

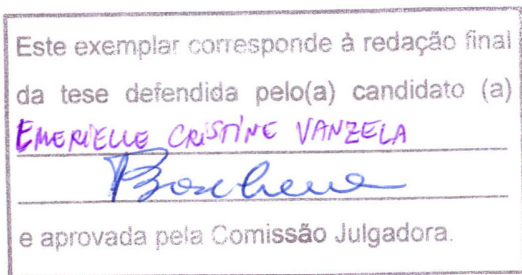
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



EMERIELLE CRISTINE VANZELA

“DIETA DE CAFETERIA INDUZ OBESIDADE, RESISTÊNCIA PERIFÉRICA À INSULINA, E REDUZ A SECREÇÃO DESTE HORMÔNIO POR ILHOTAS DE RATAS: RESTAURAÇÃO DO PROCESSO SECRETÓRIO, MAS NÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA DURANTE A PRENHEZ”



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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

Campinas, 2010

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

V396d

Vanzela, Emerielle Cristine

Dieta de cafeteria induz obesidade, resistência periférica à insulina, e reduz a secreção deste hormônio por ilhotas de ratas: restauração do processo secretório, mas não da sensibilidade à insulina durante a prenhez / Emerielle Cristine Vanzela. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Antonio Carlos Boschero.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dieta de cafeteria. 2. Langerhans, Ilhotas de. 3. Insulina – Secreção. 4. Resistência à insulina. 5. Prenhez. 6. Obesidade. I. Boschero, Antonio Carlos, 1943-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Cafeteria diet induces obesity, peripheral insulin resistance, and reduces insulin secretion in islets isolated from rats: restoration of the secretory process but not of the insulin sensibility during pregnancy.

Palavras-chave em inglês: Palatable diet; Islands of Langerhans; Insulin – Secretion; Insulin resistance; Pregnancy; Obesity.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutorado em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Antonio Carlos Boschero, Angelo Rafael Carpinelli, Mário José Abdalla Saad, Helena Coutinho Franco de Oliveira, Silvana Auxiliadora Bordin Silva.

Data da defesa: 31/03/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 31 de março de 2010

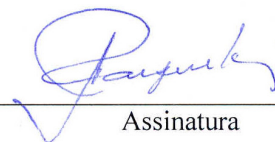
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero (Orientador)



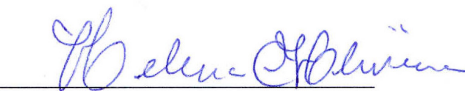
Assinatura

Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli



Assinatura

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira



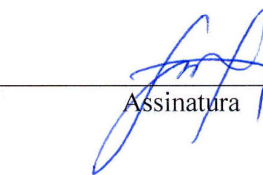
Assinatura

Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad



Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Cláudio César Zoppi



Assinatura

Profa. Dra. Eliana Pereira de Araújo



Assinatura

Profa. Dra. Márcia Queiroz Latorraca



Assinatura

Dedico este trabalho

*À minha família, por sempre
acreditar na minha capacidade e
nas minhas conquistas;*

*Aos meus amigos, e ao Elson, pelo
apoio, carinho e suporte em
todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos, por estar sempre presente, e por acreditar na minha capacidade;

Ao Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro, pelas discussões envolvendo o projeto e pela ajuda com os protocolos experimentais;

Ao Prof. Dr. Lício Augusto Velloso, pela utilização do seu laboratório, e às suas orientadas Andressa Coope e Ana Paula Arruda, pela ajuda com os experimentos, e incluindo a Marciane Milanski, pela amizade;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, em especial ao Léscio Domingos Teixeira, pelo auxílio técnico, e à Marise Mello Carnelossi Brunelli, por facilitar nosso trabalho cuidando do fornecimento de materiais para o laboratório;

Aos colegas de laboratório, em especial, ao Kléber Luiz de Araújo e Souza, pelas discussões a respeito do projeto, ao Filipy Borghi Rodrigues de Souza, pelo auxílio durante os experimentos, e à Maria Lúcia Bonfleur e Rosane Aparecida Ribeiro, pela parceria na bancada, amizade e companherismo;

Aos colegas do Departamento de Fisiologia, pelo convívio, e em especial ao André Schwambach Vieira, por sua disponibilidade e solicitude em compartilhar seus conhecimentos;

Aos amigos da pós-graduação, Helena Raposo, Gabriel Dorighello, Ana Catarina Leite, Cibele Albuquerque, Jane Souza, Camila Oliveira e Letícia Souza, cuja convivência nos aproximou e estendeu nossa amizade, obrigada pelo companherismo fora do laboratório;

À Sandra Lucinei Balbo, por me iniciar na pesquisa, despertando em mim o desejo por exercer esta atividade, e por sua amizade;

Às amigas Andressa Coope, Patrícia Riva, Camila Padilha, Giuliana Mognol, e Daniela Mobioli pelo apoio incondicional e cumplicidade.

Às agências de fomento CNPq e FAPESP.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE ABREVIATURA.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
1. Obesidade e Diabetes Mellitus.....	17
2. Dieta de cafeteria.....	18
3. Mecanismo de secreção de insulina.....	19
4. Cálcio e secreção de insulina.....	21
5. Secreção de insulina durante a prenhez.....	23
6. Mecanismo de ação da insulina em tecidos insulino-sensíveis.....	24
7. Justificativa.....	25
OBJETIVO	26
Objetivos específicos	26
MATERIAIS E MÉTODOS	27
1. Animais e dieta.....	27
2. Registro do consumo alimentar.....	28
3. Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT).....	28
4. Análises bioquímicas.....	28
5. Avaliação da obesidade.....	29
6. Isolamento de ilhotas pancreáticas de ratos.....	29
7. Secreção estática e conteúdo total de insulina.....	30
8. Quantificação do DNA das ilhotas.....	30
9. Oxidação da glicose.....	31
10. Análise da atividade metabólica de ilhotas isoladas.....	31
11. Registro das oscilações do Ca^{2+} citoplasmático.....	31
12. Expressão gênica: reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-real time).....	32
13. Estimulação com insulina exógena, imunoprecipitação e <i>imunoblot</i>	33

14. Análise estatística.....	34
RESULTADOS	35
1. Efeito da alimentação com a dieta de cafeteria sobre o ganho de peso, consumo alimentar e acúmulo de gorduras.....	35
2. Análise dos parâmetros bioquímicos.....	36
3. Tolerância à glicose de ratas alimentadas com a dieta de cafeteria, prenhes ou não.....	39
4. Efeito da alimentação com a dieta de cafeteria sobre a secreção de insulina por ilhotas isoladas de ratas prenhes ou não-prenhes.....	41
4.1. Conteúdo de insulina na ilhota.....	41
4.2. Curva de secreção de insulina dose-resposta à glicose.....	42
4.3. Liberação de insulina em resposta a estímulos metabolizáveis, despolarizantes ou potencializadores.....	45
5. Efeito da alimentação com a dieta de cafeteria sobre o metabolismo da glicose em ilhotas isoladas.....	47
5.1. Oxidação da glicose.....	47
5.2. Atividade metabólica.....	48
6. Análise do manejo do Ca^{2+} citoplasmático livre em ilhotas isoladas.....	49
7. Efeito da dieta de cafeteria sobre a expressão gênica da SERCA2a, do $Ca_v\alpha_{1.2}$ e do $Ca_v\beta_2$ em ilhotas.....	52
8. Efeito da dieta de cafeteria e da prenhez sobre a ação da insulina em fígado e músculo.....	54
DISCUSSÃO.....	60
CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
Apêndice	81
Análise do efeito da dieta de cafeteria em machos.....	81
Anexos	84
1. Artigo publicado referente à tese.....	84
2. Autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	108

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Amplímetros utilizados no PCR-Real Time..... 33

Tabela 2. Peso corporal e dos depósitos de gordura das ratas ao final do período de alimentação com a dieta de cafeteria..... 36

Tabela 3. Concentração de glicose sanguínea, e de insulina, COL, TG, AGL, albumina e proteínas totais plasmáticas, e índice insulina/glicose em ratas prenhes ou não-prenhes alimentadas com dieta padrão ou dieta de cafeteria..... 38

Figura 1. Modelo estrutural do canal de Ca^{2+} voltagem dependente na membrana plasmática. O canal é formado pela subunidade $\alpha 1$ que constitui o poro do canal, e as subunidades auxiliares $\text{CaV}\beta$, $\text{CaV}\gamma$, and $\text{CaV}\alpha 2\delta$. Retirado de Yang & Berggren, 2006..... 22

Figura 2. Esquema do protocolo experimental de tratamento das ratas..... 27

Figura 3. O ganho de peso durante o período de alimentação foi avaliado semanalmente em ratas alimentadas com a dieta padrão (linha tracejada) ou dieta de cafeteria (linha contínua). O peso corporal no início do tratamento foi de 218 ± 3 g e 215 ± 4 g, nas ratas controle e cafeteria, respectivamente (NS). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 – 20 ratas por grupo. Teste “t” de Student. * indica diferença estatística entre os grupos, $P < 0,05$ 35

Figura 4. Glicose sanguínea (A) e insulina plasmática (B) durante o ipGTT em ratas prenhes (símbolos abertos; 16º dia) e não-prenhes (símbolos sólidos) alimentadas com dieta padrão (linhas tracejadas) ou com dieta de cafeteria (linhas contínuas). Os valores são média $\pm$ EPM; $n = 6 - 20$ ratos provenientes de três grupos independentes de tratamento com a dieta de cafeteria. Os símbolos representam diferença estatística entre os grupos, $P < 0,05$; (A) * vs C; # vs CP; (B) * vs todos os grupos..... 40

Figura 5. Área sob a curva (AUC) de glicose durante o ipGTT. As barras representam a média $\pm$ EPM da AUC obtida no teste de cada rata e calculada individualmente. As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. * indica diferença estatística, $P < 0,01$ 41

Figura 6. Conteúdo total de insulina de ilhotas isoladas de ratas alimentadas com a dieta padrão ou com a dieta de cafeteria, prenhes (16º dia) ou não, após rompimento das ilhotas. Os valores são média $\pm$ EPM da concentração de insulina por ilhota; $n = 14$ grupos de ilhotas isoladas de 3 – 4 ratas. C – controle não-prenhe; CP – controle

prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: * vs C, Caf e CafP; # vs C, CP e Caf; $P < 0,05$ 42

Figura 7. Curvas de secreção de insulina dose-resposta à glicose por ilhotas isoladas de ratas prenhes (símbolos abertos; 16º dia) ou não-prenhes (símbolos sólidos) alimentadas com dieta padrão (linhas tracejadas) ou de cafeteria (linhas contínuas). As ilhotas foram incubadas por 90 minutos com concentrações crescentes de glicose, e a insulina liberada foi normalizada pelo conteúdo de DNA das ilhotas. Os valores expressam a média $\pm$ EPM; $n = 8 - 15$ grupos de ilhotas isoladas de 3 - 4 ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos em cada concentração de glicose, $P < 0,05$. # vs C e Caf; * vs todos os outros grupos; § vs CP e CafP; & vs Caf; as diferenças com 2,8 mmol/L de glicose estão descritas no texto..... 43

Figura 8. Curvas de secreção de insulina em resposta à glicose expressas como porcentagem da secreção máxima das ilhotas isoladas de ratas prenhes (símbolos abertos; 16º dia) ou não-prenhes (símbolos sólidos) alimentadas com dieta padrão (linhas tracejadas) ou de cafeteria (linhas contínuas). A liberação máxima do hormônio (100%) foi calculada subtraindo os valores basais (2,8 mmol/L) do máximo secretado (16,7 ou 27,7 mmol/L de glicose). Os pontos representam a média $\pm$ EPM; $n = 8 - 15$ grupos de ilhotas isoladas de 3 - 4 ratos. Os EC50 das curvas estão descritos no texto..... 44

Figura 9. Secreção estática de insulina estimulada por 10 mmol/L de L-leucina, na presença de 2,8 mmol/L de glicose. As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. Os valores são média $\pm$ EPM; $n = 9 - 10$ grupos de ilhotas isoladas de 3 ratas. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. * estatisticamente diferente dos demais grupos; $P < 0,005$ 45

Figura 10. Secreção estática de insulina induzida por 40 mmol/L de KCl ou 100 μ mol/L de tolbutamida, na presença de 2,8 mmol/L de glicose. As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. As barras representam média $\pm$ EPM; $n = 8 - 10$ grupos de ilhotas isoladas de 3 ratas. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos, $P < 0,05$; * vs demais grupos; # vs C e CafP..... 46

Figura 11. Secreção de insulina em resposta aos potencializadores carbacol e PMA, na presença de 11,1 mmol/L de glicose, por ilhotas isoladas de ratas alimentadas com dieta padrão (C) ou dieta de cafeteria (Caf). As barras representam a média $\pm$ EPM; $n = 8$. As comparações estatísticas foram realizadas pelo teste “t” de Student, não pareado e de duas vias. * diferente do C; $P < 0,05$ 47

Figura 12. Oxidação da glicose por ilhotas isoladas estimuladas com 11,1 mmol/L do açúcar. As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. Os valores são média $\pm$

EPM; n = 12 grupos de ilhotas isoladas de 3 ratas. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. * indica *diferença estatística versus C e Caf; P < 0,05*..... 48

Figura 13. Atividade metabólica de ilhotas isoladas e estimuladas com 11,1 mmol/L de glicose. As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. As barras representam a média ± EPM; n = 12 – 15 grupos de ilhotas isoladas de 4 ratas. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. As diferenças estatísticas entre os grupos estão indicadas pelas letras acima das barras. Letras iguais representam similaridade entre os grupos. As comparações foram realizadas dentro de cada tempo de registro, sendo assim *não houve comparação entre os tempos. P < 0,05*..... 49

Figura 14. Curvas representativas das alterações no registro do Ca²⁺ citoplasmático em resposta a 11,1 mmol/L de glicose em ilhotas isoladas de ratas controle não-prenhes (A) ou prenhes (B; 16º dia), e de ratas cafeteria não-prenhes (C) ou prenhes (D; 16º dia)..... 50

Figura 15. Amplitude do aumento do Ca²⁺ citoplasmático (A), e frequência (B) e amplitude das oscilações de Ca²⁺ (C), induzidos por 11,1 mmol/L de glicose em ilhotas isoladas. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Os valores são média ± EPM; n = 6 – 10 ilhotas isoladas de 3 ratas. As diferenças estatísticas entre os grupos estão indicadas pelas letras acima das barras. Letras iguais representam similaridade entre os grupos. P < 0,05..... 51

Figura 16. Curvas representativas do aumento do registro do Ca²⁺ citoplasmático induzido por tolbutamida (100 µmol/L), na presença de 3 mmol/L de glicose, em ilhotas isoladas de ratas controle não-prenhes (A) ou prenhes (B; 16º dia), e de ratas cafeteria não-prenhes (C) ou prenhes (D; 16º dia). As barras acima das curvas indicam o período de estimulação. Tolb – tolbutamida..... 52

Figura 17. Expressão do RNAm que codifica SERCA2a (A), Cavα1.2 (B) e Cavβ2 (C) em ilhotas isoladas. Os dados foram normalizados pela expressão do RNAm da GAPDH, e estão expressos como percentual do controle (controle não-prenhe). As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Média ± EPM; n = 5 – 8 grupos de ilhotas isoladas de 8 – 10 ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: (A) * vs C, Caf e CafP; # vs C e CP; (B) * vs C, CP e CafP; # vs C e Caf; (C) ns; P < 0,05..... 53

Figura 18. Fosforilação em resíduos de tirosina da subunidade β do IR (A) e da proteína IRS-1 (B) em músculo de ratas aos 15 dias de prenhez, após estímulo com insulina. Amostras de proteína total foram solubilizadas e imunoprecipitadas (IP) com

anticorpos anti-IR β ou anti-IRS-1. Os imunoprecipitados foram corridos em gel de poliacrilamida 8%, transferidos para membranas de nitrocelulose que foram incubadas (IB) com anticorpos anti-fosfo-tirosina (pTyr), anti-IR β ou anti-IRS-1. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe Os gráficos representam a média $\pm$ EPM; n = 4 – 6 ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: * vs C; # vs CP; & vs Caf; P < 0,05..... 56

Figura 19. Fosforilação em resíduos de tirosina da subunidade β do IR (A) e da proteína IRS-1 (B) em fígado de ratas aos 15 dias de prenhez, após estímulo com insulina. Amostras de proteína total foram solubilizadas e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos anti-IR β ou anti-IRS-1. Os imunoprecipitados foram corridos em gel de poliacrilamida 8%, transferidos para membranas de nitrocelulose que foram incubadas (IB) com anticorpos anti-fosfo-tirosina (pTyr), anti-IR β ou anti-IRS-1. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe Os gráficos representam a média $\pm$ EPM; n = 4 – 6 ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: * vs C; # vs CP; P < 0,05..... 57

Figura 20. Fosforilação em resíduos de tirosina da subunidade β do IR (A) e da proteína IRS-1 (B) em músculo de ratas aos 19 dias de prenhez, após estímulo com insulina. Amostras de proteína total foram solubilizadas e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos anti-IR β ou anti-IRS-1. Os imunoprecipitados foram corridos em gel de poliacrilamida 8%, transferidos para membranas de nitrocelulose que foram incubadas (IB) com anticorpos anti-fosfo-tirosina (pTyr), anti-IR β ou anti-IRS-1. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe Os gráficos representam a média $\pm$ EPM; n = 3 – 6 ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: * vs C; # vs CP; P < 0,05..... 58

Figura 21. Fosforilação em resíduos de tirosina da subunidade β do IR (A) e da proteína IRS-1 (B) em fígado de ratas aos 19 dias de prenhez, após estímulo com insulina. Amostras de proteína total foram solubilizadas e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos anti-IR β ou anti-IRS-1. Os imunoprecipitados foram corridos em gel de poliacrilamida 8%, transferidos para membranas de nitrocelulose que foram incubadas (IB) com anticorpos anti-fosfo-tirosina (pTyr), anti-IR β ou anti-IRS-1. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe Os gráficos representam a média $\pm$ EPM; n = 4 – 6 ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: * vs C; # vs CP; P < 0,05..... 59

RESUMO

A obesidade atingiu proporções alarmantes constituindo-se num fator de risco para o desenvolvimento de várias doenças. O aumento da resistência periférica à insulina acompanha esta patologia e a incapacidade da célula beta pancreática em suprir a maior necessidade por insulina leva ao desenvolvimento de intolerância à glicose, hiperglicemia e diabetes. Por esta razão, é importante investigar mecanismos que tornem a célula beta capaz de aumentar sua capacidade secretória. A exemplo da obesidade, resistência periférica à insulina é também observada durante a prenhez. No entanto, neste caso, a célula beta é capaz de aumentar a produção e secreção do hormônio, mantendo a tolerância à glicose em condições adequadas. Diante disso, decidimos investigar a sensibilidade à insulina e a consequente resposta das células beta pancreáticas durante a prenhez em ratas obesas. Observamos que a alimentação com a dieta de cafeteria aumentou o ganho de peso, bem como os depósitos de gordura das ratas. Ratas obesas não-prenhes (Caf) e prenhes (CafP) apresentaram tolerância à glicose diminuída, associada a um aumento da insulina plasmática em resposta à sobrecarga de glicose no grupo CafP. Apesar disso, as glicemias de jejum e pós-prandial foram normais nos dois grupos. No entanto, as ratas Caf e CafP apresentaram hiperinsulinemia (jejum e alimentado), aumento do índice insulina/glicose e do AGL plasmático (alimentado). Ainda, houve redução na sinalização da insulina no fígado e músculo esquelético das ratas Caf e CafP, aos 15 e aos 19 dias de prenhez, de forma mais exacerbada do que a redução observada nas ratas controle prenhes. Em paralelo, as ilhotas isoladas das ratas Caf secretaram menos insulina em resposta a diferentes estímulos. Contudo, o conteúdo total de insulina, a secreção estimulada por PMA (ativador da PKC), a produção de compostos redutores e a oxidação de glicose, na presença de 11,1mmol/L do açúcar, foram similares entre as ratas Caf e as controle não-prenhes. Entretanto, as ilhotas isoladas das ratas Caf apresentaram redução na mobilização do Ca^{2+} citoplasmático livre frente à glicose ou tolbutamida, acompanhada pela redução da expressão gênica da subunidade $\alpha 1.2$ do canal de cálcio voltagem-dependente ($\text{Ca}_v\alpha 1.2$), e da Ca^{2+} -

ATPase do retículo endoplasmático tipo 2a. Independente da dieta, a prenhez aumentou a secreção de insulina em resposta à glicose, a produção de compostos redutores, a oxidação de glicose, a amplitude e a frequência das oscilações do Ca^{2+} citoplasmático e, a expressão gênica do $\text{Ca}_v\alpha 1.2$. Concluindo, a prenhez nas ratas obesas melhorou o manejo do Ca^{2+} e restaurou a secreção de insulina por ilhotas isoladas. Contudo, esta restauração não foi suficiente para vencer o aumento da resistência periférica à insulina e normalizar a tolerância à glicose nas ratas obesas.

ABSTRACT

The incidence of obesity reached alarming levels worldwide. This illness constitutes a risk factor for the development of several other diseases. The augmented peripheral insulin resistance accompanies this pathology, and the failure of the pancreatic beta cell to overcome the higher demand for insulin causes glucose intolerance, hyperglycemia and diabetes. For this reason, it became interesting to investigate mechanisms that make the beta cell capable to increase its secretory capacity. As obesity, peripheral insulin resistance is also observed during pregnancy. Nevertheless, in this situation, the beta cell is capable to enhance insulin production and release, maintaining glucose tolerance at adequate levels. Therefore, we decided to investigate insulin sensibility and the consequent beta cell response during pregnancy in obese rats. We observed that cafeteria diet enhanced weight gain and fat pads in rats. Despite no differences were noticed in obese non-pregnant (Caf) and pregnant (CafP) rats, during fast and fed states, the glucose tolerance was diminished in these rats, associated with an augmented plasma insulin levels in response to a glucose load in CafP rats. However, Caf and CafP rats had hyperinsulemia (fast and fed), higher insulin/glucose index, and enhanced plasma FFA (fed state). In addition, we observed a reduction in insulin signaling in liver and skeletal muscle from Caf and CafP rats, at 15th and 19th days of pregnancy, higher than that registered in control pregnant rats. Also, there was a reduction in insulin secretion induced by different stimuli in islets from Caf rats. However, total islet insulin content, PMA-stimulated insulin secretion, production of reducing equivalents, and glucose oxidation in the presence of 11.1 mmol/L glucose, were similar between islets from Caf and non-pregnant control rats. Nevertheless, glucose- and tolbutamide-induced Ca^{2+} mobilization, $\alpha 1.2$ subunit of the voltage sensitive Ca^{2+} channel ($\text{Ca}_v\alpha 1.2$), and sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2a gene expression were reduced in islets from Caf rats. Independently of the diet, pregnancy enhanced glucose stimulated insulin secretion, reducing equivalents production, glucose oxidation, amplitude and frequency of cytoplasm Ca^{2+} oscillations, and $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ gene expression. In conclusion, although pregnancy improved Ca^{2+} handling and restored insulin secretion in cafeteria diet-induced obese rats, this

restoration was not enough to overcome the increase in peripheral resistance and normalize glucose tolerance in these obese rats.

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa (letra do alfabeto grego)
β	Beta (letra do alfabeto grego)
γ	Gama (letra do alfabeto grego)
δ	Delta (letra do alfabeto grego)
<i>Ad libitum</i>	À vontade
ADP	Adenosina difosfato
AGL	Ácidos graxos livres
AKT	Proteína cinase serina/treonina (ou proteína cinase B/PKB)
AMPC	Adenosina monofosfato-cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
Ca^{2+}	Cálcio
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentração de Ca^{2+} livre intracelular
Ca^{2+} -VD	Canal de Ca^{2+} voltagem-dependente
$\text{Ca}_v\alpha 1.2$	Subunidade $\alpha 1.2$ do canal de cálcio voltagem-dependente do tipo L
$\text{Ca}_v\beta_2$	Subunidade β_2 do canal de cálcio voltagem-dependente
Cch	Carbacol (ou carbamilcolina)
cDNA	DNA complementar
COL	Colesterol total
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DAG	Diacilglicerol
EC_{50}	Concentração efetiva mediana
EPM	Erro padrão da média
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GDM	Diabetes Mellitus Gestacional
GH	Hormônio do crescimento
GLUT-2	Transportador de glicose tipo 2 (<i>Glucose transporter 2</i>)
HCl	Ácido clorídrico
IP3	Inositol-1-4-5-trifosfato
ipGTT	Teste de tolerância intraperitoneal à glicose
IR β	Subunidade beta do receptor de insulina
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
K^+_{ATP}	Canal de potássio sensível ao ATP
KBB	Tampão Krebs-bicarbonato

KCl	Cloreto de potássio
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MTS	<i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxy-phenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H - tetrazolium, inner salt</i>
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)
NaOH	Hidróxido de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato (<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)
PMS	Metassulfato de fenazina (<i>phenazine methosulfate</i>)
pTyr	Fosforilação em resíduo de tirosina
RNA	Ácido ribonucléico
SERCA2a	Ca ²⁺ -ATPase do retículo endoplasmático tipo 2a
SNARE	Proteína receptora ao fator sensível à N-etilmaleimida
TG	Triglicerídeos
vs	Contra (<i>versus</i>)

INTRODUÇÃO

A regulação da glicemia, pelo menos nos mamíferos, é fundamental para a manutenção da vida. Tanto hipoglicemia quanto o excesso de açúcar no sangue são prejudiciais ao organismo, provocando danos, principalmente às células da retina, aos neurônios e ao epitélio germinativo das gônadas, no primeiro caso, e levando a desidratação celular, perda de líquidos e eletrólitos na urina, e dano aos vasos sanguíneos, no segundo (Guyton & Hall, 2006).

A regulação dos níveis sanguíneos de glicose, e dos nutrientes de maneira geral, durante as diferentes situações fisiológicas (jejum, prenhez, lactação, atividade física, etc.) é realizada por vários hormônios, dentre os quais a insulina. Alterações na síntese ou liberação deste hormônio podem levar a hiperglicemia crônica, e consequentemente ao diabetes (Boschero, 1996).

1. Obesidade e Diabetes Mellitus

A obesidade constitui-se num grande problema de saúde pública que vem atingindo proporções alarmantes. Segundo projeção da Organização Mundial de Saúde (2006), em 2015 serão 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso e mais de 70 milhões obesos. Esta doença é resultante de um desequilíbrio do organismo, onde a ingestão calórica excede o gasto energético, ocorrendo um acúmulo de gordura armazenada principalmente no tecido adiposo. Entre as alterações que levam a este desequilíbrio energético estão incluídos fatores metabólicos, hormonais, genéticos, neurais e ambientais (Ionescu *et al.*, 1988; Jeanrenaud & Rohner-Jeanrenaud, 2001; Hubáček, 2009). A redução na prática de atividades físicas, devido ao avanço da tecnologia, e a alimentação desbalanceada, que muitas vezes é selecionada de acordo com a praticidade e o sabor do alimento, contribuem para o surgimento desta doença (Taubes, 1998).

Além de problemas psicológicos e sociais, indivíduos obesos são mais propensos ao desenvolvimento de doenças crônicas, muitas vezes fatais, como problemas cardíacos, hipertensão arterial, aterosclerose, resistência à insulina e diabetes (Hotamisligil *et al.*, 1993; Arrone *et al.*, 1997; Gura, 1997; Bray, 2003). Cerca de 80% dos indivíduos diagnosticados com Diabetes Mellitus tipo II são ou foram obesos em algum período da vida (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2004).

Além disso, mulheres que estão acima do peso ou são obesas são mais propensas a desenvolver hipertensão e diabetes durante a gestação (Weiss *et al.*, 2004; Walsh, 2007). De fato, a obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do Diabetes Mellitus Gestacional (Torloni *et al.*, 2008; Yeung *et al.*, 2009). Esta patologia, que acomete cerca de 5% das mulheres grávidas, é definida como uma intolerância à glicose diagnosticada pela primeira vez durante a gestação. O aumento exacerbado da resistência periférica à insulina parece ter participação no desenvolvimento do Diabetes Mellitus Gestacional. Em tal condição, as concentrações plasmáticas deste hormônio não são suficientes para vencer a demanda pela insulina, que já está elevada mesmo durante uma gravidez normal, levando a intolerância à glicose. O tratamento desta doença pode ser realizado utilizando-se insulina exógena, ou apenas através do controle dietético (Di Cianni *et al.*, 2003; American Diabetes Association, 2004; Di Cianni *et al.*, 2007; Metzger *et al.*, 2007; Devlieger *et al.*, 2008; Colomiere *et al.*, 2009).

2. Dieta de cafeteria

A utilização de alimentos palatáveis compondo a dieta dos animais é uma estratégia que vem sendo empregada nas pesquisas relacionadas à obesidade e às patologias associadas a esta doença (Chen *et al.*, 2008; Scoaris *et al.*, 2009). É provável que isto se deva ao fato de a obesidade induzida pela alimentação com a

“dieta de cafeteria” ser o modelo que mais se assemelha à obesidade humana, suas causas e consequências (Heyne *et al.*, 2009).

Conhecida também como “dieta ocidental” (“Western diet”), neste tipo de dieta o aporte calórico oferecido ao animal é maior, com concomitante aumento da quantidade de carboidratos e/ou de lipídeos. O protocolo experimental, que varia de acordo com cada grupo de pesquisa, consiste em acrescentar, associar ou substituir a ração padrão para roedores, por alimentos calóricos consumido pela população humana, como chocolate, amendoim, bacon, leite condensado, bolo, patê, refrigerante, etc.

De fato, a alimentação de ratos com a dieta de cafeteria provoca obesidade, evidenciada pelo aumento do peso das gorduras viscerais (gonadal, retroperitoneal, mesentérica, etc), e da gordura corporal total (Ribot *et al.*, 2008; Akyol *et al.*, 2009; Shafat *et al.*, 2009). O aumento do índice de Lee (equivalente ao Índice de Massa Corporal - IMC - em humanos), acompanhado pelas alterações citadas anteriormente, também é utilizado para a determinação da obesidade neste modelo (Scoaris *et al.*, 2009).

