas enzimas que fosforilam esse monossacarídeo (14,15). Nas células beta pancreáticas, são representadas pelo GLUT2, pela HXK e GCK, cujas atividades mudam de acordo com as variações das concentrações de glicose sanguínea (15,16).

O GLUT2 apresenta baixa afinidade pela glicose ($K_m=17$ mmol/l) (17,18,19), mas alta capacidade ($V_{máx}$ muito elevado), permitindo que a glicose seja rapidamente transportada para dentro da célula beta (20). Sua ausência leva à perda da primeira fase de secreção de insulina, mas manutenção da segunda fase (21). Isso indica que mesmo na completa ausência desse transportador, a glicose ainda consegue ser captada e metabolizada pela célula beta para gerar sinais secretórios (21).

Uma vez transportada, a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato sendo que duas enzimas têm papel importante nesse passo: hexoquinase I-III e glicoquinase, que se diferenciam bioquimicamente por seus pesos moleculares, cinética enzimática e propriedades alostéricas (22).

A hexoquinase possui um peso molecular de 109 kDa (23), tem alta afinidade para glicose ($K_m=1$ mmol/l) e é fortemente inibida pela glicose-6-fosfato e, em menor grau, pela glicose 1,6-difosfato (24). Tem sido demonstrado que em ilhotas de camundongos (25,26) e de ratos (27), pelo menos 50% da fosforilação total de glicose parece ser catalisada pela hexoquinase. Células beta transgênicas ou tumorais que super expressam a hexoquinase apresentam um aumento da sensibilidade à glicose, representada pelo desvio da curva dose-resposta para a esquerda (28).

A glicoquinase ou hexoquinase IV, enzima com peso molecular de 50kDa tem o papel preponderante na fosforilação da glicose na célula beta por apresentar baixa afinidade por essa hexose ($K_m=10$ mmol/l). Esse mecanismo funciona como válvula de segurança, permitindo a formação de glicose-6-fosfato apenas em concentrações fisiológicas e supra-fisiológicas de glicose no sangue. Também confere à glicoquinase a importante função de regulador do fluxo glicolítico e, portanto, da secreção de insulina (30), caracterizando essa enzima como sensor da glicose na célula beta (32). Mutações no gene da glicoquinase levam a redução da secreção de insulina em Diabetes do Jovem com Aparecimento na Maturidade (Maturity Onset Diabetes of the Young-MODY) (33).

Uma vez fosforilada, a glicose é metabolizada pela glicólise para produzir piruvato, NADH e ATP (34). As células beta pancreáticas expressam baixas quantidades de lactato desidrogenase, a enzima que catalisa a conversão de piruvato a lactato (35, 36, 37) e isso provê piruvato, prioritariamente, para a via metabólica mitocondrial (38). A produção de ATP citosólico provém de duas reações finais da glicólise, que são catalisadas pela 3-fosfoglicerato quinase e piruvato quinase (40, 41).

Ambos, piruvato e NADH entram na mitocôndria para serem metabolizados e produzir ATP. A produção de ATP mitocondrial acontece via fator glicolítico, NADH, através das lançadeiras glicerol-fosfato e malato-aspartato (39, 42, 43, 44). Essas lançadeiras são essenciais na potencialização da produção de ATP e estímulo à secreção de insulina, uma vez que o bloqueio das duas lançadeiras suprime completamente a resposta da ilhota à glicose (44).

NADH é produzido também na mitocôndria a partir do piruvato pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Ambos os estoques de NADH (citosólico e mitocondrial) estimulam a cadeia de transporte de elétrons (44, 45, 46, 47), gerando ATP pela ATP-sintase acoplada ao gradiente de dissipação do H^+ .

No mecanismo de secreção de insulina, o aumento da relação ATP/ADP leva ao bloqueio dos canais de K^+ ATP-sensíveis (48), promovendo acúmulo desse cátion com conseqüente despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca^{2+} voltagem-sensível. O aumento do influxo de Ca^{2+} ativa a maquinaria exocitótica que leva à migração e extrusão dos grânulos de insulina para o interstício (49, 50, 51, 52, 53).

O acúmulo de cálcio intracelular estimula ainda as enzimas Adenilato Ciclase (AC) e Fosfolipase C (PLC) que geram adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e

inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), respectivamente (54). O IP₃ mobiliza estoques intracelulares de Ca²⁺ e o AMPc e DAG amplificam o sinal deste íon facilitando seu influxo por ativação das proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA) e dependentes de cálcio (PKC), o que potencializa a secreção de insulina (55).

2.2 Gestação e alterações no mecanismo de acoplamento-estímulo secreção de insulina

A gestação induz a resistência periférica à insulina, a qual é normalmente compensada pelo aumento da proliferação das células beta pancreáticas, expansão do volume da ilhota e aumento na síntese e secreção de insulina. Tais alterações estruturais e funcionais das ilhotas pancreáticas também estão associadas ao aumento de hormônios gestacionais, como por exemplo, os lactogênios placentários, progesterona e glicocorticóides (56, 57, 58).

As concentrações séricas de prolactina aumentam dez vezes no início da prenhez, a progesterona aumenta cinco vezes e os glicocorticóides aumentam continuamente através da gestação, com seu ponto mais alto no final desse período (59).

Embora todos os mecanismos envolvidos nas alterações das ilhotas pancreáticas durante a prenhez ainda não estejam completamente elucidados, alguns estudos têm apontado para três evidências: 1) o aumento da síntese de insulina materna do meio para o final da gestação coincide com a elevação das concentrações plasmáticas de lactogênio placentário e, em humanos, de prolactina (6, 60); 2) a expressão gênica e protéica dos receptores de prolactina e de lactogênio placentário está aumentada na ilhota durante a prenhez (61, 62); 3) o lactogênio placentário e a prolactina estimulam a proliferação das células beta, a biossíntese e a secreção de insulina induzidas por glicose em cultura de ilhotas pancreáticas (56, 57, 63, 64, 65).

Os estudos que tentam esclarecer os mecanismos pelos quais a prolactina altera a função das células beta pancreáticas apontam para os seguintes efeitos: 1) em células INS-1 cultivadas, a prolactina aumenta a expressão gênica do Glut2 e estimula a captação de glicose; 2) na presença de glicose, a prolactina induz paralelamente a expressão gênica do Glut2 e da insulina; 3) na ausência de glicose, a prolactina não promove a transcrição do gene da insulina; 4) a prolactina não aumenta a expressão protéica da hexoquinase; 5) em células INS-1 e em ilhotas pancreáticas a prolactina aumenta a expressão da glicoquinase mesmo na ausência da glicose; 6) em células INS-1 a prolactina não altera significativamente os níveis de RNA mensageiro de

glicoquinase, indicando que o aumento da expressão da glicoquinase pode ser exercido no nível pós-transcricional; 7) em extratos citosólicos de ilhotas, a prolactina aumenta a atividade da glicoquinase (66, 67, 68, 69, 70). Assim, os efeitos da prolactina são mediados por mecanismos dependentes e independentes da glicose.

O aumento da expressão do GLUT2, da expressão e da atividade da glicoquinase parecem se correlacionar com o aumento da taxa de utilização e oxidação da glicose e, conseqüentemente com a redução do limiar da glicose para estimulação da secreção de insulina e aumento da sensibilidade das ilhotas a essa hexose (68).

2.3 Restrição protéica e alterações no mecanismo de acoplamento-estímulo secreção de insulina

É consenso que a restrição protéica causa redução da insulina basal e da secreção de insulina em resposta à glicose e a outros estímulos nutrientes e não nutrientes, tais como aminoácidos (leucina e arginina) e glucagon (71, 72, 73, 74, 75, 76, 77).

