

PATRICIA CRISTINE BORCK

**A PARTICIPAÇÃO DOS *CLOCK GENES* NA MODULAÇÃO DA
SECREÇÃO E AÇÃO DA INSULINA EM CAMUNDONGOS
DESNUTRIDOS**

CAMPINAS

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**



PATRICIA CRISTINE BORCK

**A PARTICIPAÇÃO DOS *CLOCK GENES* NA MODULAÇÃO DA
SECREÇÃO E AÇÃO DA INSULINA EM CAMUNDONGOS
DESNUTRIDOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
Mestra em Biologia Funcional e Molecular, na área de
Fisiologia.

Orientador: Prof Dr. Everardo Magalhães Carneiro

Este exemplar corresponde à versão final
da dissertação apresentada pela aluna
Patricia Cristine Borck, e orientada pelo
Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

A handwritten signature in blue ink, consisting of a series of loops and strokes, positioned above a horizontal line.

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B644p Borck, Patricia Cristine, 1989-
A participação dos *clock genes* na modulação da secreção e ação da insulina em camundongos desnutridos / Patricia Cristine Borck. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Insulina – Secreção. 2. Desnutrição. 3. Ritmo circadiano. I. Carneiro, Everardo Magalhães, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Participation of *clock genes* in the modulation of secretion and insulin action in malnourished mice

Palavras-chave em inglês:

Insulin - Secretion

Malnutrition

Circadian rhythm

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Everardo Magalhães Carneiro [Orientador]

José Cipolla Neto

Gabriel Forato Anhe

Data de defesa: 18-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Campinas, 18 de fevereiro de 2014

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro



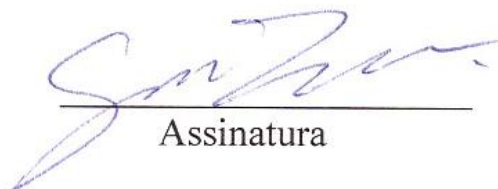
Assinatura

Prof. Dr. José Cipolla Neto



Assinatura

Prof. Dr. Gabriel Forato Anhe



Assinatura

Prof^a. Dr^a Ana Paula Couto Davel



Assinatura

Prof^a. Dr^a. Carmen Veríssima Ferreira



Assinatura

RESUMO

Os processos fisiológicos como ciclo sono-vigília e o metabolismo estão sujeitos a oscilações circadianas e são regulados por um conjunto de genes conhecidos como genes do relógio, ou *clock genes*. Mutação nesses genes em camundongos reduz a secreção de insulina e a proliferação das células β pancreáticas promovendo intolerância a glicose e hiperglicemia. Distúrbios nutricionais em fases iniciais da vida estão associados com o aparecimento do Diabetes Mellitus tipo 2 na vida adulta. Camundongos submetidos a restrição proteica intrauterina apresentam expressão alterada dos *clock genes* e maior suscetibilidade ao ganho de peso e intolerância a glicose. Neste trabalho tivemos como objetivo determinar a expressão diária dos *clock genes* em tecidos periféricos, hipotálamo e ilhotas pancreáticas de camundongos submetidos a restrição proteica. Avaliamos também o perfil oscilatório da secreção de insulina estimulada por glicose e pelo agonista colinérgico carbacol nesse modelo animal. Camundongos submetidos a restrição proteica (R) apresentaram características típicas de desnutrição como menor peso corpóreo, hipoinsulinemia, hipoproteinemia e maior tolerância a glicose e a insulina. Camundongos R apresentaram maior consumo alimentar, acompanhado de alterações no perfil oscilatório de genes hipotalâmicos *Pomc* (*Pro-opiomelanocortina*) e *Npy* (*Neuropeptídeo Y*). Nesse tecido, somente o gene do relógio *Rev-erba* teve sua expressão influenciada pela restrição proteica. Camundongos R apresentaram, no fígado e músculo perda do perfil oscilatório para os genes *Bmal1* e *Clock*. Ainda, no fígado e ilhotas pancreáticas a expressão de *Rev-erba* foi alterada, com redução no conteúdo de mRNA. Em relação ao gene *Per1*, camundongos R exibiram adiantamento na expressão desse gene no tecido adiposo. No músculo e ilhotas houve perda da oscilação diária para esse gene. Camundongos R exibiram, no músculo e tecido adiposo, adiantamento na expressão do gene *Per2*.

Ilhotas isoladas de camundongos controle (C) apresentaram padrão oscilatório de secreção de insulina sendo os maiores níveis atingido nos ZT 2 e 14 e redução no ZT 8. Contudo, camundongos R apresentaram redução na secreção de insulina estimulada por glicose, e perda do seu perfil oscilatório. O grupo R não apresentou alteração na liberação de insulina na presença do agonista e antagonista de *Rev-erba*. Além disso, a expressão dos genes *Syntaxina*, *Sinaptotagmina*, e *Insulina*, estão reduzidos em camundongos R. O grupo R também apresentou perda oscilatória da secreção de insulina na presença de glicose associada

ao Carbacol e redução na expressão do *Receptor Muscarínico de Acetilcolina*. Com os presentes resultados podemos concluir que camundongos submetidos a restrição proteica apresentaram características típicas de desnutrição com alteração na homeostase glicêmica e secreção de insulina. Ademais, camundongos R exibiram perda do perfil de secreção desse hormônio ao longo de 24 horas, o qual está relacionado com as alterações na expressão de *Rev-erba*. Além disso, houve alteração no perfil de expressão dos genes *clock*, em especial *Rev-erba*, *Per1* e *Per2* nos tecidos periféricos, fato que pode estar relacionado com as alterações na tolerância a glicose e insulina em camundongos R.

ABSTRACT

The physiological processes such as sleep-wake cycle and metabolism are subject to circadian fluctuations and are regulated by a group of genes known as clock genes or genes clock. Mutations in these genes in mice reduces insulin secretion and β -pancreatic cell proliferation promoting impaired glucose tolerance and hyperglycemia. Nutritional disorders in the early stages of life are associated with the onset of type 2 diabetes in adulthood. Mice subjected to intrauterine protein restriction have altered expression of clock genes and increased susceptibility to weight gain and glucose intolerance. In this study we aimed to determine the daily expression of clock genes in peripheral tissues, hypothalamus and pancreatic islets of mice subjected to protein restriction. We also evaluated the oscillatory profile of the glucose stimulated insulin secretion and the cholinergic agonist carbachol in this animal model. Mice subjected to protein restriction (R) showed typical features of malnutrition as lower body weight, hypoinsulinemia, hypoproteinemia and increased glucose tolerance and insulin. R mice had higher food consumption, accompanied by changes in the oscillatory profile to *Pomc* and *Npy* gene in the hypothalamus. In this tissue, only the expression *Rev- erba* gene was influenced by protein restriction. Mice R showed in the liver and muscle loss of the oscillatory profile to *Clock* and *Bmal1* gene. Still, in liver and pancreatic islets the expression of *Rev- erba* was changed, with reduction in mRNA content. Regarding the *Per1* gene, R mice exhibited advance in the expression of this gene in adipose tissue. In muscle and islets there was loss of daily fluctuation for this gene. R mice exhibited, muscle and adipose tissue, in advance of *Per2* gene expression.

Islets isolated from control mice (C) showed oscillatory pattern of insulin secretion with the highest levels attained in the ZT 2 e 14 and reduction in the ZT 8. However, R mice had reduced glucose stimulated insulin secretion and loss of its oscillatory profile. R group showed no change in insulin release in the presence of *Rev- erba* agonist and antagonist. Furthermore, the expression of *Syntaxin*, *Synaptotagmin*, and *Insulin* genes are reduced in R mice. R group also exhibited oscillatory loss of insulin secretion in the presence of glucose linked Carbachol and the reduction in the expression of *Muscarinic Acetylcholine Receptor*. With these results we can conclude that mice subjected to protein restriction showed typical features of malnutrition with alterations in glucose homeostasis and insulin

secretion. Moreover, R mice exhibited loss of secretion of this hormone profile over 24 hours, which is associated with changes in the expression of *Rev-erba*. In addition, there were changes in expression profile of *clock genes*, especially *Rev-erba*, *Per1* and *Per2* in peripheral tissues, which may be related to changes in glucose tolerance and insulin in R mice.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xv
LISTA DE TABELAS	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	9
5 RESULTADOS	14
5.1.1 Parâmetros gerais:	14
5.2.1 Tolerância à Glicose e Sensibilidade à Insulina.....	15
5.2.2 Respirometria e atividade locomotora.....	16
5.4.1 Hipotálamo.....	19
5.4.2 Fígado	22
5.4.3 Músculo	23
5.4.4 Tecido Adiposo	25
5.4.5 Ilhotas pancreáticas	27
5.5.1 Estímulo glicose	30
5.5.2 Estímulo glicose associado ao agonista e antagonista de Rev-erba.....	32
5.5.3 Estímulo glicose associado com Carbacol.....	32
5.6.1 Genes funcionais no processo secretório de insulina	33
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	41
8 REFERENCIAS.....	42
9 ANEXOS	47

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me guiar e iluminar sempre.

Agradecer minha família por todo o apoio, principalmente minha mãe e pai que sempre me incentivaram para que eu conseguisse chegar até aqui.

Ao professor Dr. Everardo Magalhães Carneiro pela oportunidade de ingressar no programa de pós graduação e pela ótima orientação.

Ao professor Dr. Antônio Carlos Boschero por contribuir com sua experiência em nossos projetos.

Ao meu grande amigo Jean por toda a paciência em me ensinar e acompanhar minhas atividades laboratoriais. Além de todo o apoio em momentos difíceis e claro por toda a parceria nas horas de risadas, conversas e festas.

Aos amigos Thiago e Rafael pelo companheirismo nas noites em claro, fazendo experimento.

A Dr^a. Elaine Vieira pela ajuda e incentivo, contribuindo para o bom andamento do trabalho.

As amigas para todos os momentos Patricia, Sarah e Naraya.

A amiga Junia Carolina por toda a companhia em experimentos, estudos e festas.

Aos amigos de laboratório Renato, Zé e André pelo apoio e colaborações nestes dois anos.

A técnica do laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo Priscila, sempre ajudando e tornando a rotina do laboratório mais fácil.

A bióloga Marise por comandar e colocar ordem no laboratório, além de cuidar de todos os reagentes, sais e matérias necessários para o desenvolvimento deste estudo e de todos os outros.

A FAPESP pela concessão da bolsa e auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: (A) Glicose plasmática durante ipGTT no ZT 2, (B) concentração total de glicose indicada pela área abaixo da curva (ASC) e (C) concentração plasmática de insulina aos 0 e 30 minutos do ipGTT. Dados representam média $\pm$ EPM (n=7-8), * P<0,05 entre C0 e R0; # P<0,01 entre C 30 e R 30 minutos. Teste *t* de Student..... 33

Figura 2: (A) Glicose plasmática durante ipITT no ZT 2 e (B) concentração total de glicose indicada pela área sob a curva (ASC). Dados representam média $\pm$ EPM (n=7-8), * P < 0,05. Teste *t* de Student.....33

Figura 3: (A) Consumo alimentar, (B) média do RQ no período claro e escuro, (C) curva do RQ e (D) gasto energético (fundo claro e sombreado, respectivamente). Dados representam média $\pm$ EPM (n=3). * P<0,05 C vs. R; # P<0,05 entre a fase clara e escura do grupo C e & P<0,05 entre fase clara e escura do grupo R. Teste *t* de Student.....35

Figura 4: (A) Curva da atividade locomotora ao longo de 48 hr e (B) atividade locomotora expressa pela ASC. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam média $\pm$ EPM (n=6). Teste *t* de Student.....36

Figura 5: Oscilação diária da concentração plasmática de (A) triglicerídeos, (B) colesterol e (C) glicose. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM. (n=5-6) * P<0,05 entre C e R, # P<0,05 entre os diferentes ZTs do grupo C. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.....37

Figura 6: (A) Expressão do gene anorexigênico *Pomc* e (B) do orexigênico *Npy* no hipotálamo de camundongos C e R. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=4-5) * P < 0,05 C vs R; # P < 0,05 entre os ZTs do grupo C; ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.....38

Figura 7: (A) Expressão gênica de (A) *Bmall*, (B) *Clock*, (C) *Rev-erba*, (D) *Per1*, (E) *Per2*, (F) *Cry1*, (G) *Cry2* no hipotálamo de camundongos C e R. Fundo claro e sombreado

representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=4-5) * P < 0,05 C vs R; # P < 0,05 entre os ZTs do grupo C; & P<0,05 entre os ZTs do grupo R. ANOVA duas vias seguida de pos-test Spjotvoll Stoline.....39

Figura 8: Expressão gênica de (A) *Bmal1*, (B) *Clock*, (C) *Rev-erba*, (D) *Per1*, (E) *Per2*, (F) *Cry1* e (G) *Cry2* no fígado de camundongos C e R. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=4-5) * P < 0,05 C vs R; # P < 0,05 entre os ZTs do grupo C; & P < 0,05 entre os ZT do grupo R. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.....41

Figura 9: Expressão gênica de *Bmal1* (A), *Clock* (B), *Rev-erba* (C) *Per1* (D), *Per2* (E), *Cry1* (F) e *Cry2* (G) no músculo de camundongos controle e desnutridos. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=4-5) * P<0,05 controle vs desnutrido. # P<0,05 dentro do ZT do grupo controle e & P<0,05 entre os ZT do grupo restrito. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.....43

Figura 10: Expressão gênica de *Bmal1* (A), *Clock* (B), *Rev-erba* (C) *Per1* (D), *Per2* (E), *Cry1* (F) e *Cry2* (G) no Tecido adiposo retroperitoneal de camundongos controle e desnutridos. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=4-5) * P<0,05 controle vs desnutrido. # P<0,05 dentro do ZT do grupo controle e & P<0,05 entre os ZT do grupo restrito. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.....45

Figura 11: Expressão gênica de *Bmal1* (A), *Clock* (B), *Rev-erba* (C) *Per1* (D), *Per2* (E), *Cry1* (F) e *Cry2* (G) em ilhotas pancreáticas de camundongos C e R. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2, (n=5-6) * P < 0,05 C vs R; # P < 0,05 entre os ZTs do grupo C; & P < 0,05 entre os ZT do grupo R. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.....47

Figura 12: Secreção de insulina em ilhotas isoladas de camundongos C e R nos ZTs 2, 8, 14 e 20 incubadas com (A) 5,6mM, (B) 16,7mM, (C) 22,2mM, (D) 27,7mM e (E) 33,3mM de glicose e (F) conteúdo total de insulina. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam média $\pm$ EPM. (n=16) * P<0,05 entre C e R, [#] P<0,05 entre os diferentes ZTs do grupo C. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.....49

Figura 13: Secreção de insulina na presença de (A) 10 μ M do agonista de *Rev-erba* e (B) 10 μ M do antagonista de *Rev-erba*. Dados representam média $\pm$ EMP (n=16-24). # P<0,05 entre C16,7 e C16,7 + (A) Agonista ou (B) Antagonista. *P<0,05 entre C 16,7 e R 16,7. Teste t de Student.....50

Figura 14: Secreção de insulina em ilhotas isoladas de camundongos C e R nos ZTs 2, 8, 14 e 20 incubadas com 8.3mM de glicose associadas ou não com 100 μ M de Cch. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam média $\pm$ EPM. (n=16) * P<0,05 entre C e R, [#] P<0,05 entre os diferentes ZTs do grupo C. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.....51

Figura 15: Expressão gênica de (A) *Sinaptotagmina*, (B) *Syntaxina* e (C) *Insulina* e (D) *Receptor Muscarínico de Acetilcolina (Ach-M3R)* em ilhotas pancreáticas de camundongos C e R. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=5-6) * P < 0,05 C vs R; ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline. \$ P < 0,05 entre C vs R; Test t de Student.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das Dietas.....

Tabela 2: Lista dos primers utilizados.....

Tabela 3: Peso corpóreo, índice de Lee, peso relativo do fígado, rins, baço, coração, gorduras retroperitoneal e perigonadal de camundongos C e R.....

Tabela 4: Glicose, insulina, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais e albumina plasmáticas de camundongos C e R, no estado alimentado.....

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ritmos biológicos, homeostasia glicêmica e diabetes

Como forma de adaptação aos fatores cíclicos ambientais, os seres vivos desenvolveram, ao longo da evolução, uma distribuição temporal de suas funções durante o dia e a noite, o mês ou o ano. Os eventos biológicos que apresentam uma repetição periódica recebem o nome de ritmos biológicos. Quando as oscilações desses fenômenos se completam em aproximadamente 24h (período de $24 \pm 4h$) são denominados ritmos circadianos. Essas variações diárias nos eventos biológicos são de origem endógena, e permitem que o organismo antecipe ou se prepare para mudanças periódicas que ocorrem no ambiente (Delezie and Challet 2011). No entanto variações cíclicas dos fatores ambientais são capazes de influenciar a expressão do ritmo circadiano. Tais fatores foram denominados de agentes sincronizadores, arrastadores ou *Zeitgeber Time* - ZT - (do termo alemão, *temporizador*), sendo que esses apresentam um papel importante para sincronizar o relógio circadiano periodicamente (Rawashdeh and Maronde 2012).