3. Mecanismo de secreção de insulina

A insulina é um hormônio protéico, constituído por 51 aminoácidos, produzido e liberado pelas células beta das ilhotas pancreáticas. A secreção deste hormônio é regulada por fatores metabólicos, neurais e endócrinos, sendo que os dois últimos participam da potencialização ou da inibição da liberação de insulina, enquanto os fatores metabólicos são os responsáveis por estimular a secreção do hormônio (Boschero, 1996).

Dentre os fatores metabólicos, a glicose é o agente estimulador mais importante. Este nutriente penetra a célula beta através do transportador GLUT-2, é fosforilado pela glicocinase IV e metabolizado na via glicolítica e no ciclo de Krebs aumentando a concentração de ATP, o que altera a razão ATP/ADP no interior da

célula (Thorens *et al.*, 1988). O aumento na razão ATP/ADP induz o fechamento de canais de K^+ sensíveis a ATP (K^+_{ATP}), diminuindo o efluxo desse cátion e, conseqüentemente, promovendo despolarização da membrana e a abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (Ca^{2+} -VD) (Malaisse *et al.*, 1981). O aumento da concentração dos íons Ca^{2+} livres no interior da célula ($[Ca^{2+}]_i$) regula a ancoragem e o início da fusão das vesículas contendo insulina com a membrana plasmática e a conseqüente secreção do hormônio (Boschero, 1996).

Além da glicose, nutrientes como ácidos graxos e aminoácidos podem influenciar a secreção de insulina (Li *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2008). A L- arginina é um aminoácido catiônico que estimula a liberação deste hormônio por alterar os fluxos iônicos e o potencial de membrana da célula beta pancreática, modulando a permeabilidade ao Ca^{2+} (Herchuelz *et al.*, 1984; Blacher *et al.*, 1989). A L-leucina, aminoácido de cadeia ramificada, também estimula a secreção de insulina, tanto através de sua metabolização por descarboxilação oxidativa pela mitocôndria, quanto ativando alostericamente a enzima glutamato desidrogenase (GDH) (Sener *et al.*, 1981; Lenzen *et al.*, 1985; Fahien *et al.*, 1988).

Dentre os fatores neurais que influenciam na liberação de insulina, estão os sinais do sistema nervoso autônomo. A noradrenalina, neurohormônio simpático, ao agir sobre receptores do tipo α_2 , promove abertura dos canais K^+_{ATP} , hiperpolarização e redução na $[Ca^{2+}]_i$ na célula beta pancreática, com conseqüente inibição na secreção de insulina (Nilsson *et al.*, 1988). Por outro lado, foram identificados 2 tipos de receptores muscarínicos expressos em linhagens de células beta e ilhotas pancreáticas, o M1 e o M3 (Boschero *et al.*, 1995; Iismaa *et al.*, 2000). A ligação da acetilcolina ou seus análogos (carbacol, oxotremorina, etc.), aos receptores muscarínicos aciona o sistema de proteína G acoplado a este receptor, resultando na hidrólise de fosfatidilinosídeos de membrana pela fosfolipase C (PLC), e na formação de inositol-1-4-5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 age sobre receptores específicos no retículo endoplasmático, liberando Ca^{2+} dos estoques intracelulares e aumentando a $[Ca^{2+}]_i$, enquanto o DAG ativa canais de Ca^{2+} -VD e a proteína cinase C (PKC), ambos os eventos auxiliando na secreção de insulina (Schrey & Montague,

1983; Mathias *et al.*, 1985; Weng *et al.*, 1993; Kelley *et al.*, 1995; Verspohl & Herrmann, 1996; Niwa *et al.*, 1998).

Alguns fármacos, como as sulfoniluréias, utilizadas no tratamento de pacientes diabéticos não dependentes de insulina agem diretamente sobre a célula beta pancreática estimulando a liberação de insulina. As sulfoniluréias, como a Tolbutamida e a Glibenclamida, estimulam a secreção de insulina por bloquear seletivamente o canal K^+_{ATP} , através da sua ligação à subunidade regulatória deste canal, o receptor de sulfoniluréia (SUR 1). A ligação do SUR 1 com uma sulfoniluréia provoca o fechamento do poro iônico do canal, que é formado pelas subunidades do tipo canal de retificação interna (Kir6.2), impedindo o efluxo do K^+ (Gillis *et al.*, 1989; Inagaki *et al.*, 1995; Panten *et al.*, 1996).

4. Cálcio e secreção de insulina

O Ca^{2+} desempenha função importante na secreção de insulina, uma vez que o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ regula a ancoragem e o início da fusão das vesículas contendo insulina com a membrana plasmática, processo que é mediado pelas proteínas receptoras ao fator sensível à N-etilmaleimida (SNARE) e pela sinaptotagmina (Boschero, 1996; Rorsman & Renström, 2003; Gauthier & Wollheim, 2008). O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ produzido pela despolarização resultante do fechamento dos canais de K^+_{ATP} e influxo de Ca^{2+} , é essencial para a primeira e segunda fases da secreção de insulina em resposta à glicose. A ausência de Ca^{2+} no meio extracelular, ou o bloqueio dos canais de Ca^{2+} -VD, inibem o influxo de Ca^{2+} e o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ em resposta a leucina e a tolbutamida, e também previne as oscilações lentas da $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pela glicose, resultando na redução da secreção de insulina (Grapengiesser *et al.*, 1989; Grapengiesser *et al.*, 1990; Dryselius *et al.*, 1999). Sendo assim, o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ decorrente do influxo deste cátion é um evento fundamental para a secreção de insulina. Além disso, a elevação da $[Ca^{2+}]_i$ também estimula a adenilato ciclase e a PLC gerando AMPc, DAG e IP_3 que, através da

fosforilação de proteínas específicas, amplificam o sinal do $[Ca^{2+}]_i$ na liberação dos grânulos de insulina (Flatt, 1996).

Dentre os vários tipos de canais de Ca^{2+} existentes e que contribuem para o influxo deste cátion, os canais de Ca^{2+} -VD do tipo L (corrente de longa duração) são de fundamental importância na célula beta pancreática, já que sua atividade está relacionada com a exocitose dos grânulos contendo insulina (Mears, 2004; Trus *et al.*, 2007). Estes canais têm a capacidade de se ligar a proteínas SNARE, direcionando a entrada de Ca^{2+} diretamente para os “sítios” de exocitose (Wiser *et al.*, 1999). Os canais de Ca^{2+} -VD do tipo L, são constituídos pelas subunidades α_1 , α_2 , β , γ e δ , sendo que a subunidade α_1 forma o poro iônico do canal, responde as alterações na voltagem da membrana e é sensível a diidropiridina (Figura 1). Já foram descritas vários tipos de subunidades α_1 em ilhotas de ratos e linhagens de células beta, dentre essas a $Ca_v1.2$ (α_1C) parece ser a que está mais relacionada a secreção de insulina. Já a subunidade β é uma subunidade auxiliar com função reguladora sobre as propriedades biofísicas e sobre a inserção na membrana plasmática do canal Ca^{2+} -VD (Jay *et al.* 1990; Schulla, 2003; Yang & Berggren, 2006; Nitert, 2008).

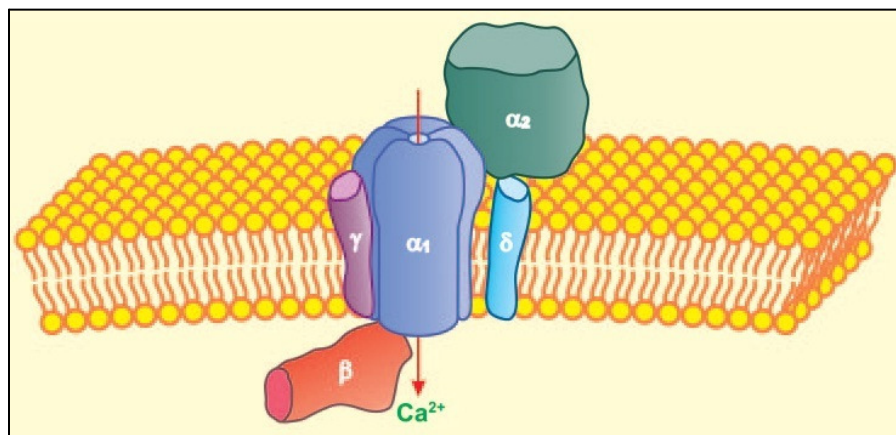


Figura 1. Modelo estrutural do canal de Ca^{2+} voltagem dependente na membrana plasmática. O canal é formado pela subunidade α_1 que constitui o poro do canal, e as subunidades auxiliares $Ca_v\beta$, $Ca_v\gamma$, and $Ca_v\alpha_2\delta$. Retirado de Yang & Berggren, 2006.

Além do Ca^{2+} proveniente do meio extracelular, íons Ca^{2+} podem ser liberados do retículo endoplasmático através da ativação dos receptores de IP_3 . Por outro lado, uma das formas pelas quais o Ca^{2+} é removido do citoplasma é através da proteína Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático (SERCA). Apesar do Ca^{2+} proveniente do retículo endoplasmático não ser absolutamente necessário para a secreção de insulina, tem sido demonstrado que também contribui para o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante a estimulação da glicose (Gilon *et al.*, 1999; Fridlyand *et al.*, 2003). Tal contribuição parece ser proveniente da amplificação da secreção de insulina através da reposição das vesículas contendo insulina, ancoradas na membrana, e que constituem o *pool* de grânulos de liberação rápida (Gromada *et al.*, 1999).

5. Secreção de insulina durante a prenhez

Durante a gestação em mamíferos, ocorre aumento gradual da resistência à insulina na mãe para garantir o fornecimento de nutrientes para o crescimento e desenvolvimento do feto. Isto se deve ao aumento progressivo nas concentrações plasmáticas dos hormônios gestacionais, do cortisol e de citocinas inflamatórias (TNF α) durante o período (Ryan & Enns, 1988; Kirwan *et al.*, 2002; Mastorakos & Ilias, 2003; Barbour *et al.*, 2004;). O aumento da fosforilação do receptor de insulina no resíduo serina/treonina e a redução da fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS 1), no músculo esquelético de gestantes, parecem estar envolvidos na redução do transporte de glicose (Friedman *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2000).

Para fazer frente a esse aumento da resistência, a célula beta pancreática secreta mais insulina durante a gestação (Malaisse *et al.*, 1969; Barbour *et al.*, 2007). Em ratos, o aumento da secreção de insulina atinge seu pico por volta do 16º dia da prenhez, resultante do aumento da massa de células beta (hiperplasia, hipertrofia e diminuição da apoptose), da produção de insulina e da sensibilidade destas células à glicose. Durante este período, há ainda um aumento das junções comunicantes entre as células beta pancreáticas, e da expressão de proteínas SNARE, bem como da

atividade da adenilato ciclase e dos níveis de AMPc, que potencializa a secreção de insulina, regulando a maquinaria secretória através da proteína cinase A (PKA), e ao mesmo tempo, aumentando o influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} -VD, uma vez que a PKA é capaz de fosforilar estes canais (Rajan *et al.*, 1989; Gromada *et al.*, 1998; Weber, *et al.*, 1998; Cunha *et al.*, 2006). Essas alterações são mediadas por diferentes hormônios tais como: prolactina, lactogênios placentários e o hormônio do crescimento (GH), principalmente através da ativação do receptor da prolactina, e da via da Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição 5 (JAK/STAT5) (Malaisse *et al.*, 1969; Sorenson *et al.*, 1987; Brelje & Sorenson, 1988; Brelje & Sorenson, 1991; Galsgaard *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 1999; Sjöholm *et al.*, 2000; Collares-Buzatto *et al.*, 2001; Levy & Darnell, 2002; Tian & Laychock, 2003; Bordin *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2007). Outras vias ativadas pelo receptor de prolactina e que participam do aumento da massa e da sensibilidade da ilhota à glicose são as vias da fosfatidilinositol 3-cinase/proteína cinase serina/treonina (PI3K/AKT) e da proteína cinase ativada por mitógenos/cinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK1/2) (Amaral *et al.*, 2004).

6. Mecanismo de ação da insulina em tecidos insulino-sensíveis

A insulina tem capacidade de agir em, praticamente, todos os tecidos do organismo. No fígado, este hormônio anabólico reduz a produção de glicose estimulando a síntese de glicogênio, através da ativação de enzimas principalmente a glicogênio sintetase, e diminuindo a gliconeogênese e a glicogenólise, inibindo a transcrição da fosfoenolpiruvato carboxiquinase e inativando a enzima fosforilase que quebra glicogênio em glicose, respectivamente. Outra ação da insulina é estimular a lipogênese pelo fígado e tecido adiposo, e inibir a lipólise neste último. Além disso, este hormônio aumenta a captação de glicose, principalmente no músculo esquelético e no tecido adiposo, bem como promove síntese e inibe a degradação de proteínas. Exerce suas ações através da ligação ao seu receptor específico de membrana. O receptor de insulina, glicoproteína transmembrana, é formado por duas subunidades α

com localização extracelular, e duas subunidades β intracelulares. A insulina se liga à subunidade α do seu receptor, o que promove a alteração conformacional e transfosforilação das subunidades β em resíduos de tirosina, aumentando sua atividade tirosina cinase. Após ativação, o receptor de insulina promove fosforilação de vários substratos protéicos em resíduos tirosina ativando diferentes vias de sinalização intracelular. Dentre estes substratos estão as proteínas da família dos substratos do receptor de insulina (IRS). Foram descritas quatro proteínas desta família, dentre as quais o IRS-1 e IRS-2 parecem ter maior importância na regulação da glicemia e da sensibilidade à insulina. A fosforilação em tirosina dos IRS possibilita a ativação de outras proteínas, principalmente da PI3K, que dentre outros eventos, é importante no transporte de glicose estimulado pela insulina. (Van Obberghen *et al.*, 1979; Kasuga *et al.*, 1982; Jacobs *et al.*, 1997; White, 1997; Patti & Kahn, 1998; Carvalheira *et al.*, 2002).

7. Justificativa

Tanto a prenhez quanto a obesidade induzida por dieta de cafeteria aumentam a resistência periférica à insulina. Em condições normais, a prenhez é um estado fisiológico no qual a célula beta é capaz de aumentar a produção e secreção do hormônio, mantendo a glicemia e a tolerância à glicose em níveis normais. Sendo assim, decidimos analisar a sensibilidade à insulina, e a consequente resposta das células beta pancreáticas associando dois estados potenciais de aumento da resistência à insulina, ou seja: obesidade e prenhez.

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da obesidade, induzida por dieta de cafeteria, sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas e sobre a sensibilidade à insulina em ratas controle e prenhes.

Objetivos específicos

- a) Verificar a tolerância das ratas à glicose;
- b) Avaliar a secreção de insulina por ilhotas isoladas estimuladas com diferentes secretagogos;
- c) Investigar o metabolismo da glicose em ilhotas isoladas;
- d) Analisar a manejo do Ca^{2+} citoplasmático em ilhotas isoladas estimuladas com glicose ou tolbutamida;
- e) Verificar a expressão gênica do canal de Ca^{2+} voltagem-dependente (subunidade $\alpha 1.2$ e β_2) e da Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático tipo 2;
- f) Avaliar a fosforilação em resíduos tirosina da subunidade β do receptor de insulina e do substrato 1 do receptor de insulina em fígado e músculo esquelético.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais e dieta

Fêmeas virgens *Wistar*, provenientes do biotério central da Unicamp, foram mantidas em período de claro/escuro (12h/12h) e temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) controlados, no Biotério Setorial do Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia. Aos 70 dias de vida, as ratas foram separadas em 2 grupos: controle (C) e cafeteria (Caf). Foi ofertado aos animais controle: ração padrão e água *ad libitum*; enquanto as ratas cafeteria receberam: ração modificada (37,5% ração padrão, 25% amendoim, 25% chocolate, e 12,5% bolacha) e refrigerante (Coca-Cola® e Guaraná Antártica®, alternadamente) *ad libitum*. Além da ração, os animais Caf receberam produtos alimentícios adicionais, tais como: biscoito, bolo e salgadinho, totalizando 4,41 kcal/g (43,1% carboidratos; 12,1% proteínas; 46,9% lipídeos), contra 2,63 kcal/g da dieta padrão Nuvilab CR-1 (NUVITAL®, Colombo, PR, Brazil). Após 12 semanas de dieta, algumas ratas foram submetidas ao cruzamento com machos formando então 4 grupos: controle (C), controle prenhe (CP), cafeteria (Caf) e cafeteria prenhe (CafP). A dieta nutricional permaneceu a mesma do início do experimento até o sacrifício das ratas no 15º, 16º ou 19º dia de prenhez. A Figura 2 mostra o desenho experimental de tratamento das ratas.

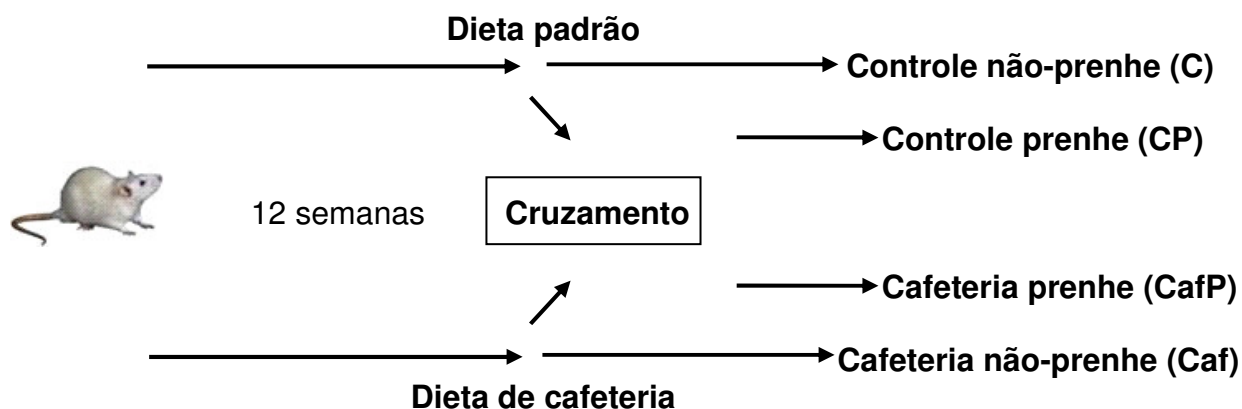


Figura 2. Esquema do protocolo experimental de tratamento das ratas.

2. Registro do consumo alimentar

Da 5ª até a 8ª semana de tratamento, ratas controle e cafeteria foram pesadas e mantidas isoladas em gaiolas adaptadas com fundo duplo que permitiam a recuperação das sobras de alimentos. Com esse procedimento, foi possível avaliar a quantidade de dieta consumida pelas ratas dos dois grupos, descontando-se a sobra da quantidade ofertada (50 g/dia/rata).

3. Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT)

Ao final das 14 semanas de dieta, e ao 14º - 15º dia de prenhez, as ratas foram submetidas ao ipGTT. Após 12 horas de jejum na noite anterior ao experimento, os animais foram pesados e uma amostra de sangue foi coletada da cauda (basal; t = 0 min). Em seguida, cada rata recebeu uma injeção intraperitoneal de solução de glicose (2 g/Kg peso corporal) e amostras suplementares de sangue foram coletadas aos 15, 30, 60 e 120 min depois da injeção. Os valores de glicose sanguínea foram medidos imediatamente, com o auxílio de um glicosímetro Accu-Chek Advantage (Roche Diagnostics, Suíça). Amostras adicionais de sangue foram coletadas em tubos heparinizados (1:1000) nos tempos 0, 15 e 60 min. Em seguida, centrifugadas a 15284 g, à 4º C, 15 min, e o plasma coletado e armazenado à -20º C para avaliação da insulinemia por radioimunoensaio. A área sob a curva de glicose foi calculada separadamente para cada rata.

4. Análises bioquímicas

A glicose sanguínea foi avaliada em um glicosímetro Accu-Chek Advantage (Roche Diagnostics, Suíça) através de amostras de sangue obtidas pela veia caudal das ratas. A determinação dos demais parâmetros foi realizada em amostras de plasma obtidas após centrifugação (15284 g, 4º C, 15 min) do sangue coletado em

tubos heparinizados (1:1000) imediatamente após decaptação dos animais. A insulina plasmática foi quantificada por radioimunoensaio, enquanto triglicerídeos e colesterol total (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemanha), ácidos graxos livres (Wako Chemicals, Neuss, Alemanha), albumina e proteínas totais (Laborlab, Guarulhos, SP, Brasil) foram determinados por kits enzimáticos colorimétricos, de acordo com as instruções do fabricante.

5. Avaliação da obesidade

As ratas foram pesadas um dia antes do início da dieta de cafeteria, e uma vez por semana até o final do tratamento e eutanásia, quando foram também retiradas e pesadas as gorduras perigonadal e retroperitoneal.

6. Isolamento de ilhotas pancreáticas de ratos

As ratas sofreram eutanásia em câmara de CO₂ seguida por decapitação. Após a eutanásia, realizou-se uma incisão abdominal para a exposição da porção proximal do ducto biliar comum e a interrupção do ducto pancreático na altura da ampola de *Water* (duodeno) com uma pinça Kelly. Em seguida, foi feita uma pequena incisão na porção distal do ducto biliar comum para a inserção de uma agulha de insulina através da qual o pâncreas foi inflado com solução de Hanks (NaCl 136.8 mmol/L; KCl 5.3 mmol/L; CaCl₂ 1.22 mmol/L; MgSO₄ 0.81 mmol/L; Na₂HPO₂ 0.34 mmol/L; KH₂PO₄ 0.44 mmol/L; NaHCO₃ 4.16 mmol/L, com pH corrigido para 7.4) contendo collagenase (tipo V; 0,8 mg/mL). O pâncreas foi então removido por dissecação e mantido em um tubo de vidro em banho-maria à 37° C durante 23 min. Após uma agitação de 1 min no final deste período, o conteúdo do tubo foi lavado (3 vezes; 5, 3 e 1 min, respectivamente) com solução de Hanks para retirar a collagenase, as enzimas pancreáticas e os fragmentos celulares liberados durante o processo de digestão.

7. Secreção estática e conteúdo total de insulina

As ilhotas recém isoladas (*ex vivo*) foram coletadas e, em grupos de 4, pré-incubadas por 45 min a 37° C em tampão de Krebs-bicarbonato (KBB) (NaCl 115 mmol/L, KCl 5 mmol/L, CaCl₂ 2,56 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, NaHCO₃ 24 mmol/L) contendo glicose (5,6 mmol/L) e albumina bovina (3 g/L) equilibrado com uma mistura de 95% O₂ - 5% CO₂, para dar um pH de 7.4. A seguir, a solução de pré-incubação foi substituída pelo tampão contendo: 1) diferentes concentrações de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 11,1; 16,7 e 27,7 mmol/L); 2) L-leucina (10 mmol/L); ou KCl (40 mmol/L), ou tolbutamida (100 µmol/L) na presença de 2,8 mmol/L de glicose; 3) carbacol (100 µmol/L) ou forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (100 nmol/L) na presença de 11.1 mmol/L de glicose. As placas foram incubadas a 37° C durante 90 min, e após este procedimento, foi recolhida uma alíquota do sobrenadante de cada amostra, que foi estocada a -20° C.

Para a determinação do conteúdo total de insulina, grupos de 10 ilhotas foram coletados e transferidos para tubos de 1,5 mL. Adicionou-se 1 mL de solução de álcool-ácido (concentração final de 70% de etanol e 30% de HCl 0,2 mmol/L), seguida de sonicação das ilhotas pancreáticas (3 vezes, pulsos de 10 s).

A insulina das amostras tanto da secreção estática, quanto do conteúdo total foi quantificada através de radioimunoensaio.

8. Quantificação do DNA das ilhotas

Ilhotas pancreáticas foram homogeneizadas através de sonicação (2 vezes, pulsos de 10 s) em 500 µL de tampão Tris-HCl/EDTA (50 mmol/L, 10 mmol/L, respectivamente), contendo SDS (1%) e com pH corrigido para 8.1. O DNA foi extraído em fenol/clorofórmio, precipitado em etanol, e resuspendido em tampão Tris-EDTA. Em seguida, o RNA foi removido por digestão com 1 µg de RNase A (Sigma), incubando por 30 min, à 37° C. Após este procedimento, o DNA foi quantificado pelo Quant-iT PicoGreen (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

9. Oxidação da glicose

Grupos de 25 ilhotas recém isoladas foram incubados durante 2 h, à 37° C, em tampão KBB na presença de glicose (11,1 mmol/L) e contendo traços de D-[U-¹⁴C]glicose (20 µCi/mL) (GE Health Care; Little Chalfont, Bucks, Reino Unido) para a formação de ¹⁴CO₂. O metabolismo da glicose foi parado com a adição de HCl (1 N) e com consequente clivagem celular. O ¹⁴CO₂ liberado foi absorvido por NaOH (1 mol/L) durante 1 h, sob agitação, à 4° C, obtendo NaH¹⁴CO₃. Em seguida, adicionou-se 6 mL de líquido de cintilação e a radioatividade foi contada em um cintilador.

10. Análise da atividade metabólica de ilhotas isoladas

A atividade metabólica foi aferida através da quantificação de compostos redutores, principalmente NAD(P)H, formados a partir da redução do sal de tetrazólio solúvel em água, MTS (*3-[4,5,dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxy-phenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt*), ao seu produto formazan, em células viáveis (Segu *et al.*, 1998; Weinhaus *et al.*, 2007). Para isto, grupos de 100 ilhotas recém isoladas foram incubados em placas de 96 poços estéril por 150 min, em tampão estéril Krebs/Hepes (NaCl 124 mmol/L, KCl 4,7 mmol/L, CaCl₂ 2,5 mmol/L, MgSO₄ 1,2 mmol/L, K₂HPO₄ 1 mmol/L, NaH₂PO₄ 5 mmol/L, NaHCO₃ 20 mmol/L, Na-HEPES 5 mmol/L) contendo: 11,1 mmol/L de glicose, 15% MTS e 1% metassulfato de fenazina (PMS). A absorbância foi captada em 490 nm, a cada 10 min depois da adição do reagente (CellTiter96 ensaio aquoso da Promega Corp., Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

11. Registro das oscilações do Ca²⁺ citoplasmático

Após o isolamento, as ilhotas foram mantidas por 4 h em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (5%), glicose (11,1 mmol/L), penicilina (100 UI/mL), e estreptomicina (100 µg/mL), à 37° C, na presença de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂). Em seguida, foram coletadas e transferidas para placas contendo KBB na

presença de glicose (5 mmol/L) e de fura2/AM (5 μ mol/L), e incubadas durante 1 h em carbogênio, à 37° C. Após este procedimento, foram transferidas para uma câmara com temperatura controlada (37° C) e perfundidas com solução KBB contendo diferentes secretagogos (glicose ou tolbutamida) no fluxo de 1,5 mL/min. As imagens das oscilações de Ca^{2+} foram captadas a cada 5 s usando aparelhagem adequada. As ondas excitatórias de 340 e 380 nm foram selecionadas por uma fonte de luz de xenônio e a emissão foi de 510 nm. A mudança no Ca^{2+} citoplasmático foi detectada como uma mudança na proporção F340/F380 (49, 60), e os dados foram obtidos utilizando o programa ImageMaster 5 (Photon Technology International, NJ, EUA).

A amplitude e a frequência das oscilações de Ca^{2+} foram determinadas depois da adição de 11,1 mmol/L de glicose ao meio de incubação. A amplitude se refere ao primeiro aumento na concentração de Ca^{2+} , e foi calculada subtraindo o valor basal (3 mmol/L) do valor obtido no pico (11,1 mmol/L) de cada registro. Já a amplitude das oscilações foi calculada subtraindo o menor valor registrado, do maior valor de cada oscilação durante a exposição à solução contendo 11,1 mmol/L de glicose. Foram consideradas oscilações cada incremento na razão da fluorescência (F340/F380) do Ca^{2+} , pelo menos 2 vezes maior do que qualquer alteração registrada durante a perfusão das ilhotas com concentração basal de glicose. A frequência foi calculada contando o número de oscilações registradas durante a perfusão com 11,1 mmol/L glicose. Nos experimentos com tolbutamida, a área sob a curva foi calculada durante o período no qual o estímulo estava presente no meio de perfusão, após subtração do valor basal (3 mmol/L de glicose).

12. Expressão gênica: reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR - real time)

O RNA total foi extraído de cerca de 500 ilhotas utilizando o método do reagente Trizol (Invitrogen - Life Technologies). Amostras de 2 μ g do RNA total foram transcritos reversamente através da enzima transcriptase reversa e de *primers* aleatórios para a obtenção dos cDNAs. As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 15 μ L, utilizando o Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems,

Foster City, CA, EUA). As amostras foram desnaturadas à 94° C por 10 min, e em seguida submetidas a 40 ciclos de PCR à 95° C/60° C. As amplificações de PCR foram realizadas em duplicata. A pureza dos produtos de PCR amplificados foi verificada através da análise da curva de *melting*. A expressão dos genes analisados foi normalizada pela do gene controle: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A tabela 1 mostra a sequência dos primers para os genes analisados.

Tabela 1. Amplímetros utilizados no PCR-Real Time

Gene	Amplímetro	
SERCA2a	Direto	5' TGGTACTGGCTGATGATAACTTCTCC 3'
	Reverso	5' TGTTGTTGTAGATGGCACGGC 3'
Ca _v α1.2	Direto	5' GACACAGAGAGGAAGTTCAAGGG 3'
	Reverso	5' GCGTGGGCTCCCATAGTTG 3'
Ca _v β ₂	Direto	5' TGCACTGGAGTATCCAAGCG 3'
	Reverso	5' CCACTTCGTCTCAGCCACTC 3'
GAPDH	Direto	5' GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG 3'
	Reverso	5' AACCTGGTCCTCAGTGTAGCCC 3'

13. Estimulação com insulina exógena, imunoprecipitação e *imunoblot*

Aos 15 ou 19 dias de prenhez, as ratas foram pesadas e anestesiadas com quetamina e diazepam (7:3; 1 µL/g de peso corporal). Após anestesia, foi realizada uma laparotomia e cada rata recebeu 100 µL de insulina (0,6 mmol/L) ou de salina na veia cava. Amostras do fígado e do sóleo foram retiradas 45 s e 3 min, respectivamente, após a injeção. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados em tampão para imunoprecipitado contendo 100mmol/L de Tris (pH 7,4), 100 mmol/L de pirofosfato de sódio, 100 mmol/L de fluoreto de sódio, 10 mmol/L de EDTA, 10 mmol/L de vanadato de sódio, 2 mmol/L de PMSF, e 0,1 mg/mL de aprotinina, à 4°C. Cada amostra recebeu 1% de Triton e permaneceu em incubação por 40 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 15284 g, 4° C por 30 min. As amostras foram transferidas para tubos e quantificadas através do reagente de

Biureto. Em seguida, 1 mg de proteína foi incubado com anti-IR β ou anti-IRS1 durante a noite à 4° C, sob agitação constante. No dia seguinte, os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A Sepharose 6 MB por 2 h, à 4°C, sob agitação constante, e decantados por centrifugação por 30 min, à 4°C, 15284 g. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem (2 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl; 1 mM RDTA; 0,5% Triton X-100). O sobrenadante foi descartado, restando apenas as proteínas precipitadas (imunocomplexos). Os imunocomplexos foram ressuspensos em tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT, fervidos por 5 min, e aplicados em gel de poliacrilamida 8% para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD, a 120 V, em gelo, durante 2 h. Após transferência, as membranas foram incubadas com solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 2 h, em seguida, lavadas com solução basal, e incubadas novamente durante à noite com anticorpo específico. O sinal foi detectado com anticorpo policlonal anti-IgG (2 h, 1:1000), e com reagentes de quimioluminescência (Pierce Biotechnology, USA), em filmes de raio-X (Kodak, AM, Brasil). A intensidade e quantificação das bandas foi avaliada por densitometria óptica através do programa UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific, Inc.).

14. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com exceção das curvas de registro de Ca²⁺ citoplasmático, que são demonstrativas. A comparação dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do pós teste de Newman-Keuls. O teste “t” de Student foi utilizado para comparações entre 2 grupos (C vs Caf; ganho de peso e secreção de insulina em resposta ao carbacol ou ao PMA). O número de amostras utilizado (*n*) está indicado na legenda das figuras ou rodapé das tabelas. As diferenças entre os grupos foram consideradas estaticamente significantes quando *P* < 0,05.

RESULTADOS

1. Efeito da alimentação com a dieta de cafeteria sobre o ganho de peso, consumo alimentar e acúmulo de gorduras

Durante a alimentação com a dieta de cafeteria, foram medidos o peso corporal (12 primeiras semanas) e a ingestão alimentar das ratas (entre a 5ª e a 8ª semana). Apesar de apresentarem uma ingestão diária menor durante o período resgistrado ($13,4 \pm 0,3$ vs $15,2 \pm 0,3$ g; $n = 8$; $P < 0,05$), a Figura 3 mostra que as ratas alimentadas com a dieta de cafeteria ganharam mais peso do que as ratas controle a partir da 3ª semana de alimentação com a dieta, assim permanecendo até o final das 12 semanas.

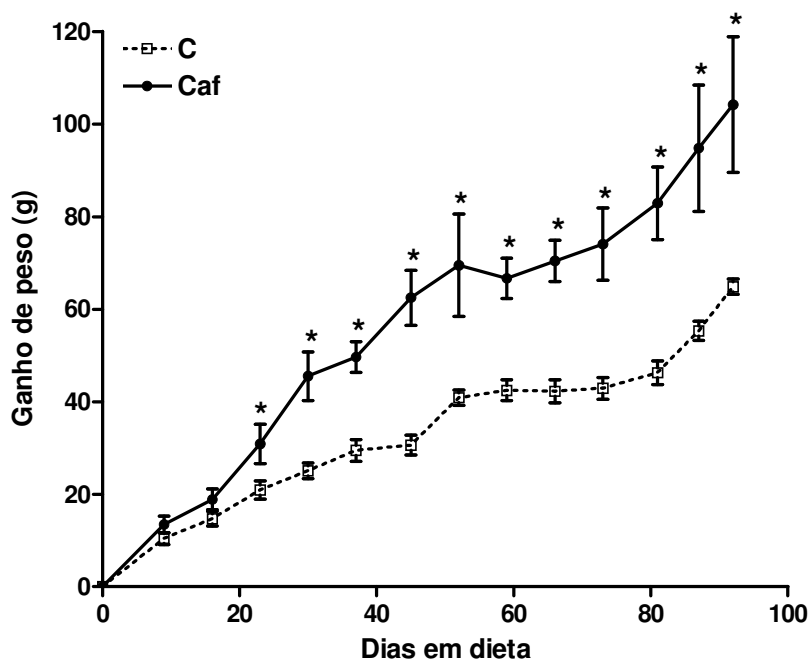


Figura 3. O ganho de peso durante o período de alimentação foi avaliado semanalmente em ratas alimentadas com a dieta padrão (linha tracejada) ou dieta de cafeteria (linha contínua). O peso corporal no início do tratamento foi de 218 ± 3 g e 215 ± 4 g, nas ratas controle e cafeteria, respectivamente (NS). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 – 20 ratas por grupo. Teste “t” de Student. * indica diferença estatística entre os grupos, $P < 0,05$.

A Tabela 2 mostra o peso corporal e o peso relativo dos depósitos de tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal, os quais foram maiores nas ratas alimentadas com a dieta de cafeteria tanto prenhes quanto não-prenhes, em comparação às ratas controle prenhes ou não-prenhes.

Tabela 2. Peso corporal e dos depósitos de gordura das ratas ao final do período de alimentação com a dieta de cafeteria, e no 16º dia de prenhez

Grupo	Peso corporal (g)	Gordura retroperitoneal (g/100 g peso corporal)	Grupo perigonadal (g/100 g peso corporal)	P
1 C	261 ± 7,8	0,68 ± 0,06	1,32 ± 0,09	-
2 CP	280 ± 8,6	0,91 ± 0,10	1,54 ± 0,23	-
3 Caf	317 ± 11,2 *	2,27 ± 0,14 *	3,82 ± 0,33 *	*vs 1; 2
4 CafP	332 ± 15,8 *	2,28 ± 0,23 *	3,48 ± 0,33 *	*vs 1;2

C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Os valores representam a média ± EPM de três grupos independentes de tratamento com a dieta; n = 6 – 8 ratas. * P < 0,05

2. Análise dos parâmetros bioquímicos

A Tabela 3 mostra os valores do índice insulina/glicose e as concentrações de glicose sanguínea, e de insulina, lipídeos, proteínas totais e albumina plasmáticas, em jejum e no estado alimentado, depois das 14 semanas de tratamento com a dieta de cafeteria. Após 12 h de jejum, não houve diferença nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos (TG), ácidos graxos livres (AGL), albumina e de proteínas totais. A glicemia e o colesterol total (COL) de jejum foram reduzidos nas ratas prenhes, tanto controle como cafeteria, em comparação com as ratas não-prenhes de ambos grupos. Já a concentração de insulina no plasma das ratas cafeteria, prenhes ou não, foi maior do que a das ratas controle prenhes e não-prenhes, tanto durante o jejum quanto no estado alimentado. A concentração de AGL das ratas prenhes e não-prenhes alimentadas com a dieta de cafeteria também foram maiores do que as

registradas para ratas controle, prenhes ou não. Nas ratas prenhes, controle e cafeteria, foi possível observar uma redução na glicemia no estado alimentado, quando comparadas às ratas não-prenhes, independente da dieta. Observou-se ainda, um aumento no TG plasmático das ratas controle prenhes em relação às ratas controle não-prenhes. As concentrações de COL, albumina e de proteínas totais do plasma alimentado das ratas foram similares. O tratamento com a dieta de cafeteria aumentou os valores do índice insulina/glicose nos estados de jejum e alimentado, tanto nas ratas prenhes quanto não-prenhes, quando comparados com os grupos controle prenhes e não-prenhes.

Tabela 3. Concentração de glicose sanguínea, e de insulina, COL, TG, AGL, albumina e proteínas totais plasmáticas, e índice insulina/glicose em ratas prenhes (16º dia) ou não-prenhes alimentadas com dieta padrão ou dieta de cafeteria

	C	CP	Caf	CafP
Jejum				
Glicose (mg/dL)	69 ± 2 (28)	58 ± 4 (9) ³	71 ± 2 (25)	60 ± 2 (10) ³
Insulina (ng/mL)	0,40 ± 0,03 (23)	0,47 ± 0,05 (13)	0,65 ± 0,04 (28) ¹	0,62 ± 0,04 (13) ¹
Índice Ins/glic	4,7 ± 0,4 (9)	6,8 ± 0,5 (3)	9,1 ± 1,0 (10) ²	10,2 ± 1,6 (4) ²
COL (mg/dL)	75 ± 7 (15)	33 ± 3 (7) ³	75 ± 9 (13)	44 ± 6 (6) ³
TG (mg/dL)	51 ± 3 (18)	61 ± 3 (5)	64 ± 5 (5)	49 ± 6 (5)
AGL (mmol/L)	1,13 ± 0,17 (10)	0,80 ± 0,13 (7)	0,95 ± 0,13 (8)	0,67 ± 0,19 (5)
Albumina (g/dL)	3,1 ± 0,02 (3)	3,2 ± 0,1 (3)	3,5 ± 0,1 (4)	3,4 ± 0,1 (3)
Proteínas totais (g/dL)	6,8 ± 0,4 (3)	6,5 ± 0,1 (3)	6,9 ± 0,01 (4)	6,7 ± 0,1 (3)
Alimentado				
Glicose (mg/dL)	87 ± 3 (16)	67 ± 3 (5) ³	91 ± 2 (19)	73 ± 2 (6) ³
Insulina (ng/mL)	1,7 ± 0,2 (12)	1,9 ± 0,2 (3)	3,4 ± 0,3 (15) ¹	4,9 ± 1,3 (5) ¹
Índice Ins/glic	19 ± 2 (8)	27 ± 2 (3)	39 ± 3 (8) ⁴	97 ± 6 (3) ⁴
COL (mg/dL)	59 ± 5 (20)	33 ± 4 (7)	72 ± 6 (28)	53 ± 7 (8)
TG (mg/dL)	105 ± 7 (17)	167 ± 22 (5) ⁴	90 ± 8 (22)	124 ± 14 (7)
AGL (mmol/L)	0,28 ± 0,03 (14)	0,29 ± 0,03 (6)	0,42 ± 0,03 (18) ¹	0,47 ± 0,03 (6) ¹
Albumina (g/dL)	3,0 ± 0,1 (7)	3,0 ± 0,1 (4)	3,3 ± 0,1 (12)	3,3 ± 0,1 (4)
Proteínas totais (g/dL)	7,1 ± 0,2 (7)	6,8 ± 0,3 (4)	7,1 ± 0,2 (12)	7,0 ± 0,1 (4)

Os valores representam a média ± EPM. Os números entre parênteses se referem ao *n* utilizado, e os sobre-escritos indicam diferença estatística entre os grupos: ¹ P < 0,05; diferente do C e CP; ² P < 0,01; diferente do C; ³ P < 0,05; diferente do C e Caf; ⁴ P < 0,01; diferente de todos os grupos. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe

3. Tolerância à glicose de ratas alimentadas com a dieta de cafeteria, prenhes ou não

A Figura 4 mostra a glicose sanguínea (4A) e a insulina plasmática (4B) das ratas durante o teste de tolerância intraperitoneal à glicose. Depois de 14 semanas, o tratamento com a dieta de cafeteria diminuiu a tolerância à glicose em ratas prenhes e não-prenhes, quando comparados com os grupos controles, sendo este um efeito dependente apenas da alteração dietética. Após 30 min da administração de glicose, as concentrações sanguíneas deste açúcar foram maiores nas ratas cafeteria não-prenhes e prenhes, em relação às ratas controle não-prenhes. As ratas cafeteria prenhes também apresentaram níveis glicêmicos mais elevados em comparação com as ratas controle prenhes. A glicemia aferida aos 60 min também foi maior nas ratas alimentadas com a dieta de cafeteria prenhes ou não, em relação à dos grupos controle.

Como podemos observar na Figura 5, a área sob a curva em resposta à sobrecarga de glicose, apresentou-se aumentada nas ratas cafeteria, tanto prenhes quanto não-prenhes, em comparação aos grupos controle. As concentrações de insulina plasmática aos 15 e 60 min do teste foram maiores nas ratas cafeteria prenhes, em relação aos outros grupos, o que foi resultado de um efeito da alteração dietética aos 60 min, e de uma interação entre a alteração dietética e a prenhez aos 15 min.

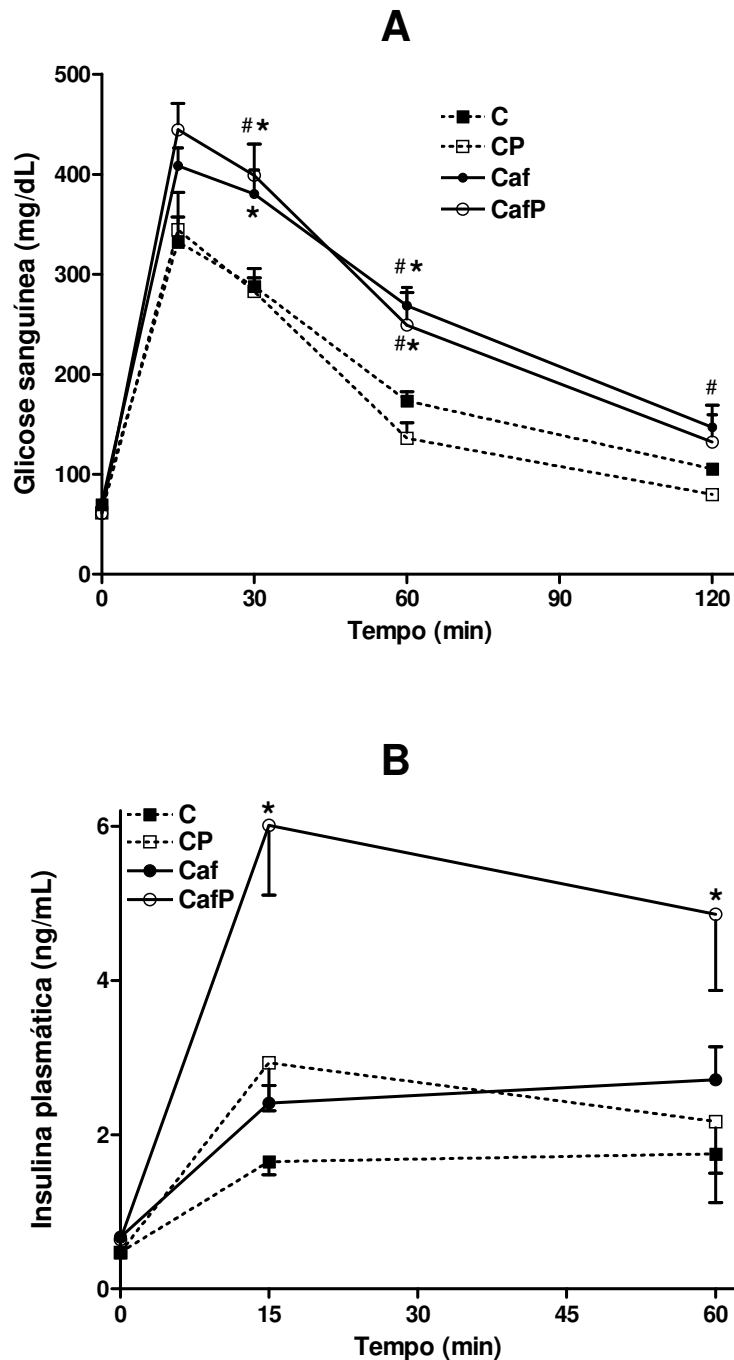


Figura 4. Glicose sanguínea (A) e insulina plasmática (B) durante o ipGTT em ratas prenhes (símbolos abertos; 16^º dia) e não-prenhes (símbolos sólidos) alimentadas com dieta padrão (linhas tracejadas) ou com dieta de cafeteria (linhas contínuas). Os valores são média $\pm$ EPM; $n = 6 - 20$ ratos provenientes de três grupos independentes de tratamento com a dieta de cafeteria. Os símbolos representam diferença estatística entre os grupos, $P < 0,05$; (A) * vs C; # vs CP; (B) * vs todos os grupos.

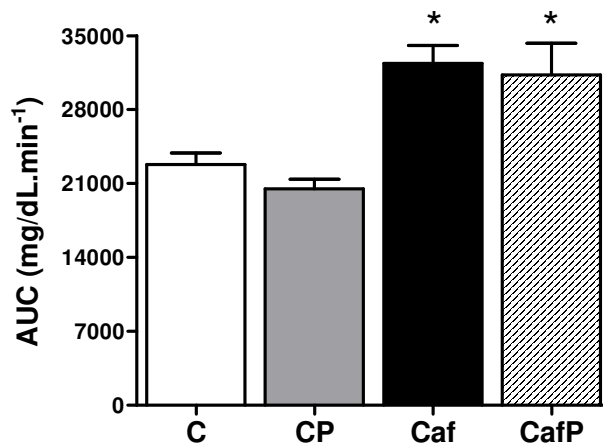


Figura 5. Área sob a curva (AUC) de glicose durante o ipGTT. As barras representam a média $\pm$ EPM da AUC obtida no teste de cada rata e calculada individualmente. As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. * indica diferença estatística, $P < 0,01$.

4. Efeito da alimentação com a dieta de cafeteria sobre a secreção de insulina por ilhotas isoladas de ratas prenhes ou não-prenhes

4.1. Conteúdo de insulina na ilhota

A Figura 6 mostra que houve um aumento no conteúdo total de insulina nas ilhotas isoladas das ratas prenhes, em comparação com as ilhotas das ratas não-prenhes, independente da dieta recebida. Não se observou diferença entre os grupos controle e cafeteria não-prenhes ao analisarmos este parâmetro. Contudo, o conteúdo total de insulina também foi maior nas ilhotas das ratas cafeteria prenhes em comparação com o das ilhotas das ratas prenhes que receberam a dieta padrão. A análise estatística mostrou que este efeito é dependente do fator dieta e do fator prenhez, independentes, e também da interação entre estes fatores.

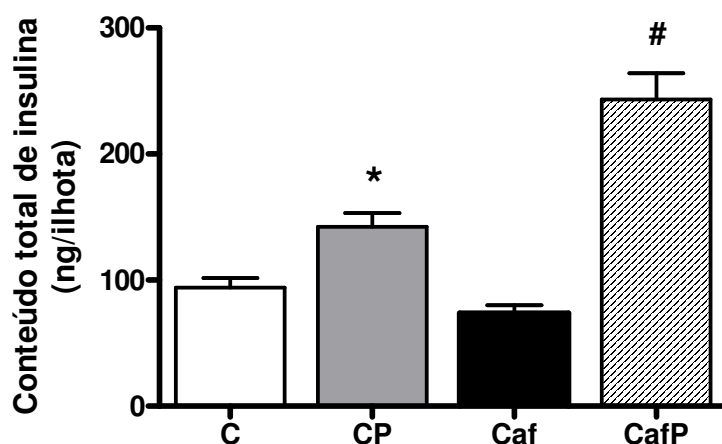


Figura 6. Conteúdo total de insulina de ilhotas isoladas de ratas alimentadas com a dieta padrão ou com a dieta de cafeteria, prenhes (16º dia) ou não, após rompimento das ilhotas. Os valores são média $\pm$ EPM da concentração de insulina por ilhota; $n = 14$ grupos de ilhotas isoladas de 3 – 4 ratas. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: * vs C, Caf e CafP; # vs C, CP e Caf; $P < 0,05$.

4.2. Curva de secreção de insulina dose-reposta à glicose

A Figura 7 mostra a secreção de insulina liberada pelas ilhotas durante a incubação estática na presença de concentrações crescentes de glicose, normalizada pelo conteúdo de DNA das ilhotas. Como podemos observar, a secreção de insulina apresentou uma curva sigmoideal em todos os grupos. Na presença de 2,8 mmol/L de glicose, as ilhotas das ratas alimentadas com a dieta de cafeteria, prenhes ou não, liberaram mais insulina do que as ilhotas das ratas que receberam a dieta padrão prenhes e não-prenhes. Já a incubação das ilhotas com 5,6 mmol/L de glicose, revelou um aumento na secreção do hormônio pelas ilhotas das ratas prenhes, em comparação as ratas não-prenhes, independente da dieta. Em 8,3 mmol/L de glicose, observou-se uma redução na liberação de insulina pelas ilhotas das ratas cafeteria não-prenhes, em relação às ratas prenhes controle e cafeteria. Adicionalmente, quando estimuladas com 11,1 mmol/L de glicose, as ilhotas das ratas cafeteria não-prenhes secretaram menos insulina do que as ilhotas das ratas dos demais grupos.

Na presença de 16,7 mmol/L de glicose, a secreção do hormônio foi maior nas ilhotas das ratas cafeteria prenhes do que nas ratas não-prenhes que receberam a mesma dieta. Não houve diferença na liberação de insulina quando as ilhotas foram incubadas com 27,7 mmol/L.

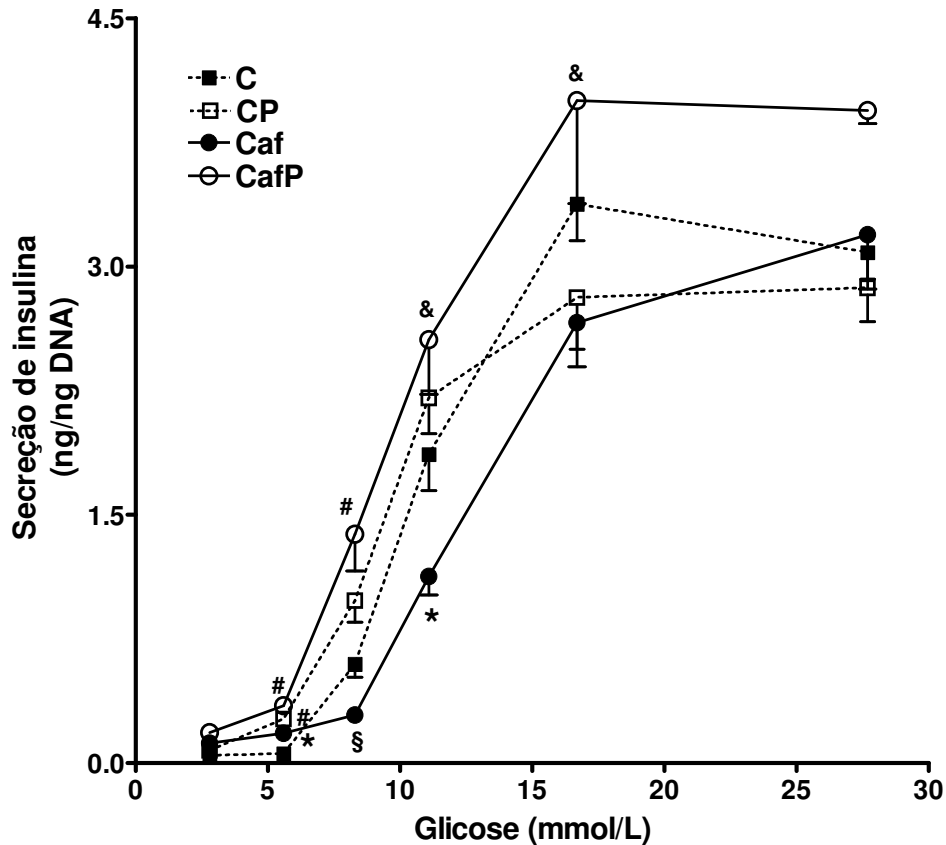


Figura 7. Curvas de secreção de insulina dose-resposta à glicose por ilhotas isoladas de ratas prenhes (símbolos abertos; 16º dia) ou não-prenhes (símbolos sólidos) alimentadas com dieta padrão (linhas tracejadas) ou de cafeteria (linhas contínuas). As ilhotas foram incubadas por 90 minutos com concentrações crescentes de glicose, e a insulina liberada foi normalizada pelo conteúdo de DNA das ilhotas. Os valores expressam a média $\pm$ EPM; $n = 8 - 15$ grupos de ilhotas isoladas de 3 - 4 ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos em cada concentração de glicose, $P < 0,05$. # vs C e Caf; * vs todos os outros grupos; § vs CP e CafP; & vs Caf; as diferenças com 2,8 mmol/L de glicose estão descritas no texto.

A prenhez deslocou para esquerda a curva de secreção de insulina em resposta a concentrações crescentes de glicose tanto nas ratas que receberam a dieta padrão quanto das que foram alimentadas com a dieta de cafeteria, em comparação com as ratas não-prenhes de ambos grupos. A Figura 8 demonstra que ao expressar a liberação de insulina como porcentagem da secreção máxima de cada grupo, a concentração efetiva mediana (EC_{50}) foi maior para as ratas cafeteria não-prenhes ($12,3 \pm 0,6$ mmol/L), em relação às ratas dos demais grupos (C = $10,6 \pm 0,2$; CP = $9,3 \pm 0,1$; CafP = $9,6 \pm 0,5$ mmol/L; $P < 0,05$).

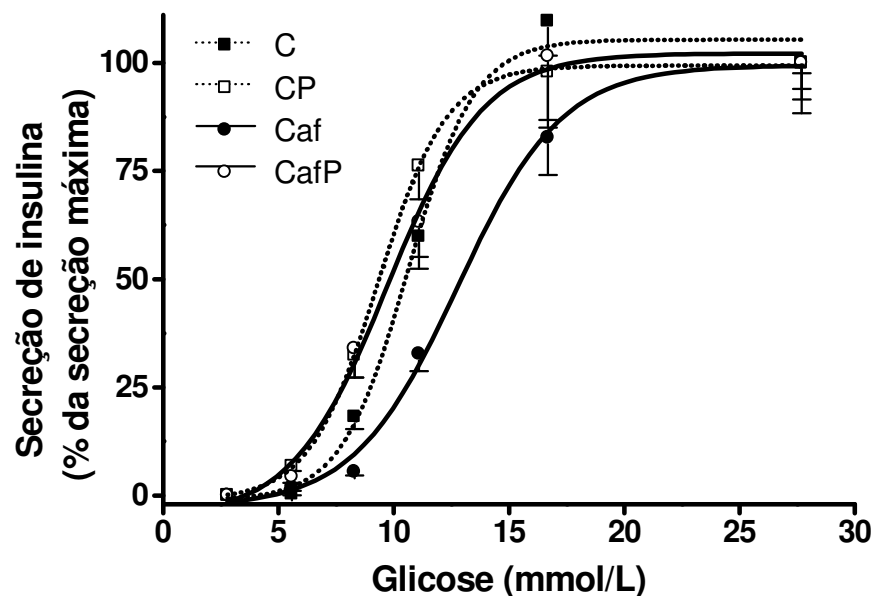


Figura 8. Curvas de secreção de insulina em resposta à glicose expressas como porcentagem da secreção máxima das ilhotas isoladas de ratas prenhes (símbolos abertos; 16º dia) ou não-prenhes (símbolos sólidos) alimentadas com dieta padrão (linhas tracejadas) ou de cafeteria (linhas contínuas). A liberação máxima do hormônio (100%) foi calculada subtraindo os valores basais (2,8 mmol/L) do máximo secretado (16,7 ou 27,7 mmol/L de glicose). Os pontos representam a média $\pm$ EPM; $n = 8 - 15$ grupos de ilhotas isoladas de 3 - 4 ratos. Os EC_{50} das curvas estão descritos no texto.

4.3. Liberação de insulina em resposta a estímulos metabolizáveis, despolarizantes ou potencializadores

Durante a incubação com L-leucina (10 mmol/L; na presença de 2,8 mmol/L de glicose), aminoácido metabolizável pela célula beta pancreática e estimulador da secreção de insulina, as ilhotas isoladas das ratas cafeteria não-prenhes secretaram menos insulina, em comparação com as ilhotas das ratas dos demais grupos (Figura 9). Este efeito foi resultante tanto do fator dieta quanto do fator prenhez, sem interação entre estes fatores.

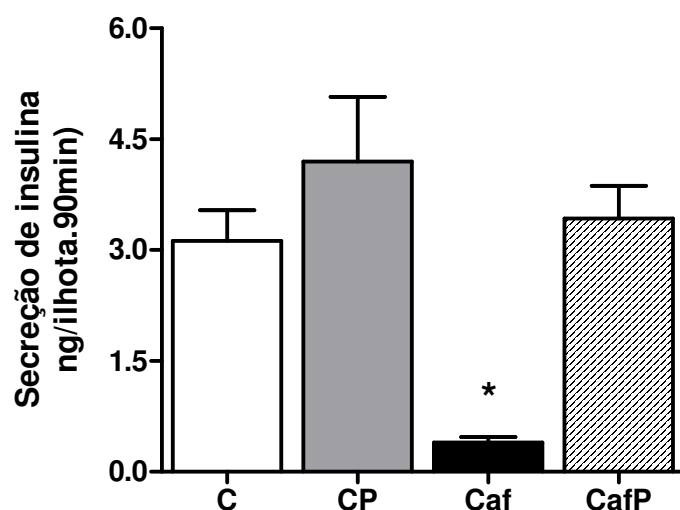


Figura 9. Secreção estática de insulina estimulada por 10 mmo/L de L-leucina, na presença de 2,8 mmol/L de glicose. As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. Os valores são média $\pm$ EPM; n = 9 – 10 grupos de ilhotas isoladas de 3 ratas. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. * estatisticamente diferente dos demais grupos; P < 0,005.

A secreção de insulina estimulada por concentrações despolarizantes de KCl (40 mmol/L) ou tolbutamida, na presença de 2,8 mmol/L de glicose, foi reduzida nas ilhotas isoladas das ratas cafeteria não-prenhes, em relação as ilhotas das ratas controle não-prenhes e cafeteria prenhes. As ilhotas das ratas cafeteria prenhes também secretaram mais insulina do que as ilhotas das ratas controle prenhes

quando estimuladas com tolbutamida, enquanto não houve diferença entre estes grupos durante a incubação com KCl (Figura 10). Estes resultados foram dependentes do fator prenhez, e com interação com o fator dieta.

