

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

JEAN FRANCIESCO VETTORAZZI

**AVALIAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE MARCADORES DA CÉLULA
BETA PANCREÁTICA ENVOLVIDOS NO ACOPLAMENTO
ESTÍMULO/SECREÇÃO DA INSULINA EM CAMUNDONGOS DESNUTRIDOS
SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA E SUPLEMENTADOS COM
TAURINA**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JEAN FRANCIESCO VETTORAZZI

**AVALIAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE
MARCADORES DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA
ENVOLVIDOS NO ACOPLAMENTO ESTÍMULO/SECREÇÃO
DA INSULINA EM CAMUNDONGOS DESNUTRIDOS
SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA E SUPLEMENTADOS
COM TAURINA**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Jean Franciesco Vettorazzi</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

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

Orientador: Prof. Dr. Everardo Magalhaes Carneiro
Coorientadora: Profa. Dra. Rosane Aparecida Ribeiro

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

V643a Vettorazzi, Jean Franciesco, 1989-
Avaliação molecular e funcional de marcadores da célula beta pancreática envolvidos no acoplamento estímulo/secreção da insulina em camundongos desnutridos submetidos à dieta hiperlipídica e suplementos com taurina / Jean Franciesco Vettorazzi. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Insulina - Secreção. 2. Desnutrição. 3. Obesidade. 4. Taurina. I. Carneiro, Everardo Magalhães, 1955-. II. Ribeiro, Rosane Aparecida. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Molecular and functional evaluation of markers in the pancreatic beta cell involved in the insulin stimulus/secretion coupling in malnourished mice submitted to high fat diet and supplemented with taurine

Palavras-chave em Inglês:

Insulin - Secretion

Malnutrition

Obesity

Taurine

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Everardo Magalhães Carneiro [Orientador]

Cláudio Chrysostomo Werneck

Leonardo dos Reis Silveira

Data da defesa: 21-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 21 de fevereiro 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Everardo Magalhaes Carneiro (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck



Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira



Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva



Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel



Assinatura

'Cause god makes no mistakes

I'm on the right track baby

I was born this way`

(Gaga)

Agradecimentos

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

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

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

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

A professora, e amiga, Dra. Rosane Aparecida Ribeiro pela ajuda e incentivo, contribuindo para este trabalho desde a escrita do meu projeto, experimentos e coorientação. Além disso, agradeço pela paciência e insistência para que eu continuasse estudando e aprendendo cada vez mais.

A minha amiga Junia Carolina que me ensinou praticamente todas as técnicas que aprendi, além de ser companheira de experimentos, estudos e festas.

As amigas Tarlliza e Patricia pelo companheirismo e apoio em todas as etapas do mestrado.

Aos amigos de laboratório Zé, Sandra, Gustavo, Jane, Thiago, Rafael, Renato, André, Fernanda, Leli, Ana Paula, Luciana pelo apoio e colaborações nestes dois anos.

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

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

Aos professores Dr. Fernando Abdukader e Ubiratan Fabres pelo empréstimo de anticorpos, fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

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

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO	1
Secreção de insulina	1
Canais de K_{ATP} e sua Contribuição para a Atividade Elétrica da Célula β	3
Canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Cav) e Função da Célula β	4
O Aminoácido Taurina (Tau), Ações Biológicas e Secreção de Insulina	5
Desnutrição, Obesidade e Diabetes	6
OBJETIVOS	8
METODOLOGIA.....	9
Animais	9
PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	10
Avaliação do Estado Nutricional.....	10
Teste de Tolerância à glicose (ipGTT) e à insulina (ipITT)	10
Isolamento de Ilhotas Pancreáticas de camundongos	11
Secreção Estática de Insulina	11
RIE (Radioimunensaio).....	12
Conteúdo total de DNA.....	12
Registro das oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ em ilhotas pancreáticas.....	12
Western Blot	13
Forma de Análise dos Resultados	13
RESULTADOS	14
Parâmetros Biométricos e Bioquímicos	14
Homeostase da glicose e sensibilidade à insulina.....	17
Secreção de Insulina e Oscilações citoplasmáticas de Ca^{2+}	19
Conteúdo total de insulina e DNA das ilhotas pancreáticas	33
Expressão de proteínas envolvidas no acoplamento estímulo-secreção da insulina	33
DISCUSSÃO	38

CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
Anexos.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha 1.2$: Subunidade $\alpha 1.2$ do canal de cálcio sensível à voltagem

$\alpha 1.3$: Subunidade $\alpha 1.3$ do canal de cálcio sensível à voltagem

$\beta 2$: Subunidade $\beta 2$ do canal de cálcio sensível à voltagem

Ach – Acetilcolina

ADP – Adenosina difosfato

Akt – Proteína homóloga ao oncogene do timona viral

AMP – Monofosfato de adenosina

AMPc – AMP cíclico

AMPK – Proteína quinase ativada por AMP

ANOVA – Análise de variância

ATP – Trifosfato de adenosina

AUC – Área abaixo da curva

Cav – Canal de cálcio sensível à voltagem

CNA – Comprimento naso-anal

COL – Colesterol

DAG – Diacilglicerol

DZX - Diazoxida

DM – Diabetes Mellitus

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GCK – Glicoquinase

GIP – Peptídeo insulínico dependente de glicose

GLP-1 – Glucagon-like peptide 1

GLUT-2 – Transportador de glicose tipo 2

GTT – Teste de tolerância à glicose

HOCl – Hipoclorito
IP3 – Trifosfato de inositol
IR – Receptor de insulina
IRS-1 – Substrato 1 do receptor de insulina
ITT – Teste de tolerância à insulina
 K_{ATP} – Canal de potássio dependente de ATP
Nif - Nifedipina
NPY – Neuropeptídeo Y
OLETF – Otsuka Long-Evans Tokushima fatty
PDX-1 – Homeobox duodenal e pancreático
PI3K – Fosfatidil inositol 3-quinase
PKA – Proteínas quinase dependente de AMPc
PKC – Proteína quinase C
PKG – Proteína quinase G
PLC – Fosfolipase C
RIE – Radioimunoensaio
SNA – Sistema nervoso autônomo
SNAP-25 – Proteína associada ao sinaptossoma de 25 kDa
SNARE – Receptores de proteínas solúveis ligantes ao fator sensível à N-etilmaleimida
SUR1 – Receptor de sulfoniluréia 1
Tau – Taurina
TG – Triglicerídeos
Tolb – Tolbutamida
VAMP-2- Proteína associada à membrana vesicular isoforma 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Peso corporal (A), Índice de Lee (B), peso das gorduras retroperitoneal (C) e perigonadal (D) dos camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Dados representam a média $\pm$ EPM (n= 10-12). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. P < 0,05 (ANOVA de uma via seguida de *Newman-Keuls*).....15

Figura 2: Efeito da suplementação com Tau sobre a tolerância à glicose em camundongos C, CH, CHT (A) e R, RH e RHT (B). Área abaixo da curva (AUC) da concentração plasmática de glicose durante o ipGTT (C). Dados representam a média $\pm$ EPM da glicemia avaliada antes e depois da injeção ip de 2g/Kg de glicose (n= 5-7). Letras diferentes indicam diferenças significativas, P < 0,05 (ANOVA de uma via seguida de *Newman-Keuls*).....18

Figura 3: Teste de tolerância à insulina (ipITT) nos grupos (A) C, CH e CHT e (B) R, RH e RHT. Área abaixo da curva (AUC) da concentração plasmática de glicose durante o ipITT (C). Dados representam a média $\pm$ EPM da glicemia avaliada antes e depois da injeção ip de 2g/Kg de insulina (n= 5-7). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, P < 0,05 (ANOVA de uma via seguida de *Newman-Keuls*).....19

Figura 4: Secreção de insulina na presença de 30 mM de K⁺ em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Grupos de 4 ilhotas foram incubadas com 2,8 mM de glicose (G) na presença ou ausência de 30 mM de K⁺. Dados são média $\pm$ EPM (n=20-24). Letras diferentes indicam diferenças significativas, P < 0,001 (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).....20

Figura 5. Mudanças na razão de fluorescência para o Ca²⁺ intracelular em ilhotas isoladas de camundongos C (A), CH (B), CHT (C), R (D), RH (E), RHT (F) em resposta a 30 mM de K⁺ como indicado pelas barras superiores. Análise da AUC (G) e da amplitude (H) das oscilações de Ca²⁺ na presença de 30 mM de K⁺. Valores representam média $\pm$ EPM (n =6-

8). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).....21

Figura 6: Secreção de insulina na presença de 20 mM de Arg nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Grupos de 4 ilhotas foram incubadas com 2,8 mM de glicose (G) na presença ou ausência de 20 mM de Arg. Dados são média $\pm$ EPM ($n = 20-24$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).....22

Figura 7: Secreção de insulina na presença de 100 μ M de tolbutamida (Tolb) nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT (A) e comparação entre o grupo C e R (B). Grupos de 4 ilhotas foram incubadas com 2,8 mM de glicose (G) na presença ou ausência de 100 μ M de Tolb. Dados são média $\pm$ EPM ($n = 20-24$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).....23

Figura 8: Mudanças na razão de fluorescência para o Ca^{2+} intracelular em ilhotas de camundongos C (A), CH (B), CHT (C), R (D), RH (E), RHT (F) em resposta a 100 μ M de Tolbutamida (Tolb) como indicado pelas barras superiores. Análise da AUC (G), da amplitude (H) e da frequência das oscilações (I) de Ca^{2+} na presença de Tolb. Valores representam média $\pm$ EPM ($n = 6-8$). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$, ANOVA de uma via seguida de *Newman-Keuls*).....24

Figura 9: Secreção de insulina na presença de 11,1 mM de glicose nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Dados são média $\pm$ EPM ($n = 20-24$). Letras diferentes indicam diferenças significativas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).....25

Figura 10: Secreção de insulina na presença de 11,1 mM de glicose (G) em associação ou não com 30 mM de K^+ nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT (A). Comparação da secreção entre o grupo C e R (B). Dados são média $\pm$ EPM ($n = 20-24$). Letras diferentes

indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*). * $P < 0,05$ versus C (teste *t* de *Student*).....26

Figura 11: Secreção de insulina na presença de 11,1 mM de glicose (G) em associação ou não com 20 mM de Arg nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT (A). Análise comparativa da secreção entre o grupo C e R (B). Dados são média $\pm$ EPM ($n = 20-24$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).....27

Figura 12: Secreção de insulina na presença de 11,1 mM de glicose (G) em associação ou não de 100 μ M de Tolb nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT (A). Comparação da secreção entre o grupo C e R (B). Dados são média $\pm$ EPM ($n = 20-24$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*). * $P < 0,05$ versus C (teste *t* de *Student*).....28

Figura 13: Secreção de insulina na presença de 250 μ M de diazoxida (DZX) em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Grupos de 4 ilhotas foram incubadas com 11,1 mM de glicose (G) na presença ou ausência de 250 μ M de DZX (A). O valor de Δ é obtido da subtração da secreção na presença de G11.1 pela secreção de insulina em resposta à G11.1 + 250 μ M de DZX (B). Dados são média $\pm$ EPM ($n=20-24$). Letras diferentes indicam diferenças significativas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).....29

Figura 14. Mudanças na razão de fluorescência para o Ca^{2+} intracelular em ilhotas isoladas de camundongos C (A), CH (B), CHT (C), R (D), RH (E), RHT (F) em resposta a 11,1 mM de glicose (G11.1) na presença ou ausência de 250 μ M de diazoxida (DZX), como indicado pelas barras superiores. (G) AUC do total de Ca^{2+} citoplasmático em resposta à G11.1 mM associado à 250 μ M de DZX. (H) Δ de Ca^{2+} citoplasmático obtido através da diferença entre o ponto máximo de influxo de Ca^{2+} com o ponto de máxima inibição realizada pela

DZX. Valores representam média $\pm$ EPM (n=6-8). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).....30

Figura 15: Secreção de insulina na presença de 10 μ M de nifedipina (Nif) em ilhotas isoladas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Grupos de 4 ilhotas foram incubadas com 11,1 mM de glicose (G11.1) na presença ou ausência de 10 μ M de Nif (A). O valor de Δ foi obtido através da subtração dos valores da secreção na presença de G11.1 pela secreção em resposta à G11,1 + 10 μ M de Nif (B). Dados são média $\pm$ EPM (n=20-24). Letras diferentes indicam diferenças significativas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).....31

Figura 16. Mudanças na razão de fluorescência para o Ca^{2+} intracelular em ilhotas isoladas de camundongos C (A), CH (B), CHT (C), R (D), RH (E), RHT (F) em resposta a 11,1 mM de glicose (G11.1) na presença ou ausência de 10 μ M de Nif como indicado pelas barras superiores. (G) AUC do total de Ca^{2+} citoplasmático em resposta à G11.1 mM associado a 10 μ M de Nif. (H) Δ de Ca^{2+} citoplasmático obtido através da diferença entre o ponto máximo de influxo de Ca^{2+} com o ponto de máxima inibição realizada pela Nif. Valores representam média $\pm$ EPM (n=6-8). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).....32

Figura 17: Conteúdo total de insulina (A) e de DNA (B) de ilhotas isoladas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Dados são a média $\pm$ EPM (n = 14-24). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$; ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).....33

Figura 18: Expressão proteica das subunidades dos canais de K_{ATP} SUR (A), Kir6.2 (B) Kir6.2 C vs R (C). Dados são a média $\pm$ EPM (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$; ANOVA, seguida de *Newman-Keulst*). * $P < 0,05$ versus C (teste t de *Student*).....34

Figura 19: Expressão proteica das subunidades dos CaV $\alpha 1.3$ (A), $\alpha 1.2$ (B) e $\beta 2$ (C). Dados são a média $\pm$ EPM (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (P <0,05; ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).....35

Figura 20: Expressão proteica da SNAP-25(A), e comparação entre grupo C e R (B). Dados são a média $\pm$ EPM (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (P <0,05; ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*). *P < 0,05 versus C (teste *t* de *Student*).....36

Figura 21: Expressão proteica da SINTAXINA (A), PKA α (B) e VAMP2 (C). Dados são a média $\pm$ EPM (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (P <0,05; ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*). *P < 0,05 versus C (teste *t* de *Student*).....37

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Composição das dietas.....10

Tabela 1: Parâmetros gerais de camundongos C, CH, CHT, R, RH, RHT. Dados representam Média $\pm$ EPM (n = 10-12). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....14

Tabela 2: Concentração plasmática de glicose, insulina, albumina, proteína, colesterol e triglicerídeos de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT no estado de jejum. Dados representam Média $\pm$ EPM (n = 10-12). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....16

Tabela 3: Concentração plasmática de glicose, insulina, colesterol e triglicerídeos de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT no estado alimentado. Dados representam Média $\pm$ EPM (n = 10-12). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....17

RESUMO

No acoplamento estímulo/secreção das células β , os canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Cav) contribuem para a geração e sustentação do potencial de ação. Alterações na sua expressão/atividade resultam em prejuízos na secreção de insulina. A restrição proteica e dieta hiperlipídica alteram o fluxo iônico e secreção de insulina nas células β , e o aminoácido taurina (Tau) regula o fluxo iônico. O objetivo desse estudo foi caracterizar a expressão e o funcionamento dos K_{ATP} e Cav, assim como proteínas de extrusão dos grânulos de insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos desnutridos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com Tau. Camundongos machos C57Bl/6J receberam dieta controle (C) ou dieta hipoproteica (R) por 6 semanas. Em sequência metade desses grupos foram alimentados por 8 semanas com dieta hiperlipídica sem (CH e RH) ou com suplementação de 5% de Tau (CHT e RHT). Foi verificado que camundongos R tiveram menor crescimento e desenvolvimento dos órgãos. Camundongos RH e CH apresentaram aumento de peso corporal e estoques de gordura, hipercolesterolemia, intolerância à glicose e resistência à insulina. A suplementação com Tau preveniu o acúmulo de gordura e prejuízos na homeostase da glicose apenas no grupo CHT. Ilhotas isoladas de camundongos R secretaram menos insulina em resposta à 2,8 mM ou 11,1mM de glicose em associação com 30 mM de K^+ ou 100 μ M de tolbutamida (Tolb). O influxo de Ca^{2+} em resposta à Tolb não diferiu entre ilhotas R e C. Ainda, ilhotas R tiveram redução do conteúdo total de insulina, da expressão protéica da SNAP-25, e aumento da subunidade Kir6.2 dos K_{ATP} e da sua atividade em resposta à glicose. Ilhotas CH secretaram mais insulina frente à 11,1 mM de glicose e agentes despolarizantes, associada à maior inibição dos K_{ATP} e ativação dos Cav em resposta à glicose. O grupo RH apresentou menor secreção de insulina frente à 2,8 mM de glicose e 30 mM de K^+ , e secreção similar ao grupo C frente à 11,1 mM de glicose e agentes despolarizantes, com aumento na expressão da SNAP-25 e inibição dos K_{ATP} em resposta à glicose. No grupo CHT houve normalização da liberação de insulina e aumento na expressão das subunidades $\alpha 1.2$ e $\beta 2$ do Cav, SNAP-25 e syntaxina. Nas ilhotas RHT houve aumento na secreção de insulina frente à glicose e agentes despolarizantes, maior expressão da syntaxina e da subunidade Kir6.2 do K_{ATP} , bem como de sua inibição em resposta à glicose. Prejuízos na secreção de insulina no grupo R estão associados à menor expressão de proteínas envolvidas no processo exocitótico e aumento da expressão e

atividade dos K_{ATP} . O grupo RH, com resistência à insulina similar ao grupo CH, não apresenta a mesma adaptação funcional das células β , sem hipersecreção nesse grupo. A melhora na capacidade secretória do grupo RHT pode decorrer da ação da Tau sobre os K_{ATP} contribuindo para o adequado acoplamento estímulo/secreção e a extrusão dos grânulos de insulina via syntaxina.

ABSTRACT

In β cells stimulus/secretion coupling, ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP}) and voltage-sensitive Ca^{2+} channel (Cav) contribute to generating and sustaining the potential action. Changes in the expression or activity of these channels lead to insulin secretion impairment. Protein restriction as well as high-fat diet alters β -cells ionic handling modifying insulin secretory profile. Taurine (Tau) regulates ion flux and improves β -cell function. The aim of this study was to characterize the expression and function of K_{ATP} and Cav channels, as well as exocytotic proteins in isolated islets from malnourished mice submitted to high-fat diet and supplemented with Tau. Male C57Bl/6J mice received control (14% protein-C) or low-protein diet (6% protein-R) for 6 weeks. After, half of these groups were submitted to high-fat diet for 8 weeks without (CH and RH) or combined with 5% of Tau (CHT and RHT). Protein restricted mice showed lower growth and organs development. Both, CH and RH mice presented higher body weight, fat stores, hypercholesterolemia, glucose intolerance and insulin resistance. Tau supplementation prevented fat accumulation and glucose intolerance only in CHT group. Isolated islets from malnourished mice secreted less insulin in response to 2.8 mM glucose in combination with 30 mM K^+ or 100 μ M tolbutamide (Tolb). However, Ca^{2+} influx in these conditions did not differ. R group also released less insulin in response to 11.1 mM glucose in combination or not with depolarizing agents. In addition, R islets showed lower insulin and SNAP-25 protein content, whereas an increased protein expression of the Kir6.2 subunit of the K_{ATP} channel, as well as its activation during glucose stimulus. However, CH islets presented increased hormone release in the presence of 11.1 mM glucose in combination or not with depolarizing agents, effect associated with enhanced K_{ATP} inhibition and Cav activation in response to glucose. RH group showed a lower insulin secretion in response to 2.8 mM glucose plus K^+ , and a similar secretion to C group upon 11.1 mM glucose together or not with depolarizing agents. Also, RH islets showed increased SNAP-25 protein levels. In CHT islets, Tau supplementation normalized insulin release and increased protein amount of $\alpha 1.2$ and $\beta 2$ subunits of the Cav without modify its activity, and enhanced islet SNAP-25 and syntaxin protein levels. But, in RHT islets, enhanced insulin secretion in response to glucose and depolarizing agents, and increased syntaxin and Kir6.2 protein expression. In addition, RHT islets showed improved K_{ATP} inhibition and Cav activation in the presence of the sugar. In

conclusion, insulin secretory dysfunction in R islets was associated with the lower expression of the exocytotic proteins and altered protein expression and activity of the K_{ATP} . Whereas, despite RH mice showed insulin resistance in a similar extent of that observed in CH mice, they did not present β -cells functional adaptations to this condition, since RH islets did not hypersecrete insulin. In addition, RHT islets presented a better secretory capacity probably due to the higher content of K_{ATP} and its inhibition induced by Tau which contributes to enhance the insulin exocytosis via syntaxin protein.