Aparentemente, nos períodos iniciais da restrição protéica ocorre uma hipertrofia do tecido acinar e das ilhotas. Com o decorrer do tempo de carência nutricional essa hipertrofia é substituída gradativamente por uma atrofia, caracterizada por redução do tamanho e do volume das ilhotas. As células beta pancreáticas de animais desnutridos apresentam número reduzido de grânulos secretórios e também da concentração de insulina por grânulo (9).

Ilhotas pancreáticas de ratos submetidos à restrição protéica apresentam uma menor resposta à glicose, representada pelo deslocamento para a direita da curva dose-resposta glicose-insulina. Esse padrão de anormalidade indica alterações nos mecanismos celulares envolvidos na secreção de insulina, além da redução da massa das células beta pancreáticas (74, 78, 79).

O defeito secretório da insulina em resposta à glicose, observado em animais desnutridos, tem sido atribuído aos seguintes mecanismos: 1) alteração do transportador de glicose e da via glicolítica (80); 2) alteração da oxidação mitocondrial da glicose devido ao prejuízo da atividade da glicerofosfato desidrogenase mitocondrial na célula beta, possivelmente associadas a outras anormalidades enzimáticas (11); 3) diminuição da capacidade da glicose em aumentar a captação e ou reduzir o efluxo de cálcio na célula beta (74, 79, 81); 4) redução da expressão de genes e de proteínas envolvidas na via da PLC-PKC e AMPc-PKA (82, 83).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar os efeitos da restrição protéica durante a prenhez sobre o metabolismo de glicose e a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de ratas.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar o efeito da restrição protéica sobre o perfil nutricional, bioquímico e hormonal de ratas prenhes;
- ✓ Verificar o efeito da restrição protéica durante a prenhez sobre a secreção de insulina em resposta a crescentes concentrações de glicose;
- ✓ Analisar o metabolismo de glicose através das taxas de captação, utilização e oxidação desta hexose em ilhotas isoladas de ratas prenhes;
- ✓ Avaliar a expressão protéica por *Western Blot* do GLUT2, Glicoquinase e Hexoquinase em ilhotas de ratas submetidas à restrição protéica durante a prenhez.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso (DAN/FANUT/UFMT).

4.1 Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade Albinos, ordem Rodentia Mammalia, família Muridae), adultas, com 90 dias de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso.

Todos os experimentos foram dirigidos por princípios de boas práticas de laboratório e procedimentos científicos, seguindo o guia prático de material de biotério do *International Committee on Laboratory Animals* (ICLA) (84).

Um grupo de ratas foi acasalado com machos adultos da mesma linhagem (4 fêmeas e 1 macho) em gaiolas de criação de polipropileno, medindo 37,0 x 31,0 x 16,0 cm com tampa de aço inoxidável, enquanto outro grupo não foi submetido ao acasalamento. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal.

Após o acasalamento, ratas virgens e prenhes foram mantidas individualmente e passaram a receber dieta normoprotéica com 17% de proteína (CNP e CP, respectivamente) ou hipoprotéica com 6% de proteína (HPNP e HPP, respectivamente) durante 15 dias. Todos os animais tiveram livre acesso à água e a dieta, e foram mantidos sob condições padrão de luminosidade (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura de 23°C.

Foi adotado o experimento fatorial 2×2 , testando os fatores estado nutricional e estado fisiológico. Assim, foram avaliados 4 grupos: Controle Não Prenhe (CNP); Controle Prenhe (CP); Hipoprotéico Não Prenhe (HPNP) e Hipoprotéico Prenhe (HPP).

4.2 Composição das dietas

A dieta normoprotéica cuja composição encontra-se descrita na Tabela 1, seguiu as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93) para roedores nas fases de crescimento, prenhez e lactação. A dieta hipoprotéica teve a proteína substituída por carboidratos, sendo mantidas as devidas proporções de amido, dextrina e sacarose, bem

como a de L-cistina, em relação ao teor de caseína e às concentrações dos demais nutrientes, sendo portanto, isocalóricas (3,76 Kcal/g).

Tabela 1 – Composição das dietas (g/Kg)

Ingredientes	Normoprotéica (17% de proteína)	Hipoprotéica (6% de proteína)
Caseína (84% de proteína)**	202,2	71,5
Amido	397,0	480,0
Dextrina	130,5	159,0
Sacarose	100,0	121,0
L-cistina	3,0	1,0
Fibra (microcelulose)	50,0	50,0
Óleo de soja	70,0	70,0
Mistura de sais AIN93G***	35,0	35,0
Mistura de vitaminas AIN93G***	10,0	10,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5

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

***Composição detalhada dada por Reeves *et al.* 1993 (85).

4.3 Procedimentos Experimentais

As medidas de consumo alimentar foram registradas a cada dois dias e a ingestão alimentar absoluta foi calculada pela diferença obtida entre a quantidade de dieta oferecida e a dieta rejeitada após 48 horas.

No décimo quinto dia foram realizados todos os procedimentos experimentais, que tiveram início às 8:00 horas e se estenderam por toda a manhã. A glicemia e a insulinemia foram determinadas após jejum de 12 horas. Em todos os casos, as ratas foram anestesiadas com CO₂, e em seguida decapitadas e o sangue coletado para as determinações de glicose e insulina. As determinações de glicose foram realizadas imediatamente após a coleta e separação do soro. Para as determinações de insulina, as amostras de soro foram estocadas a -20 °C.

4.4 Isolamento de ilhotas pancreáticas

Aos quinze dias de prenhez as ratas foram anestesiadas com CO₂ e, em seguida sacrificadas por decapitação. Logo após, realizaram-se a remoção e a digestão do pâncreas pelo método da colagenase, como previamente descrito em Boschero *et al* (86).

4.5 Secreção estática de insulina

Após o isolamento, grupos de cinco ilhotas foram incubados por 90 min a 37°C em tampão de Krebs-bicarbonato contendo glicose (2,8; 5,6; 8,3; 11,1 e 16,7 mmol/L) equilibrado com uma mistura de 95% O₂ - 5% CO₂ para garantir um pH de 7,4. O meio de incubação continha (mmol/L): NaCl 115, KCl 5, CaCl₂ 2,56, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 24 e albumina bovina (3 g/L). A insulina secretada foi determinada por radioimunoensaio.

4.6 Expressão protéica por Western Blot

Após o isolamento, grupos de ilhotas foram centrifugadas (15,000 g para a formação de *pellets*) e ressuspensas em 50-100 µL de tampão de homogeneização contendo inibidor de proteases e anti-fosfatases (87, 88). As ilhotas foram sonicadas e foi determinada a quantidade total de proteínas (89). Amostras contendo 50 µg de proteína foram incubadas por 5 min a 80°C com tampão Laemmli 4X concentrado (1 mmol/L de fosfato de sódio, pH 7,8, 0,1% azul de bromofenol, 50% glicerol, 10% SDS, 2% mercaptoetanol) (4:1, v/v) e a corrida realizada em géis de poliacrilamida (10%) a 120 V por 30 min. A eletrotransferência das proteínas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) foi feita por 2 h a 120 V em tampão contendo metanol e SDS. Depois de checada a eficiência da transferência pela coloração da membrana com Ponceau, as mesmas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em TTBS (10 mmol de Tris/L, 150 mmol de NaCl/L, 0,5% Tween 20) por uma noite a 4°C. GLUT2, Glicoquinase e Hexoquinase foram detectadas nas membranas após 2 h de incubação em temperatura ambiente com anticorpo específico (anti-GLUT2, anti-Glicoquinase e anti-Hexoquinase: IgG policlonal de coelho; Santa Cruz); diluído 1:500 em TTBS contendo 3% de leite em pó desnatado. A detecção foi feita por quimiluminescência (SuperSignal West Pico, Pierce) após incubação com anticorpo secundário (*horseradish peroxidase-conjugated*).

4.7 Metabolismo de Glicose

A taxa de metabolismo de glicose foi medida em ilhotas frescas isoladas pela digestão com colagenase.