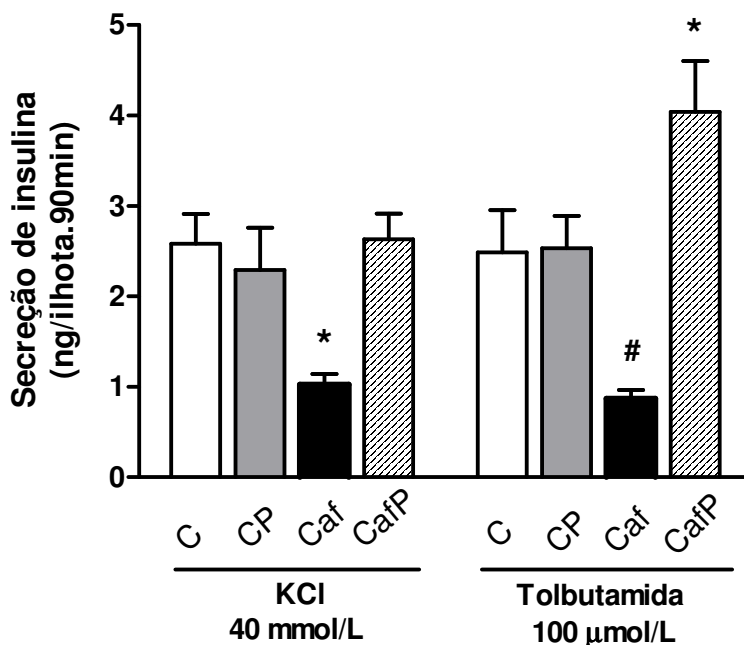


Figura 10. Secreção estática de insulina induzida por 40 mmol/L de KCl ou 100 µmol/L de tolbutamida, na presença de 2,8 mmol/L de glicose. As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. As barras representam média $\pm$ EPM; $n = 8 - 10$ grupos de ilhotas isoladas de 3 ratas. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos, $P < 0,05$; * vs demais grupos; # vs C e CafP.

Para verificar se a redução na secreção de insulina observada nas ilhotas isoladas das ratas cafeteria não-prenhes ocorreria também com a exposição destas ilhotas a agentes potencializadores da liberação do hormônio, incubamos estas ilhotas com carbacol (agonista muscarínico) e PMA (ativador da proteína cinase C), na presença de 11,1 mmol/L de glicose (Figura 11). Nestes protocolos experimentais, não consideramos a prenhez, mas apenas o efeito da alteração dietética. Observamos que a secreção de insulina foi menor nas ilhotas isoladas das ratas

cafeteria não-prenhes, incubadas com carbacol, em relação ao grupo controle não-prenhe. Entretanto, não houve diferença entre os grupos quando as ilhotas foram estimuladas com PMA.

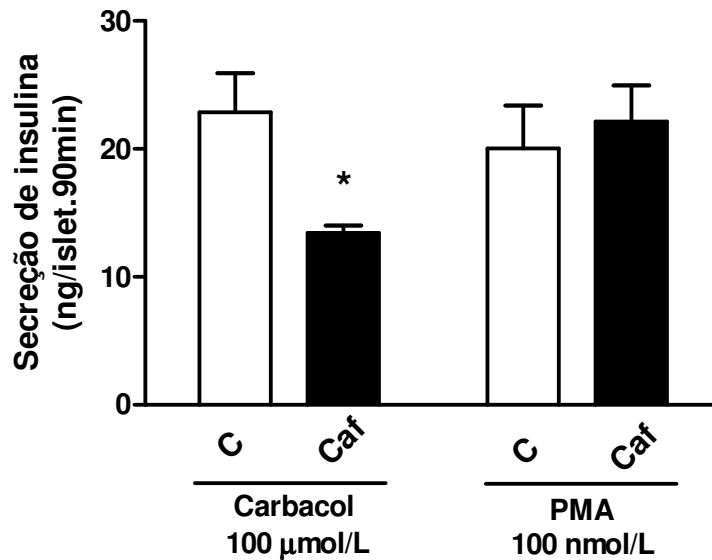


Figura 11. Secreção de insulina em resposta aos potencializadores carbacol e PMA, na presença de 11,1 mmol/L de glicose, por ilhotas isoladas de ratas alimentadas com dieta padrão (C) ou dieta de cafeteria (Caf). As barras representam a média $\pm$ EPM; $n = 8$. As comparações estatísticas foram realizadas pelo teste “t” de Student, não pareado e de duas vias. * diferente do C; $P < 0,05$.

5. Efeito da alimentação com a dieta de cafeteria sobre o metabolismo da glicose em ilhotas isoladas

Como a secreção de insulina pela célula beta-pancreática está intimamente relacionada ao metabolismo da glicose, analisamos alguns indicadores metabólicos em ilhotas de ratas alimentadas com a dieta de cafeteria, prenhes ou não.

5.1. Oxidação da glicose

Na presença de 11,1 mmol/L de glicose, a conversão de D-[U- ^{14}C]glicose a $^{14}\text{CO}_2$ (oxidação da glicose) foi maior nas ilhotas isoladas das ratas prenhes, em

comparação com as ilhotas das ratas não-prenhes, independente da dieta (Figura 12). A oxidação da glicose foi similar entre as ilhotas das ratas não-prenhes, controle e cafeteria.

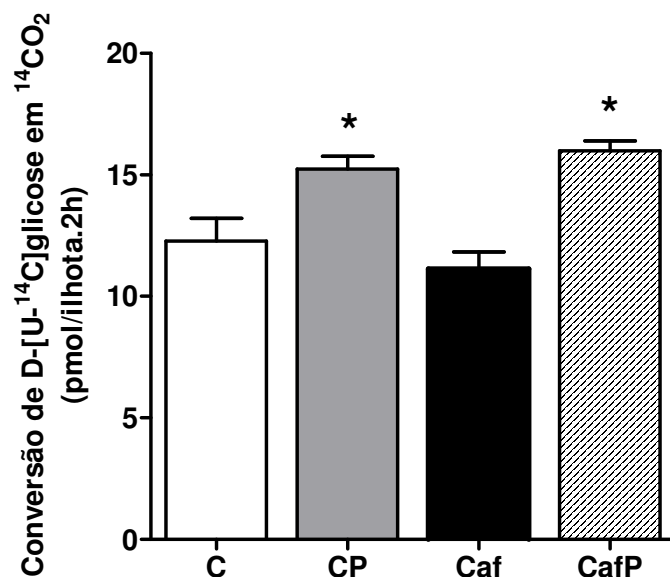


Figura 12. Oxidação da glicose por ilhotas isoladas estimuladas com 11,1 mmol/L do açúcar. As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. Os valores são média $\pm$ EPM; n = 12 grupos de ilhotas isoladas de 3 ratas. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. * indica diferença estatística *versus* C e Caf; P < 0,05.

5.2. Atividade metabólica

Analizamos também a geração de compostos redutores [principalmente NAD(P)H] na presença de 11,1 mmol/L de glicose, como um indicador da atividade metabólica das ilhotas (Weinhaus *et al.*, 2007), e esse resultado está agrupado na Figura 13. A atividade metabólica foi maior nas ilhotas isoladas das ratas controle prenhes aos 30, 60, 90 e 120 min do experimento, em relação às ilhotas das ratas controle não-prenhes. Neste parâmetro, não se observou diferença entre as ilhotas das ratas cafeteria não-prenhes e controle não-prenhes. Já as ilhotas isoladas das ratas cafeteria prenhes mostraram um aumento da atividade metabólica quando comparadas com todos os grupos, inclusive com as ratas controle prenhes, sendo

este efeito dependente tanto do fator dieta quanto do fator prenhez, sem interação entre estes fatores.

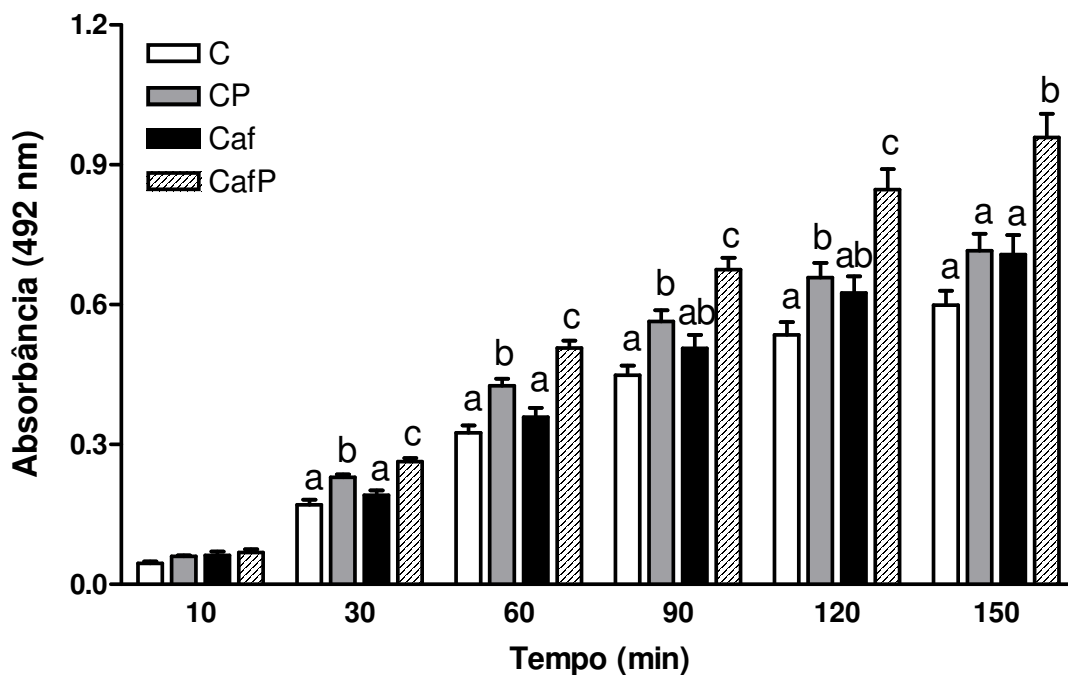


Figura 13. Atividade metabólica de ilhotas isoladas e estimuladas com 11,1 mmol/L de glicose. As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. As barras representam a média $\pm$ EPM; n = 12 – 15 grupos de ilhotas isoladas de 4 ratas. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. As diferenças estatísticas entre os grupos estão indicadas pelas letras acima das barras. Letras iguais representam similaridade entre os grupos. As comparações foram realizadas dentro de cada tempo de registro, sendo assim não houve comparação entre os tempos. $P < 0,05$.

6. Análise do manejo do Ca^{2+} citoplasmático livre em ilhotas isoladas

A Figura 14 mostra que a exposição das ilhotas pancreáticas a 11,1 mmol/L de glicose aumentou o sinal do Ca^{2+} citoplasmático em todos os grupos.

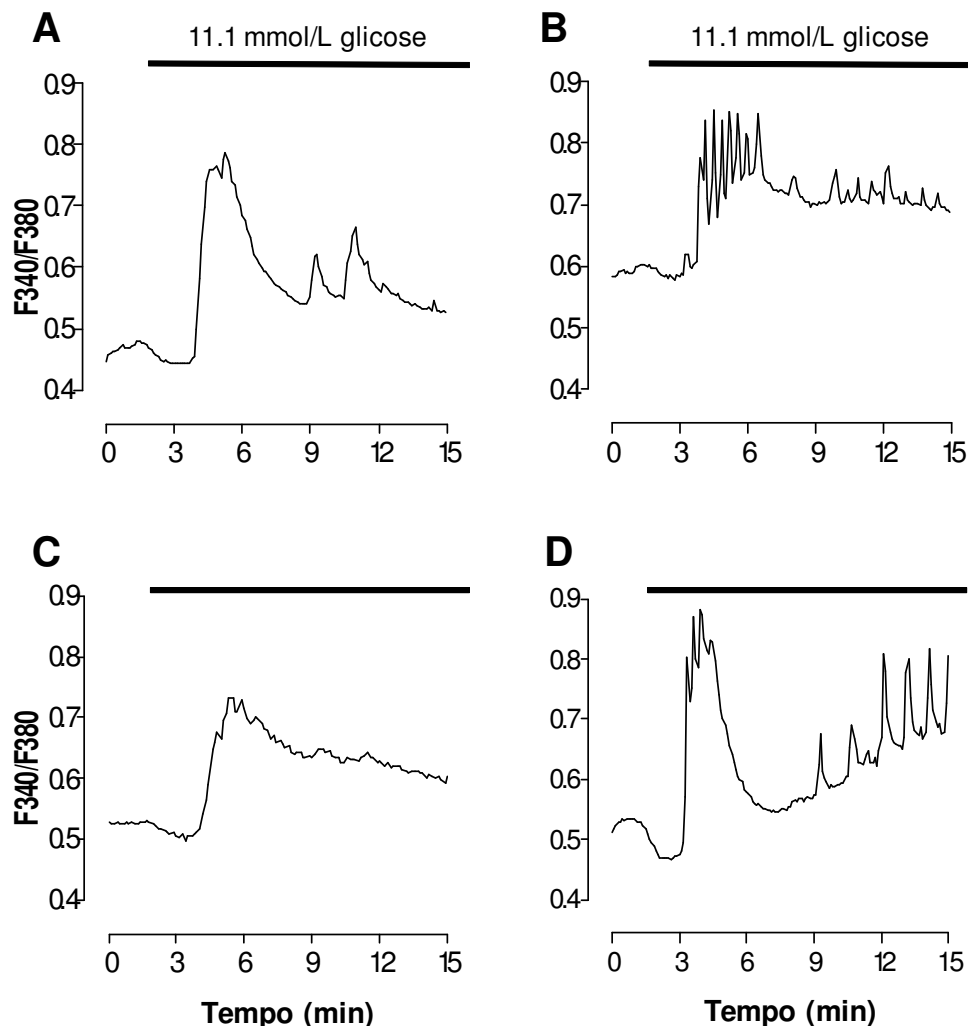


Figura 14. Curvas representativas das alterações no registro do Ca^{2+} citoplasmático em resposta a 11,1 mmol/L de glicose em ilhotas isoladas de ratas controle não-prenhes (A) ou prenhes (B; 16º dia), e de ratas cafeteria não-prenhes (C) ou prenhes (D; 16º dia).

A amplitude das alterações no Ca^{2+} citoplasmático (Figura 15 A), medida dos 3 aos 6 min posteriores a exposição das ilhotas à glicose, foi menor nas ilhotas isoladas das ratas cafeteria não-prenhe do que a observada nas ilhotas dos outros grupos. A análise estatística revelou a interação entre os fatores dieta e prenhez nesta redução. Quanto à frequência das oscilações, observamos que tal parâmetro foi similar entre as ilhotas das ratas não-prenhes, enquanto nas ilhotas das ratas prenhes houve um aumento, efeito independente da dieta dos animais (Figura 15 B). Outro parâmetro analisado foi a amplitude das oscilações (Figura 15C), que foi maior nas ilhotas das

ratas cafeteria prenhes quando comparada com as ilhotas das ratas cafeteria não-prenhes.

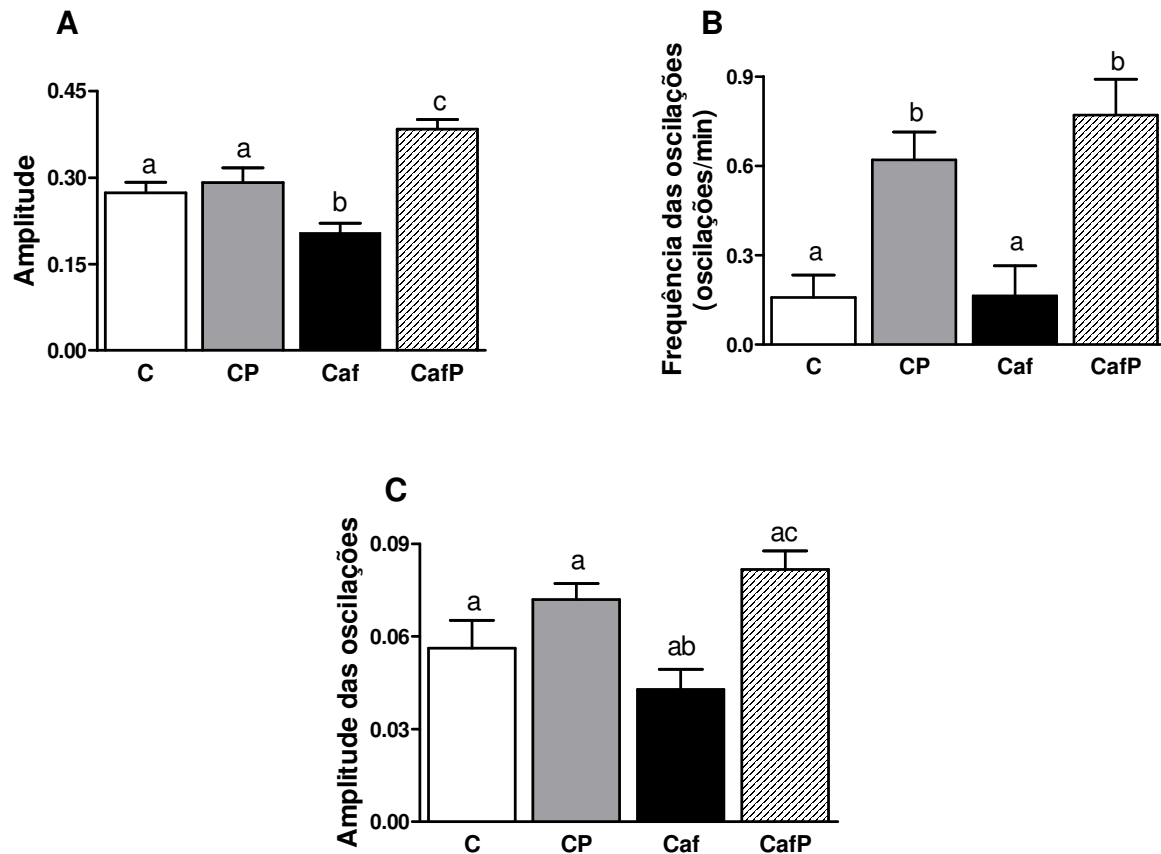


Figura 15. Amplitude do aumento do Ca^{2+} citoplasmático (A), e frequência (B) e amplitude das oscilações de Ca^{2+} (C), induzidos por 11,1 mmol/L de glicose em ilhotas isoladas. . C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Os valores são média $\pm$ EPM; $n = 6 - 10$ ilhotas isoladas de 3 ratas. As diferenças estatísticas entre os grupos estão indicadas pelas letras acima das barras. Letras iguais representam similaridade entre os grupos. $P < 0,05$.

A Figura 16 mostra que a exposição à tolbutamida (100 $\mu\text{mol/L}$) aumentou o registro de Ca^{2+} citoplasmático nas ilhotas isoladas de todos os grupos. A área sob a curva da razão das fluorescências de Ca^{2+} foi menor nas ilhotas isoladas das ratas cafeteria não-prenhe, em comparação com as ilhotas das ratas controle não-prenhe ($0,72 \pm 0,14$ vs $1,20 \pm 0,10$; F340/F380.min; média $\pm$ EPM; $n = 6$; $P < 0,05$), sendo este um efeito dependente apenas do fator dieta.

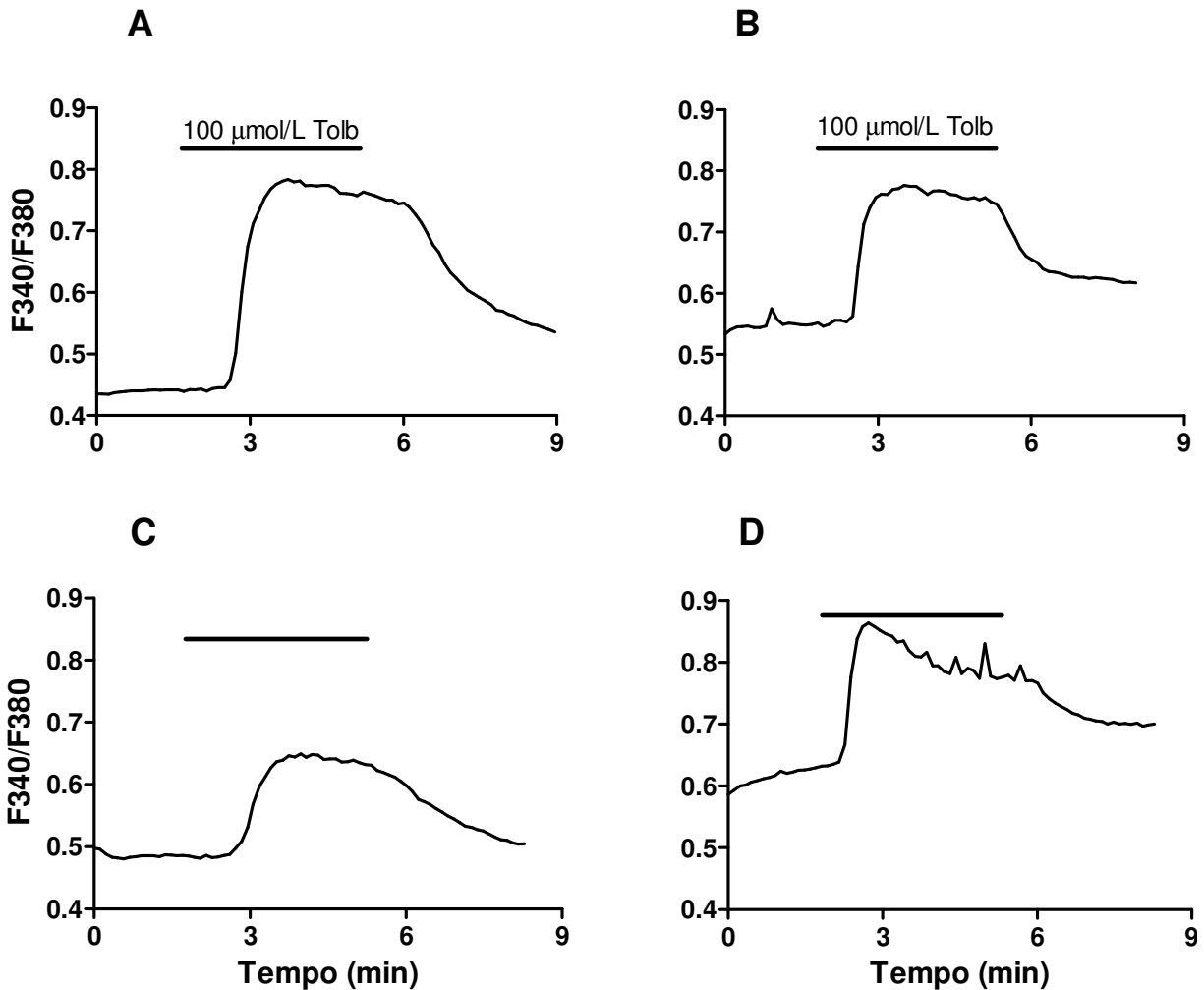


Figura 16. Curvas representativas do aumento do registro do Ca^{2+} citoplasmático induzido por tolbutamida ($100 \mu\text{mol/L}$), na presença de 3 mmol/L de glicose, em ilhotas isoladas de ratas controle não-prenhes (A) ou prenhes (B; 16º dia), e de ratas cafeteria não-prenhes (C) ou prenhes (D; 16º dia). As barras acima das curvas indicam a período de estimulação. Tolb – tolbutamida.

7. Efeito da dieta de cafeteria sobre a expressão gênica da SERCA2a, do $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ e do $\text{Ca}_v\beta_2$ em ilhotas

As ilhotas das ratas cafeteria não-prenhes apresentaram uma redução de 27% e 64% na expressão gênica da SERCA2a e do $\text{Ca}_v\alpha 1.2$, respectivamente, em comparação com as ilhotas das ratas controle não-prenhes (Figura 17 A e B).

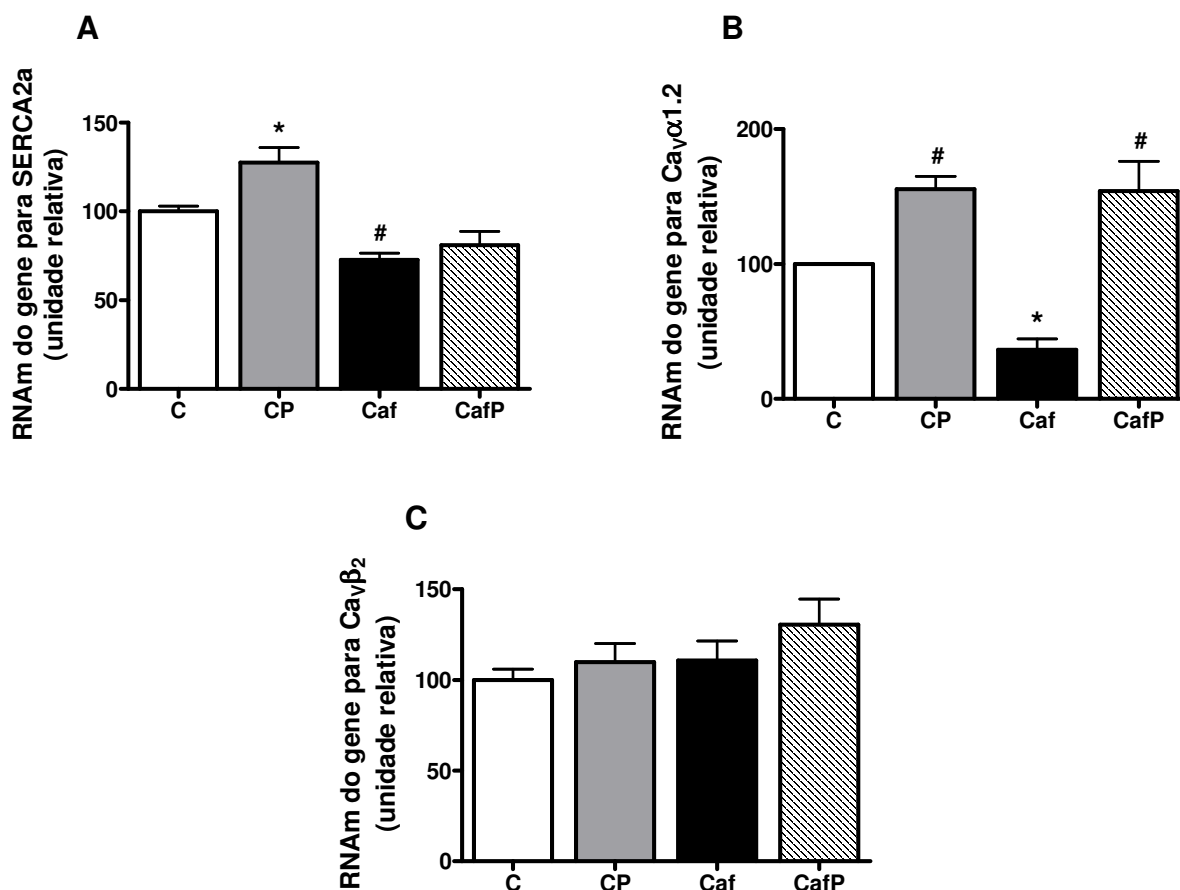


Figura 17. Expressão do RNA_m que codifica SERCA2a (A), Ca_vα1.2 (B) e Ca_vβ₂ (C) em ilhotas isoladas. Os dados foram normalizados pela expressão do RNA_m da GAPDH, e estão expressos como percentual do controle (controle não-prenhe). As ratas prenhes estavam no 16º dia de prenhez. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Média ± EPM; n = 5 – 8 grupos de ilhotas isoladas de 8 – 10 ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: (A) * vs C, Caf e CafP; # vs C e CP; (B) * vs C, CP e CafP; # vs C e Caf; (C) ns; P < 0,05.

A prenhez nas ratas controle aumentou a expressão nas ilhotas tanto do Ca_vα1.2 (56%) quanto da SERCA2a (27%), em relação as ratas controle não-prenhes. Assim como nas ilhotas das ratas controle prenhes, a expressão do Ca_vα1.2 foi 77% maior nas ratas cafeteria prenhes quando comparada com as ratas cafeteria não-prenhes, enquanto a expressão da SERCA2a foi similar entre estes grupos. Observou-se um efeito tanto do fator dieta quanto da prenhez, mas sem interação, na expressão da SERCA2a, enquanto que na expressão Ca_vα1.2 houve interação entre

estes fatores. Não houve diferença na expressão do gene que codifica o $Ca_v\beta_2$ entre os grupos (Figura 17 C).

8. Efeito da dieta de cafeteria e da prenhez sobre a ação da insulina em fígado e músculo

Frente aos resultados do teste de tolerância à glicose mostrando a provável existência de um aumento da resistência periférica à ação da insulina nas ratas obesas, investigamos também a ativação do receptor de insulina (IR) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), no fígado e no músculo soleus de ratas alimentadas com dieta padrão ou cafeteria, prenhes (15 ou 19 dias) ou não-prenhes, após estímulo com o hormônio.

As ratas obesas não-prenhes apresentaram redução na fosforilação em resíduos de tirosina da subunidade β do IR e da proteína IRS-1 tanto no músculo (38% e 39%, respectivamente) quanto no fígado (49% e 58%, respectivamente), em comparação com as ratas controle não-prenhes (Figura 18, Figura 19, Figura 20, Figura 21).

Aos 15 dias de prenhez, observamos menor fosforilação em resíduos tirosina do IR β no músculo das ratas controle (24%) e das ratas obesas (53%), em relação as ratas controle não-prenhes. Tal diferença foi observada ainda nas ratas obesas prenhes em comparação com as ratas controle prenhes, e com as ratas cafeteria não-prenhes (Figura 18A). Apesar da redução de 23% na fosforilação em tirosina da proteína IRS-1 no músculo das ratas controle prenhes no 15º dia de prenhez, em relação as ratas controle não-prenhes, não houve diferença estatística entre os grupos ($P = 0,12$; $n = 5 - 6$). Já nas ratas obesas prenhes, a redução de 53% na fosforilação em resíduos de tirosina da proteína IRS-1 foi estatisticamente diferente das ratas controle não-prenhes (Figura 18B). Ainda neste período da prenhez, houve redução na fosforilação em resíduos de tirosina do IR β (48%) e da proteína IRS-1 (76%) no fígado das ratas cafeteria prenhes ou não-prenhes, em comparação com as ratas controle não-prenhes. Além disso, houve diferença estatística mostrando

redução na fosforilação também entre as ratas obesas prenhes em comparação com as ratas controle prenhes (Figura 19 A e B).

Aos 19 dias de prenhez, observamos uma redução na fosforilação em resíduos de tirosina do IR β e da proteína IRS-1 no músculo e no fígado tanto de ratas alimentadas com a dieta padrão (IR β = 22% e 34%; IRS-1 = 26% e 36%, respectivamente) quanto com a dieta de cafeteria (IR β = 39% e 37%; IRS-1 = 60% e 45%, respectivamente), em comparação com as ratas controle não-prenhes. Observamos ainda que, no 19º dia de prenhez, a fosforilação em resíduos de tirosina do IR β e da proteína IRS-1 no músculo das ratas cafeteria prenhes apresentou uma redução mais acentuada, em relação às ratas controle prenhes (Figura 20 A e B; Figura 21 A e B).