A ritmicidade circadiana é gerada por meio de alças auto-regulatórias compostas pelos fatores de transcrição BMAL1(Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT)-like) e CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) que por sua vez induzem a expressão de *Per 1-3 (Period)* e *Cry 1-2 (Cryptochrome)*. Após o aumento da concentração citoplasmática das proteínas PER e CRY, essas heterodimerizam e deslocam-se até o núcleo inibindo a expressão de *Bmal1*. Os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 também irão induzir a expressão dos NHRs (Orphan Nuclear Hormone Receptor) tais como, ROR α (Retinoic Acid-related Orphan Receptors) e REV-ERB α (Nuclear Receptor Encoded by NR1D1), os quais quando ativados irão promover a ativação e repressão da transcrição de *Bmal1*, respectivamente (Preitner et al. 2002; Guillaumond et al. 2005; Ko e Takahashi 2006; Crumbley e Burris 2011).

Em mamíferos os ciclos de sono vigília, atividade cardiovascular, temperatura corpórea, bem como o metabolismo energético obedecem um ritmo circadiano e são regulados por um relógio biológico endógeno (Froy 2010). Esse sistema endógeno é organizado de maneira hierárquica, onde o marcapasso central está localizado no núcleo supraquiasmático (SCN) no hipotálamo (Welsh et al. 1995; Weaver 1998; Welsh et al. 2010). Outras áreas

hipotalâmicas (extra-SCN), como núcleo arqueado e paraventricular e área lateral hipotalâmica são regulados pelo temporizador SCN, uma vez que esse emite projeções neuronais para essas áreas hipotalâmicas e em respostas essas regiões extra-SCN, via sistema nervoso autônomo e liberação de hormônios, controlam a atividade locomotora, ingestão alimentar e processos metabólicos nos tecidos periféricos (Feillet et al. 2008; Huang et al. 2011). O SCN ainda promove a sincronização da maquinaria dos genes do relógio presentes nas células de tecidos periféricos como fígado, músculo e tecido adiposo e também o pâncreas endócrino, fato que permite que esses tecidos regulem a periodicidade da expressão de mRNA que serão traduzidos em enzimas envolvidas na glicólise, oxidação dos ácidos graxos e fosforilação oxidativa, ao longo do dia (Lee et al. 2001; Mühlbauer et al. 2004; Zvonic et al. 2006; McCarthy et al. 2007; Hsieh et al. 2010; Schmutz et al. 2012).

A tolerância a glicose e sensibilidade periférica a insulina são fundamentais para a regulação da homeostase glicêmica e também estão sujeitos a oscilações circadianas. Shi et al. (2013) realizaram, *clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico em diferentes CTs (tempo circadiano) em camundongos C57BL/6J e observaram um ritmo circadiano próprio da ação periférica da insulina, visto que esses roedores apresentaram maior resistência a ação desse hormônio durante o período diurno, caracterizado por baixa atividade locomotora e consumo alimentar. Além disso, evidências da literatura demonstram que componentes intracelulares da via de sinalização da insulina, como PI3K (Fosfatidilinositol 3 quinase) e a Akt possuem ritmicidade circadiana (Anea et al. 2009). Ademais dados da literatura mostram que a secreção de insulina, em ilhotas isoladas, obedece a um padrão oscilatório de liberação (Delattre et al. 1999; Green et al. 2008; Peschke and Peschke 1998). Vieira e colaboradores (2012) também observaram em ilhotas de camundongos Swiss um perfil oscilatório na secreção desse hormônio. Ademais foi verificado a participação do gene, *Rev-erba*, como um novo regulador do acoplamento estímulo/secreção de insulina, proliferação de células β pancreáticas e no metabolismo de lipídeos.

A perda da sincronização circadiana dos genes do relógio está relacionado com o desenvolvimento do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Polonsky et al. 1988; Wonn et al. 2007; Scott et al. 2008). Camundongos com *knockout* para o gene *Bmal1* apresentaram diminuição no tamanho e proliferação, bem como aumento na taxa de morte das células β pancreáticas. Além disso, esses roedores apresentam prejuízo na secreção de insulina estimulada por glicose e outros agentes insulíntrópicos, explicando a hiperglicemia observada nesses animais

(Marcheva et al. 2010). Corroborando com esses achados, Lee et al. (2013) verificaram em camundongos *knockout* especificamente nas células β pancreáticas para o gene *Bmal1*, redução da secreção de insulina, hiperglicemia e intolerância a glicose.

1.2 Secreção de insulina

A secreção de insulina pelas células β é controlada continuamente de acordo com as flutuações da concentração de nutrientes circulantes, em especial, a glicose. Este açúcar é o regulador mais importante da secreção de insulina sendo que em resposta a glicose há um aumento rápido, ou pico da liberação do hormônio nos primeiros minutos da estimulação, o qual constitui a primeira fase da secreção. Enquanto a concentração de glicose permanecer elevada, um segundo aumento ou fase é observado, e embora seja de menor amplitude do que a primeira resposta, esta é sustentada até que a euglicemia seja estabelecida (Straub and Sharp 2002; Hiriart and Aguilar-Bryan 2008; Rorsman and Braun 2012).

Os mecanismos responsáveis pela secreção de insulina estimulada pela glicose iniciam-se com o transporte deste açúcar pelas células β pancreáticas, através de um transportador específico (GLUT 2); a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato pela enzima glicoquinase (GCK) e metabolizada gerando ATP. O resultado é o aumento da relação ATP/ADP, que provoca o fechamento dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), presentes na membrana das células β . A redução do efluxo de K^+ das células leva à despolarização da membrana que, por sua vez, provoca a abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Cav) e influxo deste cátion que ativa a maquinaria exocitótica dos grânulos de insulina (Hiriart and Aguilar-Bryan 2008; Hsieh et al. 2009). A secreção de insulina pode ser modulada por vários nutrientes e hormônios peptídicos. Nutrientes como ácidos graxos, aminoácidos e cetoácidos podem regular a secreção de insulina tão bem como a glicose (Gao et al. 2003; Li et al. 2004; Um et al. 2004). Outros hormônios produzidos pelas ilhotas pancreáticas como o glucagon e a somatostatina exercem ação estimulatória e inibitória, respectivamente, sobre a secreção das células β (Nesher et al. 2002; McClenaghan 2007; Hiriart & Aguilar-Bryan 2008).

Além disso, o sistema nervoso autônomo também possui um papel de destaque sobre a regulação da secreção de insulina. As ilhotas de Langerhans são inervadas por terminações derivadas do nervo vago que liberam a acetilcolina (Ach) que se liga a receptores muscarínicos acoplados à proteína G, levando à ativação da fosfolipase C (PLC) que por sua vez hidrolisa lipídios de membrana, produzindo inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol

(DAG). O IP_3 estimula a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático que juntamente com o DAG ativam a proteína quinase C (PKC), uma serina/treonina quinase envolvida na fosforilação de elementos da maquinaria exocitótica, aumentando sua sensibilidade ao Ca^{2+} (Gilon & Henquin, 2001). Finalmente, o sistema nervoso autônomo simpático também modula a secreção de insulina através da liberação da noradrenalina, fato que resulta na interação desse neurotransmissor a receptores específicos, α_2 -adrenérgicos, levando a inibição do processo secretório pelas células β -pancreáticas, através da hiperpolarização da membrana celular e redução da ativação da maquinaria exocitótica e da formação de AMP_c (Nakaki et al. 1981; Nilsson et al. 1988; Sharp 1996).

1.3 Desnutrição, ritmo circadiano e diabetes

A desnutrição proteica é um termo genérico que associa uma série de doenças relacionadas à falta de nutrientes na alimentação. Ela é caracterizada como uma desordem nutricional de maior prevalência entre crianças de países em desenvolvimento (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004). Dependendo da intensidade, podem ser observados desde pequenas alterações metabólicas de efeito adaptativo até falência orgânica generalizada e irreversível (Fagundes et al. 2007).

Estudos epidemiológicos mostram que indivíduos nascidos com baixo peso corporal possuem correlação positiva para desenvolver na vida adulta hipertensão, obesidade e DM 2 (Ravelli et al. 1976; Rao 1988). Em 1992, Hales & Barker criaram a hipótese do fenótipo econômico (*Thrifty Phenotype Hypothesis*) que postula a ativação de uma reprogramação *in utero*, mediante restrição nutricional durante a gestação, levando ao retardo no desenvolvimento de órgãos e tecidos como rins, tecido muscular e pâncreas endócrino em favorecimento de órgãos vitais como o cérebro. Essas adaptações poderiam repercutir na vida adulta no desenvolvimento de doenças renais, hipertensão arterial e DM 2, sendo esse último caracterizado pela resistência periférica à ação da insulina, que pela sobrecarga secretória pode levar a disfunção e falência das células β (Hales & Barker 1992; Cnop et al. 2005).

Em modelos experimentais de desnutrição após o desmame, observa-se frequentemente alterações na homeostase glicêmica, com aumento na tolerância a glicose e sensibilidade a insulina no fígado, músculo e tecido adiposo (Langley et al. 1994; Hales et al. 1996; Ozane et al. 1997). Nosso grupo de pesquisa demonstrou, no músculo de ratos submetidos a restrição proteica precoce, aumento da sinalização da insulina, com maior fosforilação do receptor de

insulina (IR) e do seu substrato (IRS-1). Ademais, Batista et al. (2013) observaram em camundongos tratados com dieta hipoproteica aumento da fosforilação da AMPK (*AMP-activated protein kinase*), e o aumento dessa quinase está relacionado com maior sensibilidade periférica (Yadav et al. 2013). Além disso, o mecanismo de secreção de insulina encontra-se alterado em resposta a estímulos secretórios de nutrientes, agentes despolarizantes e potencializadores da secreção via alteração do influxo e mobilização intracelular de íons Ca^{2+} , bem como da expressão de genes e proteínas fundamentais para o acoplamento estímulo/secreção de insulina (Latorraca et al. 1998; Araujo et al. 2004; Ferreira et al. 2004; Filiputti et al. 2010; Soriano et al. 2010; Batista et al. 2011; Batista et al. 2013).

Todavia, vários estudos tem mostrado que ratos submetidos a desnutrição proteica intrauterina com 15 meses de vida apresentaram redução da tolerância a glicose acompanhado de menor sensibilidade a insulina e aos 17 meses se tornaram diabéticos (Hales et al. 1996; Petry et al. 1997; Ozanne et al. 1997; Petry et al., 2001). Ozanne e colaboradores (2001) verificaram na prole de ratas desnutridas redução da capacidade do tecido adiposo epididimal em responder ao estímulo da insulina, uma vez que na presença desse hormônio a atividade da PI3K e da Akt foi reduzida.

Outros estudos descreveram o desenvolvimento de resistência a insulina em roedores desnutridos alimentados com dieta hiperlipídica. Bol et al. 2009 observaram que camundongos submetidos a desnutrição intrauterina foram mais suscetíveis aos efeitos deletérios da dieta hipercalórica refletido por maior ganho de peso corpóreo, maior concentração plasmática de glicose e leptina e hiperfagia. Além disso, esses roedores exibiram alterações na expressão de genes no tecido adiposo perigonadal incluindo, *Srebp-1c* (*Sterol regulatory element binding protein 1c*), *Fas* (*Fatty acid synthase*) e leptina. Batista et al. (2013) observaram em camundongos desnutridos após o desmame seguido do tratamento com dieta hiperlipídica, aumento de peso corpóreo, perda da tolerância a glicose e sensibilidade periférica a insulina, bem como aumento da produção hepática de glicose. Os achados acima indicam que a restrição proteica aumenta a sensibilidade a insulina em fases iniciais da vida, porém esse efeito parece ser transitório podendo ser invertido durante a vida adulta e senescência. Ainda, a reprogramação metabólica induzida pela desnutrição pode favorecer o desenvolvimento de obesidade e intolerância a glicose após exposição a dietas contendo alto teor de gorduras e calorias.

Outro fator envolvido no desenvolvimento das alterações encontradas em modelos animais de restrição proteica é o desequilíbrio circadiano na expressão dos genes do relógio (Orozco-Solís et al. 2011). Estudos em fígado de camundongos que foram submetidos a restrição proteica durante a gestação mostram que a expressão de *Bmal1* e *Per2* está aumentada e não exibem variações circadianas. Além disso, esses animais apresentam redução na expressão de *Rev-erba* e aumento na expressão de *Tnf- α* , *Fas* e *glicose-6-fosfatase*. Ainda, esses camundongos apresentaram maior suscetibilidade ao ganho de peso e maior adiposidade quando alimentados com dieta hiperlipídica. Sendo assim, exposição a dieta hipoproteica no período gestacional está também associada a desregulação na oscilação circadiana de genes envolvidos no metabolismo da glicose e lipídeos (Sutton et al. 2010). Além disso, alterações na integridade do ritmo biológico apresentado por esses camundongos poderiam estar relacionados com a predisposição apresentada por esse modelo animal e também em humanos para o desenvolvimento de doenças como obesidade e DM2.

Contudo, a participação dos genes do relógio biológico como um importante fator nas mudanças geradas pela restrição proteica, após o desmame, na homeostase glicêmica ainda não foram totalmente elucidadas. Além disso, não há dados na literatura mostrando o perfil de secreção de insulina, bem como as oscilações dos *clock genes* em ilhotas isoladas de camundongos desnutridos.

2 OBJETIVOS

Nosso estudo teve por objetivo avaliar o perfil de secreção de insulina, bem como o envolvimento dos *clock genes* no controle do acoplamento estímulo/secreção desse hormônio em ilhotas isoladas de camundongos desnutridos. Avaliamos também a expressão desses genes em tecidos periféricos e hipotálamo para correlacioná-los com o controle da homeostase glicêmica nesse modelo experimental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 a partir de 30 dias, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, os quais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

a) Controle (C): os animais receberam dieta normoprotéica (14% de proteína) por todo o período experimental (8 semanas).

b) Restritos (R): os animais receberam dieta contendo 6% de proteína por todo o período experimental (8 semanas).

Os camundongos foram mantidos no biotério setorial do departamento de Biologia estrutural e funcional, sob condição padronizada de iluminação com 12 horas de ciclo claro/escuro (período claro 06:00-18:00h) e temperatura de 22 ± 2 °C. Para estudar a variação circadiana de alguns parâmetros propostos nesse projeto, camundongos C57BL/6, foram eutanasiados em diferentes horários (8:00, 14:00, 20:00 e 2:00 h) ou Zeitgeber (ZT) 2, 8, 14 e 20, respectivamente. Os animais dos ZT 14 e 20, tanto C como R, permaneceram em rack desenvolvida especificamente para estudos de ritmos circadianos, na qual o ciclo claro/escuro foi invertido, ou seja, o período claro ocorreu das 18:00 as 6:00h. As condições de temperatura, luminosidade e umidade foram padronizadas no interior da rack para que permanecessem semelhantes a câmara do biotério.

As dietas, mistura de vitaminas e minerais, cujas composições encontram-se descritas na Tabela 1, foram adquiridas comercialmente da empresa Pragsoluções (Jaú-SP). A dieta controle segue as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93) para roedores nas fases de crescimento, gravidez e lactação.

Tabela 1: Composição das Dietas

<i>Ingredientes (g/Kg)</i>	Normoproteica (14% proteína)	Hipoproteica (6% proteína)
Caseína	140	71,5
Amido	465,7	502,5
Dextrina	155	166,5
Sacarose	100	121

L-cistina	1,8	1
Fibra (microcelulose)	50	50
Óleo de soja	40	40
Mistura de sais AIN93G*	35	35
Mistura de vitaminas AIN93G*	10	10
Cloridrato de colina	2,5	2,5
Caloria (Kcal/Kg)	3,88	3,88

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

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Avaliação corpórea e do estado nutricional

Os camundongos foram pesados e o comprimento naso-anal (CNA) foi medido, para posterior cálculo do Índice de Lee (raiz cúbica peso/CNA). Em seguida, os camundongos foram eutanasiados e os tecidos como fígado, músculo, coração, tecido adiposo foram pesados e os respectivos valores percentuais foram expressos em relação ao peso corpóreo de cada camundongo. Além disso, o sangue foi coletado em tubos *eppendorf* contendo anticoagulante (heparina 1:1000). O plasma foi separado por centrifugação a 1.600 rpm durante 15 minutos e armazenado a -20 °C para posterior determinação de insulina por radioimunoensaio. Também foram quantificados os triglicerídeos, colesterol, proteínas totais e albumina plasmáticos utilizando kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante. (Merck®, Alemanha; Wako®, EUA; Bioclin®, Brasil; Bioliquid®, Brasil).

4.2 Teste de Tolerância a glicose (ipGTT) e a insulina (ipITT)

Animais dos grupos estudados após 12h de jejum foram pesados, e em seguida foi realizada a coleta de sangue pela cauda para obtenção da glicemia de jejum (tempo 0), por meio de um glicosímetro (Accu-Chek Advantage, Roche, Suíça). Em seguida, os animais receberam uma injeção ip de glicose na concentração de 2g/Kg peso corporal. A glicemia foi verificada aos 15, 30, 60 e 120 min após a aplicação da glicose. O cálculo da área abaixo da curva representa, em unidades arbitrárias, o perfil de glicose ao longo do teste do GTT.