4.7.1 Captação de 2-Deoxy-D-glicose

Grupos de 30 ilhotas forma incubadas com 100µl de Tampão Krebs-bicarbonato suplementado com 3µCi de [¹⁴C] 2-deoxy D-Glicose (Amersham Biosciences, USA) com quantidade de glicose não marcada (Sigma) para atingir a concentração final de 2,8 ou 8,3 mmol/l. Os tubos foram incubados em banho Maria sob agitação constante a 37°C e a captação interrompida com 0,1 ml de reagente de TRIZOL (Invitrogen Life Science, USA), após 2h. Aos frascos foram adicionados 3ml de líquido de cintilação. A atividade radioativa específica foi determinada pela espectrometria do líquido de cintilação. A captação foi expressa em pmol/ilhota/h.

4.7.2 Utilização e Oxidação de Glicose

A utilização e oxidação de glicose foram medidas em pools de 30 ilhotas imersas em 100µl de solução Krebs-bicarbonato suplementada com quantidades traço de ambas [5-³H]glicose e D-[U-¹⁴C]glicose (3µCi/mL) (Amersham Biosciences, USA), além da glicose não radioativa até a concentração final de 2,8 mmol/L ou 8,3 mmol/L. Os *ependorfs* foram suspensos em frascos de cintilação de 20ml devidamente lacrados e mantidos sob agitação constante em banho-maria a 37°C com gaseamento 95% O₂ e 5% CO₂ por 2h. Depois da incubação, 0,1 ml de 0,2 N HCl e 0,2 ml de hidróxido de sódio foram injetados, através da tampa de borracha, com uma agulha dentro do frasco do *ependorf* contendo o meio de incubação e dentro do frasco de cintilação, respectivamente. Depois de 1h a 4°C, 10 ml de líquido de cintilação foi adicionado ao hidróxido de sódio e a radioatividade contada. Para determinar a utilização de glicose, os *ependorfs* foram transferidos para novos frascos de cintilação contendo, cada um, 500µl de água destilada. Os sistemas foram incubados por 18h para a [³H]água no meio de incubação se equilibrar com a água no fundo do frasco. Depois da incubação, o *ependorf* de ilhotas foi removido e 10 ml de líquido de cintilação foram adicionados à água destilada. A radioatividade específica foi determinada pela espectrometria do líquido de cintilação. As taxas de utilização e oxidação de glicose foram expressas em pmol/ilhota/h.

4.8 Determinações Bioquímica e Hormonal

4.8.1 Glicose

A glicemia foi determinada pelo método da glicose oxidase-peroxidase (90). As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro modelo 395, marca Micronal, em comprimento de onda de 505nm. Os resultados foram expressos em mmol/l.

4.8.2 Insulina

A insulinemia e a insulina secretada por ilhotas isoladas foram determinadas por radioimunoensaio de acordo com o método descrito por Scott *et al.* (91). Foram transferidas alíquotas de 0,1 ml das amostras desconhecidas (em duplicata) as quais receberam, a seguir, 0,2 ml de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com ^{125}I (traçador) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9% e albumina 0,5%. Em seguida, foram preparados os seguintes controles:

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

Em seguida, preparou-se também em triplicata, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0,1 ml de insulina conhecida nas seguintes concentrações: 0,02; 0,039; 0,078; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; e 5,0 ng/ml. Cada tubo dessa série recebeu também 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e anticorpo anti-insulina. Em seguida, amostras, controle e curva padrão foram agitados em vórtex e estocados a 4 °C, durante 48 horas. Após este período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, todos os outros tubos receberam 0,2 ml de uma solução contendo 2,5% de carvão (Norit A), 0,5% de albumina e 0,25% de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso durante 20 min e a seguir centrifugados durante 20 min (800 g) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo foi avaliada em contador de radiação gama. Os três tubos elaborados para

análise da radiação máxima não tiveram o sobrenadante descartado, sendo as radiações dos mesmos avaliadas diretamente. Com base nos valores obtidos nos tubos contendo insulina conhecida elaborou-se a curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores desconhecidos das amostras. Os resultados foram expressos em pmol/L.

4.9 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados em média \pm desvio padrão do número de animais ou experimentos. Para ilhotas, o n se refere ao número de experimentos realizados. Inicialmente foi aplicado o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Os resultados com variâncias heterogêneas e sem distribuição normal foram transformados (logarítmica- Log_{10} ou Ln da variável) para correção da heterogeneidade ou anormalidade (92). Em seguida os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) a dois fatores (estado nutricional e estado fisiológico). Quando necessário, estas análises foram complementadas pelo teste de comparação múltipla de média LSD. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Para análise dos resultados utilizou-se o programa "Statistic for Windows", versão 4.3, 1993 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

5.0 RESULTADOS

5.1 Perfil nutricional

Independentemente do estado nutricional, ratas prenhes tiveram maior ingestão alimentar e peso corporal final ($F_{1,36}= 10,59$, $P<0,01$ e $F_{1,36}= 19,67$, $P<0,0001$, respectivamente) e menor concentração sérica de glicose ($F_{1,16}= 6,30$, $P<0,01$). A insulina sérica foi menor em ratas alimentadas com dieta hipoprotéica ($F_{1,16}= 6,48$, $P<0,03$) e maior em ratas prenhes ($F_{1,16}= 6,31$, $P<0,03$) (Tabela 2).

Tabela 2- Ingestão alimentar, peso corporal final e concentrações séricas de glicose e insulina em ratas prenhes e não prenhes que receberam dieta controle ou hipoprotéica.

Variáveis	Grupos			
	CNP	CP	HPNP	HPP
Ingestão alimentar (g)	267±62 (10)	320±32 (10)	263±40 (10)	308±51 (10)
Peso corporal final (g)	257±64 (10)	355±47 (10)	262±55 (10)	321±57 (10)
Glicemia (mmol/L)	4,0±0,8 (5)	3,3±0,5 (5)	4,6±0,8 (5)	3,8±0,5 (5)
Insulinemia (pmol/L)	27±17 (5)	104±46 (5)	20±7 (5)	25±17 (5)

Os valores representam a média ± DP do número de ratas mostrado entre parênteses.

5.2 Secreção estática de insulina

Ilhotas de ratas HPNP mostraram curva dose-resposta à glicose deslocada para a direita em relação às ilhotas de ratas CNP (EC_{50} : $9,9\pm0,6\times10^{-3}$ mmol/L e $8,6\pm0,3\times10^{-3}$ mmol/L, respectivamente, $P < 0,01$). Contudo, a prenhez deslocou a curva dose-resposta à glicose para a esquerda, e a EC_{50} de ratas HPP foi menor em relação ao grupo CP ($6,5\pm0,1\times10^{-3}$ mmol/L e $7,4\pm0,2\times10^{-3}$ mmol/L glicose, respectivamente, $P < 0,0001$) (Figuras 1A e 1B).

