

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

*Expressão gênica das junções intercelulares em ilhotas pancreáticas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica*

Ana Flávia Marçal Pessoa

Cuiabá-MT  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

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

*Expressão gênica das junções intercelulares em ilhotas pancreáticas de ratas  
prenhes submetidas à restrição protéica*

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

**Orientanda:** Ana Flávia Marçal Pessoa  
**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Queiroz Latorraca  
**Co-Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Cristina Arantes

Cuiabá-MT  
2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

P475e Pessoa, Ana Flávia Marçal  
Expressão gênica das junções intercelulares em ilhotas pancreáticas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica / Ana Flávia Marçal Pessoa. – 2009.  
59f. : il. ; color. ; 30 cm.

“Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Queiroz Latorraca”.

“Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Cristina Arantes”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Ciências Médicas, Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2009.

Bibliografia: f. 49-59.

1. Ilhotas pancreáticas. 2. Ilhotas pancreáticas – Expressão gênica. 3. Pâncreas – Patologia. 4. Restrição protéica – Ratas prenhes. I. Título.

CDU – 616.379

Ficha elaborada por: Rosângela Aparecida Vicente Söhn –  
CRB-1/931

**TUDO** tem o seu tempo determinado, é há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir, tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.

**ECLESIASTE 3:1-8**

**DEDICO:**

**Ao meu filho e companheiro**

**Pedro.**

**AGRADECIMENTOS**

---

A grande **Força do Universo**, por mais uma conquista.

A Profa. Dra. **Márcia Queiroz Latorraca**, pela dedicação, confiança, orientação e paciência a mim dispensada, minha terna gratidão e lágrimas de felicidades, pela realização de mais um sonho e início de muitos outros.

A Profa. Dra. **Vanessa Cristina Arantes**, pela co-orientação, me ensinando a confiar mais em mim e me auxiliando sempre que necessitei. Muito grata.

A Profa. Dra. **Marise Auxiliadora de Barros Reis**, Profa. Dra. **Maria Helena G. G. da Silva** e Prof. Dr. **Roberto V. Veloso**, pelo auxílio em minhas pesquisas.

À Profa Dra **Silvana Bordin** por aceitar participar da minha banca de defesa.

Ao Prof. Dr. **Amilcar Sabino Damazio** e Profa. Dra. **Maria Salete F. Martins**, pela imensa contribuição à minha banca de qualificação, grata pelo carinho e amizade.

Aos Prof. Dr. **Antonio Carlos Boschero** e Prof. Dr. **Everardo Carneiro**, do UNICAMP, pela acolhida sempre que necessária ao suporte material e técnico as minhas pesquisas.

Aos Prof. Dr. **Cor Jésus Fernandes Fontes** e Profa. Dra. **Rosane Christine Hahn**, do Laboratório de Investigação Médica - UFMT, pela finalização de minhas pesquisas em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. **Luciano Nakazato**, do Laboratório de Biologia Molecular Veterinária, e seus alunos **Dhafine** e **João**, por permitir o acesso ao laboratório e a realização de parte dos meus experimentos.

A Profa.Dra. **Nair Honda Kawashita**, do Laboratório de Bioquímica Pesquisa, por contribuir com parte da realização dos meus experimentos.

Ao Dr. **Alex Rafacho** e Dr. **Luiz Fernando**, pela prontidão no compartilhamento de suas experiências, possibilitando a realização dos meus experimentos.

Ao Prof. Dr. **Fabrizio Stoppiglia**, pela amizade, carinho, respeito e disposição em me ajudar mesmo aos sábados à tarde. Minha eterna amizade e carinho.

A Prof. Dra. **Carmem Lúcia Bassi**, pela ajuda em meus experimentos finais. Por suas experientes palavras de carinho, ânimo, amizade e pela acolhida em seu laboratório. Minha eterna gratidão e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Histologia, Profa. **Mestre Aloísia, Jô** e **Denésio**, pelo carinho com que me acolheram em seu laboratório.

A minha mãe, **Soleida**, palavras seriam incapazes de descrever o quanto sou grata por sua presença na minha vida, ainda mais nessa etapa que se acaba e na nova que nos aguarda, **Te Amo**.

Ao meu irmão, **Gustavo**, apesar da distância você sempre me escutou e pensou, pensou, pensou em suas palavras de apoio. **Te Amo**.

Ao meu pai, **Francisco**, minha irmã **Natalia** e “boadrasta” **Madalena**, pelo apoio incondicional de família.

Aos meus primos, **Renato** e **Márcia**, sendo meus eternos cúmplices, em minhas alegrias, amores, lágrimas. **Amo Vocês**.

A toda família **Marçal**, pelo amor, carinho e apoio mesmo a distância.

Aos meus amigos **Edilayne** e **Wilmondes**, apesar da distância, isso não impediu de rir, chorar, confidenciar, brigar, reclamar, grata pela verdadeira amizade.

Às minhas amigas e irmãs, **Cristiane Celina**, **Vânia** e **Vaninha**, pela verdadeira amizade, carinho e aconselhamento espiritual.

À minha amiga, **Naiana**, tempo é apenas o nome dado para designar um período ou época, pelo pouco tempo de amizade sou muito grata por fazer parte da minha conquista, tornando-a mais agradável com seus conselhos, ouvidos e verdades.

Ao meu amigo, **Leonardo Marin**, pelas discussões acadêmicas, confiança e amizade incondicional.

À **Suzanny**, **Juliane**, **Katherine**, **Maristela** e **Samantha**, pela amizade conquistada, troca de experiência, além das risadas e brincadeiras, tornando esse final mais sorridente.

Aos meus **alunos** e **ex-alunos**, pela torcida e força.

Aos colegas do Laboratório de Avaliação Biológica dos Alimentos, **Cristiana**, **Letícia**, **Sílvia**, **Tallita**, **Faena**, **Barbara** e **Rafaela**, minha gratidão pela troca de experiências e ajuda nesse tempo de convívio.



Aos técnicos do LABA , Laboratório de Investigação Médica e funcionários da UFMT, **Celso, Walter, Nilson e Dona Iraci** , sem vocês essa conquista não seria possível.

A **todos** que de alguma formam contribuíram para essa conquista, muito grata.

As **ilhotas pancreáticas** por fazerem do seu mundo um eterno campo de pesquisas.

À Universidade Federal de Mato Grosso – **UFMT**.

A **CAPES** e **FAPEMAT** pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

## SUMÁRIO

---

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo Geral .....	26
3.2 Objetivos Específicos .....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
4.1 Animais.....	28
4.2 Composição das dietas.....	28
4.3 Procedimentos experimentais .....	29
4.4 Isolamento de ilhotas pancreáticas e secreção estática de insulina .....	30
4.5 Western blotting .....	30
4.5.1 Immunoblotting .....	30
4.5.2 Imunoprecipitado.....	31
4.6 <i>RT</i> -PCR .....	32
4.6.1 Extração do RNA de Ilhotas Pancreáticas.....	32
4.6.2 Análise da Integridade do RNA.....	33
4.6.3 Análise por <i>RT</i> - PCR semiquantitativo .....	34
4.7 Determinação Bioquímica e Hormonal .....	35
4.7.1 Glicose.....	35
4.7.2 Insulina .....	36
4.8 Análise Estatística .....	37
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>

<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela1-Composição das dietas controle e hipoprotéica (g/kg).....	29
Tabela2- Lista de oligonucleotídeos utilizados.....	34
Tabela 3- Indicadores nutricional, bioquímico e hormonal de ratas prenhes e não prenhes que consumiram dieta controle (CNP e CP) e hipoprotéica (HPNP e HPP). .....	39

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Diagrama esquemático descrevendo as junções intercelulares.....	18
Figura 2. Modelo topográfico para as Conexinas (Cx).....	18
Figura 3. Representação gráfica da organização celular e molecular das Junções intercelulares.....	21
Figura 4. Demonstração da integridade do RNA extraído das ilhotas pancreáticas dos diferentes grupos experimentais: (CNP) Controle Não Prenhe, (CP) Controle Prenhe, (HPNP) Hipoprotéico Não Prenhe e (HPP) Hipoprotéico Prenhe.....	33
Figura 5. Secreção de insulina estimulada por glicose por ilhotas pancreáticas de ratas (CNP) Controle Não Prenhe, (CP) Controle Prenhe, (HPNP) Hipoprotéico Não Prenhe e (HPP) Hipoprotéico Prenhe.....	40
Figura 6. Expressão protéica e do RNAm da Cx36 em ilhotas de ratas (CNP) Controle Não Prenhe, (CP) Controle Prenhe, (HPNP) Hipoprotéico Não Prenhe e (HPP) Hipoprotéico Prenhe.....	41
Figura 7. Expressão protéica e do RNAm da Cx43 em ilhotas de ratas (CNP) Controle Não Prenhe, (CP) Controle Prenhe, (HPNP) Hipoprotéico Não Prenhe e (HPP) Hipoprotéico Prenhe.....	43
Figura 8. Expressão protéica e do RNAm da $\beta$ -catenina em ilhotas de ratas (CNP) Controle Não Prenhe, (CP) Controle Prenhe, (HPNP) Hipoprotéico Não Prenhe e (HPP) Hipoprotéico Prenhe.....	44
Figura 9. Expressão do RNAm da $\beta$ -actina em ilhotas de ratas (CNP) Controle Não Prenhe, (CP) Controle Prenhe, (HPNP) Hipoprotéico Não Prenhe e (HPP) Hipoprotéico Prenhe.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ANOVA	Análise de Variância
BSA	Soro de Albumina Bovina
cDNA	DNA complementar
CNP	Controle Não Prenhe
CP	Controle Prenhe
Cx	Conexina
Cx36	Conexina 36
Cx43	Conexina 43
Cx43 serina <sup>279/282</sup> fosforilada	Conexina 43 fosforilada nos resíduos das serina <sup>279</sup> e serina <sup>282</sup>
Cxs	Conexinas
DEPC	Dimetil pirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
g	gravidade
h	hora
HPNP	Hipoprotéico Não Prenhe
HPP	Hipoprotéico Prenhe
kDa	Quilodalton
L	litro
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
NaCl	Cloreto de sódio
nm	nanômetro
°C	graus Celsius
PKC	Proteína Quinase C

pmol	picomol
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
pS	Picosiemens
RNAm	RNA mensageiro
<i>RT</i> -PCR	Transcrição Reversa - Reação de Cadeia da Polimerase
s	segundos
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil suldato
Src	Proteína oncogênica quinase
Tris	Tri (hidroximetil)-aminometano
$\gamma$	Gama
$\mu$ L	microlitro
$\alpha$ -Actina	Alfa-Actina
$\alpha$	Alfa
$\beta$ -Catenina	Beta-Catenina
$\beta$	Beta

### ABSTRACT

Low protein diet and pregnancy are conditions commonly associated to antagonistic changes in insulin secretion.  $\beta$ -cell gap junctions are required for the fine regulation of the insulin secretion and adherens junctions and its associated proteins have the crucial role for the formation, function and structural maintenance of gap junctions. It has been showed that pregnancy increase gap junctional between beta-cells and protein restriction during pregnancy reduces adherens junctions-associated protein in placental vessel. Thus the aim of this study was to investigate the effect of protein restriction during pregnancy on gene and protein expression of gap and adherens junctions in pancreatic islets. Adult control non-pregnant (CN) and control pregnant (CP) rats were fed a normal-protein diet (17%), whereas low-protein non-pregnant (LPNP) and low protein pregnant (LPP) rats were fed a low-protein diet (6%) for 15 d. Islets were isolated for the measurement of insulin secretion, the content of Cx36, Cx43, phospho-[Ser<sup>279/282</sup>]-Cx43 and  $\beta$ -catenin by immunoblotting. The expressions of the genes of gap and adherens junctions, and  $\beta$ -actin were evaluated by *RT-PCR*. Low protein diet reduced the Cx36 and  $\beta$ -catenin protein content in pancreatic islets. Pregnancy was effective in decreasing Cx36,  $\beta$ -catenin and  $\beta$ -actin transcripts and protein contents of Cx36,  $\beta$ -catenin as well as in increasing phospho-[Ser<sup>279/282</sup>]-Cx43 in control islets, but did not alter these genes and proteins expressions in the low protein islets. Insulin secretion was higher in pregnant than in non-pregnant rats, independently of nutritional status. Short term protein restriction during pregnancy did not promote the expected alterations in the gene and protein expression of the gap and adherens junctions in pancreatic islets.