Para o ipITT os animais dos grupos em estudo, no estado alimentado, foram pesados e a glicemia inicial (tempo 0) foi aferida por meio de um glicosímetro. Em seguida, os animais receberam injeção ip de 0,75U/Kg de insulina e a glicemia verificada nos tempos 5, 10, 15, 30 e 60 min após a administração de insulina. O cálculo da área abaixo da curva representa, em unidades arbitrárias, o perfil de glicose ao longo do teste do ITT.

4.3 Isolamento de Ilhotas Pancreáticas de camundongos

Os animais foram eutanasiados nos ZTs 2, 8, 14 e 20 e após incisão abdominal o fígado foi rebatido para expor a vesícula biliar e a porção proximal do ducto biliar comum. Utilizando-se de um fio cirúrgico, o ducto pancreático foi obstruído a altura da papila maior para evitar a saída de solução de collagenase para o duodeno. Na porção distal do conduto biliar comum, abaixo da vesícula biliar foi realizada uma pequena incisão no ducto, com tesoura cirúrgica oftalmológica, para introduzir uma agulha de insulina, e em seguida a agulha foi fixada em sua posição por meio de um fio cirúrgico. Através dessa agulha foi injetado no pâncreas 2 a 3 ml de solução de Hanks com collagenase tipo V *Sigma* (0,8 mg/mL). Este procedimento facilitou o acesso da collagenase para todo o pâncreas para sua conseqüente extração. O pâncreas foi retirado da cavidade abdominal por dissecação e transferido para um tubo de 15 ml. Em seguida foi adicionado mais 7 ml da solução de Hanks com collagenase e o tubo foi submergido em banho termostatzado a 37°C durante 17 min. No final deste período foi realizada uma pequena agitação de 30 segundos para facilitar a desagregação do tecido pancreático. A digestão do tecido foi interrompida mediante a adição de Hanks a 4 °C. O conteúdo do tubo foi transferido para um becker e o material foi centrifugado com solução de Hanks por 4 vezes para a remoção da collagenase, enzimas digestivas liberadas durante a incubação, e também fragmentos celulares. As ilhotas, completamente separadas do tecido acinar, foram coletadas uma a uma, sob lupa, por aspiração com o auxílio de pipeta *Pasteur*, previamente estirada e siliconizada.

4.4 Secreção Estática de Insulina

Grupos de 4 ilhotas pancreáticas dos diferentes grupos estudados foram transferidas para placas de cultura com 24 poços contendo 0,5 ml de solução de Krebs suplementada com 0,3% de albumina bovina (m/v) e 5,6 mM de glicose. A seguir as placas foram acondicionadas

em uma estufa a 37°C e mantidas em ambiente controlado (umidificado e gaseificado com 95% O₂/5% CO₂). O pH da solução foi ajustado para 7,4 pela injeção desse gás. Inicialmente as ilhotas foram pré-incubadas por 30 min em 5,6 mM de glicose. A solução foi rapidamente removida e substituída por nova solução de incubação contendo 5,6; 8,3; 16,7; 22,2; 27,7 e 33,3 mM de glicose. Nos experimentos para avaliar a via colinérgica a incubação foi realizada com 8,3 mM de glicose em associação com 100 µM de carbacol. Para avaliar a participação do gene do relógio *Rev-erba* no processo secretório de insulina, foram realizados experimentos incubando ilhotas pancreáticas com 10 µM do agonista de *Rev-erba* – GSK 4112 e com 10 µM do antagonista de *Rev-erba* - SR8278. Após 60 min de incubação, as placas foram resfriadas por 10 minutos na geladeira e o sobrenadante removido, transferido para tubos de ensaio e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio. Em seguida as ilhotas incubadas na condição 2,8 mM foram coletas e colocadas em *ependorfs* (1,5mL) sendo acrescentado 1mL de água MilliQ. Logo após as ilhotas foram sonicadas e armazenadas a -20° para posterior dosagem do conteúdo total de insulina.

4.5 Dosagem de Insulina

A insulina plasmática e secretada durante os experimentos *in vitro* foi quantificada pelo método de radioimunoensaio (Ribeiro et al., 2010), utilizando-se anticorpo específico (*anti-rat*), insulina de rato para traçar a curva padrão e insulina recombinante humana marcada com Iodo 125 (*PerkinElmer*).

4.6 Real Time PCR

Após a coleta dos tecidos fígado, músculo, tecido adiposo, hipotálamo e ilhotas isoladas nos ZTs 2, 8, 14 e 20, o RNA total foi extraído e amostra de 2 µg de cada RNA foi submetida à reação de transcrição reversa (RT) com primers randômicos. Para isto, foi adicionado em cada amostra tampão da enzima, DTT (100 mM), dNTP mix (10mM), e a enzima SuperScript II (200U; Invitrogen – Life Technologies). Em seguida as amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C para a reação e obtenção do cDNA. Os PCRs foram realizados numa reação contendo 20 µl de volume final, composta por 4 µl do cDNA (0,1 µg/µl), 10

pmol/l de cada primer e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os produtos foram detectados com o sistema 7500 *Fast* para real time PCR (Life-Applied Biosystems). Os valores obtidos foram normalizados pelos valores do gene controle: *rlpl0* (*ribosomal protein large P0*, ou *36B4*) e foram expressados como a expressão relativa pelos níveis do controle no ZT 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Tabela 2: Lista dos primers utilizados

<i>Gene</i>	<i>Sequência Foward</i>	<i>Sequência Reverse</i>
36B4	GAGGAATCAGATGAGGATATGGGA	AAGCAGGCTGACTTGGTTGC
Bmal1	GGACTTCGCCTCTACCTGTTCA	ATAGCCTGTGCTGTGGATTGT
Clock	TTGCTCCACGGGAATCCTT	GGAGGGAAAGTGCTCTGTTGTAG
Rev-erba	GGTGCCTTTGCATCGTT	GGTTGTGCGGCTCAGGAA
Per1	GCGGGTCTTCGGCTAAGGTT	AGGCTCAGCTGGGATTTGG
Per2	ATGCTCGCCATCCACAAGA	GCGGAATCGAATGGGAGAAT
Cry1	CTGGCGTGGAAGTCA TCGT	CTGTCCGCCATTGAGTTCTATG
Cry2	AGCCCAGGCCAAGAGGAA	GTTTTTCAGGCCCACTCTACCTT
Insulina	AGCAAAGTCCAGGGGGCAGAGA	GAAACAATGACCTGCTTGCTGATGG
Sintaxina	CGGTGTGTTTCCGCTTCACCT	TCACTGTGGACCGAGACCGC
Sinaptotagmina	CTTAGCGTCACTATCGTCCTCTG	GTAGCCAACACTGAACTGGATTC
Receptor muscarínico de Acetilcolina	ACCTCTGACACCAACTCCTCG	TCCGCTTGCTGATCTGACTTC
Neuropeptídeo Y	TACTCCGCTCTGCGACACTA	TCTTCAAGCCTTGTCTCTGGG
Proopiomelanocortina	GGCTTGCAAACCTCGACCTC	TGACCCATGACGTACTTCCG

4.7 Respirometria e determinação do metabolismo basal

Para determinação do consumo de oxigênio e produção de CO₂, foram utilizadas gaiolas metabólicas totalmente seladas e acopladas ao sistema *Oxylet system* (*Pan Lab/Harvad instruments*, Barcelona, Espanha). Após 24 horas de aclimação ao sistema e com os animais em completo repouso, foram avaliados esses padrões metabólicos. A partir desses dados foram feitos os cálculos do quociente respiratório (RQ), gasto energético (EE) pelo programa *Metabolism*[®] (*Pan Lab/Harvad instruments*, Barcelona, Espanha) acoplado ao sistema.

4.8 Atividade Locomotora

Para avaliação da atividade locomotora foram utilizadas gaiolas acopladas ao sistema (*Pan Lab/Harvad instruments*, Barcelona, Espanha). Após 24 horas de aclimação, iniciou-se a determinação da atividade locomotora. Os dados obtidos foram analisados pelo programa *Compulsive*[®] (*Pan Lab/Harvad instruments*, Barcelona, Espanha) acoplado ao sistema.

4.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos com média $\pm$ erro padrão (EPM). A análise de alguns parâmetros entre os grupos C e R, foram avaliados por meio do Teste *t* de *Student* onde indicado. Análises que envolvem os fatores dieta e ZT foram analisados pela variância (ANOVA) de duas vias seguida do *post hoc test* Spjotvoll-Stoline. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo experimental

5.1.1 Parâmetros gerais:

Camundongos submetidos à dieta hipoproteica (R) apresentaram ao final do período experimental redução no peso corpóreo em relação ao controle – C ($P < 0,001$; Tab. 3). Além disso, camundongos R apresentaram redução no peso relativo dos rins, sem alterações para os demais órgãos e tecidos, quando comparados a C ($P < 0,05$; Tab.3).

A análise dos parâmetros bioquímicos no estado alimentado (Tab. 4) revelou valores semelhantes de glicemia entre os grupos experimentais. A concentração plasmática de insulina, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais e albumina foram menores em camundongos R em relação a C ($P < 0,05$).

Tabela 3: Peso corpóreo, índice de Lee, peso relativo do fígado, rins, baço, coração, gorduras retroperitoneal e perigonadal de camundongos C e R.

	Controle	Restrito
Peso (g)	26,360 ± 1,138	21,140 ± 0,423**
Índice de Lee (g/cm)	0,3281 ± 0,010	0,3198 ± 0,005
Fígado (g/100g)	4,388 ± 0,096	4,297 ± 0,115
Rins (g/100g)	1,072 ± 0,019	0,976 ± 0,019*
Baço (g/100g)	0,301 ± 0,020	0,265 ± 0,014
Coração (g/100g)	0,480 ± 0,012	0,488 ± 0,012
Músc. Gastrocnêmio	0,490 ± 0,02147	0,456 ± 0,022
Gord. Retroperitoneal (g/100g)	0,450 ± 0,048	0,566 ± 0,066
Gord. Perigonadal (g/100g)	0,261 ± 0,040	0,262 ± 0,025

Dados representam Média ± EPM (n=7-9), * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ Teste *t* de Student.

Tabela 4: Glicose, insulina, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais e albumina plasmáticas de camundongos C e R, no estado alimentado.

	Controle	Restrito
--	----------	----------

Glicose (mg/dL)	135,4±4,01	133,8±3,80
Insulina (ng/mL)	1,39 ± 0,25	0,57 ± 0,06 *
Colesterol (mg/dL)	173,5 ± 13,16	125,7 ± 7,11 *
Triglicerídeos (mg/dL)	103,9 ± 6,36	60,01 ± 6,27 *
Proteínas Totais (g/dL)	4,52 ± 0,26	3,73 ± 0,23 *
Albumina (g/dL)	1,97 ± 0,13	0,84 ± 0,05*

Dados representam Média ± EPM (n=7-13), *P<0,05, Teste *t* de Student.

5.2 Homeostase energética

5.2.1 Tolerância à Glicose e Sensibilidade à Insulina

A Figura 1A mostra o perfil da concentração plasmática de glicose durante um ipGTT, no ZT 2. Camundongos de ambos os grupos apresentaram uma glicemia de jejum similar e após a administração intraperitoneal de glicose (2g/Kg) houve um pico na glicemia aos 15 minutos em C e R. O perfil da glicemia, representado pela área sob a curva (ASC) foi menor nos camundongos R quando comparado ao grupo C (P<0,05; Fig. 1B). Ademais, verificou-se que a insulinemia nos tempos 0 e 30 do teste foi menor no grupo R em relação a C (P<0,05; Fig. 1C).

A figura 2A mostra o perfil glicêmico nos grupos C e R durante um ipITT, no ZT 2. Após a administração de insulina (0,75U/Kg), o decaimento da glicose plasmática foi mais proeminente nos camundongos R como evidenciado pela análise da ASC (P<0,05; Fig. 2B).

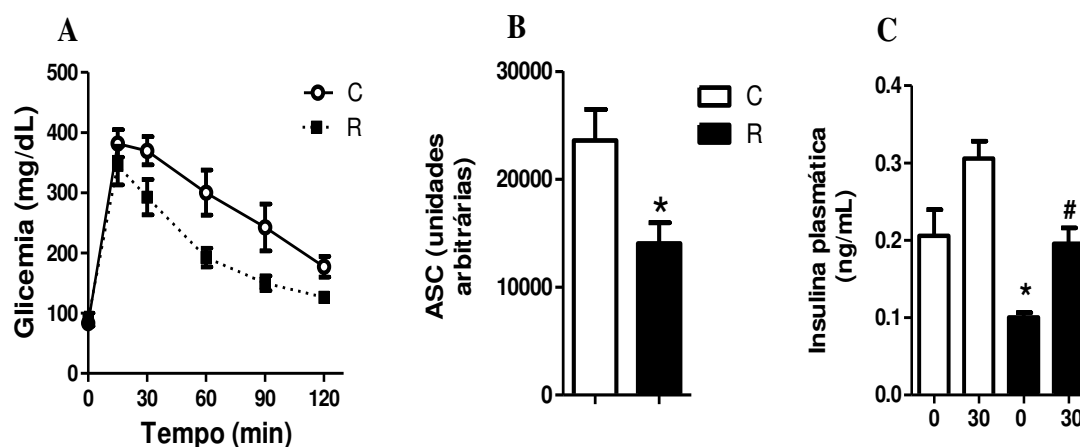


Figura 1: (A) Glicose plasmática durante ipGTT no ZT 2, (B) área abaixo da curva (ASC) e (C) concentração plasmática de insulina aos 0 e 30 minutos do ipGTT. Dados representam média $\pm$ EPM (n=7-8), * $P < 0,05$ entre os grupos C e R no tempo 0'; # $P < 0,01$ entre os grupo C e R no tempo 30 minutos. Teste *t* de Student.

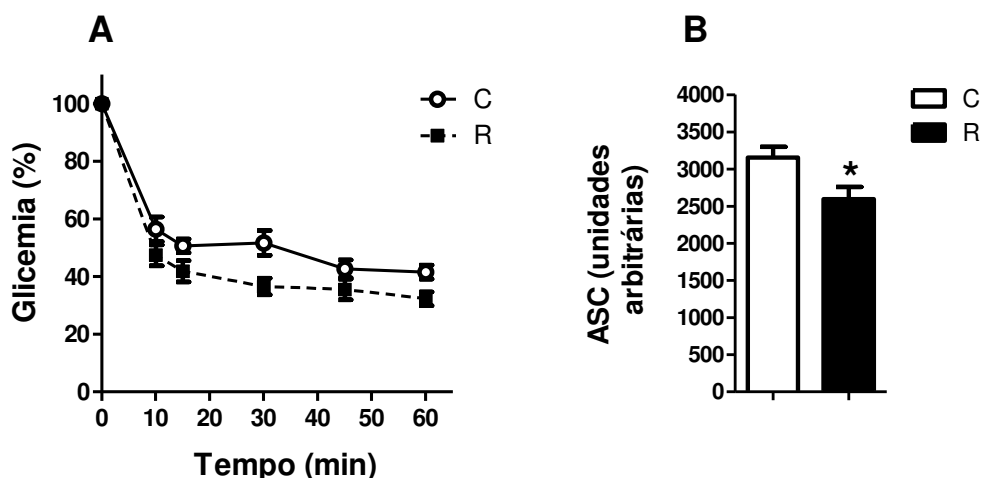


Figura 2: (A) Glicose plasmática durante ipITT no ZT 2 e (B) e a área sob a curva (ASC). Dados representam média $\pm$ EPM (n=7-8), * $P < 0,05$. Teste *t* de Student.

5.2.2 *Respirometria e atividade locomotora*

A figura 3A apresenta a média do consumo alimentar dos grupos C e R durante a última semana de tratamento. Os valores relativos de ingesta normalizados pelo peso corpóreo indicam maior consumo alimentar em camundongos R ($P < 0,05$).

A respirometria de 24 h indicou que o grupo C e R apresentaram Quociente Respiratório (RQ) similar durante o período claro com valores próximos a 0,77, indicando a utilização preferencial de lipídeos como fonte de energia (Fig. 3B). Durante o período escuro, camundongos C e R exibiram um RQ aproximado de 0,9 mostrando preferência pela metabolização da glicose como fonte de energia ($P < 0,05$). Ademais a figura 3C mostra a mudança dos valores de RQ ao longo de 24 horas, evidenciando a flexibilidade metabólica de ambos os grupos. Além disso, observamos que ambos os grupos possuem gasto energético semelhante (Fig. 3D), seja durante o período noturno e/ou diurno.

A Figura 4A mostra a curva da atividade locomotora dos grupos C e R ao longo de 48 horas. Observa-se que ambos os grupos possuem um padrão similar durante o período

analisado, com aumento da atividade ao apagar das luzes, e diminuição da mesma durante a fase a clara. A área sob a curva (Fig. 4B) indica que não ha diferença no padrão de atividade locomotora entre os camundongos C e R em nenhum dos períodos avaliados.