INTRODUÇÃO

Secreção de insulina

A secreção de insulina pelas células β é controlada continuamente de acordo com as flutuações da concentração de nutrientes circulantes, em especial, a glicose. Este açúcar é o regulador mais importante da secreção de insulina sendo que em resposta a glicose há um aumento rápido, ou pico da liberação do hormônio nos primeiros minutos da estimulação, o qual constitui a primeira fase da secreção. Enquanto a concentração de glicose permanecer elevada, um segundo aumento ou fase é observado, e embora essa seja de menor amplitude é sustentada até que a euglicemia seja estabelecida (Straub and Sharp 2002, Hiriart and Aguilar-Bryan 2008, Rorsman and Braun 2012). Distúrbios na secreção e/ou ação da insulina levam a alteração na homeostase glicêmica causando o Diabetes mellitus (DM)(Cnop et al. 2005).

Os mecanismos responsáveis pela secreção de insulina estimulada pela glicose iniciam-se com o transporte deste açúcar pelas células β pancreáticas, através de um transportador específico (GLUT 2); a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato pela enzima glicoquinase (GCK) e metabolizada gerando ATP. O resultado é o aumento da razão ATP/ADP, que provoca o fechamento dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), presentes na membrana da célula β . A redução do efluxo de K^+ das células leva à despolarização da membrana que, por sua vez, provoca a abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Cav), e influxo deste cátion que ativa a maquinaria exocitótica dos grânulos de insulina (Yang and Berggren 2006, Hiriart and Aguilar-Bryan 2008, Rorsman and Braun 2012).

A secreção de insulina pode ser modulada por vários nutrientes como ácidos graxos e aminoácidos, neurotransmissores e hormônios peptídicos (Gao et al. 2003, Li et al. 2003, Um et al. 2004). Além disso, o sistema nervoso autônomo (SNA) também possui um papel de destaque sobre a regulação da secreção de insulina, controlando o metabolismo hepático, muscular e do tecido adiposo além da atividade das células β . A ativação ou inibição dos ramos parassimpático e simpático do SNA são controlados por neurônios localizados em diferentes sítios anatômicos, principalmente no tronco cerebral e hipotálamo (Thorens, B., 2011). O SNA parassimpático age por terminações derivadas do nervo vago que inervam as ilhotas pancreáticas e liberam a

acetilcolina (Ach), ligando-se a receptores muscarínicos do tipo 3 e levando a potencialização da secreção de insulina já iniciada pela glicose (Gilon and Henquin 2001). O SNA simpático, por sua vez, age via liberando norepinefrina e o neuropeptídeo Y (NPY). Nas células α a norepinefrina se liga a receptores β 2-adrenérgicos, estimulando a secreção de glucagon. Nas células β , a ligação da norepinefrina nos receptores β aumenta a secreção de insulina, por outro lado, a ligação aos receptores α -adrenérgicos resulta em inibição na secreção (Thorens, B., 2011).

Hormônios gastrintestinais também participam da regulação da liberação de insulina. O hormônio *glucagon like peptide 1* (GLP-1) e o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), são importantes durante a ingestão alimentar. Eles são liberados pelo intestino para circulação e amplificam a secreção de insulina. Outros hormônios produzidos pelas ilhotas pancreáticas como o glucagon e a somatostatina exercem ação estimulatória e inibitória, respectivamente, sobre a secreção das células β (Nesher et al. 2002, McClenaghan 2007, Hiriart and Aguilar-Bryan 2008).

Estudos em ilhotas isoladas de camundongos mostram que a maquinaria exocitótica envolvida na liberação dos grânulos de insulina é semelhante àquela encontrada na liberação de neurotransmissores. Estas proteínas fazem parte de um complexo chamado SNARE (Receptores de proteínas solúveis ligantes ao fator sensível à N-etilmaleimida) (Johnson et al., 2008), e subdividem-se em t-SNARE e v-SNARE. As t-SNARE estão localizadas na porção da membrana plasmática onde o grânulo contendo a insulina será fusionado e são compostas pelas proteínas syntaxina e SNAP-25 (proteína associada ao sinaptossoma de 25 kDa). A VAMP-2 (proteína associada à membrana vesicular isoforma 2) é uma v-SNARE que se encontra inserida na membrana do grânulo de insulina (Südhof and Rothman 2009). Durante a exocitose as t-SNARE e v-SNARE formam um complexo heterotetramétrico conhecido como trans-SNARE. A formação deste complexo é responsável pela movimentação do grânulo até a membrana plasmática para que ocorra sua fusão (Johnson, Oliver and Davies 2008, Südhof and Rothman 2009).

A fusão dos grânulos de insulina é totalmente dependente do influxo de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Cav). Outra proteína envolvida na extrusão dos grânulos, a sinaptotagmina, possui dois domínios de ligação ao Ca^{2+} (C2A e C2B), sendo portanto, uma sensora de Ca^{2+} citoplasmático para o processo de exocitose (Südhof and Rothman 2009). Nas

células β pancreáticas, as sinaptotagminas VII e IX são as principais proteínas associadas com a exocitose dos grânulos de insulina (Nakajima et al. 2001, Gauthier and Wollheim 2008).

Alguns agentes farmacológicos também regulam a secreção de insulina, sendo a subunidade SUR1 dos canais de K_{ATP} alvo para uma variedade de drogas coletivamente denominadas sulfoniluréias. Estas, bloqueiam os canais de K_{ATP} nas células β e são amplamente usadas para estimular secreção de insulina no tratamento do DM do tipo 2 (DM2). As sulfoniluréias e drogas afins apresentam diferenças na especificidade com os tecidos, interagindo em vários graus com diferentes subunidades. A tolbutamida e gliclazida são seletivas para as células β e possuem ligação reversível. Já a glimepirida e glibenclamida inibem os canais de K_{ATP} do músculo cardíaco e do músculo liso em adição aqueles das células β , e possuem efeito pouco reversível (Ashcroft and Gribble 1999, Gribble and Reimann 2002). Em contraste, drogas como a diazoxida levam a abertura dos canais de K_{ATP} , resultando no relaxamento muscular, vasodilatação e redução do trabalho do miocárdio, além de inibir a secreção de insulina nas células β (Gribble and Reimann 2002, Quayle, Nelson and Standen 1997).

Canais de K_{ATP} e sua Contribuição para a Atividade Elétrica da Célula β

Para o adequado acoplamento estímulo/secreção de insulina a célula β pancreática possui diferentes canais iônicos que mantêm o equilíbrio eletroquímico, dentre os quais se destaca o canal de K_{ATP} que é composto pelas subunidades Kir6.2/SUR1 (Inagaki et al. 1995, Aguilar et al. 1997). A subunidade Kir forma um poro seletivo ao íon K^+ e possui sítio para a ligação do ATP. A subunidade SUR1 é responsável pela ligação e hidrólise dos nucleotídeos, portanto a regulação dos canais pelo ATP e ADP requer interação de ambas as subunidades num balanço entre o efeito inibitório do ATP e estimulatório do ADP. Ainda, a subunidade SUR1 favorece a sensibilidade da Kir a drogas como as sulfoniluréias (glibenclamida, gliclazida, glipizida e a glimepirida) e estimuladores da abertura do canal de K_{ATP} (Hiriart and Aguilar-Bryan 2008).

Foi demonstrado que nutrientes como ácidos graxos podem regular a função dos canais de K_{ATP} . Células β isoladas de ilhotas de ratos demonstram hiperpolarização da membrana plasmática na presença de ácidos graxos mediada tanto por metabólitos formados a partir da degradação dos ácidos graxos, quanto pela sua interação com receptores acoplados a proteínas G que levam a ativação dos canais de K_{ATP} (Zhao et al. 2008, Tokuyama et al. 1996). Além disso,

prejuízos na secreção de insulina devido à menor expressão do canal de K_{ATP} já foram relatados. Em ilhotas isoladas de ratos diabéticos *Zucker* foi evidenciada redução da expressão da subunidade Kir6.2, contudo sem alteração na expressão da subunidade SUR1 (Tokuyama et al. 1996). Células INS-1 e ilhotas isoladas de ratos apresentam declínio na capacidade secretória e redução da expressão das subunidades Kir6.2 e SUR1 quando incubadas em meio com 16,7 mM de glicose por 72h (Moritz et al. 2001). Contudo, não foi demonstrada nenhuma relação entre a expressão dos canais de K_{ATP} em condições de desnutrição seguida por ingestão de dieta hiperlipídica, apesar de estar bem estabelecido que estas condições, individualmente, modificam o padrão secretório da célula β (Latorraca et al. 1999, De Souza et al. 2007, Filiputti et al. 2008, da Silva et al. 2010, Batista et al. 2012).

Canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Cav) e Função da Célula β

A célula β possui diferentes tipos de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Cav) que são classificados como Cav1, Cav2 e Cav3 de acordo com o tipo da subunidade “ $\alpha 1$ ” que forma o poro do canal (Ertel et al. 2000). Além da subunidade $\alpha 1$, os canais de Cav apresentam subunidades auxiliares que são denominadas “ β , γ , $\alpha 2\delta$ ” e que influenciam a atividade e a translocação dos canais de Ca^{2+} para a membrana plasmática (Yang and Berggren 2006). Atualmente existe um consenso que os canais do tipo L, que apresentam uma alta condutividade ao cátion e são sensíveis à diidropiridinas, são os canais que contribuem com o maior influxo de Ca^{2+} para as células β (Ohta et al. 1993, Davalli et al. 1996, Schulla et al. 2003). Dados da literatura demonstraram que o influxo de Ca^{2+} pelo canal Cav1.2 está relacionado à primeira fase da secreção e os canais Cav2.3 contribuem para a entrada do cátion durante à segunda fase da liberação (Schulla et al. 2003, Jing et al. 2005, Eliasson et al. 2008). Além disso, o canal Cav1.2 interage com proteínas envolvidas no processo exocitótico da insulina (Wiser et al. 1999, Trus et al. 2007).

Os canais de Cav são regulados por diferentes mecanismos que alteram a condutividade do Ca^{2+} conforme as condições fisiológicas. Dentre estes reguladores tem-se a participação de vários hormônios, mensageiros intracelulares (IP3 e DAG) e proteínas quinases (PK) como PKA, PKC, Ca^{2+} /Calmodulina, PKG, Akt/PKB (proteína thymoma viral oncogene) (Yang and Berggren 2006, Yang and Colecraft 2012, Zamponi and Currie 2012).

Em diferentes modelos experimentais de Diabetes mellitus (DM) a expressão gênica e a atividade dos canais Cav apresentam-se alterados (Wang et al. 1999, Wang et al. 1996, Iwashima et al. 2001, Yang and Berggren 2006). Foi observado em linhagem de células secretoras de insulina (RINm5F) cultivadas na presença de soro de pacientes com DM 1 aumento da atividade dos canais Cav, elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) basal, fragmentação do DNA e apoptose (Juntti-Berggren et al. 1993). Além disso, ilhotas pancreáticas de ratos *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty* (OLETF) com DM2 apresentam redução da secreção de insulina e do influxo de Ca^{2+} , associados à redução da expressão gênica das subunidades $\delta 1.3$, $\beta 2$ e $\beta 3$ do canal de Cav (Iwashima et al. 2001). Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que a restrição proteica em ratos reduz a expressão gênica e de proteínas das subunidades do Cav em ilhotas pancreáticas (Filiputti et al. 2010, Amaral et al. 2010). Este efeito deve contribuir para o reduzido influxo de íons Ca^{2+} na presença de nutrientes e agentes potencializadores da secreção nos roedores desnutridos (de Oliveira et al. 2011, Batista et al. 2011). Intensificar as investigações sobre a expressão dos canais Cav contribuirá para melhor identificação dos mecanismos fisiológicos envolvidos na redução da capacidade secretória das células β em condições de menor oferta de nutrientes, bem como, melhor caracterização do fluxo de Ca^{2+} em condições de ingestão de dietas hipercalóricas e da associação entre desnutrição e obesidade.

O Aminoácido Taurina (Tau), Ações Biológicas e Secreção de Insulina

A Tau é um aminoácido que está presente em altas concentrações tanto no interior das células como no plasma de mamíferos. Este aminoácido é obtido pela ingestão de carne, peixe e leite, mas também pode ser biossintetizado a partir de metionina e cisteína (Tappaz 2004). Uma vasta literatura demonstra que o aminoácido Tau abrange inúmeras ações biológicas sendo que o mecanismo de ação da Tau pode ocorrer pela combinação do aminoácido com vários tipos de canais iônicos, transportadores e enzimas (Huxtable, R. J., 1992; Satoh, 1998; Palmi et al., 1999; Chen et al. 2001). Estudos demonstram que a Tau possui a propriedade de reagir com HOCl (hipoclorito) gerando taurocloraminas, e desta forma ser um antioxidante (Franconi et al. 2004).

No pâncreas a concentração de Tau está compartimentalizada em células da ilhota contendo glucagon e somatostatina, sugerindo que a liberação de Tau por estas células exerça uma possível ação parácrina sobre o processo de secreção de insulina em células β (Bustamante et al. 2001).

Uma das ações mediadas pela Tau nas células β pancreática é a de inibir a atividade dos canais de K_{ATP} . (Park et al. 2004), investigando as propriedades dos canais K_{ATP} em células β quando aplicada a Tau via intracelular em presença da glibenclamida, que tem a propriedade de interagir com as duas regiões de alta afinidade, os sítios sulfoniluréia e benzamida da subunidade SUR, verificaram que a Tau aumenta a sensibilidade do canal de K_{ATP} na célula β em resposta a esta sulfoniluréia e, além disso, células pré-tratadas com Tau apresentaram aumento da secreção de insulina e da $[Ca^{2+}]_i$ na presença de glibenclamida.

Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento com Tau aumenta a sensibilidade das células β à glicose, aos agentes despolarizantes e amplificadores da secreção, via modulação do influxo de Ca^{2+} e da expressão da subunidade $\beta 2$ do canal de Ca^{2+} (Carneiro et al. 2009, Ribeiro et al. 2009, Ribeiro et al. 2010, Ribeiro et al. 2012). Ainda, a Tau eleva a expressão do PDX-1 (*pancreatic duodenal homeobox*), fator de transcrição importante para o desenvolvimento pancreático e regulação da expressão gênica (Carneiro et al. 2009). Assim, este aminoácido possui potencial terapêutico para o tratamento do DM e seu efeito na associação da desnutrição e obesidade sobre a função pancreática endócrina merece ser considerada.

Desnutrição, Obesidade e Diabetes

Nosso grupo de pesquisa tem contribuído para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas metabólicas em situações de reduzida (desnutrição) ou excessiva (obesidade) oferta de nutrientes, tendo como foco a função da célula β e ação periférica do hormônio insulina. Neste âmbito, evidenciamos que roedores submetidos à restrição protéica apresentam hipoinsulinemia e normoglicemia (Reis et al. 1997, Ferreira et al. 2004). Ilhotas isoladas destes animais secretam menos insulina em resposta a nutrientes, sendo evidenciada a perda da primeira fase da secreção e reduzida liberação de insulina durante a segunda fase (Latorraca et al. 1999, Filiputti et al. 2008, da Silva et al. 2010). Ainda, a capacidade secretória

frente à agentes potencializadores está prejudicada (Ferreira et al. 2003, Ferreira et al. 2004, Filiputti et al. 2008), e estes efeitos estão relacionados com alteração na expressão de genes e proteínas envolvidos no processo secretório das células β (Delghingaro-Augusto et al. 2004, Ferreira et al. 2003, Ferreira et al. 2004, Filiputti et al. 2008, Amaral et al. 2010), bem como com alteração no influxo e mobilização intracelular de íons Ca^{2+} (Batista et al. 2011, de Oliveira et al. 2011). Além disso, de forma compensatória os camundongos submetidos à restrição protéica têm maior sensibilidade periférica à insulina (Reis et al. 1997, Escrivá et al. 1992, Giozzet et al. 2008, Filiputti et al. 2008). Por outro lado, na obesidade ocorrem prejuízos metabólicos antagônicos dos evidenciados na desnutrição. Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica desenvolvem intolerância à glicose, hiperglicemia, hiperinsulinemia, e, ilhotas isoladas desses animais hipersecretam insulina para compensar a ação prejudicada do hormônio nos tecidos-alvo (Cintra et al. 2008, De Souza et al. 2005, De Souza et al. 2007, Lalli et al. 2008). Estudos do nosso grupo de pesquisa também demonstraram que a Tau preveniu alterações morfofuncionais no pâncreas de camundongos tratados com dieta hiperlipídica, evitando a hipertrofia das ilhotas, aumento na área da célula β /ilhota e também no conteúdo de ilhotas e massa de células β no pâncreas (Ribeiro et al. 2012).

OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi caracterizar a expressão e funcionamento dos canais de K_{ATP} e dos canais de Cav, assim como de proteínas envolvidas na extrusão dos grânulos de insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos desnutridos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com Tau.

METODOLOGIA

Animais

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA/Unicamp), certificado nº 2234-1. Foram utilizados camundongos C57BL/6J, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, mantidos 12h em ciclo claro/escuro com comida e água a vontade. Os camundongos foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- a) Controle (C):** camundongos que receberam dieta contendo 14% de proteína por todo o período experimental (105 dias).
- b) Controle + Dieta Hiperlipídica (CH):** camundongos alimentados com dieta contendo 14% de proteína (normoprotéica) a partir do desmame (30 dias de vida) por 45 dias e em seguida receberam dieta contendo alto teor de gordura (35% - dieta hiperlipídica) por mais 60 dias.
- c) Controle + Dieta Hiperlipídica + Tau (CHT):** camundongos que receberam dieta normoprotéica a partir do desmame (30 dias de vida) por 45 dias e em seguida foram alimentados com dieta hiperlipídica por mais 60 dias. A suplementação com Tau foi administrada na água de beber, com concentração de 5%, desde o desmame.
- d) Restritos (R):** camundongos que receberam dieta contendo 6% de proteína (hipoprotéica) por todo o período experimental (105 dias).
- e) Restritos (R) + Dieta Hiperlipídica (RH):** camundongos alimentados com dieta contendo 6% de proteína (hipoprotéica) a partir do desmame (30 dias de vida) por 45 dias e em seguida receberam dieta contendo alto teor de gordura (35%-hiperlipídica) por mais 60 dias.
- f) Restritos + Dieta Hiperlipídica (RH) + Tau (RHT):** camundongos submetidos à restrição protéica a partir do desmame (30 dias de vida) por 45 dias e após receberam dieta hiperlipídica por mais 60 dias. . A suplementação com Tau foi administrada na água de beber, com concentração de 5%, desde o desmame.

Quadro 1 - Composição das Dietas

Ingredientes (g/Kg)	Normoprotéica (AIN-93M)	Hipoprotéica (6% proteína)	Hiperlipídica
Caseína	140	71,5	140
Amido	465,7	502,5	208,7
Dextrina	155	166,5	100
Sacarose	100	121	100
L-cistina	1,8	1	1,8
Fibra (microcelulose)	50	50	50
Óleo de soja	40	40	40
Banha	-	-	312
Mistura de sais AIN93G*	35	35	35
Mistura de vitaminas AIN93G*	10	10	10
Cloridrato de colina	2,5	2,5	2,5

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

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Avaliação do Estado Nutricional

Os camundongos dos grupos estudados foram pesados e obtido o comprimento naso-anal (CNA). Em seguida foram colocados em câmara de CO₂ e eutanasiados por decapitação. O sangue foi coletado em tubos de 1,5 ml contendo anticoagulante (heparina 1:1000 - 5000U). O plasma foi separado por centrifugação a 12000 rpm durante 15 min e armazenado a -20 °C para posterior determinação de insulina por radioimunoensaio (RIE) e também albumina, proteínas totais (kit colorimétrico LabCenter), triglicerídeos e colesterol (kit colorimétrico ROCHE). Os órgãos foram retirados e pesados. O índice de Lee foi obtido pela relação: [Raiz cúbica do peso(g)/CNA(cm)]*1000.

Teste de Tolerância à glicose (ipGTT) e à insulina (ipITT)

Os camundongos após 12h de jejum foram pesados e em seguida a glicemia de jejum foi verificada (tempo 0), com o uso de um glicosímetro. Após os camundongos receberam uma injeção ip de glicose na concentração de 2g/Kg de peso corporal. A glicemia foi verificada aos 15, 30, 60 e 120 min após a aplicação da glicose. Para o ipITT os camundongos dos grupos em estudo, no estado alimentado, foram pesados e, em seguida, foi verificada a glicemia no estado alimentado (tempo 0). Depois foi aplicado 0,75 U/Kg de insulina via ip, e a glicemia verificada nos tempos 0, 10, 15, 30, 45 e 60 min.