---

**RESUMO**

A restrição protéica e a prenhez são condições comumente associadas a alterações antagônicas na secreção de insulina. As junções comunicantes das células  $\beta$  são requeridas para uma regulação precisa da secreção de insulina e as junções aderentes e suas proteínas associadas têm uma importância crucial para formação, manutenção estrutural e função das junções comunicante. Têm-se mostrado que a prenhez aumenta os acoplamentos das células  $\beta$  por meio das junções comunicantes e a restrição protéica durante a prenhez reduz o conteúdo de proteínas associadas às junções aderentes nos vasos placentários. O objetivo do estudo foi investigar os efeitos da restrição protéica durante a prenhez sobre a expressão gênica e protéica das junções comunicantes e aderentes em ilhotas pancreáticas. Ratas dos grupos controle não prenhe (CNP) e controle prenhe (CP) foram alimentadas com uma dieta normoprotéica (17% de proteína), enquanto ratas dos grupos hipoprotéico não prenhe (HPNP) e hipoprotéico prenhe (HPP) foram alimentadas com dieta hipoprotéica (6% de proteína) por 15 dias. As ilhotas foram isoladas para medida da secreção de insulina, do conteúdo protéico das conexinas 36, 43, 43 fosforilada em resíduos de serina<sup>279/282</sup> e  $\beta$ -catenina por *immunoblotting*, e da expressão gênica das junções comunicantes, aderentes e da  $\beta$ -actina por *RT-PCR* semiquantitativa. A dieta hipoprotéica reduziu o conteúdo protéico da Cx36 e  $\beta$ -catenina em ilhotas pancreáticas. A prenhez diminuiu a transcrição Cx36,  $\beta$ -catenina e  $\beta$ -actina e o conteúdo protéico das Cx36 e  $\beta$ -catenina, assim como aumentou o conteúdo protéico de Cx43 fosforilada em resíduos de serina<sup>279/282</sup> das ilhotas controle, mas não alterou a expressão gênica nem protéica das ilhotas mantidas com dieta hipoprotéica. A secreção de insulina foi maior em ratas prenhes do que nas não prenhes, independente do estado nutricional. A restrição protéica a curto prazo, durante a prenhez, não promoveu as alterações esperadas na expressão de genes e proteínas das junções comunicantes e aderentes em ilhotas pancreáticas.

# INTRODUÇÃO

---

## 1.0 INTRODUÇÃO

A secreção normal de insulina requer o funcionamento coordenado das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas. Essa coordenação depende de uma rede de comunicação que envolve a interação das células com sinais extracelulares e com células vizinhas. Assim, as interações celulares mediadas por receptores de superfície, adesões celulares e moléculas de superfície regulam o funcionamento dessas células (1,2).

Como outros tipos de células, as células  $\beta$  aderem intimamente às células vizinhas por meio de uma variedade de proteínas de superfície celular (3). Essas proteínas interagem seletivamente em domínios restritos da membrana celular e formam as junções intercelulares (4).

As junções celulares compreendem as junções ou canais comunicantes, junções aderentes e junções oclusivas. A função das junções celulares é manter a adesão entre as células, garantir funcionamento adequado das junções aderentes e junções oclusivas, assim como a homeostasia celular, pelas trocas de metabólito e íons entre as células através junções comunicantes (4,5).

As junções comunicantes ou canais intercelulares estão presentes em praticamente todos os organismos dos vertebrados (6), interligando as membranas plasmáticas de duas células para formar um canal único, onde cada célula contribui com metade do canal chamado de hemicanal ou conexon. A interação entre dois conexons no espaço extracelular formam as junções comunicantes, permitindo a comunicação direta entre os citoplasmas das células. Cada conexon é formado pela oligomerização de seis subunidades de proteínas estruturais denominadas conexina(s) Cx(s) (7,8). Este arranjo estrutural caracteriza os tipos de conexons, que são classificados como homoméricos, quando formados por um único tipo de Cx, ou heteroméricos, quando contêm mais de um tipo de Cx (8,9,10). A acoplagem de dois conexons homoméricos compostos das mesmas proteínas produz um canal homotípico, enquanto a oligomerização de dois conexons homoméricos e compostos de diferentes tipos de Cxs formam um canal heterotípico. Finalmente, a oligomerização de dois conexons heteroméricos forma um canal heteromérico (8,9,10) (Figura 1).

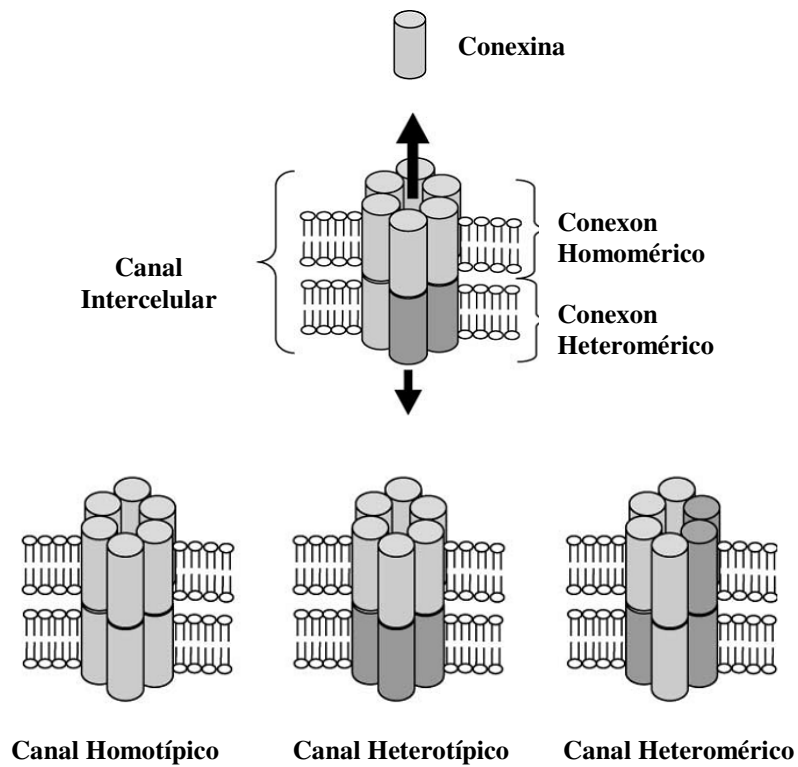


Figura 1. Diagrama esquemático descrevendo as junções intercelulares. Fonte: Houghton *et al.* 2005 (10).

As Cxs são proteínas integrais de membrana, contendo quatro domínios transmembranas, dois extracelulares e três intracelulares. Os domínios intracelulares, que contêm uma alça intracelular e segmentos terminais amino e carboxila, são alvos de modificações translacionais, importantes para a regulação da atividade do canal. Os domínios extracelulares são requeridos para a ancoragem dos conexons (4,6,10,11,12,13,14) (Figura 2).

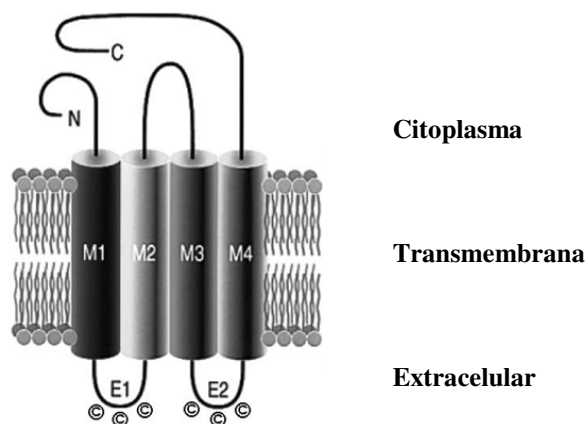


Figura 2. Modelo topográfico para as Cxs. Fonte: Kumar e Gilula, 1996 (6).

Há um grande número de Cx expressas no organismo, algumas de forma mais rara, outras amplamente difundidas em tecidos e linhagens celulares. Até o momento foram caracterizadas 21 Cx em mamíferos incluindo humanos (15,16), sendo as mesmas nomeadas de acordo com a sua massa molecular (17,18).

A Cx36, com peso molecular de 36 kDa, é expressa em várias regiões do sistema nervoso central, na glândula pineal (19,20,21), na retina (22), nas células cromafins das glândulas adrenais (23) e nas ilhotas pancreáticas, preferencialmente nas células  $\beta$  (23,24,25,26,27). As junções comunicantes formadas pela Cx36 são pequenos canais homoméricos que, diferindo das demais isoformas, são bastante permeáveis a pequenas moléculas preferencialmente catiônicas (10/15 pS) (28,29).

Por se tratar da principal isoforma expressa nas células  $\beta$  pancreáticas, a Cx36 é fisiologicamente relevante no processo de secreção de insulina. Estudos realizados *in vivo* com ratos *knock out* para a Cx36 (-/-) e *in vitro* com linhagens de células produtoras de insulina (MIN6 e INS-1E), demonstraram perda na sincronização da secreção de insulina induzida pela glicose e das oscilações de  $Ca^{2+}$ , indicando que a Cx36 controla o fluxo de corrente entre células vizinhas (30,31,32,33). Além disso, ilhotas que não expressam Cx36, exibem aumento da secreção basal de insulina similar aquela observada nos estados pré-diabéticos e nos diabéticos tipo 2, indicando que os sinais dependentes da Cx36 podem ser essenciais para a regulação do controle da secreção de insulina (28,31,34,35).

Estudos *in vitro* têm mostrado que o controle da secreção desempenhado pela Cx36 não é obtido quando a mesma é substituída por outras Cxs (36,37) e que o excesso da Cx36 também tem um efeito deletério sobre a secreção de insulina (36,38,39). Finalmente, estudos têm mostrado que a Cx36 é necessária para a secreção de insulina, possivelmente pelo efeito proeminente sobre a sincronização da função da célula  $\beta$  pancreática (40).

A Cx43, com peso molecular de 43 kDa (38,41), permite a passagem de metabólitos de até 200 pS (42). O miocárdio ventricular é o principal tecido que expressa a Cx43, sendo esta proteína predominantemente localizada no sarcolema (43,44), embora sua presença seja também observada em várias glândulas secretoras endócrinas (45). No pâncreas, a Cx43 se localiza entre os fibroblastos ao redor dos ductos interlobulares e entre as células endoteliais dos vasos nas porções endócrina e exócrina do pâncreas (45,46,47).

Linhagens de células secretoras de insulina que não expressam Cx43, exibem redução do conteúdo de insulina, perda da responsividade às concentrações fisiológicas de glicose e incapacidade de trocar moléculas citoplasmáticas através do acoplamento juncional (38,48). A transfecção dessas células com genes que codificam a Cx43 proporcionou o acoplamento

juncional mediado pela expressão da Cx43 e resultou na modificação da expressão do gene da insulina e do armazenamento da insulina (49). Células que apresentavam um modesto acoplamento juncional e uma expressão de Cx43 similar àquelas observadas em células  $\beta$  nativas tiveram características secretórias significativamente melhoradas (38,50). Esses achados indicam que a expressão adequada da Cx43 e o acoplamento juncional proporcionado pelas mesmas são requeridos para o funcionamento apropriado das células produtoras de insulina (38,48,50,51).