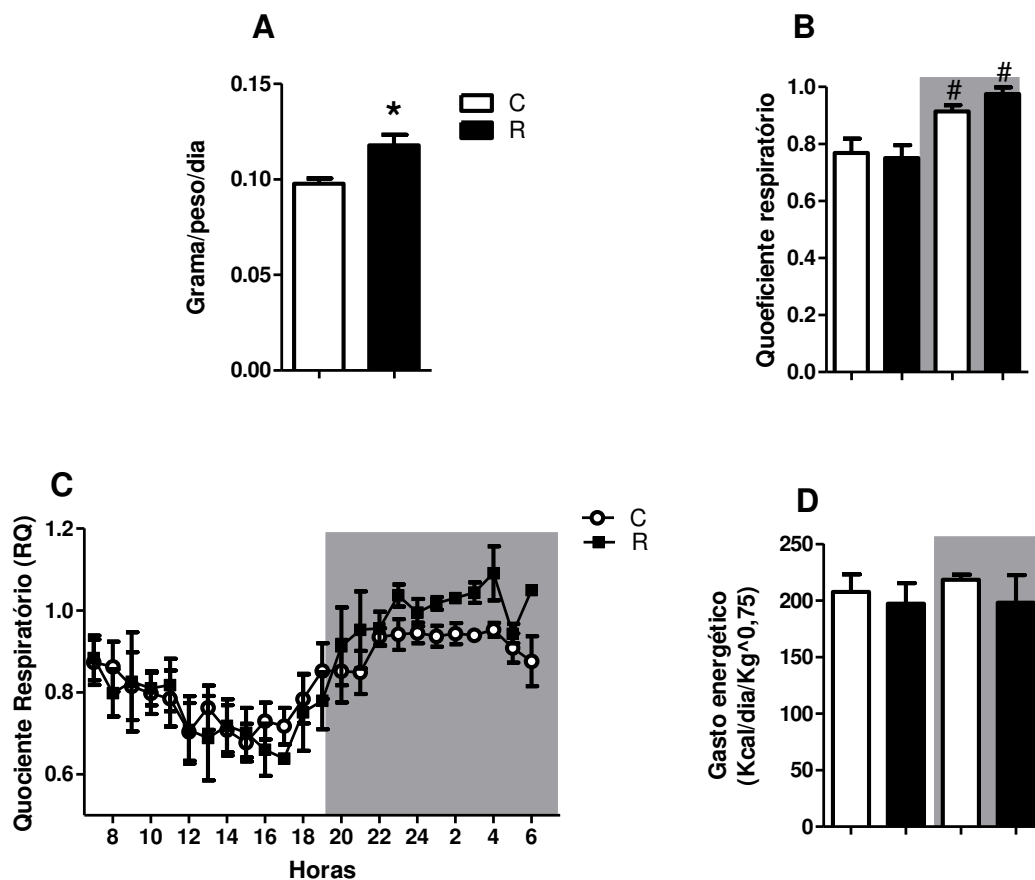


Figura 3: (A) Consumo alimentar, (B) média do RQ no período claro e escuro, (C) curva do RQ e (D) gasto energético (fundo claro e sombreado, respectivamente). Dados representam média $\pm$ EPM (n=3). * $P < 0,05$ C vs. R; # $P < 0,05$ entre a fase clara e escura tanto para o grupo C como para o R. Teste *t* de Student.

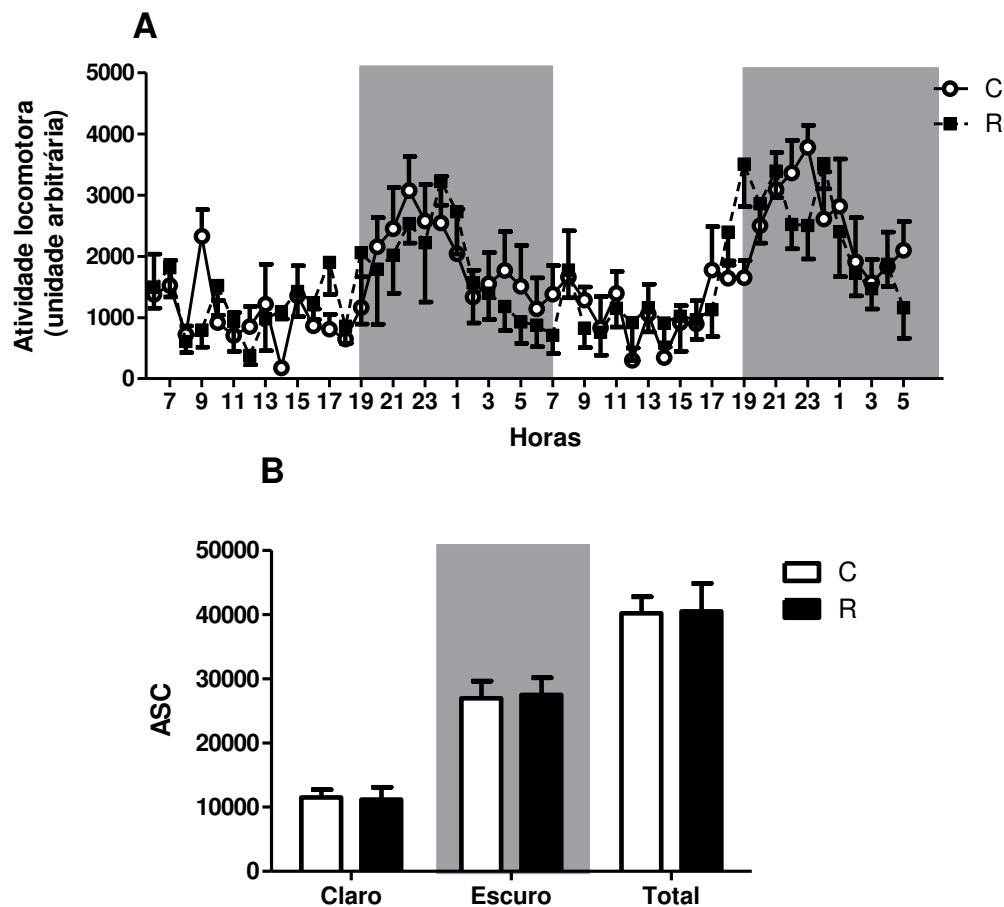


Figura 4: (A) Curva da atividade locomotora ao longo de 48 hr e (B) atividade locomotora expressa pela ASC. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam média $\pm$ EPM (n=6). Teste *t* de Student.

5.3 Perfil circadiano de substratos metabólicos plasmáticos

A figura 5 mostra, em camundongos C e R, os quais permaneceram *ad libitum*, a concentração plasmática de (A) triglicerídeos, (B) colesterol, e (C) glicose ao longo de 24 horas. Observou-se que os níveis plasmáticos de triglicerídeos apresentaram variação diária através da análise ANOVA, no grupo controle ($P < 0,05$). No entanto, o pós-teste não identificou diferença entre os ZTs. No grupo R, a mesma análise estatística não revelou influência do fator horário na concentração plasmática de triglicérides, porém esse parâmetro se manteve reduzido em relação a C em todos os ZTs avaliados ($P < 0,05$). Não foram observadas oscilações ao longo de 24 horas na concentração plasmática de colesterol. No

entanto, camundongos R apresentaram redução da concentração de colesterol plasmático nos ZT 2 e 8 ($P<0,05$; Fig. 5B).

Camundongos C apresentaram variação diária da glicemia, com aumento significativo nos ZTs 8 e 14 ($P<0,05$; Fig. 5C). Contudo, o grupo R mostrou perda dessa variação na concentração plasmática de glicose, além de redução da glicemia nos ZTs 8 e 14, em relação a C ($P<0,05$; Fig. 5C).

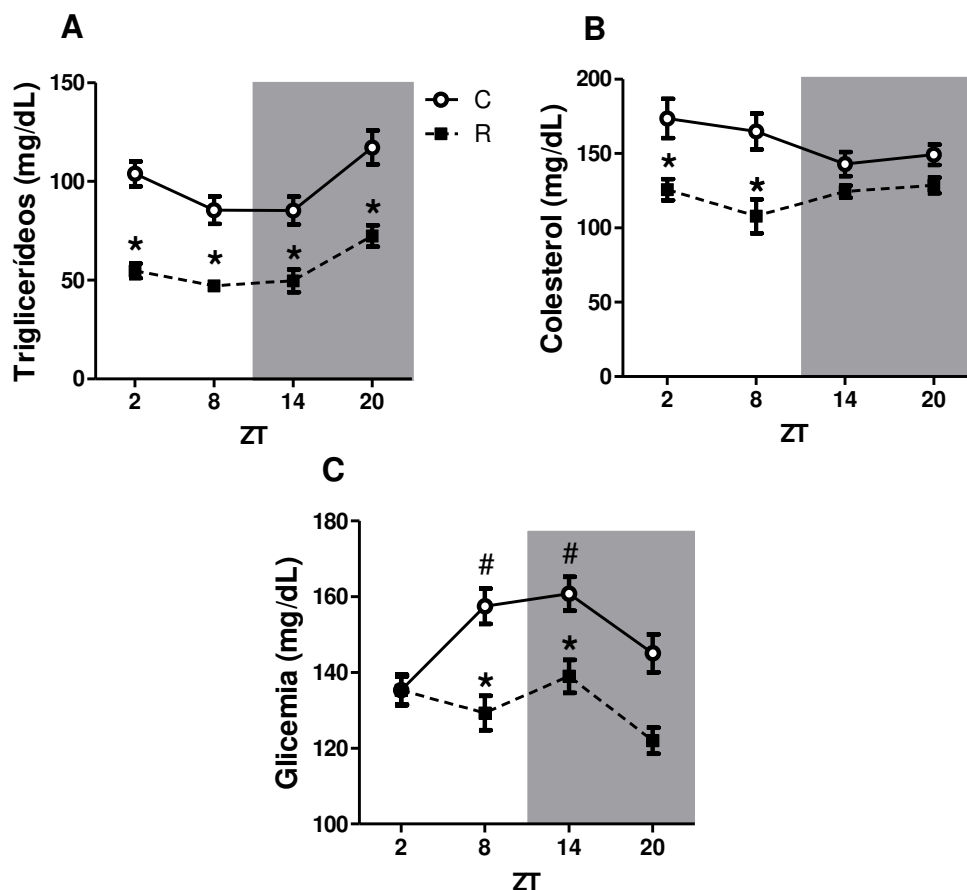


Figura 5: Oscilação diária da concentração plasmática de (A) triglicerídeos, (B) colesterol e (C) glicose. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM. (n=5-6) * $P<0,05$ entre C e R, # $P<0,05$ entre os diferentes ZTs do grupo C. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.

5.4 Expressão gênica

5.4.1 Hipotálamo

A figura 6 mostra a expressão dos neuropeptídeos *Pomc* e *Npy* no hipotálamo de camundongos C e R avaliada nos ZTs 2, 8, 14 e 20. Os níveis de expressão para o gene

anorexigênico *Pomc* apresentou, no grupo C, oscilação diária, sendo o valor máximo alcançado no ZT 14 ($P < 0,001$; Fig. 6A). No entanto, em camundongos R, a variação periódica para esse gene foi perdida ($P < 0,01$). No grupo C, o gene orexigênico *Npy* não apresentou variação na sua expressão ao longo de 24 horas (Fig. 6B). Camundongos R também não exibiram oscilação para esse gene, contudo, houve aumento significativo na expressão de *Npy* no ZT 14, em relação ao grupo C ($P < 0,05$).

Ao analisarmos a expressão dos *clock genes* (Fig. 7) no hipotálamo de camundongos C e R, observamos que a oscilação dos genes *Bmal1*, *Clock*, *Cry1* e *Cry2* (Fig. 7 A, B, F e G, respectivamente) ao longo de 24 h não atingiu significância estatística em ambos os grupos. O gene *Rev-erba* exibiu oscilação diária no grupo C, sendo os maiores níveis alcançados no ZT 14 ($P < 0,05$; Fig. 7 C). Em camundongos R essa variação na expressão de *Rev-erba* foi perdida. Os genes *Per1* e *Per2* apresentaram o mesmo perfil de oscilação em ambos os grupos sendo o que houve aumento na expressão desses genes no ZT 14 ($P < 0,05$; Fig. 7 D e E).

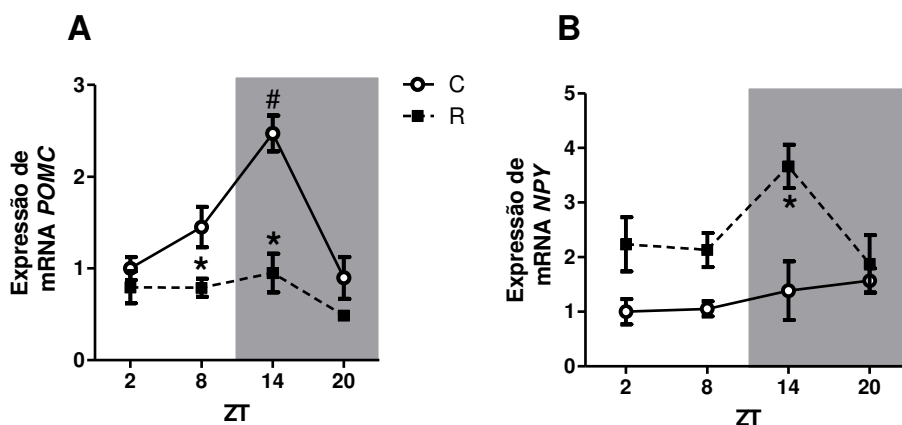


Figura 6: (A) Expressão do gene anorexigênico *Pomc* e (B) do orexigênico *Npy* no hipotálamo de camundongos C e R. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=4-5) * $P < 0,05$ C vs R; # $P < 0,05$ entre os ZTs do grupo C; ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.

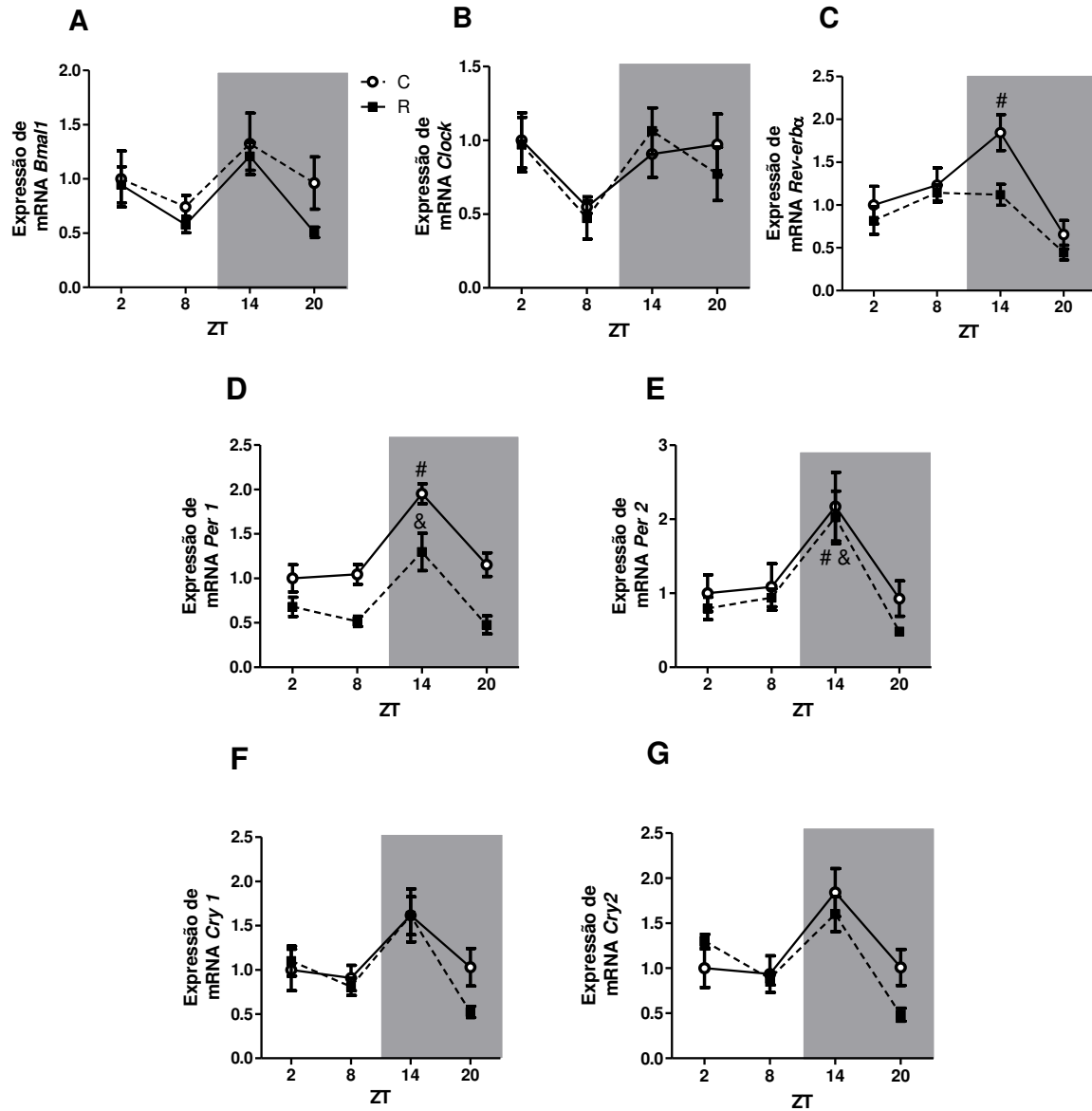


Figura 7: (A) Expressão gênica de (A) *Bmal1*, (B) *Clock*, (C) *Rev-erba*, (D) *Per1*, (E) *Per2*, (F) *Cry1*, (G) *Cry2* no hipotálamo de camundongos C e R. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=4-5) * $P < 0,05$ C vs R; # $P < 0,05$ entre os ZTs do grupo C; & $P < 0,05$ entre os ZTs do grupo R. ANOVA duas vias seguida de pos-test Spjotvoll Stoline.