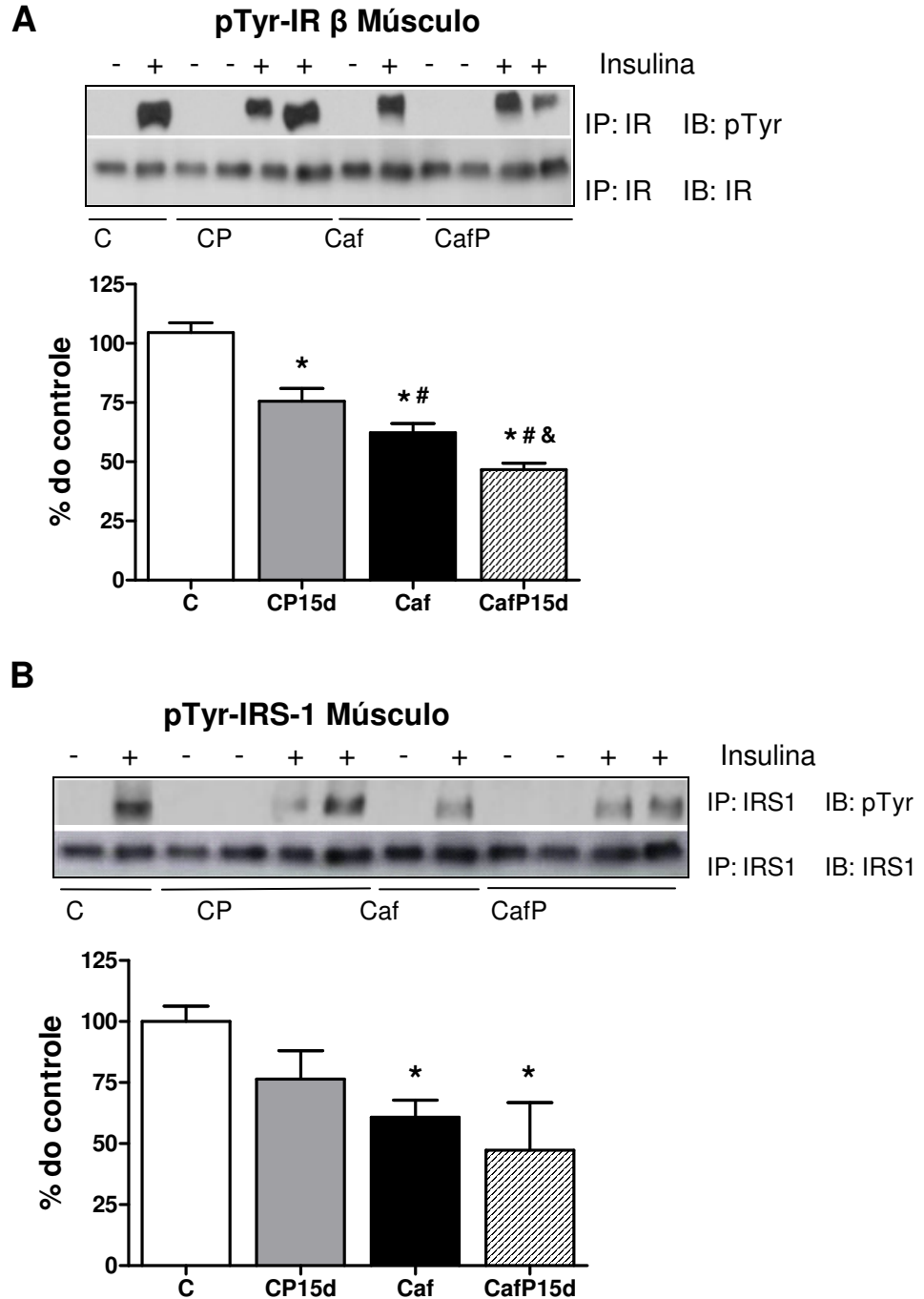


Figura 18. Fosforilação em resíduos de tirosina da subunidade β do IR (A) e da proteína IRS-1 (B) em músculo de ratas aos 15 dias de prenhez, após estímulo com insulina. Amostras de proteína total foram solubilizadas e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos anti-IR β ou anti-IRS-1. Os imunoprecipitados foram corridos em gel de poliacrilamida 8%, transferidos para membranas de nitrocelulose que foram incubadas (IB) com anticorpos anti-fosfo-tirosina (pTyr), anti-IR β ou anti-IRS-1. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Os gráficos representam a média $\pm$ EPM; $n = 4 - 6$ ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: * vs C; # vs CP; & vs Caf; $P < 0,05$.

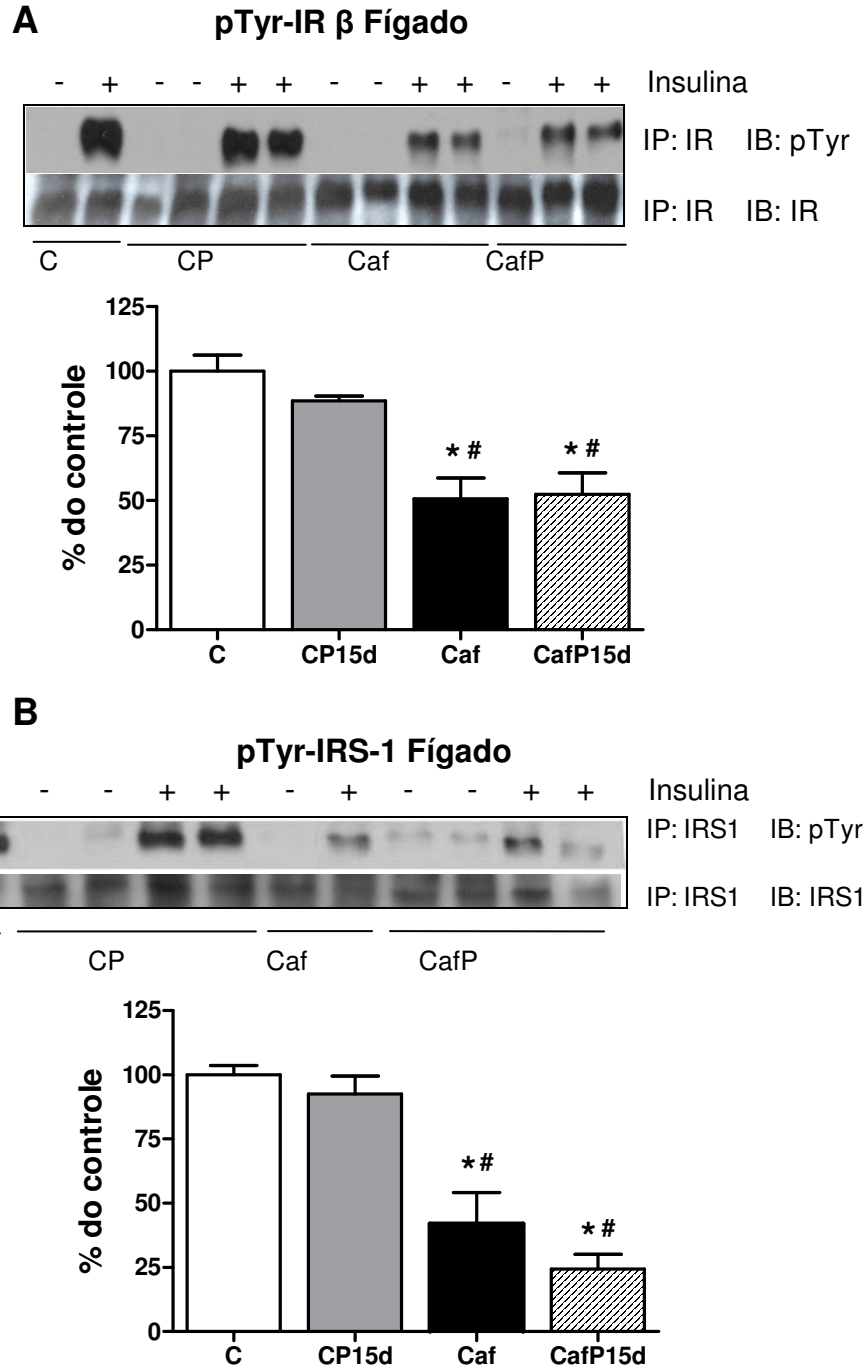


Figura 19. Fosforilação em resíduos de tirosina da subunidade β do IR (A) e da proteína IRS-1 (B) em fígado de ratas aos 15 dias de prenhez, após estímulo com insulina. Amostras de proteína total foram solubilizadas e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos anti-IR β ou anti-IRS-1. Os imunoprecipitados foram corridos em gel de poliacrilamida 8%, transferidos para membranas de nitrocelulose que foram incubadas (IB) com anticorpos anti-fosfo-tirosina (pTyr), anti-IR β ou anti-IRS-1. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Os gráficos representam a média $\pm$ EPM; $n = 4 - 6$ ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: * vs C; # vs CP; $P < 0,05$.

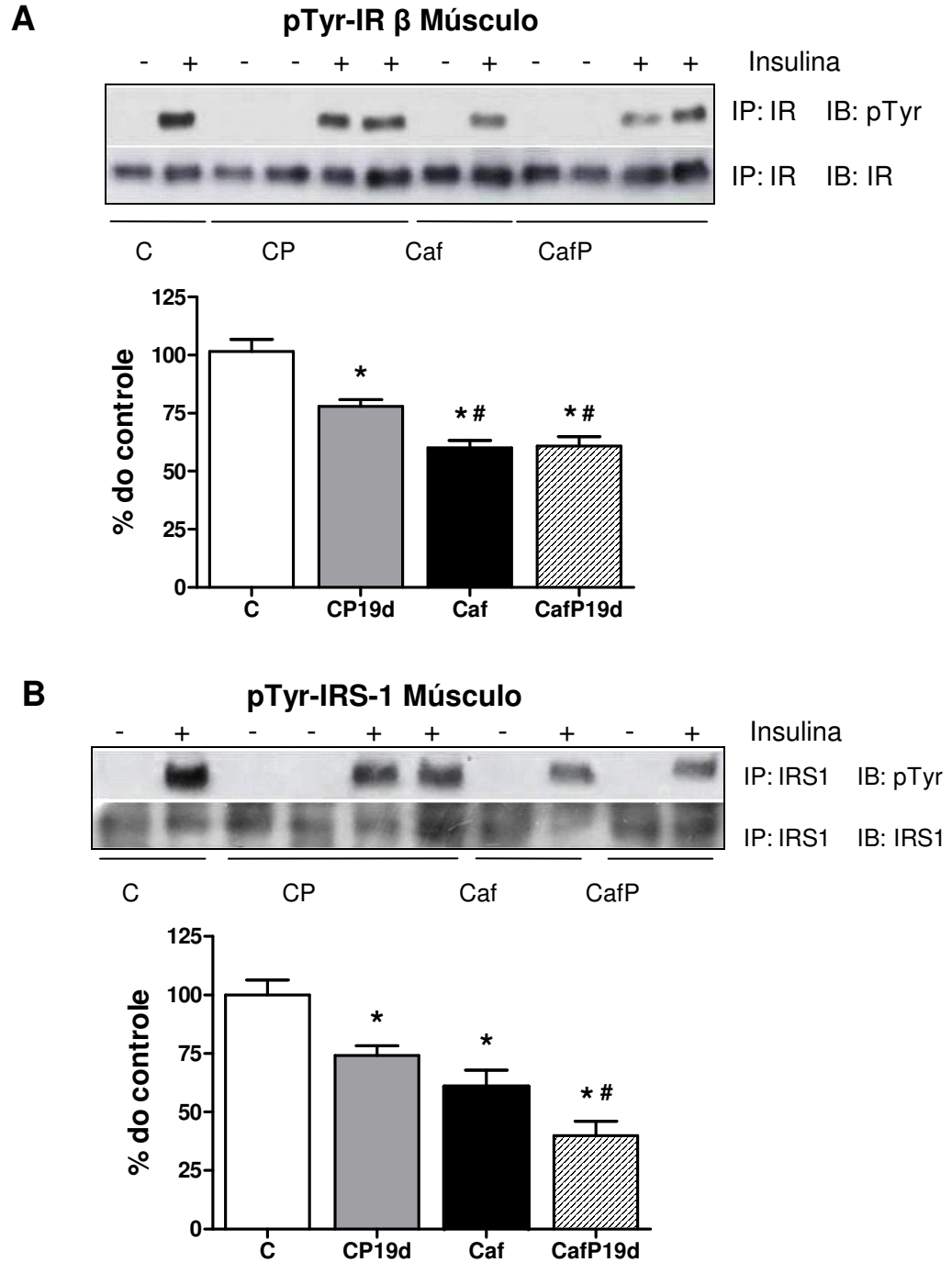


Figura 20. Fosforilação em resíduos de tirosina da subunidade β do IR (A) e da proteína IRS-1 (B) em músculo de ratas aos 19 dias de prenhez, após estímulo com insulina. Amostras de proteína total foram solubilizadas e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos anti-IR β ou anti-IRS-1. Os imunoprecipitados foram corridos em gel de poliacrilamida 8%, transferidos para membranas de nitrocelulose que foram incubadas (IB) com anticorpos anti-fosfo-tirosina (pTyr), anti-IR β ou anti-IRS-1. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Os gráficos representam a média $\pm$ EPM; $n = 3 - 6$ ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: * vs C; # vs CP; $P < 0,05$.

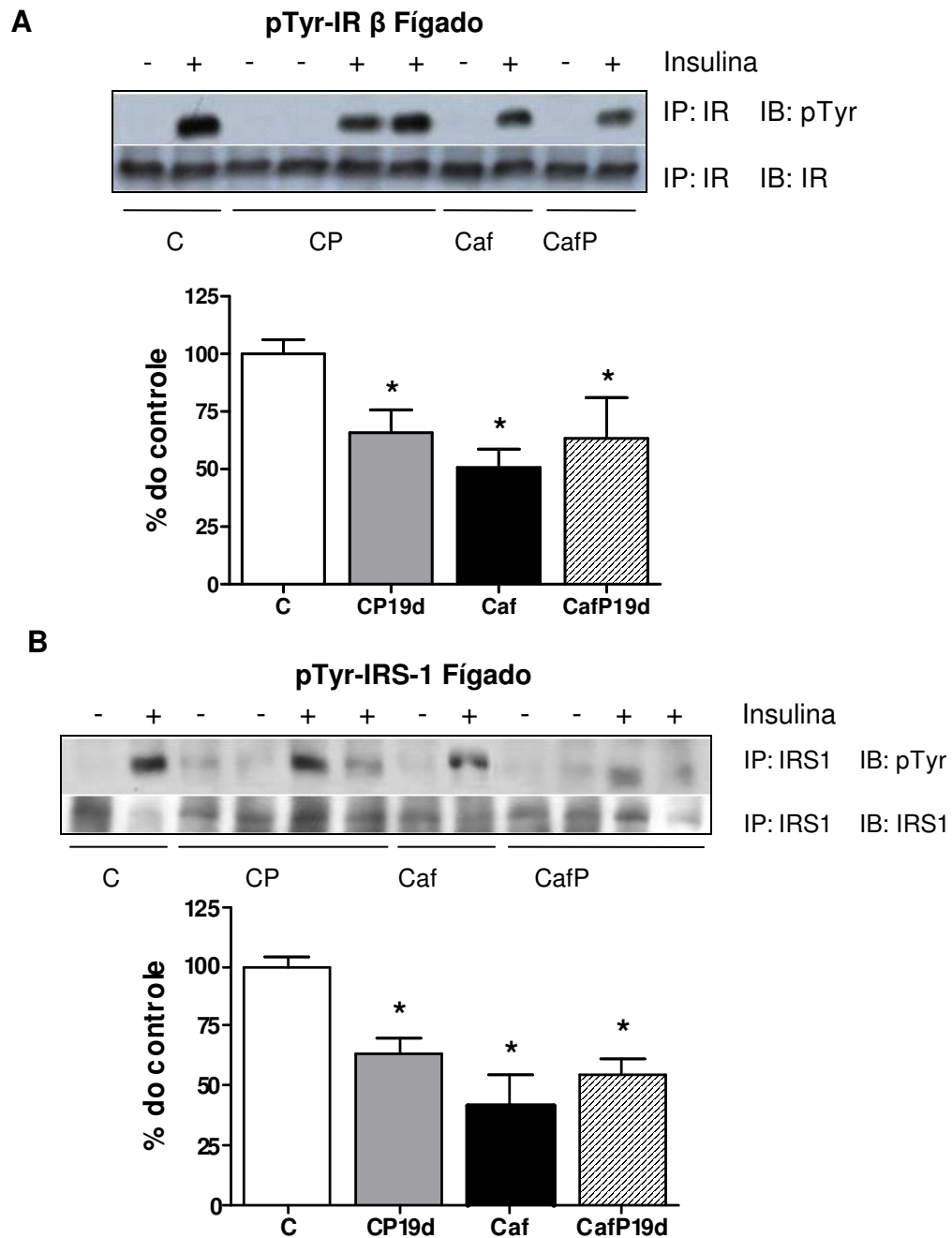


Figura 21. Fosforilação em resíduos de tirosina da subunidade β do IR (A) e da proteína IRS-1 (B) em fígado de ratas aos 19 dias de prenhez, após estímulo com insulina. Amostras de proteína total foram solubilizadas e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos anti-IR β ou anti-IRS-1. Os imunoprecipitados foram corridos em gel de poliácridamida 8%, transferidos para membranas de nitrocelulose que foram incubadas (IB) com anticorpos anti-fosfo-tirosina (pTyr), anti-IR β ou anti-IRS-1. C – controle não-prenhe; CP – controle prenhe; Caf – cafeteria não-prenhe; CafP – cafeteria prenhe. Os gráficos representam a média $\pm$ EPM; $n = 4 - 6$ ratas. Os símbolos indicam diferença estatística entre os grupos: * vs C; # vs CP; $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

A incidência de obesidade vem atingindo proporções alarmantes em várias populações no mundo. Favorecendo o crescimento desta epidemia, o avanço tecnológico e a modernidade levaram a alterações do estilo de vida resultando em um menor gasto energético na execução de tarefas diárias, e ao aumento da oferta e do consumo de alimentos prontos, geralmente com elevado valor calórico e pouco valor nutricional (Caterson & Gill, 2002).

A obesidade está associada a várias outras doenças, favorecendo o surgimento de novas patologias ou agravando quadros pré-existentes. Dentre estas doenças, estão o Diabetes Mellitus tipo 2 e o Diabetes Mellitus Gestacional (GDM) (Solomon *et al.*, 1997; Flegal *et al.*, 2007; Satpathy *et al.*, 2008). Há uma relação marcante entre estas formas de diabetes e a obesidade. Muito tem se investigado para o esclarecimento deste ponto, e dentre os avanços obtidos, a resistência à ação da insulina parece ser um ponto convergente de possível responsabilidade.

Durante uma gestação normal, o organismo é capaz de compensar o aumento da resistência periférica instalada através do aumento da secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas (Polonsky *et al.*, 1988). A incapacidade das células beta em responder adequadamente ao aumento da glicose sanguínea para vencer o aumento exacerbado da resistência periférica à insulina, levam ao desenvolvimento do GDM. Neste contexto, torna-se importante investigar os mecanismos que possibilitam a célula beta pancreática vencer a demanda pela insulina, imposta pela resistência ao hormônio, observada durante a gestação.

Sendo assim, decidimos estudar este fenômeno em uma situação onde há a presença do principal fator de risco para o desenvolvimento do GDM, a obesidade, e num quadro provável de aumento na resistência periférica. Para isto, utilizamos um modelo experimental onde a obesidade é induzida através da substituição da dieta padrão de ratos pela dieta de cafeteria, com maior aporte calórico e alta quantidade de lipídeos (West & York, 1998; Prada *et al.*, 2005). A alimentação com a dieta de cafeteria expõe os animais a um excesso de ingestão calórica induzindo distúrbios metabólicos, similares aquelas observadas em humanos obesos, tornando este um

modelo atrativo para o estudo da obesidade e suas consequências durante a gestação.

Assim como em outros estudos (Akyol *et al.*, 2009; Shafat *et al.*, 2009), a alimentação com dieta de cafeteria induziu a obesidade em ratas, evidenciada pelo maior ganho de peso a partir da terceira semana, e que se estendeu até o final do período de alimentação. Associado ao ganho de peso corporal houve aumento do peso relativo dos depósitos viscerais de tecido adiposo, gordura retroperitoneal e perigonadal. Apesar disso, as ratas que foram alimentadas com esta dieta, apresentaram redução do consumo alimentar diário da 5ª até a 8ª semana de tratamento. É muito provável que tal discrepância se deva ao fato da dieta de cafeteria ter maior conteúdo calórico do que a ração padrão, resultando em uma ingestão calórica diária maior. Além disso, a quantidade de calorias da dieta de cafeteria apresentadas neste estudo, não leva em consideração o valor energético proveniente da ingestão dos refrigerantes, que certamente eleva ainda mais a ingestão calórica neste grupo de ratas.

Como o esperado, as ratas prenhes apresentaram uma redução na glicemia durante os estados fisiológicos de jejum e alimentado, provavelmente, devido ao fornecimento de nutrientes para o feto. Esta redução foi observada inclusive nas ratas obesas por dieta de cafeteria. É comum que a alimentação com dieta contendo alto teor de gordura leve ao aumento da glicemia e dos lipídeos plasmáticos. Entretanto, assim como relatamos neste estudo, vários trabalhos não observaram alterações nestes parâmetros em tais condições dietéticas. Possivelmente, isto se deve as diferentes composições das dietas utilizadas, levando ao consumo de diferentes tipos de lipídeos (Buettner *et al.*, 2006; Akyol *et al.*, 2009). No entanto, a alimentação com a dieta de cafeteria por período prolongado elevou as concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, e também de insulina. A insulinemia aumentada das ratas obesas também deve ter papel na manutenção de níveis glicêmicos normais nestas ratas. Levando em consideração as concentrações plasmáticas normais de albumina e de proteínas totais das ratas, após alimentação com a dieta de cafeteria, consideramos que a modificação do padrão dietético consumido pelos animais não alterou seu estado nutricional.

A tolerância à glicose diminuída e a alta concentração de insulina nas ratas obesas por dieta de cafeteria, principalmente nas ratas prenhes, corroboram resultados obtidos por outros grupos indicando que a obesidade, e inclusive a dieta de cafeteria, induzem a resistência à insulina (Bonadonna *et al.*, 1990; Prada *et al.*, 2005; Martyn *et al.*, 2008). O aumento do índice insulina/glicose, e a redução da fosforilação em tirosina da subunidade β do receptor de insulina e do substrato 1 do receptor de insulina no fígado e músculo das ratas obesas por dieta de cafeteria, observadas neste estudo, reforçam este ponto.

Em gestantes, a redução da sensibilidade à insulina parece ser resultado do aumento da fosforilação do receptor de insulina no resíduo serina/treonina, bem como da redução da fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina no músculo esquelético (Friedman *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2000). No presente estudo, observamos uma redução da ativação do receptor de insulina no músculo sóleo de ratas já no 15º dia de prenhez. Contudo, a ativação do substrato 1 do receptor de insulina no músculo, não foi estatisticamente diferente das ratas controle, assim como a sensibilidade à insulina não foi alterada no fígado destas ratas neste período da prenhez. Já aos 19 dias, as ratas prenhes apresentaram uma redução na sensibilidade à insulina nos dois tecidos estudados. Estes dados corroboram o fato de o aumento da resistência à insulina endógena em ratas, *in vivo*, se estabelecer entre o 16º e 19º dias de prenhez (Leturque *et al.*, 1980). Em paralelo, as ratas obesas por dieta de cafeteria apresentaram uma redução da sensibilidade à insulina em maior intensidade e que parece se estabelecer antes do período observado nas ratas controle.

Em condições normais, o aumento da liberação de insulina é suficiente para manter a tolerância à glicose em níveis adequados durante a prenhez, como observamos nas ratas controle neste estudo, evitando o GDM. A intolerância à glicose reconhecida pela primeira vez durante a prenhez é o parâmetro utilizado no diagnóstico do GDM. No entanto, não se exclui a possibilidade de que esta intolerância tenha sido originada antes da prenhez (American Diabetes Association, 2004). No presente estudo, as ratas obesas por dieta de cafeteria apresentaram redução na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina, apesar de valores

normais de glicemia (jejum e alimentado) e da manutenção da capacidade da célula beta pancreática em aumentar a secreção do hormônio durante a prenhez. A obesidade induzida por dieta de cafeteria já foi proposta como um modelo para o estudo do GDM (Holemans *et al.*, 2004). Neste modelo, foi observado que ratas prenhes apresentaram redução na sensibilidade à insulina, e apesar de maior do que nas ratas controle, secreção de insulina (*in vivo*) insuficiente para vencer a demanda aumentada pelo hormônio durante a prenhez. Em mulheres obesas com GDM, foi relatado aumento na segunda fase de secreção de insulina em resposta à glicose (*in vivo*), acompanhado pela redução na sensibilidade ao hormônio (Catalano *et al.*, 1999). Esta redução na sensibilidade à insulina em mulheres com GDM tem sido atribuída principalmente a menor ativação do receptor de insulina e do substrato 1 do receptor de insulina no músculo esquelético destas mulheres (Friedman *et al.*, 1999; Metzger *et al.*, 2007).

Hollness e colaboradores (2007) mostraram um aumento na secreção de insulina durante o teste de tolerância à glicose, aos 19 dias de prenhez em ratas alimentadas com alto teor de gordura saturada na dieta. Entretanto, assim como no presente estudo, apesar do aumento da secreção de insulina *in vivo*, estas ratas apresentaram intolerância à glicose. Estes autores sugerem que a intolerância à glicose é, provavelmente, resultado de um aumento insuficiente da secreção de insulina em resposta ao desenvolvimento da resistência à insulina. No entanto, ao contrário do que observamos neste estudo, a secreção de insulina em resposta à glicose por ilhotas isoladas destas ratas estava reduzida. Esta diferença deve ser resultado da divergência entre os protocolos experimentais empregados tais como: tipo de dieta, duração do período de alimentação das ratas bem como o tempo de prenhez no qual foram realizadas as análises.

Na realidade, nossos resultados indicam que a obesidade por dieta de cafeteria reduz a secreção de insulina em resposta a estímulos provocados por substratos metabolizáveis, agentes despolarizantes diretos e também ao carbacol, potencializador da secreção. Mas que a prenhez restaura a liberação deste hormônio nestas ratas, indicando uma função importante do aumento da atividade metabólica e, principalmente, do influxo e mobilização do $[Ca^{2+}]_i$ neste processo. Takahashi e

colaboradores (1991) observaram redução da secreção de insulina em resposta à glicose em ratos que receberam dieta com alta quantidade de carboidratos, proteínas ou lipídeos. No entanto, tal alteração foi relacionada com redução na oxidação da glicose, sem diferenças observadas no efluxo do $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Corroborando nossos resultados, Machado e colaboradores (1992) mostraram que a obesidade, em ratos velhos (12 meses), provoca redução na secreção de insulina, e no efluxo do $^{45}\text{Ca}^{2+}$, sugerindo alterações no fluxo do Ca^{2+} e a participação dos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes neste processo.

Entender como ocorre a recuperação da capacidade secretória das ratas obesas durante a prenhez, e determinar os eventos intracelulares relacionados com essa melhora é de grande importância. Neste sentido, nossos resultados contribuem para o esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos neste fenômeno. Durante a prenhez, as ratas obesas por dieta de cafeteria mostraram um aumento na atividade metabólica, inclusive em relação às ratas prenhes controle, aliado a melhora no manejo do Ca^{2+} , e a restauração da secreção de insulina.

Para analisar a atividade metabólica das ilhotas, em resposta à glicose, utilizamos como recurso a quantificação da produção de compostos redutores em resposta a este açúcar. O método empregado para esta finalidade infere principalmente a produção de NADPH. Como já se sabe, a prenhez eleva o metabolismo da glicose em células beta pancreáticas, aumentando a atividade da glicocinase, enzima chave da via glicolítica, e a oxidação de glicose (Weinhaus *et al.*, 1996). Corroborando com estes dados, nossos resultados mostraram que as ratas prenhes apresentaram um aumento do metabolismo celular em resposta à glicose, sendo que as ratas obesas tiveram a atividade metabólica durante a prenhez maior do que a observada nas ratas controle.

A sinalização redox é importante para o desempenho normal das funções celulares, e é de grande importância no caso das células beta pancreáticas, onde o metabolismo oxidativo é o principal sinal que desencadeia a secreção de insulina. A maior parte do NADPH contido no interior das células é proveniente da via das pentoses. O NADPH pode ser gerado na mitocôndria por desidrogenases, ou no citoplasma sendo produto da glicose-6-fosfato após algumas reações enzimáticas

(Ying, 2008). Em ilhotas pancreáticas, ocorre um aumento do NADPH intracelular após estímulo com glicose, sendo que o aumento da razão NADPH/NADP⁺ é importante para a secreção de insulina. Já a razão NADH/NAD⁺ parece não estar relacionada com o processo de secreção deste hormônio (Malaisse *et al.*, 1979; Hedekov *et al.*, 1987). Além disso, tem sido proposto que o NADPH tem importância na homeostase do Ca²⁺ (Ying, 2008). De fato, NADPH parece ser importante para a exocitose dos grânulos de insulina induzida por Ca²⁺, participando do controle do estado redox da glutathione, agindo sobre a glutathione redutase dependente de NADPH. A glutaredoxina 1, que pode ser formada pela glutathione reduzida, participa do controle pós-transcricional de proteínas SNARE (MacDonald *et al.*, 2005; Reinbothe *et al.*, 2009). Sendo assim, o aumento do NADPH demonstrado em nossos resultados, provavelmente deve contribuir para a restauração da capacidade secretória durante a prenhez em ratas obesas por dieta de cafeteria. Além disso, o aumento da oxidação da glicose, observado no presente estudo, sugere um maior fornecimento de glicose-6-fosfato para a formação de NADPH.