As comunicações intercelulares podem ser reguladas em vários níveis: transcrição, tradução, transporte das Cxs para membrana plasmática onde se reúnem para formar os conexons, reunião dos conexons para formar os canais, abertura/fechamento dos canais funcionais, desacoplamento e degradação das Cxs (52,53).

As Cx podem sofrer vários tipos de modificações pós-traducionais, sendo a fosforilação a modificação mais estudada. Esse evento tem sido observado em pelo menos nove tipos de Cxs, incluindo a Cx43, sendo essencial para o controle apropriado da formação e modulação da função das junções comunicantes. As Cxs podem ser fosforiladas por diferentes tipos de quinases, incluindo Src (proteína quinase oncogênica), PKC (proteína quinase C), MAPK (*mitogen-activated proteins* ou proteínas quinases ativadas por mitógenos), resultando nas modificações pós-traducionais supracitadas (54,55,56).

Outras proteínas de membrana que participam da interação direta entre as células  $\beta$  pancreáticas e parecem contribuir para o controle da secreção de insulina são as caderinas e as cateninas (4,57).

As caderinas fazem parte de uma família de glicoproteínas transmembrana responsáveis pelo importante papel de regulação da adesão e motilidade celular (58,59,60). As caderinas interagem com os componentes citoplasmáticos  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -cateninas que medeiam a ligação aos filamentos de actina do citoesqueleto (61,62,63,64) (Figura 3).

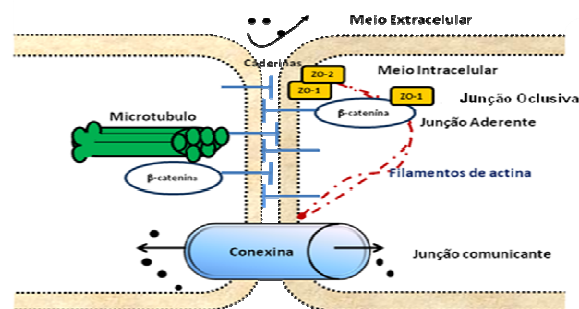


Figura 3. Representação gráfica da organização celular e molecular das junções intercelulares. Adaptado de Giepmans *et al.* 2004(4).

Além da função de formarem as junções aderentes, este complexo caderina/catenina é utilizado para transmitir sinais a células vizinhas através de interações com receptores do fator de crescimento epidermal (65).

Existe uma interdependência entre as junções comunicantes e aderentes, uma vez que a alteração da expressão de proteínas formadoras das junções aderentes, afeta a montagem das junções comunicantes e o acoplamento celular mediado por essa junção (5,66).

Além da importância da junção aderente para a manutenção da estrutura e função das junções comunicantes, estudos também têm indicado a relevância da adesão celular mediada por esta junção intercelular no pâncreas endócrino, para a adequada secreção de insulina (67,68).

Condições que estimulam a secreção de insulina, como a prenhez e o tratamento crônico com prolactina, aumentam a expressão das junções comunicantes e aderentes nas ilhotas pancreáticas (69). O aumento das junções intercelulares tem sido considerado um dos processos adaptativos que garante o suprimento adequado da insulina e conseqüentemente, a manutenção da homeostase glicêmica, condição essencial para o desenvolvimento normal do feto e prevenção do diabetes gestacional (70).

Por outro lado, a deficiência de proteína dietética durante a prenhez altera a integridade dos vasos sanguíneos placentários à custa da redução das junções aderentes (71). É possível que a restrição protéica durante a prenhez modifique as junções célula-célula das ilhotas pancreáticas e contribuam para anormalidades na secreção de insulina.

## **JUSTIFICATIVA**

---



## 2.0 JUSTIFICATIVA

Restrição protéica e gravidez são condições usualmente associadas a alterações antagônicas na secreção de insulina. Na restrição protéica verifica-se baixa secreção de insulina que tem sido atribuída a alterações estruturais e funcionais tais como: redução do tamanho das células  $\beta$  (72), metabolismo da glicose inadequado (73,74), movimentação de cálcio diminuída (75,76) e alterações nas vias da Fosfolipase C (PLC)/Proteína quinase C (PKC) e AMPc/Proteína quinase A (PKA) (77,78). Por outro lado, na gravidez observa-se um aumento da secreção da insulina e redução do limiar da glicose necessário para secreção desse hormônio (79,80), devido, entre outros fatores, ao aumento do metabolismo da glicose e da atividade das vias da PLC e AMPc, (81,82,83,84) bem como da proliferação das células  $\beta$  e volume da ilhotas (85), da síntese de insulina (86) e do acoplamento das junções intercelulares entre as células  $\beta$  (87).

Estudos têm sugerido que as junções comunicantes são requeridas para regulação da biossíntese, estocagem e secreção de insulina, e que as junções aderentes e suas proteínas associadas, são cruciais para a função e manutenção estrutural das junções comunicantes (24,38,39,40). Alterações nas junções comunicantes podem prejudicar a capacidade proliferativa e funcional das ilhotas pancreáticas (87).

A incapacidade das ilhotas maternas em responderem ao aumento da demanda da insulina na gravidez se constitui em ameaça para o bem estar da mãe e do feto. Assim, o presente estudo investigou a expressão de genes e proteínas associadas às junções comunicantes em ilhotas pancreáticas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica. É importante ressaltar que esta é a primeira descrição da expressão desses genes e proteínas no referido modelo experimental.

# OBJETIVO

---

## 3.0 OBJETIVOS

### 3.1 *Objetivo Geral*

Avaliar os efeitos da restrição protéica durante a prenhez sobre a expressão de genes e de proteínas integrantes das junções comunicantes e aderentes, e do citoesqueleto em ilhotas pancreáticas.

### 3.2 *Objetivos Específicos*

- A. Determinar o efeito da restrição protéica sobre o consumo alimentar, ganho de peso e peso final de ratas prenhes.
- B. Determinar o efeito da restrição protéica sobre a glicemia e insulinemia de jejum de ratas prenhes.
- C. Verificar o efeito da restrição protéica sobre a secreção de insulina em resposta à glicose em concentração basal e fisiológica por ilhotas de ratas prenhes.
- D. Determinar a expressão gênica da Cx36, Cx43,  $\beta$ -catenina e  $\beta$ -actina em ilhotas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica.
- E. Quantificar a expressão das proteínas Cx36, Cx43 e  $\beta$ -catenina em ilhotas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Nutrição, juntamente com os laboratórios de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, e Laboratório de Biologia Molecular Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Mato Grosso.

### 4.1 Animais

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

As ratas foram acasaladas com machos adultos da mesma linhagem e a prenhez foi confirmada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. As fêmeas prenhes foram pesadas e separadas aleatoriamente, sendo mantidas do primeiro até o 15º dia de prenhez com dieta isocalórica contendo 6% de proteína (dieta hipoprotéica) ou 17% de proteína (dieta controle).

Quatro grupos de ratas foram usados neste estudo: grupo controle não prenhe (CNP) e controle prenhe (CP), alimentados com dieta controle, e grupo hipoprotéico não prenhe (HPNP) e hipoprotéico prenhe (HPP), alimentados com dieta hipoprotéica. Durante o período experimental, as ratas receberam dieta e água *ad libitum* e foram mantidas sob condições padrão de luminosidade (ciclo de 12 h claro/escuro) e de temperatura a 22°C.

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

### 4.2 Composição das dietas

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

carboidratos, sendo mantidas as devidas proporções de amido, dextrina e sacarose, bem como a de L-cistina, em relação ao teor de caseína e às concentrações dos demais nutrientes, sendo portanto, isocalóricas (3,76 Kcal/g).

Tabela 1: Composição das dietas controle e hipoprotéica (g/kg)<sup>1</sup>

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

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

\*\*\*Composição detalhada dada por Reeves *et al.* 1993(88).

Os ingredientes secos foram pesados em balança analítica marca Marte, modelo A 500, com precisão de 0,01 g, peneirados (malha 200) e homogeneizados. As dietas foram preparadas em quantidade suficiente para todo o estudo, peletizadas e acondicionadas em recipientes de polipropileno, hermeticamente fechados e armazenadas a 5°C.

### 4.3 Procedimentos experimentais

O consumo alimentar e o peso corporal das ratas foram registrados a cada dois dias e a ingestão alimentar absoluta foi calculada pela diferença obtida entre a quantidade de dieta

oferecida e a dieta rejeitada após 48 h. No décimo quinto dia foram realizados todos os procedimentos experimentais.

Todos os experimentos foram dirigidos por princípios de boas práticas de laboratório e procedimentos científicos, seguindo o guia prático do manual de biotério do *International Committee on Laboratory Animals* (ICLA) (COBEA). Em todos os casos, as ratas foram anestesiadas com CO<sub>2</sub>, em seguida decapitadas e o sangue coletado para as determinações bioquímica e hormonal, sendo estocado a -80°C.

#### ***4.4 Isolamento de ilhotas pancreáticas e secreção estática de insulina***

Após a eutanásia por decapitação o pâncreas foi removido e digerido pelo método da colagenase, como descrito por Boschero *et al.* (1995)(89). Grupos de cinco ilhotas foram incubados por 90 min a 37°C em tampão de Krebs-bicarbonato contendo glicose (5,6 e 8,3 mmol/L) equilibrado com uma mistura de 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> para manutenção do pH de 7,4. O meio de incubação continha (mmol/L): NaCl 115, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2,56, MgCl<sub>2</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 24 e albumina bovina (3 g/L). A insulina liberada foi determinada por radioimunoensaio usando insulina de rato como padrão.

#### ***4.5 Western blotting***

##### ***4.5.1 Immunoblotting***

Grupos de 1000 ilhotas foram ressuspensas em 100 µL de tampão de homogeneização contendo inibidor de proteases, anti-fosfatases e triton-X 1% (90,91) e sonicadas, sendo a quantidade total de proteínas determinada pelo método do biureto. Amostras contendo 200 µg de proteína foram incubadas por 1 h a 37°C, em banho, com tampão *Laemlli* 4X concentrado (1mmol/L de fosfato de sódio, pH 7,8, 0,1% azul de bromofenol, 50% glicerol, 10% SDS, 2% mercaptoetanol) (4:1,v/v) e a corrida realizada em gel de poliacrilamida (12%), com voltagem fixa de 120 V por 90 min, em tampão de corrida.

Para Cx36 e β-catenina a eletrotransferência para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) foi feita por 2 h a 120V em tampão contendo Trisma base 25mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,02%. Para a Cx43, o tampão de transferência foi feito sem a adição de

metanol e SDS. Todo o processo de corrida e transferência foram realizadas no gelo. Depois de checada a eficiência da transferência pela coloração da membrana com *Ponceau*, as membranas foram bloqueadas com albumina 5% em TTBS (10 mmol de Tris/L; 150 mmol de NaCl/L; 0,5% Tween 20), *overnight*, sob agitação e a 4°C, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal em três sessões de 10 min, a temperatura ambiente, para incubação dos anticorpos primários.

As Cx36 e 43 fosforilada em resíduos de serina<sup>279/282</sup> (Santa Cruz) e  $\beta$ -catenina (Zymed) foram detectadas nas membranas após 2 h de incubação em temperatura ambiente com anticorpo específico, diluídos 1:500, 1:1000 e 1:1000, respectivamente, em TTBS contendo 3% de albumina. As membranas foram então lavadas, com TTBS, 5 min, por 3 vezes, sob agitação. Em seguida foram incubadas por 1 h e 30 min, com os respectivos anticorpos secundários (Rabbit Anti-Goat IgG HRP – Zymed – 1620, diluições 1:1000 e 1:1500 e Goat Anti-Mouse IgG HRP- Zymed – 816520, diluído 1:3000). As diluições foram feitas em TTBS com 3% de albumina.