Isolamento de Ilhotas Pancreáticas de camundongos

Os camundongos eutanasiados por decapitação foram submetidos à uma incisão abdominal o ducto pancreático foi exposto e obstruído para evitar a saída de solução de colagenase para o duodeno. Na porção distal do conduto biliar comum foi realizada uma pequena incisão no ducto para introduzir uma agulha pela qual foi injetado no pâncreas 2 a 3 ml de solução de Hanks com colagenase tipo V (0,8 mg/ml; Sigma). O pâncreas foi retirado por dissecação e transferido para um tubo de 15 ml, e incubado a 37°C durante 11 min. Ao final deste período foi realizada uma pequena agitação de 30s para facilitar a desagregação da porção exócrina do tecido pancreático. A digestão do tecido foi interrompida mediante a adição de Hanks a 4°C. As ilhotas, completamente separadas do tecido acinar, foram coletadas uma a uma, sob lupa, por aspiração com o auxílio de pipeta *Pasteur*, previamente estirada e siliconizada.

Secreção Estática de Insulina

Grupos de 4 ilhotas pancreáticas dos diferentes grupos estudados foram transferidas para placas de cultura com 24 poços contendo 0,5 ml de solução de Krebs suplementada com 0,3% de albumina bovina (m/v) e 5,6 mM de glicose. A seguir as placas foram acondicionadas em estufa a 37°C e mantidas em ambiente controlado (umidificado e gaseificado com 95% O₂/5% Co₂) pH 7,4. Inicialmente as ilhotas foram pré-incubadas por 30 min e após a solução foi rapidamente removida e substituída por nova solução de incubação contendo diferentes concentrações de glicose, agentes despolarizantes (K⁺ e Arginina), bloqueadores e ativadores dos canais de K_{ATP} (tolbutamida e DZX, respectivamente) e inibidores dos CaV (Nif). Após 1h

de incubação, as placas foram resfriadas em banho de gelo e o sobrenadante removido, transferido para tubos de ensaio e armazenado a -20°C para posterior dosagem de insulina por RIE. Para a quantificação do conteúdo total de insulina, grupos de 4 ilhotas foram homogeneizadas em tubos contendo 1mL de água destilada.

RIE (Radioimunensaio)

A concentração plasmática, a secreção estática e o conteúdo total de insulina foram quantificados pelo método de RIE (Scott et al. 1981), utilizando-se anticorpo específico (anti-rat), insulina de rato com concentração conhecida para determinar a curva padrão e insulina recombinante humana marcada com Iodo¹²⁵ (Genesis, Berwyn, Illinois, EUA). As amostras foram lidas em contador de radiação gama.

Conteúdo total de DNA

Grupos de 20 ilhotas foram homogeneizadas em tampão tris-acetato EDTA e o DNA íntegro foi separado e extraído pelo método trizol/triton (Santos *et al.*, 2011). As frações de DNA foram quantificadas a partir de uma curva padrão de DNA utilizando o corante fluorescente Syber-green.

Registro das oscilações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em ilhotas pancreáticas

Ilhotas pancreáticas isoladas dos grupos estudados foram incubadas em 1 ml de Krebs contendo 5,6 mM de glicose durante 1 h. Em seguida foi adicionado 5 μM fura-2/AM dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% e mantido por 1 h em estufa gaseificada com 95% O_2 /5% CO_2 a 37°C . Posteriormente, uma ilhota foi transferida para uma lâmina de vidro, previamente tratada com poli-lisina, e perfundida na presença de diferentes estímulos (glicose, K^+ , tolbutamida, DZX e Nif). Os registros das oscilações de Ca^{2+} foram obtidos por sistema de análise de imagem apropriado (câmera ORCA-100 CCD –Hamamatsu Photonics Iberica, Barcelona, Espanha). As ondas excitatórias de 340 e 380 nm foram selecionadas por uma fonte

de luz de xenônio (Omega Optical, Stanmore, UK) e a emissão foi de 510 nm. A mudança no Ca^{2+} citoplasmático foi detectada como uma mudança na proporção F340/F380 (Quesada et al., 2002) e analisadas pelo software Image Mater3 (Photon Technology International, NJ, USA).

Western Blot

Para a análise da expressão proteica das subunidades Kir6.2 e SUR1 do K_{ATP} , das subunidades $\alpha 1.2$, $\alpha 1.3$ e $\beta 2$ do canal de Cav bem como das proteínas envolvidas na extrusão dos grânulos de insulina: SNAP-25, VAMP-2, syntaxina e da PKA α , ilhotas pancreáticas isoladas dos grupos estudados foram colocadas em coquetel anti-protease e homogeneizadas com o auxílio de um sonificador. Em seguida, o homogenado foi centrifugado a 12000 rpm por 15 min. Após quantificação proteica por Bradford, as amostras foram incubadas a 100°C por 5 min em 30% do volume de Tampão de Laemmli 5X (Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%). As proteínas foram, então, separadas por eletroforese em gel bifásico de poliacrilamida (SDS-PAGE). Em seguida as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad). A transferência foi realizada durante 90 min a 120V em gelo, banhada com tampão de transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,02%). Após transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em solução de TBS (tampão fosfato-salina) por 1h a temperatura ambiente. As proteínas relacionadas ao estudo foram detectadas na membrana de nitrocelulose após 12h de incubação a 4°C, com anticorpo primário para a subunidade $\alpha 1.3$ do Cav (sc-25687), $\alpha 1.2$ do CaV (Alomone), $\beta 2$ do CaV (Alomone), subunidades SUR1 (sc-25683) e Kir6.2 do canal de K_{ATP} (Millipore), SNAP-25 (sc-73044), syntaxina (sc-58297), VAMP-2 (sc-69706) e para PKA α (sc-365615). Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo policlonal anti-IgG (diluição 1:10000 em TBS com 2% de leite desnatado) seguido de exposição por 2h à temperatura ambiente, e reveladas em fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000 Mini). As imagens foram quantificadas com o software ImageQuant.

Forma de Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (EPM) e foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do *post test* Newman-Keuls. As análises em separado entre os grupos C e R, quando necessárias, foram analisadas por meio do test *t* de *Student*. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$.

RESULTADOS

Parâmetros Biométricos e Bioquímicos

O tratamento com dieta hipoproteica reduziu o peso corporal e o comprimento naso-anal (CNA) de camundongos R em relação ao grupo C ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente; Tab. 1), bem como o peso do fígado, baço, rins e coração ($P < 0,001$; Tab. 1).

Tabela 1: Parâmetros biométricos de camundongos C, CH, CHT, R, RH, RHT.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
CNA (cm)	$9,2 \pm 0,1^a$	$9,2 \pm 0,1^a$	$9,6 \pm 0,2^a$	$8,0 \pm 0,3^b$	$9,1 \pm 0,2^a$	$8,8 \pm 0,3^a$
Fígado (g)	$1,19 \pm 0,07^{a,c}$	$1,21 \pm 0,05^{a,c}$	$1,34 \pm 0,12^a$	$0,74 \pm 0,03^b$	$0,99 \pm 0,04^c$	$1,34 \pm 0,08^a$
Baço (mg)	80 ± 5^a	80 ± 7^a	80 ± 4^a	60 ± 5^b	$70 \pm 2^{a,b}$	90 ± 6^a
Rins (mg)	290 ± 7^a	299 ± 9^a	328 ± 14^b	197 ± 13^c	260 ± 10^d	312 ± 7^a
Coração (mg)	149 ± 4^a	147 ± 10^a	$132 \pm 7^{a,b}$	113 ± 5^b	$135 \pm 6^{a,b}$	$128 \pm 4^{a,b}$

Dados representam média $\pm$ EPM ($n = 10-12$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).

A administração de dieta hiperlipídica foi eficiente em desenvolver a obesidade como pode ser observado pelo maior peso corporal e aumento das gorduras retroperitoneal e perigonadal nos camundongos CH e RH comparado aos seus respectivos controles ($P < 0,001$; Fig 1A, 1C e 1D). A suplementação com Tau reduziu o peso corporal e os depósitos de gordura apenas no grupo CHT (Fig. 1).

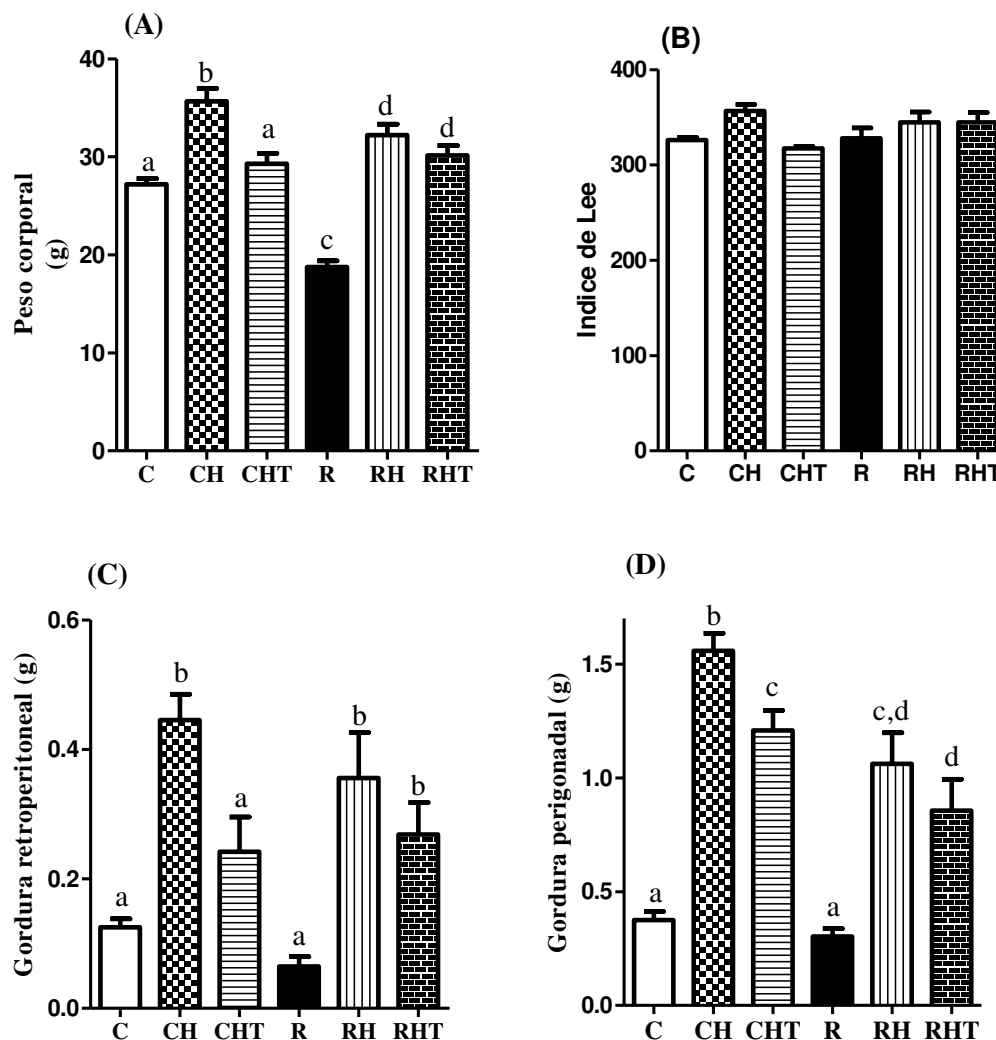


Figura 1: Peso corporal (A), Índice de Lee (B), peso das gorduras retroperitoneal (C) e perigonadal (D) dos camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Dados representam a média $\pm$ EPM (n= 10-12). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. $P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de *Newman-Keuls*).

Na tabela 2 pode-se observar que camundongos R apresentaram glicemia de jejum, insulinemia e perfil plasmático de lipídeos similares ao grupo C. Observamos também que a dieta hipoproteica foi eficiente no desenvolvimento da desnutrição neste grupo, com diminuição dos valores plasmáticos de proteínas totais ($P < 0,001$). Os camundongos que receberam dieta hiperlipídica apresentaram maior concentração plasmática de colesterol ($P < 0,001$), com

redução deste parâmetro apenas no grupo CHT. Além disso, no estado de jejum camundongos CH apresentaram hiperinsulinemia, com redução parcial no grupo CHT (Tab. 2).

Tabela 2: Concentração plasmática de glicose, insulina, albumina, proteína, colesterol e triglicerídeos de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT no estado de jejum.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Glicemia (mg/dL)	85 ± 5	86 ± 5	87 ± 4	75 ± 6	82 ± 5	90 ± 5
Insulinemia (ng/mL)	0,30 ± 0,05 ^a	1,27 ± 0,35 ^b	0,69 ± 0,22 ^{a,b}	0,16 ± 0,05 ^a	0,69 ± 0,24 ^{a,b}	0,34 ± 0,13 ^a
Albumina (mg/dL)	3,7 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,4 ± 0,1
Proteína (mg/dL)	5,8 ± 0,3 ^a	5,4 ± 0,1 ^a	5,8 ± 0,2 ^a	4,7 ± 0,3 ^b	5,9 ± 0,2 ^a	5,0 ± 0,3 ^a
Colesterol (mg/dL)	138 ± 9 ^a	223 ± 15 ^b	178 ± 16 ^c	145 ± 7 ^a	192 ± 9 ^{b,c}	188 ± 9 ^{b,c}
Triglicerídeos (md/dL)	84 ± 8	107 ± 8	113 ± 8	90 ± 10	106 ± 9	117 ± 9

Dados representam Média ± EPM (n = 10-12). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, P < 0,001 (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).

No estado alimentado, o grupo R apresentou glicemia similar ao grupo C, com redução nos valores plasmáticos de triglicerídeos (P < 0,001; Tab. 3). Os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com Tau apresentaram glicemia de alimentado e triglicerídeos similares aos controles, porém aumento dos valores plasmáticos de colesterol (P < 0,001; Tab. 3).

Tabela 3: Concentração plasmática de glicose, insulina, colesterol e triglicerídeos de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT no estado alimentado.

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Glicemia (mg/dL)	137 ± 4	141 ± 4	143 ± 3	128 ± 4	143 ± 7	140 ± 4
Insulinemia (ng/mL)	1,71 ± 0,4 ^{a,b}	2,23 ± 0,6 ^a	1,95 ± 0,3 ^a	0,30 ± 0,1 ^b	1,48 ± 0,1 ^{a,b}	1,58 ± 0,3 ^a
Colesterol (mg/dL)	134 ± 13 ^a	212 ± 18 ^b	262 ± 13 ^b	148 ± 5 ^a	238 ± 17 ^b	258 ± 27 ^b
Triglicerídeos (mg/dL)	201 ± 21 ^a	230 ± 29 ^a	270 ± 22 ^a	131 ± 5 ^b	244 ± 41 ^a	262 ± 23 ^a

Dados representam Média ± EPM (n = 10-12). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, P < 0,001 (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).

Homeostase da glicose e sensibilidade à insulina

Na figura 2A observamos a curva glicêmica dos grupos C, CH e CHT e na figura 2B pode-se observar o perfil da glicemia dos grupos R, RH e RHT durante o ipGTT. Estes grupos não apresentaram diferença na glicemia do estado de jejum (tempo 0). Após a aplicação de glicose, os camundongos apresentaram aumento na glicemia que teve seu pico em 15 min nos grupos C, R e CHT, e em 30 min para os camundongos CH, RH e RHT, retornando próximo aos valores basais aos 120 min do teste. O total da concentração plasmática de glicose registrada durante o ipGTT, expressa pela área abaixo da curva (AUC), foi menor no grupo R em relação ao C (P < 0,01; Fig. 2C). A ingestão de dieta hiperlipídica levou à intolerância à glicose, como observado pelo aumento da AUC nos grupos CH e RH comparados ao grupo C (P < 0,01; Fig 2C). A suplementação com Tau melhorou a tolerância à glicose com valores de AUC no grupo CHT similares aos observados no C, sem efeito no grupo RHT (Fig. 2C).

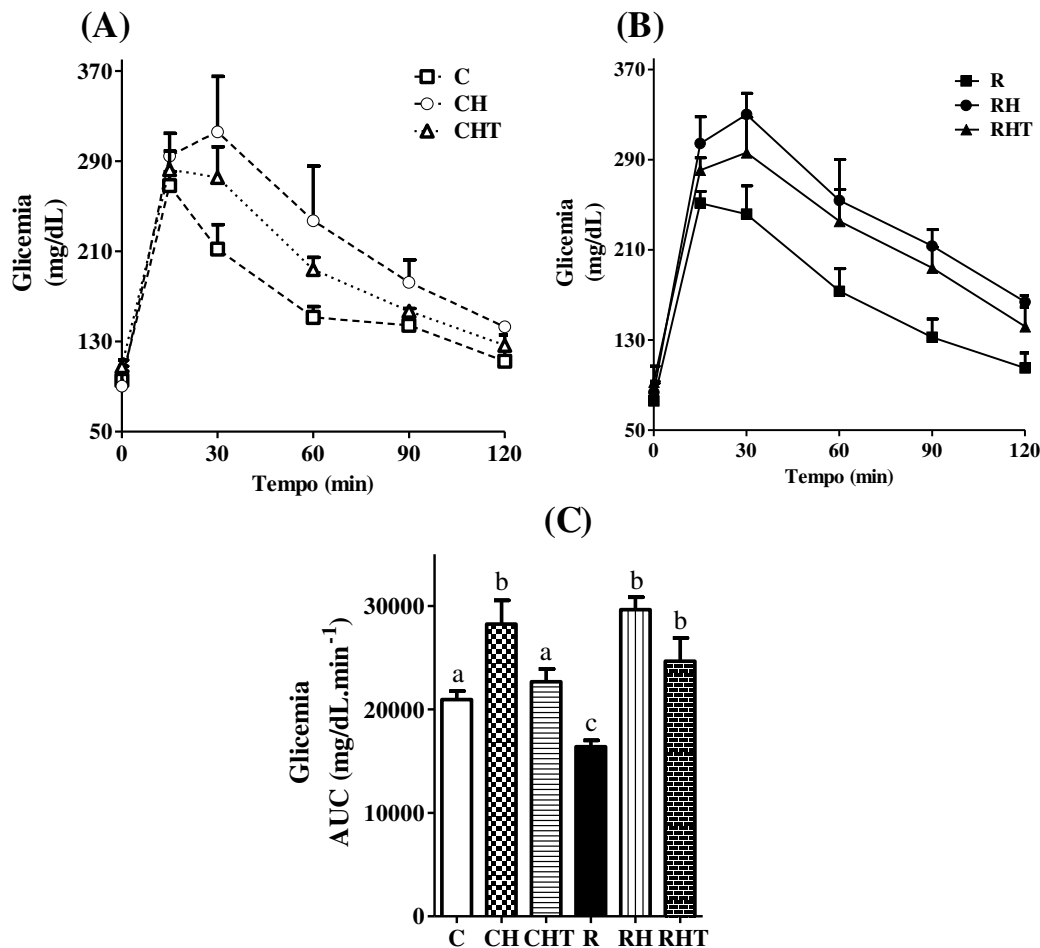


Figura 2: Efeito da suplementação com Tau sobre a tolerância à glicose em camundongos C, CH, CHT (A) e R, RH e RHT (B). Área abaixo da curva (AUC) da concentração plasmática de glicose durante o ipGTT (C). Dados representam a média $\pm$ EPM da glicemia avaliada antes e depois da injeção ip de 2g/Kg de glicose (n= 5-7). Letras diferentes indicam diferenças significativas, $P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de *Newman-Keuls*).

Na figura 3A pode-se observar o decaimento da glicemia nos camundongos C, CH e CHT e na figura 3B para os grupos R, RH e RHT durante o ipITT. Após 10 min da aplicação de insulina a glicemia começou a reduzir em todos os grupos estudados. A análise da AUC durante o teste demonstrou que camundongos R são mais sensíveis à insulina comparados aos C ($P < 0,01$; Fig. 3C). A ingestão de dieta hiperlipídica promoveu resistência à insulina nos grupos CH

e RH (Fig. 3C). A suplementação com Tau não alterou a ação da insulina induzida pela dieta hiperlipídica nos grupos CHT e RHT (Fig. 3C).