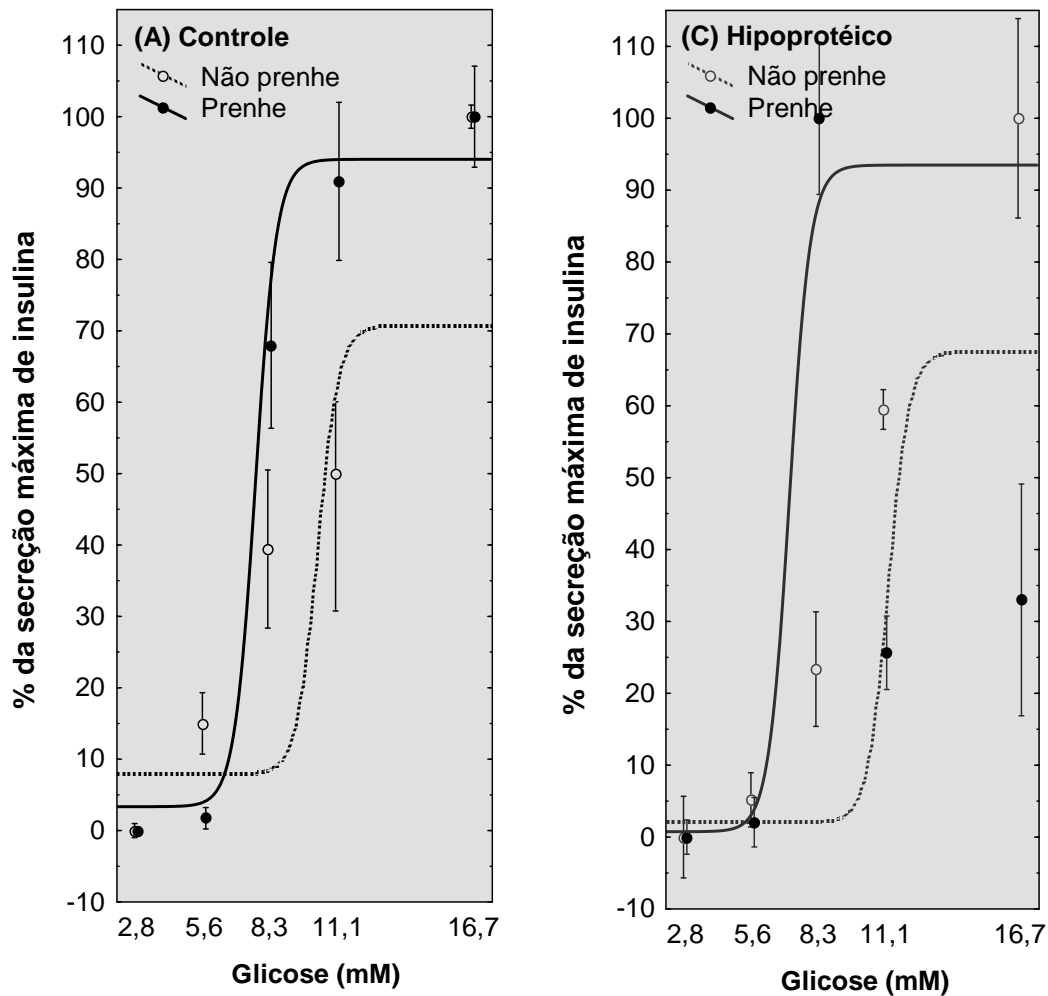


Figura 1. Curva dose-resposta da secreção de insulina por ilhotas de ratas CNP, CP (A) HPNP e HPP (B). Grupos de 5 ilhotas foram incubados com diferentes concentrações de glicose por 90min. Os valores representam a média \pm SD de três experimentos independentes, expressos em porcentagem da secreção máxima de insulina. (Teste LSD, $p < 0,05$).

5.3 Metabolismo de glicose

Em 2,8 mmol/L de glicose a captação desse substrato foi aumentada pelo estado fisiológico ($F_{1,19} = 10,84$, $P < 0,01$), assim ratas prenhes exibiram maior taxa de captação de glicose em relação às ratas não prenhes. A captação de glicose em 8,3mmol/L foi

aumentada pela dieta hipoprotéica ($F_{1,19} = 7,80$, $P < 0,02$) bem como pela prenhez ($F_{1,19} = 45,35$, $P < 0,0001$) (Figura 2A e 2B).

A utilização da glicose na presença de 2,8mmol/L desse substrato foi influenciada pelo estado nutricional ($F_{1,24} = 20,83$, $P < 0,001$), bem como pela interação entre estado nutricional e fisiológico ($F_{1,24} = 10,12$, $P < 0,01$). Assim, a taxa de utilização de glicose foi significativamente aumentada em ilhotas de ratas HPNP comparadas às de ratas CNP. A prenhez diminuiu a taxa de utilização de glicose em ilhotas de ratas alimentadas com dieta hipoprotéica e aumentou em ilhotas de ratas controles. Entretanto, a utilização de glicose foi similar entre os grupos HPP e CP (Figura 2C). A taxa de utilização de glicose em ilhotas incubadas na presença de 8,3 mmol/l de glicose foi afetada somente pelo estado nutricional ($F_{1,22} = 24,04$, $P < 0,0001$). A restrição protéica aumentou a produção de $^3\text{H}_2\text{O}$ nos grupos HPP e HPNP comparados aos grupos CP e CNP (Figura 2D).

A oxidação de glicose em ilhotas incubadas na presença de 2,8 mmol/l de glicose foi influenciada pelo estado nutricional ($F_{1,18} = 63,96$, $P < 0,0001$) e pela interação entre estado nutricional e estado fisiológico ($F_{1,18} = 17,22$, $P < 0,001$). Ilhotas de ratas HPNP metabolizaram mais glicose que ilhotas de ratas CNP. A prenhez aumentou a produção de $^{14}\text{CO}_2$ em ambos os grupos de ilhotas, entretanto a magnitude desse efeito foi menor em ilhotas HPP do que naquelas do grupo CP. Assim, a taxa de oxidação de glicose em ilhotas de ratas HPP foi significativamente menor do que ilhotas do grupo CP (Figura 2E). O aumento da concentração de glicose do meio de 2,8 para 8,3 mmol/l elevou significativamente a taxa de metabolismo de glicose em todos os grupos. A análise de variância revelou o efeito da interação entre estado nutricional e fisiológico ($F_{1,16} = 11,77$, $P < 0,01$). Em 8,3mmol/l de glicose, a oxidação de glicose em ilhotas de ratas HPNP foi significativamente maior em relação à de ratas CNP. A prenhez reduziu a produção de $^{14}\text{CO}_2$ em ilhotas de ratas alimentadas com dieta hipoprotéica e aumentou em ilhotas de ratas controles, mas a taxa de oxidação não diferiu entre ilhotas HPP e CP (Figura 2F).