5.4.2 Fígado

A Figura 8 apresenta a expressão dos principais genes do ritmo circadiano no fígado de camundongos C e R. Os genes *Bmal1* e *Clock*, no grupo controle, apresentaram menor expressão no ZT 8 e 14 ($P < 0,01$) tendo um aumento no ZT 2 e 20. No entanto a oscilação diária desses genes está perdida nos animais desnutridos (Fig. 8A e 8B, respectivamente).

Em camundongos C, a expressão hepática do gene *Rev-erba* apresentou um padrão oscilatório ao longo de 24 horas (Fig. 8C). Nesse tecido houve um aumento na expressão de *Rev-erba* no ZT8 ($P < 0,01$) seguido de uma redução acentuada nos ZT 14 e 20. Camundongos R também apresentaram variação nos níveis de *Rev-erba*, entre o ZT 2 e ZT 20 ($P < 0,05$), no entanto o aumento na expressão desse gene no ZT 8 foi abolido (Fig. 8C).

Os genes *Per1* e *Per2* (Fig. 8D e 8E, respectivamente), no grupo C, apresentaram maior expressão no ZT 14 ($P < 0,01$ e $0,001$, respectivamente). No grupo R a variação da expressão desses genes foi similar ao controle, no entanto o aumento do conteúdo de mRNA em relação ao ZT 2, iniciou-se no ZT 8 ($P < 0,05$) tendo no ZT 14 o máximo de expressão ($P < 0,01$).

No fígado de camundongos C, o conteúdo do mRNA de *Cry1* (Fig. 8F) não revelou diferença significativa entre os diferentes ZTs. Em camundongos R o perfil de expressão de *Cry1* foi semelhante a C, porém em ZT 20 o conteúdo de mRNA foi significativamente maior em relação ao ZT 2 ($P < 0,01$). A expressão de *Cry2* não apresentou variação diária e não foi influenciada pela restrição proteica (Fig. 8G).

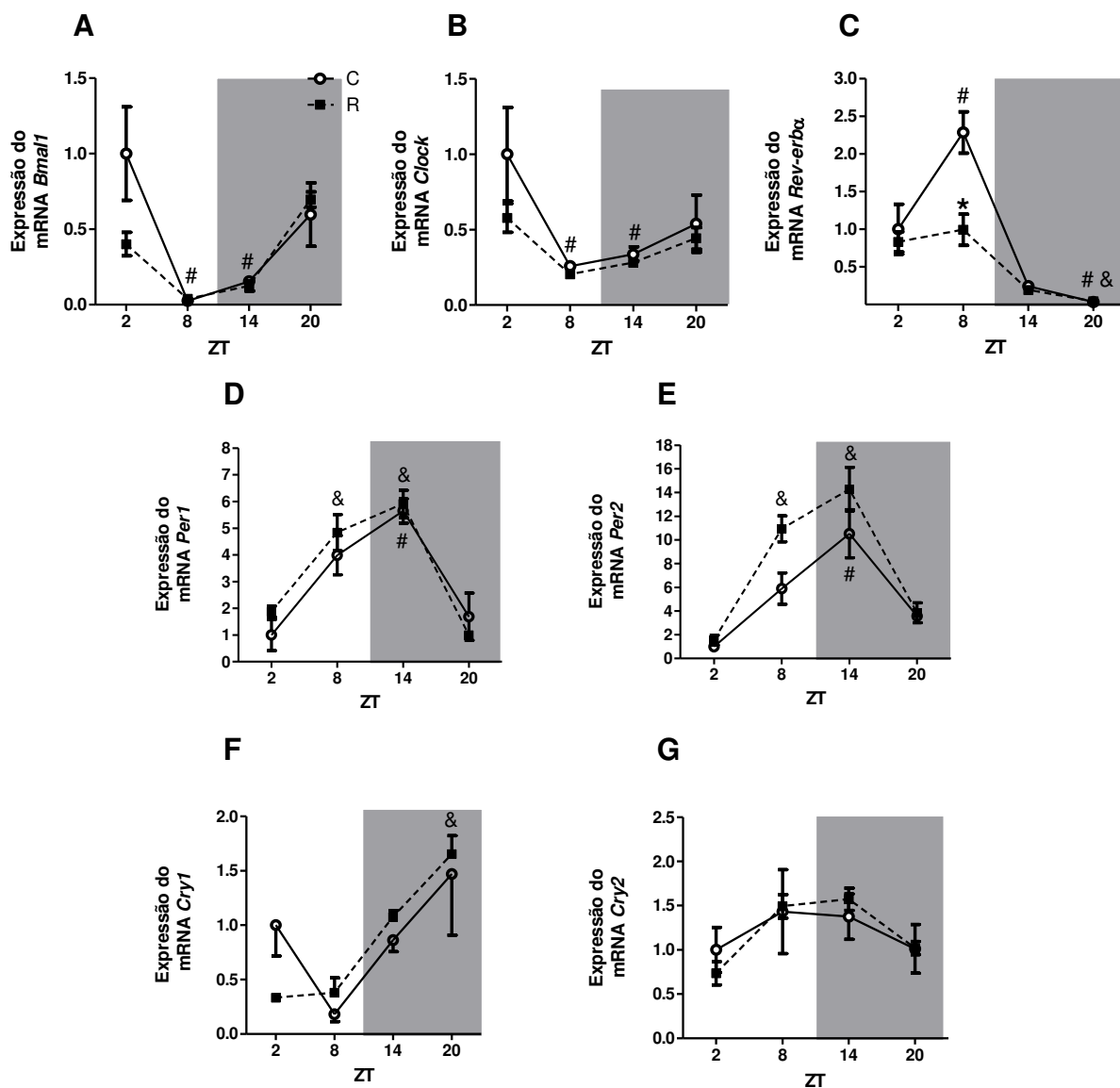


Figura 8: Expressão gênica de (A) *Bmal1*, (B) *Clock*, (C) *Rev-erba*, (D) *Per1*, (E) *Per2*, (F) *Cry1* e (G) *Cry2* no fígado de camundongos C e R. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=4-5) * $P < 0,05$ C vs R; # $P < 0,05$ entre os ZTs do grupo C; & $P < 0,05$ entre os ZT do grupo R. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.

5.4.3 Músculo

A figura 9 apresenta a expressão dos *clock genes* no músculo de camundongos C e R. O gene *Bmal1* (Fig. 9A) apresentou menor expressão nos ZTs 8 e 14 ($P < 0,05$). A oscilação diária desse gene no músculo foi atenuada em camundongos R. A expressão do gene *Clock*

não apresentou oscilação ao longo de 24 horas e não foi influenciado pela restrição proteica (Fig. 9B).

A figura 9C mostra que o gene *Rev-erba* apresentou oscilação diária, com menores valores de expressão nos ZTs 14 e 20 ($P < 0,05$ e $0,01$ respectivamente). No músculo, a expressão desse gene não foi influenciada pela restrição proteica.

Em camundongos C, o gene *Per1* apresentou maiores valores de expressão nos ZTs 8 e 14 ($P < 0,01$; Fig 9D). Nos camundongos R a oscilação periódica desse gene foi perdida. O *Per2* (Fig. 9E) revelou maior expressão nos ZTs 8, 14 e 20 em relação ao ZT 2 em C ($P < 0,001$), com níveis máximos de mRNA no ZT 14. Camundongos R, para o gene *Per2*, apresentaram expressão significativamente elevada somente nos ZTs 8 e 14 ($P < 0,001$). Ainda, houve uma redução significativa na expressão desse gene no ZT 14 em relação a C ($P < 0,01$).

A expressão do gene *Cry1* não apresentou variação ao longo de 24 horas em camundongos C (Fig. 9F). Em camundongos R houve um aumento significativo na expressão desse gene no ZT 20 ($P < 0,001$). A figura 9G mostra que a expressão de *Cry2* em camundongos controle foi significativamente elevada no ZT 14 ($P < 0,01$). Em camundongos R a oscilação diária para o gene *Cry2* foi perdida.

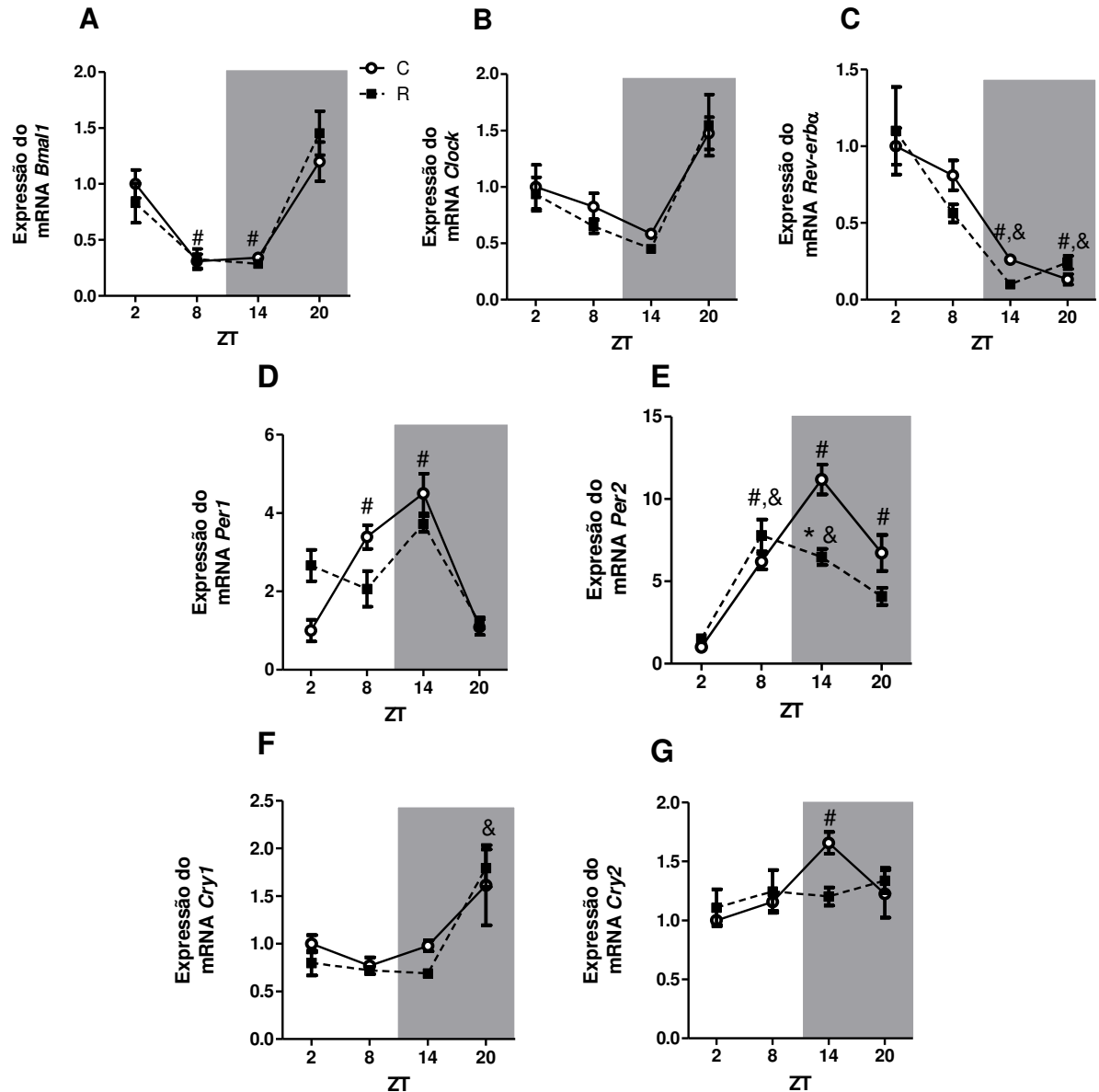


Figura 9: Expressão gênica de *Bmal1* (A), *Clock* (B), *Rev-erba* (C) *Per1* (D), *Per2* (E), *Cry1* (F) e *Cry2* (G) no músculo de camundongos controle e desnutridos. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=4-5) * $P < 0,05$ controle vs desnutrido. # $P < 0,05$ dentro do ZT do grupo controle e & $P < 0,05$ entre os ZT do grupo restrito. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.

5.4.4 Tecido Adiposo

A figura 10 apresenta os *clock genes* no tecido adiposo dos grupos C e R. Em camundongos C o gene *Bmal1* exibiu maior conteúdo de mRNA nos ZTs 2 e 20 e os menores

nos ZTs 8 e 14 ($P < 0,001$; Fig. 10A). Camundongos R exibiram o mesmo perfil de oscilação para o gene *Bmal1* quando comparado ao grupo C ($P < 0,001$; Fig. 10A). Ademais, em R, esse gene mostrou-se aumentado no ZT 20 ($P < 0,05$).

O gene *Clock* não apresentou oscilação, dentro do período de 24 horas, no grupo controle (Fig 10B). Em camundongos R houve oscilação para esse gene sendo a menor expressão no ZT 14 ($P < 0,05$ Fig. 10B).

No tecido adiposo de camundongos C, o gene *Rev-erba* exibiu padrão oscilatório com aumento de expressão no ZT 8 seguido de redução nos ZT 14 e ZT 20. ($P < 0,001$; Fig. 10C). Camundongos R apresentaram um perfil de oscilação ao longo de 24h semelhante ao grupo controle ($P < 0,05$; Fig. 10C). Ademais o grupo R exibiu menor expressão desse gene no ZT 20 em relação ao ZT 2 ($P < 0,001$).

O gene *Per1*, em camundongos C exibiu variação diária, atingindo maior expressão no ZT 14 ($P < 0,05$; Fig. 10D). Em camundongos R também houve oscilação para o gene *Per1*, no entanto esse grupo exibiu um adiantamento na expressão desse gene, uma vez que essa ocorreu no ZT 8 seguido de redução nos ZTs 14 e 20 ($P < 0,01$; Fig. 10D).

A figura 10E mostra a expressão do gene *Per2* que em camundongos C apresentou variação diária com aumento no ZT 14 ($P < 0,001$). O grupo R também apresentou oscilação durante as 24 horas para o gene *Per2*, entretanto sua expressão foi elevada no ZT 8 e 14 ($P < 0,05$).

No tecido adiposo o gene *Cry1* teve maior expressão no ZT 20 sem influência do tratamento dietético ($P < 0,05$; Fig. 10F). A expressão de *Cry2* não apresentou variação periódica e não foi influenciada pela restrição proteica (Fig. 10G).