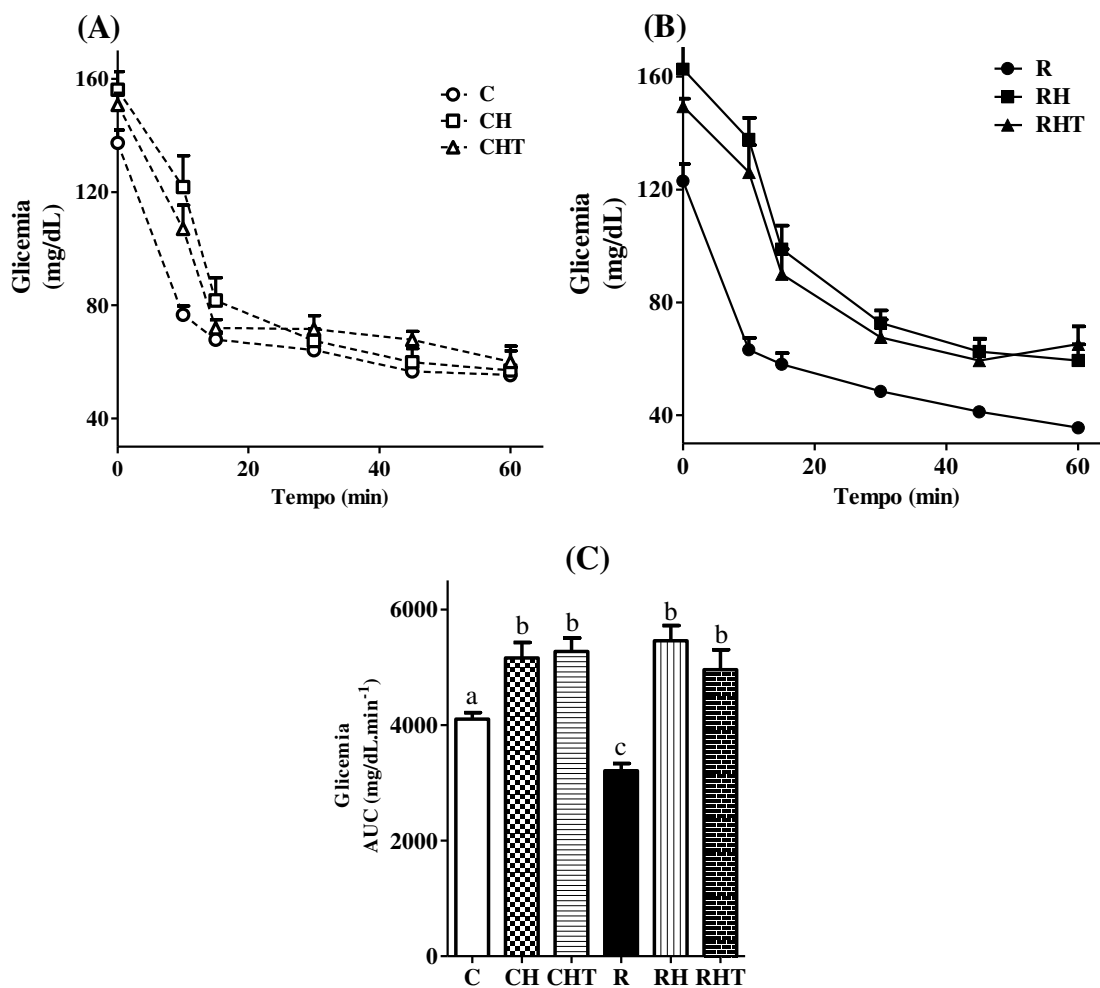


Figura 3: Teste de tolerância à insulina (ipITT) nos grupos (A) C, CH e CHT e (B) R, RH e RHT. Área abaixo da curva (AUC) da concentração plasmática de glicose durante o ipITT (C). Dados representam a média $\pm$ EPM da glicemia avaliada antes e depois da injeção ip de 2g/Kg de insulina (n= 5-7). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de *Newman-Keuls*).

Secreção de Insulina e Oscilações citoplasmáticas de Ca^{2+}

A figura 4 mostra a secreção de insulina em resposta à 30 mM de K^+ em ilhotas isoladas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Ilhotas do grupo R secretaram menos insulina frente ao K^+ em relação às ilhotas C ($P < 0,01$). A dieta hiperlipídica não alterou o perfil de secreção dos grupos CH e RH quando comparados aos seus respectivos controles (Fig. 4). A suplementação com Tau melhorou a resposta secretória ao estímulo despolarizante nas ilhotas do grupo RHT, com valores de insulina similares aos observados para o grupo C (Fig. 4). Entretanto as alterações na secreção de insulina não foram acompanhadas por modificações no influxo de Ca^{2+} estimulado pelo K^+ (Fig. 5). Não foram observadas alterações na secreção de insulina em resposta a 2,8 mM de glicose entre os grupos estudados.

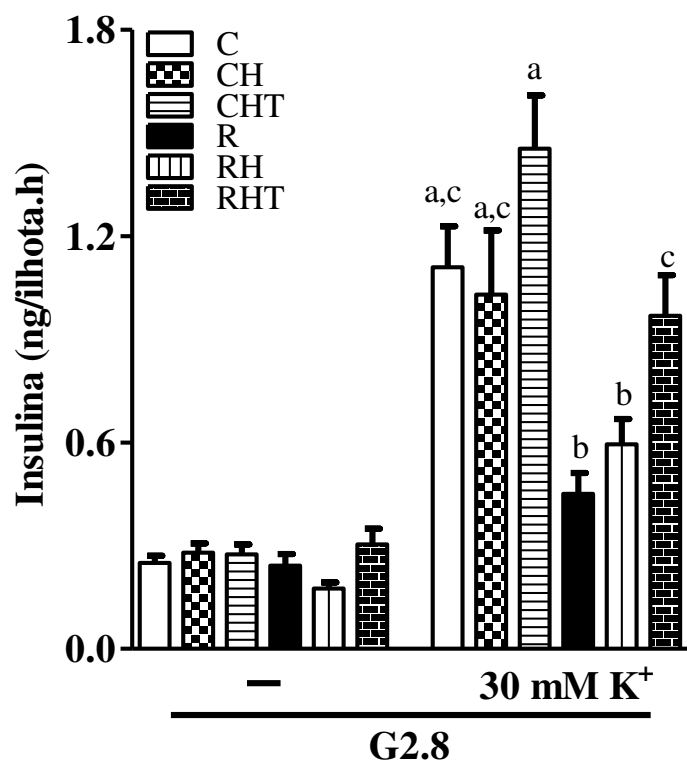


Figura 4: Secreção de insulina na presença de 30 mM de K^+ em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Grupos de 4 ilhotas foram incubadas com 2,8 mM de glicose (G) na presença ou ausência de 30 mM de K^+ . Dados são média $\pm$ EPM ($n=20-24$). Letras diferentes indicam diferenças significativas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).

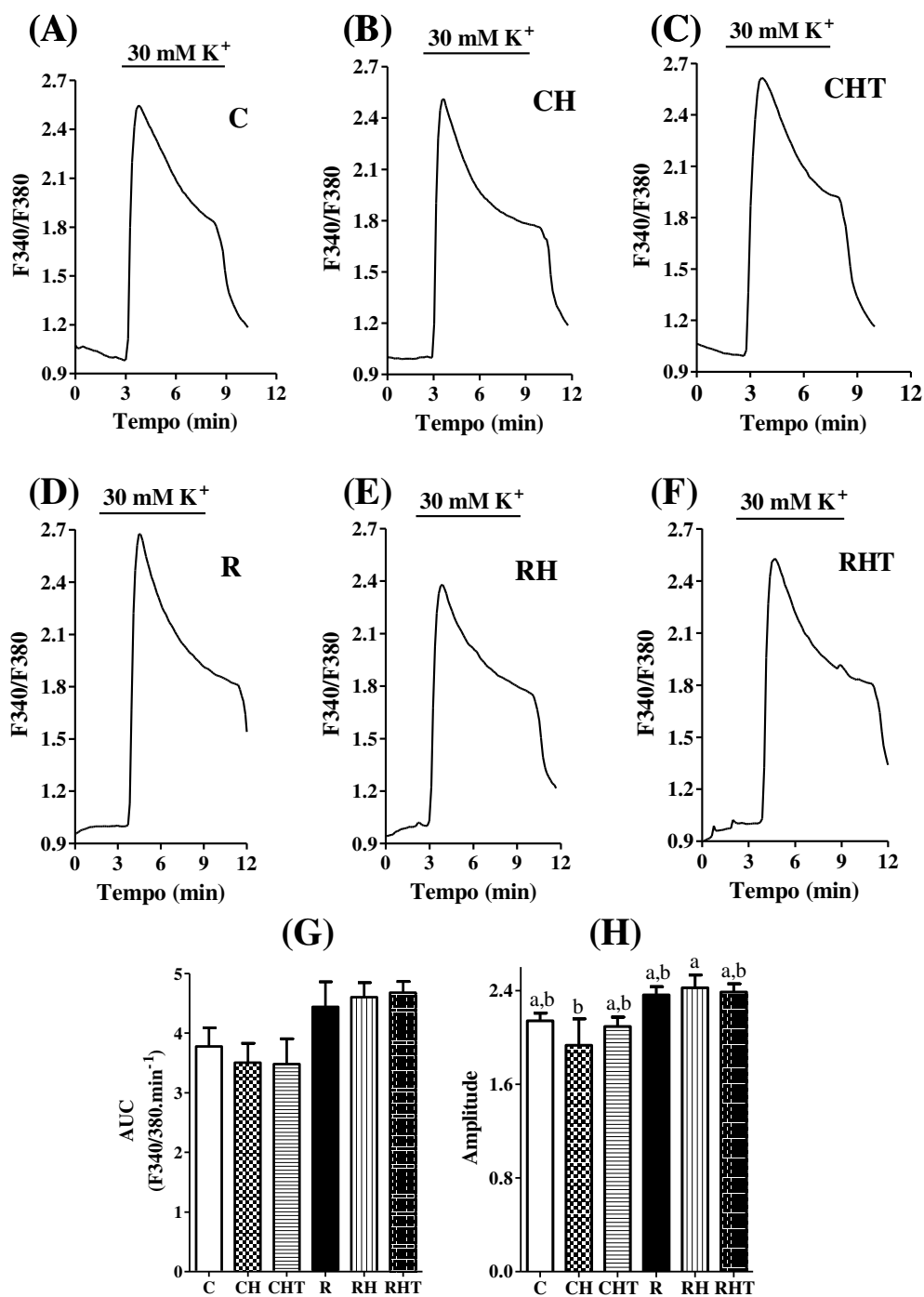


Figura 5. Mudanças na razão de fluorescência para o Ca^{2+} intracelular em ilhotas isoladas de camundongos C (A), CH (B), CHT (C), R (D), RH (E), RHT (F) em resposta a 30 mM de K^{+} como indicado pelas barras superiores. Análise da AUC (G) e da amplitude (H) das

oscilações de Ca^{2+} na presença de 30 mM de K^+ . Valores representam média $\pm$ EPM (n =6-8). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

O aminoácido L-arginina (Arg) têm efeito na secreção de insulina, primeiramente, por meio de seu transporte eletrogênico para o interior das células β , resultando no aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Sener *et al.*, 2000) e pela ação direta sobre o processo exocitótico de insulina, via aumento do pool de glutamato gerado pelo metabolismo da Arg (Wu *et al.*, 1998). Ao analisarmos a secreção de insulina frente a 20 mM de Arg, novamente ilhotas do grupo R secretaram menos insulina quando comparadas às ilhotas C ($P < 0,01$; Fig. 6). A As ilhotas dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica suplementados ou não com Tau apresentaram secreção de insulina em resposta à Arg similar ao grupo C (Fig. 6).

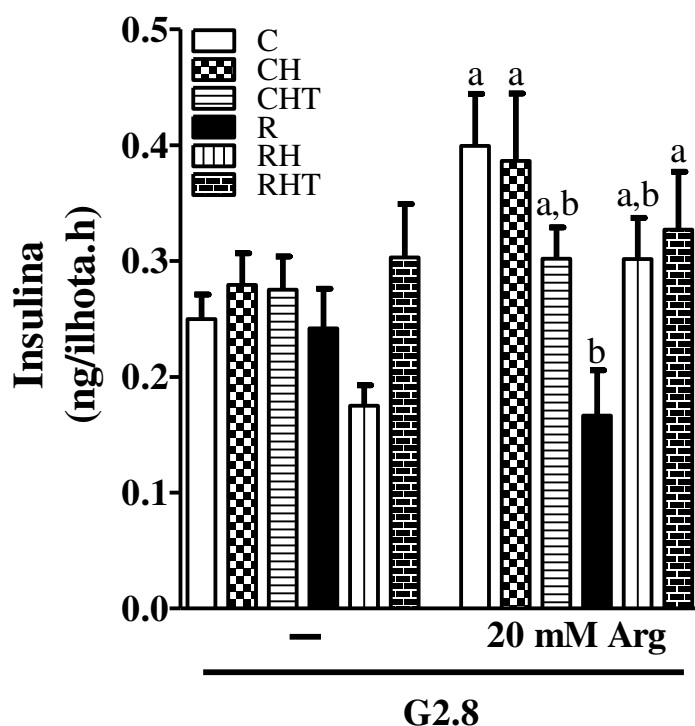


Figura 6: Secreção de insulina na presença de 20 mM de Arg nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Grupos de 4 ilhotas foram incubadas com 2,8 mM de glicose (G) na presença ou ausência de 20 mM de Arg. Dados são média $\pm$ EPM (n = 20-24). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).

A figura 7 mostra a secreção estática de insulina na presença de 100 μ M de tolbutamida (Tolb). Ao analisarmos a secreção por meio de ANOVA de uma via não observamos nenhuma diferença entre os grupos estudados. Contudo, a análise em separado da secreção comparando somente a resposta à Tolb nos grupos C e R por test *t* de *Student* demonstrou que ilhotas isoladas de camundongos R não respondem à essa sulfoniluréia, como pode ser observado na figura 7B. Por outro lado, a reduzida secreção de insulina no grupo R não foi acompanhada por alteração no total de influxo de Ca^{2+} estimulado pela Tolb (Fig. 8A). Contudo, ilhotas R apresentaram menor frequência das oscilações citoplasmáticas do cátion quando comparadas às ilhotas C ($P < 0,05$; Fig. 8C). Ainda, não foram observadas modificações no total da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, na amplitude de resposta e na frequência das oscilações de Ca^{2+} entre grupos obesos suplementados ou não com Tau (Fig. 8A-C).

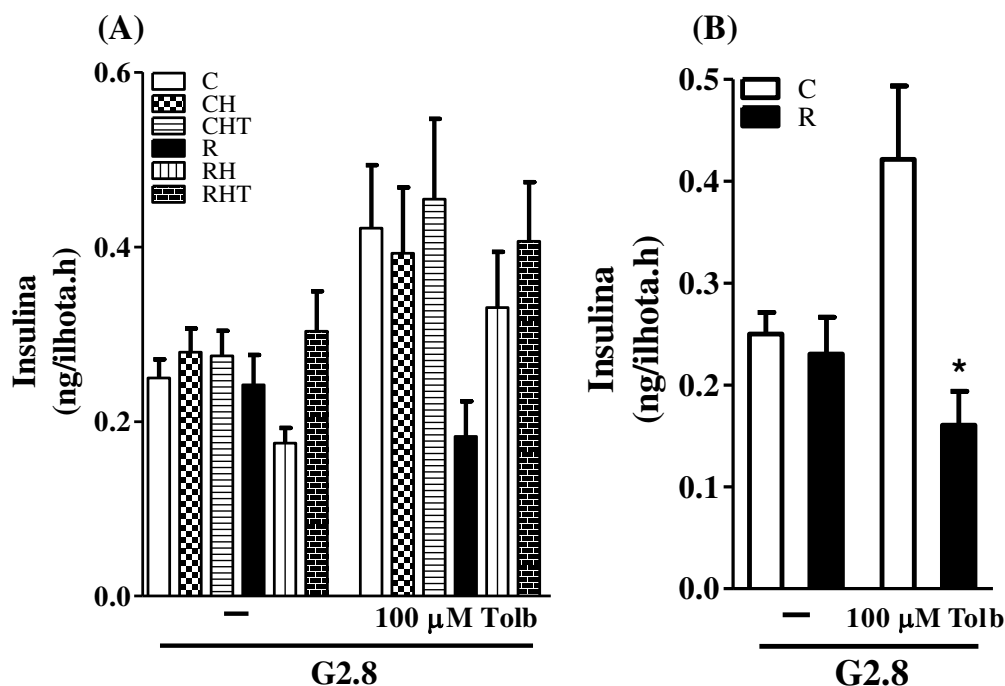


Figura 7: Secreção de insulina na presença de 100 μ M de tolbutamida (Tolb) nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT (A) e comparação entre o grupo C e R (B). Grupos de 4 ilhotas foram incubadas com 2,8 mM de glicose (G) na presença ou ausência de 100 μ M de Tolb. Dados são média $\pm$ EPM ($n = 20-24$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).

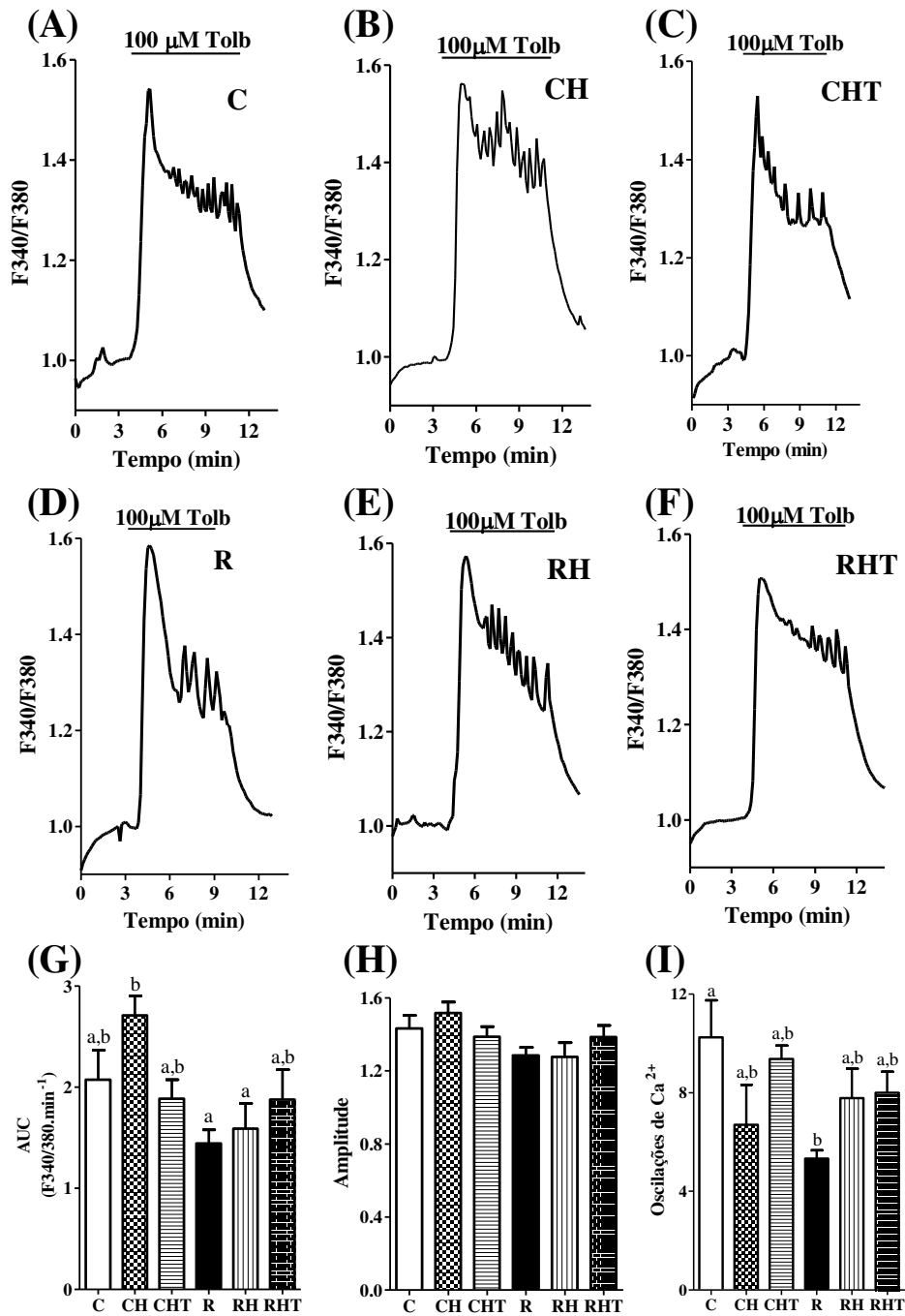


Figura 8: Mudanças na razão de fluorescência para o Ca^{2+} intracelular em ilhotas de camundongos C (A), CH (B), CHT (C), R (D), RH (E), RHT (F) em resposta a 100 μM de Tolbutamida (Tolb) como indicado pelas barras superiores. Análise da AUC (G), da amplitude (H) e da frequência das oscilações (I) de Ca^{2+} na presença de Tolb. Valores

representam média $\pm$ EPM (n =6-8). Letras diferentes indicam diferença estatística (P < 0,05, ANOVA de uma via seguida de *Newman-Keuls*).