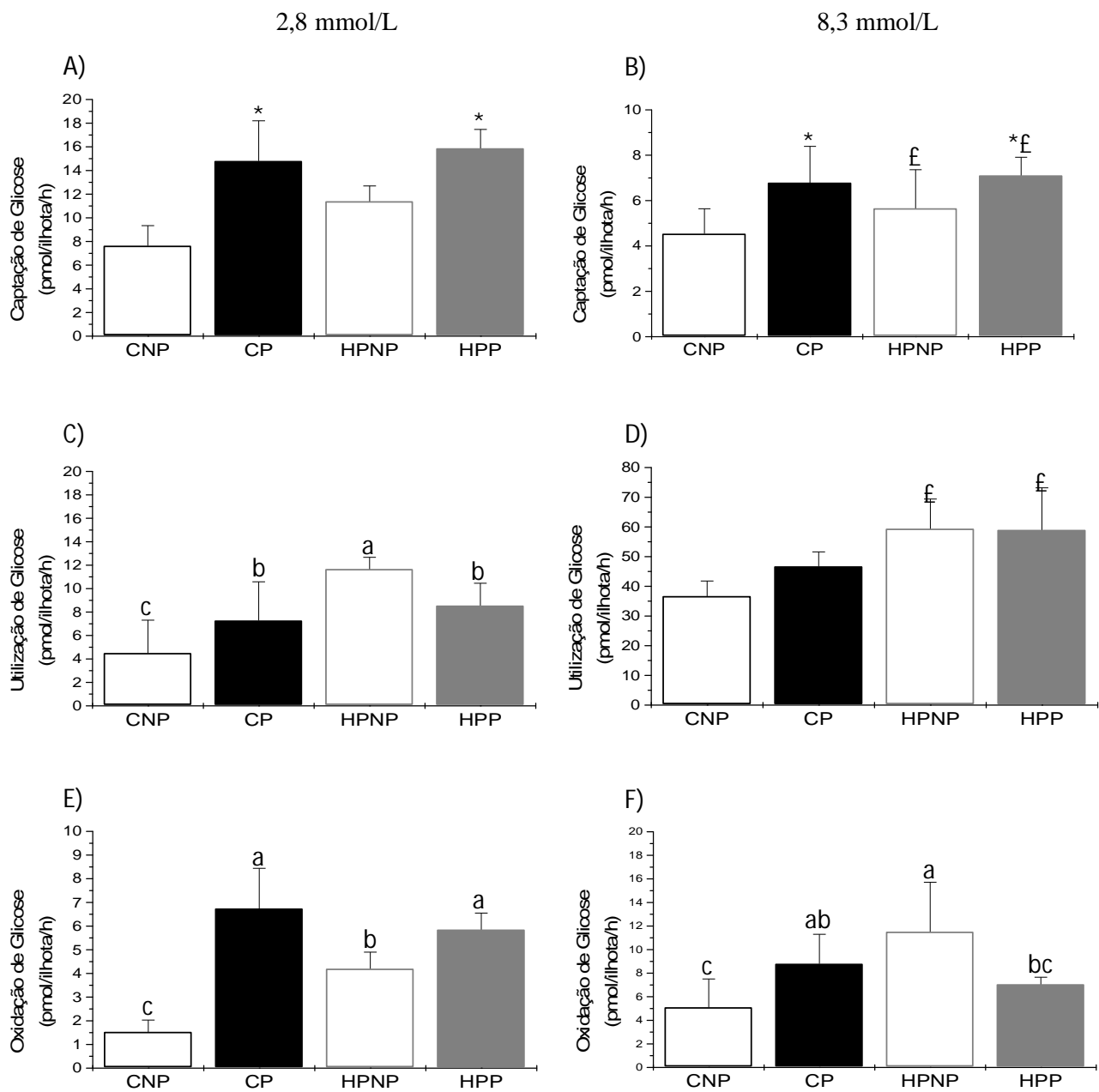


Figura 2. Taxa de captação (A e B), utilização (C e D) e oxidação (E e F) em 2,8 e 8,3 mmol/L de glicose por ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP. Valores representam média \pm SD de seis *pools* de 20 ilhotas de cada grupo. * Valores médios diferentes em relação às não prenhes. f Valores médios em relação aos controles. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. $p < 0.05$.

5.4 Expressão protéica por Western Blot

A expressão protéica de GLUT-2 e glicoquinase foi modificada pelo estado nutricional ($F_{1,8}= 11,01$, $P < 0,02$ e $F_{1,10}= 34,73$, $P < 0,01$, respectivamente) e pelo estado fisiológico ($F_{1,8}= 12,16$, $P < 0,01$ e $F_{1,10}= 11,67$, $P < 0,01$, respectivamente), bem como pela interação entre esses dois fatores ($F_{1,8}= 6,43$, $P < 0,05$ e $F_{1,10}= 11,82$, $P < 0,01$, respectivamente). A expressão dessas duas proteínas foi similar entre os grupos HPNP, CNP e CP e maior do que nas ilhotas do grupo HPP (Figuras 3A e 3B). A expressão protéica da hexoquinase foi afetada pelo estado nutricional ($F_{1,8}= 28,24$, $P < 0,0001$) e pela interação entre estado nutricional e fisiológico ($F_{1,8}= 7,76$, $P < 0,05$). Ilhotas de ratas HPNP e CNP tiveram expressões de hexoquinase similares. A prenhez não afetou a expressão dessa proteína em ilhotas de ratas HPP e aumentou em ilhotas de ratas CP (Figura 3C).

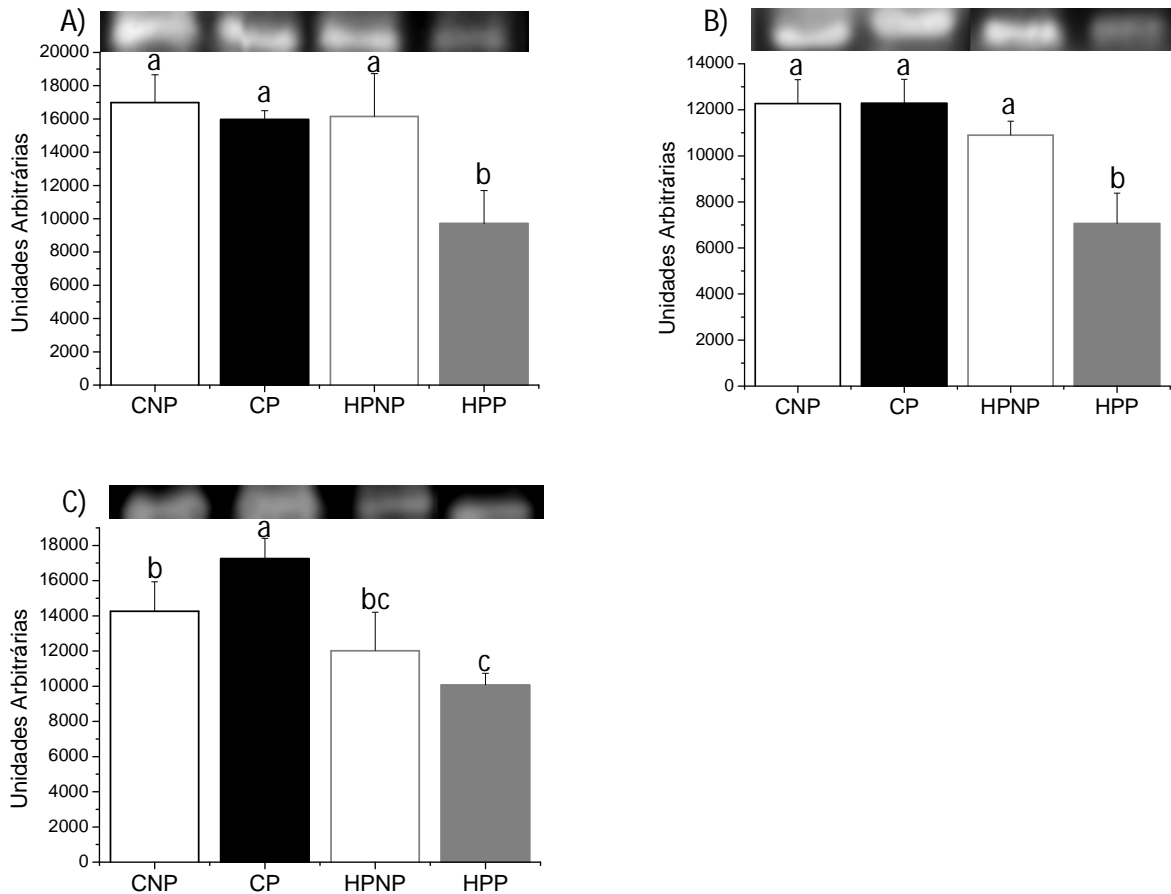


Figura 3. Expressão protéica de GLUT2 (A), Glicoquinase (B) e Hexoquinase (C) em ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP. Cinquenta microgramas de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida (10%) e eletrotransferidas a 120V por 2h. Valores expressos em média \pm SD. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Estes resultados mostraram que o consumo de dieta hipoprotéica por curto período de tempo (15 dias) não resultou em perda de peso, mas diminuiu a concentração sérica de insulina. Confirmando esses resultados, houve alteração significativa da capacidade das ilhotas secretar insulina em resposta à glicose, a julgar pela curva dose-resposta das ilhotas do grupo HPNP estar desviada para a direita em relação àquelas do grupo CNP. Tais observações corroboram um estudo anterior (93), que mostrou, no mesmo modelo animal, baixa secreção de insulina quando ilhotas de ratas submetidas à restrição protéica foram estimuladas com uma concentração fisiológica de glicose (8,3 mmol/L). O presente estudo também verificou os aumentos clássicos da concentração sérica da insulina, da secreção da insulina e a diminuição do limiar de estimulação da secreção de insulina pela glicose, típicos da prenhez. É interessante ressaltar que a magnitude desse efeito foi maior em ilhotas do grupo HPP, uma vez que o menor valor da EC_{50} foi observado nesse grupo.