A detecção foi feita por quimiluminescência (*SuperSignal West Pico*, Pierce) após incubação com anticorpo secundário (HRP-*horseradish peroxidase-conjugated*). A intensidade das bandas foi determinada por leitura das autoradiografias reveladas, por densitometria ótica, utilizando um scanner (HP 3400) e o programa Scion Image (Scion Corporation). Os dados numéricos obtidos, correspondentes às bandas protéicas foram comparados estatisticamente como descritos posteriormente.

#### 4.5.2 Imunoprecipitado

Para a determinação da Cx43 (Zymed), foi realizado o procedimento de imunoprecipitação das ilhotas. Aproximadamente 1000 ilhotas foram homogeneizadas em tampão de extração para imunoprecipitado contendo Tris-HCl (pH 7,4), 100 mmol/L pirofosfato de sódio, 100 mmol/L fluoreto de sódio, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L ortovanadato de sódio, 2,0 mmol/L PMSF e 0,1 mg aprotinina/mL e homogeneizado durante 20 s, a 4°C utilizando sonicador. Foi adicionado ao homogeneizado, Triton X-100 a 1%, sendo agitado manualmente e armazenado no -80°C. Posteriormente, a quantidade total de proteína foi determinada pelo método do biureto.

Alíquotas com 200  $\mu$ g de proteína foram adicionadas a *ependorfs* juntamente com 10  $\mu$ L de anticorpo primário e 200  $\mu$ L de tampão de imunoprecipitado, para garantir



homogeneização adequada e mantida *overnight* a  $-4^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte foram adicionados às amostras 40  $\mu\text{L}$  de Proteína A *Shepharose 5MB* (GE Healthcare), que foram mantidas em geladeira por 2 h sob agitação constante.

As amostras foram centrifugadas a  $8.000 \times g$  durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os imunocomplexos foram lavados por três vezes com tampão de lavagem contendo ortovanadato de sódio 2 mM, Trisma 100 mM, EDTA 1 mM, Triton 0,5%. O *pellet* foi ressuspenso em 20  $\mu\text{L}$  de *Laemmli* contendo DTT e mantido em banho a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 h. A seguir, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose, conforme descrito anteriormente.

## **4.6 RT-PCR**

### *4.6.1 Extração do RNA de Ilhotas Pancreáticas*

Aproximadamente 1000 ilhotas foram acondicionadas em *eppendorf* contendo 1 mL de Trizol (Gibco), mantidas a temperatura ambiente por 20 min para completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos presentes na solução, e em seguida homogeneizadas no vórtex, por aproximadamente 10 s. Após homogeneização, foram adicionados a cada amostra 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (JT.Baker) e a mesma quantidade de solução salina (0,9%) preparada com água DEPC e autoclavada. Os tubos foram tampados e homogeneizados vigorosamente por 15 s. Após incubação por 2-3 min à temperatura ambiente ( $30^{\circ}\text{C}$ ), as amostras foram centrifugadas por 15 min, a  $4^{\circ}\text{C}$ , a  $12.000 \times g$ . O volume correspondente à fase aquosa foi transferido para outro *eppendorf* e o conteúdo de RNA foi precipitado com 500  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico (JT.Baker). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente ( $30^{\circ}\text{C}$ ) por 10 min, sendo novamente centrifugadas a  $12.000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante removido. Os *pelletes* contendo RNA foram lavados com 500  $\mu\text{L}$  etanol a 75% (JT.Baker) gelado e centrifugado a  $8.500 \times g$  por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  por três vezes. Os *eppendorfs* vertidos para retirada do excesso de etanol e deixados a temperatura ambiente por 10 min para a secagem do *pellet*. As amostras foram ressuspenso em 10  $\mu\text{L}$  de água DEPC, agitadas manualmente e em vórtex e posteriormente aquecidas em banho a  $60^{\circ}\text{C}$  por 10 min e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  a curto prazo ou  $-80^{\circ}\text{C}$  a longo prazo.

#### 4.6.2 Análise da Integridade do RNA

Para a quantificação das amostras, as mesmas foram diluídas e submetidas à leitura em espectrofotômetro (UV – Mini1240 Shimadzu) nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm. Os valores de absorvância a 260 nm foram utilizados para o cálculo da concentração do ácido nucléico. Os valores da relação das absorvâncias a 230/260 e 280/260 nm foram utilizados como indicativos da qualidade do RNA com relação à contaminação com fenol e proteínas, respectivamente. Não foram utilizadas amostras cuja relação 230/260 fosse menor do que 1,9 ou com relação 280/260 menor do que 1,6.

Para analisar a integridade do RNA extraído, utilizou-se gel de agarose a 1,5% (Sigma) diluído em tampão MOPS 10X (0,2 mM MOPS, 0,1 mM acetato de sódio e 0,5 mM EDTA) e 10% de formaldeído (J.T Baker) (Figura 4).

Para a visualização das bandas das subunidades 28S e 18S do RNA total extraído, 2 µg de RNA foram incubadas por 15 min a 56°C, em banho, com tampão contendo: 12% de ácido 3 (N-Morfolino) propanosulfônico (MOPS buffer) 10X, 21% de formaldeído a 37%, 60% formamida, 1 µg/µL de brometo de etídio (USB) e 1 µL de tampão de corrida (40% sacarose, 2,5 mM EDTA e 0,25% de azul de bromofenol).

Após incubação, as amostras foram mantidas em banho de gelo por 5 min e posteriormente aplicadas em gel de agarose. A corrida eletroforética (Power Pac HC- Bio Rad) procedeu-se a 50 V por 1 h, com tampão MOPS 1X. Para a visualização do gel contendo o RNA utilizou-se um transiluminador com luz ultravioleta (LOCUS).

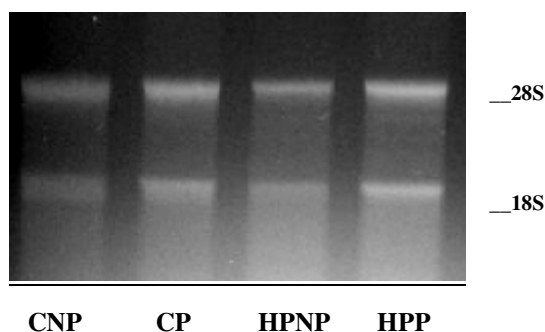


Figura 4. Demonstração da integridade do RNA extraído das ilhotas pancreáticas dos diferentes grupos experimentais: CNP, CP, HPNP e HPP. A integridade do RNA é comprovada pela visualização das bandas das subunidades 18S e 28S.

#### 4.6.3 Análise por RT- PCR semiquantitativo

Amostras de 2 µg de RNA foram submetidas à reação de transcrição reversa, em um volume final de 20 µL. Para isso, foram adicionados: 50% (v/v) PCR buffer 10X (Invitrogen), DNase 1 U (Invitrogen), água DEPC q.s.p 10 µL e posteriormente, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min em termociclador (Matercyclcer Personal - *Eppendorf*). Foi adicionado 1 mM de EDTA (20 mM) (Invitrogen) e as amostras incubadas por mais 10 min a 65°C. Em seguida, às amostras foram acrescidas de 0,25 µg/µL de *Oligo dTprimer* (Invitrogen) e incubadas por mais 10 min a 70°C. Removidas do termociclador, as amostras foram acondicionadas em recipientes contendo gelo e acrescidas de 100% (v/v) *First stand buffer* 5X (Invitrogen), 0,01 mM DTT (0,1mM), 2 mM dNTP (10mM) e 1 U da enzima *SuperScript III* (200U/µL-Invitrogen). Em seguida, foram novamente incubadas em termociclador por 50 min a 42°C.

A partir dos cDNAs obtidos, foi realizada a técnica de RT-PCR semiquantitativo (92). Para cada par de primer, foram realizadas curvas das concentrações de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen), *primers* (Prodimol) (Tabela 2) e números de ciclos, feitas com 5 pontos para cada parâmetro testado. Após obtenção das curvas, os experimentos foram realizados com o ponto que antecedeu a saturação (platô).

As concentrações de MgCl<sub>2</sub> testadas foram 1 mM; 1,5 mM; 2 mM; 3 mM e 5 mM. As concentrações de *primers* foram 0,05µM; 0,075 µM; 0,15 µM; 0,6 µM e 0,3 µM. Os ciclos utilizados foram 24, 27, 30, 33 e 36.

Tabela 2: Lista de oligonucleotídeos utilizados.

cDNA	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	T <sub>m</sub>	Produto bp
<b>Cx36-</b> RefINM_019281.1	CGGTGTACGATGATGAGCAG	GAGTACCGGCGTTCTCTCTG	62°C	199
<b>Cx43-</b> RefINM_012567	CCGACGACAACCAGAATGCC	CTTGGGATAGCTGGGCGGAAC	50°C	321
<b>β-catenina-</b> RefINM_053357.2	GCCAGTGGATCCGTACTIONGT	GAGCTTGCTTTCCTGATTGC	45°C	202
<b>β-actina-</b> RefINC_005111.2	CAACCTTCTTGACGCTCCTC	TTCTGACCCATACCCACCAT	48°C	201
<b>RPS29-</b> RefINM_012876.1	CTGAAGGCAAGATGGGTCAC	CCATTGAGGTCGCTTAGTCC	48°C	195

bp: pares de bases

T<sub>m</sub>: Temperatura de anelamento.

A reação de *RT-PCR* foi realizada em um volume final de 15  $\mu$ L, utilizando 1  $\mu$ L de cDNA como molde. As condições ótimas padronizadas para cada par de *primer* foram as seguintes: 100% (v/v) de *PCR buffer* 10X (Invitrogen), 1 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 2 mM dNTPs Mix (Invitrogen), a concentração de *primer* variou de acordo com os genes de interesse e controle: Cx43 (0,15  $\mu$ M), Cx36 (0,6  $\mu$ M) ,  $\beta$ -catenina (0,3  $\mu$ M),  $\beta$ -actina (0,3  $\mu$ M) e RPS-29 (controle interno)-(0,075  $\mu$ M) e 1U *Taq* polymerase (5 U/ $\mu$ L)(Invitrogen). A amplificação ótima foi observada em 27 ciclos para os seguintes genes: Cx43,  $\beta$ -catenina,  $\beta$ -actina e RPS-29; e para a Cx36 o número de ciclos foi de 35.

As reações foram realizadas em um termociclador da marca Mastercycler Personal-*Eppendorf*, sendo as condições de amplificação as seguintes: um ciclo de 5 min a 94°C, um ciclo de 2 min com a temperatura de *annealing* do *primer* (Tabela2) correspondente e um ciclo 1 min a 72°C; seguiram-se 27-35 ciclos a 94°C por 45s , temperatura de *annealing* por 45s e 72°C por 1 min, finalizando com um ciclo a 72°C por 10 min e 1 ciclo a 4°C por 20 min.

Utilizamos o cérebro e o coração, que são conhecidos por expressarem grandes quantidades de Cx36, Cx43 e  $\beta$ -catenina, respectivamente, como controle positivo da reação. Como controle negativo, utilizamos o coração e o fígado, quando avaliamos a expressão da Cx36 e Cx43, respectivamente.

Para a visualização do produto amplificado, foi utilizado gel de agarose 1,2% diluído em tampão TBE 1X, sendo a corrida eletroforética realizada com voltagem fixa de 50V por aproximadamente 1 h.

As imagens dos géis foram capturadas pelo Sistema de Fotodocumentação da LOCUS Biotecnologia, sendo as bandas quantificadas utilizando-se o programa Scion Imagen, obtido da Scion Corporation.

## ***4.7 Determinação Bioquímica e Hormonal***

### ***4.7.1 Glicose***

A glicemia foi determinada pelo método da glicose oxidase-peroxidase (93). As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro modelo 395, marca Micronal, em comprimento de onda de 505 nm. Os resultados foram expressos em mmol/L.