Na figura 9 pode-se observar que ilhotas R também secretaram menos insulina na presença de 11,1 mM de glicose (P < 0,01). Ilhotas isoladas dos grupos tratados com dieta hiperlipídica apresentaram maior liberação do hormônio comparada aos seus respectivos controles (P < 0,05). A suplementação com Tau restaurou a secreção no grupo CHT para valores similares ao do grupo C, porém ilhotas RHT secretaram mais insulina quando comparado ao seu respectivo controle (P < 0,001; Fig. 9).

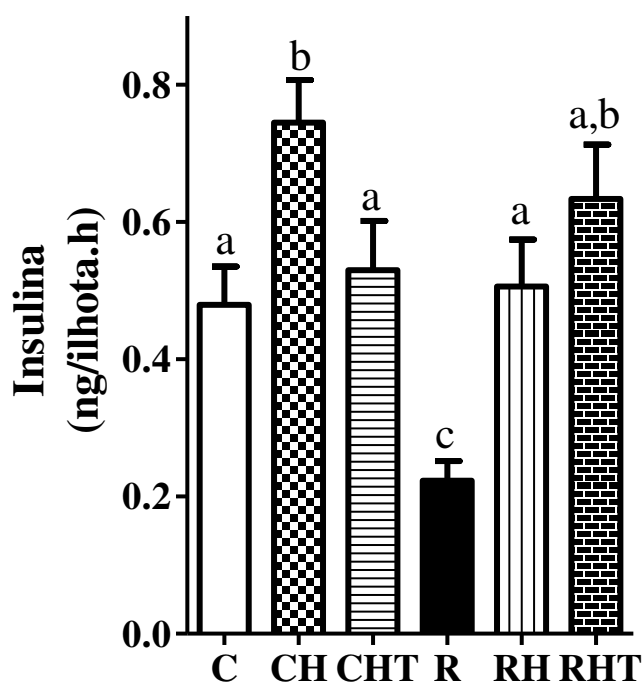


Figura 9: Secreção de insulina na presença de 11,1 mM de glicose nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Dados são média $\pm$ EPM (n = 20-24). Letras diferentes indicam diferenças significativas, P < 0,001 (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).

Em resposta a associação de 11,1 mM de glicose e 30 mM de K⁺, ilhotas R também liberaram menos insulina comparado às ilhotas C (P < 0,01, teste *t* de *Student*; Fig. 10). A dieta hiperlipídica aumentou a secreção no grupo CH (P < 0,05). A suplementação elevou a liberação de insulina no grupo RHT (P < 0,001; Fig. 10).

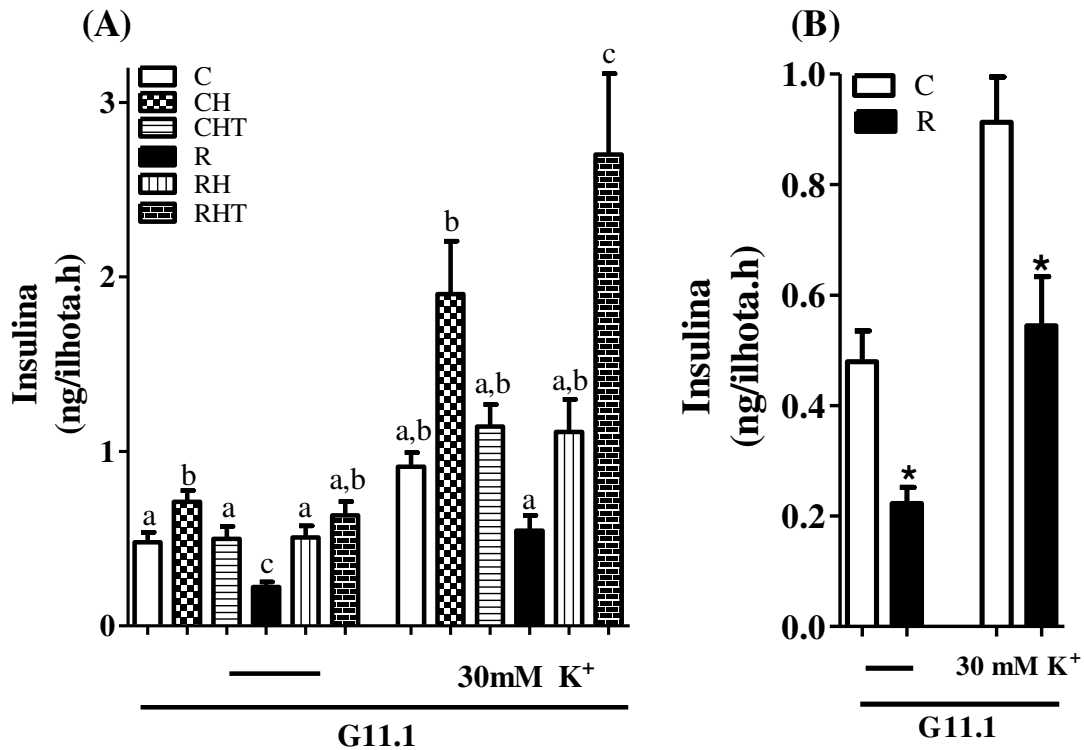


Figura 10: Secreção de insulina na presença de 11,1 mM de glicose (G) em associação ou não com 30 mM de K⁺ nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT (A). Comparação da secreção entre o grupo C e R (B). Dados são média $\pm$ EPM (n = 20-24). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*). * $P < 0,05$ versus C (teste *t* de *Student*).

Na figura 11 pode-se observar a secreção de insulina em resposta à combinação de 11,1 mM de glicose e 20 mM de Arg. Novamente, o grupo R secretou menos insulina comparado ao C ($P < 0,05$, teste *t* de *Student*). As ilhotas CH secretaram mais insulina nessas condições ($P < 0,05$; Fig. 11). O tratamento com Tau normalizou a liberação do hormônio nas ilhotas CHT, mas nas ilhotas RHT aumentou a secreção comparado às R ($P < 0,05$).

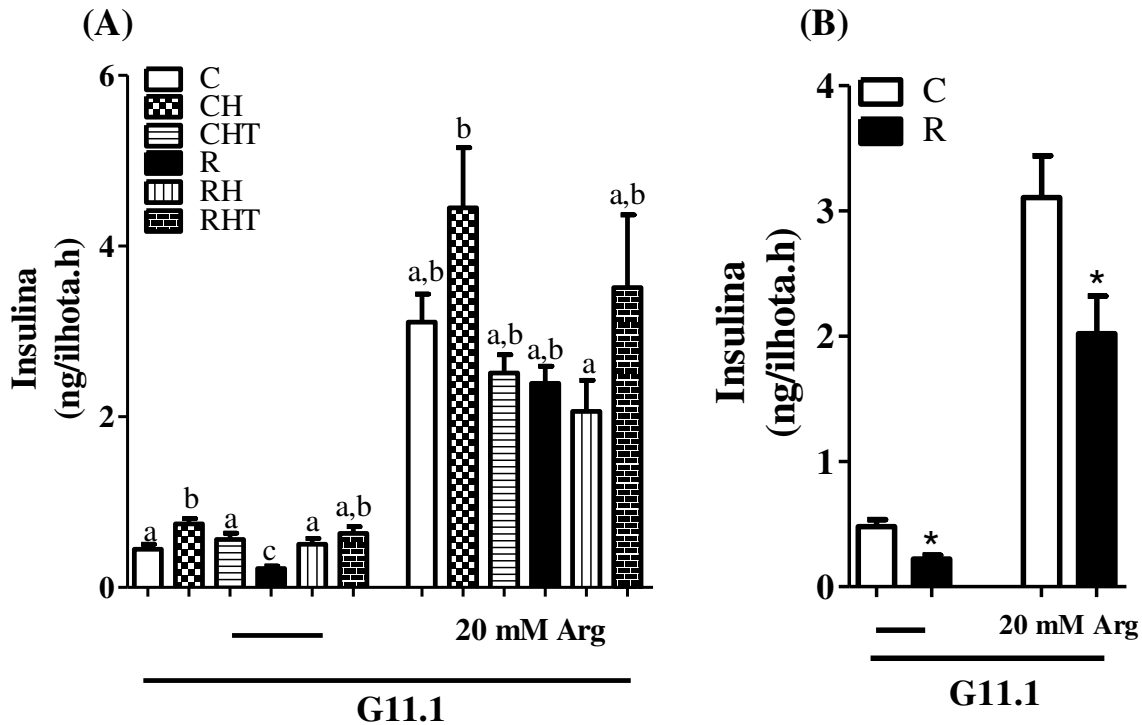


Figura 11: Secreção de insulina na presença de 11,1 mM de glicose (G) em associação ou não com 20 mM de Arg nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT (A). Análise comparativa da secreção entre o grupo C e R (B). Dados são média $\pm$ EPM (n = 20-24). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).

Quando as ilhotas dos grupos estudados foram incubadas na presença de 11,1 mM de glicose juntamente com 100 μ M de Tolb, o grupo R secretou menos insulina comparado ao grupo C ($P < 0,05$, teste *t* de *Student*; Fig. 12). O grupo CH liberou mais insulina nessa condição ($P < 0,01$). A Tau normalizou o perfil secretório nas ilhotas CHT, contudo, aumentou a secreção no grupo RHT ($P < 0,001$; Fig. 12).

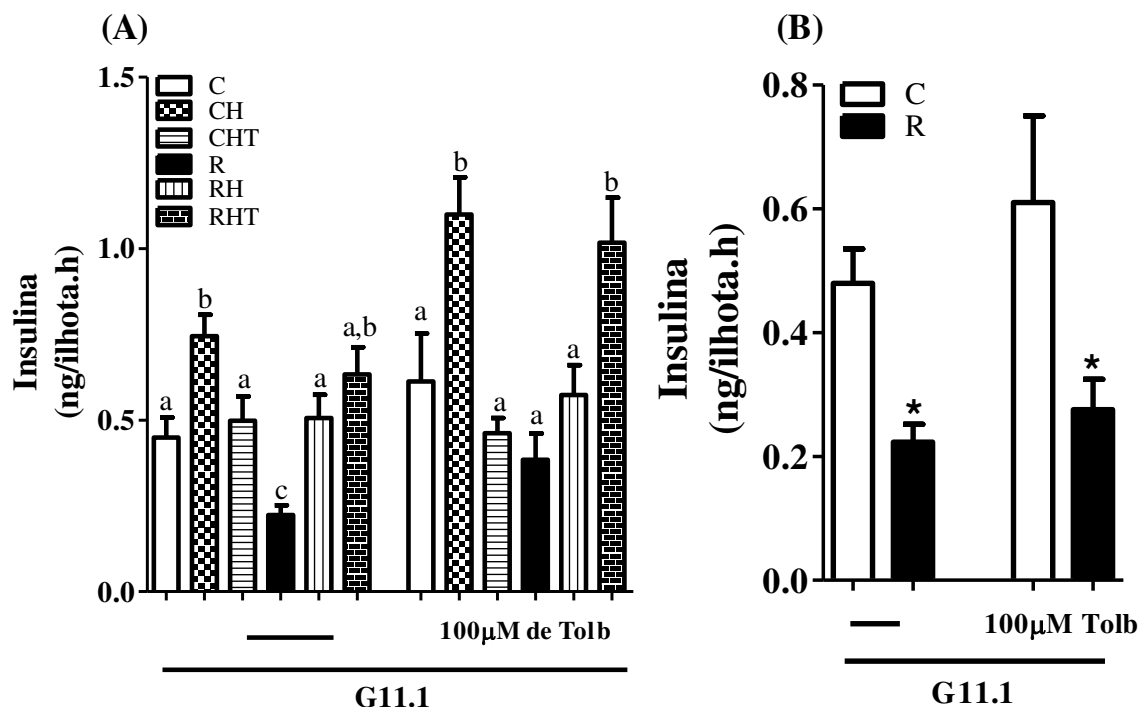


Figura 12: Secreção de insulina na presença de 11,1 mM de glicose (G) em associação ou não de 100 μ M de Tolb nos grupos C, CH, CHT, R, RH e RHT (A). Comparação da secreção entre o grupo C e R (B). Dados são média $\pm$ EPM (n = 20-24). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*). * $P < 0,05$ versus C (teste t de *Student*).

Ao analisarmos a secreção de insulina em resposta à 11,1 mM de glicose em associação com 250 μ M de diazoxida (DZX), droga ativadora dos K_{ATP} , e portanto, inibidora da secreção de insulina (Gribble and Reimann 2002, Quayle et al. 1997), observamos que ilhotas de camundongos R apresentaram apenas uma discreta inibição da secreção de insulina (Fig. 13B). Por outro lado, tanto ilhotas de camundongos RH e CH quanto as RHT e CHT apresentaram redução acentuada e maior do que o grupo C, na liberação da insulina em resposta à adição de DZX ao meio de incubação ($P < 0,001$; Fig. 13B).

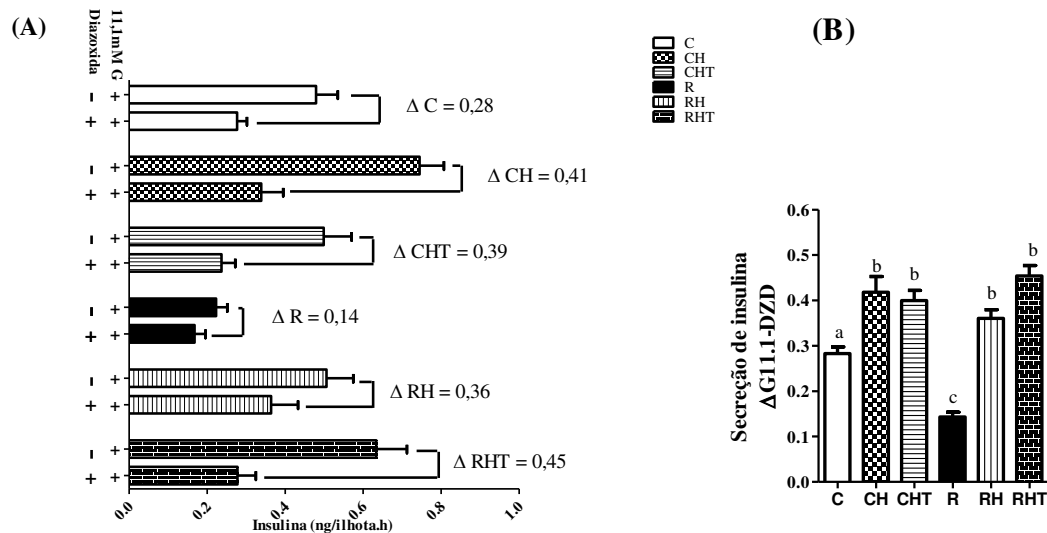


Figura 13: Secreção de insulina na presença de 250 μ M de diazoxida (DZX) em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Grupos de 4 ilhotas foram incubadas com 11,1 mM de glicose (G) na presença (+) ou ausência (-) de 250 μ M de DZX (A). O valor de Δ é obtido da subtração da secreção na presença de G11.1 pela secreção de insulina em resposta à G11.1 + 250 μ M de DZX (B). Dados são média $\pm$ EPM (n=20-24). Letras diferentes indicam diferenças significativas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).

As variações citoplasmáticas de Ca^{2+} quando as ilhotas foram perfundidas com 11,1 mM de glicose na presença de 250 μ M de DZX demonstraram que ilhotas CH reduziram discretamente o influxo deste cátion (Fig. 14G). Contudo, ilhotas RHT tiveram redução acentuada no influxo de Ca^{2+} comparado às ilhotas C e R ($P < 0,0001$; Fig. 14G e 14H).

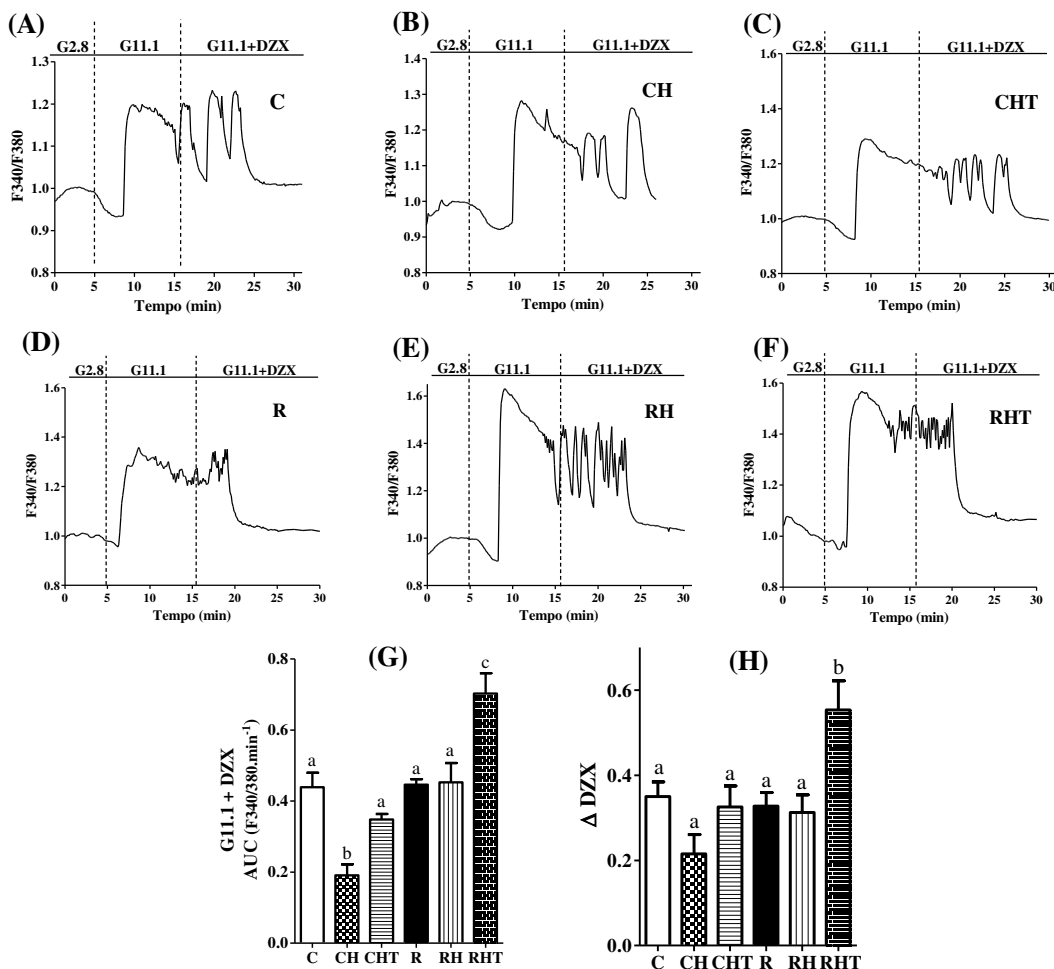


Figura 14. Mudanças na razão de fluorescência para o Ca^{2+} intracelular em ilhotas isoladas de camundongos C (A), CH (B), CHT (C), R (D), RH (E), RHT (F) em resposta a 11,1 mM de glicose (G11.1) na presença ou ausência de 250 μM de diazoxida (DZX), como indicado pelas barras superiores. (G) AUC do total de Ca^{2+} citoplasmático em resposta à G11.1 mM associado à 250 μM de DZX. (H) Δ de Ca^{2+} citoplasmático obtido através da diferença entre o ponto máximo de influxo de Ca^{2+} com o ponto de máxima inibição realizada pela DZX. Valores representam média $\pm$ EPM (n=6-8). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Na presença de nifedipina (Nif), uma diidropiridina bloqueadora dos canais Ca^{2+} do tipo L, ilhotas R apresentaram uma pequena redução na liberação da insulina (Fig. 15A e 15B). Foi observada acentuada inibição na secreção de insulina do grupo CH, porém no

grupo RH o efeito inibitório foi similar ao observado para o grupo C (Fig. 15A). Ilhotas isoladas de camundongos CHT apresentaram decaimento da secreção de insulina similar às ilhotas C. No grupo RHT o bloqueio dos canais de Cav promoveu acentuada inibição do processo secretório da insulina (Fig. 15A).