O Ca²⁺ desempenha várias funções nas células em geral, sendo importante na sinalização intracelular e fundamental para o processo de exocitose (Douglas & Rubin, 1961). Nas células beta pancreáticas, existe uma correlação entre o padrão oscilatório da secreção de insulina e as oscilações do [Ca²⁺]_i (Tengholm & Gylfe, 2009). De fato, ilhotas pancreáticas isoladas, apresentam aumento das oscilações do Ca²⁺ citoplasmático em resposta a estimulação com glicose (Santos *et al.*, 1991). Nossos resultados mostram que a obesidade induzida pela dieta de cafeteria provocou uma alteração no manejo dos íons Ca²⁺ em ilhotas isoladas, sendo que este efeito parece ser dependente de uma redução na mobilização do Ca²⁺ proveniente dos estoques intracelulares, e principalmente, pela diminuição no influxo deste cátion. A redução da secreção de insulina em resposta a agentes tais como altas concentrações de KCl ou tolbutamida (bloqueia o canal de K⁺_{ATP}), que despolarizam a membrana das células beta pancreáticas, independentemente do metabolismo celular, aliada a menor expressão da subunidade $\alpha 1.2$ do canal de Ca²⁺ voltagem dependente (Ca_v $\alpha 1.2$ - que forma o poro iônico do canal e é responsável pela ativação em resposta a alterações na voltagem da membrana) reforçam a hipótese de que há uma

redução do influxo de Ca^{2+} nas ilhotas das ratas obesas por dieta de cafeteria. Corroborando estes resultados, Schulla e colaboradores (2003) demonstraram que camundongos com deleção para o $\text{Ca}_v\alpha 1.2$, específica em células beta pancreáticas, apresentam alterações na secreção de insulina e na tolerância à glicose. Por outro lado, a redução da secreção de insulina em resposta ao carbacol (análogo da acetilcolina), e a resposta normal ao PMA, ressaltam a evidência de que deve haver uma dificuldade na mobilização de Ca^{2+} do retículo plasmático nas ratas obesas. A ativação dos receptores M3 pela acetilcolina ou seus análogos leva a formação de IP_3 que age sobre receptores no retículo endoplasmático, liberando Ca^{2+} para o citoplasma. Além disso, esta ativação resulta na formação de DAG, que ativa a PKC, levando a extrusão dos grânulos contendo insulina. No entanto, ao contrário do observado com todos os outros estímulos, não houve diferença na secreção de insulina pelas ilhotas das ratas obesas por dieta de cafeteria, em resposta a ativação da PKC através do PMA. Estudos mostram que a ativação da PKC por altas concentrações (acima de 100 nmol/L) de éster de forbol (TPA ou PMA), estimula a secreção de insulina em resposta à glicose mesmo na ausência de Ca^{2+} no meio extracelular, ou após o bloqueio do canal de Ca^{2+} -VD com nitrendipina (Sharp *et al.*, 1989; Komatsu *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1998). Ainda corroborando nossos resultados, foi demonstrado que em modelos animais de tolerância diminuída à glicose, a redução na secreção de insulina está associada com alterações no manejo do Ca^{2+} em resposta à glicose (Marie *et al.*, 2001). Tais alterações parecem ser atribuídas à menor atividade e expressão da SERCA, proteína envolvida na regulação do manejo do Ca^{2+} na célula beta pancreática (Marie *et al.*, 2001; Kulkarni *et al.*, 2004). Apesar do Ca^{2+} originado do compartimento extracelular ter maior importância na secreção de insulina, tem sido demonstrado que o Ca^{2+} proveniente do retículo endoplasmático também desempenha algum papel no processo secretório. Foi demonstrado que a acetilcolina ativa a movimentação das vesículas intracelulares contendo insulina através do Ca^{2+} mobilizado pelo IP_3 em células beta pancreáticas (Niwa *et al.*, 1998).

Vários dos eventos envolvidos no processo de secreção de insulina são modulados durante a prenhez (Sorenson & Brelje, 1997; Amaral *et al.*, 2004; Bordin *et*

al., 2004; Cunha *et al.*, 2006). A prolactina, os hormônios placentários e o hormônio do crescimento parecem ser os principais responsáveis por tais alterações. No entanto, tem sido demonstrado que vários destes efeitos são resultantes da ativação do receptor de prolactina (Malaisse *et al.*, 1969; Sorenson *et al.*, 1987; Brelje & Sorenson, 1988; Brelje & Sorenson, 1991; Galsgaard *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 1999; Sjöholm *et al.*, 2000; Collares-Buzatto *et al.*, 2001; Levy & Darnell, 2002; Tian & Laychock, 2003; Cunha *et al.*, 2007). Sendo assim, é provável que as melhoras observadas nas ilhotas das ratas obesas por dieta de cafeteria, durante a prenhez, sejam causadas pela prolactina. A prenhez aumenta a expressão protéica da SERCA2 em ilhotas pancreáticas, sendo que a inibição desta proteína reduz a primeira fase de secreção de insulina durante a prenhez, sugerindo que os estoques intracelulares de Ca^{2+} (i.e. retículo endoplasmático) desempenham função importante no aumento da capacidade secretória das ilhotas durante esse estado fisiológico. Tal efeito parece ser mediado pela prolactina, uma vez que a exposição a este hormônio aumentou a expressão da SERCA2 via STAT3 em células beta tumorais (RIN) (Anhe *et al.*, 2007). Além disso, a ativação do receptor de prolactina pelo hormônio do crescimento aumenta a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a secreção de insulina em células beta da linhagem BRIN-BD11 (Zhang *et al.*, 2006). Por outro lado, a elevação dos níveis de cAMP aumenta o influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes em células beta pancreáticas, sendo este o mecanismo pelo qual o cAMP potencializa a secreção de insulina em resposta à glicose (Rajan *et al.*, 1989). Durante a prenhez, há um aumento das concentrações de cAMP em ilhotas (Green *et al.*, 1973). É possível que este aumento também favoreça a melhora no manejo do Ca^{2+} citoplasmático observado nas ilhotas das ratas obesas por dieta de cafeteria durante a prenhez.

CONCLUSÃO

- A alimentação com dieta de cafeteria induziu obesidade, diminuiu a tolerância à glicose e reduziu a sensibilidade à insulina no músculo e fígado de ratas. Além disso, ilhotas isoladas destas ratas secretaram menos insulina, o que parece estar associado à maior dificuldade no manejo dos íons Ca^{2+} pelas mesmas.
- A prenhez aumentou o metabolismo da glicose, melhorou o manejo do Ca^{2+} e aumentou a secreção de insulina em ilhotas isoladas, tanto nas ratas controles quanto nas ratas obesas. Além disso, diminuiu a sensibilidade à insulina no músculo e fígado de ratas controles, e de maneira mais exacerbada nas ratas obesas.
- A prenhez nas ratas obesas melhorou o manejo do Ca^{2+} e restaurou a secreção de insulina. No entanto, esta restauração não foi suficiente para vencer o aumento da resistência periférica à insulina e normalizar a tolerância à glicose nestas ratas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akyol A, Langley-Evans SC, McMullen S. 2009. Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. *Br J Nutr* 102(11):1601-10.
- Amaral ME, Cunha DA, Anhê GF, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, Bordin S, Boschero AC. 2004. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J Endocrinol* 183(3):469-76.
- Anhe GF, Nogueira TC, Nicoletti-Carvalho JE, Lellis-Santos C, Barbosa HC, Cipolla-Neto J, Bosqueiro JR, Boschero AC, Bordin S. 2007. Signal transducer and activator of transcription 3-regulated sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 expression by prolactin and glucocorticoids is involved in the adaptation of insulin secretory response during the peripartum period. *J Endocrinol* 195: 17-27.
- Arrone LJ, Mackintosh R, Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J. 1997. Cardiac autonomic nervous system activity in obese and never-obese young men. *Obes Res* 5(4):354-9.
- Barbour LA, Shao J, Qiao L, Leitner W, Anderson M, Friedman JE, Draznin B. 2004. Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology* 145(3):1144-50.
- Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. 2007. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care* 30 Suppl 2:S112-9.
- Blachier F, Mourtada A, Sener A, Malaisse WJ. 1989. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Uptake of metabolized and nonmetabolized cationic amino acids by pancreatic islets. *Endocrinology* 124(1):134-41.
- Bonadonna RC, Groop L, Kraemer N, Ferrannini E, Del Prato S, DeFronzo RA. 1990. Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study. *Metabolism* 39(5):452-9.
- Bordin S, Amaral ME, Anhê GF, Delghingaro-Augusto V, Cunha DA, Nicoletti-Carvalho JE, Boschero AC. 2004. Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. *Mol Cell Endocrinol* 220(1-2):41-50.

Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E, Atwater I. 1995. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol* 268(2 Pt 1):E336-42.

Boschero AC. 1996. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células b pancreáticas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 40: 149-155.

Bray GA. 2003. Risks of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 32(4):787-804, viii.

Brelje TC, Sorenson RL. 1988. Nutrient and hormonal regulation of the threshold of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreases. *Endocrinology* 123(3):1582-90.

Brelje TC, Sorenson RL. 1991. Role of prolactin versus growth hormone on islet B-cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. *Endocrinology* 128(1):45-57.

Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. 2006. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 36(3):485-501.

Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA. 2002. Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 46/4:419-425.

Catalano PM, Huston L, Amini SB, Kalhan SC. 1999. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 180(4):903-16.

Caterson ID, and Gill TP. 2002. Obesity: epidemiology and possible prevention. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16: 595-610.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2004. Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes--United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 53(45):1066-8.

Chen H, Simar D, Lambert K, Mercier J, Morris MJ. 2008. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology* 149(11):5348-56.

Collares-Buzato, CB, Leite, AR, Boschero, AC. 2001. Modulation of gap and adherens junctional proteins in cultured neonatal pancreatic islets. *Pancreas* 23 (2), 177–185.

Cunha, DA, Amaral, ME, Carvalho, CPF, Collares-Buzato, CB, Carneiro, EM, Boschero, AC. 2006. Increased expression of SNARE proteins and synaptotagmin IV in islets from pregnant rats and in vitro prolactin-treated neonatal islets. *Biol. Res.* 39, 555–566.

Cunha DA, Roma LP, Boschero AC. 2007. Prolactin modulates the association and phosphorylation of SNARE and kinesin/MAP-2 proteins in neonatal pancreatic rat islets. *Mol Cell Endocrinol.* 273(1-2):32-41.

Devlieger R, Casteels K, Van Assche FA. 2008. Reduced adaptation of the pancreatic B cells during pregnancy is the major causal factor for gestational diabetes: Current knowledge and metabolic effects on the offspring. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1-5.

Di Cianni G, Volpe L, Lencioni C, Miccoli R, Cuccuru I, Ghio A, Chatzianagnostou K, Bottone P, Teti G, Del Prato S, Benzi L. 2003. Prevalence and risk factors for gestational diabetes assessed by universal screening. *Diabetes Res Clin Pract* 62: 131-137.

Di Cianni G, Seghieri G, Lencioni C, Cuccuru I, Anichini R, De Bellis A, Ghio A, Tesi F, Volpe L, Del Prato S. 2007. Normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus: what is in between? *Diabetes Care* 30: 1783-1788.

Douglas WW, Rubin RP. 1961. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* 159: 40-57.

Dryselius S, Grapengiesser E, Hellman B, Gylfe E. Voltage-dependent entry and generation of slow Ca²⁺ oscillations in glucose-stimulated pancreatic beta-cells. *Am J Physiol* 276(3 Pt 1):E512-8.

Fahien LA, MacDonald MJ, Kmietek EH, Mertz RJ, Fahien CM. 1988. Regulation of insulin release by factors that also modify glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 263:13610 -13614.

Flatt PR. 1996. Textbook of Diabetes. Oxford: Blackwell.

Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, and Gail MH. 2007. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *Jama* 298: 2028-2037.

Fridlyand LE, Tamarina N, Philipson LH. 2003. Modeling of Ca²⁺ flux in pancreatic beta-cells: role of the plasma membrane and intracellular stores. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E138-E154.

Friedman JE, Ishizuka T, Shao J, Huston L, Highman T, Catalano P. 1999. Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes* 48:1807–14.

Gauthier BR, Wollheim CB. 2008. Synaptotagmins bind calcium to release insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(6):E1279-86. Epub 2008 Aug 19.

Gillis KD, Gee WM, Hammoud A, McDaniel ML, Falke LC, Misler S. 1989. Effects of sulfonamides on a metabolite-regulated ATPi-sensitive K⁺ channel in rat pancreatic B-cells. *Am J Physiol*. 257(6 Pt 1):C1119-27.

Gilon P, Arredouani A, Gailly P, Gromada J, Henquin JC. 1999. Uptake and release of Ca²⁺ by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic Ca²⁺ concentration triggered by Ca²⁺ influx in the electrically excitable pancreatic B-cell. *J Biol Chem* 274(29):20197-205.

Grapengiesser E, Gylfe E, Hellman B. 1989. Ca²⁺ oscillations in pancreatic beta-cells exposed to leucine and arginine. *Acta Physiol Scand* 136(1):113-9.

Grapengiesser E, Gylfe E, Hellman B. 1990. Sulfonylurea mimics the effect of glucose in inducing large amplitude oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ in pancreatic beta-cells. *Mol Pharmacol* 37(3):461-7.

Green IC, Howell SL, Montague W, Taylor KW. 1973. Regulation of insulin release from isolated islets of Langerhans of the rat in pregnancy. The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Biochem J* 134(2):481-487.

Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Holst JJ, Nielsen JH, Rorsman P. 1998. Glucagon-like peptide 1 (7-36) amide stimulates exocytosis in human pancreatic beta-cells by both proximal and distal regulatory steps in stimulus-secretion coupling. *Diabetes* 47(1):57-65.

Gromada J, Høy M, Renström E, Bokvist K, Eliasson L, Göpel S, Rorsman P. 1999. CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 518 (Pt 3):745-59.

Gura T. 1997. Obesity sheds its secrets. *Science* 275(5301):751-3.

Guyton AC, Hall JE. 2006. Textbook of medical physiology. 11^a ed. Ed. Elsevier Saunders; Filadelfia, Pensilvânia, EUA. p. 972-973.

Hedeskov CJ, Capito K, Thams P. 1987. Cytosolic ratios of free [NADPH]/[NADP⁺] and [NADH]/[NAD⁺] in mouse pancreatic islets, and nutrient-induced insulin secretion. *Biochem J* 241: 161-167.

Heyne A, Kiesselbach C, Sahún I, McDonald J, Gaiffi M, Dierssen M, Wolffgramm J. 2009. An animal model of compulsive food-taking behaviour. *Addict Biol* 14(4):373-83.

Holemans K, Caluwaerts S, Poston L, Van Assche FA. 2004. Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*. 190(3):858-65.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259(5091):87-91.

Holness MJ, Smith ND, Greenwood GK, Sugden MC. 2007. PPAR α activation reverses adverse effects induced by high-saturated-fat feeding on pancreatic beta-cell function in late pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(4):E1087-94.

Hubáček JA. 2009. Eat less and exercise more - is it really enough to knock down the obesity pandemic? *Physiol Res* 58 Suppl 1:S1-6.

Iismaa TP, Kerr EA, Wilson JR, Carpenter L, Sims N, Biden TJ. 2000. Quantitative and functional characterization of muscarinic receptor subtypes in insulin-secreting cell lines and rat pancreatic islets. *Diabetes* 49(3):392-8.

Inagaki N, Gonoi T, Clement JP 4th, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. 1995. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270(5239):1166-70.

Ionescu E, Rohner-Jeanrenaud F, Proietto J, Rivest RW, Jeanrenaud B. 1988. Taste-induced changes in plasma insulin and glucose turnover in lean and genetically obese rats. *Diabetes* 37(6):773-9.

Jacobs S, Hazum E, Shechter Y, Cuatrecasas P. 1979. Insulin receptor: covalent labeling and identification of subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(10):4918-21.

Jay SD, Ellis SB, McCue AF, Williams ME, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP. 1990. Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 248(4954):490-2.

Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F. 2001. Effects of neuropeptides and leptin on nutrient partitioning: dysregulations in obesity. *Annu Rev Med* 52:339-51.

- Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. 1982. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 215(4529):185-7.
- Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM. 2002. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 51(7):2207-13.
- Komatsu M, Schermerhorn T, Aizawa T, Sharp GW. 1995. Glucose stimulation of insulin release in the absence of extracellular Ca²⁺ and in the absence of any increase in intracellular Ca²⁺ in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(23):10728-32.
- Kulkarni RN, Roper MG, Dahlgren G, Shih DQ, Kauri LM, Peters JL, Stoffel M, Kennedy RT. 2004. Islet secretory defect in insulin receptor substrate 1 null mice is linked with reduced calcium signaling and expression of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA)-2b and -3. *Diabetes* 53: 1517-1525.
- Lenzen S, Schmidt W, Panten U. 1985. Transamination of neutral amino acids and 2-keto acids in pancreatic B-cell mitochondria. *J Biol Chem* 260(23):12629-34.
- Leturque A, Ferré P, Satabin P, Kervran A, Girard J. 1980. In vivo insulin resistance during pregnancy in the rat. *Diabetologia* 19(6):521-8.
- Levy DE, Darnell JE Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9):651-62.
- Li C, Buettger C, Kwagh H, Matter A, Daikhin Y, Nissim IB, Collins HW, Yudkoff M, Stanley CA, Matschinsky FM. 2004. A Signaling Role of Glutamine in Insulin Secretion. *J.Biol. Chem.* 279 (14) : 13393-401.
- MacDonald MJ, Fahien LA, Brown LJ, Hasan NM, Buss JD, Kendrick MA. 2005. Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1–E15.
- Machado UF, Nogueira CR, Carpinelli AR. 1992. Obesity is the major cause of alterations in insulin secretion and calcium fluxes by isolated islets from aged rats. *Physiol Behav* 52(4):717-21.
- Malaisse WJ, Sener A, Herchuelz A, and Hutton JC. 1979. Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism* 28: 373-386.

Malaisse WJ, Carpinelli AR, Sener A. 1981. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Timing of early metabolic, ionic, and secretory events. *Metabolism* 30(5):527-32.

Marie JC, Bailbe D, Gylfe E, Portha B. 2001. Defective glucose-dependent cytosolic Ca^{2+} handling in islets of GK and nSTZ rat models of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 169: 169-176.

Martyn JA, Kaneki M, Yasuhara S. 2008. Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology* 109(1):137-48.

Mastorakos G, Ilias I. 2003. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci* 997:136-49.

Mathias PC, Carpinelli AR, Billaudel B, Garcia-Morales P, Valverde I, Malaisse WJ. 1985. Cholinergic stimulation of ion fluxes in pancreatic islets. *Biochem Pharmacol* 34(19):3451-7.

Mears D. 2004. Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca^{2+} channels. *J Membr Biol* 200(2):57-66.

Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR, de Leiva A, Dunger DB, Hadden DR, Hod M, Kitzmiller JL, Kjos SL, Oats JN, Pettitt DJ, Sacks DA, Zoupas C. 2007. Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 30 Suppl 2:S251-60.

Nielsen JH, Svensson C, Galsgaard ED, Møldrup A, Billestrup N. 1999. Beta cell proliferation and growth factors. *J Mol Med* 77(1):62-6.

Nilsson T, Arkhammar P, Rorsman P, Berggren PO. 1988. Inhibition of glucose-stimulated insulin release by α 2-adrenoceptor activation is paralleled by both a repolarization and a reduction in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration. *J Biol Chem* 263(4):1855-60.

Nitert MD, Nagorny CL, Wendt A, Eliasson L, Mulder H. 2008. $\text{CaV}1.2$ rather than $\text{CaV}1.3$ is coupled to glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 832/13 cells. *J Mol Endocrinol* 41(1):1-11.

Niwa T, Matsukawa Y, Senda T, Nimura Y, Hidaka H, Niki I. 1998. Acetylcholine activates intracellular movement of insulin granules in pancreatic beta-cells via inositol

trisphosphate-dependent [correction of triphosphate-dependent] mobilization of intracellular Ca^{2+} . *Diabetes* 47(11):1699-706.

Nogueira TC, Anhê GF, Carvalho CR, Curi R, Bordin S, Carpinelli AR. 2008. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase/AKT/PKCzeta/lambda pathway in the effect of palmitate on glucose-induced insulin secretion. *Pancreas* 37(3):309-15.

Panten U, Schwanstecher M, Schwanstecher C. 1996. Sulfonylurea receptors and mechanism of sulfonylurea action. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104(1):1-9.

Patti ME, Kahn CR. 1998. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9(2-4):89-109.

Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E. 1988. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81: 442-448

Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJ. 2005. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146: 1576-1587.

Rajan AS, Hill RS, Boyd AE 3rd. 1989. Effect of rise in cAMP levels on Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels in HIT cells. Second-messenger synarchy in beta-cells. *Diabetes* 38(7):874-80.

Reinbothe TM, Ivarsson R, Li DQ, Niazi O, Jing X, Zhang E, Stenson L, Bryborn U, Renstrom E. 2009. Glutaredoxin-1 mediates NADPH-dependent stimulation of calcium-dependent insulin secretion. *Mol Endocrinol* 23: 893-900.

Ribot J, Rodríguez AM, Rodríguez E, Palou A. 2008. Adiponectin and resistin response in the onset of obesity in male and female rats 16(4):723-30.

Rorsman P, Renström E. 2003. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46(8):1029-45.

Ryan EA, Enns L. 1988. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 67(2):341-7.

Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeomillos B. 1991. Widespread synchronous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol* 418:417-22.

Sato Y, Nenquin M, Henquin JC. 1998. Relative contribution of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent mechanisms to the regulation of insulin secretion by glucose. *FEBS Lett.* 421(2):115-9.

Satpathy HK, Fleming A, Frey D, Barsoom M, Satpathy C, and Khandalavala J. 2008. Maternal obesity and pregnancy. *Postgrad Med* 120: E01-09.

Schrey MP, Montague W. 1983. Phosphatidylinositol hydrolysis in isolated guinea-pig islets of Langerhans. *Biochem J* 216(2):433-41.

Schulla V, Renström E, Feil R, Feil S, Franklin I, Gjnovci A, Jing XJ, Laux D, Lundquist I, Magnuson MA, Obermüller S, Olofsson CS, Salehi A, Wendt A, Klugbauer N, Wollheim CB, Rorsman P, Hofmann F. 2003. Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} channel null mice. *EMBO J* 22(15):3844-54.

Scoaris CR, Rizo GV, Roldi LP, de Moraes SM, de Proença AR, Peralta RM, Marçal Natali MR. 2009. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition* 7 de Agosto [Epub ahead of print].

Segu VB, Li G, Metz SA. Use of a soluble tetrazolium compound to assay metabolic activation of intact beta cells. *Metabolism* 47(7):824-30.

Sener A, Malaisse-Lagae F, Malaisse WJ. 1981. Stimulation of pancreatic islet metabolism and insulin release by a nonmetabolizable amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(9):5460-4.

Shafat A, Murray B, Rumsey D. 2009. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite* 52(1):34-8. Epub 2008 Jul 17.

Shao J, Catalano PM, Yamashita H, Ruyter I, Smith S, Youngren J, Friedman JE. 2000. Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus (GDM): evidence for increased serine/threonine phosphorylation in pregnancy and GDM. *Diabetes* 49(4):603-10.

Sharp GW, Le Marchand-Brustel Y, Yada T, Russo LL, Bliss CR, Cormont M, Monge L, Van Obberghen E. 1989. Galanin can inhibit insulin release by a mechanism other than membrane hyperpolarization or inhibition of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 264(13):7302-9.

Solomon CG, Willett WC, Carey VJ, Rich-Edwards J, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Spiegelman D, and Manson JE. 1997. A prospective study of pregravid determinants of gestational diabetes mellitus. *Jama* 278: 1078-1083.

Sjöholm A, Zhang Q, Welsh N, Hansson A, Larsson O, Tally M, Berggren PO. 2000. Rapid Ca²⁺ influx and diacylglycerol synthesis in growth hormone-mediated islet beta-cell mitogenesis. *J Biol Chem* 275(28):21033-40.

Sorenson RL, Brelje TC, Hegre OD, Marshall S, Anaya P, Sheridan JD. 1987. Prolactin (in vitro) decreases the glucose stimulation threshold, enhances insulin secretion, and increases dye coupling among islet B cells. *Endocrinology* 121 (4), 1447–1453.

Sorenson RL, Brelje TC. 1997. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29: 301-307.

Takahashi RF, Curi R, Carpinelli AR. 1991. Insulin secretion to glucose stimulus in pancreatic islets isolated from rats fed unbalanced diets. *Physiol Behav* 50(4):787-91.

Taubes G. 1998. As obesity rates rise, experts struggle to explain why. *Science* 280(5368):1367-8.

Tengholm A, Gylfe E. 2009. Oscillatory control of insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 297: 58-72.

Tian Y, Laychock SG. 2003. Prolactin regulates adenylyl cyclase and insulin secretion in rat pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol* 204(1-2):75-84.

Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF. 1988. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55(2):281-90.

Tian Y, Laychock SG. 2003. Prolactin regulates adenylyl cyclase and insulin secretion in rat pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol* 204(1-2):75-84.

Torloni MR, Betran AP, Horta BL, Nakamura MU, Atallah AN, Moron AF, Valente O. 2008. Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Obes Rev* 10:194–203.

Trus M, Corkey RF, Nesher R, Richard AM, Deeney JT, Corkey BE, Atlas D. 2007. The L-type voltage-gated Ca^{2+} channel is the Ca^{2+} sensor protein of stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *Biochemistry* 46(50):14461-7.

Van Obberghen E, Ksauga M, Le Cam A, Hedo JA, Itin A, Harrison LC. 1981. Biosynthetic labeling of insulin receptor: studies of subunits in cultured human IM-9 lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(2):1052-6.

Verspohl EJ, Herrmann K. 1996. Involvement of G proteins in the effect of carbachol and cholecystokinin in rat pancreatic islets. *Am J Physiol* 271(1 Pt 1):E65-72.

Walsh SW. 2007. Obesity: a risk factor for preeclampsia. *Trends Endocrinol Metab* 18, 365–370.

Weber T, Zemelman BV, Mcnew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH, Rothman JE. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92 (6), 759–772.

Weinhaus AJ, Stout LE, Sorenson RL. 1996. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets. *Endocrinology* 137(5):1640-9.

Weinhaus AJ, Stout LE, Bhagroo NV, Brelje TC, and Sorenson RL. 2007. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *J Endocrinol* 193: 367-381.

Weiss JL, Malone FD, Emig D, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Saade G, Eddleman K, Carter SM, Craigo SD, Carr SR, D'Alton ME; FASTER Research Consortium. 2004. Obesity, obstetric complications and Cesarean delivery rate – a population-based screening study. *Am J Obstet Gynecol* 190, 1091–1097.

Weng L, Davies M, Ashcroft SJ. Effects of cholinergic agonists on diacylglycerol and intracellular calcium levels in pancreatic beta-cells. 1993. *Cell Signal* 5(6):777-86.

West DB, e York B. 1998. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr* 67: 505S-512S.

White MF. 1997. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2:S2-17.

Wiser O, Trus M, Hernandez A, Renström E, Barg S, Rorsman P, Atlas D. 1999. The voltage sensitive Lc-type Ca^{2+} channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(1): 248–253.

World Health Organization (WHO). 2006. Obesity and overweight. Disponível em : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Fact sheet nº 311.

Yang SN, Berggren PO. 2006. The Role of Voltage-Gated Calcium Channels in Pancreatic β -Cell Physiology and Pathophysiology. *Endocrine Reviews* 27(6):621–676.

Yeung EH, Hu FB, Solomon CG, Chen L, Louis GM, Schisterman E, Willett WC, Zhang C. 2009. Life-course weight characteristics and the risk of gestational diabetes. *Diabetologia* [Epub ahead of print].

Ying W. 2008. NAD^+/NADH and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal* 10: 179-206.

APÊNDICE 1

Análise do efeito da dieta de cafeteria em machos

Assim como as fêmeas, após 14 semanas de alimentação com a dieta de cafeteria, os machos apresentaram um aumento no peso dos depósitos de tecido adiposo periepídidimo e retroperitoneal, em relação aos ratos que receberam a dieta controle (Figura 1a). No entanto, não houve diferença no peso corporal dos ratos ao final do tratamento (dados não mostrados).

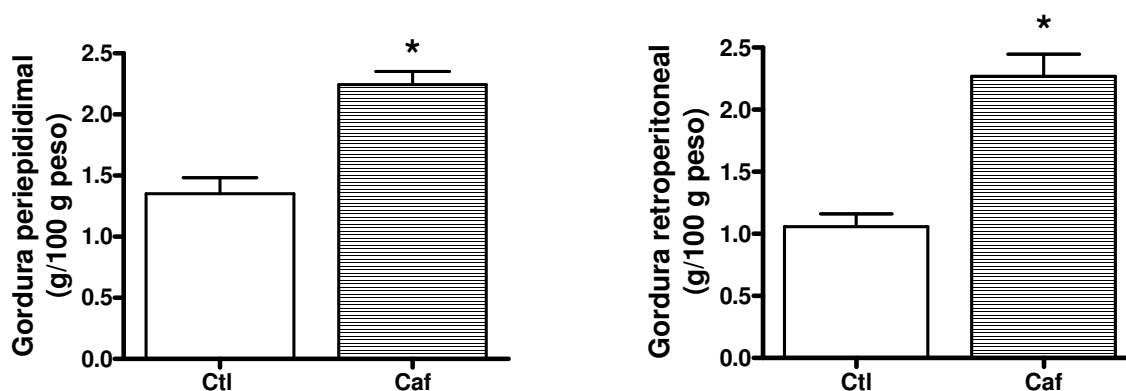


Figura 1a. Peso dos depósitos de gordura periepídidimo (A) e retroperitoneal (B) de ratos alimentados com a dieta padrão (Ctl) ou com a dieta de cafeteria (Caf). Os dados estão expressos como g/100 g de peso corporal. Média $\pm$ EPM; $n = 8$. Teste “t” de Student. * indica diferença estatística entre os grupos; $P < 0,001$.

Os machos que receberam a dieta de cafeteria apresentaram um aumento na glicemia de jejum (91 ± 3 vs 75 ± 5 ; $P < 0,05$) e de alimentado, assim como das concentrações plasmáticas de insulina e de triglicerídeos (TG) no estado alimentado (Tabela 1a). Não houve diferença no colesterol total (COL) entre os grupos.

Tabela 1a. Glicose sanguínea e parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratos machos alimentados com dieta padrão ou de cafeteria.