#### 4.7.2 Insulina

A insulinemia e a insulina secretada por ilhotas isoladas foram determinadas por radioimunoensaio de acordo com o método descrito por Scott *et al.* (1981)(94). Foram transferidas alíquotas de 0,1 mL das amostras desconhecidas (em duplicata) as quais receberam, a seguir, 0,2 mL de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com  $^{125}\text{I}$  (traçador) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9% e albumina 0,5%. Em seguida, foram preparados os seguintes controles:

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

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

tubos contendo insulina conhecida elaborou-se a curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores desconhecidos das amostras. Os resultados foram expressos em pmol/L.

#### ***4.8 Análise Estatística***

Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão do número de animais ou experimentos. Para ilhotas, o  $n$  se refere ao número de experimentos realizados. Inicialmente foi aplicado o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Os resultados com variâncias heterogêneas e sem distribuição normal foram transformados (logarítmica- $Log_{10}$  ou  $Ln$  da variável) para correção da heterogeneidade ou anormalidade (95). Em seguida os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) a dois fatores (estado nutricional e estado fisiológico). Quando necessário, estas análises foram complementadas pelo teste de comparação múltipla de média *LSD*. O nível de significância foi estabelecido em  $P < 0,05$ .

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

## **RESULTADOS**

---

## 5. RESULTADOS

Sabendo-se que a restrição protéica provoca alterações em indicadores bioquímicos, hormonais e nutricionais, nos propomos a estudar as variáveis listadas na tabela 3. A ingestão alimentar foi modificada pelo estado nutricional ( $F_{1,66} = 15,26$ ;  $P < 0,0001$ ), pela prenhez ( $F_{1,66} = 33,66$ ;  $P < 0,0001$ ), bem como pela interação entre esses fatores ( $F_{1,66} = 8,08$ ;  $P < 0,001$ ). Em ratas do grupo HPNP a ingestão alimentar foi maior em relação ao grupo CNP. O consumo alimentar dos grupos HPP e CP foram similar e maior que seus respectivos controles (HPNP e CNP). Independente do estado nutricional, ratas prenhes tiveram maior ganho de peso e peso final ( $F_{1,66} = 532,97$ ;  $P < 0,0001$  e  $F_{1,66} = 41,36$ ;  $P < 0,0001$ , respectivamente) e menor concentração de glicose sérica ( $F_{1,23} = 5,80$ ;  $P < 0,05$ ) do que em ratas não prenhes. As concentrações séricas de insulina e a razão insulina:glicose não diferiram entre os grupos.

Tabela 3: Indicadores nutricional, bioquímico e hormonal de ratas prenhes e não prenhes que consumiram dieta controle (CNP e CP) e hipoprotéica (HPNP e HPP).

Variáveis	Grupos			
	CNP	CP	HPNP	HPP
Consumo alimentar (g)	203±40 <sup>c</sup> (18)	282±44 <sup>ab</sup> (15)	265±18 <sup>b</sup> (12)	292±37 <sup>a</sup> (25)
Ganho de peso corporal(g)	27±9 (18)	84±12 <sup>#</sup> (15)	22±5 (12)	80±12 <sup>#</sup> (25)
Peso corporal final (g)	266±22 (18)	306±24 <sup>#</sup> (15)	267±15 (12)	307±31 <sup>#</sup> (25)
Glicose sérica (mmol/L)	4,40±1,50 (7)	3,10±0,2 <sup>#</sup> (6)	3,93±1,35 (6)	3,21±0,67 <sup>#</sup> (8)
Insulina sérica (pmol/L)	137±86 (7)	197±132 (6)	160±66 (6)	204±156 (8)
Razão insulina:glicose	30±14 (7)	65±45 (6)	45±23 (6)	63±43 (8)

Valores expressos em médias± desvios padrões do número de ratas entre parênteses.

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas,  $P < 0,05$ .

# Valores médios diferentes em relação as não prenhes.

A secreção de insulina em ratas HPNP foi menor em relação aos grupos HPP, CP e CNP em resposta ao estímulo com 5,6 mmol/L de glicose, mostrando que a desnutrição durante a prenhez não foi capaz de prejudicar a secreção de insulina (Figura 5A). A prenhez aumentou a secreção de insulina em resposta ao estímulo com 8,3 mmol/L glicose independente do estado nutricional ( $F_{1,36} = 90,30$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 5B).



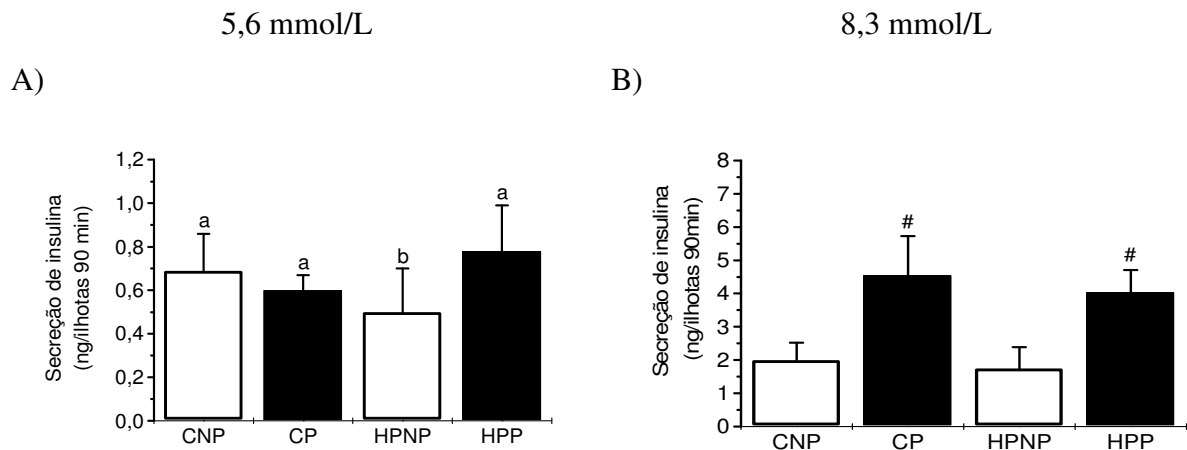


Figura 5- Secreção de insulina estimulada por glicose por ilhotas pancreáticas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP. Grupos de 5 ilhotas foram incubadas por 90 min em meio Krebs-bicarbonato contendo 5,6 (A) and 8,3 (B) mmol de glicose/L. As colunas representam a secreção de insulina em 90-min e são representadas em valores médios±desvios padrões de 5-9 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas,  $P < 0,05$ . # Indica diferença em relação aos grupos não prenhes.

Conforme ilustrado nas Figuras 6A e 6B, não foi detectada expressão do RNAm e de proteína Cx36 no coração (um tecido que reconhecidamente não expressa esse gene) sendo, no entanto, detectadas no cérebro e ilhotas. A expressão de RNAm e proteína da Cx36 em ilhotas pancreáticas foram modificados pelo estado nutricional ( $F_{1,11} = 23,22$ ;  $P < 0,001$ ,  $F_{1,8} = 5,90$ ;  $P < 0,05$ , respectivamente), pelo estado fisiológico ( $F_{1,11} = 28,94$ ;  $P < 0,001$ ,  $F_{1,8} = 17,16$ ;  $P < 0,01$ ) e pelo efeito interativo entre esses fatores ( $F_{1,11} = 15,48$ ;  $P < 0,01$ ,  $F_{1,8} = 8,64$ ;  $P < 0,01$ ). Assim, a expressão do RNAm e conteúdo protéico da Cx36 em ilhotas do grupo HPNP foi menor quando comparado com ilhotas do grupo CNP. A prenhez diminuiu a expressão do RNAm e do conteúdo protéico da Cx36 em ilhotas do grupo controle, o que não foi observado para o grupo com dieta hipoprotéica (Figuras 6C e 6D).

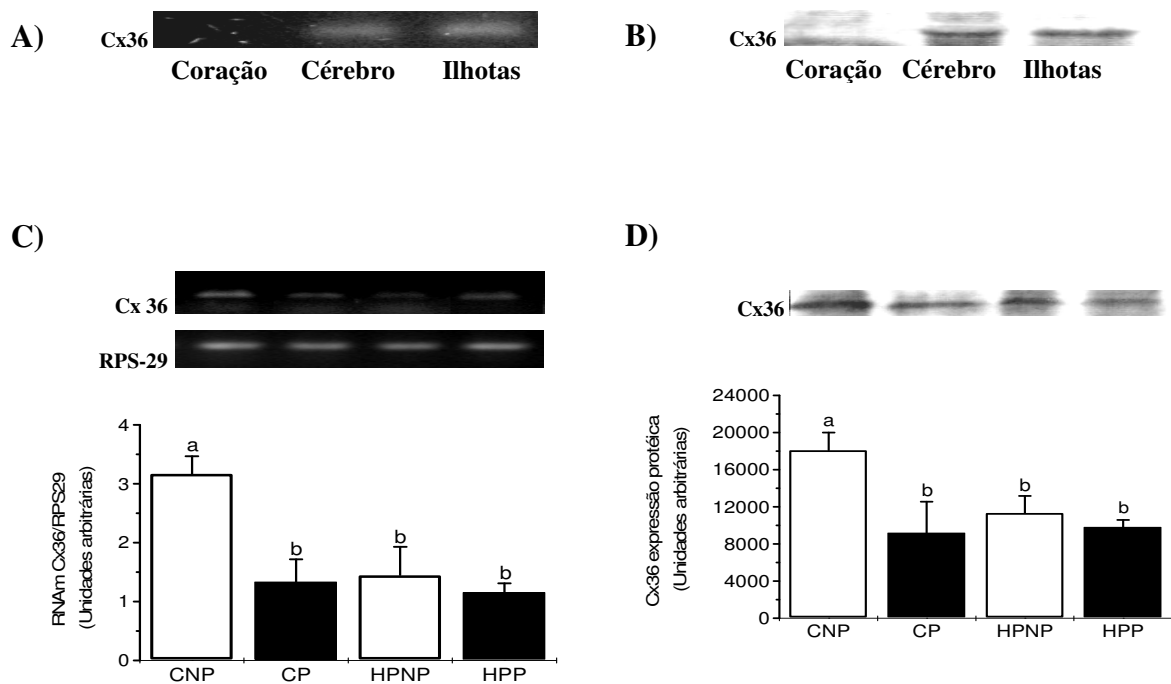


Figura 6 - Expressão do RNAm e protéica da Cx36 em ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP. (A) Expressão do RNAm da Cx36 RNAm em amostras de coração (controle negativo), cérebro (controle positivo) e ilhotas pancreáticas. (B) Conteúdo protéico da Cx36 em amostras de coração (controle negativo), cérebro (controle positivo) e ilhotas pancreáticas. (C) Expressão do RNAm da Cx36 em ilhotas de ratas prenhes e não prenhes mantidas com dieta controle e hipoprotéica. As concentrações do RNAm da Cx36 foram expressas em relação ao RNAm do RPS-29 (gene controle). (D) Conteúdo protéico da Cx36 de ilhotas de ratas prenhes e não prenhes mantidas com dieta controle e hipoprotéica. As colunas representam as médias±desvios padrões de 3-5 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas,  $P < 0,05$ .

A capacidade da expressão do RNAm e do conteúdo protéico da Cx43 foi testada no fígado (controle negativo) e coração (controle positivo). Conforme revelado nas figuras 7A e 7B, RNAm e conteúdo protéico da Cx43 não foram detectados no fígado, mas detectadas no coração e ilhotas. A análise de variância, mostrou uma menor expressão do RNAm da Cx43, nos grupos submetidos a restrição protéica ( $F_{1,10} = 13,54$ ;  $P < 0,01$ ) independente de seu estado fisiológico (prenhez). O estado fisiológico e a interação (estado nutricional x estado fisiológico) não interferiram na expressão do RNAm da Cx43 ( $F_{1,10}=1,78$ ;  $p=0,21$ ,  $F_{1,10}=3,74$ ;  $p=0,08$ ) (Figura 7C). O conteúdo protéico da Cx43 não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 7D). No entanto, quando avaliamos a Cx43 fosforilada em resíduos de serina<sup>279/282</sup>

observamos efeito do estado nutricional ( $F_{1, 13} = 29.48$ ;  $P < 0,0001$ ), fisiológico ( $F_{1, 13} = 28,44$ ;  $P < 0,001$ ) e interação entre esses fatores ( $F_{1, 13} = 22,83$ ;  $P < 0,0003$ ). Assim, o conteúdo de Cx43 fosforilada em resíduos de serina<sup>279/282</sup> foi maior no grupo CP, quando comparada com os demais grupos (Figura 7E).