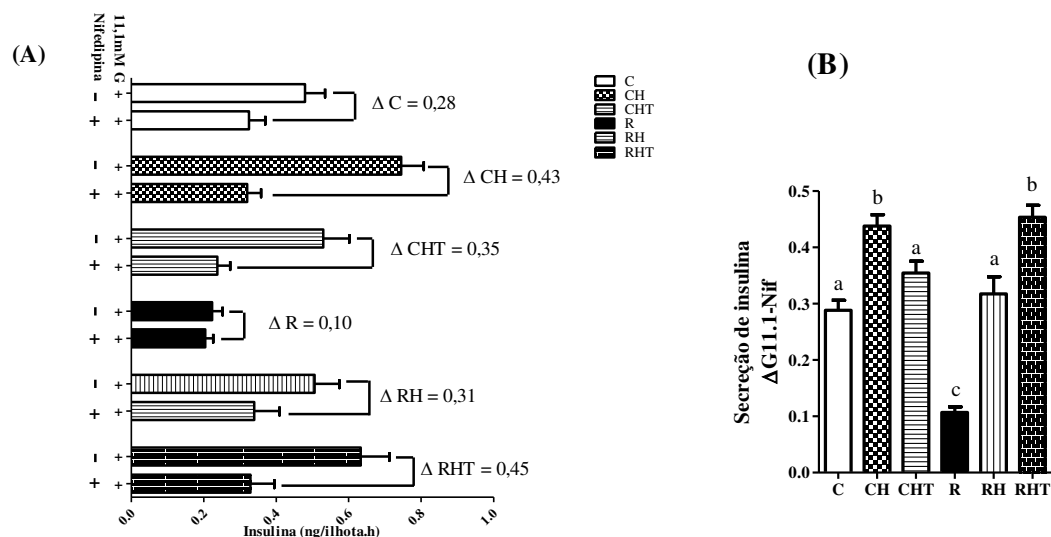


Figura 15: Secreção de insulina na presença de 10 μM de nifedipina (Nif) em ilhotas isoladas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Grupos de 4 ilhotas foram incubadas com 11,1 mM de glicose (G11.1) na presença (+) ou ausência (-) de 10 μM de Nif (**A**). O valor de Δ foi obtido através da subtração dos valores da secreção na presença de G11.1 pela secreção em resposta à G11.1 + 10μM de Nif (**B**). Dados são média ± EPM (n=20-24). Letras diferentes indicam diferenças significativas, $P < 0,001$ (ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).

As variações citoplasmáticas de Ca^{2+} quando as ilhotas foram perfundidas com 11,1 mM de glicose na presença de 10 μM de Nif apresentou apenas uma tendência a maior inibição no influxo deste íon no grupo CH (Fig.16).

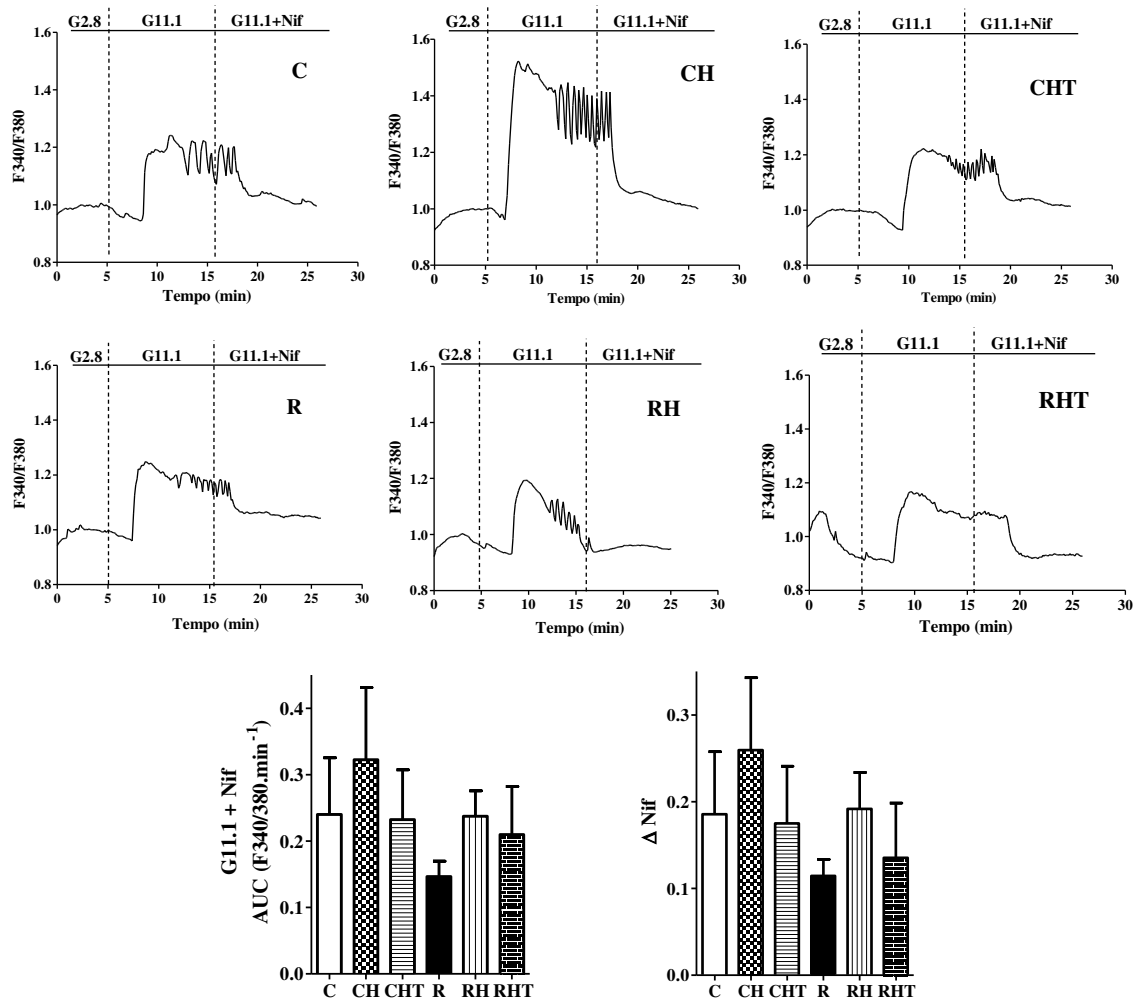


Figura 16. Mudanças na razão de fluorescência para o Ca^{2+} intracelular em ilhotas isoladas de camundongos C (A), CH (B), CHT (C), R (D), RH (E), RHT (F) em resposta a 11,1 mM de glicose (G11.1) na presença ou ausência de 10 μM de Nif como indicado pelas barras superiores. (G) AUC do total de Ca^{2+} citoplasmático em resposta à G11.1 mM associado à 10 μM de Nif. (H) Δ de Ca^{2+} citoplasmático obtido através da diferença entre o ponto máximo de influxo de Ca^{2+} com o ponto de máxima inibição realizada pela Nif. Valores representam média $\pm$ EPM (n=6-8). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

Conteúdo total de insulina e DNA das ilhotas pancreáticas

Foi observado redução de 43% no conteúdo total de insulina das ilhotas de camundongos R quando comparado às ilhotas C ($P < 0,01$; Fig. 17A). A ingestão de dieta hiperlipídica aumentou a reserva de insulina no grupo RH quando comparado às ilhotas R ($P < 0,05$), sem alteração para o grupo CH (Fig. 17A). O conteúdo total do hormônio foi similar entre as ilhotas isoladas dos grupos CHT e RHT com as do grupo C (Fig. 13A). Além disso, o conteúdo total de DNA por ilhota foi similar entre todos os grupos experimentais (Fig. 17B).

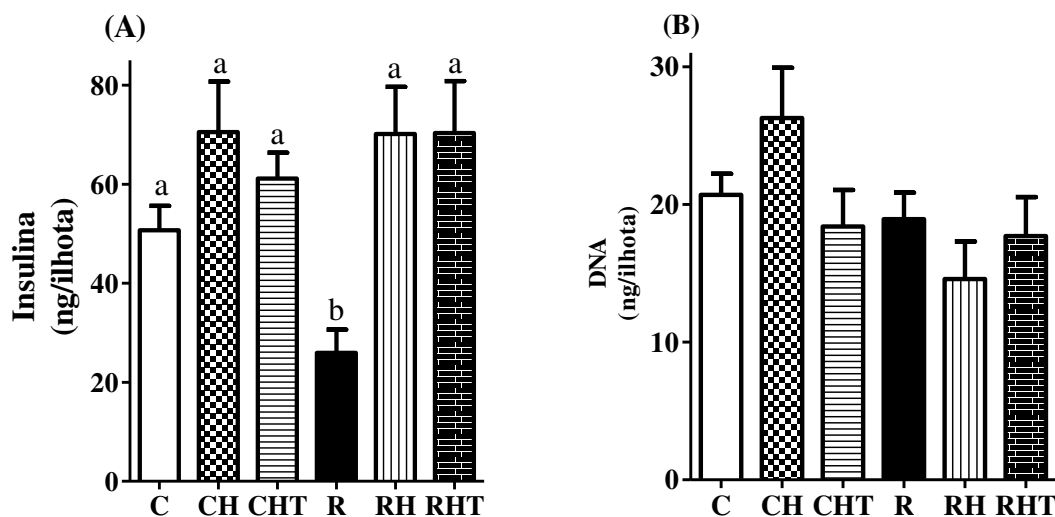


Figura 17: Conteúdo total de insulina (A) e de DNA (B) de ilhotas isoladas de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT. Dados são a média $\pm$ EPM ($n = 6-8$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$; ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).

Expressão de proteínas envolvidas no acoplamento estímulo-secreção da insulina

A expressão da subunidade Kir6.2 do canal de K_{ATP} foi maior em ilhotas R quando comparado às ilhotas C ($P < 0,01$, teste *t* de *Student*; Fig. 18C). A suplementação com Tau aumentou a expressão da subunidade Kir6.2 no grupo RHT ($P < 0,05$, Fig. 18B). Não foram observadas alterações estatisticamente significativas na expressão da subunidade SUR1 do canal de K_{ATP} (Fig. 18A). Em relação às subunidades dos canais Cav, observamos um aumento da subunidade $\alpha 1.2$ no grupo CHT em relação ao controle ($P < 0,003$; Fig.

19B), e elevação parcial da subunidade $\beta 2$ (Fig. 19C), sem alteração para os demais grupos. Não foi observado alteração na expressão da subunidade $\alpha 1.3$ (Fig. 19A).

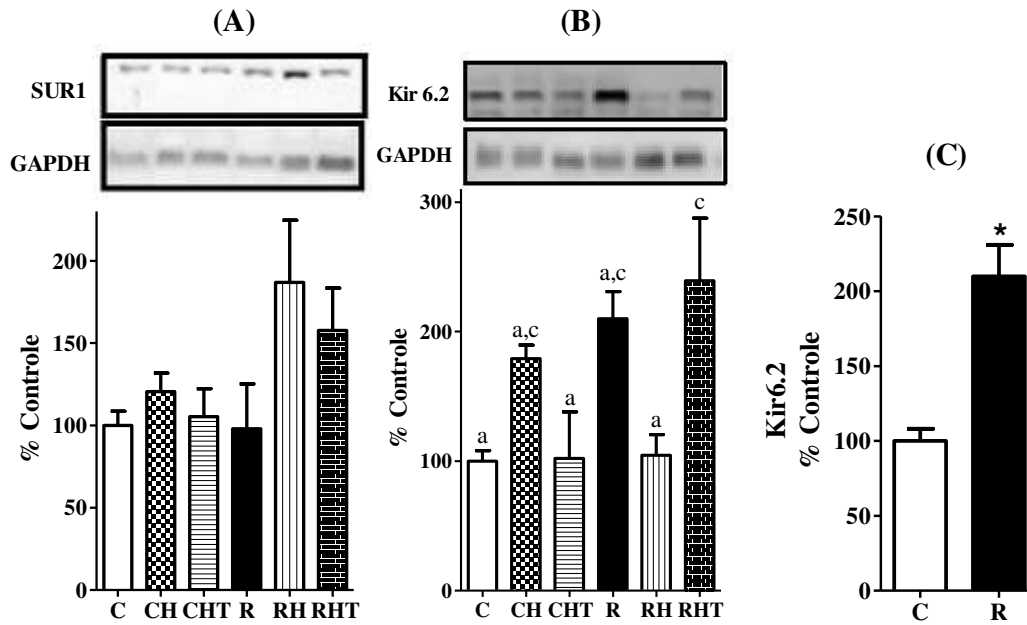


Figura 18: Expressão proteica das subunidades dos canais de K_{ATP} SUR (A), Kir6.2 (B) Kir6.2 C vs R (C). Dados são a média $\pm$ EPM ($n = 6-8$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$; ANOVA, seguida de *Newman-Keulst*). * $P < 0,05$ versus C (teste *t* de *Student*).

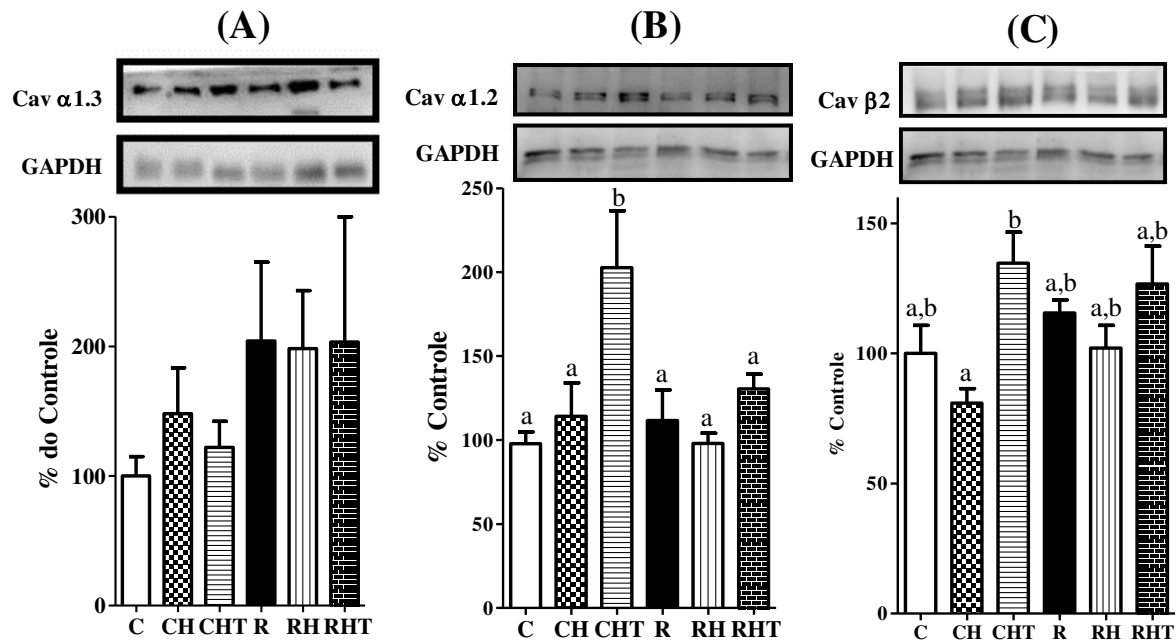


Figura 19: Expressão proteica das subunidades dos CaV α 1.3 (A), α 1.2 (B) e β 2 (C). Dados são a média $\pm$ EPM (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (P < 0,05; ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*).

Por outro lado, a expressão da proteína SNAP-25 foi menor no grupo R em relação ao C (P < 0,05, teste *t* de *Student*; Fig. 20B), e o tratamento com dieta hiperlipídica aumentou a expressão da SNAP-25 no grupo RH (P < 0,01; Fig. 20A). A suplementação aumentou o conteúdo de SNAP-25 no grupo CHT em relação aos grupos R e RHT (P < 0,05), por outro lado, normalizou sua expressão nas ilhotas RHT (Fig. 20A).

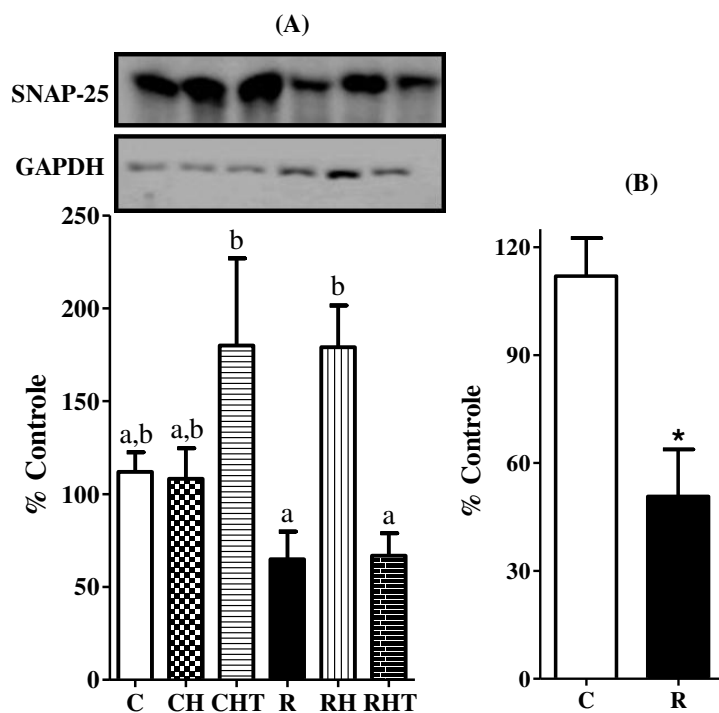


Figura 20: Expressão proteica da SNAP-25(A), e comparação entre grupo C e R (B). Dados são a média $\pm$ EPM ($n = 6-8$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$; ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*). * $P < 0,05$ versus C (teste *t* de *Student*).

A Tau aumentou a expressão proteica da syntaxina nas ilhotas RHT e CHT em relação às ilhotas C ($P < 0,05$; Fig. 21A). Não houve alteração na expressão da PKA α (Fig 21B) e VAMP-2 (Fig. 21C) entre os grupos.

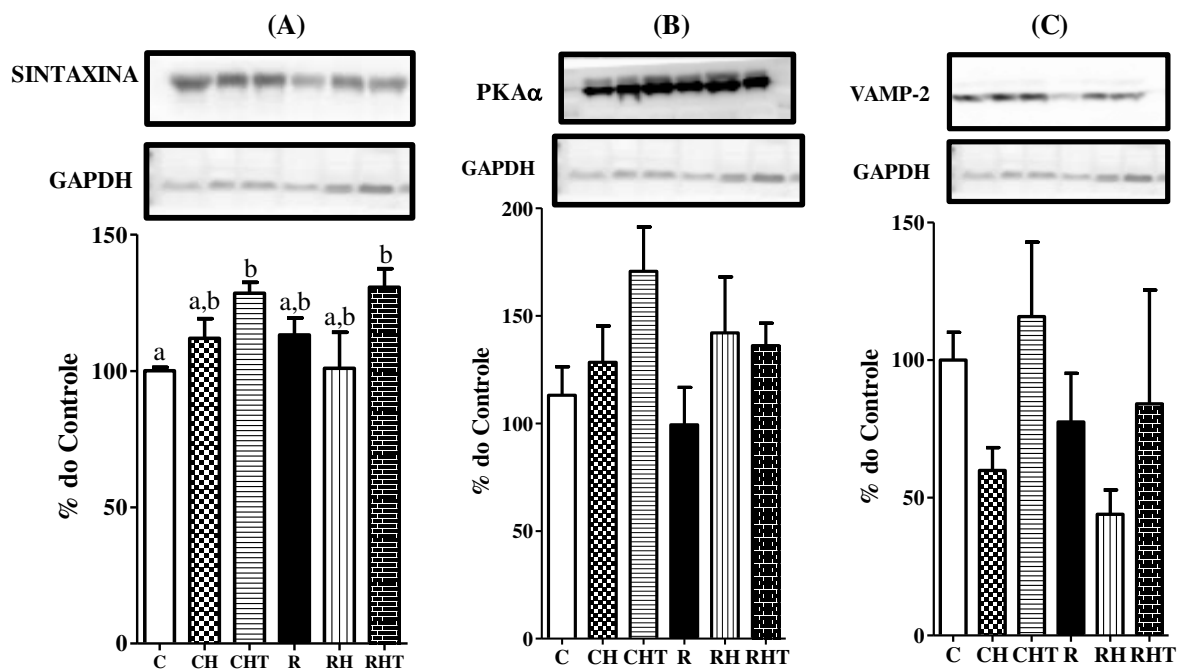


Figura 21: Expressão proteica da SINTAXINA (A), PKA α (B) e VAMP2 (C). Dados são a média $\pm$ EPM (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (P < 0,05; ANOVA, seguida de *Newman-Keuls*). *P < 0,05 versus C (teste *t* de *Student*).