O desvio da curva dose-resposta para uma maior ou menor concentração de glicose depende de vários mecanismos (94). A redução da secreção de insulina por ilhotas de ratos mantidos com dieta hipoprotéica tem sido atribuída a problemas relacionados com o reconhecimento da glicose devido a baixa expressão do transportador de glicose e/ou diminuição do metabolismo da glicose (sítio substrato) (80), alteração na oxidação mitocondrial da glicose devido a déficit na atividade da glicerofosfato desidrogenase mitocondrial da célula β , possivelmente associada a outras anormalidades enzimáticas (11), e perda da capacidade da glicose aumentar a captação ou reduzir o efluxo de Ca^{2+} nas células β (74).

Na prenhez as mudanças na expressão do GLUT2, hexoquinase, glicoquinase e no metabolismo da glicose parece ter um papel central no aumento da sensibilidade das ilhotas à glicose (68). No presente estudo, a concentração de GLUT2 não foi aumentada na prenhez normal nem reduzida pela dieta hipoprotéica. Esses resultados estão em desacordo com estudos que mostraram aumento da expressão do GLUT2 na prenhez e em ilhotas cultivadas com prolactina (68, 70) e redução da expressão gênica do referido transportador em ilhotas de ratos alimentados com dieta hipoprotéica (95). A ausência de mudança na expressão de GLUT2 em ilhotas de ratas do grupo HPNP não surpreendeu, uma vez que estes animais foram submetidos à restrição protéica por um

curto período de tempo e a redução da expressão gênica do GLUT2 é consistentemente verificada após longa exposição à dieta hipoprotéica (95).

Notavelmente, na presença de 8,3 mmol/L de glicose ilhotas dos grupos HPP e HPNP apresentaram captação de glicose elevada, embora tenham expressado quantidades diferentes de GLUT2. Também, as ilhotas do grupo HPNP, que foram menos sensíveis à glicose, expressaram quantidade elevada de GLUT2, enquanto no grupo HPP ocorreu justamente o oposto. Apesar das ilhotas dos grupos CP e HPP terem apresentado expressão do GLUT2 inalterada e reduzida, respectivamente, houve aumento da captação da glicose tanto em 2.8 quanto em 8.3 mmol/L de glicose. Contudo, a magnitude do aumento da captação de glicose em resposta à prenhez foi menor em ilhotas de ratas submetidas à restrição protéica do que em ilhotas de ratas controles (26% vs 51% em 2,8mmol/L de glicose e 39% vs 95% em 8,3 mmol/L de glicose). Assim, nas ilhotas do grupo CP a elevada captação de glicose parece ter resultado de alterações na cinética do GLUT2, ao passo que nas ilhotas do grupo HPP a menor magnitude da captação de glicose ocorreu devido à baixa concentração de GLUT2. Coletivamente, esses resultados não são compatíveis com a hipótese de que o aumento da expressão e da atividade do GLUT2 está associado com a melhora da sensibilidade das ilhotas à glicose.

O metabolismo da glicose é fundamental para a secreção da insulina e a glicoquinase é considerada o sensor crucial da glicose (96). A hexoquinase parece determinar a quantidade de insulina secretada na presença de concentração basal da glicose (15, 71, 98, 29). Portanto, o presente estudo examinou se as alterações na expressão da hexoquinase e da glicoquinase, bem como na utilização da glicose, se correlacionam com as mudanças na secreção de insulina observadas em ilhotas de ratas prenhes e submetidas à restrição protéica. A hexoquinase (enzima de baixo K_m) foi reduzida, mas em 2.8 mmol/L de glicose a utilização dessa hexose foi similar em ilhotas de ratas HPP comparadas as de ratas CP. O aumento da expressão da hexoquinase foi paralelo ao aumento da utilização de glicose em ilhotas do grupo CP em relação ao grupo CNP. Além disso, embora ilhotas do grupo HPP tenham expressado menos hexoquinase do que ilhotas do grupo CP, em 2,8 mmol/L de glicose ambos exibiram utilização de glicose e secreção de insulina (dados não mostrados) similares.

A expressão inalterada de glicoquinase (enzima de alto K_m) coincidiu com a similaridade na taxa de utilização em 8,3 mmol/L de glicose nas ilhotas CP e CNP, mas

ambas não correlacionaram com a mudança no padrão de secreção de insulina. Ao contrário, o grupo HPP que expressou menos glicoquinase apresentou taxa de utilização de glicose similar e melhora significativa da secreção de insulina em relação ao grupo HPNP. Estes resultados sugerem que a restrição protéica durante a prenhez aumenta mais a atividade do que a expressão da hexoquinase e da glicoquinase. Esta suposição baseou-se no fato de que mesmo quando a restrição protéica reduziu a expressão dessas enzimas a utilização da glicose foi preservada.

Existem várias evidências do papel da oxidação da glicose na secreção de insulina (99, 100, 101, 102), e de que a prenhez aumenta a taxa de oxidação desse substrato (68). Neste estudo, os resultados mostraram que a prenhez normal aumentou a taxa de oxidação de glicose em ambas as concentrações e melhorou a sensibilidade das ilhotas à glicose. Em contrapartida, o consumo de dieta hipoprotéica por curto período de tempo reduziu a secreção de insulina apesar de ter elevado a taxa de oxidação em 2,8 e 8,3 mmol/L de glicose. Também, ilhotas do grupo HPP que foram muito sensíveis à glicose, exibiram elevada taxa de oxidação em 2,8 mmol/L de glicose, mas redução dessa taxa em 8,3 mmol/L de glicose quando comparadas as ilhotas do grupo HPNP. Contudo, em 2,8 mmol/L e 8,3 mmol/L de glicose, a taxa de oxidação foi similar em ilhotas dos grupos HPP e CP. Assim, as mudanças na sensibilidade à glicose em ilhotas dos grupos HPNP e HPP não podem ser atribuídas a alterações da via oxidativa.

O conjunto dos resultados sugere que as mudanças na expressão das proteínas avaliadas no presente estudo não prejudicaram o metabolismo da glicose nem correlacionaram com as alterações de sensibilidade à glicose vistas nas ilhotas dos grupos HPNP, HPP e CP. O deslocamento da curva dose-resposta parece requerer eventos secundários a essas alterações moleculares e metabólicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malaisse, WJ. Hormonal and environmental modification of islet activity. In: Steiner DF, Freinkel B, editors. *Endocrine Pancreas*. Washington: The Am Phys Soc. 1972:237-60.
2. Boschero, AC. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células b pancreáticas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1996;40:149-55.
3. Leturque A, Ferré P, Satabin P, Kervran A, Girard J. In vivo insulin resistance during pregnancy in the rat. *Diabetologia*. 1980;19:521-8.
4. Nieuwenhuizen AG, Schuiling GA, Seijsener AF, Moes H, Koiter TR. Effects of food restriction on glucose tolerance, insulin secretion, and islet-cell proliferation in pregnant rats. *Physiol Behav*. 1999;65:671-7.
5. Costrini NV, Kalkhoff RK. Relative effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet content. *J Clin Inv*. 1971;50:992-9.
6. Parsons JA, Brelje T.C, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: Increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology*. 1992;130:1459-66.
7. Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG e Sorenson RL. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*. 1993;132:879-87.
8. Brelje TC, Stout LE, Bhagroo NV, Sorenson RL. Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of langerhans. *Endocrinology*. 2004;145:4162-75.
9. Rao RH. Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence? *Endocr Rev*. 1988;9:67-87.
10. Barbosa, FB, Caito K, Kofod H, Thams P. Pancreatic islet insulin secretion and metabolism in adult rats malnourished during neonatal life. *Br J Nutr*. 2002;87:147-55.