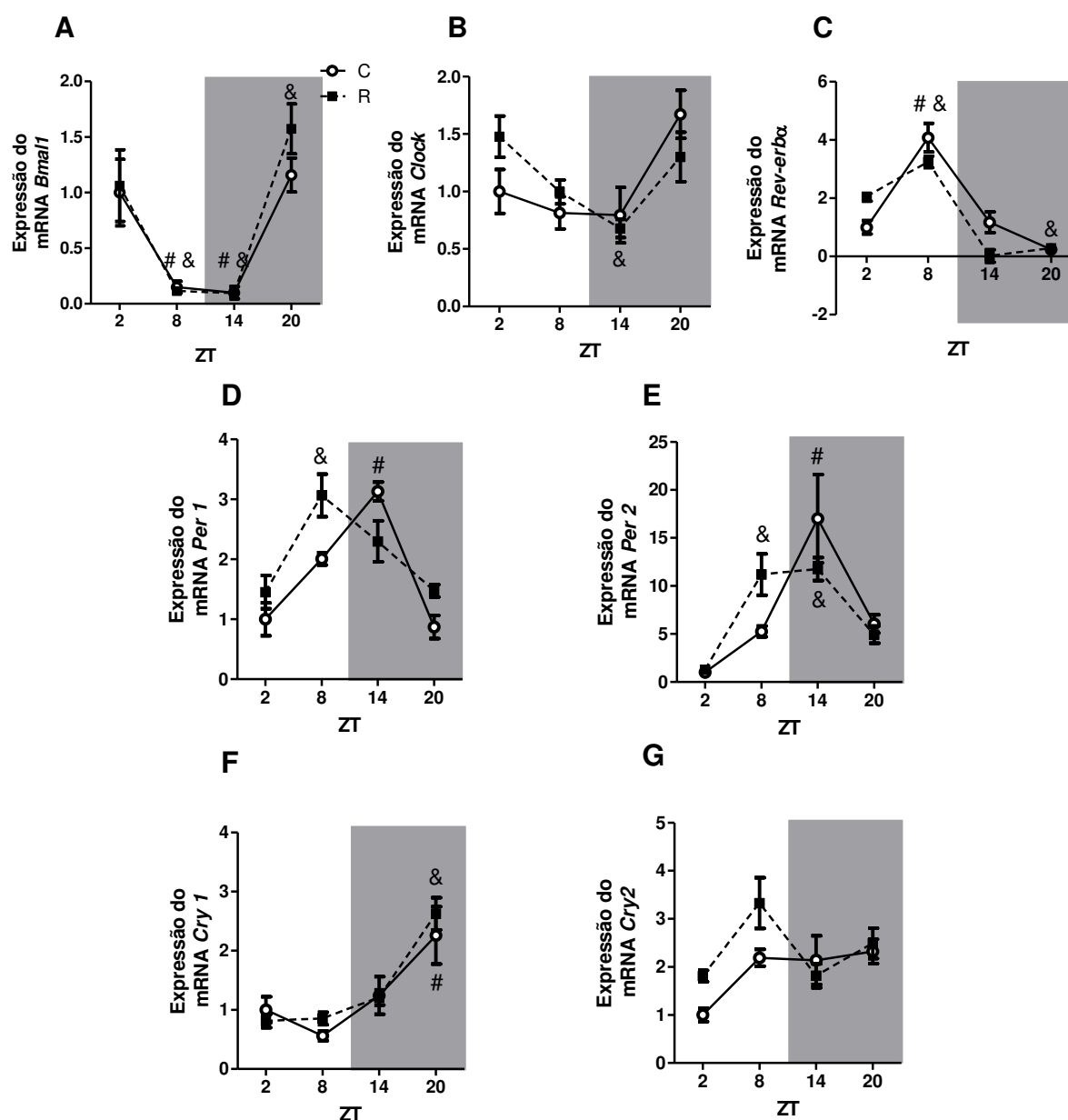


Figura 10: Expressão gênica de *Bmal1* (A), *Clock* (B), *Rev-erba* (C) *Per1* (D), *Per2* (E), *Cry1* (F) e *Cry2* (G) no Tecido adiposo retroperitoneal de camundongos controle e desnutridos. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=4-5) * $P < 0,05$ controle *vs* desnutrido. # $P < 0,05$ dentro do ZT do grupo controle e & $P < 0,05$ entre os ZT do grupo restrito. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.

5.4.5 Ilhotas pancreáticas

A figura 11 mostra a expressão dos *clock genes* em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C e R. No grupo C observou-se maior expressão de *Bmal1* no ZT 2 e ZT 20 e menores no ZT 8 e ZT 14 ($P<0,05$; Fig. 11A). O grupo restrito apresentou padrão oscilatório semelhante ao exibido pelo controle. No entanto, houve redução na expressão de *Bmal1* no ZT 20 em camundongos R comparado a C ($P<0,05$).

O gene *Rev-erba* nos camundongos C apresentou variação nos níveis de mRNA ao longo de 24 horas, com maior expressão no ZT 8 e redução acentuada no ZT 14 e 20 ($P<0,05$; Fig.11C). Camundongos R também apresentaram essa oscilação na expressão de *Rev-erba*, no entanto o aumento dos níveis de mRNA no ZT 8 foram significativamente reduzidos ($P<0,05$).

O gene *Per1* apresentou oscilação diária em ilhotas, de camundongos C, com maiores níveis no ZT 8 ($P<0,05$). Em ilhotas isoladas do grupo R não houve oscilação significativa para esse gene. O gene *Per2* exibiu um padrão oscilatório em ilhotas C, com aumento da expressão no ZT 14 ($P<0,05$; Fig.11E). Ilhotas de camundongos desnutridos exibiram padrão oscilatório semelhante a C sem diferenças induzida pelo tratamento dietético nos níveis de mRNA para esse gene.

Em ilhotas pancreáticas, o mRNA dos genes *Clock*, *Cry1* e *Cry2* não variou significativamente ao longo de 24 h nem foi influenciado pela restrição proteica (Figs. 11B, F e G).

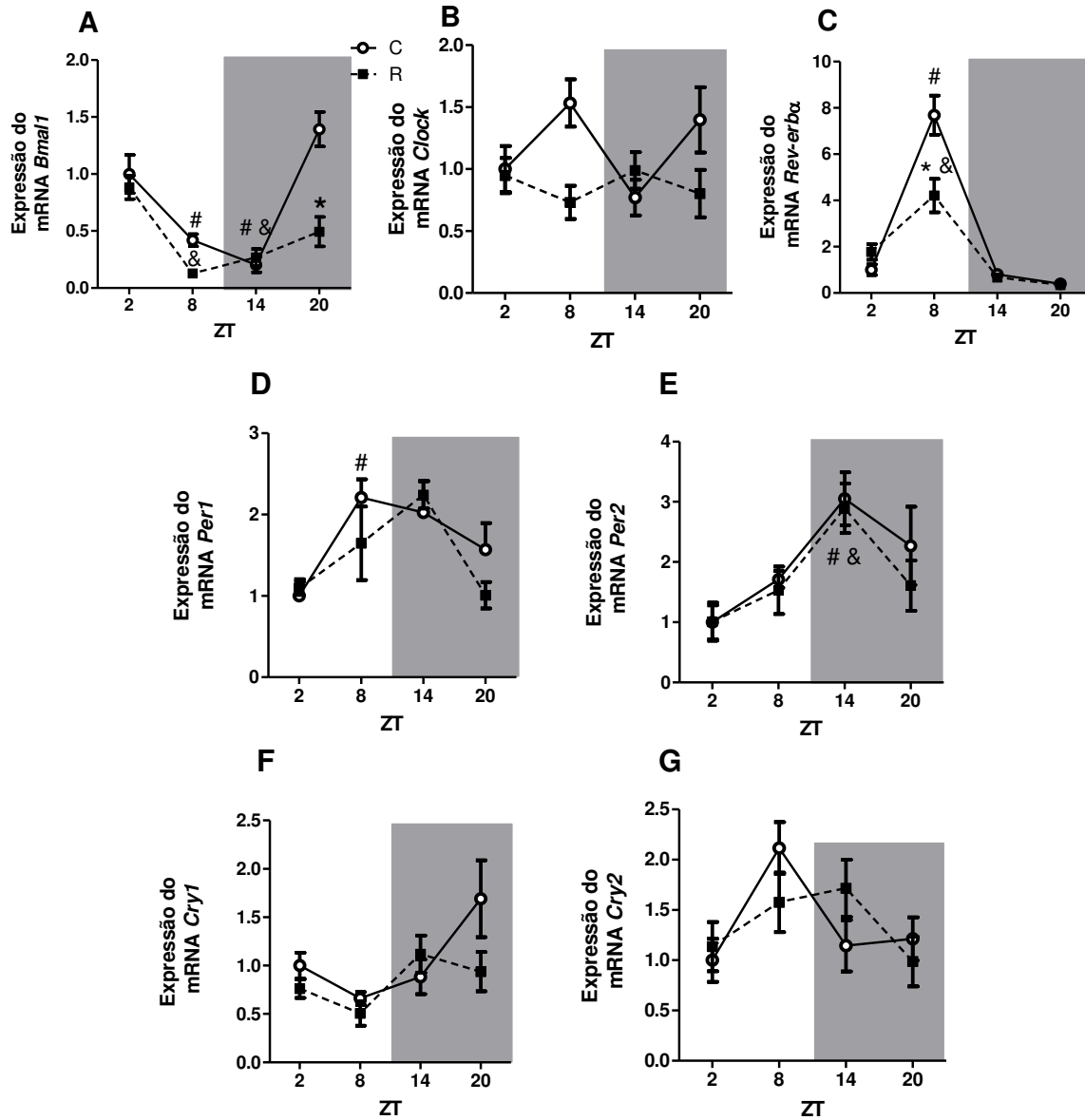


Figura 11: Expressão gênica de *Bmal1* (A), *Clock* (B), *Rev-erba* (C) *Per1* (D), *Per2* (E), *Cry1* (F) e *Cry2* (G) em ilhotas pancreáticas de camundongos C e R. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2, (n=5-6) * $P < 0,05$ C vs R; # $P < 0,05$ entre os ZTs do grupo C; & $P < 0,05$ entre os ZT do grupo R. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.

5.5 Secreção Estática de Insulina

Na série anterior de experimentos observamos que os genes *Per 1*, *Per 2*, *Bmal1* e *Rev-erba* apresentam oscilações diárias e, ainda, *Bmal1* e *Rev-erba* tiveram seu perfil de expressão significativamente alterado pela restrição proteica (Fig. 11). Tendo em consideração a premissa de que alterações nos *clock genes* podem impactar na fisiologia do pâncreas endócrino (Marcheva, et al., 2010; Lee, et al., 2013), a próxima série de experimentos teve como objetivo determinar a secreção de insulina em ilhotas isoladas estimuladas com glicose e também com o agonista colinérgico carbacol nos diferentes ZTs (2, 8, 14 e 20).

5.5.1 Estímulo glicose

A Figura 12 mostra a secreção estática de insulina em ilhotas isoladas de camundongos C e R eutanasiados nos diferentes ZTs (2, 8, 14 e 20) e expostas as seguintes concentrações de glicose: (A) 5,6 mM, (B) 16,7 mM (C) 22,2 mM, (D) 27,7mM e (E) 33,3mM. Em 5,6 mM não houve oscilação diária significativa na secreção. No entanto, camundongos R apresentaram menor secreção desse hormônio em relação a C no ZT 2 ($P<0,05$). Em camundongos C, a secreção de insulina frente a concentrações estimulatórias de glicose (16,7 e 22,2 mM; Fig. 12 B e C, respectivamente) apresentou aumento nos ZTs 2 e 14 e redução significativa no ZT 8 ($P<0,01$). Somente na concentração de 22,2mM de glicose houve redução na liberação de insulina no ZT 20. ($P<0,05$). Em camundongos R o maior valor de secreção foi obtido no ZT 20 ($P<0,05$), porém o perfil oscilatório com intervalos de 12 horas entre os picos de secreção não foi observado nesse grupo. Nos ZTs 2 e 20, a secreção de R foi significativamente inferior a C ($P<0,01$ e 0,001, respectivamente). Ademais na presença de 27,7mM e 33,3mM, o perfil oscilatório de secreção de insulina, em camundongos C não foi observado. Camundongos R também não apresentaram padrão oscilatório diário na liberação de insulina com 27,7mM e 33,3mM de glicose, sendo encontrado diferença significativa de menor secreção em relação a C no ZT 8 ($P<0,05$; Fig 12D e E). O conteúdo total de insulina foi semelhante nos diferentes ZTs para ambos os grupos. Entretanto o conteúdo desse hormônio foi reduzido em ilhotas pancreáticas do grupo restrito nos ZTs 8 e 20 (Fig. 12F).

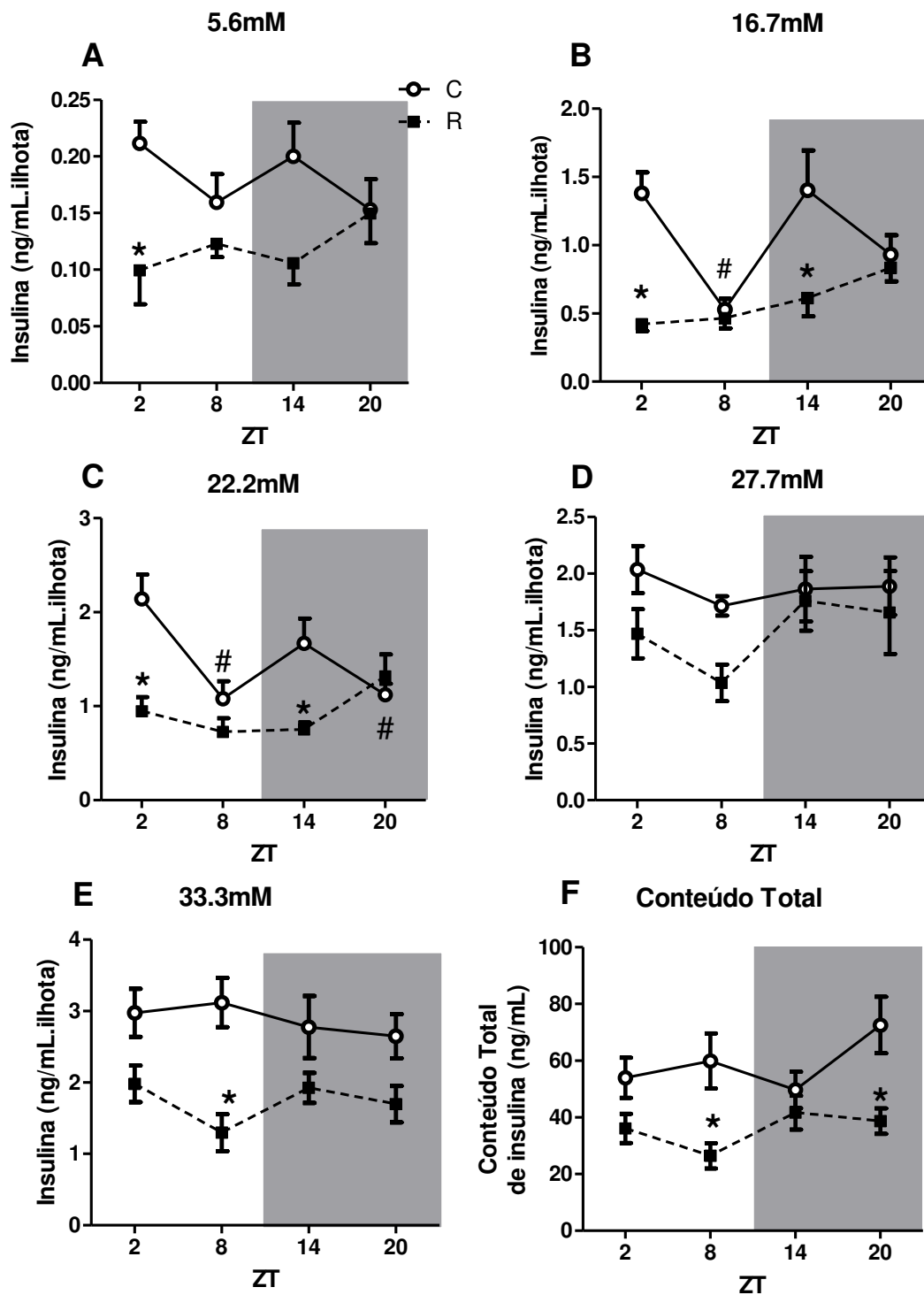


Figura 12: Secreção de insulina em ilhotas isoladas de camundongos C e R nos ZTs 2, 8, 14 e 20 incubadas com (A) 5,6mM, (B) 16,7mM, (C) 22,2mM, (D) 27,7mM e (E) 33,3mM de glicose e (F) conteúdo total de insulina. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam média ± EPM. (n=16) * P<0,05

entre C e R, [#] P<0,05 entre os diferentes ZTs do grupo C. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.

5.5.2 Estímulo glicose associado ao agonista e antagonista de *Rev-erba*

A figura 13 representa a secreção de insulina na presença do agonista e do antagonista de *Rev-erba*. Observou-se em ilhotas isoladas de camundongos C aumento da liberação de insulina na presença de elevada concentração de glicose em associação com o agonista de *Rev-erba* (Fig. 13A). No entanto, ilhotas pancreáticas do grupo R, não apresentaram essa modulação na secreção de insulina quando estimuladas por esse agonista.

Em resposta a associação de 16,7 mM de glicose e do antagonista de *Rev-erba*, ilhotas do grupo C apresentaram redução no processo secretório de insulina (Fig. 13B). Contudo, a resposta da liberação desse hormônio, frente à condição de elevada concentração de glicose e a presença do antagonista de *Rev-erba*, não foi alterada em ilhotas do grupo restrito.