DISCUSSÃO

Neste estudo, observamos o efeito da desnutrição pós-natal em alterações no crescimento corporal, parâmetros plasmáticos e homeostase glicêmica. Como já relatado por estudos anteriores (Delghingaro-Augusto et al. 2004, Filiputti et al. 2008, Amaral et al. 2010, Batista et al. 2012, da Silva et al. 2010), a restrição proteica reduziu o crescimento dos camundongos, o CNA e o peso de órgãos (Tab. 1 e Fig. 1A), além de diminuir os valores plasmáticos de proteína (Tab. 2).

O tratamento com dieta hiperlipídica foi eficiente no desenvolvimento da obesidade (Fig. 1A), assim como no aumento dos depósitos de gordura nos grupos RH e CH (Fig. 1C e 1D). Por outro lado, a suplementação com Tau preveniu o desenvolvimento da obesidade somente no grupo CHT (Fig. 1). Dados da literatura correlacionaram a obesidade e as concentrações plasmáticas de Tau, demonstrando que nesta síndrome a deficiência do aminoácido provoca um ciclo vicioso que resulta em maior acúmulo de gordura corporal (Tsuboyama-Kasaoka et al. 2006). Foi demonstrado que a Tau reduz o peso corporal e o acúmulo de gorduras perigonadal, retroperitoneal e hepática em ratos obesos (Nardelli et al. 2011). A suplementação com Tau preveniu a obesidade induzida por dieta hiperlipídica e a geneticamente programada (Nakaya et al. 2000). A Tau aumenta a expressão gênica de fatores envolvidos com aumento do gasto energético reduzindo o acúmulo de gordura no tecido adiposo (Tsuboyama-Kasaoka et al. 2006). Contudo, em nosso estudo a suplementação com Tau no grupo RHT não impediu o acúmulo de gordura, e estes achados vão de encontro com Batista et al. (2012). Nossos dados, portanto, sugerem que a desnutrição promova alterações metabólicas severas que tornam os camundongos mais susceptíveis aos prejuízos fisiológicos promovidos pela ingestão de dieta hiperlipídica, os quais não podem ser prevenidos pela suplementação com Tau.

Observamos também que camundongos R apresentaram maior tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (Fig. 2 e 3). Tal efeito deve contribuir para a normoglicemia em camundongos R (Tab. 2 e 3). Sabe-se que ratos submetidos à restrição proteica apresentam aumento na fosforilação do receptor de insulina (IR) e de seu substrato (IRS-1), bem como da associação do IRS-1 com a subunidade p85 da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no músculo após estimulação com insulina (Reis et al. 1997, Gavete et al. 2005). Recentemente, Batista et al.

(2012) demonstraram que camundongos R apresentam maior concentração plasmática de adiponectina que está associada ao aumento da ativação hepática da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). De fato, a adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina via fosforilação da AMPK (pAMPK) aumentando a captação de glicose (Yadav et al. 2013), sendo portanto, um dos fatores que contribuem para a homeostase em camundongos desnutridos.

O modelo de obesidade induzido por dieta hiperlipídica é conhecido por resultar em prejuízos na homeostase da glicose e desenvolvimento de DM2 (Winzell and Ahrén 2004, De Souza et al. 2005). Em nosso estudo, tanto camundongos C quanto R submetidos à dieta hiperlipídica demonstraram intolerância a glicose e resistência à insulina (Fig. 2 e 3). Esses prejuízos na homeostase da glicose no grupo RH são devidos à diminuição da concentração plasmática de adiponectina e menor conteúdo hepático da pAMPK o que contribui para a resistência à insulina neste grupo (Batista et al. 2012).

A suplementação com Tau impediu o desenvolvimento de prejuízos na homeostase da glicose no grupo CHT (Fig. 2). Apesar de várias evidências demonstrarem o envolvimento desse aminoácido sobre o controle da glicemia (Kulakowski and Maturo 1984, Franconi et al. 1995, Anuradha and Balakrishnan 1999, Aerts and Van Assche 2001, Colivicchi et al. 2004, Tsuboyama-Kasaoka et al. 2006, Loizzo et al. 2007, Xiao, Giacca and Lewis 2008, Carneiro et al. 2009, Ribeiro et al. 2009), o mecanismo de ação da Tau em prevenir ou restaurar distúrbios da homeostase da glicose, não está completamente compreendido. Dados da literatura demonstraram que a Tau interage diretamente com o IR (Kulakowski and Maturo, 1988; Carneiro et al. 2009) e recentemente nosso laboratório demonstrou que a melhora da tolerância à glicose nos camundongos CHT é acompanhada de maior fosforilação da Akt no fígado (Ribeiro et al. 2012; Batista et al. 2012), efeito que reduz a produção hepática da glicose (Lochhead et al. 2001) melhorando o controle da glicemia no grupo CHT (Fig. 2). Contudo, a suplementação com Tau não preveniu a intolerância à glicose e resistência à insulina no grupo RHT (Fig. 2 e 3). Associado à isso observamos que apesar da resistência à insulina estabelecida no grupo RHT, os camundongos não apresentam hiperinsulinemia, o que demonstra que a combinação de desnutrição e ingestão de dieta hiperlipídica prejudica a capacidade da célula β em compensar a prejudicada ação da insulina contribuindo para o desenvolvimento do DM (Batista et al. 2012).

Com relação à secreção de insulina, observamos que as ilhotas isoladas de camundongos R secretaram menos insulina em resposta a 11,1 mM de glicose (Fig. 9) e ainda, apresentaram

um prejuízo secretório acentuado frente a agentes que induzem despolarização da célula β , tanto em condições basais quanto estimulatórias de glicose (Fig. 4, 6, 7, 9-12). Apesar desse efeito, não foram observadas modificações no influxo de Ca^{2+} frente aos agentes despolarizantes (Fig. 5 e 8). Mas ilhotas R tiveram menor conteúdo total de insulina (Fig. 17).

Estudos anteriores demonstraram que várias etapas da secreção de insulina estimulada por glicose estão prejudicadas em roedores submetidos à restrição proteica, dentre as quais pode-se citar: redução do conteúdo de GLUT2 (de Oliveira et al. 2011), da expressão da glicoquinase e glicerofosfato desidrogenase (Rasschaert et al. 1995), menor mobilização de Ca^{2+} (Latorraca et al. 1999) e alterações no processo de exocitose dos grânulos de insulina (Cherif et al. 2001, Batista et al. 2011). Em nosso estudo observamos que a menor secreção de insulina no grupo R está relacionada à redução da expressão da proteína relacionada com a extrusão dos grânulos de insulina, SNAP-25 (Fig. 20B), o que corrobora com as evidências de Batista et al. (2012) para ilhotas de ratos desnutridos, bem como dados da literatura que demonstraram que ilhotas de pacientes diabéticos apresentaram menor secreção de insulina frente a 8,3 e 16,7 mM de glicose devido à redução da expressão das proteínas SNAP-25 e VAMP-2 (Ostenson et al. 2006). Ainda, observamos que ilhotas R apresentaram aumento da expressão proteica da subunidade Kir6.2 (Fig. 18B), com correspondente aumento da atividade dos canais de K_{ATP} , pois a adição de DZX ao meio de incubação contendo 11,1 mM de glicose produziu menor inibição da liberação da insulina em ilhotas R (Fig. 13). Soriano et al. (2010), já tinham demonstrado que ilhotas de camundongos desnutridos apresentavam maior atividade dos canais de K_{ATP} resultando em hiperpolarização e prejuízo na despolarização das células β , contudo esse efeito era associado somente à maior expressão proteica da subunidade SUR1.

Outros relatos da literatura demonstram que a subunidade Kir6.2 apresenta alteração na expressão gênica e proteica contribuindo para disfunção em diferentes modelos experimentais. Foi demonstrado que a expressão proteica da subunidade Kir6.2 em células musculares lisas cancerígenas está elevada juntamente com aumento da corrente dos canais de K_{ATP} (Park et al. 2008). Em células INS-1, foi demonstrado que em baixas concentrações de glicose a expressão da subunidade Kir6.2 eleva-se, por outro lado, diminui quando a concentração de glicose sobe para concentrações superiores a 5 mM de glicose (Smith et al. 2006). Ratos *Wistar* tratados com grelina apresentaram atenuação da insulinemia durante o GTT, assim como redução na secreção de insulina em resposta a 11,1 e 16,7 mM de glicose devido alteração na voltagem da membrana

da célula β e aumento na expressão gênica e proteica da subunidade Kir6.2 (Peng et al. 2012). Esses dados, juntamente com os resultados obtidos em nosso estudo, enfatizam que os canais de K_{ATP} estão mais ativos no grupo R contribuindo à disfunção da célula β na desnutrição.

As ilhotas dos camundongos CH liberaram mais insulina frente à 11,1 mM de glicose em combinação ou não com agentes despolarizantes (Fig. 9-12). Esse efeito foi acompanhado por maior ativação dos canais de K_{ATP} no grupo CH, pois ao adicionarmos DZX ao meio de incubação contendo 11,1 mM de glicose, observamos acentuada inibição da secreção de insulina nas ilhotas CH (Fig. 13B). Ainda, a maior liberação de insulina no grupo CH foi também associada ao aumento na atividade dos canais Cav, pois ocorreu maior inibição da liberação do hormônio frente a combinação de 11,1 mM de glicose e Nif (Fig. 15), bem como menor redução do influxo de Ca^{2+} em resposta à DZX (Fig. 14G). Estes resultados vão de encontro com estudos que demonstraram que ácidos graxos como o palmitato diretamente aumentam a atividade dos canais de Cav do tipo L de ilhotas de camundongos em resposta à glicose e agentes despolarizantes da secreção (Olofsson, et al. 2004). Best et al. (2011) demonstraram recentemente que os ácidos graxos apresentam um efeito duplo sobre a atividade elétrica da célula β . Em ilhotas de ratos foi evidenciado que em resposta à 0,5 mM de octanoato ocorre inicialmente redução da atividade dos canais de K_{ATP} e aumento da atividade elétrica da célula β . Contudo, em sequência ocorrem efeitos opostos sobre a fisiologia da célula β . As mesmas ações foram evidenciadas na presença de 1mM de palmitato. Essas ações vão de encontro com os efeitos à longo prazo realizados pelos ácidos graxos que levam à disfunção da célula β . Sabe-se que a ingestão de dieta rica em gordura eleva a concentração plasmática de ácidos graxos livres, na célula β esses nutrientes são convertidos em acil-CoAs de cadeia longa que interagem com o canal de K_{ATP} ativando-o e dessa forma inibindo a secreção de insulina (Bränström et al. 2004). Portanto, sugerimos em nosso trabalho que o efeito da ingestão da dieta hiperlipídica sobre a função da célula β ainda esteja em estágios onde os ácidos graxos ingeridos estão promovendo aumento da secreção contribuindo para a maior liberação do hormônio frente à resistência à insulina.

Por outro lado, apesar do grupo RH apresentar um quadro de resistência à insulina similar ao grupo CH (Fig. 3), os dados de secreção nas ilhotas RH frente ao K^+ e 11,1 mM de glicose (Fig. 9 e 10) indicam que estas ilhotas não apresentam o mesmo padrão compensatório de secreção frente à resistência induzida pela ingestão de dieta hiperlipídica. Ademais, a DZX

promoveu acentuada inibição da secreção (Fig. 13) e do influxo de Ca^{2+} quando comparado ao grupo CH (Fig. 14G), sendo a inibição da liberação da insulina frente à inativação dos Cav pela Nif similar ao grupo C (Fig. 15). Esse efeito sugere que as alterações funcionais da célula β desencadeadas pelo período de ingestão de dieta hipoproteica, possa alterar as ações dos ácidos graxos obtidos na dieta e que são disponibilizados via circulação sobre a célula β , deixando-a mais susceptível à manifestação precoce dos prejuízos funcionais dos ácidos graxos sobre os canais de Cav (Best et al. 2011) reduzindo a liberação da insulina o que resultaria na manifestação mais precoce do DM.

A relação entre o tratamento de ilhotas isoladas com ácidos graxos e seus efeitos nas proteínas SNARE já foi relatada. Zraika et al. (2004) demonstraram que ilhotas isoladas de camundongos incubadas com 1 mM de palmitato por 48h apresentam redução na secreção de insulina estimulada por glicose e agentes despolarizantes, porém houve aumento na expressão da SNAP-25. Esse dado se assemelha aos resultados do conteúdo protéico de SNAP-25 no grupo RH (Fig. 20A). O aumento da expressão da SNAP-25 pode também ser prejudicial à função da célula β , pois como demonstrado por Fasshauer and Margittai (2004) o excesso de proteínas do complexo SNARE pode inibir a formação correta do complexo de extrusão e reduzir a exocitose do grânulo de insulina.

Em relação aos efeitos da suplementação com Tau, ela restaurou a secreção de insulina no grupo RHT frente à 2,8 mM de glicose mais K^+ ou Arg (Fig. 4 e 6). A suplementação normalizou a secreção em resposta à 11,1 mM de glicose no CHT (Fig. 9 e 12). Porém no grupo RHT, a liberação de insulina foi elevada em resposta a 11,1 mM de glicose associada ou não com K^+ ou Tolb (Fig. 10 e 12). Desta forma, o tratamento com Tau teve efeito diferencial entre os grupos estudados. No grupo CHT podemos observar que apesar da maior expressão proteica das subunidades $\alpha 1.2$ e $\beta 2$ dos canais de Cav (Fig. 19B e 19C), estes não apresentaram maior atividade, pois o bloqueio dos canais Cav frente à Nif foi similar entre ilhotas CHT e C (Fig. 15B). Mas, a DZX promoveu elevada inibição da secreção de insulina, contudo, acompanhada de redução do influxo de Ca^{2+} similar ao grupo C (Fig. 13B e 14G). Esses resultados demonstram que a suplementação está modulando a atividade dos canais Cav no grupo CHT.

Sabe-se que a Tau contribui para a regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sendo observado que em células cardíacas ela estimula a abertura do canal de Ca^{2+} na presença de baixa $[\text{Ca}^{2+}]_i$; por outro lado inibe a abertura do canal em alta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Sato 1998). A Tau aumenta a corrente do trocador de

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nos miócitos atriais (Sato 1998). Além disso, em neurônios é evidenciado um papel protetor da Tau contra a citotoxicidade desencadeada por glutamato, onde este aminoácido reduz a captação de Ca^{2+} e amplitude do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulada pelo neurotransmissor (Chen et al. 2001). Contudo, em hepatócitos a Tau aumenta o transporte de Ca^{2+} , via uniporte, para a mitocôndria o que eleva a atividade mitocondrial destas células por aumentar o aporte de Ca^{2+} para a ativação de desidrogenases (Palmi et al. 1999). Portanto, apesar de aqui o aumento da expressão protéica do canal Cav não estar acompanhada de maior atividade, essa ação deve-se ao efeito modulatório da Tau sobre o canal prevenindo a hiperfunção da célula β e demais alterações morfofuncionais no pâncreas endócrino que caracterizam roedores submetidos à dieta hiperlipídica (Ribeiro et al., 2012), levando à melhora da insulinemia (Tab. 2) e em última instância no armazenamento de gordura (Fig. 1) no grupo CHT.

Como citado anteriormente, a suplementação agiu de forma diferencial nas ilhotas RHT. Os dados demonstram que o aumento da capacidade secretória neste grupo está associada tanto à maior atividade dos canais de K_{ATP} (Fig. 13 e 14), quanto dos canais de Cav (Fig. 15). Esses efeitos foram acompanhados de aumento da expressão da subunidade Kir6.2 (Fig. 18B) e da proteína syntaxina (Fig. 21A). Contraditoriamente ao que podemos evidenciar anteriormente para os grupos R e RH, nas ilhotas RHT os canais de K_{ATP} aumentaram a função da célula β . Além das evidências observadas nos experimentos de secreção com DZX e Nif, dados da literatura demonstraram importante efeito regulatório da Tau sobre a atividade dos canais de K_{ATP} . Ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos controle suplementados com Tau apresentaram redução no tempo de abertura dos canais de K_{ATP} , aumentando a despolarização das células β (Navarro, M. 2009). Essa ação deve estar associada ao aumento da sensibilidade à sulfoniúreias dos canais de K_{ATP} promovido pelo aminoácido em linhagens celulares secretoras de insulina (Park et al. 2004). Em oócitos *Xenopus laevis* foi demonstrado que a Tau bloqueia os três tipos principais de associação das subunidades dos canais de K_{ATP} (Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A e Kir6.2/SUR2B), via ligação ao radical benzamido da subunidade SUR (Lim et al. 2004). Em fibras musculares esqueléticas isoladas, a aplicação de Tau leva ao fechamento dos canais de K_{ATP} de forma dose-dependente e que pode ser revertida através da remoção da Tau do meio de incubação (Tricarico, Barbieri and Camerino 2000). Além do efeito sobre a atividade dos canais no grupo RHT, é necessário ressaltar que após a melhora no acoplamento promovido pela Tau, seja sobre a regulação da expressão proteica e/ou atividade dos canais, a

função completa da célula β do grupo RHT foi aprimorada também pela melhora na extrusão dos grânulos via aumento da proteína syntaxina (Fig. 21A).

CONCLUSÃO

As evidências obtidas no presente estudo levam as seguintes conclusões:

- A desnutrição reduziu o peso corporal, assim como peso do baço, rins e coração. Os camundongos desnutridos apresentaram maior tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. A secreção de insulina no grupo R é menor frente à concentração basal e estimulatória de glicose. O defeito secretório foi pronunciado frente aos agentes despolarizantes (K^+ , Tolb e Arg) sem alteração para o influxo de Ca^{2+} nessas condições. Estas alterações na secreção de insulina foram relacionadas ao menor conteúdo protéico de insulina e SNAP-25 nas ilhotas R, além de aumento da expressão da subunidade Kir6.2 dos canais de K_{ATP} e de sua atividade frente ao estímulo com glicose.
- O tratamento com a dieta hiperlipídica no grupo CH levou ao desenvolvimento da obesidade, intolerância a glicose, resistência à insulina e hiperinsulinemia. As ilhotas CH secretaram mais insulina em resposta à 11,1 mM de glicose e agentes despolarizantes, efeitos associados à maior inibição dos canais de K_{ATP} e ativação dos canais Cav em resposta à glicose.
- O tratamento com a dieta hiperlipídica também levou ao desenvolvimento da obesidade no grupo RH, assim como resistência a insulina, porém suas ilhotas não mostraram perfil de hipersecreção, efeito que pode estar correlacionado com a ativação dos canais de Cav em resposta à 11,1 mM de glicose. Ainda, ilhotas RH tiveram maior expressão proteica de SNAP-25.
- A suplementação com Tau reduziu o peso corpóreo e os depósitos de gordura, e melhorou a tolerância à glicose somente nos camundongos CHT.
- As ilhotas CHT apresentaram secreção de insulina similar ao grupo C. Contudo, foi maior a expressão proteica das subunidades $\alpha 1.2$ e $\beta 2$ dos canais Cav, e da SNAP-25 e syntaxina. Não foi evidenciada alteração na atividade dos canais de Cav em resposta à glicose no grupo CHT.
- O grupo RHT apresentou aumento da liberação de insulina frente à glicose e agentes despolarizantes. A maior secreção do hormônio foi acompanhada por aumento da

expressão protéica da subunidade Kir6.2 e de sua inibição frente ao estímulo com glicose, associada ao aumento da atividade dos canais de Cav, e do conteúdo proteico de syntaxina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, L. & F. A. Van Assche (2001) Low taurine, gamma-aminobutyric acid and carnosine levels in plasma of diabetic pregnant rats: consequences for the offspring. *J Perinat Med*, 29, 81-4.
- Aguilar, L., M. Martín, I. P. Balcabao, M. L. Gómez-Lus, R. Dal-Ré & J. Prieto (1997) In vitro assessment of the effect of clavulanic acid at concentrations achieved in human serum on the bactericidal activity of amoxicillin at physiological concentrations against *Staphylococcus aureus*: implications for dosage regimens. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 1403-5.
- Amaral, A. G., A. Rafacho, C. A. Machado de Oliveira, T. M. Batista, R. A. Ribeiro, M. Q. Latorraca, A. C. Boschero & E. M. Carneiro (2010) Leucine supplementation augments insulin secretion in pancreatic islets of malnourished mice. *Pancreas*, 39, 847-55.
- Anuradha, C. V. & S. D. Balakrishnan (1999) Taurine attenuates hypertension and improves insulin sensitivity in the fructose-fed rat, an animal model of insulin resistance. *Can J Physiol Pharmacol*, 77, 749-54.
- Ashcroft, F. M. & F. M. Gribble (1999) ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia*, 42, 903-19.
- Batista, T. M., R. A. Ribeiro, A. G. Amaral, C. A. de Oliveira, A. C. Boschero & E. M. Carneiro (2011) Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced insulin secretion in islets from low-protein diet rats: involvement of Ach-M3R, Synt 1 and SNAP-25 proteins. *J Nutr Biochem*.
- Batista, T.M, R.A. Ribeiro, A.G. Amaral, C.A. de Oliveira, A.C. Boschero & E.M. Carneiro (2012) Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced insulin secretion in islets from low-protein diet rats: involvement of Ach-M3R, Synt 1 and SNAP-25 proteins. *J Nutr Biochem*, 23, 306-12.
- Batista T.M., Ribeiro R. A., da Silva P.M., Camargo R.L., Lollo P.C., Boschero A.C., Carneiro EM (2012). Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res*. 2012 Dec 26. doi: 10.1002/mnfr.201200345. [Epub ahead of print]
- Bustamante, J., M. V. Lobo, F. J. Alonso, N. T. Mukala, E. Giné, J. M. Solís, J. Tamarit-Rodríguez & R. Martín Del Río (2001) An osmotic-sensitive taurine pool is localized in rat pancreatic islet cells containing glucagon and somatostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281, E1275-85.
- Carneiro, E. M., M. Q. Latorraca, E. Araujo, M. Beltrá, M. J. Oliveras, M. Navarro, G. Berná, F. J. Bedoya, L. A. Velloso, B. Soria & F. Martín (2009) Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *J Nutr Biochem*, 20, 503-11.
- Chen, W. Q., H. Jin, M. Nguyen, J. Carr, Y. J. Lee, C. C. Hsu, M. D. Faiman, J. V. Schloss & J. Y. Wu (2001) Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. *J Neurosci Res*, 66, 612-9.
- Cherif, H., B. Reusens, S. Dahri & C. Remacle (2001) A protein-restricted diet during pregnancy alters in vitro insulin secretion from islets of fetal Wistar rats. *J Nutr*, 131, 1555-9.