Alimentado	Ctl	Caf	P
Glicose (mg/dL)	84 ± 2 (8)	94 ± 3 (8)	*
Insulina (ng/mL)	1,13 ± 0,31 (5)	2,33 ± 0,34 (6)	*
COL (mg/dL)	51,3 ± 1,8 (5)	55,4 ± 3,0 (8)	ns
TG (mg/dL)	85,5 ± 5,7 (5)	178,8 ± 15,7 (8)	***

Ctl – controle; Caf – cafeteria. Os valores representam a média ± EPM de dois grupos independentes de tratamento com a dieta; (n). Teste “t” de Student. * P < 0,05.

A figura 2a mostra a glicemia dos ratos durante o teste de tolerância intraperitoneal à glicose. A área sob a curva de glicose foi maior nos ratos alimentados com a dieta de cafeteria, em comparação com os ratos que receberam a dieta padrão (31515 ± 1559 vs 24740 ± 2205 , respectivamente; $\text{mg/dL} \cdot \text{min}^{-1}$; média ± EPM; teste “t” de Student; P < 0,05). No entanto, não houve diferença entre os grupos quando comparamos a glicemia em cada tempo do teste.

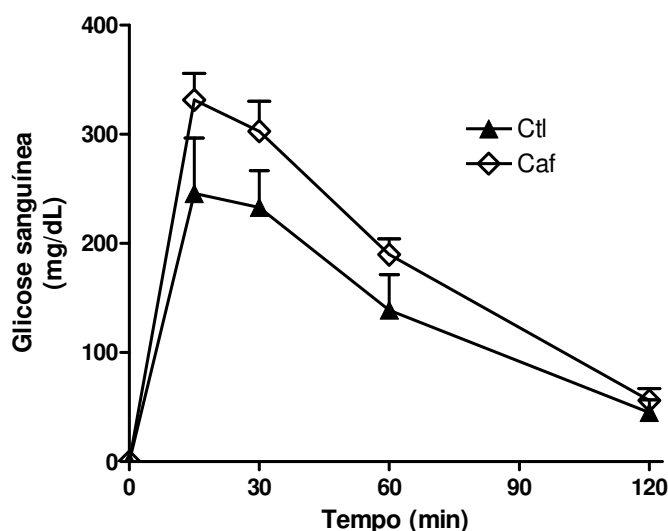


Figura 2a. Glicose sanguínea durante o ipGTT em ratos que receberam a dieta padrão (Ctl) ou dieta de cafeteria (Caf) durante 14 semanas. Os valores representam a média ± EPM; n = 7 ratos.

A liberação de insulina estimulada por 11,1 mmol/L de glicose foi menor nas ilhotas isoladas dos ratos alimentados com a dieta de cafeteria, em relação às ilhotas dos ratos controle (Figura 3a). Não houve diferença entre os grupos quando as ilhotas foram incubadas com 2,8 ou 16,7 mmol/L do açúcar. O conteúdo total de insulina foi similar entre as ilhotas dos ratos controle e cafeteria (79 ± 8 vs 71 ± 8 , respectivamente; ng/ilhota; média $\pm$ EPM; $n = 10$; teste “t” de Student; ns).

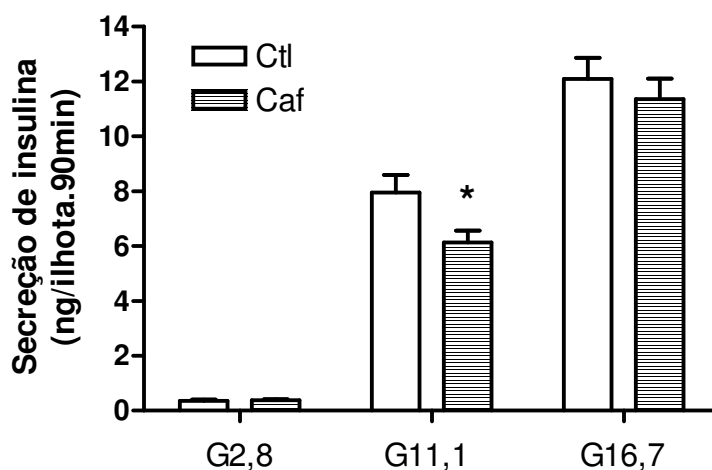


Figura 3a. Secreção estática de insulina induzida por glicose em ilhotas isoladas de ratos alimentados com a dieta padrão (Ctl) ou dieta de cafeteria (Caf). G2,8 – 2,8 mmol/L de glicose; G11,1 – 11,1 mmol/L; G16,7 – 16,7 mmol/L. Os valores são média $\pm$ EPM; $n = 20$ grupos de ilhotas isoladas de 5 ratos. Teste “t” de Student. * indica diferença estatística entre os grupos; $P < 0,05$.

ANEXO 1

Artigo publicado referente à tese

Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 298:320-328, 2010. First published Nov 11, 2009.

Pregnancy restores insulin secretion from pancreatic islets in cafeteria diet-induced obese rats

E. C. Vanzela, R. A. Ribeiro, C. A. Machado de Oliveira, F. B. Rodrigues, M. L. Bonfleur, E. M. Carneiro, K. L. A. Souza, and A. C. Boschero

Department of Anatomy, Cellular Biology, Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, Brazil

Abstract

Insulin resistance during pregnancy is counteracted by enhanced insulin secretion. This condition is aggravated by obesity, which increases the risk of gestational diabetes. Therefore, pancreatic islet functionality was investigated in control nonpregnant (C) and pregnant (CP), and cafeteria diet-fed nonpregnant (Caf), and pregnant (CafP) obese rats. Isolated islets were used for measurements of insulin secretion (RIA), NAD(P)H production (MTS), glucose oxidation ($^{14}\text{CO}_2$ production), intracellular Ca^{2+} levels (fura-2 AM), and gene expression (real-time PCR). Impaired glucose tolerance was clearly established in Caf and CafP rats at the 14th wk on a diet. Insulin secretion induced by direct depolarizing agents such as KCl and tolbutamide and increasing concentrations of glucose was significantly reduced in Caf, compared with C islets. This reduction was not observed in islets from CP and CafP rats. Accordingly, the glucose oxidation and production of reduced equivalents were increased in CafP islets. The glucose-induced Ca^{2+} increase was significantly lower in Caf and higher in CafP, compared with all other groups. CP and CafP islets demonstrated an increased Ca^{2+} oscillation frequency, compared with both C and Caf islets, and the amplitude of oscillations was augmented in CafP, compared with Caf islets. In addition, $\text{Cav}\alpha 1.2$ and $\text{SERCA}2\text{a}$ mRNA levels were reduced in Caf islets. $\text{Cav}\alpha 1.2$, but not $\text{SERCA}2\text{a}$, mRNA was normalized in CafP islets. In conclusion, cafeteria diet-induced obesity impairs insulin secretion. This alteration is related to the impairment of Ca^{2+} handling in pancreatic islets, in especial Ca^{2+} influx, a defect that is reversed during pregnancy allowing normalization of insulin secretion.

Keywords: Ca^{2+} ; insulin resistance; metabolism; pancreatic β -cells; metabolic syndrome

INTRODUCTION

Pregnancy associated with peripheral insulin resistance, which is compensated by increased insulin secretion during normal circumstances (3, 19, 30). Pancreatic

islets undergo major structural and functional changes during pregnancy to fulfill this increased demand for insulin (1, 30, 34). These alterations in rats peak at around days 14–16 of pregnancy, and the placental lactogens and/or prolactin hormones play an important role in this process (6, 8, 23, 33). The mechanisms responsible for increasing the capacity of the β -cells to respond to a higher demand of insulin during pregnancy is very relevant in the context of Type 2 diabetes studies, since it may provide clues for potential therapeutics. The inability of maternal β -cells to respond to this increased demand for insulin can lead to the development of glucose intolerance and to gestational diabetes mellitus (10, 11). Several models of experimental obesity have been used to date. Among them, the use of the fat-rich diet is an interesting approach, since it closely resembles the overfeeding intake of humans, affecting specific tissues involved in the regulation of energy expenditure (9, 36). An improvement for this model is the use of the cafeteria diet, which is even closer to human food intake, since it is more palatable, strongly increases adiposity, and has been proposed to be the rodent model that best fits human obesity (25, 27, 28). In this study, we investigated glucose homeostasis and pancreatic islet functionality in nonpregnant and pregnant cafeteria diet-induced obese rats. We found that glucose tolerance is impaired in obese cafeteria-fed pregnant and nonpregnant rats. Cafeteria diet-induced obesity impairs insulin secretion induced by glucose, tolbutamide, and KCl in freshly isolated islets. However, this inhibitory effect is overcome in islets from pregnant rats, probably as a result of an increase in metabolic activity, associated with a better intracellular Ca^{2+} handling, in especial Ca^{2+} influx.

MATERIALS AND METHODS

All applicable institutional and governmental regulations concerning the ethical use of animals were followed during this research study. The experimental procedures were approved by the university's Committee for Ethics in Animal Experimentation from the State University of Campinas (protocol number 1198-1).

Chemicals

D-[U-14C]glucose and 125I-human recombinant insulin were purchased from G. E. Health Care (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). MTS/PMS preparation was

from CellTiter96 aqueous assay (Promega, Madison, WI). Standard commercial kits were used for measurement of plasma total cholesterol (CHOL), triglycerides (TG) (both from Roche Diagnostics; Mannheim, Germany) free fatty acids (FFA; Wako Chemicals, Neuss, Germany), and albumin and total proteins (Laborlab; Guarulhos, SP, Brazil). Fura-2 AM was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Routine reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Animals, dietary regimen and composition of diet

Virgin female Wistar rats (70 days old, obtained from the State University of Campinas Central Breeding Centre) were randomly assigned to two diet groups: a standard rodent chow and water ad libitum or cafeteria diet for 14 wk. The cafeteria diet group received soft drinks ad libitum, instead of water, alternated daily (Coca-Cola and Guaraná Antarctica) and were fed a pellet made of 37.5% standard rodent chow, 25% peanuts, 25% chocolate, and 12.5% cookies, offered together with palatable food items comprising wafer, snacks, cakes, and biscuits, totaling 4.41 kcal/g (43.1% from carbohydrates; 12.1% from proteins, and 46.9% from fats) as opposed to the 2.63 kcal/g of the standard chow diet Nuvilab CR-1 (Nuvital, Colombo, PR, Brazil). To guarantee the success of this protocol, leftovers were collected and replaced with new items daily. During the feeding period, rats' weight gain was measured weekly. After 12 wk of treatment, the rats were mated by housing males with females overnight during 3 days, and the presence of sperm in vaginal smears was verified each morning. On the occasion of presence of sperm (day 1 of pregnancy), the female rat was housed separately for confirmation of pregnancy and further utilized in experiments on the 15th/16th day of pregnancy, corresponding the 14th wk of treatment. During the experimental period, rats were housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12:12-h light-dark cycle (lights on 0600–1800).

Animal features

At the end of the feeding period, and on the 15th/16th day of pregnancy, the rats were killed by decapitation, and perigonadal and retroperitoneal fat pad weights were measured. Blood glucose levels were measured using a glucose analyzer (Accu-Check Advantage II, Roche, Basel, Switzerland). Plasma CHOL, TG, FFA, albumin, and total proteins were measured using standard commercial kits, according to the

manufacturer's instructions. Insulin was measured by RIA using rat insulin as standard. Intraperitoneal glucose tolerance test. At 14–15 days after the onset of pregnancy, all groups of rats were submitted to an intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT). Food was withdrawn 12 h before the experiment, and then the rats were weighed, and a basal blood sample was taken from the tip of the tail ($t = 0$ min). Subsequently, each rat received a glucose solution load (2 g/kg ip body wt), and additional blood samples were collected at 15, 30, 60, and 120 min after injection. Glucose levels during the test were measured immediately. The area under the curve was calculated from values for each rat.

Islet isolation, insulin secretion, and insulin content

Islets were isolated from fed rats (pregnant or not; 14 wk of treatment, 15th/16th day of pregnancy) by collagenase digestion of pancreas and then selected with a micropipette under a microscope to exclude any contaminating tissues. Groups of four islets were first incubated for 45 min at 37°C in Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB) containing glucose 5.6 mmol/l and equilibrated with 95% O₂-5% CO₂, pH 7.4. The solution was then replaced with fresh KRB, and the islets were incubated for a further 90-min period with medium containing 2.8, 5.6, 8.3, 11.1, 16.7, or 27.7 mmol/l glucose; 2.8 mmol/l glucose plus 40 mmol/l KCl; or 2.8 mmol/l glucose plus 100 µmol/l tolbutamide. The incubation medium contained (mmol/l): 115 NaCl, 5 KCl, 24 NaHCO₃, 2.6 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 25 HEPES; pH 7.4, supplemented with BSA (0.3% wt/vol; Sigma). For measurement of the total insulin content, groups of 10 islets were collected and transferred to tubes of 1.5 ml. Alcohol-acid solution (1 ml; final concentration of 20% of ethanol and 0.2 mmol/l of HCl) was added to the samples followed by sonication of the pancreatic islets (3 times, 10-s pulses). The insulin in the media was measured by RIA.

DNA assay.

Pancreatic islets were homogenized through short bursts of sonication in 500 µl of buffer composed of 50 mmol/l Tris - HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS (pH 8.1). DNA was extracted in phenol/chloroform, precipitated in ethanol, and resuspended in low Tris-EDTA buffer. RNA was subsequently removed by digestion with 1 µg of RNase A

(Sigma) for 30 min at 37°C. Thus, DNA was quantified using a commercial kit (Quant-iT PicoGreen, Invitrogen), according to the instructions in the manual.

Glucose oxidation

Groups of 25 islets were incubated for 2 h at 37°C in KRB supplemented with 11.1 mmol/l glucose with trace amounts of D-[U-14C]glucose (20 µCi/ml) for ¹⁴CO₂ formation. Islet glucose metabolism was stopped with HCl (1 N) with consequent cell cleavage. ¹⁴CO₂ released was absorbed by NaOH (1 mol/l) for 1 h at 4°C, obtaining NaH¹⁴CO₃. Scintillation fluid was added, and radioactivity was counted in a liquid scintillation counter.

Metabolic activity

Metabolic activity of islets was assessed by measuring reducing equivalents, namely NAD(P)H, through reduction of a water-soluble tetrazolium salt, MTS (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxy-phenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt) to its respective formazan product in a living tissue system (29, 33). For this purpose, groups of 100 freshly isolated islets were incubated for 150 min in Krebs/HEPES sterile buffer containing 11.1 mmol/l glucose, 15% MTS, and 1% phenazine methosulfate (PMS). The absorbance was acquired at 490 nm, every 10 min after the addition of the reagent solution, according to the manufacturer's instructions.

Measurement of intracellular Ca²⁺

Freshly isolated islets were incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal calf serum, 11.1 mmol/l glucose, 100 UI of penicillin/ml, 100 µg of streptomycin/ml at 37°C in a 95% O₂-5% CO₂ for 4–6 h. Thereafter, islets were transferred to plates containing KRB medium (mmol/l concentrations were 115 NaCl, 5 KCl, 24 NaHCO₃, 1 MgCl₂, 2.6 CaCl₂, 25 HEPES; pH 7.4) with 5 mmol/l glucose and 5 µmol/l fura-2 AM for 1 h. Islets were then transferred to a thermostatically regulated open chamber (37°C), placed on the stage of an inverted microscope (Nikon UK, Kingston, UK), and perfused with KRB at a flow rate of 1.5 ml/min. A ratio image was acquired approximately every 5 s with an ORCA-100 charge-coupled device camera (Hamamatsu Photonics Ibérica, Barcelona, Spain), in conjunction with a Lambda-10-CS dual-filter wheel (Sutter Instrument Company, Novato, CA), equipped with 340 and

380 nm, 10-nm bandpass filters, and a range of neutral density filters (Omega Optical, Stanmore, UK). Data were obtained using the ImageMaster5 software (Photon Technology International, Birmingham, NJ). The amplitude and frequency of Ca^{2+} oscillations were determined after the first peak following the introduction of 11.1 mmol/l glucose in the medium. For the amplitude, the first increase in Ca^{2+} concentration was calculated subtracting basal values (2.8 mmol/l) from values obtained at the zenith (11.1 mmol/l). The amplitude of oscillations was calculated by subtracting the highest from the lowest value of individual oscillation at 11.1 mmol/l glucose. We considered as oscillation every increment in Ca^{2+} fluorescence ratio (F340/F380) at least two times greater than any change in F340/F380 at basal glucose concentration. The frequency was calculated by counting the number of oscillations during 11.1 mmol/l glucose, and it was expressed as oscillations per minute. In the experiments with tolbutamide, the area under the curves was calculated during the period that the drug was present in the medium, after subtracting the basal values (2.8 mmol/l glucose).

Real-time PCR

Total cellular RNA was extracted from groups of 500 islets using TRIzol reagent. Two micrograms of total RNA were reverse transcribed using a reverse transcriptase and random hexamer primers. Real-time PCR reactions were performed in a total volume of 15 μl using the Fast SYBR Green technology (Applied Biosystems, Foster City, CA). Samples were denatured at 94°C for 10 min followed by 40 PCR cycles at 95°C/60°C. PCR amplifications were performed in duplicate. The purity of the amplified PCR products was verified by melting curves. The expression of the target genes was normalized against the expression levels of the housekeeping gene GAPDH. Sequence of the primers used were (5'-3'): sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2a (SERCA2a) forward: GGTACTGGCTGATGATAACTTCTCC, reverse: TGTTGTTGTAGATGGCACGGC; L-type- α 1.2 subunit voltage-sensitive Ca^{2+} channel ($\text{Ca}_v\alpha 1.2$) forward: GACACAGAGAGGAAGTTCAAGGG, reverse: GCGTGGGCTCCCATAGTTG; L-type- β 2 subunit voltage-sensitive Ca^{2+} channel ($\text{Ca}_v\beta 2$) forward: TGCACTGGAGTATCCAAGCG, reverse: CCACTTCGTCTCAGCCACTC.

Statistical analysis

Data were expressed as means $\pm$ SE for the number of rats and samples (n) indicated. Statistical analysis was performed by the Student's t-test or two-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls posttest. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Animal features

Cafeteria-diet-fed rats showed a greater weight gain than control chow diet-fed rats from the 3rd until the 12th wk of the feeding period, when females were mated with males (Fig. 1). At the end of the diet period (14th wk), body weight, retroperitoneal, and perigonadal fat pad weights were heavier in Caf and CafP rats, compared with the C and CP groups (Table 1). CafP and CP rats presented higher body weight than Caf and C rats, respectively, because of the contribution of the weight of the fetuses. After 12 h of fasting, plasma insulin, TG, FFA, albumin, and total plasma protein levels were similar for the groups (Table 2). Fasting blood glucose and plasma (CHOL) levels were lower in CP and CafP than the C and Caf groups. In the fed state, plasma insulin and FFA levels were higher in Caf and CafP than C and CP rats. Fed blood glucose levels were diminished in both CP and CafP rats, compared with nonpregnant groups. In CP rats, fed TG plasma levels were higher than those of the C group. CHOL, albumin, and total plasma proteins values were similar in the groups during the fed state. Insulin/glucose index was higher in Caf and CafP than C and CP groups in both fasting (12 h) and fed conditions.

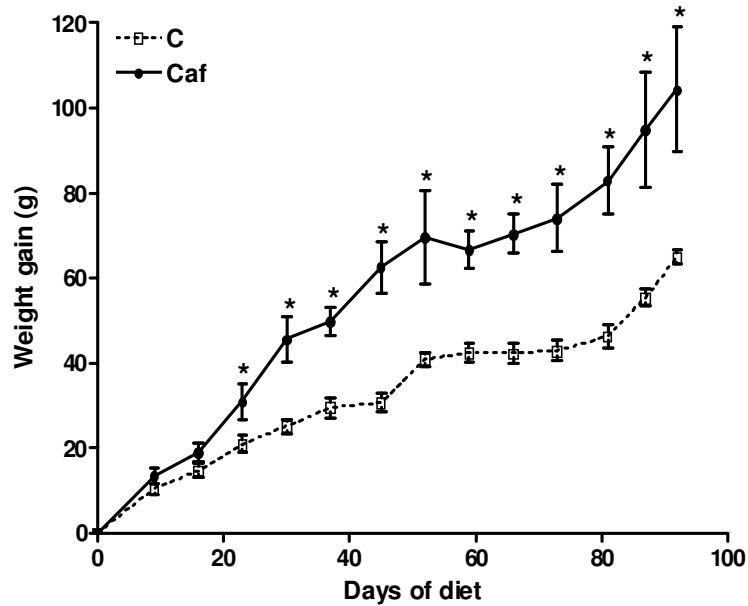


Figure 1. Weight gain during the feeding period was measured weekly in rats fed on a chow (dotted lines) or a cafeteria (solid lines) diet. Initial body weights were 218 ± 3 g and 215 ± 4 g for C and Caf, respectively (NS). Values are means $\pm$ SE; $n=10-20$ rats for each group. * $P < 0.05$.

Table 1. Body weight (bw) and fat pad weight at the end of the diet treatment

Group	bw (g)	Retroperitoneal Fat Pad (g/100g bw)	Perigonadal Fat Pad (g/100g bw)	P
1 C	261 $\pm$ 7.8	0.68 $\pm$ 0.06	1.32 $\pm$ 0.09	-
2 CP	280 $\pm$ 8.6	0.91 $\pm$ 0.10	1.54 $\pm$ 0.23	-
3 Caf	317 $\pm$ 11.2*	2.27 $\pm$ 0.14***	3.82 $\pm$ 0.33***	*vs 1;2
4 CafP	332 $\pm$ 15.8*	2.28 $\pm$ 0.23***	3.48 $\pm$ 0.33***	*vs 1;2

Values are expressed as means $\pm$ SE. C, nonpregnant; CP, pregnant; Caf, cafeteria diet fed nonpregnant; and CafP, cafeteria diet fed pregnant. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

Table 2. Blood glucose, plasma insulin, CHOL, TG, FFA, albumin, and total proteins levels and insulin/glucose index of non-pregnant and pregnant rats fed a chow or cafeteria diet

	C	CP	Caf	CafP
Fasted				
Glucose (mg/dL)	69±2 (28)	58±4 (9) ³	71±2 (25)	60±2 (10) ³
Insulin (ng/mL)	0.34±0.04 (12)	0.47±0.11 (5)	0.62±0.07 (11)	0.58±0.07 (4)
Ins/Glu Index	4.7±0.4 (9)	6.8±0.5(3)	9.1±1.0(10) ²	10.2±1.6(4) ²
CHOL (mg/dL)	75±7 (15)	33±3 (7) ³	75±9 (13)	44±6 (6) ³
TG (mg/dL)	51±3 (18)	61±3 (5)	64±5 (15)	49±6 (5)
FFA (mmol/L)	1.13±0.17 (10)	0.80±0.13 (7)	0.95±0.13 (8)	0.67±0.19 (5)
Albumin (g/dL)	3.1±0.02 (3)	3.2±0.1 (3)	3.5±0.1 (4)	3.4±0.1 (3)
Total plasma proteins (g/dL)	6.8±0.4 (3)	6.5±0.1 (3)	6.9±0.01 (4)	6.7±0.1 (3)
Fed				
Glucose (mg/dL)	87±3 (16)	67±3 (5) ³	91±2 (19)	73±2 (6) ³
Insulin (ng/mL)	1.7±0.2 (12)	1.9±0.2 (3)	3.4±0.3 (15) ¹	4.9±1.3 (5) ¹
Ins/Glu Index	19±2 (8)	27±2 (3)	39±3 (8) ⁴	97±6 (3) ⁴
CHOL (mg/dL)	59±5 (20)	33±4 (7)	72±6 (28)	53±7 (8)
TG (mg/dL)	105±7 (17)	167±22 (5) ⁴	90±8 (22)	124±14 (7)
FFA (mmol/L)	0.28±0.03(14)	0.29±0.03(6)	0.42±0.03(18) ¹	0.47±0.03(6) ¹
Albumin (g/dL)	3.0±0.1 (7)	3.0±0.1 (4)	3.3±0.1 (12)	3.3±0.1 (4)
Total plasma proteins (g/dL)	7.1±0.2 (7)	6.8±0.3 (4)	7.1±0.2 (12)	7.0±0.1 (4)

Values are means ± SE; (n) from three different treatment groups.

1 *P* < 0.05; different from C and CP;

2 *P* < 0.01; different from C;

3 *P* < 0.05; different from C and Caf;

4 *P* < 0.01; different from all other groups.

Glucose tolerance

As installation of insulin resistance in diet-induced obesity is time dependent and tissue specific (25), our first studies were performed in rats fed on a cafeteria diet for 8 wk. After this period, we observed an increase in weight gain, but only a marginal impairment in glucose tolerance in the cafeteria-diet-fed rats (data not shown) and, for this reason, we decided to extend the diet period for 6 additional weeks. After 14 wk, cafeteria diet-induced obesity provoked impaired glucose tolerance in pregnant and nonpregnant rats (Fig. 2A). This effect was dependent only on obesity, rather than on the pregnancy state or on the interaction between both conditions. At 30 min after glucose challenge, blood glucose concentrations were higher in Caf than C rats ($P < 0.05$) and in CafP than C and CP rats ($P < 0.05$). After 1 h, glycemia was still higher in Caf and CafP rats than C and CP rats (Fig. 2A). The area under the curve in response to glucose load was higher in Caf and CafP than in control groups [$32,370 \pm 1,680$ Caf ($n = 19$), $31,280 \pm 3,015$ CafP ($n = 6$) vs. $22,800 \pm 1,095$ C ($n = 18$), $20,500 \pm 885$ CP ($n = 6$), respectively; $\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] ($P < 0.01$). This effect, at least in the CafP rats, was probably due to an increase in insulin resistance, since plasma insulin during the GTT (Fig. 2B) in CafP rats at 15 min (interaction among obesity and pregnancy) and 1 h (effect of obesity) was higher than that of the other groups.

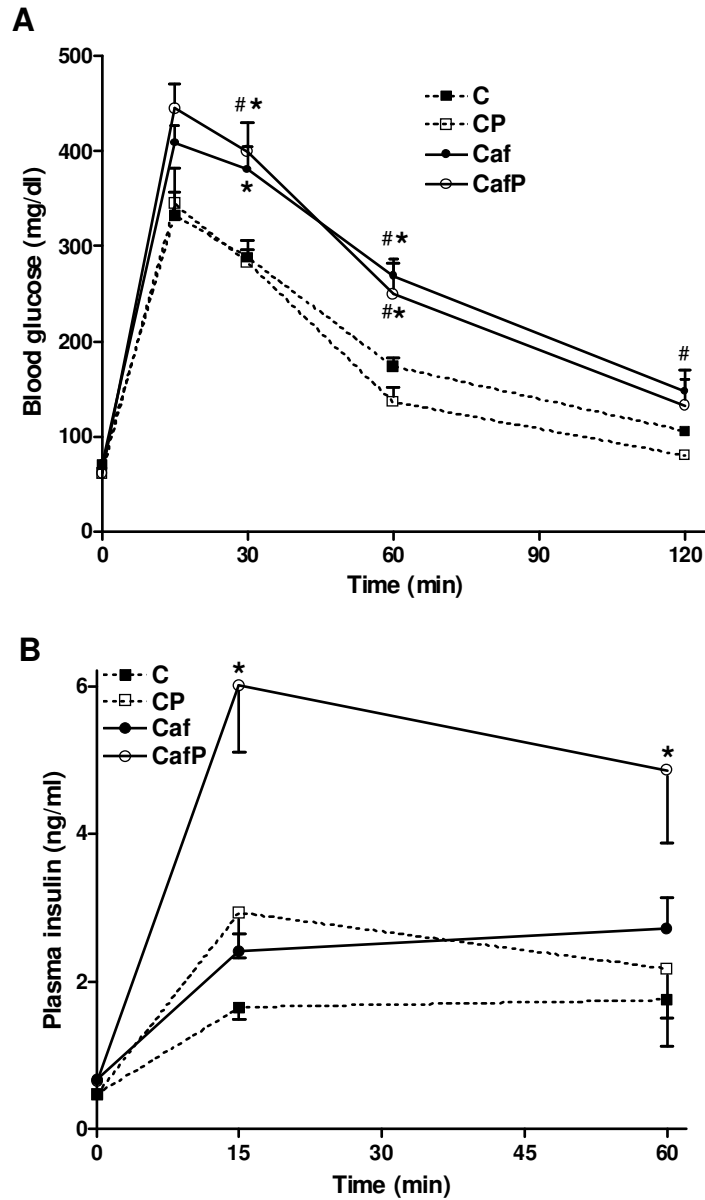


Figure 2. Blood glucose (A) and plasma insulin (B) during ipGTT from non-pregnant (solid symbols) and pregnant (open symbols) rats on day 14-15 of pregnancy in rats fed on a chow (dotted lines) or cafeteria (solid lines) diet. Values are means $\pm$ SE; n=6-20 rats from three different treated groups. Symbols represent statistical differences between groups, $P < 0.05$; (A) * vs C; # vs CP; (B) * vs all the other groups.

Islet insulin content and insulin secretion induced by glucose, KCl, and tolbutamide

Pregnancy enhanced total insulin content in islets from CafP rats compared with the other groups (43.7 ± 3.7 vs. C 15.6 ± 1.2 ; CP 19.1 ± 1.5 ; Caf 12.6 ± 1.1 , ng/ng DNA $P < 0.001$; $n = 14-19$). This effect was dependent on both obesity and the pregnancy states and also on the interaction between both conditions. Total insulin content was similar in C, CP, and Caf islets. The insulin released by islets during static incubation in response to increasing glucose concentrations (2.8 –27.7 mmol/L), normalized by the islet DNA content, is shown in Fig. 3. In all groups, insulin secretion was represented by a sigmoidal curve. At 2.8 mmol/L glucose, insulin released was higher in Caf and CafP compared with C and CP islets ($P < 0.05$). At 5.6 mmol/L glucose, secretion was higher in islets from pregnant (CP and CafP) than nonpregnant rats (C and Caf) ($P < 0.05$). The insulin secretion, in the presence of 8.3 mmol/L glucose, was lower in Caf compared with CP and CafP groups ($P < 0.01$). At 11.1 mmol/L glucose, the insulin secretion was significantly lower in Caf compared with C, CP, and CafP islets ($P < 0.05$). Finally, at 16.7 mmol/L glucose, but not at 27.7 mmol/L, insulin secretion was higher in CafP than Caf islets ($P < 0.05$). Pregnancy shifted the dose-response curve to the left in both chow (CP) and cafeteria diet (CafP), compared with nonpregnant rats (C and Caf groups). When the insulin secretion was expressed as a percentage of the maximal release inside each group (Fig. 3, inset), the half-maximal release (EC_{50}) was higher in Caf compared with other groups (12.3 ± 0.6 , 10.6 ± 0.2 , 9.3 ± 0.1 , and 9.6 ± 0.5 mmol/L, respectively for Caf, C, CP, and CafP; $P < 0.05$). It is of note that normalization of insulin secretion by total insulin content shifted the glucose dose-response curve to the right in the CafP group (not shown). However, it seems that this kind of normalization does not reflect the capacity of individual islets to secrete insulin, as judged by the results normalized to total DNA content.