11. Rasschaert J, Reusens B, Dahri S, Sener A, Remacle C, Hoet JJ, Malaisse WJ. Impaired activity of rat pancreatic islets mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. *Endocrinology*. 1995;136:2631-4.
12. Wilson WR, Hughes SJ. Impaired glucose-stimulated insulin release in islets from adult rats malnourished during fetal-neonatal life. *Molecular and cellular endocrinology*. 1998;142:41-8.
13. Rutter GA. Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. *Mol Aspects Med*. 2001;22:247-84 Review.
14. Boschero AC. Acoplamento excitação-secreção nas células B pancreáticas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1996;40:149-55 Review.
15. Bell GI, Kayano T, Buse JB. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*. 1990;13:198-208.
16. Meglasson MD, Matschinsky FM. Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev*. 1986;2:163-214.
17. Hellman B, Lernmark A, Sehlin J, Täljedal IB. Effects of phlorizin on metabolism and function of pancreatic β -cell. *Metabolism*. 1972;21:60-6.
18. Thorens B, Sarkar HK, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transportator present in the liver, intestine, kidney, and b-pancreatic islet cells. *Cell*. 1988;55:281-90.
19. Orci L, Thorens B, Ravazzola M, Lodish HF. Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science*. 1989;245:295-7.
20. Johnson JH, Ogawa A, Chen L, Orci L, Newgard CB, Alam T, Unger RH. Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes. *Science*. 1990;26:546-9.
21. Newgard CB, McGarry JD. Metabolic coupling factors in pancreatic b-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:689-719.
22. Guillam MT, Hümmler E, Schaerer E, Yeh JI, Birnbaum MJ, Beermann F, Schmidt A, Dériaz N, Thorens B. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet*. 1997;17:327-30.
23. Iynedjian PB, Marie S, Gjinovci A, Genin B, Deng SP, Buhler L, Morel P, Mentha G. Glucokinase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase

- (GTP) in the human liver. Regulation of gene expression in cultured hepatocytes. *J Clin Invest.* 1995;95:1966-73.
24. Maiztegui B, Borelli MI, Massa ML, Del Zotto H, Gagliardino JJ. Enhanced expression of hexokinase I in pancreatic islets induced by sucrose administration. *J Endocrinol.* 2006;189:311-7.
 25. Schuit F, Moens K, Heimberg H, Pipeleers D. Cellular origin of hexokinase in pancreatic islets. *J Biol Chem.* 1999;274:32803-9.
 26. Matschinsky FM, Ellerman JE. Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *J Biol Chem.* 1968;243:2730-6.
 27. Ashcroft SJ, Hedekov CJ, Randle PJ. Glucose metabolism in mouse pancreatic islets. *Bioch J.* 1970;118:143-54.
 28. Malaisse WJ, Sener A, Levy J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Fasting-induced adaptation of key glycolytic enzymes in isolated islets. *J Biol Chem.* 1976;251:1731-7.
 29. German MS. Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Natl Acad.* 1993;90:1781-5.
 30. Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, Katagiri H, Inukai K, Anai M, Kikuchi M, Yazaki Y, Miyazaki JI, Oka Y. Overexpression of hexokinase I but not GLUT1 glucose transporter alters concentration dependence of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cell line MIN6. *J Biol Chem.* 1994;269:3081-7.
 31. Lenzen S, Panten U. Signal recognition by pancreatic b-cells. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:371-8.
 32. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Rasschaert J, Záhner D, Sener A, Davies DR, Van Schaftingen E. The fuel concept for insulin release: regulation of glucose phosphorylation in pancreatic islets. *Biochem Soc Trans.* 1990;18:107-8.
 33. Lenzen S. Glucokinase: signal recognition for glucose-induced insulin secretion. In: Flatt PR. (Ed). *Nutrient regulation of insulin secretion.* London: Portland Press. 1992:101-24.
 34. Porter JR, Barrett TG. Monogenic syndromes of abnormal glucose homeostasis: clinical review and relevance to the understanding of the pathology of insulin resistance and b-cell failure. *J Med Genet.* 2005;42:893-902.

35. MacDonald PE, Joseph JW, Rorsman P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic b-cells. *Phil Trans R Soc.* 2005;360:2211–25.
36. Sekine N, Cirulli V, Regazzi R, Brown LJ, Gine E, Tamarit-Rodriguez J, Girotti M, Marie S, MacDonald MJ, Wollheim CB, *et al.* Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic b-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem.* 1994;269:4895–902.
37. Schuit F, De Vos A, Farfari S, Moens K, Pipeleers D, Brun T, Prentki M. Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in b cells. *Biol Chem.* 1997;272:18572–9.
38. Ishihara H, Wang H, Drewes LR, Wollheim CB. Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells. *J Clin Invest.* 1999;104:1621–9.
39. Zhao C, Wilson MC, Schuit F, Halestrap AP, Rutter GA. Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas. *Diabetes.* 2001;50:361–6.
40. MacDonald MJ. Evidence for the malate aspartate shuttle in pancreatic islets. *Arch Biochem Biophys.* 1982;213:643–9.
41. MacDonald MJ. Is liver type pyruvate kinase present in the normal pancreatic islet? *Diabetologia.* 1995;38:125.
42. Malaisse WJ, Malaisse-lagae F, Sener A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: effect of aminooxyacetate upon nutrient-stimulated insulin secretion. *Endocrinology.* 1982;111:392-7.
43. Giroix MH, Rasschaert J, Bailbe D, Leclercq-Meyer V, Sener A, Portha B, Malaisse WJ. Impairment of glycerol phosphate shuttle in islets from rats with diabetes induced by neonatal streptozocin. *Diabetes.* 1991;40:227-32.
44. Sener A, Malaisse WJ. Hexose metabolism in pancreatic islets. Ca²⁺-dependent activation of the glycerol phosphate shuttle by nutrient secretagogues. *J Biol Chem.* 1992;267:13251–6.
45. Eto K, Kadowaki T. Role of NADH shuttle system in glucose induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science.* 1999;283:981–5.
46. Duchen MR, Smith PA, Ashcroft FM. Substrate-dependent changes in mitochondrial function, intracellular free calcium concentration and membrane channels in pancreatic beta-cells. *Biochem J.* 1993;294:35–42.

47. Maechler P, Kennedy ED, Pozzan T, Wollheim CB. Mitochondrial activation directly triggers the exocytosis of insulin in permeabilized pancreatic β -cells. *EMBO J.* 1997;16:3833–41.
48. Kennedy ED, Maechler P, Wollheim CB. Effects of depletion of mitochondrial DNA in metabolism secretion coupling in INS-1 cells. *Diabetes.* 1998;47:374–80.
49. Green IC, Howell SL, Montague W, Taylor KM. Regulation of insulin release from isolated islets of Langerhans of the rat in pregnancy. *Biochem J.* 1973;134:481-7.
50. Hadeskov CJ. Mechanism of glucose induced insulin secretion. *Physiol Rev.* 1980;60:442-509.
51. Wollheim CB, Sharp GW. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev.* 1981;61:914-73.
52. Sutter BCJ. Regulation hormonale de la secretion de l'insuline. *J Physiol.* 1982;78:119-30.
53. Petersen OH, Findlay Z. Electrophysiology of the pancreas. *Physiol Rev.* 1987;67:1054-116.
54. Grodsky GM. A new phase of insulin secretion. How will it contribute to our understanding of β cell function? *Diabetes.* 1989;38:673-8.
55. Zawalich WS, Zawalich KC. Effects of protein kinase C inhibitors on insulin secretory responses from rodent pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;177:95-105.
56. Flatt PR. Hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. In: Pickup JC, Williams G, editors. *Textbook of Diabetes.* Oxford: Blackwell; 1996.
57. Sorenson RL, Johnson MG, Parsons JA, Sheridan JD. Decreased glucose stimulation threshold, enhanced insulin secretion, and increased beta cell coupling in islets of prolactin-treated rats. *Pancreas.* 1987a;2:283-8.
58. Sorenson RL, Brelje TC, Hegre OD, Marshall S, Anaya P, Sheridan JD. Prolactin (in vitro) decreases the glucose stimulation threshold, enhances insulin secretion, and increases dye coupling among islet β cells. *Endocrinology.* 1987b;121:1447-53.