Utilizamos como controle positivo o coração, um tecido reconhecidamente que expressa grandes quantidades do gene da  $\beta$ -catenina (Figura 8A e 8B). A expressão do RNAm da  $\beta$ -catenina não foi modificada pela prenhez ( $F_{1,8} = 3,79$ ;  $P = 0,08$ ) nem pela restrição protéica ( $F_{1,8} = 0,42$ ;  $P = 0,53$ ), mas foi alterada pela interação de ambos os fatores ( $F_{1,8} = 14.19$ ;  $P = 0,01$ ) (Figura 8C). A prenhez também não interferiu no conteúdo protéico da  $\beta$ -catenina ( $F_{1,15} = 2,66$ ;  $P=0,12$ ), que sofreu modificação em função do estado nutricional ( $F_{1,15} = 23,89$ ;  $P<0,001$ ) e da interação entre os dois fatores ( $F_{1,15} = 4,87$ ;  $P<0,05$ ) (Figura 8D). Portanto, a expressão do RNAm e o conteúdo protéico da  $\beta$ -catenina não diferiu entre os grupos HPP e HPNP e foi menor no grupo CP em relação ao CNP (Figura 8C e 8D).

Acompanhando o padrão de expressão observado na  $\beta$ -catenina, nem o estado fisiológico ( $F_{1,10}=0,06$ ;  $P=0,43$ ) e nem nutricional ( $F_{1,10}=1,89$ ;  $P=0,19$ ) alteraram o RNAm da  $\beta$ -actina, mas houve interação significativa entre esses fatores ( $F_{1,10} = 5,64$ ;  $P < 0,05$ ). Portanto, em ratas CP verificamos uma menor expressão deste gene em comparação ao grupo CNP, não havendo diferença entre os grupos HPP e HPNP (Figura 9).

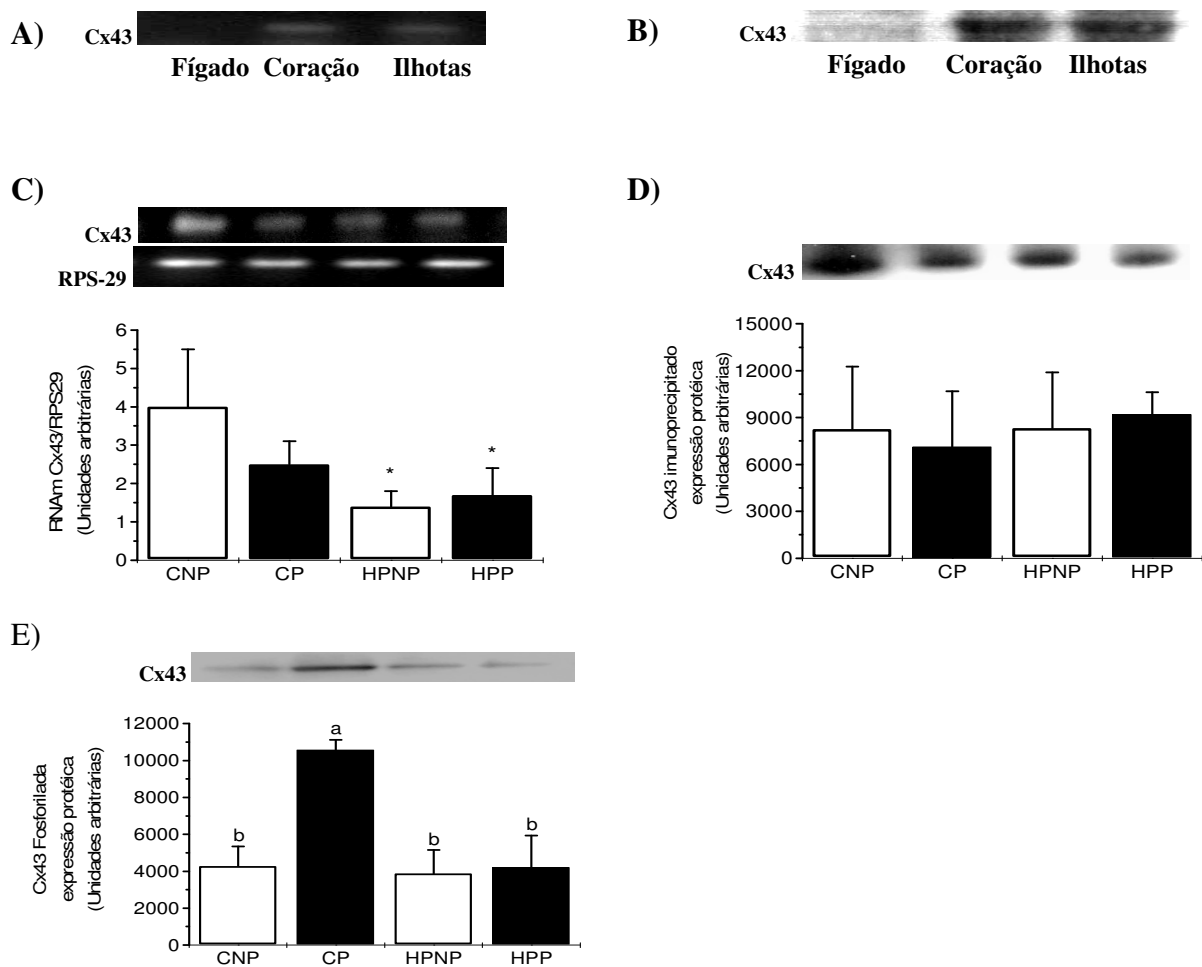


Figura 7 - Expressão do RNAm e da proteína da Cx43 em ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP. (A) Expressão do RNAm da Cx43 RNAm em amostras de fígado (controle negativo), coração (controle positivo) e ilhotas pancreáticas. (B) Conteúdo protéico da Cx43 em amostras de fígado (controle negativo), coração (controle positivo) e ilhotas pancreáticas. (C) Expressão do RNAm da Cx43 em ilhotas de ratas prenhes e não prenhes mantidas com dieta controle e hipoprotéica. As concentrações do RNAm da Cx43 foram expressas em relação ao RNAm do RPS-29 (gene controle). (D) Conteúdo protéico das Cx43 e da (E) Cx43 Ser279/282 fosforilada de ilhotas de ratas prenhes e não prenhes mantidas com dieta controle e hipoprotéica. As colunas representam as médias±desvios padrões de 3-5 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas,  $P < 0,05$ . \*Valores médios diferentes em relação aos grupos controles.

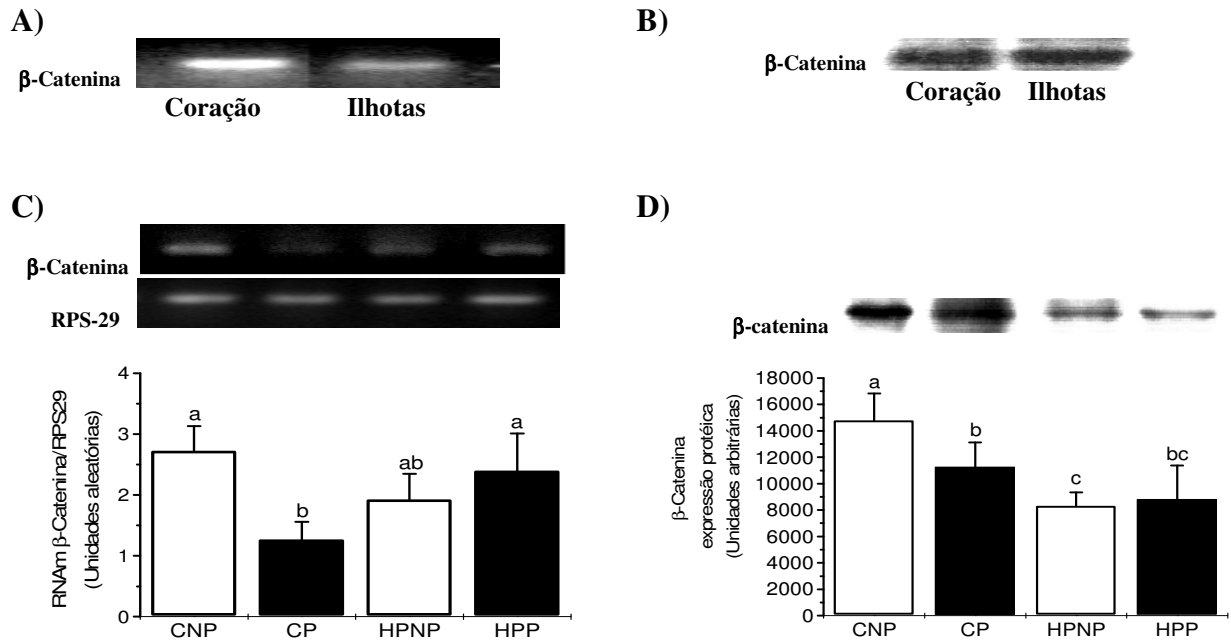


Figura 8 – Expressão do RNAm e da proteína da  $\beta$ -catenina em ilhotas de ratos CNP, CP, HPNP e HPP. (A) Expressão do RNAm da  $\beta$ -catenina RNAm em amostras de coração (controle positivo) e ilhotas pancreáticas. (B) Conteúdo protéico da  $\beta$ -catenina em amostras de coração (controle positivo) e ilhotas pancreáticas. (C) Expressão do RNAm da  $\beta$ -catenina em ilhotas de ratos prenhes e não prenhes mantidas com dieta controle e hipoprotéica. As concentrações do RNAm da  $\beta$ -catenina foram expressas em relação ao RNAm do RPS-29 (gene controle). (D) Conteúdo protéico da  $\beta$ -catenina de ilhotas de ratos prenhes e não prenhes mantidas com dieta controle e hipoprotéica. As colunas representam as médias  $\pm$  desvios padrões de 3-6 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas,  $P < 0,05$ .

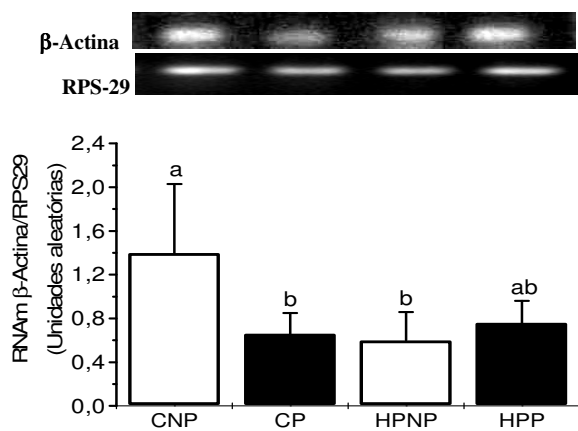


Figura 9- Expressão do RNAm da  $\beta$ -actina em ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP. As concentrações de RNAm da  $\beta$ -actina foram expressas em relação ao RNAm do RPS-29. As colunas representam as médias  $\pm$  desvios padrões de 3-4 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas,  $P < 0,05$ .