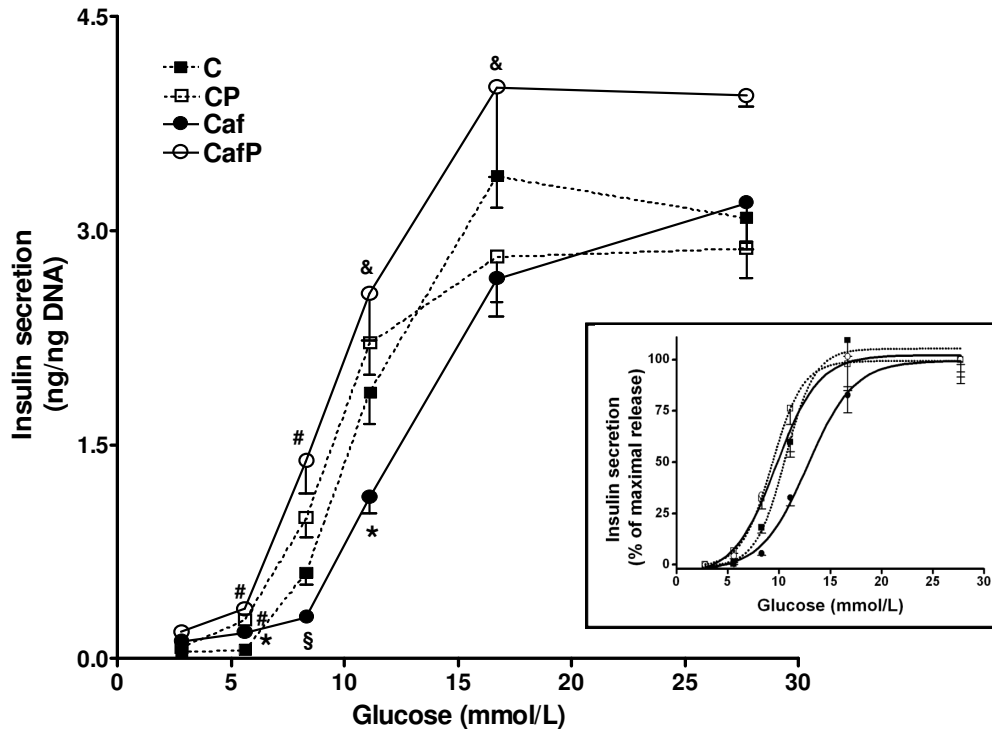


Figure 3. Comparative glucose dose-response curves for isolated islets from non-pregnant (solid symbols) and pregnant (open symbols) rats fed on a chow (dotted lines) or cafeteria (solid lines) diet. Islets were incubated for 90 min with increasing concentrations of glucose, and insulin released was normalized by respective islet DNA content. Values are means $\pm$ SE; $n=8-15$ groups of islets from three different rats. Symbols represent statistical differences between groups in each concentration of glucose, $P < 0.05$; # vs C and Caf; * vs all the other groups; § vs CP and CafP; & vs Caf; differences at 2.8 mmol/L glucose are indicated in the text. In the inset, values represent the percentage of the maximal insulin release inside each group. The 100% released was calculated subtracting basal values from maximal secretion (16.7 or 27.7 mmol/L glucose).

Insulin secretion stimulated by 40 mmol/l KCl or 100 μ mol/L tolbutamide, in the presence of 2.8 mmol/L glucose, was strongly reduced in Caf islets compared with all of the other groups, and higher in CafP than CP islets ($P < 0.05$; $n = 8-10$) (Fig. 4). These results indicate that Caf islets also secreted less insulin than the other groups when the islet cells were depolarized by agents that bypass nutrient metabolism and that pregnancy restores insulin secretion in those experimental conditions.

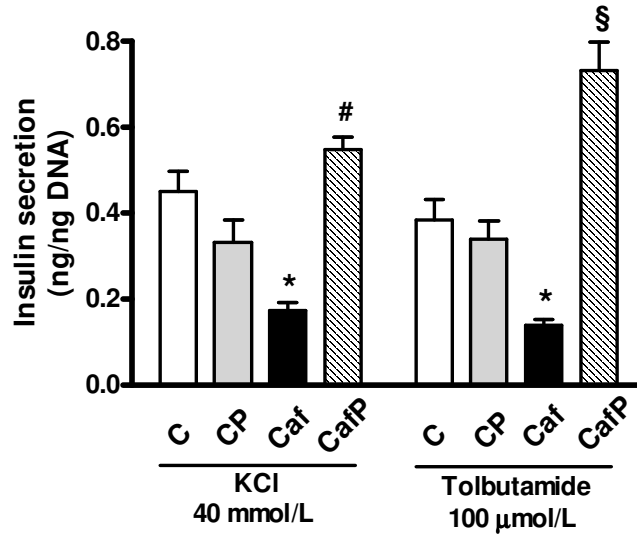


Figure 4. Insulin secretion induced by KCl and Tolbutamide, at 2.8 mmol/L glucose, in isolated islets from C, CP, Caf and CafP rats. The insulin values were normalized by the respective islet DNA content. Values are means $\pm$ SE; $n=8-10$ groups of islets from three different rats. Symbols on the top of each column represent statistical differences between groups, $P < 0.05$; * vs C, CP and CafP; # vs CP and Caf; ** vs C, CP and Caf.

Glucose oxidation and metabolic activity.

Because insulin secretion from β -cells is closely linked to metabolism of glucose, we analyzed some metabolic indicators in islets from obese and pregnant rats. At 11.1 mmol/L glucose, the D-[U- 14 C]glucose conversion to $^{14}\text{CO}_2$ (glucose oxidation) was higher in islets from CafP rats, compared with the other groups (CafP 2.9 ± 0.1 vs. C 2.1 ± 0.2 ; CP 2.0 ± 0.1 , and Caf 1.9 ± 0.1 pmol/ng DNA 2 h; $P < 0.001$; $n = 12$). This effect was dependent on both obesity and the pregnancy state and also on the interaction between both conditions. We also measured the generation of reducing equivalents [i.e., NAD(P)H] in the presence of 11.1 mmol/L glucose, as an indicator of the metabolic activity of the islets (33). CafP showed a higher metabolic activity compared with C and CP islets already at 10 min, and this activity was higher compared with all other groups from 30 up to 150 min (effect of both obesity and pregnancy with interaction) (Fig. 5). It is of note that CP also showed higher glucose oxidation and metabolic activity compared with C group in absolute values, a difference not seen after normalization to total DNA content (not shown).

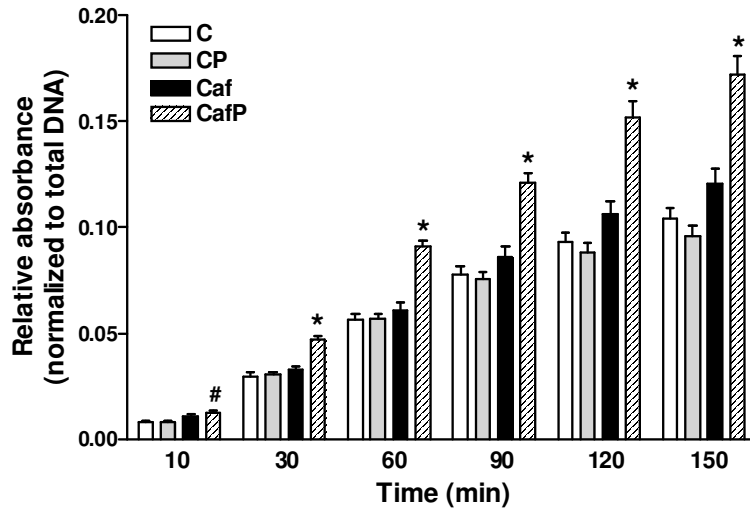


Figure 5. Metabolic activity of islets stimulated with 11.1 mmol/L glucose, normalized by the islet DNA content. Values are means $\pm$ SE; $n=12$ batches of islets from three different rats. Symbols on the top of each column represent statistical differences between groups at each time point, $P < 0.05$; # vs C and CP; * vs C, CP, and Caf.

Glucose- and tolbutamide-induced cytoplasmic Ca^{2+} alterations

After exposure of pancreatic islets to 11.1 mmol/L glucose, cytosolic Ca^{2+} concentrations were increased in all groups (Fig. 6, A–D). The amplitude of the Ca^{2+} alterations, measured after 3–6 min glucose exposure, was significantly lower in islets from Caf, compared with the other three groups (Fig. 6E) ($P < 0.05$; with interaction among obesity and pregnancy). The frequency of oscillations was similar between islets from C and Caf and increased significantly in islets from both CP and CafP groups (Fig. 6F) ($P < 0.05$). Finally, the amplitude of the oscillations was higher in CafP, compared with Caf islets ($P < 0.05$). The cytosolic Ca^{2+} concentrations were also increased by tolbutamide (100 – mol/l) in all groups, and the area under the curve was lower in Caf compared with C islets (0.72 ± 0.14 vs. 1.20 ± 0.10 F340/F380 min; $P < 0.05$; $n = 6$), an effect of obesity without interaction.

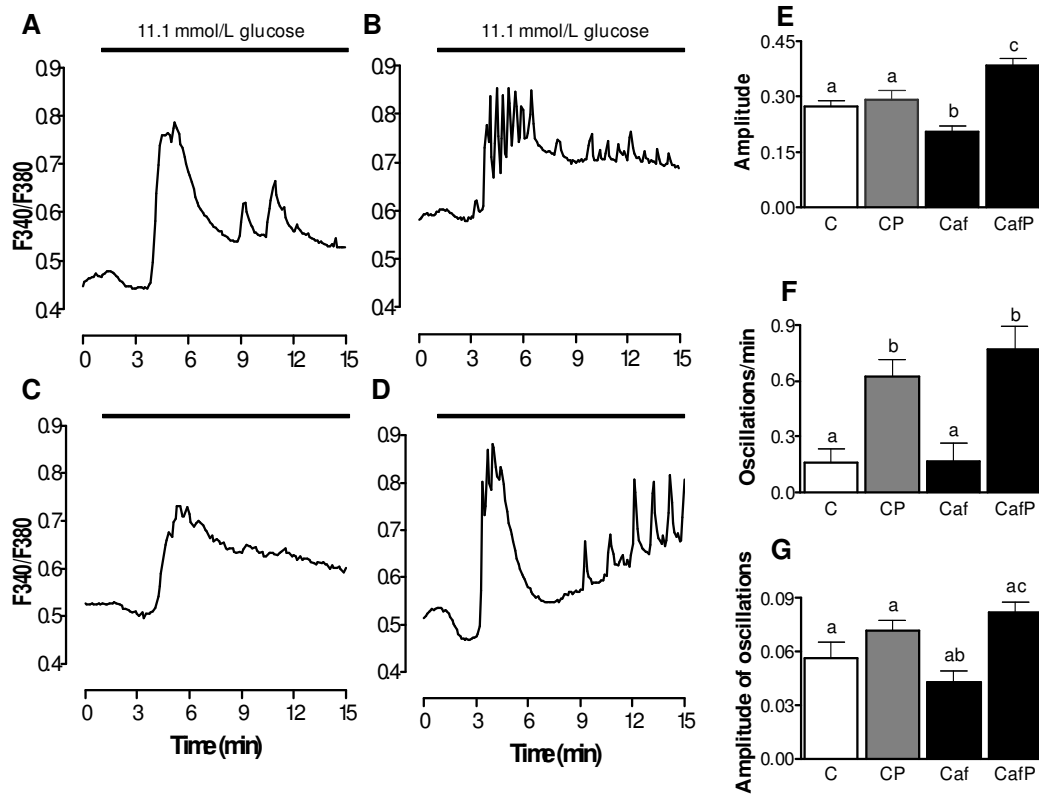


Figure 6. Representative curves of changes in intracellular Ca^{2+} concentrations in response to 11.1 mmol/L glucose (bars) in islets isolated from C (A), CP (B), Caf (C), and CafP (D) rats. The means $\pm$ SE represent the amplitude in ratio units (E), frequency (F) and amplitude of oscillations in ratio units (G) of $[Ca^{2+}]_i$ at 11.1 mmol/L glucose. $n=6-10$ islets from three different rats; same letters above columns indicate similarity between groups, $P < 0.05$.

Cav α 1.2, Cav β 2, and SERCA2a gene expression

A reduction of both Cav α 1.2 (64% vs. C; $P < 0.01$) and SERCA2a (27% vs. C; $P < 0.05$) gene expression was observed in Caf compared with C islets (Fig. 7, A and C). Pregnancy enhanced both Cav α 1.2 (56% vs. C; $P < 0.05$) and SERCA2a (27% vs. C; $P < 0.05$) islet gene expression in control rats (Fig. 7, A and C). Cav α 1.2 gene expression was augmented in CafP compared with Caf islets (77% vs. Caf; $P < 0.001$), while no differences were found in SERCA2a between these groups. These results showed separated effects of obesity and pregnancy (without interaction) in SERCA2a gene expression, while in Cav α 1.2 gene expression, there was an effect of both nutritional and physiological conditions with interaction. Cav β 2 gene expression was similar among the groups (Fig. 7B).

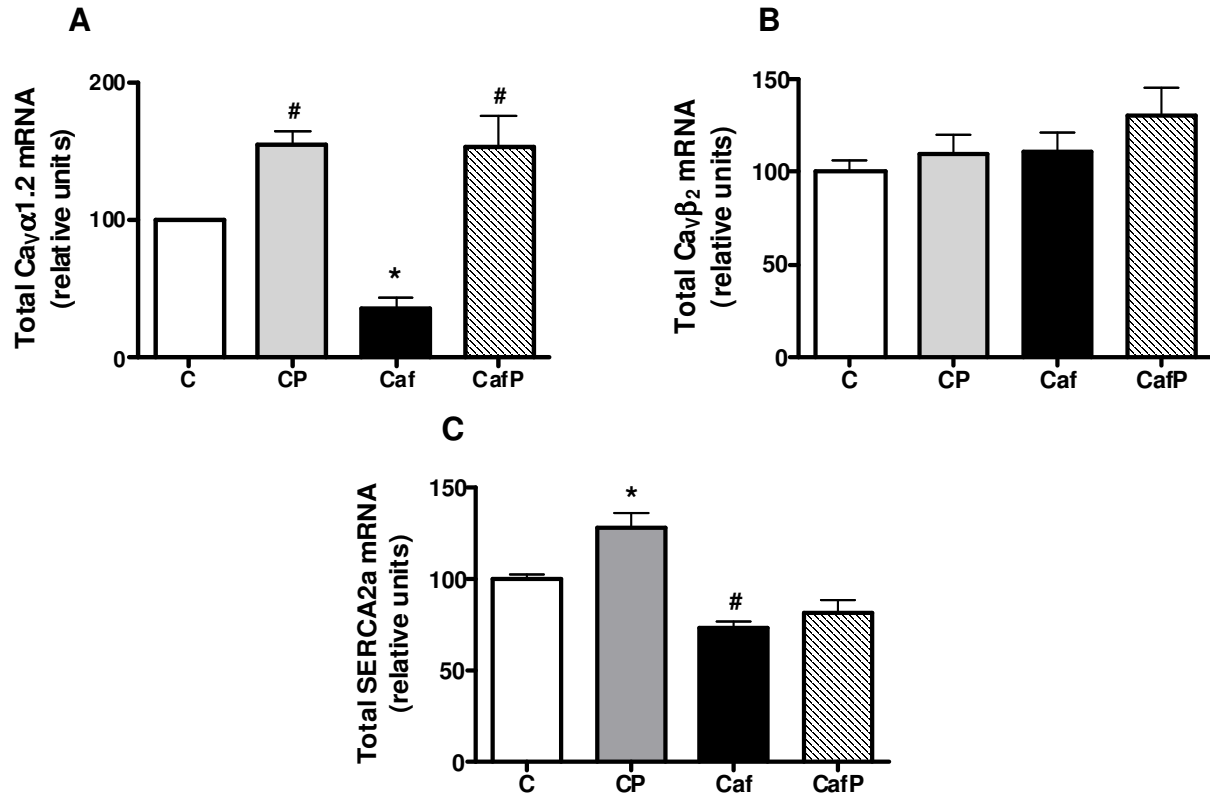


Figure 7. Real-time PCR determination of *Cava1.2* (A), *Cavβ2* (B) and *SERCA2a* (C) mRNA expressions in isolated islets from C, CP, Caf and CafP rats. The data were corrected for GAPDH expression, and are shown as percentage of C; means $\pm$ SE; $n=5-8$. Symbols on the top of each column represent statistical differences between groups, $P < 0.05$; (A) * vs C, CP and CafP; # vs C and Caf; (C) * vs C, Caf and CafP; # C and CP.

DISCUSSION

Obesity is reaching epidemic proportions worldwide, mainly due to changes in lifestyle and easy access to both imbalanced food and overfeeding (7). Many diseases are associated with or have increased risks for health in obese patients, including Type 2 diabetes (4, 13). Under normal situations, the organism is able to compensate the demand for insulin, increasing the hormone secretion from pancreatic β -cells (24). Defects or inability of the β -cells to respond to glucose certainly have a role in the onset of Type 2 diabetes. Therefore, the mechanisms that make β -cells capable of overcoming insulin resistance during pregnancy are of great importance within the scope of biomedical sciences, having potential implications for humans. To address this question, we used an experimental model in which obesity was achieved by feeding female rats on a high-fat/high-calorie cafeteria diet (25, 35). Because the

metabolic disorders induced by the cafeteria diet closely resemble those observed in humans, this is an attractive model to study obesity and also its consequence upon pregnancy. Our results show that cafeteria-induced obesity impairs insulin secretion stimulated by glucose and also by direct depolarizing agents, which is ameliorated in obese rats during pregnancy, and point to an important role of increased metabolic activity and especially of Ca^{2+} influx and mobilization in this process.

The impaired glucose tolerance observed in obese rats, both pregnant and nonpregnant, is in accordance with several observations showing that obesity induces insulin resistance (4, 16, 22, 25). Interestingly, fasted and fed plasma glucose is normal in the insulin-resistant rats, especially in pregnant groups, indicating that the higher plasma insulin levels are enough to maintain normoglycemia. The resistance to endogenous insulin in rats develops between days 16 and 19 of pregnancy (18), justifying the normal insulin levels observed in the pregnant chow-diet rats during ipGTT at the 14–15th day of pregnancy.

Reductions in insulin secretion stimulated by glucose in islets from rats fed on high-carbohydrate, high-protein or high-lipid diets have been previously observed (31). Thus, it is expected that obese cafeteria rats also present lower insulin release capacity. Nevertheless, the recovery of this capacity during pregnancy is of crucial interest and the information regarding intracellular events leading to this enhanced insulin secretion is not yet known. Therefore, our results showing increased metabolic activity, improved Ca^{2+} handling, and recovery of insulin secretion in pancreatic β -cells of obese rats during pregnancy are, to our knowledge, the first data to contribute to the clarification of the molecular mechanism of this phenomenon. On the other hand, it is at variance with decreased insulin secretion observed in high-saturated-fat-fed pregnant obese rats (15). We understand that different findings may be the outcome of different scientific strategies (type and time of diet, and time of pregnancy), but it is clear that a cafeteria diet is much closer to human overfeeding than other experimental models.

It is well established that the redox signaling is important for normal cellular functions, and it is of the greatest importance in the case of β -cells, where the oxidative metabolism is the main signal for insulin secretion. The majority of the

NADPH inside the cells comes from the pentose phosphate pathway owing to the oxidative phase of reactions. At the molecular levels, NADPH can be generated by mitochondrial transhydrogenase or in the cytosol from glucose-6-phosphate by several enzymes (37). It has been known since long ago that intracellular NADPH increases following a load of glucose on pancreatic islets, and it is assumed that the increase in the ratio of $[NADPH/NADP^+]$ is important for insulin secretion (14, 20). Conversely, the $[NADH/NAD^+]$ ratio seems to be of no importance for proper insulin secretion (14). Recently, it has been proposed that NADPH is important for Ca^{2+} homeostasis (37). Indeed, NADPH is essential for Ca^{2+} -induced insulin exocytosis, an effect that seems to be mediated by the NADPH-dependent protein glutaredoxin-1 (26). Therefore, the increase in NADPH showed in this study may partly explain the recovery of the insulin secretion capacity of pregnant obese rats. We speculate that a possible increase in the nonoxidative phase of pentose phosphate pathway may also provide additional substrate (fructose-6-phosphate) to glycolysis. This hypothesis is in line with the increase in glucose oxidation in pregnant obese rats, albeit it cannot be excluded by our data that these pathways are independently regulated.

Several of the steps involved in the insulin secretion process are modulated during pregnancy (1, 5, 8, 30). Ca^{2+} has a multitude of effects on the cells and plays an essential role on exocytosis (12). A correlation between the oscillatory insulin secretion pattern and oscillations of free Ca^{2+} within β -cells is well established (32). Cafeteria diet-induced obesity provoked a defect in Ca^{2+} handling by the islets. This effect seems to be dependent on a reduction of Ca^{2+} influx, as well as internal Ca^{2+} mobilization. Our experiments showing that direct depolarization of the cell membrane by KCl and tolbutamide (circumventing glucose metabolism) is impaired in Caf islets associated to a reduction in the L-type Ca^{2+} channel $Cav\alpha 1.2$ subunit expression, support this hypothesis. In accordance reduced insulin secretion is also associated with defective glucose-dependent cytosolic Ca^{2+} handling in animal models of glucose intolerance (21), a defect linked to alterations in the activity and expression of the SERCA, which is involved in the regulation of Ca^{2+} handling by β -cells (17, 21). Actually, pregnancy increases SERCA2 protein expression in pancreatic islets, as shown in this study, and the inhibition of this protein decreases the first phase of

insulin secretion, suggesting that intracellular Ca^{2+} stores in pancreatic islets from pregnant rats play a role in the enhancement of insulin release capacity (2). It seems that normalization of the Cav α 1.2 gene expression in CafP islets is sufficient to restore cytoplasmic Ca^{2+} levels and insulin secretion in these islets, independent of modifications on the SERCA2a expression.

Perspectives and Significance

The present observations indicate that cafeteria diet induces obesity and insulin resistance, as well as diminishes insulin secretion stimulated by glucose and other depolarizing agents. The inhibitory effect of obesity on insulin secretion seems to be due to a defect in Ca^{2+} mobilization by these islets, independently of alterations in islets metabolism. Pregnancy recovers the secretory capacity in islets from obese rats, which is linked to the restoration of the β -cell ability to manage Ca^{2+} , especially by increasing the capacity of Ca^{2+} uptake. This phenomenon seems to be, at least in part, dependent on the augmentation of the expression of the L-Type Ca^{2+} channels sub-unit α 1.2. In addition, during pregnancy pancreatic islet metabolic activity is enhanced in obese rats, which may increase the glucose responsiveness of pancreatic β -cells. Further studies aiming at clarifying the deleterious effects of obesity on Ca^{2+} movements and insulin secretion, as well as the discovery of agents that help the islet cells to recover such an ability during the pregnant state, may help in developing strategies to maintain normoglycemia in Type 2 diabetic obese patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian foundations Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Pesquisa, and Instituto Nacional de Obesidade e Diabetes. We thank Mr. L. Domingos for technical assistance and Dr. N. Conran for English editing. M. L. Bonfleur is a Ph.D. student on leave from the State University West of Parana', Brazil.

REFERENCES

1. Amaral ME, Cunha DA, Anhe GF, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, Bordin S, Boschero AC. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J Endocrinol* 183: 469–476, 2004.
2. Anhe GF, Nogueira TC, Nicoletti-Carvalho JE, Lellis-Santos C, Barbosa HC, Cipolla-Neto J, Bosqueiro JR, Boschero AC, Bordin S. Signal transducer and activator of transcription 3-regulated sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 expression by prolactin and glucocorticoids is involved in the adaptation of insulin secretory response during the peripartum period. *J Endocrinol* 195: 17–27, 2007.
3. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care* 30 Suppl 2: S112–S119, 2007.
4. Bonadonna RC, Groop L, Kraemer N, Ferrannini E, Del Prato S, DeFronzo RA. Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study. *Metabolism* 39: 452–459, 1990.
5. Bordin S, Amaral ME, Anhe GF, Delghingaro-Augusto V, Cunha DA, Nicoletti-Carvalho JE, Boschero AC. Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. *Mol Cell Endocrinol* 220: 41–50, 2004.
6. Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* 132: 879–887, 1993.
7. Caterson ID, Gill TP. Obesity: epidemiology and possible prevention. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16: 595–610, 2002.
8. Cunha DA, Amaral ME, Carvalho CP, Collares-Buzato CB, Carneiro EM, Boschero AC. Increased expression of SNARE proteins and synaptotagmin IV in islets from pregnant rats and in vitro prolactin-treated neonatal islets. *Biol Res* 39: 555–566, 2006.

9. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146: 4192–4199, 2005.
10. Devlieger R, Casteels K, Van Assche FA. Reduced adaptation of the pancreatic B cells during pregnancy is the major causal factor for gestational diabetes: Current knowledge and metabolic effects on the offspring. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1–5, 2008.
11. Di Cianni G, Seghieri G, Lencioni C, Cuccuru I, Anichini R, De Bellis A, Ghio A, Tesi F, Volpe L, Del Prato S. Normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus: what is in between? *Diabetes Care* 30: 1783–1788, 2007.
12. Douglas WW, Rubin RP. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* 159: 40–57, 1961.
13. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* 298: 2028–2037, 2007.
14. Hedekov CJ, Capito K, Thams P. Cytosolic ratios of free [NADPH]/[NADP⁺] and [NADH]/[NAD⁺] in mouse pancreatic islets, and nutrient-induced insulin secretion. *Biochem J* 241: 161–167, 1987.
15. Holness MJ, Smith ND, Greenwood GK, Sugden MC. PPAR α activation reverses adverse effects induced by high-saturated-fat feeding on pancreatic beta-cell function in late pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1087–E1094, 2007.
16. Kissebah AH. Insulin resistance in visceral obesity. *Int J Obes* 15 Suppl 2: 109–115, 1991.
17. Kulkarni RN, Roper MG, Dahlgren G, Shih DQ, Kauri LM, Peters JL, Stoffel M, Kennedy RT. Islet secretory defect in insulin receptor substrate 1 null mice is linked with reduced calcium signaling and expression of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA)-2b and -3. *Diabetes* 53: 1517–1525, 2004.
18. Leturque A, Ferre P, Satabin P, Kervran A, Girard J. In vivo insulin resistance during pregnancy in the rat. *Diabetologia* 19: 521–528, 1980.

19. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Picard C, Flament-Durand J. Effects of pregnancy and chorionic growth hormone upon insulin secretion. *Endocrinology* 84: 41–44, 1969.
20. Malaisse WJ, Sener A, Herchuelz A, Hutton JC. Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism* 28: 373–386, 1979.
21. Marie JC, Bailbe D, Gylfe E, Portha B. Defective glucose-dependent cytosolic Ca^{2+} handling in islets of GK and nSTZ rat models of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 169: 169–176, 2001.
22. Martyn JA, Kaneki M, Yasuhara S. Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology* 109: 137–148, 2008.
23. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130: 1459–1466, 1992.
24. Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81: 442–448, 1988.
25. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJ. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146: 1576–1587, 2005.
26. Reinbothe TM, Ivarsson R, Li DQ, Niazi O, Jing X, Zhang E, Stenson L, Bryborn U, Renstrom E. Glutaredoxin-1 mediates NADPH-dependent stimulation of calcium-dependent insulin secretion. *Mol Endocrinol* 23: 893–900, 2009.
27. Rothwell NJ, Stock MJ. Regulation of energy balance in two models of reversible obesity in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93: 1024–1034, 1979.
28. Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav* 17: 461–471, 1976.
29. Segu VB, Li G, Metz SA. Use of a soluble tetrazolium compound to assay metabolic activation of intact β cells. *Metabolism* 47: 824–830, 1998.

30. Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: β -cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29: 301–307, 1997.
31. Takahashi RF, Curi R, Carpinelli AR. Insulin secretion to glucose stimulus in pancreatic islets isolated from rats fed unbalanced diets. *Physiol Behav* 50: 787–791, 1991.
32. Tengholm A, Gylfe E. Oscillatory control of insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 297: 58–72, 2009.
33. Weinhaus AJ, Stout LE, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *J Endocrinol* 193: 367–381, 2007.
34. Weinhaus AJ, Stout LE, Sorenson RL. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long-term up-regulation of islets. *Endocrinology* 137: 1640–1649, 1996.
35. West DB, York B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr* 67: 505S–512S, 1998.
36. Woods SC, D'Alessio DA, Tso P, Rushing PA, Clegg DJ, Benoit SC, Gotoh K, Liu M, Seeley RJ. Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance. *Physiol Behav* 83: 573–578, 2004.
37. Ying W. NAD^+/NADH and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal* 10: 179–206, 2008.

ANEXO 2

Autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

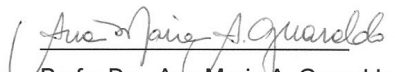
CERTIFICADO

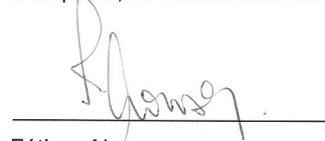
Certificamos que o Protocolo nº **1198-1**, sobre "**Secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratas prenhes obesas por dieta cafeteria**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero / Emerielle Cristine Vanzela**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 27 de fevereiro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1198-1**, entitled "**Insulin secretion from pregnant obese rats fed cafeteria diet**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 27, 2007.

Campinas, 27 de fevereiro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>