- Cintra, D. E., J. R. Pauli, E. P. Araújo, J. C. Moraes, C. T. de Souza, M. Milanski, J. Morari, A. Gambero, M. J. Saad & L. A. Velloso (2008) Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol*, 48, 628-37.
- Colivicchi, M. A., L. Raimondi, L. Bianchi, K. F. Tipton, R. Pirisino & L. Della Corte (2004) Taurine prevents streptozotocin impairment of hormone-stimulated glucose uptake in rat adipocytes. *Eur J Pharmacol*, 495, 209-15.
- Cnop M., Welsh N., Jonas J.C., Jörns A., Lenzen S., Eizirik D.L. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*. 2005 Dec;54 Suppl 2:S97-107. Review.
- da Silva, P. M., C. C. Zoppi, E. Filiputti, L. R. Silveira, I. Quesada, A. C. Boschero & E. M. Carneiro (2010) Preliminary report: leucine supplementation enhances glutamate dehydrogenase expression and restores glucose-induced insulin secretion in protein-malnourished rats. *Metabolism*, 59, 911-3.
- Davalli, A. M., E. Biancardi, A. Pollo, C. Socci, A. E. Pontiroli, G. Pozza, F. Clementi, E. Sher & E. Carbone (1996) Dihydropyridine-sensitive and -insensitive voltage-operated calcium channels participate in the control of glucose-induced insulin release from human pancreatic beta cells. *J Endocrinol*, 150, 195-203.
- de Oliveira, C. A., M. Q. Latorraca, M. A. de Mello & E. M. Carneiro (2011) Mechanisms of insulin secretion in malnutrition: modulation by amino acids in rodent models. *Amino Acids*, 40, 1027-34.
- De Souza, C. T., E. P. Araujo, S. Bordin, R. Ashimine, R. L. Zollner, A. C. Boschero, M. J. Saad & L. A. Velloso (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, 146, 4192-9.
- De Souza, C. T., E. P. Araújo, L. F. Stoppiglia, J. R. Pauli, E. Ropelle, S. A. Rocco, R. M. Marin, K. G. Franchini, J. B. Carnevali, M. J. Saad, A. C. Boschero, E. M. Carneiro & L. A. Velloso (2007) Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *FASEB J*, 21, 1153-63.
- Delghingaro-Augusto, V., F. Ferreira, S. Bordin, M. E. do Amaral, M. H. Toyama, A. C. Boschero & E. M. Carneiro (2004) A low protein diet alters gene expression in rat pancreatic islets. *J Nutr*, 134, 321-7.
- Eliasson, L., F. Abdulkader, M. Braun, J. Galvanovskis, M. B. Hoppa & P. Rorsman (2008) Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol*, 586, 3313-24.
- Ertel, E. A., K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien & W. A. Catterall (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25, 533-5.
- Escrivá, F., C. Rodríguez, J. Cacho, C. Alvarez, B. Portha & A. M. Pascual-Leone (1992) Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am J Physiol*, 263, E1-7.
- Fasshauer, D. & M. Margittai (2004) A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *J Biol Chem*, 279, 7613-21.
- Ferreira, F., H. C. Barbosa, L. F. Stoppiglia, V. Delghingaro-Augusto, E. A. Pereira, A. C. Boschero & E. M. Carneiro (2004) Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA α expression. *J Nutr*, 134, 63-7.
- Ferreira, F., E. Filiputti, V. C. Arantes, L. F. Stoppiglia, E. P. Araújo, V. Delghingaro-Augusto, M. Q. Latorraca, M. H. Toyama, A. C. Boschero & E. M. Carneiro (2003) Decreased

- cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase calpha expression. *J Nutr*, 133, 695-9.
- Filiputti, E., F. Ferreira, K. L. Souza, L. F. Stoppiglia, V. C. Arantes, A. C. Boschero & E. M. Carneiro (2008) Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. *Life Sci*, 82, 542-8.
- Filiputti, E., A. Rafacho, E. P. Araújo, L. R. Silveira, A. Trevisan, T. M. Batista, R. Curi, L. A. Velloso, I. Quesada, A. C. Boschero & E. M. Carneiro (2010) Augmentation of insulin secretion by leucine supplementation in malnourished rats: possible involvement of the phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/mammalian target protein of rapamycin pathway. *Metabolism*, 59, 635-44.
- Franconi, F., F. Bennardini, A. Mattana, M. Miceli, M. Ciuti, M. Mian, A. Gironi, R. Anichini & G. Seghieri (1995) Plasma and platelet taurine are reduced in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus: effects of taurine supplementation. *Am J Clin Nutr*, 61, 1115-9.
- Franconi, F., M. A. Di Leo, F. Bennardini & G. Ghirlanda (2004) Is taurine beneficial in reducing risk factors for diabetes mellitus? *Neurochem Res*, 29, 143-50.
- Gao, R., J. Ustinov, M. A. Pulkkinen, K. Lundin, O. Korsgren & T. Otonkoski (2003) Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes*, 52, 2007-15.
- Gauthier, B. R. & C. B. Wollheim (2008) Synaptotagmins bind calcium to release insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, E1279-86.
- Gavete, M. L., M. A. Martín, C. Alvarez & F. Escrivá (2005) Maternal food restriction enhances insulin-induced GLUT-4 translocation and insulin signaling pathway in skeletal muscle from suckling rats. *Endocrinology*, 146, 3368-78.
- Gilon, P. & J. C. Henquin (2001) Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev*, 22, 565-604.
- Giozzet, V. A., A. Rafacho, A. C. Boschero, E. M. Carneiro & J. R. Bosqueiro (2008) Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment in rats. *Metabolism*, 57, 617-24.
- Gribble, F. M. & F. Reimann (2002) Pharmacological modulation of K(ATP) channels. *Biochem Soc Trans*, 30, 333-9.
- Hiriart, M. & L. Aguilar-Bryan (2008) Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, E1298-306.
- Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev*. 1992 Jan;72(1):101-63. Review. No abstract available.
- Inagaki, N., T. Gonoi, J. P. Clement, N. Namba, J. Inazawa, G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan, S. Seino & J. Bryan (1995) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 270, 1166-70.
- Iwashima, Y., A. Abiko, F. Ushikubi, A. Hata, K. Kaku, H. Sano & M. Eto (2001) Downregulation of the voltage-dependent calcium channel (VDCC) beta-subunit mRNAs in pancreatic islets of type 2 diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 280, 923-32.
- Jing, X., D. Q. Li, C. S. Olofsson, A. Salehi, V. V. Surve, J. Caballero, R. Ivarsson, I. Lundquist, A. Pereverzev, T. Schneider, P. Rorsman & E. Renström (2005) CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest*, 115, 146-54.

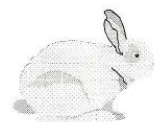
- Johnson, R. D., P. L. Oliver & K. E. Davies (2008) SNARE proteins and schizophrenia: linking synaptic and neurodevelopmental hypotheses. *Acta Biochim Pol*, 55, 619-28.
- Juntti-Berggren, L., O. Larsson, P. Rorsman, C. Ammälä, K. Bokvist, K. Wåhlander, P. Nicotera, J. Dypbukt, S. Orrenius & A. Hallberg (1993) Increased activity of L-type Ca²⁺ channels exposed to serum from patients with type I diabetes. *Science*, 261, 86-90.
- Kulakowski, E. C. & J. Maturo (1984) Hypoglycemic properties of taurine: not mediated by enhanced insulin release. *Biochem Pharmacol*, 33, 2835-8.
- Lalli, C. A., J. R. Pauli, P. O. Prada, D. E. Cintra, E. R. Ropelle, L. A. Velloso & M. J. Saad (2008) Statin modulates insulin signaling and insulin resistance in liver and muscle of rats fed a high-fat diet. *Metabolism*, 57, 57-65.
- Latorraca, M. Q., E. M. Carneiro, M. A. Mello & A. C. Boschero (1999) Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with a diminished calcium uptake. *J Nutr Biochem*, 10, 37-43.
- Li, C., H. Najafi, Y. Daikhin, I. B. Nissim, H. W. Collins, M. Yudkoff, F. M. Matschinsky & C. A. Stanley (2003) Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. *J Biol Chem*, 278, 2853-8.
- Lim, J. G., H. Y. Lee, J. E. Yun, S. P. Kim, J. W. Park, S. I. Suh, B. C. Jang, C. H. Cho, J. H. Bae, S. S. Kim, J. Han, M. J. Park & D. K. Song (2004) Taurine block of cloned ATP-sensitive K⁺ channels with different sulfonylurea receptor subunits expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Pharmacol*, 68, 901-10.
- Lochhead P.A., Coghlan M., Rice S.Q., Sutherland C. Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Diabetes*. 2001 May;50(5):937-46.
- Loizzo, A., S. Carta, F. Bennardini, R. Coinu, S. Loizzo, I. Guarino, G. Seghieri, G. Ghirlanda & F. Franconi (2007) Neonatal taurine administration modifies metabolic programming in male mice. *Early Hum Dev*, 83, 693-6.
- McClenaghan, N. H. (2007) Physiological regulation of the pancreatic {beta}-cell: functional insights for understanding and therapy of diabetes. *Exp Physiol*, 92, 481-96.
- Moritz, W., C. A. Leech, J. Ferrer & J. F. Habener (2001) Regulated expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*, 142, 129-38.
- Nakajima, Y., M. Okamoto, H. Nishimura, K. Obata, H. Kitano, M. Sugita & T. Matsuyama (2001) Neuronal expression of mint1 and mint2, novel multimodular proteins, in adult murine brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 92, 27-42.
- Nakaya, Y., A. Minami, N. Harada, S. Sakamoto, Y. Niwa & M. Ohnaka (2000) Taurine improves insulin sensitivity in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*, 71, 54-8.
- Nardelli, T. R., R. A. Ribeiro, S. L. Balbo, E. C. Vanzela, E. M. Carneiro, A. C. Boschero & M. L. Bonfleur (2011) Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. *Amino Acids*, 41, 901-8.
- Nesher, R., E. Anteby, M. Yedovizky, N. Warwar, N. Kaiser & E. Cerasi (2002) Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. *Diabetes*, 51 Suppl 1, S68-73.
- Ohta, M., J. Nelson, D. Nelson, M. D. Meglasson & M. Erecińska (1993) Effect of Ca⁺⁺ channel blockers on energy level and stimulated insulin secretion in isolated rat islets of Langerhans. *J Pharmacol Exp Ther*, 264, 35-40.

- Ostenson C.G., Gaisano H., Sheu L., Tibell A., Bartfai T. Impaired gene and protein expression of exocytotic soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor complex proteins in pancreatic islets of type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2006 Feb;55(2):435-40.
- Palmi, M., G. T. Youmbi, F. Fusi, G. P. Sgaragli, H. B. Dixon, M. Frosini & K. F. Tipton (1999) Potentiation of mitochondrial Ca^{2+} sequestration by taurine. *Biochem Pharmacol*, 58, 1123-31.
- Park, E. J., J. H. Bae, S. Y. Kim, J. G. Lim, W. K. Baek, T. K. Kwon, S. I. Suh, J. W. Park, I. K. Lee, F. M. Ashcroft & D. K. Song (2004) Inhibition of ATP-sensitive K^{+} channels by taurine through a benzamido-binding site on sulfonylurea receptor 1. *Biochem Pharmacol*, 67, 1089-96.
- Park, S. H., S. Ramachandran, S. H. Kwon, S. D. Cha, E. W. Seo, I. Bae, C. Cho & D. K. Song (2008) Upregulation of ATP-sensitive potassium channels for estrogen-mediated cell proliferation in human uterine leiomyoma cells. *Gynecol Endocrinol*, 24, 250-6.
- Peng, Z., Z. Xiaolei, H. Al-Sanaban, X. Chengrui & Y. Shengyi (2012) Ghrelin inhibits insulin release by regulating the expression of inwardly rectifying potassium channel 6.2 in islets. *Am J Med Sci*, 343, 215-9.
- Quayle, J. M., M. T. Nelson & N. B. Standen (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev*, 77, 1165-232.
- Rasschaert, J., B. Reusens, S. Dahri, A. Sener, C. Remacle, J. J. Hoet & W. J. Malaisse (1995) Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. *Endocrinology*, 136, 2631-4.
- Reis, M. A., E. M. Carneiro, M. A. Mello, A. C. Boschero, M. J. Saad & L. A. Velloso (1997) Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein-deficient rats. *J Nutr*, 127, 403-10.
- Ribeiro, R. A., M. L. Bonfleur, A. G. Amaral, E. C. Vanzela, S. A. Rocco, A. C. Boschero & E. M. Carneiro (2009) Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes Metab Res Rev*, 25, 370-9.
- Ribeiro, R. A., J. C. Santos-Silva, J. F. Vettorazzi, B. B. Cotrim, D. D. Mobiolli, A. C. Boschero & E. M. Carneiro (2012) Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic β -cells. *Amino Acids*, 43, 1791-801.
- Ribeiro, R. A., E. C. Vanzela, C. A. Oliveira, M. L. Bonfleur, A. C. Boschero & E. M. Carneiro (2010) Taurine supplementation: involvement of cholinergic/phospholipase C and protein kinase A pathways in potentiation of insulin secretion and Ca^{2+} handling in mouse pancreatic islets. *Br J Nutr*, 104, 1148-55.
- Rorsman, P. & M. Braun (2012) Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. *Annu Rev Physiol*.
- Satoh, H. (1998) Inhibition by taurine of the inwardly rectifying K^{+} current in guinea pig ventricular cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol*, 346, 309-13.
- Schulla, V., E. Renström, R. Feil, S. Feil, I. Franklin, A. Gjinovci, X. J. Jing, D. Laux, I. Lundquist, M. A. Magnuson, S. Obermüller, C. S. Olofsson, A. Salehi, A. Wendt, N. Klugbauer, C. B. Wollheim, P. Rorsman & F. Hofmann (2003) Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} channel null mice. *EMBO J*, 22, 3844-54.
- Smith, A. J., C. J. Partridge, A. Asipu, L. A. Mair, M. Hunter & A. Sivaprasadarao (2006) Increased ATP-sensitive K^{+} channel expression during acute glucose deprivation. *Biochem Biophys Res Commun*, 348, 1123-31.

- Straub, S. G. & G. W. Sharp (2002) Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev*, 18, 451-63.
- Südhof, T. C. & J. E. Rothman (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, 323, 474-7.
- Tappaz, M. L. (2004) Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochem Res*, 29, 83-96.
- Thorens B. Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes Metab*. 2011 Oct;13 Suppl 1:82-8. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01453.x. Review.
- Tokuyama, Y., Z. Fan, H. Furuta, J. C. Makielski, K. S. Polonsky, G. I. Bell & H. Yano (1996) Rat inwardly rectifying potassium channel Kir6.2: cloning electrophysiological characterization, and decreased expression in pancreatic islets of male Zucker diabetic fatty rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 220, 532-8.
- Tricarico, D., M. Barbieri & D. C. Camerino (2000) Taurine blocks ATP-sensitive potassium channels of rat skeletal muscle fibres interfering with the sulphonylurea receptor. *Br J Pharmacol*, 130, 827-34.
- Trus, M., R. F. Corkey, R. Nesher, A. M. Richard, J. T. Deeney, B. E. Corkey & D. Atlas (2007) The L-type voltage-gated Ca²⁺ channel is the Ca²⁺ sensor protein of stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *Biochemistry*, 46, 14461-7.
- Tsuboyama-Kasaoka, N., C. Shozawa, K. Sano, Y. Kamei, S. Kasaoka, Y. Hosokawa & O. Ezaki (2006) Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity. *Endocrinology*, 147, 3276-84.
- Um, S. H., F. Frigerio, M. Watanabe, F. Picard, M. Joaquin, M. Sticker, S. Fumagalli, P. R. Allegrini, S. C. Kozma, J. Auwerx & G. Thomas (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 431, 200-5.
- Wang, L., A. Bhattacharjee, Z. Zuo, F. Hu, R. E. Honkanen, P. O. Berggren & M. Li (1999) A low voltage-activated Ca²⁺ current mediates cytokine-induced pancreatic beta-cell death. *Endocrinology*, 140, 1200-4.
- Wang, W. J., K. Inoue, H. Hayashi, T. Aung, T. Tun, Y. J. Gu, H. Kaji, Y. Echigo, M. Kato, R. Doi, H. Setoyama, Y. Kawakami, M. Imamura, S. Maetani, N. Morikawa, H. Iwata, Y. Ikada & J. I. Miyazaki (1996) Efficacy of microencapsulation of a pancreatic B-cell line (MIN6) in an agarose/PSSa microbead as a bioartificial pancreas. *Transplant Proc*, 28, 1094-6.
- Winzell, M. S. & B. Ahrén (2004) The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 53 Suppl 3, S215-9.
- Wiser, O., M. Trus, A. Hernández, E. Renström, S. Barg, P. Rorsman & D. Atlas (1999) The voltage sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 248-53.
- Xiao, C., A. Giacca & G. F. Lewis (2008) Oral taurine but not N-acetylcysteine ameliorates NEFA-induced impairment in insulin sensitivity and beta cell function in obese and overweight, non-diabetic men. *Diabetologia*, 51, 139-46.
- Yadav A., Kataria M.A., Saini V., Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta*. 2013 Feb 18;417:80-4. doi: 10.1016/j.cca.2012.12.007. Epub 2012 Dec 22.

- Yang, S. N. & P. O. Berggren (2006) The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev*, 27, 621-76.
- Yang, T. & H. M. Colecraft (2012) Regulation of voltage-dependent calcium channels by RGK proteins. *Biochim Biophys Acta*.
- Zamponi, G. W. & K. P. Currie (2012) Regulation of Ca(V)₂ calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta*.
- Zhao, N. Q., Y. R. Yu, H. W. Tan, G. Deng & X. X. Zhang (2008) [Role of apoptosis and mitochondrial apoptotic pathway in glucolipotoxicity-induced islet beta-cell dysfunction]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 28, 2009-13.
- Zraika, S., M. E. Dunlop, J. Proietto & S. Andrikopoulos (2004) Elevated SNAP-25 is associated with fatty acid-induced impairment of mouse islet function. *Biochem Biophys Res Commun*, 317, 472-7.

Anexos



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2234-1, sobre "Caracterização molecular e funcional dos canais de K⁺ e Ca²⁺ envolvidos no acoplamento estímulo/secreção da insulina em ilhotas de camundongos desnutridos e alimentados com dieta hiperlipídica", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro / Jean Francisco Vettorazzi, 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 no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 13 de setembro de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2234-1, entitled "Molecular and functional characterization of the K⁺ and Ca²⁺ channels involved in β -cell stimulus/secretion coupling in isolated islets from malnourished mice submitted to a high fat 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 September 13, 2010.

Campinas, 13 de setembro de 2010.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Fátima Alonso
Secretária Executiva

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