# DISCUSSÃO

---

## 6. DISCUSSÃO

Como usualmente demonstrada (96,97,98), prenhez e dieta hipoprotéica produzem hiperfagia. No entanto, de acordo com estudo anterior (99), a associação dessas condições (restrição protéica durante a prenhez), não produziu alterações no consumo alimentar. Assim, ratas prenhes apresentaram maior ingestão alimentar, resultando em um significativo ganho de peso corporal e, conseqüentemente, maior peso final, em relação às não prenhes, independentemente da dieta. A típica hipoglicemia vista na prenhez normal (100) foi também observada em nossas ratas prenhes. Um achado bastante comum e que ocorre antes mesmo da resistência à insulina se instalar na prenhez é a hiperinsulinemia (101). Em contraste, hipoinsulinemia bem como uma maior sensibilidade à insulina é freqüentemente observada em ratos submetidos à restrição protéica (76). Neste estudo, nem a privação protéica ou a prenhez alteraram a insulinemia e a razão insulina: glicose (que aqui foi utilizada como um indicador da resistência à insulina), embora o aumento da razão insulina:glicose observada em ratas prenhes tenha se aproximado da significância estatística. É possível que o curto prazo da exposição à dieta hipoprotéica (15 dias) e da fase da prenhez (fim da fase anabólica) tenha contribuído para as discrepâncias.

No entanto, quando ilhotas de ratas privadas de proteína foram submetidas à concentração basal de glicose, observou-se menor secreção de insulina em relação as ilhotas controle. Além disso, ilhotas de ratas prenhas estimuladas com concentração fisiológica de glicose, apresentaram maior secreção de insulina em relação às ratas não prenhes, concordando com o estudo anterior (80). A divergência entre a concentração sérica de insulina e liberação de insulina por ilhotas isoladas não surpreendeu, uma vez que os níveis periféricos de insulina podem não refletir a verdadeira secreção de insulina (102,103).

A maior secreção de insulina verificada na prenhez (87), ou em condições de aumento dos lactogênios placentários (69,104) tem sido atribuída, entre vários fatores, ao aumento do acoplamento juncional das células  $\beta$ . A comunicação intercelular pelas junções comunicantes é primordial para manter a homeostase e função celular (24,105) e células  $\beta$  estão acopladas por canais formados pela Cx36 (24). Em nosso estudo a amplificação do RNA total por RT-PCR semiquantitativo mostrou que a restrição protéica reduziu a transcrição da Cx36 em ilhotas pancreáticas e a prenhez foi eficaz em diminuir a transcrição da Cx36 apenas em ilhotas de ratas mantidas com dieta controle. A mesma tendência foi verificada quando se determinou o teor protéico da Cx36. Os estudos que avaliam os efeitos da redução da



expressão da Cx36 sobre a secreção de insulina são controvertidos. Tem-se observado diminuição da secreção de insulina induzida por glicose (35,36,37,39) ou um aumento significativo da secreção de insulina em resposta a concentração basal de glicose (31). Neste estudo não houve correlação entre a expressão da Cx36 e a secreção de insulina em concentração basal, assim como em concentração fisiológica de glicose.

Meda *et al.* (45,106) observaram expressão diminuída da Cx43 em ilhotas pancreáticas de ratos. Posteriormente Theis *et al.* (47) usando da técnica de imunohistoquímica, verificaram presença de Cx43 em ilhotas, preferencialmente entre as células endoteliais dos capilares e não propriamente nas células  $\beta$ , corroborando com os nossos resultados que mostraram expressão das Cx43 em ilhotas pancreáticas nos grupos de ratas estudadas. É possível que a grande variabilidade na expressão protéica da Cx43 tenha contribuído para mascarar as diferenças entre os grupos experimentais, apesar de observarmos redução dos níveis de RNAm da Cx43 em ratas mantidas com dieta hipoprotéica. Além disso, é possível que o consumo de uma dieta hipoprotéica por um curto período de tempo não tenha sido suficiente para modular negativamente o processo de tradução.

A via da MAPK está envolvida no aumento da massa de ilhotas pancreáticas durante a prenhez (107). Sabe-se que a Cx43 é um substrato para as proteínas da via da MAPK, e quando fosforilada nos resíduos de serina<sup>279/282</sup> é inativada, promovendo alterações ultra-estruturais e rearranjo celular (41). Como esperado, verificamos que em ilhotas de ratas prenhes controle houve aumento do conteúdo da Cx43 fosforilada em resíduos de serina<sup>279/282</sup>. Em ilhotas de ratas prenhes submetidas à dieta hipoprotéica não houve alteração no conteúdo dessa proteína na forma fosforilada, sugerindo que as mudanças estruturais próprias da prenhez, tais como hipertrofia e hiperplasia não ocorreram no grupo hipoprotéico.

Foi estabelecido que importantes processos celulares como proliferação e crescimento celular são parcialmente regulados pela interação caderina-conexina (108). A  $\beta$ -catenina desempenha um papel crucial na adesão celular em vários tipos de células epiteliais, por modular a ligação das caderinas com a  $\alpha$ -catenina que, por sua vez, interage com o citoesqueleto de actina (109,110). Além disso, em ilhotas foi demonstrado que o tratamento com prolactina *in vitro* induz maior expressão de  $\beta$ -catenina, que é diretamente proporcional a expressão da Cx43 (111). Neste estudo verificou-se redução na transcrição e no conteúdo protéico da  $\beta$ -catenina e Cx43, na prenhez normal isso possivelmente ocorreu devido à presença de outros hormônios, além da prolactina, que tornam o meio mais completo, dinâmico e fisiológico encontrado nos experimentos *in vivo*, em oposição às condições estáticas controladas e concentrações supra-fisiológicas de um único hormônio encontrado no

experimento *in vitro*. Também foi observado que a diminuição da transcrição da  $\beta$ -catenina foi correlacionada com o baixo nível de transcrito da  $\beta$ -actina na prenhez normal. Por outro lado, a prenhez associada à dieta hipoprotéica não alterou a transcrição da  $\beta$ -catenina e  $\beta$ -actina ou do conteúdo protéico da  $\beta$ -catenina. Assim, esta é mais uma indicação de que a proliferação celular e o crescimento observados na prenhez normal, não ocorram na prenhez de ratas mantidas com dieta hipoprotéica.

Em conclusão, nossos resultados indicam que a restrição protéica imposta nos primeiros 15 dias de prenhez impediu alterações importantes nas junções comunicantes e aderentes em ilhotas pancreáticas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion: implications for health and disease. *Diabetologia*. 2000;43:393-410.
2. Serre-Beinier V, Mas C, Calabrese A, Caton D, Bauquis J, Caille D, *et al.* Connexins and secretion. *Biol Cell*. 2002;94(7-8):477-92.
3. Orci L, Unger RH, Renold AE. Structural coupling between pancreatic islet cells. *Experientia*. 1973;29:1015-18.
4. Giepmans BN. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res*. 2004;62(2):233-45.
5. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*. 1996;84(3):381-8.
6. Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*. 2004; 62(2):228-32.
7. Revel JP, Karnovsky MJ. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol*. 1967; 33(3):7-12.
8. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem/ FEBS*. 1996;238(1):1-27.
9. Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA. Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J Cell Biol*. 1977;74(2):629-45.
10. Houghton FD. Role of gap junctions during early embryo development. *Reproduction*. 2005;129(2):129-35.
11. Paul DL. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J Cell Biol*. 1986;103(1):123-34.
12. Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science*. 1999;283(5405):1176-80.
13. Shibata Y, Kumai M, Nishii K, Nakamura K. Diversity and molecular anatomy of gap junctions. *Med Electron Microsc*. 2001;34(3):153-9.
14. Panchin YV. Evolution of gap junction proteins-the pannexin alternative. *J Exp Biol*. 2005; 208(8):1415-9.
15. Sohl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes*. 2003 Jul-Dec;10(4-6):173-80.

16. Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1719(1-2):6-23.
17. Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol*. 1987;105(6 Pt 1):2621-9.
18. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1359-400.
19. Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, *et al*. Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci*. 1998;10:1202-08.
20. Teubner B, Degen J, Sohl G, *et al*. Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J Membr Biol*. 2000;176:249-62.
21. Belluardo N, Mud G, Trovato-Salinaro A, *et al*. Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res*. 2000;865:121-38.
22. Guldenagel M, Ammermuller J, Feigenspan A, *et al*. Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *J Neurosci*. 2001;21:6036-44.
23. Martin AO, Mathieu MN, Chevillard C, Guerineau NC. Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca<sup>2+</sup> increases between chromaffin cells in adrenal slices: a role in catecholamine release. *J Neurosci*. 2001; 21:5397-405.
24. Serre-Beinier V, Le Gurun S, Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Charollais A, Haefliger JA, *et al*. Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets. *Diabetes*. 2000;49(5):727-34.
25. Meda P. Cx36 involvement in insulin secretion: characteristics and mechanism. *Cell Commun Adhes*. 2003;10(4-6):431-5.
26. Moreno AP, Berthoud VM, Perez-Palacios G, Perez-Armendariz EM. Biophysical evidence that connexin-36 forms functional gap junction channels between pancreatic mouse beta-cells. *Am J Physiol*. 2005; 288(5):E948-56.
27. Nlend RN, Michon L, Bavamian S, Boucard N, Caille D, Cancela J, *et al*. Connexin36 and pancreatic beta-cell functions. *Arch Physiol Biochem*. 2006;112(2):74-81.

28. Caton D, Calabrese A, Mas C, Serre-Beinier V, Wonkam A, Meda P. Beta-cell crosstalk: a further dimension in the stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. *Diabetes Metab.* 2002 Dec;28(6 Pt 2):3S45-53;discussion 3S108-12.
29. Bavamian S, Klee P, Britan A, Populaire C, Caille D, Cancela J, *et al.* Islet-cell-to-cell communication as basis for normal insulin secretion. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9(2):118-32.
30. Li X, Olson C, Lu S, Nagy JJ. Association of connexin 36 with zonula occludens-1 in HeLa cells, betaTC-3 cells, pancreas, and adrenal gland. *Histochem Cell Biol.* 2004;122(5):485-98.
31. Ravier MA, Guldenagel M, Charollais A, Gjinovci A, Caille D, Sohl G, *et al.* Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced  $Ca^{2+}$  and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes.* 2005;54(6):1798-807.
32. Charpantier E, Cancela J, Meda P. Beta cells preferentially exchange cationic molecules via connexin 36 gap junction channels. *Diabetologia.* 2007;50(11):2332-41.
33. Benninger RK, Zhang M, Head WS, Satin LS, Piston DW. Gap junction coupling and calcium waves in the pancreatic islet. *Biophys J.*
34. Meda P, Bosco D, Chanson M, Giordano E, Vallar L, Wollheim C, *et al.* Rapid and reversible secretion changes during uncoupling of rat insulin-producing cells. *J Clin Invest.* 1990;86(3):759-68.
35. Calabrese A, Zhang M, Serre-Beinier V, Caton D, Mas C, Satin LS, *et al.* Connexin 36 controls synchronization of  $Ca^{2+}$  oscillations and insulin secretion in MIN6 cells. *Diabetes.* 2003;52(2):417-24.
36. Caton D, Calabrese A, Mas C, Serre-Beinier V, Charollais A, Caille D, *et al.* Lentivirus-mediated transduction of connexin cDNAs shows level- and isoform-specific alterations in insulin secretion of primary pancreatic beta-cells. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 11):2285-94.
37. Calabrese A, Caton D, Meda P. Differentiating the effects of Cx36 and E-cadherin for proper insulin secretion of MIN6 cells. *Exp Cell Res.* 2004;294(2):379-91.
38. Vozzi C, Ullrich S, Charollais A, Philippe J, Orci L, Meda P. Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. *J Cell Biol.* 1995;131(6 Pt 1):1561-72.