59. Sorenson RL, Brelje TC, Roth C. Effects of steroid and lactonegic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology*. 1993;133:2227-34.
60. Casey ML, MacDonald CP. Endocrine changes of pregnancy. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen RP, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Saunders; 1998. Pp. 1259–71.
61. Ogren L, Talamantes F. Prolactins of pregnancy and their cellular source. *Intl Rev Cytol*. 1988;112:1–65.
62. Moldrup A, Petersen ED, Nielsen JH. Effects of sex and pregnancy hormones on growth hormone and prolactin receptor gene expression in insulin-producing cells. *Endocrinology*. 1993;133:1165–72.
63. Sorenson RL, Stout LE. Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis. *Endocrinology*. 1995;136:4092–8.
64. Brelje TC, Sorenson RL. Role of prolactin versus growth hormone on islet B-cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. *Endocrinology*. 1991;128:45–57.
65. Hellerstrom C, Sjöholm A, Swenne I. Effects of growth hormone and related growth factors on DNA replication and insulin production in pancreatic islet beta cells. *Acta Paediatr Scand Suppl*. 1991;377:55–62.
66. Brelje TC, Parsons JÁ, Sorenson RL. Regulation of islet beta cell proliferation by prolactin in rat islets. *Diabetes*. 1994;43:263–73.
67. Docherty K, Clark AR. Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB J*. 1994;8:20–7.
68. Philippe J, Pacheco I, Meda P. Insulin gene transcription is decreased rapidly by lowering glucose concentrations in rat islet cells. *Diabetes*. 1994;4:523–8.
69. Weinhaus AJ, Stout LE, Sorenson RL. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets. *Endocrinology*. 1996;137:1640–9.
70. Petryk A, Fleenor D, Driscoll P, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene expression: the roles of glucose and glucose transporter-2. *Endocrinology*. 2000;164:277-86.

71. Weinhaus AJ, Stout LE, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *J Endocrinol.* 2007;193:3673-81.
72. Becker DJ, Pimstone BL, Hansen JD, Hendricks S. Insulin secretion in protein calorie malnutrition. Quantitative abnormalities and response to treatment. *Diabetes.* 1971;20:542-51.
73. Becker DJ, Pimstone BL, Kronheim S, Weinkove E. The effect of alanine infusions on growth hormone, insulin, and glucose in protein-calorie malnutrition. *Metabolism.* 1975;24:953-8.
74. Brun TA, Nezam-Mafi S, Moshiri M, Margen S. Growth hormone response to arginine infusion in malnourished children. *Diabete Metab.* 1978;4:27-33.
75. Carneiro EM, Mello MAR, Gobatto CA, Boschero AC. Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and ⁴⁵Ca uptake by pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem.* 1995;6:314-8.
76. Milner RDG. Metabolic and hormonal responses to oral amino acids in infantile malnutrition. *Arch Dis Childhood.* 1971;46:301-5.
77. Okitolonda W, Brichard SM, Henquin JC. Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. *Diabetologia.* 1987;30:946-51.
78. Smith SR, Edgar PJ, Pozefsky T, Chhetri MK, Prout TE. Insulin secretion and glucose tolerance in adults with protein-calorie malnutrition. *Metabolism.* 1975;24:1037-84.
79. Latorraca MQ, Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, Velloso LA, Saad MJ, Boschero AC. Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. *Br J Nutr.* 1998;80:291-7.
80. Latorraca MQ, Carneiro EM, Mello MA, Boschero AC. Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with a diminished calcium uptake. *J Nutr Biochem.* 1999;10:37-43.
81. Dixit PK, Kaung HLC. Rat pancreatic β -cells in protein deficiency: A study involving morphometric analysis and alloxan effect. *J Nutr.* 1985;115:375-81.

82. Cherif H, Reusens B, Dahri S, Remacle C, Hoet JJ. Islets insulin secretion is altered in fetus from pregnant rats fed an isocaloric low protein diet. *Diabetes*. 1997;46:1359-66.
83. Ferreira F, Filiputti E, Arantes VC, Stoppiglia LF, Araújo EP, 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 C alpha expression. *J Nutr*. 2003;133:695-9.
84. Ferreira F, Barbosa HC, Stoppiglia LF, Delghingaro-Augusto V, Pereira EA, Boschero AC, Carneiro EM. Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKAalpha expression. *J Nutr*. 2004;134:636-7.
85. Manual para Técnicos em Laboratórios. Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). 1996; 2^a ed.
86. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey CG Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: reports of the American Institute of Nutrition ad hoc working committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr*. 1993;123:1939-51.
87. Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E, Atwater I. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol*. 1995;268:E336-42.
88. Kelley GG, Zawulich KC, Zawulich WS. Calcium and a mitochondrial signal interact to stimulate phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in rat islets. *Endocrinology*. 1994;134:1648-54.
89. Jones PM, Persaud SJ. Protein Kinases, Protein Phosphorylation, and the Regulation of Insulin Secretion from Pancreatic β -Cells. *Endocrine Reviews*. 1998;19:429-61.
90. Yu W, Niwa T, Fukasawa T, Hiroyoshi H, Senda T, Sasaki Y, Niki I. Synergism of protein kinase A, protein kinase C, and myosin light-chain kinase in the secretory cascade of the pancreatic β -cell. *Diabetes*. 2000;49:945-52.
91. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol*. 1969;22:158-61.

92. Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and β -cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*. 1981;21:470-5.
93. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. Freeman WH editor. New York. 1995. pp.392-450.
94. Milanski M, Arantes VC, Ferreira F, de Barros Reis MA, Carneiro EM, Boschero AC, Collares-Buzato CB, Latorraca MQ. Low-protein diets reduce PKA α expression in islets from pregnant rats. *J Nutr*. 2005;135:1873-8.
95. Brelje TC, Sorenson RL. Nutrient and hormonal regulation of the threshold of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreases. *Endocrinology*. 1988;123:1582-90.
96. Delghingaro-Augusto V, Ferreira F, Bordin S, do Amaral ME, Toyama MH, Boschero AC, Carneiro EM. A low protein diet alters gene expression in rat pancreatic islets. *J Nutr*. 2002;134:321-7.
97. Matschinsky FM. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*. 1996;45:223-41.
98. Becker TC, BeltrandelRio H, Noel RJ, Johnson JH, Newgard CB. Overexpression of hexokinase I in isolated islets of Langerhans via recombinant adenovirus. Enhancement of glucose metabolism and insulin secretion at basal but not stimulatory glucose levels. *J Biol Chem*. 1994;269:21234-8.
99. Voss-McCowan ME, Xu B, Epstein PN. Insulin synthesis, secretory competence, and glucose utilization are sensitized by transgenic yeast hexokinase. *J Biol Chem*. 1994;269:15814-8.
100. Ashcroft SJ, Weerasinghe LC, Bassett JM, Randle PJ. The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets. *Biochem J*. 1972;126:525-32.
101. Hughes SJ, Suzuki K, Goto Y. The role of islet secretory function in the development of diabetes in the GK Wistar rat. *Diabetologia*. 1994;37:863-70.
102. Porta B, Giroix MH, Serradas P, Welsh N, Hellerström C, Sener A, Malaisse WJ. Insulin production and glucose metabolism in isolated pancreatic islets of rats with NIDDM. *Diabetes*. 1988;37:1226-33.
103. Cole EH, Logothetopoulos J. Glucose oxidation (14 -CO $_2$ production) and insulin secretion by pancreatic islets isolated from hyperglycemic and normoglycemic rats. *Diabetes*. 1974;23:469-73.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)