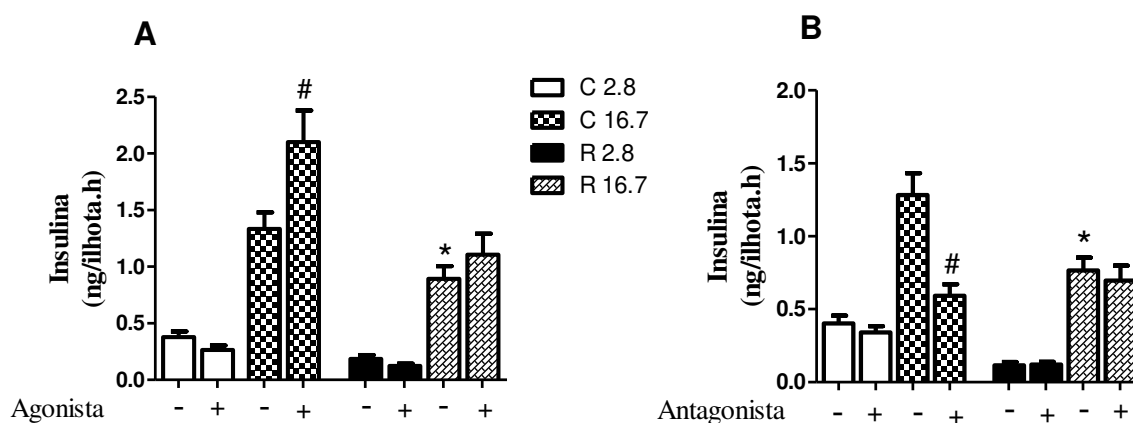


Figura 13: Secreção de insulina na presença de (A) 10μM do agonista de *Rev-erba* e (B) 10μM do antagonista de *Rev-erba*. Dados representam média ±EMP (n=16-24). [#] P<0,05 entre C16,7 e C16,7 + (A) Agonista ou (B) Antagonista. ^{*}P<0,05 entre C 16,7 e R 16,7. Teste t de Student.

5.5.3 Estímulo glicose associado com Carbacol

A figura 14 apresenta a secreção de insulina na presença de glicose e do potencializador Cch. Em camundongos C e R, a variação diária na secreção de insulina na presença de 8.3mM de glicose não é significativa, porém a secreção entre os grupos é diferente nos ZTs 2 e 14 (P<0,05). Observou-se que o Cch em associação com 8,3 mM de glicose

efetivamente potencializou a secreção de insulina. Na presença de Cch as ilhotas C exibiram padrão oscilatório diário semelhante ao observado em 16,7 e 22,2 mM de glicose (Fig. 14, 12B e C, respectivamente). Entretanto, em ilhotas R, o Cch potencializou a secreção, porém sem oscilações ao longo de 24 horas. Ainda, ilhotas R secretaram menos insulina em relação a C no ZT 2 ($P<0,05$).

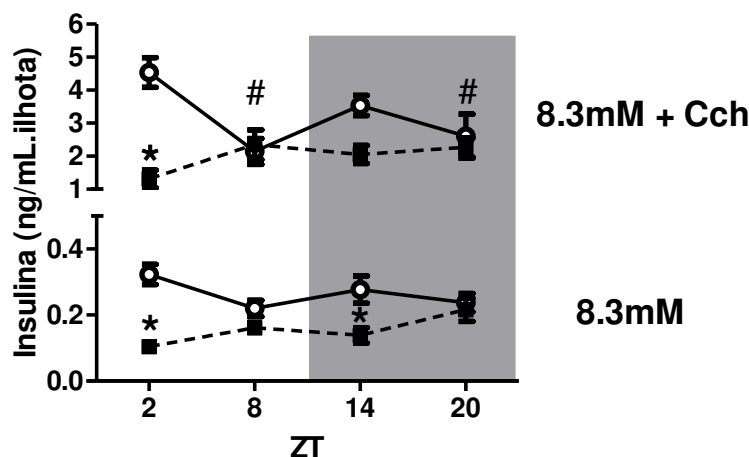


Figura 14: Secreção de insulina em ilhotas isoladas de camundongos C e R nos ZTs 2, 8, 14 e 20 incubadas com 8.3mM de glicose associadas ou não com 100 μ M de Cch. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam média $\pm$ EPM. (n=16) * $P<0,05$ entre C e R, # $P<0,05$ entre os diferentes ZTs do grupo C. ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline.

5.6 Expressão gênica em ilhotas pancreáticas

5.6.1 Genes funcionais no processo secretório de insulina

Em seguida avaliamos a expressão de genes envolvidos em diversos aspectos funcionais das células β como a extrusão de grânulos – *Sinaptotagmina* e *Syntaxina* (Figs. 15A e B) – síntese hormonal – *Insulina* (Fig. 15C) - e potencialização da secreção de insulina - *Receptor Muscarínico de Acetilcolina* (Ach-M3R) (Fig. 15D). Em camundongos C observou-se que houve influência do fator horário na expressão dos genes *Sinaptotagmina*, *Syntaxina*, *Insulina* e Ach-M3R quando realizado ANOVA para esses genes ($P<0,05$). No entanto o pós-teste não identificou diferença entre os ZTs. No grupo R a mesma análise estatística não

revelou influência significativa do fator horário na expressão dos genes *Sinaptotagmina*, *Sintaxina*, *Insulina* e *Ach-M3R*. Ademais, o grupo R apresentou redução na expressão de *Sinaptotagmina* e *Ach-M3R* nos ZTs 2 e 8, de *Sintaxina* no ZT 8 e de *Insulina* no ZT 20 ($P < 0,05$).

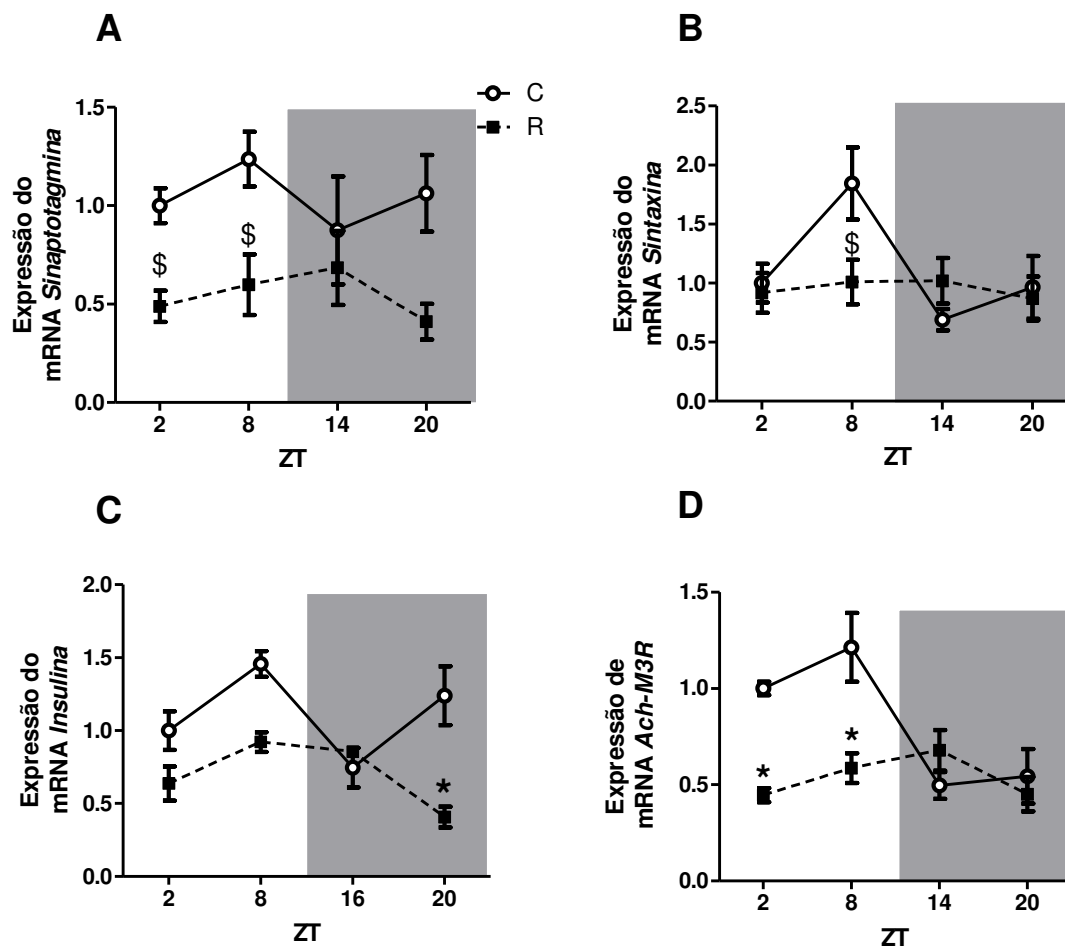


Figura 15: Expressão gênica de (A) *Sinaptotagmina*, (B) *Sintaxina* e (C) *Insulina* e (D) *Receptor Muscarínico de Acetilcolina (Ach-M3R)* em ilhotas pancreáticas de camundongos C e R. Fundo claro e sombreado representam, respectivamente, período claro e escuro. Dados representam Média $\pm$ EPM de valores expressos em vezes de aumento em relação a C no ZT 2. (n=5-6) * $P < 0,05$ C vs R; ANOVA duas vias seguida de pós-teste Spjotvoll Stoline. \$ $P < 0,05$ entre C vs R; Test *t* de Student.

6 DISCUSSÃO

Esse estudo teve por objetivo investigar o perfil da liberação de insulina ao longo de 24 horas, e a participação dos *clock genes* no processo secretório desse hormônio e na regulação da homeostase glicêmica em camundongos submetidos a dieta hipoproteica. Nossos dados mostram que camundongos desnutridos possuem alterações na expressão dos genes *Rev-erba*, *Per1*, *Per2*, nos tecidos periféricos, o que pode estar associado com as mudanças no controle da homeostase glicêmica exibidas por esse grupo. Além disso, camundongos R também exibiram perda da oscilação diária da secreção de insulina, fato que pode estar relacionado com as alterações encontradas na expressão do gene *Rev-erba*, ao longo de 24 horas.

Em diferentes modelos experimentais já empregados para o estudo da desnutrição, observam-se características comuns como o comprometimento do crescimento corpóreo, hipoproteinemia, hipoinsulinemia além de alterações na homeostase glicêmica (Soriano et al. 2010). Em nosso estudo verificamos que camundongos submetidos à dieta hipoproteica, a partir do desmame, apresentaram redução do peso corpóreo e na concentração plasmática de proteínas totais, albumina e insulina, bem como maior tolerância a glicose e sensibilidade periférica a esse hormônio e capacidade de coordenar o fluxo metabólico, corroborando com achados prévios de nosso e outros grupos de pesquisa (Okitolonda et al. 1988; Huber et al. 2009; Batista et al. 2013).

Evidências da literatura mostram que a restrição proteica durante o período intrauterino leva a hiperfagia e alterações circadianas na expressão de genes hipotalâmicos que codificam neuropeptídeos responsáveis pelo controle da fome como o anorexigênico *Pomc*, e os orexigênicos *Npy* e *AgRP* (*Agouti - related peptide*) (Orozco-Solís et al. 2011). Nossos dados mostram que camundongos desnutridos precocemente apresentaram aumento do consumo alimentar o qual foi acompanhado por perda da oscilação e redução na expressão do gene anorexigênico *Pomc* e aumento dos níveis de mRNA do gene orexigênico *Npy* no início do período noturno. Dessa forma, diferentes modelos de desnutrição levam a hiperfagia decorrente da perda da regulação hipotalâmica dos neuropeptídios podendo constituir um fator de risco para o desenvolvimento de obesidade e outras co-morbididades em indivíduos expostos a deficiência de proteínas.

A análise dos *clock genes* no hipotálamo revelou que o único gene que sofreu influência da restrição proteica com perda da oscilação foi o *Rev-erba*. O efeito da desnutrição

sobre a expressão desse gene do relógio pode estar relacionado com a mudança das oscilações apresentadas pelos genes reguladores da ingestão alimentar. Contudo, é importante ressaltar que a análise realizada para os *clock genes* no hipotálamo, foi sem a separação dos núcleos que o constituem. Assim, não é possível concluir que as oscilações dos genes do relógio tanto no grupo controle como no desnutrido, bem como o efeito que a restrição proteica ocasionou na variação diária da expressão de *Rev-erba* seja de um núcleo específico do hipotálamo.

Em relação a atividade locomotora, essa foi similar para ambos os grupos que apresentaram o mesmo padrão bifásico caracterizado por menor atividade no período diurno e maior atividade durante o período noturno. Cho et al, (2012) analisaram a função dos genes *Rev-erba* e *Rev-erb β* no controle da atividade locomotora em camundongos *knockout* para ambos os genes e para as isoformas α e β separadamente. Os autores verificaram perda cíclica da atividade locomotora somente em camundongos *knockout* para ambos os genes *Rev-erb*, indicando que a perda da expressão de apenas uma isoforma não é capaz de levar a mudanças desse parâmetro comportamental. Dessa forma, apenas a expressão de *Rev-erba* alterada não é suficiente para promover mudanças na atividade locomotora de camundongos desnutridos.

A partir dos resultados encontrados observamos que camundongos submetidos à dieta hipoproteica possuem aumento do consumo alimentar, e atividade locomotora e gasto energético semelhantes ao grupo C. Norman et al. (2012) verificaram, em ratos Wistar submetidos a desnutrição intrauterina, aumento dos depósitos de glicogênio no músculo gastrocnêmio. Ainda, Batista et al. (2013) observaram, em camundongos desnutridos após o desmame, aumento de glicogênio hepático. Nesse sentido, o aumento do consumo alimentar no grupo R, pode estar relacionado com a maior capacidade de estoque de glicogênio no músculo e fígado desses camundongos. Essa pressuposição vai ao encontro da hipótese do fenótipo econômico, uma vez que o organismo de camundongos desnutridos está programado para armazenar energia para que em momentos de escassez essa possa ser utilizada para suprir as necessidades de órgãos vitais como o cérebro (Hales & Barker, 1992).

O relógio biológico atua na regulação da oscilação diária da concentração plasmática de glicose, triglicerídeos e colesterol. La Fleur et al. (1999) observaram em ratos Wistar, variação da glicemia ao longo do período circadiano, com aumento dos níveis de glicose durante o período diurno culminado com um pico no início da fase escura. Em nosso estudo observamos que camundongos C apresentaram perfil semelhante na oscilação diária da glicemia. Essa variação na concentração plasmática de glicose pode estar relacionada a

oscilação rítmica na ingestão alimentar, tolerância a glicose e produção hepática desse substrato, sendo que esses três processos podem estar sendo modulados pelo SCN, variação dos *clock genes* nos tecidos periféricos e ação dos hormônios, insulina, glucagon e corticosterona (La Fleur et al. 2003; Shi et al. 2013). Contudo em camundongos R observamos que a variação diária da glicemia foi perdida, além da concentração plasmática de glicose apresentar redução durante o período diurno e noturno. As alterações na oscilação da glicemia podem estar relacionadas a maior tolerância a glicose e sensibilidade periférica a insulina, apresentadas por camundongos desnutrido, sendo que essas mudanças no controle glicêmico podem ser decorrentes das alterações na expressão dos *clock genes* nos tecidos periféricos (Sutton et al. 2010).

Dentre os genes do relógio avaliados no fígado de camundongos desnutridos, apenas o *Rev-erba* teve sua expressão influenciada pela restrição proteica. Vieira et al. (2008) observaram redução na expressão de *Rev-erba* no músculo de camundongos C57BL/6 após a administração do agonista de AMPK - AICAR (*5-amino-4-imidazole-carboxamide riboside*). Batista, et al. (2013) verificaram aumento da fosforilação de AMPK no fígado de camundongos desnutridos. Dessa forma sugere-se que o aumento de p-AMPK possa estar envolvido na desregulação da expressão de *Rev-erba* no fígado de camundongos desnutridos.

Já está descrito na literatura que o gene *Rev-erba* desempenha importante papel na regulação de processos bioquímicos como no metabolismo de lipídeos e carboidratos, modulando a expressão *Srebp-1c* (*sterol regulatory element binding protein*), *Fas* / *Pepck* (*Fosfoenolpiruvato carboxi quinase*), *Glucose-6 fosfatase*, respectivamente. (Yin et al. 2007; Wang et al. 2008). Sutton et al. (2010) verificaram no fígado de camundongos desnutridos durante o período intrauterino alteração na expressão circadiana do gene *Rev-erba*, bem como de genes envolvidos no metabolismo da glicose, *Pepck* e ácidos graxos como a *Fas*. Dessa forma, as mudanças encontradas no controle da homeostase glicêmica, no grupo R, podem estar relacionadas com as alterações encontradas na expressão do gene *Rev-erba*, ao longo de 24 horas.

Ao analisar a sincronização das alças de feedback auto regulatórias no fígado de camundongos desnutridos observamos que essa foi perdida, pois não houve oscilação de *Bmal1* também não ocorreu o aumento dos níveis de mRNA de *Rev-erba* um dos genes chaves que compõem essa alça. Preitner et al. (2002), mostraram que a expressão de *Rev-erba* é um dos reguladores mais importantes da expressão de *Bmal1*. Sutton et al. (2010) sugerem

que a perda da oscilação dos genes *Bmal1* e *Per2* no fígado de animais submetidos a desnutrição intrauterina, pode ser dirigido pela perda da ritmicidade de *Rev-erba*. Assim a dessincronização das alças de feedback auto regulatórias, as quais são responsáveis por gerar o ritmo circadiano, podem ser outro fator relacionado com as mudanças no controle da homeostasia da glicose observadas em camundongos desnutridos.