39. Le Gurun S, Martin D, Formenton A, Maechler P, Caille D, Waeber G, *et al.* Connexin-36 contributes to control function of insulin-producing cells. *J Biol Chem.* 2003; 278(39):37690-7.  
Michon L, Nlend Nlend R, Bavamian S, Bischoff L, Boucard N, Caille D, *et al.*
40. Involvement of gap junctional communication in secretion. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1719(1-2):82-101.
41. Cramer Bonnie J, Trevor Cottrell G, Burt Janis M, Alan F Lau. Regulation of Connexin-43 Gap Junctional Intercellular Communication by Mitogen-activated Protein Kinase. *J Biol Chem.* 1998;273(15):9188-96.
42. Contreras JE, Sanchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, *et al.* Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 J;99(1):495-500.
43. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, *et al.* Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem.* 2002; 383(5):725-37.
44. Schulz R, Boengler K, Totzeck A, Luo Y, Garcia-Dorado D, Heusch G. Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. *Heart Fail Rev.* 2007;12(3-4):261-6.
45. Meda P, Pepper MS, Traub O, Willecke K, Gros D, Beyer E, *et al.* Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. *Endocrinology.*1993;133(5):2371-8.
46. Charollais A, Serre V, Mock C, Cogne F, Bosco D, Meda P. Loss of alpha 1 connexin does not alter the prenatal differentiation of pancreatic beta cells and leads to the identification of another islet cell connexin. *Dev Genet.* 1999;24(1-2):13-26.
47. Theis M, Mas C, Doring B, Degen J, Brink C, Caille D, *et al.* Replacement by a lacZ reporter gene assigns mouse connexin 36, 45 and 43 to distinct cell types in pancreatic islets. *Exp Cell Res.* 2004;294(1):18-29.
48. Salomon D, Meda P. Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual B cells. *Exp Cell Res.* 1986; 62(2):507-20.
49. Bosco D, Meda P. Actively synthesizing beta-cells secrete preferentially after glucose stimulation. *Endocrinology.* 1991;129(6):3157-66.

50. Philippe J, Giordano E, Gjinovci A, Meda P. Cyclic adenosine monophosphate prevents the glucocorticoid-mediated inhibition of insulin gene expression in rodent islet cells. *J Clin Invest.* 1992; 90(6):2228-33.
51. Oyamada M, Oyamada Y, Kaneko T, Takamatsu T. Regulation of gap junction protein (connexin) genes and function in differentiating ES cells. *Methods Mol Biol.* 2002;185:63-9.  
Musil LS. Structure and assembly of gap junctions. In: Citi S, Ed. *Molecular mechanisms of epithelial cell junctions: from development to disease.* Texas: Molecular Biology Intelligence Unit, CRC Press 1994:173-194.
52. Spray, D. Physiology and pharmacological regulation of gap junction channels. In: Citi S, Ed. *Molecular mechanisms of epithelial cell junctions: from development to disease.* Texas: Molecular Biology Intelligence Unit, CRC Press, Texas, 1994;195-215.
53. Musil LS, Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol.* 1991;115:1357-74.
54. Lampe PD, Lau AF. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys.* 2000;384(2):205-15.
55. Spray DC, Ye ZC, Ransom BR. Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia.* 2006; 54(7):758-73.
56. Dahl U, Sjodin A, Semb H. Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells in vivo. *Development.* 1996;122(9):2895-902.
57. Ngithke IS, Hinck L, Nelso WJ. The cadherin/catenin complex: connections to multiple cellular processes involved in cell adhesion, proliferation and morphogenesis. *Semin Dev Biol.* 1995;6:89-95.
58. Yagi T, Takeichi M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Dev Genes Evol.* 2000;14(10):1169-80. PKA $\alpha$  expression. *J Nutr.* 2004;134:63-67.
59. Ranscht Barbara. Cadherins: Interactions and Regulation of Adhesivity. *Handbook of Cell Signaling.* La Jolla, Ca. Elsevier Science; 2003; 2:889-99.
60. Ozawa M, Ringwald M, KemLer R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(11):4246-50.



62. Salomon D, Ayalon O, Patel-King R, Hynes RO, Geiger B. Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *Journal of cell science*. 1992;102 ( Pt 1):7-17.
63. Behrens J. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 1999;18(1):15-30.
64. Stemmler MP. Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst*. 2008;4(8):835-50.
65. Hoschuetzky H, Aberle H, KemLer R. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol*. 1994;127(5):1375-80.
66. Saez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MV. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1711(2):215-24.
67. Hauge-Evans AC, Squires PE, Persaud SJ, Jones PM. Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced  $Ca^{2+}$  and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. *Diabetes*. 1999;48(7):1402-8.
68. Lilla V, Webb G, Rickenbach K, Maturana A, Steiner DF, Halban PA, *et al*. Differential gene expression in well-regulated and dysregulated pancreatic beta-cell (MIN6) sublines. *Endocrinology*. 2003;144(4):1368-79.
69. Michaels RL, Sorenson RL, Parsons JA, Sheridan JD. Prolactin enhances cell-to-cell communication among beta-cells in pancreatic islets. *Diabetes*. 1987;36(10):1098-103.
70. Leite AR, Carvalho CP, Furtado AG, Barbosa HC, Boschero AC, Collares-Buzato CB. Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005;83(2):142-51.
71. Rutland CS, Latunde-Dada AO, Thorpe A, Plant R, Langley-Evans S, Leach L. Effect of gestational nutrition on vascular integrity in the murine placenta. *Placenta*. 2007;28 (7):734-42.
72. Rao RH. Chronic undernutrition may accentuate the b-cell dysfunction of type II diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 1990;8:125-30.
73. Dixit PK, Kaung HLC. Rat pancreatic  $\beta$ -cells in protein deficiency: a study involving morphometric analysis and alloxan affect. *J Nutr*. 1985;115:375-81.
74. Rasschaert J, Reusens B, Dahri S, Sener A, Remacle C, Hoet JJ, Malaisse W. Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. *Endocrinology*. 1995;136:2631-34.

75. Carneiro EM, Mello MAR, Gobatto CA, Boschero AC. Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and <sup>45</sup>Ca uptake by pancreatic rats islets. *J Nutr Biochem.* 1995;6:314-18.
76. Latorraca MQ, Reis MAB, Carneiro EM, Mello MAR, Velloso LA, Saad MJA, Boschero A C. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J Nutr.* 1998;128:1643-49.
77. Ferreira F, Filiputti E, Arantes VC, Stoppiglia LF, Araújo EP, Delghingaro-Augusto V, Latorraca MQ, Toyama MH, Boschero AC, Carneiro EM. Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase C $\alpha$  expression. *J Nutr.* 2003;133:695-99.
78. Ferreira F, Barbosa HCL, Stoppiglia LF, Delghingaro-Augusto V, Pereira EA, Boschero AC, Carneiro EM. Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA $\alpha$  expression. *J Nutr.* 2004;134:63-67.
79. Weinhaus AJ, Stout LE, Sorenson RL. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2 and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets *in vitro*: mechanisms for long term up-regulation of islets. *Endocrinology.* 1996; 137:1640-49.
80. Milanski M, Arantes VC, Ferreira F, de Barros Reis MA, Carneiro EM, Boschero AC, *et al.* Low-protein diets reduce PKA alpha expression in islets from pregnant rats. *J Nutr.* 2005;135(8):1873-8.
81. Green IC, Perrin D, Howell SL. Insulin release in isolated islets of Langerhans of pregnant rats: relationship between glucose metabolism and cyclic AMP. *Horm Metab Res.* 1978; 10:32-35.
82. Brelje TC, Sorenson RL. Nutrient and hormonal regulation of the threshold of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreases. *Endocrinology.* 1988;123:1582-90.
83. Mazancourt P, Carneiro EM, Atwater I, Boschero AC. Prolactin treatment increases GLUT2 but not G protein subunit content in cell membranes from cultured neonatal rat islets. *FEBS Lett.* 1994;343(2):137-40.
84. Weinhaus AJ, Stout LE, Sorenson RL. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2 and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets *in vitro*: mechanisms for long term up-regulation of islets. *Endocrinology.* 1996; 137:1640-49.
85. Van Assche FA. Quantitative morphologic and histoenzymatic study of the endocrine pancreas in non pregnant and pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol.* 1974;118:39-41.

86. Bone AJ, Taylor KW. Metabolism adaptation to pregnancy shown by increased biosynthesis of insulin in islets of Langerhans isolated from pregnant rats. *Nature*. 1976;262:501-2.
87. Sheridan JD, Anaya P, Parsons JA, Sorenson RL. Increased dye coupling in pancreatic islets from rats in late-term pregnancy. *Diabetes*. 1988;37:908-11.
88. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey CG Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: reports of the American Institute of Nutrition ad hoc working committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr*. 1993; 123:1939-51.
89. Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E, Atwater I. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol*. 1995;268:E336-42.
90. Kelley GG, Zawulich KC, Zawulich WS. Calcium and a mitochondrial signal interact to stimulate phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in rat islets. *Endocrinology*. 1994;134:1648-54.
91. Jones PM, Persaud SJ. Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocr Rev*. 1998;19:429-61.
92. Marone M, Mozzetti S, Ritis DD, Pierelli L, Scambia G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced Online*. 2001; 3:19-25.
93. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol*. 1969;22:158-61.
94. Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and  $\beta$ -cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*. 1981;21:470-5.
95. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. Freeman WH editor. New York. 1995;392-450.
96. Herrera E, Lasuncion MA, Palacin M, Zorzano A, Bonet B. Intermediary metabolism in pregnancy. *Diabetes*. 1991;40(Suppl 2):83-88.
97. Frontera M, Pujol E, Rodriguez-Cuenca S, Catala-Niell A, Roca P, Garcia-Palmer FJ, *et al*. Rat brown adipose tissue thermogenic features are altered during mid-pregnancy. *Cell Physiol Biochem*. 2005;15:203-10.

98. Du F, Higginbotham DA, White BD. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr.* 2000;130:514-21.
99. Macêdo GS, Ferreira CLP, Menegaz A, Arantes VC, Veloso RV, Carneiro EM. *et al.* Correlation of serum leptin and insulin levels of pregnant protein-restricted rats with predictive obesity variables. *Braz J Med Biol Res.*2008; 41(6):519-25.
100. Herrera E, Muñoz C, López-Luna P, Ramos P. Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Braz J Med Biol Res.* 1994;27(11):2499-519.
101. Munoz C, Lopez-Luna P, Herrera E. Glucose and insulin tolerance tests in the rat on different days of gestation. *Biol Neonate.* 1995;68:282-91.
102. Hovorka R, Jones RH. How to measure insulin secretion. *Diabetes Metab Rev.*1994;10:91-117.
103. Polonsky KS, Rubenstein AH. Current approaches to measurement of insulin secretion. *Diabetes Metab.* 1986; 2:315-29.
104. Sorenson RL, Johnson MG, Parsons JA, Sheridan JD. Decreased glucose stimulation threshold, enhanced insulin secretion, and increased beta cell coupling in islets of prolactin-treated rats. *Pancreas.* 1987;2(3):283-8.
105. Jonkers FC, Jonas JC, Gilon P, Henquin JC. Influence of cell number on the characteristics and synchrony of  $Ca^{2+}$  oscillations in clusters of mouse pancreatic islet cells. *J Physiol.* 1999;520(3):839-49.
106. Meda P, Chanson M, Pepper M, Giordano E, Bosco D, Traub O, *et al.* In vivo modulation of connexin 43 gene expression and junctional coupling of pancreatic  $\beta$ -cells. *Exp Cell Res.* 1991;192(2):469-80.
107. Amaral ME, Ueno M, Carvalheira JB, Carneiro EM, Velloso LA, Saad MJ, *et al.* Prolactin-signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway. *Horm Metab Res.* 2003;35(5):282-9.
108. Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal.* 2009;7:4.
109. Adams CL, Nelson WJ, Smith SJ. Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 1996;135(6 Pt 2):1899-1911.
110. Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, Nelson WJ. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol.* 1994;125(6):1327-40.

111. Collares-Buzato CB, Carvalho CP, Furtado AG, Boschero AC. Upregulation of the expression of tight and adherens junction-associated proteins during maturation of neonatal pancreatic islets in vitro. *Journal of molecular histology*. 2004;35(8-9):811-22.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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