Em outros tecidos periféricos como músculo e tecido adiposo, somente os *clock genes* *Per2* e *Per1 e 2*, respectivamente, tiveram o seu perfil de expressão alterado pela restrição proteica. Dallman et al. (2006) mostraram que camundongos *knockout* para o gene *Per2* possuem aumento da tolerância a glicose, além de alteração no metabolismo de lipídeos, com redução dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e triglicerídeos. Portanto as alterações apresentadas nas oscilações do gene *Per1 e 2* e *Per2* no tecido adiposo e músculo de camundongos desnutridos, respectivamente, podem estar favorecendo uma distribuição diferencial de substratos para os tecidos periféricos e isso pode estar relacionado com as mudanças na tolerância a glicose e sensibilidade a insulina encontrados nesse grupo.

Outro fator importante para a regulação da oscilação diária da glicemia é a variação circadiana da secreção do hormônio hipoglicemiante insulina. Dados da literatura mostram que ilhotas de ratos perfundidas continuamente com 8,3 mM de glicose exibem um padrão de oscilação circadiano, onde se observa o ponto máximo de secreção pela manhã (Peschke et al. 1998). Em nosso estudo a avaliação da oscilação diária da secreção de insulina em ilhotas incubadas com concentrações estimulatórias de glicose revelou dois picos de secreção com intervalo de 12h sendo um no período diurno e outro no período noturno (Fig. 13). No entanto, essa variação foi perdida no grupo controle quando ilhotas isoladas foram incubadas com elevadas concentrações de glicose. Essa condição experimental poderia estar mimetizando o que ocorre em pacientes pré-diabéticos e com DM2, os quais possuem hiperglicemia de jejum e pós-prandial acompanhado de desequilíbrio do ritmo circadiano. Assim, nossos dados mostram pela primeira vez o importante efeito da elevada concentração de glicose na perda da ritmicidade circadiana na secreção de insulina. A ausência dessas oscilações ao longo de 24 h, associado a outros fatores de susceptibilidade, como hábitos alimentares, poderiam favorecer o desenvolvimento do DM2 (Scheer et al. 2009; Bass & Takahashi 2010; Antunes et al. 2010).

Já está descrito na literatura que ilhotas isoladas de ratos e camundongos quando submetidos a desnutrição após o desmame apresentam redução na secreção de insulina estimulado por glicose (Reis, et al 1997). Resultados encontrados em nosso trabalho

demonstram pela primeira vez que o padrão de secreção de insulina, ao longo de 24 horas, está perdido em camundongos desnutridos. Além disso, a restrição proteica resultou em alteração da expressão dos genes do relógio *Rev-erba* e *Bmal1*, em ilhotas isoladas do grupo R. Marchevas et al. (2010) verificaram em camundongos com *knockout* global para *Bmal1*, perda na oscilação diária e redução da secreção de insulina. Vieira et al., (2012) mostraram a participação do gene *Rev-erba* na regulação do processo de secreção de insulina e sugerem que o mecanismo pelo qual esse gene está atuando é através da regulação da expressão dos genes que compõem a maquinaria exocitótica, incluindo a proteína de 25 kDa associada ao sinaptossoma (*SNAP-25*), *Syntaxin1a* e *Vamp3* (proteína de membrana associada a vesícula). Em nosso estudo a perda na variação da secreção de insulina, em camundongos desnutridos, está relacionada com as alterações na expressão de *Rev-erba*, uma vez que na presença do agonista e antagonista, para esse gene, não houve nenhuma mudança na liberação desse hormônio. Além disso, nossos dados mostram que camundongos desnutridos possuem redução na expressão de *Syntaxin* e *Sinaptotagmina*, fato que pode ser decorrente das mudanças na expressão de *Rev-erba*, uma vez que esse gene promove a modulação da expressão das proteínas que compõem a maquinaria exocitótica.

Já está descrito na literatura o papel da acetilcolina na regulação da secreção de insulina através da liberação desse neurotransmissor pelos nervos que compõem o sistema nervoso parassimpático. Dados encontrados em nosso trabalho mostram pela primeira vez, que a variação diária da secreção de insulina na presença do agonista colinérgico Cch é perdida, em camundongos R. Ainda, a expressão do *M3R-Ach* nesses roedores está reduzida, além dos níveis de mRNA desse gene não estarem sujeitos a oscilação diária. Amaral et al. (2010) observaram, em camundongos submetidos a restrição proteica, redução na secreção de insulina na presença de glicose associado ao Cch e redução na expressão do *M3R-Ach* e *PKC*. Ademais, Leon-Quinto et al. (1998) observaram baixa atividade do nervo vago, em camundongos desnutridos, após a aplicação de Cch. Concomitantemente pesquisas vêm demonstrando que a transcrição/ liberação da acetilcolina está sujeita ao controle do ritmo circadiano (Rusak & Bina 1990; Willemijntje et al. 2010). Assim, a redução da secreção de insulina, bem como a perda oscilatória da liberação desse hormônio na presença de Cch, em camundongos desnutridos, pode estar relacionada com disfunção na transcrição/secreção de acetilcolina pela inervação parassimpática presente no pâncreas endócrino, a qual refletiria as alterações na secreção de insulina na presença do agonista colinérgico observado nesse estudo.

Por fim, as mudanças adaptativas e as alterações na expressão dos *clock genes* com destaque para o *Rev-erba*, em ilhotas pancreáticas, geradas pela restrição proteica, contribuem para as alterações na homeostase glicêmica e secreção de insulina, podendo a longo prazo estar associado com o desenvolvimento do DM2, observado em humanos e modelos de experimentação animal submetidos a dieta com baixo teor proteico (Hales & Barker 1992; Petry et al.1997; Green et al. 2008).

7 CONCLUSÃO

A partir dos dados encontrados concluímos que as alterações na expressão dos genes do ritmo circadiano nos tecidos periféricos e ilhotas pancreáticas de camundongos desnutridos podem estar relacionado com as mudanças na homeostase glicêmica/energéticas e no processo secretório de insulina, apresentadas por esse modelo experimental. Ainda alterações a longo prazo na integridade do ritmo circadiano induzidas pela desnutrição poderiam estar relacionados com o desenvolvimento de doenças como obesidade e DM2 e, portanto, poderia constituir um novo mecanismo envolvido na programação metabólica proposta na hipótese do fenótipo econômico.

8 REFERENCIAS

- Amaral, A.G. et al., (2010). Leucine supplementation augments insulin secretion in pancreatic islets of malnourished mice. *Pancreas*, 39(6), pp,847–55.
- Anea, C.B. et al., (2009). Vascular disease in mice with a dysfunctional circadian clock. *Circulation*, 119(11), pp.1510–1517.
- Antunes, L.C. et al., (2010). Obesity and shift work: chronobiological aspects. *Nutrition Research Reviews*, 23(1), pp.155–168.
- Araujo, E.P. et al., (2004). Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *The Journal of endocrinology*, 181(1), pp,25–38.
- Bass, J. & Takahashi, J.S., (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science New York NY*, 330(6009), pp.1349–54.
- Batista, T.M. et al., (2012). Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced insulin secretion in islets from low-protein diet rats : involvement of Ach-M3R , Synt 1 and SNAP-25 proteins. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(3), pp.1–7.
- Batista, T.M. et al., (2013). Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high-fat diet. *Molecular nutrition & food research*, 57 pp,423-434.
- Boujendar, S. et al., (2002). Taurine supplementation to a low protein diet during foetal and early postnatal life restores a normal proliferation and apoptosis of rat pancreatic islets. *Diabetologia*, 45(6), pp,856–866.
- Coomans, C.P. et al., (2013). Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(4), pp.1721–32.
- Cnop, M. et al., (2005). Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*, 54 Suppl 2(6), pp,S97–S107.
- Crumbley, C. & Burris, T.P., (2011). Direct Regulation of CLOCK Expression by REV-ERB I. Hansen, ed. *PLoS ONE*, 6(3), p.6.
- Dallman, M.F. et al., 1993. Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14(4), pp.303–347.
- Delattre, E., Cipolla-Neto, J. & Boscherio, A.C. (1999). Diurnal variations in insulin secretion and K⁺ permeability in isolated rat islets. *Clinical and experimental pharmacology physiology*, 26(7), pp,505–510.
- Delezie, J. & Challet, E., (2011). Interactions between metabolism and circadian clocks: reciprocal disturbances. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1243(1), pp.30–46.
- Fagundes, A.T.S. et al., (2007). Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *The British journal of nutrition*, 98(5), pp.922–928.
- Feillet, C.A. et al., (2008). Forebrain oscillators ticking with different clock hands. *Molecular And Cellular Neurosciences*, 37(2), pp.209–221.
- Ferreira, F. et al., (2004). Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA α expression, *The Journal of nutrition*, 134(1), pp,63–67.

- Filiputti, E. et al., (2010). Augmentation of insulin secretion by leucine supplementation in malnourished rats: possible involvement of the phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/mammalian target protein of rapamycin pathway. *Metabolism Clinical And Experimental*, 59(5), pp,635–644.
- Giozzet, V. A. G. et al., (2008). Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment in rats. *Metabolism Clinical And Experimental*, 57(5), pp,617–624.
- Green, C. Bass, J., Takahashi, S. et al., (2008). "The meter of metabolism," *Cell* 134(5): 728-42.
- Guillaumond, F. et al., (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of Biological Rhythms*, 20(5), pp.391–403.
- Hales, C.N. & Barker, D.J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35(1), pp,595–601.
- Hales, C.N. et al., 1996. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochemical Society transactions*, 24(2), pp.341–50.
- Hiriart, M. & Aguilar-Bryan, L. (2008). Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 295(6), pp,E1298–E1306.
- Hsieh, M. C. et al., (2010). Abnormal expressions of circadian-clock and circadian clock-controlled genes in the livers and kidneys of long-term, high-fat-diet-treated mice. *International journal of obesity* 2005, 34(2), pp,227–239.
- Huang, W. et al., (2011). Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *The journal of clinic investigation*, 121(6), pp,2133–2141.
- Ko, C.H. & Takahashi, J.S., (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15 Spec No(2), pp.R271–R277.
- La Fleur, S.E. et al., 1999. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *Journal of Neuroendocrinology*, 11(8), pp.643–652.
- Latorraca, M.Q. et al., (1998). Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *The Journal of nutrition*, 128(10), pp,1643–1649.
- Lee, J. et al., (2013). Bmal1 and β -cell clock are required for adaptation to circadian disruption, and their loss of function leads to oxidative stress-induced β -cell failure in mice. *Molecular and cellular biology*, 33(11), pp.2327–38.
- Leon-Quinto, T., Magnan, C. & Portha, B., (1998). Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology*, 139(8), pp.3382–9 .
- Marcheva, B., Ramsey, K.M., & Bass, J. (2011). Circadian genes and insulin exocytosis. *Cellular logistics*, 1(1), pp,32–36.
- Marcheva, B. et al., (2010). Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*, 466(7306), pp,627–631.
- McCarthy, J.J. et al., (2007). Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle. *Physiological Genomics*, 31(1), pp,86–95.
- Mühlbauer, E. et al., (2004). Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Letters*, 564(1-2), pp.91–96.
- Nakaki, T. et al., (1981). Postsynaptic alpha-2 adrenergic receptors in isolated rat islets of Langerhans: inhibition of insulin release and cyclic 3':5'-adenosine monophosphate

- accumulation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 216(3), pp.607–612.
- Nilsson, T. et al., (1988). Inhibition of glucose-stimulated insulin release by alpha 2-adrenoceptor activation is paralleled by both a repolarization and a reduction in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration. *The Journal of biological chemistry*, 263(4), pp.1855–60.
- Norman, A.M. et al., (2012). Postnatal development of metabolic flexibility and enhanced oxidative capacity after prenatal undernutrition. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 19(6), pp.607–14.
- Orozco-Solís, R. et al., (2011). Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *International journal of obesity*, 35(7), pp.990–1000.
- Ozanne, S.E. et al., (1997). Poor fetal nutrition causes long-term changes in expression of insulin signaling components in adipocytes. *American Journal of Physiology*, 273(1 Pt 1), pp.E46–E51.
- Ozanne, S.E. et al., (2001). Impaired PI 3-kinase activation in adipocytes from early growth-restricted male rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 280(3), pp.E534–E539.
- Peschke, E. & Peschke, D. (1998). Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia*, 41(9), pp.1085–92.
- Petrik, J., Reusens, B. et al., (1999). A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* 140(10): 4861–73.
- Petry, C.J. et al., (1997). Early protein restriction and obesity independently induce hypertension in 1-year-old rats. *Clinical science London England 1979*, 93(2), pp.147–152.
- Petry, C.J. et al., (2001). Diabetes in Old Male Offspring of Rat Dams Fed a Reduced Protein Diet. *International Journal of Experimental Diabetes Research*, 2(2), pp.139–143.
- Polonsky, K.S. et al., (1988). Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 318(19), pp.1231–1239.
- Preitner, N. et al., (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator University of Geneva University of Geneva. *Cell*, 110(2), pp.251–260.
- Rao, R.H. (1988). Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence? *Endocr_Rev* 9(1): 67-87.
- Ravelli, G.P., Stein, Z.A. & Susser, M.W., (1976). Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *The New England Journal of Medicine*, 295(7), pp.349–353.
- Rawashdeh, O. & Maronde, E. (2012). The hormonal Zeitgeber melatonin: role as a circadian modulator in memory processing. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5(March), p.27.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H. & Fahey, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition*, 123(11), pp.1939–1951.

- Reis, M.A. et al., (1997). Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein-deficient rats. *The Journal of nutrition*, 127(3), pp.403–410.
- Remacle, C. et al., (2001). Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *British medical bulletin*, 9 Suppl 2(1), pp.196–209.
- Ribeiro, R.A. et al., (2010). Taurine supplementation: involvement of cholinergic/phospholipase C and protein kinase A pathways in potentiation of insulin secretion and Ca²⁺ handling in mouse pancreatic islets. *The British journal of nutrition*, 104(8), pp.1148–1155.
- Scott, E.M., Carter, A.M. & Grant, P.J., (2008). Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *International journal of obesity* 2005, 32(4), pp.658–662.
- Scheer, F.A.J.L. et al., (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), pp.4453–4458.
- Schmutz, I., Albrecht, U. & Ripperger, J. a, (2012). The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Molecular and cellular endocrinology*, 349(1), pp.38–44.
- Sharp, G.W., (1996). Mechanisms of inhibition of insulin release. *The American journal of physiology*, 271(6 Pt 1), pp.C1781–C1799.
- Shi, S.-Q. et al., (2013). Circadian Disruption Leads to Insulin Resistance and Obesity. *Current biology CB*, pp.1–10.
- Soriano, S. et al., (2010). Reduced insulin secretion in protein malnourished mice is associated with multiple changes in the beta-cell stimulus-secretion coupling. *Endocrinology*, 151(8), pp.3543–3554.
- Straub, S.G. & Sharp, G.W.G. (2002). Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetesmetabolism research and reviews*, 18(6), pp.451–463.
- Sukumaran, S. et al., (2010). Circadian variations in gene expression in rat abdominal adipose tissue and relationship to physiology. *Physiological Genomics*, 42A(2), pp.141–152.
- Sutton, G.M., Centanni, A. V. & Butler, A.A. (2010) Protein malnutrition during pregnancy in C57BL/6J mice results in offspring with altered circadian physiology before obesity. *Endocrinology*, 151(4), pp.1570–1580.
- Vieira, E. et al., (2008). Relationship between AMPK and the transcriptional balance of clock-related genes in skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 295(5), pp.E1032–7.
- Vieira, E. et al., (2012). The clock gene Rev-erba regulates pancreatic β -cell function: modulation by leptin and high-fat diet. *Endocrinology*, 153(2), pp.592–601.
- Wang, J. & Lazar, M.A., (2008). Bifunctional role of Rev-erbalph in adipocyte differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 28(7), pp.2213–20.
- Weaver, D.R., (1998). The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *Journal of Biological Rhythms*, 13(2), pp.100–112.
- Welsh, D.K. et al., (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14(4), pp.697–706.
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S. & Kay, S.A., (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual review of physiology*, 72, pp.551–77.
- Yadav, Amita et al., (2013). Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 417, pp.80–4.

- Yin, L. et al., (2007). Rev-erb α , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5857), pp.1786–9.
- Zvonic, S. et al., (2006). Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes*, 55(4), pp.962–970.

9 ANEXOS



CEEAA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEAA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1942-1, sobre "Mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de resistência a insulina em camundongos desnutridos submetidos a obesidade experimental", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro / Thiago Martins Batista, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em 25 de agosto de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1942-1, entitled "Molecular mechanisms involved in the development of insulin resistance in obesity induced malnourished mice", 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 August 25, 2009.

Campinas, 25 de agosto de 2009.

Profa. Dra. Ana-Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEAA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada: A participação dos *clock genes* na modulação da secreção e ação da insulina em camundongos desnutridos.

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição: _____.

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 2938-1, Instituição:

Universidade Estadual de Campinas:

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: (Patricia Cristine Borck)



Orientador: (Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Prof. Dr. EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO
Professor Titular - Matrícula 27509-3
Depto. Biologia Estrutural e Funcional
Instituto de Biologia / UNICAMP

Carimbo e assinatura


Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura