

LEONARDO SOKOLNIK DE OLIVEIRA

**Perfil de expressão de genes modulados pela amilina  
em ilhotas pancreáticas de rato**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Endocrinologia

Orientadora: Dra. Maria Lúcia C. Corrêa Giannella

São Paulo

2008

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Leonardo Sokolnik de

Perfil de expressão de genes modulados pela amilina em ilhotas pancreáticas de rato / Leonardo Sokolnik de Oliveira. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lúcia C. Corrêa Giannella.

Descritores: 1.Diabetes mellitus 2.Expressão gênica 3.Análise de seqüência com séries de oligonucleotídeos 4.Amilóide 5.Apoptose 6.Polipeptídeo inibidor gástrico

USP/FM/SBD-444/08

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular – LIM 25 – da disciplina de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo a concessão de auxílio-pesquisa da FAPESP (processo nº 04/10691-1).

À minha esposa, Eliane Dias Guimarães pela compreensão demonstrada nos momentos cruciais deste trabalho.

À minha filha, Giovana, que é a materialização do mais puro amor e reveladora do verdadeiro sentido da vida.

Aos meus pais, pela dedicação, exemplos e ensinamentos sempre presentes.

## **AGRADECIMENTOS**

À médica Dra. Maria Lúcia C. Corrêa Giannella pela oportunidade de ingressar no ambiente acadêmico e pelos ensinamentos prestados.

Ao médico Dr. Daniel Giannella Neto pelo exemplo de cientista que sempre será.

Ao biomédico Dr. Cassio Negro Coimbra pela colaboração na padronização do isolamento de ilhotas pancreáticas, pelo apoio nos momentos de dificuldade e principalmente pelos bons momentos de amizade no decorrer destes anos.

Ao médico Dr. Rodrigo Nunes Lamounier pela colaboração na padronização do isolamento de ilhotas e pela amizade formada.

Às biomédicas pós-graduandas Erika e Flavia pela ajuda nos isolamentos de ilhotas pancreáticas e experimentos de RT-qPCR.

Ao biomédico Dr. José Tadeu Stefano e farmacêutica Dra. Márcia Saldanha Kubrusly pela ajuda na hidridização das lâminas de microarranjo.

A toda equipe de biólogos do LIM-25 formada pelos biomédicos Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi e Ana Mercedes Cavaleiro, pelos biólogos Maria Ângela Henriques Zanela Fortes e Marco Antônio Rego e pela técnica de laboratório Maria Auxiliadora R. Higa pela amizade e apoio durante estes anos.

À secretária Norisa Amadeo Herrera sempre solícita e dedicada.

À FAPESP e à Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas que financiaram os reagentes e materiais de consumo utilizados neste trabalho.

*“Somente a ciência, a ciência exata a respeito da natureza humana, e a mais sincera abordagem, realizada com a ajuda do onipotente método científico, conseguirão libertar o homem da sua atual sensação de impotência e conseguirão redimi-lo da sua vergonha contemporânea, na esfera das inter-relações humanas.”*

Ivan Petrovich Pavlov (1849-1936)

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. Introdução.....	1
1.1 O Diabetes Mellitus tipo 2.....	1
1.2 A amilina e o depósito amilóide.....	6
2. Objetivos .....	15
3. Material e métodos .....	16
3.1 Isolamento de ilhotas pancreáticas muríneas.....	16
3.1.1 Canulação e digestão do pâncreas .....	17
3.1.2 Interrupção da digestão e preparo da amostra para a purificação das ilhotas .....	20
3.1.3 Gradiente de HBSS-Ficoll para purificação das ilhotas .....	20
3.2 Avaliação da viabilidade funcional das ilhotas isoladas.....	23
3.3 Preparo das amilinas .....	26
3.4 Tratamento das ilhotas pancreáticas com amilina.....	26
3.5 Extração e controle de qualidade do RNA total.....	27
3.6 Amplificação e marcação do RNA total.....	34
3.7 Análise dos genes diferencialmente expressos por microarranjos de DNA.....	39
3.8 Confirmação da expressão diferencial de alguns genes.....	42
3.9 Análise Estatística.....	49
3.9.1 Experimento de microarranjo de DNA.....	49
3.9.2 Confirmação dos genes diferencialmente expressos.....	50
4. Resultados.....	52
4.1 Vias biológicas relevantes.....	52
4.2 Genes diferencialmente expressos.....	57

4.3 Confirmações de alguns genes diferencialmente expressos.....	62
4.3.1 <i>Capn2</i> .....	62
4.3.2 <i>Calr</i> .....	63
4.3.3 <i>Anxa1</i> .....	64
4.3.4 <i>Pitpna</i> .....	66
4.3.5 <i>Atp5j</i> .....	67
4.3.6 <i>Gipr</i> .....	68
4.3.7 <i>Bcl2</i> .....	69
4.3.8 <i>Dbp</i> .....	70
4.3.9 <i>Sepw1</i> .....	71
4.3.10 <i>Nos2</i> .....	72
4.3.11 <i>Xdh</i> .....	74
4.3.12 <i>Eif2b5</i> .....	75
4.3.13 <i>Rab5a</i> .....	76
4.3.14 <i>Lin7a</i> .....	77
5. Discussão .....	79
6. Conclusão .....	93
7. Referências Bibliográficas.....	94

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Dr.	Doutor
et al.	e outros
Prof.	Professor
q.s.p	quantidade suficiente para

**LISTA DE SÍMBOLOS**

$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
$\pm$	mais ou menos
$<$	menor
$=$	igual
$>$	maior
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
cm	centímetro
dL	decilitro
h	hora
L	litro
m	metro
mm	milímetro
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
rpm	rotações por minuto
s	segundo(s)

**LISTA DE SIGLAS**

AGLs	ácidos graxos livres
AMP <sub>c</sub>	adenosinamonofosfato cíclico
ATP	adenosinatrifosfato
BSA	albumina bovina sérica
cDNA	ácido desoxiribonucléico complementar
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CGRP	peptídeos relacionados ao gene de calcitonina
CRLR	receptor semelhante ao receptor para calcitonina
cRNA	ácido ribonucléico complementar
CTP	citiosinatrifosfato
CTR	receptor de calcitonina
DEPC	dietilpirocarbonato
DM	diabetes mellitus
DNA	ácido desoxirubonucléico
dNTPs	deoxinucleotídeos trifosfatados
DTZ	Ditizona
ED <sub>50</sub>	dose efetiva em metade dos indivíduos
EUA	Estados Unidos da América
GTP	guanidinatrifosfato
GO	<i>gene ontology</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas de Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	lipoprotéina de alta densidade
HIP	rato transgênico para amilina humana
IAPP	polipeptídeo amilóide da ilhota
IL-1	Interleucina 1
IMC	índice de massa corporal
NADH	dinucleotídeo de nicotinamida

PC1/3	pro-hormônio convertase 1/3
PC2	pro-hormônio convertase 2
PCR	reação em cadeia de polimerase
POMC	pro-opiomelanocortina
RAMP	proteínas modificadoras da atividade do receptor
RIA	radioimunoensaio
RNA	ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensageiro
RNAse	enzima degradadora de RNA
RT-qPCR	reação em cadeia pela polimerase quantitativa pós-transcrição reversa
RPMI	meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SFB	soro fetal bovino
SNC	sistema nervoso central
TNF	fator de necrose tumoral
UTP	uridinatrifosfato
USP	Universidade de São Paulo

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA utilizadas no experimento 1 .....	29
Tabela 2 – Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA utilizadas no experimento 2 .....	30
Tabela 3 - Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA utilizadas no experimento 3 .....	31
Tabela 4 - Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA utilizadas no experimento 4 .....	32
Tabela 5 - Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA amplificadas e utilizadas no experimento de microarranjos de DNA .....	36
Tabela 6: Seqüência dos <i>primers</i> utilizados nos experimentos de PCR em tempo real com respectivas temperaturas de <i>annealing</i> , tamanho do produto amplificado e eficiência de amplificação.....	48
Tabela 7: Processos e componentes celulares modulados no tratamento de ilhotas pancreáticas com fibrilas de amilina madura em concentração fisiológica de glicose .....	53
Tabela 8: Processos e componentes celulares modulados no tratamento de ilhotas pancreáticas com oligômeros de amilina em concentração fisiológica de glicose .....	54
Tabela 9: Processos e componentes celulares modulados no tratamento de ilhotas pancreáticas com fibrilas de amilina madura em concentração suprafisiológica de glicose.....	55

Tabela 10: Processos e componentes celulares modulados no tratamento de ilhotas pancreáticas com oligômeros de amilina em concentração suprafisiológica de glicose .....	56
Tabela 11: Genes diferencialmente expressos após tratamento de ilhotas pancreáticas com fibrilas de amilina madura em concentração fisiológica de glicose .....	58
Tabela 12: Genes diferencialmente expressos após tratamento de ilhotas pancreáticas com oligômeros de amilina em em concentração fisiológica de glicose .....	59
Tabela 13: Genes diferencialmente expressos após tratamento de ilhotas pancreáticas com fibrilas de amilina madura em em concentração suprafisiológica de glicose .....	60
Tabela 14: Genes diferencialmente expressos após tratamento de ilhotas pancreáticas com oligômeros de amilina em concentração suprafisiológica de glicose .....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização do ducto biliar e pinçamento da ramificação que vai para o intestino delgado.....	18
Figura 2 - Canulação do ducto biliar e introdução da colagenase tipo V.....	18
Figura 3. Padronização do tempo de digestão enzimática do pâncreas.....	19
Figura 4. Gradiente de HBSS-Ficoll, mostrando as diferentes densidades e a interface onde as ilhotas se concentram após centrifugação.....	22
Figura 5. Ilhota purificada e corada com ditizona após centrifugação em gradiente de HBSS-ficoll.....	22
Figura 6 - Incremento da concentração de insulina em relação ao basal por ilhotas expostas a 16,7 mM de glicose (estimuladas) em relação a ilhotas mantidas em 1,67 mM de glicose (não estimuladas) após 24, 48 e 72 horas de cultivo .....	25
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose dos RNAs do experimento 4, mostrando as bandas referentes às subunidades 28S e 18S.....	33
Figura 8a: Eletroforese em gel de agarose do RNA amplificado, mostrando um “smear” de até 250 pares de bases .....	37
Figura 8b: Eletroforese em gel de agarose do RNA amplificado, mostrando um “smear” de até 250 pares de bases .....	38
Figura 9: Delineamento experimental da análise por microarranjo .....	41
Figura 10: Avaliação da especificidade da amplificação dos pares de primers utilizados no estudo .....	46

Figura 11: Gráfico representativo da eficiência de amplificação de um gene <sup>47</sup>	
Figura 12: Quantificação do mRNA de <i>Calp2</i> nas diferentes condições experimentais estudadas .....	63
Figura 13: Quantificação do mRNA de <i>Calr</i> nas diferentes condições experimentais estudadas .....	64
Figura 14: Quantificação do mRNA de <i>Anxa1</i> nas diferentes condições experimentais estudadas .....	65
Figura 15: Quantificação do mRNA de <i>Pitpna</i> nas diferentes condições experimentais estudadas .....	66
Figura 16: Quantificação do mRNA de <i>Atp5j</i> nas diferentes condições experimentais estudadas .....	67
Figura 17: Quantificação do mRNA do <i>Gipr</i> nas diferentes condições experimentais estudadas .....	69
Figura 18: Quantificação do mRNA de <i>Bcl2</i> nas diferentes condições experimentais estudadas .....	70
Figura 19 - Quantificação do mRNA de <i>Dbp</i> nas diferentes condições experimentais estudadas .....	71
Figura 20 - Quantificação do mRNA de <i>Sepw1</i> nas diferentes condições experimentais estudadas .....	72
Figura 21 - Quantificação do mRNA de <i>Nos2</i> nas diferentes condições experimentais estudadas .....	73
Figura 22 - Quantificação do mRNA de <i>Xdh</i> nas diferentes condições experimentais estudadas .....	75

Figura 23 - Quantificação do mRNA de *Eif2b5* nas diferentes condições experimentais estudadas ..... 76

Figura 24 - Quantificação do mRNA de *Rab5a* nas diferentes condições experimentais estudadas ..... 77

Figura 25 - Quantificação do mRNA de *Lin7a* nas diferentes condições experimentais estudadas. .... 78

## RESUMO

Oliveira LS. *Perfil de expressão de genes modulados pela amilina em ilhotas pancreáticas de rato* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 105p.

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM 2) é uma doença crônica na qual os pacientes apresentam capacidade secretória de insulina inadequada para suplantarem a resistência insulínica concomitante e, como resultado, advém a hiperglicemia. Os mecanismos que explicam a diminuição da secreção insulínica não são completamente conhecidos e acredita-se que o depósito de amilina, um achado histopatológico freqüente nesses pacientes, esteja envolvido. A amilina humana é uma proteína co-secretada com a insulina capaz de se agregar e se depositar nas ilhotas pancreáticas. Ainda não está totalmente estabelecido se a toxicidade da amilina humana é mediada pelas fibrilas maduras, conforme demonstrado em trabalhos mais antigos, ou por oligômeros de tamanho intermediário, como tem sido aventado nos trabalhos mais recentes. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de genes modulados por oligômeros, bem como por fibrilas maduras de amilina, em ilhotas pancreáticas de rato. As ilhotas foram isoladas a partir de ratos Wistar, mantidas em cultura por 24 horas e a seguir tratadas com 10  $\mu$ M de oligômeros ou de fibrilas maduras de amilina por 24 horas adicionais em concentração fisiológica ou suprafisiológica de glicose. O RNA total foi extraído e utilizado para análise da expressão gênica por microarranjos de DNA. O conteúdo de RNA de alguns genes modulados nas condições experimentais estudadas também foi avaliado por RT-qPCR, a fim de validar

os resultados obtidos pela análise de microarranjos. A análise das vias significativamente afetadas pelas preparações de amilina demonstrou que, em ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose, os oligômeros de amilina modularam, entre outros, processos relacionados à Resposta ao Estresse e à Apoptose, processos não modulados pelas fibrilas maduras de amilina. Em concentração suprafisiológica de glicose, o tratamento com oligômeros de amilina deixou de modular as vias relacionadas a Estresse e Apoptose, surgindo como moduladas vias relacionadas aos processos de Regulação da endocitose e Biossíntese de óxido nítrico. Os resultados do RT-qPCR sugeriram que somente os oligômeros (e não as fibrilas maduras) de amilina modulam genes relacionados a apoptose (*Anxa1*, *Rab5a*) e ao estresse oxidativo (*Nos2* e *Xdh*), o que vai ao encontro dos estudos mais recentes que atribuem às fibrilas intermediárias um papel na citotoxicidade das células  $\beta$ . Um achado novo do presente estudo foi a identificação do mRNA do *Gipr* (receptor de polipeptídeo inibitório gástrico) como alvo de regulação negativa pelos oligômeros de amilina, o que sugere que esse possa ser um mecanismo adicional pelo qual essas fibrilas intermediárias de amilina sejam deletérias para a célula  $\beta$  pancreática.

Descritores: 1.Diabetes mellitus 2.Ilhotas pancreáticas 3.Apoptose  
4.Amilina 5.Expressão gênica 6.Microarranjos de DNA

## SUMMARY

Oliveira LS. *Gene expression profile of genes modulated by amylin in rat pancreatic islets* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 105p.

Type 2 diabetes mellitus is a chronic disease in which there is inability of pancreatic  $\beta$  cells to secrete sufficient insulin to overcome the insulin resistance in the peripheral tissues with resultant hyperglycemia. Mechanisms leading to diminished insulin secretion are not completely known and the amyloid deposit, a frequent histopathological finding in patients with type 2 diabetes, is believed to be involved. Human amylin, a protein co-secreted with insulin, is capable of aggregating and forming deposits in the pancreatic islets. It is not fully established whether amylin cytotoxicity is mediated by mature amylin fibrils or by soluble oligomers. The objective of this study was to evaluate the gene profiling modulated by oligomers as well as by mature amylin fibrils in rat pancreatic islets. The islets were isolated from Wistar rats, maintained in culture for 24 hours and then treated with 10  $\mu$ M of oligomers or mature amylin fibrils for additional 24 hour in physiologic and supraphysiologic glucose concentrations. Total RNA was extracted and used for gene expression analysis by microarray. RNA content of some modulated genes was evaluated by RT-qPCR in order to validate the results obtained from the microarray analysis. The analysis of the pathways significantly affected by the two amylin preparations demonstrated that, in islets maintained in physiological glucose concentration, amylin oligomers modulated, among others, processes related to Response to

stress and to Apoptosis, which were not modulated by mature amylin fibrils. In supraphysiological glucose concentration, treatment with oligomers did not modulate the pathways related to Stress and Apoptosis, which were replaced by processes related to Endocytosis regulation and Nitric oxide biosynthesis. RT-qPCR results suggested that only amylin oligomers modulate genes related to apoptosis (*Anxa1*, *Rab5a*) and oxidative stress (*Nos2* e *Xdh*), which is in agreement with studies indicating a role for oligomers in the cytotoxicity of  $\beta$  cells. A new finding of the present study was the identification of the *Gipr* (gastric inhibitory polypeptide receptor) mRNA as a target for downregulation by amylin oligomers, which suggests that this might be an additional mechanism by which these oligomers are deleterious to the pancreatic  $\beta$  cells.

Descriptors: 1.Diabetes mellitus 2.Pancreatic islets 3.Apoptosis 4.Amylin  
5.Gene Expression 6.Microarray

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O diabetes mellitus tipo 2

O diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) é a forma mais freqüente de diabetes, representando aproximadamente 90% de todos os casos (Zimmet, Alberti *et al.*, 2001). Uma epidemia de DM 2 é esperada tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento e o número de portadores de DM 2 deve subir de uma estimativa de 150 milhões de doentes atualmente para 220 milhões em 2.010 e 300 milhões em 2.025.

A doença ocorre em indivíduos geneticamente susceptíveis que são expostos a condições ambientais que precipitam o início da doença (Harris, Eastman *et al.*, 1997; Harris, Flegal *et al.*, 1998; Mokdad, Bowman *et al.*, 2001). Os fatores de risco para o DM 2 são: história familiar positiva, sobrepeso (IMC  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>), sedentarismo, hipertensão arterial sistêmica, HDL colesterol  $\leq 35$  mg/dL ou, também, concentrações de triglicérides  $\geq 250$  mg/dL e história de DM gestacional.

As características principais dos portadores de DM 2 são a presença de: (1) resistência à ação da insulina em tecidos periféricos, principalmente muscular, adiposo e hepático e (2) secreção defeituosa de insulina, especialmente após estímulo com glicose.

Apesar do conhecimento de como estes fatores ambientais e genéticos interagem para levar ao desenvolvimento do DM 2 ter se tornado mais claro nos últimos anos, ainda há várias questões não esclarecidas sobre os mecanismos moleculares que regulam a secreção e sensibilidade à insulina nesta doença.

A resistência à insulina se traduz em uma resposta biológica diminuída à ação da insulina em seus tecidos-alvo e pode estar presente anos antes do início da doença. Parece haver um componente genético importante na sua gênese, uma vez que parentes de primeiro grau de portadores de DM 2 têm resistência insulínica mesmo antes de se tornarem obesos (Lillioja, Mott *et al.*, 1988; Warram, Martin *et al.*, 1990).

Um importante fator implicado na patogênese do DM 2 é a elevação das concentrações de ácidos graxos livres (AGLs), gerando a lipotoxicidade. A maior lipólise que ocorre no tecido adiposo visceral em consequência da resistência insulínica causa aumento nas concentrações de AGLs plasmáticos, aumentando seu aporte para o músculo esquelético e contribuindo na diminuição da sensibilidade à insulina do tecido muscular. Um dos mecanismos envolvidos seria a competição entre os AGLs e a glicose como substratos para oxidação. O aumento do metabolismo dos AGLs leva a um aumento intra-mitochondrial de Acetil-CoA e redução da relação  $\text{NADH/NAD}^+$ , com conseqüente inibição da enzima piruvato desidrogenase. Isso gera um aumento da concentração de citrato que inibe alostericamente a fosfofrutoquinase, enzima “passo-limitante” da glicólise.

Além disso, o acúmulo de glicose-6-fosfato na célula pode inibir a atividade da enzima hexoquinase II, causando aumento nas concentrações de glicose intracelular e diminuição da utilização da glicose extracelular (Roden, Price *et al.*, 1996).

A lipotoxicidade também contribui para a fisiopatologia do DM 2 pelo fato dos AGL, principalmente o palmitato, causarem estresse de retículo

endoplasmático nas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas (Kharroubi, Ladrière *et al.*, 2004; Cnop, Welsh *et al.*, 2005) e favorecem a apoptose destas células, o que contribui para o defeito secretório encontrado nos pacientes portadores de DM 2.

Um estudo com a linhagem de células  $\beta$  originada de insulinooma de camundongos transgênicos MIN6n8a tratadas com palmitato demonstrou um aumento do índice de apoptose destas células, que diminuiu quando a célula foi tratada concomitantemente com um quelante de cálcio extracelular e com um bloqueador de canal de cálcio, sugerindo que toxicidade por lipídeos seja mediada, pelo menos em parte, por íons cálcio (Choi, Kim *et al.*, 2007).

Embora a participação da lipotoxicidade na apoptose das células  $\beta$  esteja bem estabelecida, sugere-se que a glicotoxicidade concomitante seja um pré-requisito para a lipotoxicidade (Harmon, Gleason *et al.*, 2001). A exposição crônica *in vitro* de células  $\beta$  a concentrações supra-fisiológicas de glicose causa acúmulo de lipídeos, secreção diminuída de insulina e apoptose deste tipo celular (Efanova, Zaitsev *et al.*, 1998). Sugere-se, ainda, que no DM 2, a hiperglicemia crônica induza a síntese de interleucina-1 (IL-1) pela própria célula  $\beta$ , que atuaria de maneira autócrina na indução da apoptose, em um mecanismo semelhante ao observado no DM tipo 1 (Mandrup-Poulsen, 2003).

Os efeitos adversos da hiperglicemia crônica na função da célula  $\beta$  incluem: 1) perda de sensibilidade à glicose; 2) exaustão da célula  $\beta$  e 3) citotoxicidade. A perda de sensibilidade à glicose se traduz em uma rápida e reversível incapacidade de secretar insulina após uma exposição aguda à

hiperglicemia (Kilpatrick e Robertson, 1998). A exaustão da célula  $\beta$  ocorre pela depleção dos estoques intracelulares de insulina após exposição prolongada a um secretagogo, enquanto a citotoxicidade induzida por glicose causa uma diminuição na expressão do gene da insulina associada a uma diminuição da atividade de um importante fator de transcrição, o *PDX-1* (Olson, Sharma *et al.*, 1995). A glicotoxicidade pode, ainda, induzir estresse oxidativo nas células das ilhotas pancreáticas (Tanaka, Tran *et al.*, 2002).

Outras moléculas que têm sido implicadas na fisiopatologia do DM 2 são as incretinas, hormônios polipeptídicos produzidos no trato gastrointestinal e secretados durante a absorção de nutrientes que agem nas células  $\beta$  e aumentam a secreção de insulina. O conceito incretina foi criado quando se observou que a secreção de insulina em resposta à glicose via oral é maior do que a secreção de insulina em resposta à glicose intravenosa, mesmo quando os níveis de glicose sérica são iguais. Esse efeito otimiza a resposta de insulina durante as refeições e limita a variação da glicose pós-prandial (Mcintyre, Holdsworth *et al.*, 1965).

A primeira incretina identificada foi chamada de GIP, do inglês, *gastric inhibitory polypeptide*, devido a sua capacidade de inibir a secreção ácida do estômago de cães. Posteriormente, utilizando preparações mais puras, verificou-se que este peptídeo tem a capacidade de estimular a secreção de insulina em animais e em seres humanos (Brown, Dryburgh *et al.*, 1975).

O GIP é produzido pelas células K do duodeno e jejuno proximal, e exerce suas ações quando se liga ao seu receptor específico (GIPR). Os tecidos que expressam o GIPR são: pâncreas, estômago, intestino delgado,

tecido adiposo, córtex da adrenal, pituitária, coração, testículo, células endoteliais, osso, traquéia, baço, timo, rim, tireóide a diversas regiões do sistema nervoso central (Baggio e Drucker, 2007b).

Após ser liberado pelas células enteroendócrinas, o GIP se liga a receptores específicos na célula  $\beta$  pancreática e estimula a secreção de insulina através de mecanismos que incluem aumento de AMPc, fechamento de canais de potássio ATP-dependentes, aumento de cálcio intracelular e estímulo para a excitose. O GIP também estimula a transcrição do gene da insulina, assim como a expressão de sensores de glicose nas células  $\beta$ . Ainda no pâncreas, ele inibe a apoptose de células  $\beta$  através da ativação da PI-3K/Akt-PKB e subsequente fosforilação da proteína FOXO-1, diminuição da expressão do gene pró-apoptótico *Bax* e aumento da expressão do gene anti-apoptótico *Bcl2*. Além disso, o GIP age sinergicamente com a glicose estimulando a proliferação celular e diminuindo os marcadores biológicos associados ao estresse oxidativo. A inibição do GIPR por meio de antagonistas do seu receptor ou por inativação do gene que o codifica (GIPR<sup>-/-</sup>) causa intolerância à glicose e secreção de insulina insuficiente em ratos (Tseng, Kieffer *et al.*, 1996).

Outra importante incretina é o GLP-1 (*Glucagon-Like peptide-1*). O GLP-1 é produzido e secretado pelas células L, localizadas no íleo distal e cólon, após a ingestão de alimentos, principalmente os ricos em gorduras e hidratos de carbono. Seu receptor, o GLP-1R é um receptor com sete alças transmembrânicas associado à proteína G que é expresso nos diversos tipos celulares das ilhotas pancreáticas, pulmão, coração, rim, estômago,

intestino, pituitária, pele, gânglios nervosos do nervo vago e diversas regiões do sistema nervoso central (SNC).

A ação biológica do GLP-1 sobre o pâncreas inclui a estimulação da secreção de insulina dependente de glicose, que ocorre pela ativação da atividade de adenilato ciclase e produção de AMPc que ocasiona: 1) fechamento dos canais de potássio; 2) aumento da concentração intracelular de cálcio e 3) aumento na síntese de ATP (Baggio e Drucker, 2007a).

O GLP-1 também tem a capacidade de promover a transcrição do gene de insulina, estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) e biosíntese da insulina recompondo, assim, a reserva de insulina das células  $\beta$  (Drucker, Philippe *et al.*, 1987). Além disso, o GLP-1 aumenta a transcrição do gene que codifica o fator de transcrição insulínico *PDX-1* (Wang, Cahill *et al.*, 1999), induz sua translocação do citoplasma para o núcleo da célula (Wang, Zhou *et al.*, 2001) e restaura a sensibilidade à insulina das células  $\beta$  por meio de um aumento na expressão dos transportadores de glicose e glicocinase (Holz, Kühnreiter *et al.*, 1993). A apoptose de ilhotas de rato, de células  $\beta$  purificadas e de linhagens celulares de células  $\beta$  expostas a agentes citotóxicos ou dexametasona foi inibida pelo tratamento com agonistas do GLP-1R (Buteau, El-Assaad *et al.*, 2004).

### **1.2 A Amilina e o depósito amilóide**

Além da lipotoxicidade e da glicotoxicidade, outra condição associada à apoptose de células  $\beta$  é a formação de um depósito tóxico da proteína amilina nas ilhotas pancreáticas.

A amilina, também conhecida por polipeptídeo amilóide da ilhota (IAPP: *islet amyloid polypeptide*) é uma proteína sintetizada e armazenada juntamente com a insulina nos grânulos citoplasmáticos das células  $\beta$  (Lukinius, Wilander *et al.*, 1989). A amilina é co-secretada com a insulina (Hartter, Svoboda *et al.*, 1991) numa relação molar amilina: insulina de aproximadamente 1:100 (Dechenes, Verchere *et al.*, 1998).

O gene que codifica a amilina está localizado, em seres humanos, no cromossomo 12 e sua transcrição é controlada por uma seqüência promotora que, assim como o gene da insulina, é ativada pelo fator de transcrição *PDX-1*.

A amilina é derivada de um precursor maior, chamado preproIAPP, que contém 89 aminoácidos e uma seqüência de sinal na porção amino-terminal. Uma vez que esta seqüência é removida, o peptídeo restante passa a ter 67 aminoácidos e chama-se proIAPP, que é clivado enzimaticamente pela prohormônio convertase 1 (PC1/3) e 2 (PC2), dando origem ao peptídeo maduro, que contém 37 aminoácidos (Wang, Xu *et al.*, 2001; Marzban, Trigo-Gonzalez *et al.*, 2004).

As tentativas iniciais de identificar um receptor para amilina chegaram ao receptor de calcitonina (CTR) (Chen, Armour *et al.*, 1997). De fato a amilina, bem como os peptídeos relacionados ao gene da calcitonina (CGRPs, *calcitonin gene-related peptides*) e a adrenomedulina compartilham uma similaridade estrutural com a calcitonina e, portanto ativam o mesmo receptor. Em 1998, descreveu-se que membros de um grupo previamente desconhecido de proteínas modificadoras da atividade do receptor (RAMPs:

*receptor-activity-modifying proteins*) interagem com o receptor similar ao receptor de calcitonina (CRLR: *calcitonin receptor-like receptor*) órfão e determinam sua especificidade de ligação. Assim, enquanto a combinação RAMP1/CRLR resulta em um receptor para os CGRPs, a combinação RAMP2/CRLR resulta em um receptor para a adrenomedulina (Mclatchie, Fraser *et al.*, 1998). Em 1999, dois grupos independentes reportaram que heterodímeros entre o CTR e RAMP1 ou RAMP3 ligam-se preferencialmente à amilina, podendo ser receptores funcionais para esse peptídeo (Christopoulos, Perry *et al.*, 1999; Muff, Bühlmann *et al.*, 1999). O receptor assim formado é um receptor com sete alças transmembrânicas ligado à proteína G (Hay, Christopoulos *et al.*, 2005). Apesar de não se poder descartar a existência de outros receptores para a amilina, as interações complexas ligante-receptor dos peptídeos da família da calcitonina parecem explicar as dificuldades no isolamento de um único receptor específico para a amilina.

A atividade biológica da amilina ainda não está totalmente definida, porém sabe-se que ela diminui o peristaltismo gástrico, a ingestão alimentar e a secreção pós-prandial de glucagon em ratos e humanos. (Chance, Balasubramaniam *et al.*, 1993; Kong, King *et al.*, 1997; Fineman, Weyer *et al.*, 2002; Gedulin, Jodka *et al.*, 2006; Roth, Hughes *et al.*, 2006a).

Ratos tratados com amilina por via subcutânea apresentaram menor ingestão alimentar, menor ganho de peso, menor porcentagem de gordura corporal, diminuição das concentrações plasmáticas de triglicérides, de colesterol, de insulina e de leptina e aumento da expressão do mRNA de

pró-opiomelanocortina (POMC), um importante regulador da ingestão alimentar no SNC (Roth, Hughes *et al.*, 2006b). Em estudo realizado com humanos, a amilina foi capaz de diminuir, de uma maneira dose-dependente o peristaltismo gástrico entre 50% e 100% (Young, 2005).

Apesar destes efeitos fisiológicos, a amilina humana apresenta uma tendência a se agregar rapidamente em soluções aquosas *in vitro* e se depositar nas ilhotas pancreáticas *in vivo*. Existem evidências de que as moléculas de amilina que sofrem agregação *in vivo*, tal como a amilina humana, sejam citotóxicas para as células  $\beta$ , enquanto as variedades não agregantes, como a amilina de rato, não apresentam efeito deletério.

Os mecanismos que determinam a agregação ou não da proteína *in vivo* não estão completamente esclarecidos. Sabe-se que a amilina humana, quando presente em soluções fisiológicas *in vitro*, sofre alterações físicas progressivas tempo-dependentes que incluem: a adoção de quantidades crescentes de lâminas de conformação  $\beta$  (Goldsbury, Goldie *et al.*, 2000); a formação de oligômeros de tamanhos progressivamente maiores e a agregação em fibrilas polimórficas. Ao contrário, a amilina de rato, cuja seqüência difere da amilina humana em seis aminoácidos, não forma fibrila e não é citotóxica, adotando uma conformação estável em solução fisiológica (Goldsbury, Kistler *et al.*, 1999).

Apesar de a seqüência de aminoácidos da amilina apresentar homologia entre os mamíferos, somente a amilina humana, de primatas e de gatos sofre agregação. Isto se deve a diferenças de aminoácidos na região 20 a 29 da proteína madura, conhecida por seqüência amiloidogênica. Os

resíduos nesta região são críticos para a organização em folhas  $\beta$ -pregueadas e posteriormente para a formação das fibrilas que irão formar o depósito amilóide. A presença de três aminoácidos prolina nesta região parece ser o fator protetor contra a agregação na amilina murídea (Green, Goldsbury *et al.*, 2003).

Algumas evidências sugerem que a formação de amilóide possa estar relacionada à hipersecreção de amilina associada à hiperglicemia e a outros fatores até o momento desconhecidos. Estudos utilizando camundongos transgênicos para a amilina humana demonstraram que um aumento do consumo de gorduras na dieta ou, também, alterações no metabolismo lipídico poderiam ser os fatores responsáveis pelo desenvolvimento do depósito amilóide (Verchere, D'alessio *et al.*, 1996). Além da amilina, também estão presentes no depósito amilóide o amilóide P sérico (SAP: *serum amyloid P*), a apolipoproteína E (apo E) e o proteoglicano heparan sulfato perlecan. Embora o papel destes componentes na formação do depósito amilóide não esteja completamente elucidado, a presença dessas moléculas em outros tipos de depósitos amilóides (por exemplo, na doença de Alzheimer) sugere que mecanismos semelhantes atuem na formação amilóide em diferentes processos patológicos (Marzban, Park *et al.*, 2003).

O depósito amilóide foi primeiramente descrito por Eugene Opie em 1901, como uma degeneração hialina das ilhotas pancreáticas. Diversas evidências demonstram o potencial citotóxico do depósito amilóide sobre as células  $\beta$  pancreáticas e, portanto sua contribuição na patogênese do DM 2. Ele é encontrado em até 90% dos pacientes portadores de DM 2 e sua

intensidade correlaciona-se com o grau de gravidade da doença (Höppener, Ahrén *et al.*, 2000). A formação do amilóide precede o início da hiperglicemia em primatas e está associada à redução da massa de células  $\beta$  em humanos e primatas (De Koning, Bodkin *et al.*, 1993). Além disso, o rato transgênico HIP, que carrega o gene da amilina humana sob o controle da seqüência promotora do gene da insulina, desenvolve depósito amilóide, DM 2 depois de 5 a 10 meses de idade e apresenta uma redução de aproximadamente 60% no número de células  $\beta$ , servindo como modelo experimental para o DM 2 (Butler, Jang *et al.*, 2004).

Diversos estudos já demonstraram *in vitro* o potencial citotóxico da amilina humana sobre linhagem de células  $\beta$  e ilhotas pancreáticas humanas e muríneas isoladas. Ainda não está totalmente estabelecido, no entanto, se a toxicidade da amilina humana é mediada pelas fibrilas maduras, conforme demonstrado em trabalhos mais antigos (Lorenzo, Razzaboni *et al.*, 1994) ou por oligômeros de tamanho intermediário, como tem sido aventado nos trabalhos mais recentes (Konarkowska, Aitken *et al.*, 2006a; Meier, Kaye *et al.*, 2006b).

A toxicidade dos oligômeros de amilina em ilhotas pancreáticas muríneas e humanas foi detectada com concentrações a partir de 5  $\mu$ M. O tratamento com 20  $\mu$ M de amilina madura resultou em morte celular em aproximadamente 95% das células após 24 horas de cultura. Esta toxicidade foi inibida pelo tratamento das células em cultura com actinomicina D, que é um inibidor da transcrição, sugerindo que o efeito deletério da amilina

humana é, pelo menos em parte, dependente da síntese de RNA (Lorenzo, Razzaboni *et al.*, 1994a).

Outros trabalhos realizados com outros tipos celulares também demonstraram citotoxicidade das fibrilas maduras de amilina. Células humanas da linhagem monocítica e células muríneas da microglia tratadas com fibrilas maduras de amilina demonstraram maior produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Yates, Burgess *et al.*, 2000).

Por outro lado, 24 horas de exposição de células de uma linhagem de insulinoma de ratos RINm5F a 10  $\mu$ M de amilina humana contendo poucas fibrilas maduras e muitas fibrilas intermediárias (oligômeros) resultou em maior porcentagem de morte celular quando comparada com o tratamento contendo preponderantemente fibrilas maduras, sugerindo que o potencial citotóxico da proteína esteja mais relacionado ao processo de formação do amilóide do que ao amilóide *per se* (Konarkowska, Aitken *et al.*, 2006b).

Em estudo realizado por Bai e colaboradores (Bai, Saafi *et al.*, 1999a) nas células RINm5F, a concentração de amilina recém preparada (e, portanto, rica em oligômeros) capaz de induzir a morte celular em 50% das células (EC<sub>50</sub>) foi definida em 10  $\mu$ M e o tempo de tratamento em que a morte celular atinge metade do valor máximo foi de 24 horas. .

Zhang e colaboradores demonstraram em células RINm5F e em células CM (originadas de insulinoma humano) que o tratamento com amilina humana recém preparada na concentração de 10  $\mu$ M em tempos variados induziu a atividade de caspase-8 (ativadora de apoptose) e caspase-3 (efetora de apoptose) de maneira tempo-dependente. O

tratamento destas mesmas células com amilina murídea não resultou em maior atividade das caspases, ressaltando a falta de citotoxicidade desta amilina sobre as células  $\beta$ . A ativação de apoptose mediada por amilina nestas células parece depender, pelo menos em parte, da ativação da proteína JNK1, uma vez que a inibição desta proteína, utilizando oligonucleotídeos *antisense*, diminuiu a atividade da caspase-3, mas não da caspase-8 (Zhang, Liu *et al.*, 2003d).

Além de promover a ativação das caspases-8 e -3, o tratamento de células RINm5F com amilina recém preparada promove a indução de apoptose por meio da maior expressão das proteínas p53 e p21, que estão relacionadas positivamente com o processo de apoptose, enquanto o tratamento com amilina murídea não promove qualquer alteração na expressão dessas proteínas. (Zhang, Liu *et al.*, 1999c).

Outro mecanismo pelo qual a amilina humana pode induzir morte celular é pela formação de poros na membrana celular. Em estudo utilizando concentrações de amilina humana e murídea entre 1 e 10  $\mu\text{M}$  em contato com membranas de bicamada lipídica, demonstrou-se um aumento da condutância nas membranas que sofreram tratamento com amilina humana, mas não nas que foram tratadas com amilina murídea. As membranas tratadas com amilina humana se tornaram mais permeáveis a íons como cálcio, sódio, potássio e cloro de uma maneira dose-dependente (Mirzabekov, Lin *et al.*, 1996). É sabido que o influxo de cálcio é um importante indutor de morte celular.

Em outro estudo utilizando a linhagem de células MIN6, o tratamento com 10 e 20  $\mu$ M de oligômeros de amilina humana por 24 e 48 horas induziu a formação de irregularidades e invaginações na membrana plasmática, estresse de retículo endoplasmático, diminuição da atividade do proteossoma, maior expressão do mRNA de proteínas de choque térmico (Hsp90b1, Hsp90ab1 e Hsp90aa1) e maior concentração intra-celular de cálcio. A maior expressão das proteínas de choque térmico foi reproduzida em ilhotas humanas tratadas com oligômeros de amilina humana (Casas, Gomis *et al.*, 2007a).

O processo de agregação da amilina pode, ainda, causar estresse oxidativo pela formação de peróxido de hidrogênio durante a formação das fibrilas. O estresse oxidativo causado por esse mecanismo parece ser potencializado por íons cobre (Masad, Hayes *et al.*, 2007). Também se avanta que a formação de amilóide intracelular pode causar a morte das células  $\beta$ , mas esta relação ainda não está claramente estabelecida. O efeito citotóxico da amilina poderia envolver a ruptura das membranas intracelulares pelas partículas amilóides tóxicas de tamanho intermediário. Após a morte das células, esses agregados pré-amiloigênicos de amilina poderiam ser liberados no ambiente extracelular, ficar retidos no endotélio vascular e formar os depósitos amilóides (Janson, Ashley *et al.*, 1999a).

Estudos que permitam uma melhor compreensão das bases moleculares dos efeitos da amilina sobre as células  $\beta$  podem resultar em novas estratégias terapêuticas para evitar a falência da célula  $\beta$  no DM 2 (Zhang, Liu *et al.*, 2003c).

## **2. OBJETIVO**

Investigar o perfil de expressão gênica de ilhotas pancreáticas de ratos tratadas com fibrilas maduras e com fibrilas intermediárias (oligômeros) de amilina humana em presença de concentrações fisiológica e suprafisiológica de glicose.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### ***3.1. Isolamento de ilhotas pancreáticas muríneas***

Todos os procedimentos envolvendo os animais deste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Para a realização dos experimentos, todos os materiais foram autoclavados ou, também, filtrados. Ratos Wistar machos pesando de 250 a 350 g (2 meses de idade) foram anestesiados com solução de quetamina + xilazina (0,2 mL/100 g de peso do animal) via intraperitoneal e controlados com éter etílico, em seguida foi feita a anti-sepsia do abdômen com solução de Iodo Polvidine (PVPI). A cavidade abdominal foi aberta com tesoura, o ducto biliar localizado e a ramificação que vai para o intestino delgado pinçada para evitar dispersão da enzima para o órgão (Figura 1). Um pequeno corte com tesoura no terço proximal do ducto biliar foi realizado para introdução do escalpe (25G) e após a introdução, o local foi amarrado para evitar refluxo da enzima, tomando-se o cuidado para não perfurar o ducto.

Utilizou-se uma técnica previamente descrita (Cattan, Berney *et al.*, 2001) com modificações, conforme descrição que se segue. Esta técnica apresenta boa reprodutibilidade e bom rendimento (aproximadamente 850 ilhotas por animal).

### **3.1.1 Canulação e digestão do pâncreas**

Após a injeção de 10 mL da solução de Colagenase tipo V (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) a 0,7 mg/mL diluída em solução de HBSS (*Hank's balanced salt solution*) (Figura 2), o pâncreas foi separado do intestino com uma tesoura, transferido para uma placa de Petri e lavado em solução de HBSS suplementada com antibióticos (100.000 U/mL de penicilina e 100.000 µg/mL de estreptomicina). O baço foi retirado juntamente com o excesso de tecido adiposo, linfonodos e vasos sanguíneos maiores e o foi cortado em pedaços grandes e colocado em um tubo graduado de 50 mL contendo 5 mL de HBSS. A amostra foi levada ao banho-maria a 37 °C para a digestão com a colagenase. A cada 5 minutos, a amostra foi lentamente homogeneizada e alíquotas foram retiradas e colocadas em placas de 24 poços onde eram coradas com ditizona (DTZ, Sigma), que se liga às moléculas de zinco nos grânulos de insulina e permite a visualização das ilhotas, que adquirem cor avermelhada. Com este procedimento, verifica-se o andamento do processo de digestão e o momento da interrupção (Figura 3), que deve ocorrer quando se visualizam ilhotas livres de tecido acinar (Figura 3D).



Figura 1. Localização do ducto biliar e pinçamento da ramificação que vai para o intestino delgado.



Figura 2. Canulação do ducto biliar e introdução da colagenase tipo V.

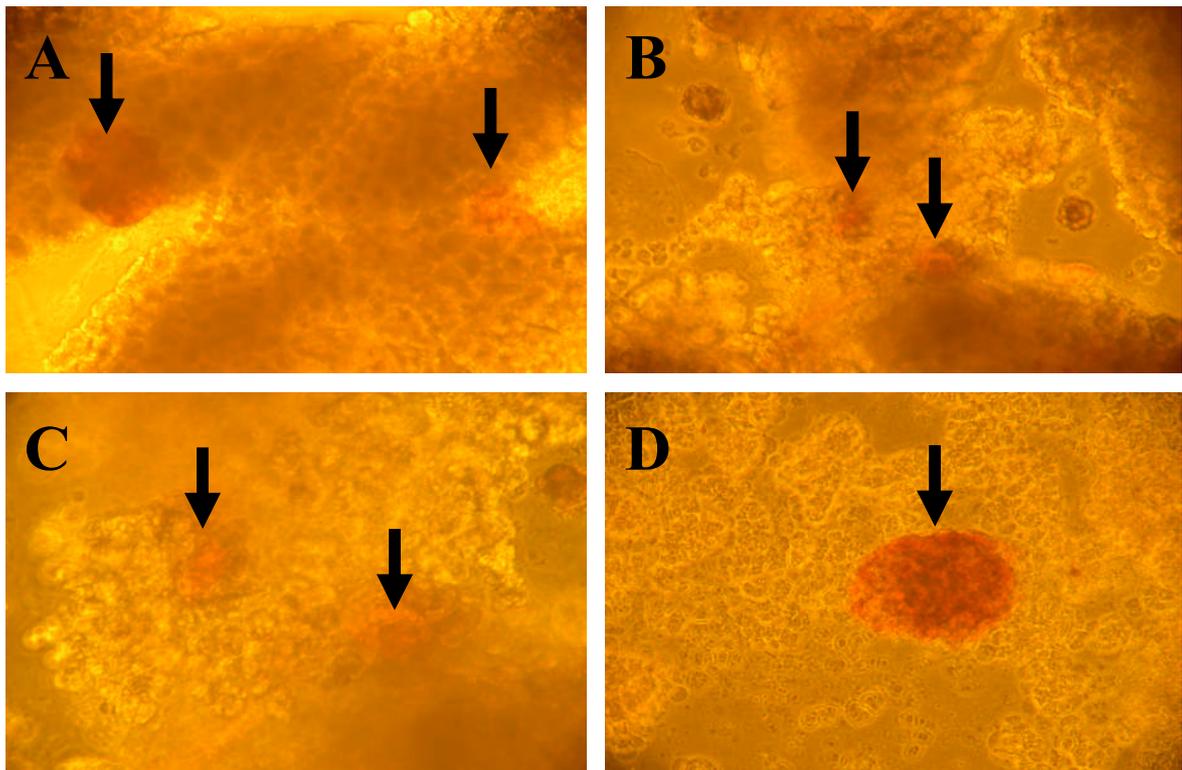


Figura 3. Padronização do tempo de digestão enzimática do pâncreas por meio da visualização das ilhotas pancreáticas coradas em vermelho pela ditizona (setas). A: 5 min de digestão; B: 10 min de digestão; C: 15 min de digestão; D: 20 min de digestão. (Aumento de 100 vezes).

### ***3.1.2 Interrupção da digestão e preparo da amostra para a purificação das ilhotas***

Após o final da etapa de digestão, que normalmente ocorre entre 18 e 25 min a 37° C, a suspensão foi transferida para um tubo graduado de 50 mL contendo 30 mL de meio de cultura RPMI 1640 e 10% de soro fetal bovino (SFB) a 4° C para interromper a ação da enzima. A amostra foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta descartável de 10 mL, o volume completado com RPMI 1640 suplementado com antibióticos e com 10% de SFB a 4°C q.s.p. 50 mL e o tubo foi centrifugado a 1.000 rpm por 5 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com pipeta de 10 mL e o precipitado de células suspenso em 30 mL de RPMI 1640 suplementado com antibióticos e 10% de SFB a 4°C. Após homogeneização, a amostra foi retirada do tubo por meio de uma pipeta graduada de 25 mL e filtrada em uma malha de aço inoxidável de 600 µm. A solução foi transferida para um novo tubo de 50 mL, e o tubo foi lavado com mais 15 mL de meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos e com 10% SFB a 4°C para evitar perda de tecido, filtrando-se na mesma malha. A amostra foi novamente centrifugada a 1.000 rpm por 5 min a 4 °C.

### ***3.1.3 Gradiente de HBSS-Ficoll para purificação das ilhotas***

O Ficoll DL tipo 400 (Sigma, E.U.A.) é retirado da geladeira e deixado a temperatura ambiente por pelo menos 30 min antes do uso. Após a retirada do sobrenadante, o precipitado de tecido foi suspenso em 8 mL de Solução de HBSS-Ficoll  $\mu = 1,110$ . A seguir, foi acrescentado,

cuidadosamente, 5 mL de uma solução de HBSS-Ficoll  $\mu = 1,096$ . Sobre esta segunda camada, foi colocado 5 mL de uma solução de HBSS-Ficoll  $\mu = 1,069$  e finalmente, 5 mL de uma solução de HBSS-Ficoll  $\mu = 1,037$ , obtendo-se o seguinte gradiente descontínuo; 1,110 – 1,096 – 1,069 – 1,037. Após centrifugação a 2.000 rpm por 20 min a 20 °C (com freios da centrífuga desligados), as ilhotas localizadas na interface entre as densidades  $\mu = 1,069/1,096$  do HBSS-Ficoll (Figura 4) foram retiradas cuidadosamente com pipeta automática de 1 mL. As ilhotas foram colocadas em um tubo de 50 mL e foi adicionado RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e 5,6 mM de glicose q.s.p. 50 mL. Após centrifugação a 1.000 rpm por 5 min a 4 °C (com os freios da centrífuga desligados), este procedimento foi repetido por três vezes para retirar todo o HBSS-Ficoll presente nas ilhotas, o sobrenadante foi retirado e o precipitado suspenso em 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e 5,6 mM de glicose. Após homogeneização, uma alíquota de 50  $\mu$ L foi corada com 25  $\mu$ L de DTZ para contagem e verificação da pureza das ilhotas isoladas na preparação (Figura 5). As ilhotas foram distribuídas em frascos de cultura de maneira que não ultrapassem a densidade considerada ideal de 4 ilhotas/cm<sup>2</sup> (De Haan, Faas *et al.*, 2004) e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Esta padronização foi utilizada em todos os experimentos e os passos descritos acima foram rigorosamente seguidos.

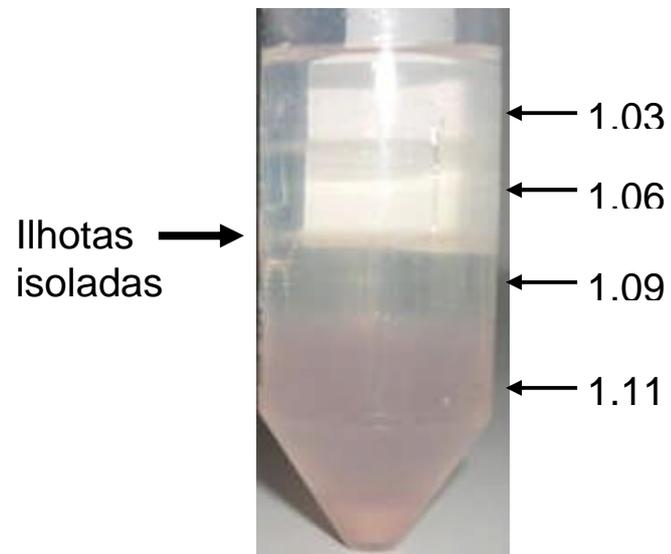


Figura 4. Gradiente descontínuo de HBSS-Ficoll, mostrando as diferentes densidades e a interface onde as ilhotas se concentram após centrifugação (seta).

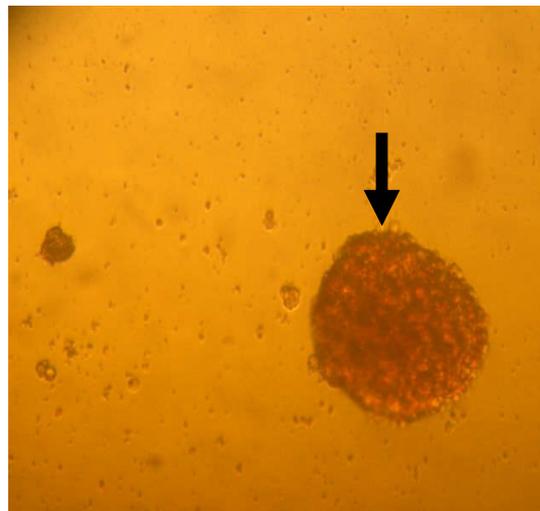


Figura 5. Ilhota purificada e corada com ditizona após centrifugação em gradiente de HBSS-ficoll (seta).

### **3.2 Avaliação da viabilidade funcional das ilhotas isoladas**

A viabilidade funcional das ilhotas isoladas pelo método descrito acima foi avaliada por meio da dosagem de insulina pela técnica de ELISA (*rat/mouse insulin ELISA kit*, Linco Research, St. Louis, EUA) no meio de cultura após um teste de estímulo com glicose.

Dez ilhotas foram semeadas em placas de 24 poços aglomerados em quadruplicata, cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos, 10% SFB e 5,6 mM de glicose durante 24, 48 e 72 horas. O ensaio para avaliação da secreção de insulina foi realizado em 1 mL de tampão de Krebs suplementado com 1,67 mM ou 16,7 mM de glicose e BSA *RIA grade* fator V (Sigma Aldrich, E.U.A). As soluções foram mantidas na estufa por 15 min antes da utilização, em um béquer, para serem gaseificadas com 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a avaliação da secreção de insulina após estímulo com glicose, as ilhotas foram retiradas e colocadas em tubos graduados de 15 mL e os poços foram lavados com 7 mL de HBSS e colocados no mesmo tubo com o objetivo de retirar todas as células dos poços. Os tubos foram centrifugados a 1.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as ilhotas foi suspenso em 1 mL de tampão de Krebs suplementado com 1,67 mM de glicose. A seguir, as células foram novamente colocadas em placas de 24 poços aglomerados. Após incubação de 2 horas para a sincronização das células na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o tampão foi retirado, as ilhotas foram novamente lavadas com 7 mL de HBSS e centrifugadas a 1.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi

descartado e o precipitado contendo as células foi suspenso em 1 mL de tampão de Krebs. Em um grupo de dez ilhotas em duplicata, o tampão de Krebs foi suplementado com 1,67 mM de glicose e no outro grupo de dez ilhotas em duplicata, o tampão de Krebs foi suplementado com 16,7 mM de glicose. Após nova incubação de 1 hora na estufa a 37°C, 500 µL do sobrenadante foram removidos com o auxílio de microscópio para não remover nenhuma célula da placa e armazenados a -20° C em tubos de 1,5 mL até o momento da dosagem. As ilhotas também foram removidas da placa, após terem sido lavadas com 7 mL de Hank's e armazenadas a -20° C em tubo 1,5 mL para posterior extração de DNA, pela técnica de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico, que foi utilizado para normalizar os valores de insulina obtidos.

Conforme pode ser observado na Figura 6, observou-se um incremento em relação ao basal estatisticamente significativo nas concentrações de insulina na solução de Krebs por ilhotas cultivadas por 24, 48 e 72 horas em meio suplementado com 16,7 mM de glicose (ilhotas estimuladas) em relação às ilhotas mantidas em 1,67 mM de glicose (ilhotas não estimuladas), o que demonstra a viabilidade funcional das ilhotas extraídas com a metodologia padronizada, especialmente após 48 e 72 horas de cultivo, período suficiente para as ilhotas “se recuperarem” do estresse associado ao processo de isolamento.

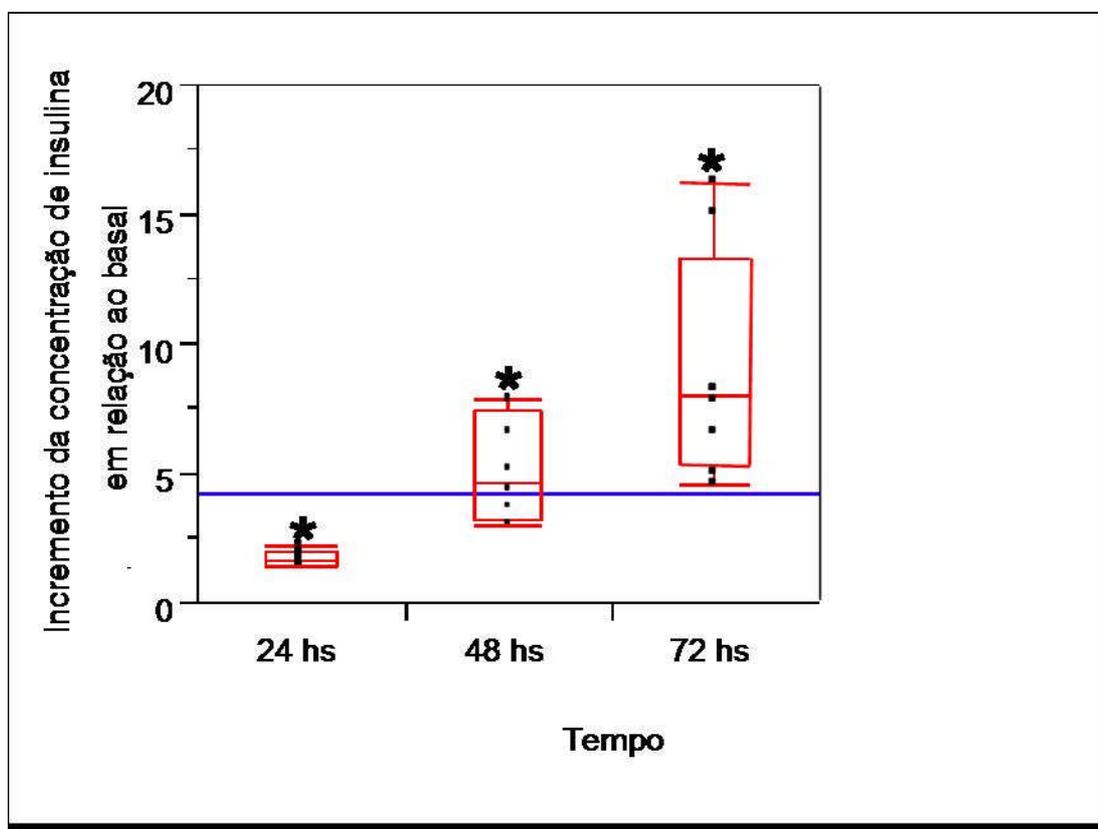


Figura 6: Incremento da concentração de insulina por ilhotas expostas a 16,7 mM de glicose (estimuladas) em relação a ilhotas mantidas em 1,67 mM de glicose (não estimuladas) após 24, 48 e 72 horas de cultivo. A linha transversal representa a média de todas as dosagens. A linha intermediária de cada *boxplot* representa a mediana das dosagens de cada condição, os limites superiores e inferiores representam os percentis 75th e 25th e as barras representam os percentis 90th e 10th, respectivamente. \* =  $P < 0,05$  em relação às ilhotas não estimuladas.

### **3.3 Preparo das amilinas**

Para a realização do tratamento das ilhotas, foi utilizada a proteína amilina humana (Bachem, Torrance, EUA) cujo liofilizado foi ressuspendido em água deionizada para uma concentração de 500  $\mu$ M. A amilina foi preparada de duas formas:

Amilina Madura (Fibrilas): amilina ressuspendida e incubada por sete dias em temperatura ambiente.

Amilina Fresca (Oligômeros): amilina ressuspendida imediatamente antes da adição ao meio de cultura para tratamento das ilhotas.

### **3.4 Tratamento das ilhotas pancreáticas com amilina**

Após o isolamento, as ilhotas foram mantidas em cultura por 24 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI 1640 suplementado com 2% de SFB e 5,6 mM de glicose em temperatura de 37°C.

Após este período, 250 ilhotas foram submetidas ao tratamento com amilina madura ou amilina fresca na concentração de 10  $\mu$ M em concentrações fisiológica (5,6 mM) ou suprafisiológica (23 mM) de glicose e incubadas por 24 horas em meio RPMI 1640, com 2% de SFB em temperatura de 37°C. As respectivas condições controle foram realizadas da mesma maneira, porém sem a adição de amilina.

Após o período de tratamento, as ilhotas foram transferidas para um tubo de 15 mL, centrifugadas por 10.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* de ilhotas foi adicionado 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EUA). As ilhotas foram vigorosamente

homogeneizadas com Trizol e armazenadas em temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA total.

Para o experimento de análise da expressão gênica por microarranjos de DNA, todas as condições foram estudadas em duplicata biológica (dois experimentos independentes). Para a confirmação por reação em cadeia da polimerase semi-quantitativa após transcrição reversa (RT-qPCR) da expressão diferencial dos genes selecionados, dois ou três experimentos independentes foram realizados.

### **3.5 Extração e controle de qualidade do RNA total**

Para a extração de RNA total das ilhotas, foi utilizado um protocolo baseado na lise das células com Trizol e subsequente isolamento do RNA total pelo método de cromatografia utilizando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, EUA).

A amostra foi descongelada lentamente e foram adicionados  $266\ \mu\text{L}$  de clorofórmio. Após nova homogeneização, a amostra foi incubada por 10 min em temperatura ambiente e centrifugada por 15 min a  $12.000\ \text{g}$  a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . A camada superior aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado um volume ( $350$  a  $600\ \mu\text{L}$ ) de etanol 70% e homogeneizado por pipetagem. A mistura foi transferida para uma coluna de cromatografia e centrifugada. Após algumas lavagens com tampão, o RNA ligado à coluna foi eluído com  $30\ \mu\text{L}$  de água livre de RNase (0,1% DEPC).

A qualidade da preparação de RNA foi avaliada quanto à integridade, quantidade e pureza. A análise da integridade foi feita por meio de

eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, sendo que as bandas relativas ao RNA ribossômico 18S e 28S deviam estar bem visíveis e íntegras. A análise da quantidade e da pureza do material foi feita por espectrofotometria no equipamento Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, EUA). Foram consideradas ótimas amostras com uma relação Abs260/Abs280 entre 1,7 e 2,1.

Os resultados das análises dos RNAs utilizados neste estudo estão demonstrados nas Tabelas 1 até 4 e exemplificados na Figura 7.

Tabela 1: Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA total do experimento 1

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Relação 260/280</b>	<b>Rendimento (<math>\mu</math>g)</b>
<b>Controle 5,6 mM – A</b>	147,8	2,02	4,43
<b>Controle 5,6 mM – B</b>	221,0	2,03	6,63
<b>Controle 23 mM – A</b>	114,0	1,92	3,42
<b>Controle 23 mM – B</b>	98,4	1,96	2,95
<b>Amilina Madura 5,6mm – A</b>	166,4	2,02	4,99
<b>Amilina Madura 5,6mm – B</b>	153,8	2,02	4,61
<b>Amilina Madura 23 mM – A</b>	199,3	2,02	5,98
<b>Amilina Madura 23 mM – B</b>	122,7	1,96	3,68
<b>Amilina Fresca 5,6 mm – A</b>	190,0	2,11	5,70
<b>Amilina Fresca 5,6 mm – B</b>	112,9	2,09	3,39
<b>Amilina Fresca 23 mM – A</b>	119,2	2,04	3,58
<b>Amilina Fresca 23 mM - B</b>	194,0	2,10	5,82

Tabela 2: Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA total do experimento 2

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Relação 260/280</b>	<b>Rendimento (<math>\mu</math>g)</b>
<b>Controle 5,6 mM – A</b>	46,3	1,91	1,39
<b>Controle 5,6 mM – B</b>	93,7	2,01	2,81
<b>Controle 23 mM – A</b>	48,5	1,87	1,46
<b>Controle 23 mM – B</b>	39,8	1,89	1,19
<b>Amilina Madura 5,6mm – A</b>	77,3	2,00	2,32
<b>Amilina Madura 5,6mm – B</b>	82,9	1,96	2,49
<b>Amilina Madura 23 mM – A</b>	26,8	1,75	0,80
<b>Amilina Madura 23 mM – B</b>	54,6	1,93	1,64
<b>Amilina Fresca 5,6 mm – A</b>	54,9	1,89	1,65
<b>Amilina Fresca 5,6 mm – B</b>	36,7	1,80	1,10
<b>Amilina Fresca 23 mM – A</b>	19,4	1,77	0,58
<b>Amilina Fresca 23 mM - B</b>	14,8	1,70	0,44

Tabela 3: Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA total do experimento 3

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Relação 260/280</b>	<b>Rendimento (<math>\mu</math>g)</b>
<b>Controle 5,6 mM – A</b>	223,5	2,10	6,7
<b>Controle 5,6 mM – B</b>	136,3	2,09	4,1
<b>Controle 23 mM – A</b>	150,7	2,08	4,5
<b>Controle 23 mM – B</b>	130,4	2,06	3,9
<b>Amilina Madura 5,6mm – A</b>	88,0	2,08	2,6
<b>Amilina Madura 5,6mm – B</b>	158,8	2,08	4,8
<b>Amilina Madura 23 mM – A</b>	69,4	2,04	2,1
<b>Amilina Madura 23 mM – B</b>	130,6	2,05	3,9
<b>Amilina Fresca 5,6 mm – A</b>	100,3	2,06	3,0
<b>Amilina Fresca 5,6 mm – B</b>	87,9	2,05	2,6
<b>Amilina Fresca 23 mM – A</b>	83,4	2,08	2,5
<b>Amilina Fresca 23 mM – B</b>	87,0	2,08	2,6

Tabela 4: Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA total do experimento 4

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Relação 260/280</b>	<b>Rendimento (<math>\mu</math>g)</b>
<b>Controle 5,6 mM – A</b>	52,4	1,96	1,6
<b>Controle 5,6 mM – B</b>	41,3	1,95	1,2
<b>Controle 23 mM – A</b>	35,8	2,00	1,1
<b>Controle 23 mM – B</b>	40,6	1,99	1,2
<b>Amilina Madura 5,6mm – A</b>	45,8	1,96	1,4
<b>Amilina Madura 5,6mm – B</b>	42,6	2,00	1,3
<b>Amilina Madura 23 mM – A</b>	34,1	1,96	1,0
<b>Amilina Madura 23 mM – B</b>	31,8	1,92	1,0
<b>Amilina Fresca 5,6 mm – A</b>	25,0	1,70	0,8
<b>Amilina Fresca 5,6 mm – B</b>	16,6	1,93	0,5
<b>Amilina Fresca 23 mM – A</b>	15,4	1,71	0,5
<b>Amilina Fresca 23 mM – B</b>	17,3	1,78	0,5

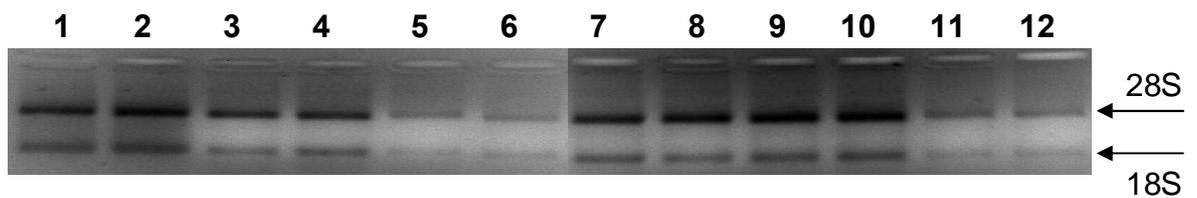


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo dos RNAs do experimento 4, mostrando as bandas referentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal.

1 e 2 = Controle 5,6 mM;

3 e 4= Amilina Madura 5,6 mM;

5 e 6 = Amilina Madura 23 mM;

7 e 8 = Controle 23 mM;

9 e 10= Amilina Fresca 23 mM;

11 e 12= Amilina Fresca 23 mM

### **3.6 Amplificação e marcação do RNA total**

Para a realização dos experimentos de microarranjo são necessários 10 µg de RNA. Para conseguir esta quantidade de RNA, foi realizada uma reação para amplificação concomitantemente com a marcação com biotina deste RNA. Para esta reação foi utilizado o protocolo de um conjunto de reagentes (*MessageAmp II aRNA Amplification Kit*, Ambion, Austin, EUA) que consiste resumidamente em incubar 1 µg de RNA total com 1 µL de *primer* T7 oligo-dT por 10 min a 70°C e depois resfriar em gelo. Após esta incubação, adiciona-se um mistura contendo 1 µL de transcriptase reversa, 4 µL de nucleotídeos (dNTPs), 2 µL de tampão de reação 10x e 1 µL de um inibidor de RNase. Um nova incubação foi realizada por 2 horas a 42°C, para a síntese da primeira fita do cDNA.

A partir da primeira fita, foi realizada uma segunda reação para a síntese da segunda fita de cDNA, adicionando-se 2 µL de DNA polimerase, 10 µL de tampão de reação 10x, 4 µL de um *pool* de nucleotídeos (dNTPs), 1 µL de RNase H e 63 µL de água livre de RNase. Após incubação por 2 horas a 16°C, o cDNA foi purificado em uma coluna de cromatografia e utilizado na reação de transcrição *in vitro*.

Na reação de transcrição *in vitro*, 16 µL do cDNA foram incubados com uma mistura contendo RNA polimerase, 7,5 mM dos nucleotídeos: ATP, CTP, GTP, 4,9 mM do nucleotídeo UTP, 4,0 µL de tampão de reação concentrado 10X e 2,6 mM de nucleotídeo UTP marcado com biotina (Biotin-11-UTP, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, EUA), por 12 horas a 37°C.

O RNA amplificado foi purificado por cromatografia e analisado quanto a sua quantidade e qualidade, da mesma maneira que o RNA total. Os resultados estão descritos na Tabela 5 e ilustrados nas Figuras 8a e 8b.

Tabela 5: Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA amplificadas e utilizadas no experimento de microarranjos de DNA. Em todas as reações, foram utilizadas as mesmas quantidades iniciais de RNA (1 µg)

<b>Amostra</b>	<b>Relação pré-amplificação</b>	<b>Relação pós-amplificação</b>	<b>Rendimento (µg)</b>
<b>Controle 5,6 mM -1</b>	2,02	1,81	53,5
<b>Controle 5,6 mM - 2</b>	2,03	1,79	54,2
<b>Controle 23,0 mM - 1</b>	1,92	2,10	25,4
<b>Controle 23,0 mM - 2</b>	1,96	2,07	26,0
<b>Amilina Madura 5,6 mM - 1</b>	2,02	1,81	43,5
<b>Amilina Madura 5,6 mM - 2</b>	2,02	1,82	39,4
<b>Amilina Madura 23 mM - 1</b>	2,02	1,81	41,7
<b>Amilina Madura 23 mM – 2</b>	1,96	1,80	33,7
<b>Amilina Fresca 5,6 mM - 1</b>	2,11	2,10	35,4
<b>Amilina Fresca 5,6 mM - 2</b>	2,09	2,13	34,5
<b>Amilina Fresca 23 mM - 1</b>	2,04	2,07	34,2
<b>Amilina Fresca 23 mM – 2</b>	2,10	2,09	42,9

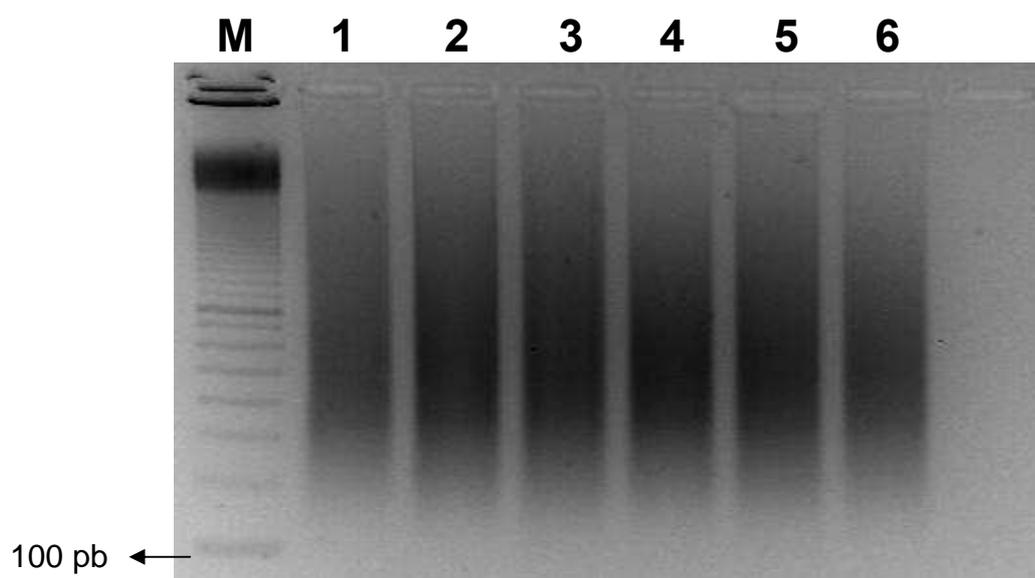


Figura 8a: Eletroforese em gel de agarose do RNA amplificado, mostrando um “*smear*” de até 250 pares de bases. **M** = marcador de peso molecular (100 pb); **1**: Controle 5,6 mM -1; **2**: Controle 5,6 mM - 2; **3**: Amilina Madura 5,6 mM -1; **4**: Amilina Madura 5,6 mM - 2; **5**: Amilina Madura 23 mM-1; **6**: Amilina Madura 23 mM - 2.

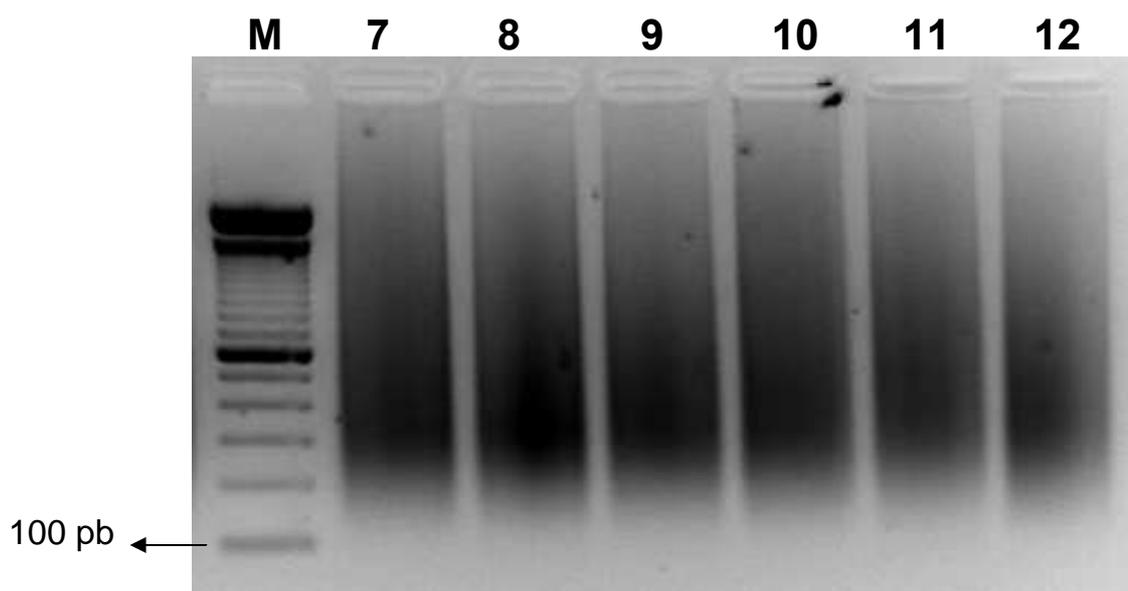


Figura 8b: Eletroforese em gel de agarose do RNA amplificado, mostrando um “smear” de até 250 pares de bases. M = marcador de peso molecular (100 pb); 7: Controle 23 mM -1; 8: Controle 23 mM - 2; 9: Amilina Fresca 5,6 mM -1; 10: Amilina Fresca 5,6 mM - 2; 11: Amilina Fresca 23 mM-1; 12: Amilina Fresca 23 mM - 2

### **3.7 Análise dos genes diferencialmente expressos por microarranjos de DNA**

Para análise do perfil de expressão gênica de ilhotas pancreáticas de ratos tratadas com fibrilas maduras e com fibrilas intermediárias (oligômeros) de amilina humana, foi utilizado um sistema de análise de expressão gênica denominado *Code Link Expression Bioarray* (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, EUA). Este sistema permite o monitoramento dos níveis de expressão de múltiplos mRNAs simultaneamente.

O sistema é construído em uma lâmina de vidro coberta com sondas de 30 bases que são covalentemente fixadas a uma matriz tridimensional de poliacrilamida por meio da sua extremidade 5' para facilitar a hibridização com os RNAs amplificados e marcados com biotina. Esse sistema tem alta sensibilidade, sendo capaz de detectar um único transcrito por célula.

Para a hibridização, 10 µg de RNA marcado com biotina foram fragmentados em tampão de fragmentação por 20 min a 94°C e, em seguida, resfriado em gelo por 5 min. A seguir, 250 µL da amostra foram aplicados sobre a lâmina contendo as sondas, e a lâmina foi mantida sob agitação de 300 rpm por 18 horas a 37°C.

Após a hibridização as lâminas foram lavadas inicialmente em tampão TNT 0,75x (0,10 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20) por 1 hora a 46°C. Após a primeira lavagem as lâminas foram incubadas com solução de Estreptavidina+Cy5 por 30 min em temperatura ambiente; em seguida foram realizadas três lavagens com duração de 5 min cada, com tampão TNT 1x em temperatura ambiente, ao final da terceira lavagem, foi realizada uma

lavagem final com solução 0,1x SSC/ 0,05% Tween 20 em temperatura ambiente por 30 s.

As lâminas foram escaneadas e excitadas em um comprimento de onda de 632 nm utilizando o escaner GenePix 4000B (Axon Instruments/Molecular Devices, Union City, EUA). O resultado da hibridização das amostras provenientes das ilhotas tratadas com fibrilas maduras e com fibrilas intermediárias foi comparado ao resultado da hibridização das respectivas amostras controle, conforme ilustra a Figura 9.

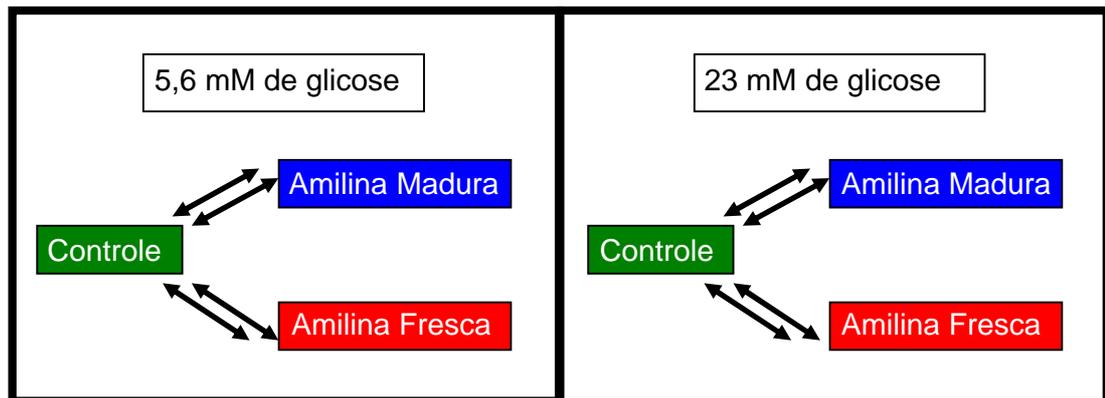


Figura 9: Delineamento experimental da análise por microarranjo de DNA. Cada condição experimental foi realizada em duplicata biológica. Os resultados das hibridizações das ilhotas tratadas com os dois tipos de amilina foram comparados com as respectivas ilhotas controle.

A análise dos experimentos de microarranjo de DNA foi realizada utilizando o programa *Codelink*. A fluorescência emitida por cada gene foi quantificada e seu valor dividido pela mediana de todos os genes presentes na lâmina, a fim de prover um parâmetro escalonado e comparável entre os diversos ensaios. As intensidades foram expressas como o  $\log_2$  da relação entre as condições de tratamento, ou seja, cada uma das duas formas de amilina testada e seu respectivo controle (sem adição de amilina, porém com a mesma concentração de glicose). Medidas confiáveis foram definidas como aquelas consideradas como “G – Good” pelo programa. Genes modulados foram definidos como aqueles que se adequassem aos critérios acima mencionados e tivessem um  $\log_2$  da relação menor que -1,5 ou maior que 1,5.

A análise de ontologia gênica foi analisada pelo programa GenMAPP para a interpretação dos dados quanto à função, processos e componentes moleculares de acordo com o *Gene Ontology* (GO) *Consortium*. Todas as vias da base de dados do GenMAPP foram analisadas para determinar se um número significativo de genes foi modulado dentro de uma determinada via.

### **3.8 Confirmação da expressão diferencial de alguns genes**

A confirmação da expressão diferencial de alguns genes nas condições experimentais estudadas foi realizada por RT-qPCR. Para cada gene a ser confirmado, foram desenhados *primers* em exons diferentes, a fim de evitar a amplificação de DNA genômico (Tabela 6). Todos os *primers*

foram construídos com auxílio do programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu>). Como normalizador das reações, foi utilizado o gene  $\beta$ -actina, que mostrou um coeficiente de variação entre todas as amostras analisadas de 8%, demonstrando que sua expressão não foi significativamente modulada nas diferentes condições experimentais avaliadas.

Para a síntese de cDNA, foram utilizados 500 ng de RNA total e seguido o protocolo do conjunto de reagentes *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Invitrogen), no qual o RNA total é incubado com 2,5  $\mu$ M de oligo(dT)<sub>20</sub>, 2,5 ng/ $\mu$ L de *primers* randômicos, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, mistura de nucleotídeos e transcriptase reversa.

Esta mistura foi incubada a 25°C por 10 min e depois a 50°C por 30 min. A reação foi finalizada com o aquecimento do tubo a 85°C por 5 min e, em seguida, com sua colocação no gelo. Para a degradação da fita de RNA da molécula híbrida (RNA:cDNA), a amostra foi tratada com 2 U de RNase H por 20 min a 37°C. Ao final do processo, o cDNA foi diluído 1:5 com água livre de nuclease e armazenado a -20 °C até sua utilização nas reações de PCR.

As reações de PCR foram realizadas com o conjunto de reagentes *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen) e processadas no equipamento Rotor Gene RG-5000 (Corbett Research, Sydney, Austrália) conforme o seguinte protocolo:

- 12,5  $\mu$ L de reagente para PCR contendo: Taq DNA polymerase, fluoróforo SYBR, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dATP, 800  $\mu$ M cUTP e uracil DNA glicosilase (UDG).

- 0,2  $\mu$ M de *primer Forward*

- 0,2  $\mu$ M de *primer Reverse*

- 2,5  $\mu$ L de cDNA

Água bidestilada e deionizada q.s.p 25,0  $\mu$ L.

As reações de PCR foram realizadas com as seguintes temperaturas e tempos:

Desnaturação inicial: 95 °C 10 min

40 ciclos compostos por:

Desnaturação: 95° C 15 s

*Annealing*: vide Tabela 7 45 s

Extensão: 72 °C 90 s

A fluorescência emitida pelas dupla-fitas formadas durante os ciclos de amplificação foi detectada sempre no final de etapa de extensão. Para cada gene-alvo e para a  $\beta$ -actina, foi determinada a melhor temperatura de *annealing*. A temperatura ideal é aquela em que não há amplificação inespecífica durante a reação de PCR. Para avaliar a presença ou não de amplificação inespecífica, foi realizada uma curva de *melting* para cada um dos pares de *primers* utilizados na amplificação dos genes selecionados para confirmação.

A curva de *melting* consiste em aquecer a amostra gradativamente e medir a emissão de fluorescência em tempo real. Com o aumento da temperatura, as dupla-fitas de DNA se separam e a intensidade de fluorescência diminui. Caso tenha ocorrido apenas a amplificação do gene em estudo, haverá somente um pico de decréscimo na fluorescência

medida. Esta análise é importante porque a metodologia utilizada não discerne entre a fluorescência emitida pelo cDNA alvo daquela emitida por outras fontes como por exemplo: dímeros de *primers* e amplificação não específica.

As curvas de *melting* para amplificação dos genes selecionados estão ilustradas na Figura 10.

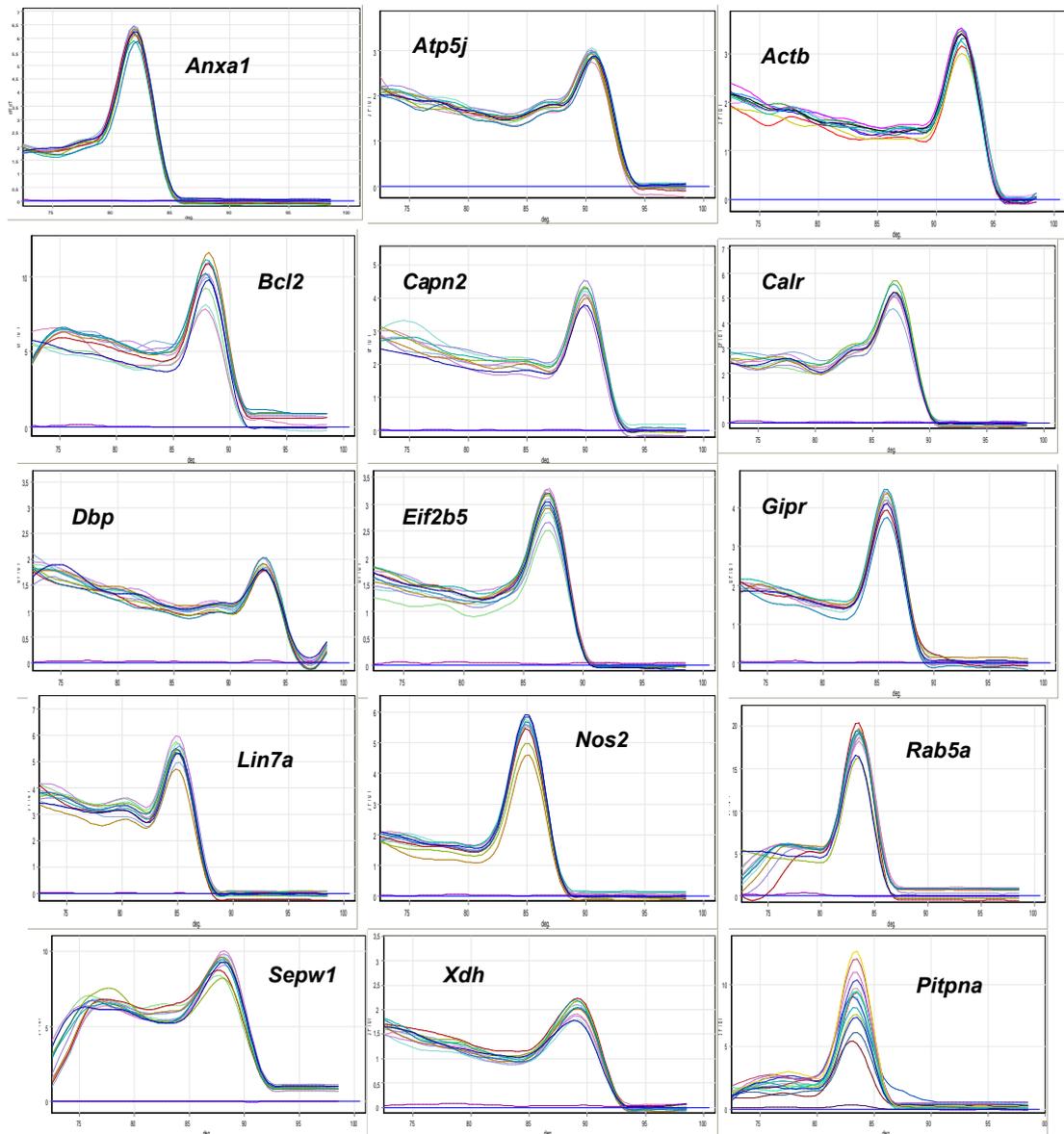


Figura 10: Avaliação da especificidade das reações de RT-qPCR, evidenciada pela curva de *melting*, para estudo de genes selecionados para a confirmação dos resultados obtidos nos experimentos de microarranjos de DNA.

Também foi realizado um experimento para calcular a eficiência de amplificação de cada um dos pares de *primers*. Uma amostra de cDNA de ilhotas foi diluída 1:10, 1:100 e 1:1000 e uma PCR foi realizada em duplicata com cada um dos pares de *primers*, em cada uma destas diluições, além da amostra sem diluição (pura). Foi construído um gráfico do valor de Ct (ponto em que o sinal emitido pela reação cruza o limiar de detecção) de cada diluição de cDNA em função da diluição da amostra, conforme exemplifica a Figura 10. A inclinação (*slope*) desta reta foi utilizada para o cálculo de eficiência de amplificação conforme a fórmula:

$$\text{Eficiência de amplificação} = 10^{(-1/\text{SLOPE})}$$

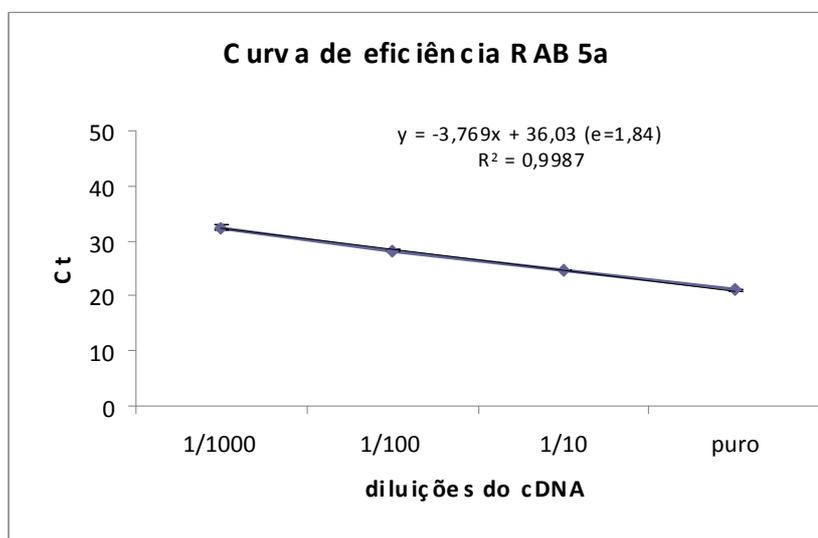


Figura 11: Gráfico representativo da eficiência de amplificação de um dos genes avaliado por RT-qPCR.

Tabela 6: Seqüência dos *primers* utilizados nos experimentos de RT-qPCR com respectivas temperaturas de *annealing*, tamanho do produto amplificado e eficiência de amplificação

Gene	Seqüência (5' → 3)'	Temperatura (°C)	Tamanho (pb)	Eficiência
<i>B-Act</i>	F: CAACCTTCTTGCAGCTCCTC R: TCCATATCGTCCCAGTTGGT	58	300	1,92
<i>B-Act</i>	F: CAACCTTCTTGCAGCTCCTC R: TCCATATCGTCCCAGTTGGT	59	300	1,90
<i>B-Act</i>	F: CAACCTTCTTGCAGCTCCTC R: TCCATATCGTCCCAGTTGGT	60	300	1,89
<i>Calr</i>	F: CTCCTGCTTGGCCTCCTC R: CCCGTAGAATTTGCCAGAAC	58	156	1,88
<i>Anxa1</i>	F: GGATTGAAGGAAGGGTAGGG R: CCCTGGAAGACAAGGCAATA	58	170	1,93
<i>Pitpna</i>	F: GACAGAGCAGACCACAACGA R: ACTGGCTTCAGCCACAGAGT	58	152	1,98
<i>ATP5j</i>	F: GAGCGTCAACGACTGAAG R: GAGACTGCTGACCGAAGGAC	58	200	1,89
<i>Bcl2</i>	F: ACATCGCTCTGTGGATGAC R: ACTTGTGGCCCAGGTATG	57	204	1,85
<i>Capn2</i>	F: CTTCCAGGATCCTTCCTTCC R: TCGAGCCAGGATTTCTTCAT	58	235	2,00
<i>Gipr</i>	F: CCGCGCTTTTCGTATCC R: CCACCAAATGGCTTTGACTT	56	90	1,90
<i>Nos2</i>	F: CAGGCTTGGGTCTTGTTAGC R: GGAATAGCACCTGGGGTTTT	58	189	1,79
<i>Xdh</i>	F: TCTCAGCCCTCAAGACCACT R: AAGGTGGGTCCAGTTTACC	58	234	1,93
<i>Eif2b5</i>	F: CCTCCAGGCAGTTTTAGTGG R: TTCCAGCAGCAAAAGACAAA	58	168	2,04
<i>Sepw1</i>	F: GAGGTGATGGCTACGTGGAT R: ATCTCTGGCCTGACTTGGTG	60	218	1,97
<i>Rab5a</i>	F: AGTCTGGTGCTTCGCTTTGT R: TACACAATATGGCGGCTTG	58	197	1,84
<i>Dbp</i>	F: GAAACAGCAAGCCCAAAGAA R: GTCCCCGAAAGGCAAAGT	58	230	1,84
<i>Lin7a</i>	F: TGATGGGAGGAAAGGAACAG R: TCTGACGACCAGCTTCACAC	58	197	1,86

A semelhança das eficiências de amplificação dos genes-alvo e do gene controle interno ( $\beta$ -actina) permitiu a utilização do seguinte modelo matemático para o cálculo da expressão relativa de cada amostra:

Expressão Relativa =  $2^{(\text{Delta Ct})}$ , onde:

Delta Ct = Ct do gene de referência ( $\beta$ -actina) – Ct do gene em estudo (Yuan, Reed *et al.*, 2006).

Cada experimento independente consistiu de uma duplicata biológica formada por um *pool* de ilhotas isoladas de pelo menos 4 ratos. Para os experimentos de RT-qPCR, cada uma das duplicatas biológicas foi realizada em duplicata técnica, totalizando 4 análises para cada condição estudada.

As expressões dos genes *Atp5j*, *Bcl2*, *Pitpna*, *Anxa1*, *Calr*, *Capn2* foram estudadas em quatro experimentos independentes, o gene *Gipr* foi estudado em três experimentos independentes e os genes *Nos2*, *Sepw1*, *Eif2b5*, *Rab5a*, *Dbp*, *Xdh* e *Lin7a* foram avaliados em dois experimentos independentes.

### **3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

#### **3.9.1 Experimento de microarranjo de DNA**

Para a análise das vias moduladas pelos tratamentos com as diferentes formas de amilina, foi calculado o escore Z, que expressa a frequência de genes que preenchem os critérios do GO. Ele foi comparado com a hipótese de nulidade para a frequência esperada de genes modulados, que é baseada no número total de genes presentes na plataforma do microarranjo.

O escore Z foi calculado pela divisão da diferença entre o número observado de genes que cumprem os critérios propostos em uma determinada via do GO e o número esperado, baseado no total de genes presentes no microarranjo; pelo desvio padrão do número observado de genes modulados em uma distribuição hipergeométrica, conforme equação abaixo:

$$Z = \frac{\left( r - n \frac{R}{N} \right)}{\sqrt{n \left( \frac{R}{N} \right) \left( 1 - \frac{R}{N} \right) \left( 1 - \frac{n-1}{N-1} \right)}}$$

, onde:

N= número de genes avaliados no microarranjo

R=número de genes que se enquadram nos critérios de modulação

n= número de genes em uma determinada via

r= número de genes que se enquadram nos critérios em uma determinada via.

Um escore Z positivo indica que mais genes cumpriram os critérios de modulação do que seria esperado pelo acaso em uma determinada via, ou seja, aquela via foi modulada.

### **3.9.2 Confirmação dos genes diferencialmente expressos**

Para a análise estatística dos experimentos de RT-qPCR foi utilizado o programa SPSS versão 13. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado na comparação entre dois grupos, enquanto o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado na comparação de mais de dois grupos. A hipótese de

nulidade foi rejeitada sempre que o valor de  $P$  era menor que 5%. Nas figuras, os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Vias biológicas relevantes

A análise do GO identificou várias vias que apresentaram escore Z significativo (positivo >2) correlacionadas com processos e componentes celulares. Para cada uma das condições experimentais estudadas, as vias moduladas estão apresentadas nas Tabelas 7 a 10. A coluna “Lista” enumera a quantidade de genes que compõem cada uma das vias no GO. A coluna “Lâmina” enumera a quantidade de genes daquela via representados na plataforma de microarranjos utilizada. A coluna “Regulados” enumera a quantidade de genes daquela via que sofreu modulação. O sinal > indica que aquela via está contida na via descrita na linha imediatamente acima.

Tabela 7: Processos e componentes celulares modulados após tratamento de ilhotas pancreáticas com fibrilas de amilina madura em concentração fisiológica de glicose

<b>GO</b>	<b>Processo celular</b>	<b>Lista</b>	<b>Lâmina</b>	<b>Regulados</b>	<b>Z-escore</b>
45934	<i>Regulação negativa do metabolismo de ácidos nucléicos</i>	201	135	6	2,50
16481	<i>&gt; Regulação negativa da transcrição</i>	187	126	6	2,69
45892	<i>&gt;&gt; Regulação negativa da transcrição dependente de DNA</i>	132	85	5	3,01
6508	<i>Proteólise</i>	546	353	11	2,12
9056	<i>Processos Catabólicos</i>	413	277	11	2,99
44248	<i>&gt; Processos Catabólicos celulares</i>	322	205	8	2,48
44265	<i>&gt;&gt; Processos Catabólicos celulares de macromoléculas</i>	190	115	5	2,22
<b>Componente celular</b>					
<i>Nenhum componente específico</i>					

Tabela 8: Processos e componentes celulares modulados após tratamento de ilhotas pancreáticas com oligômeros de amilina em concentração fisiológica de glicose

<b>N° GO</b>	<b>Processo celular</b>	<b>Lista</b>	<b>Lâmina</b>	<b>Regulados</b>	<b>Z-escore</b>
6950	<i>Resposta ao Estresse</i>	595	457	48	3,35
1666	<i>&gt; Resposta a Hipóxia</i>	48	43	9	3,74
7028	<i>Organização de citoplasma e biogênese</i>	13	10	3	2,94
7267	<i>Sinalização célula-célula</i>	278	215	24	2,65
45168	<i>&gt; Sinalização célula-célula durante destino celular</i>	12	11	3	2,73
8219	<i>Morte celular</i>	470	346	34	2,38
12501	<i>&gt; Morte celular programada</i>	458	335	34	2,57
6915	<i>&gt;&gt; Apoptose</i>	454	333	34	2,61
43281	<i>&gt;&gt;&gt; Regulação da atividade de caspases</i>	29	23	5	2,80
42981	<i>&gt;&gt;&gt; Regulação de apoptose</i>	338	251	26	2,35
8632	<i>&gt;&gt;&gt; Programa apoptótico</i>	38	30	5	2,18
<b>Componente celular</b>					
44432	<i>Retículo endoplasmático</i>	101	68	10	2,65
5789	<i>&gt; Membrana de retículo endoplasmático</i>	82	56	9	2,81
31227	<i>&gt;&gt; Intrínseco à membrana do retículo endoplasmático</i>	36	25	5	2,66

Tabela 9: Processos e componentes celulares modulados após tratamento de ilhotas pancreáticas com fibrilas de amilina madura em concentração suprafisiológica de glicose

<b>N° GO</b>	<b>Processo celular</b>	<b>Lista</b>	<b>Lâmina</b>	<b>Regulados</b>	<b>Z-escore</b>
7584	<i>Resposta a nutriente</i>	9	8	4	2,20
5996	<i>Processos metabólicos de monossacarídeos</i>	128	89	30	3,47
6006	<i>&gt; Metabolismo de glicose</i>	102	65	21	2,67
44257	<i>Catabolismo de proteínas</i>	96	65	23	3,30
6511	<i>&gt; Catabolismo de proteínas dependente de ubiquitina</i>	90	60	22	3,42
6749	<i>Metabolismo de glutathiona</i>	12	10	5	2,46
6750	<i>&gt; Biossíntese de glutathiona</i>	4	4	3	2,82
6800	<i>Metabolismo de Espécies Reativas de Oxigênio</i>	65	45	16	2,77
6979	<i>&gt; Resposta ao estresse oxidativo</i>	51	33	12	2,49
6119	<i>Fosforilação oxidativa</i>	50	33	13	2,93
6974	<i>Resposta de dano ao DNA</i>	153	111	30	2,08
<b>Componente celular</b>					
5739	<i>Mitocôndria</i>	624	473	135	5,27
44431	<i>Complexo de Golgi</i>	120	86	26	2,58
5634	<i>Núcleo</i>	2234	1429	309	2,50
502	<i>Proteossomo</i>	23	15	5	2,04

Tabela 10: Processos e componentes celulares modulados após tratamento de ilhotas pancreáticas com oligômeros de amilina em concentração suprafisiológica de glicose

<b>N° GO</b>	<b>Processo celular</b>	<b>Lista</b>	<b>Lâmina</b>	<b>Regulados</b>	<b>Z-score</b>
45807	Regulação de endocitose	14	8	3	4,66
1558	Regulação de crescimento celular	78	59	7	2,93
6809	Biossíntese de óxido nítrico	11	8	3	4,68
14047	Secreção de glutamato	49	40	5	5,58
<b>Componente celular</b>					
5887	Membrana celular	228	160	12	2,10
8021	Vesículas	50	32	6	4,10

#### **4.2 Genes diferencialmente expressos**

Os genes identificados como diferencialmente expressos em cada uma das quatro condições experimentais estudadas em relação aos respectivos controles estão demonstrados nas Tabelas 11, 12, 13 e 14.

Tabela 11: Genes diferencialmente expressos após tratamento de ilhotas pancreáticas com fibrilas de amilina madura em concentração fisiológica de glicose

ID	Sigla	Nome	Varição na magnitude de expressão
GE19807	<i>Cpb1</i>	<i>Carboxypeptidase B1</i>	-3,47
GE13076	<i>Ctrl</i>	<i>Chymotrypsin-like</i>	-2,21
GE20264	<i>Cpa1</i>	<i>Carboxypeptidase A1</i>	-1,9
GE1221744	<i>Prss2</i>	<i>Pancreatic trypsin 2</i>	-1,79
GE1137686	<i>Gp2</i>	<i>Secretory granule membrane glycoprotein</i>	-1,69
GE21191	<i>Sycp2</i>	<i>Synaptonemal complex protein 2</i>	-1,50
GE1182776	<i>Slco4a1</i>	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 4a1</i>	2,46
GE16345	<i>Ifit3</i>	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i>	2,91
GE20844	<i>Ccl5</i>	<i>Chemokine ligand 5</i>	3,41
<b>GE1142049</b>	<b><i>Gipr</i></b>	<b><i>Gastric inhibitory polypeptide receptor</i></b>	<b>-2,16</b>
<b>GE20380</b>	<b><i>Xdh</i></b>	<b><i>Xanthine dehydrogenase</i></b>	<b>1,82</b>

Tabela 12: Genes diferencialmente expressos após tratamento de ilhotas pancreáticas com oligômeros de amilina em concentração fisiológica de glicose

ID	Sigla	Nome	Varição na magnitude de expressão
GE13920	<i>Tyrobp</i>	<i>Tyro protein tyrosine kinase binding protein</i>	-1,88
GE13922	<i>Snrpd1</i>	<i>Small nuclear ribonucleoprotein D1</i>	-1,60
GE17192	<i>Itpkc</i>	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C</i>	1,50
GE1133234	<i>Yt521</i>	<i>Splicing factor YT521-B</i>	1,50
GE17761	<i>Rreb1</i>	<i>Ras responsive element binding protein 1</i>	1,50
<b>GE1276782</b>	<b><i>Capn2</i></b>	<b><i>Calpain 2</i></b>	<b>1,58</b>
GE1143282	<i>Eef1d</i>	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1 delta</i>	1,63
<b>GE21559</b>	<b><i>Atp5jd</i></b>	<b><i>ATP synthase subunit d</i></b>	<b>1,65</b>
GE1161276	<i>Ania11</i>	<i>Activity and neurotransmitter-induced early gene 11</i>	1,66
GE1218180	<i>Ac2-190</i>	<i>Ac2-190</i>	1,70
GE1281253	<i>Krt19</i>	<i>Keratin 19</i>	1,81
GE17580	<i>Capg</i>	<i>Capping protein, gelsolin-like</i>	1,95
<b>GE20046</b>	<b><i>Anxa1</i></b>	<b><i>Annexin 1</i></b>	<b>1,95</b>
GE1284981	<i>R3hcc1</i>	<i>R3H domain and coiled-coil containing 1</i>	1,96
GE1157475	<i>Hnrnph1</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1</i>	1,98
<b>GE15024</b>	<b><i>Rab5a</i></b>	<b><i>RAB5A, member RAS oncogene family</i></b>	<b>2,36</b>
GE15278	<i>Re4</i>	<i>Epididymal secretory protein 4</i>	2,45
GE21261	<i>Cdh1</i>	<i>Cadherin 1</i>	2,60
GE1112133	<i>Ranbp5</i>	<i>RAN binding protein 5</i>	2,96
GE1202898	<i>Atp5e</i>	<i>ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, epsilon subunit</i>	2,99
<b>GE1137524</b>	<b><i>Lin7a</i></b>	<b><i>Lin-7 homolog a</i></b>	<b>2,41</b>
<b>GE1241210</b>	<b><i>Dbp</i></b>	<b><i>D site of albumin promoter binding protein</i></b>	<b>-2,86</b>
<b>GE19861</b>	<b><i>Nos2</i></b>	<b><i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i></b>	<b>4,62</b>
<b>GE20439</b>	<b><i>Pitpn</i></b>	<b><i>phosphatidylinositol transfer protein</i></b>	<b>1,54</b>

Tabela 13: Genes diferencialmente expressos após tratamento de ilhotas pancreáticas com fibrilas de amilina madura em concentração suprafisiológica de glicose

ID	Sigla	Nome	Varição na magnitude de expressão
GE1112133	<i>Ranbp5</i>	<i>RAN binding protein 5</i>	-2,78
GE1157475	<i>Hnrnp1</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1</i>	-2,62
<b>GE1171859</b>	<b><i>Calr</i></b>	<b><i>Calreticulin</i></b>	<b>-2,36</b>
GE1202898	<i>Atp5e</i>	<i>ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, Mitochondrial F1 complex, epsilon subunit</i>	-2,42
GE1222187	<i>Plxnd1</i>	<i>Plexin D1</i>	-2,07
GE12283	<i>Col15a1</i>	<i>Procollagen, type XV</i>	-1,94
GE1234931	<i>Sarip</i>	<i>Small androgen receptor-interacting protein</i>	2,08
GE13922	<i>Snrpd1</i>	<i>Small nuclear ribonucleoprotein D1</i>	1,79
<b>GE15024</b>	<b><i>Rab5a</i></b>	<b><i>RAB5A, member RAS oncogene family</i></b>	<b>-2,81</b>
GE17761	<i>Rreb1</i>	<i>Ras responsive element binding protein 1</i>	-1,94
GE20255	<i>Rpl32</i>	<i>Ribosomal protein L32</i>	-3,14
<b>GE20439</b>	<b><i>Pitpn</i></b>	<b><i>Phosphatidylinositol transfer protein</i></b>	<b>-1,97</b>
GE21261	<i>Cdh1</i>	<i>Cadherin 1</i>	-1,99
GE21217	<b><i>Eif2b5</i></b>	<b><i>Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5 epsilon</i></b>	<b>2,60</b>
GE20125	<b><i>Sepw1</i></b>	<b><i>Selenoprotein W, muscle 1</i></b>	<b>-2,02</b>

Tabela 14: Genes diferencialmente expressos após tratamento de ilhotas pancreáticas com oligômeros de amilina em concentração suprafisiológica de glicose

ID	Sigla	Nome do Gene	Varição na magnitude de expressão
GE13920	<i>Tyrobp</i>	<i>Tyro protein tyrosine kinase binding protein</i>	- 4,00
GE21089	<i>Expi</i>	<i>Extracellular proteinase inhibitor</i>	-3,79
GE1137686	<i>Gp2</i>	<i>Secretory granule membrane glycoprotein</i>	-3,07
GE1221744	<i>Prss2</i>	<i>Pancreatic trypsin 2</i>	-2,96
GE21583	<i>Reg3a</i>	<i>Regenerating islet-derived 3 alpha</i>	-2,94
GE1261889	<i>Cxcl13</i>	<i>Similar to Small inducible cytokine B13 precursor</i>	-2,71
GE19749	<i>Tagln</i>	<i>Transgelin</i>	-2,71
GE19799	<i>Cd53</i>	<i>CD53 antigen</i>	-2,62
GE1138953	<i>My19</i>	<i>Myosin, light polypeptide 9, regulatory</i>	-2,59
GE1159850	<i>Csf1r</i>	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>	-2,23
GE1209269	RGD1562727	<i>Similar to aquaporin 12</i>	-2,22

### **4.3 Confirmações de alguns genes diferencialmente expressos**

Os genes foram selecionados para validação por RT-qPCR não com base nas diferenças na magnitude de expressão, mas por sua relevância em algumas vias biológicas identificadas.

#### **4.3.1 *Capn2***

O gene que codifica a Calpaína 2 foi selecionado por fazer parte da via de Proteólise, um processo identificado como modulado pelas fibrilas maduras de amilina (“amilina madura”) em ilhotas mantidas em 5.6 mM de glicose, e também por estar envolvida na via de Apoptose, que foi modulada pelos oligômeros de amilina (“amilina fresca”) em ilhotas mantidas em 5,6 mM de glicose. Este gene foi positivamente regulado nas ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose e tratadas com amilina fresca em relação ao controle. Esta alteração, entretanto, não se confirmou, pois não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de mRNA de *Capn2* entre as diferentes condições experimentais na avaliação por RT-qPCR (Figura 12).

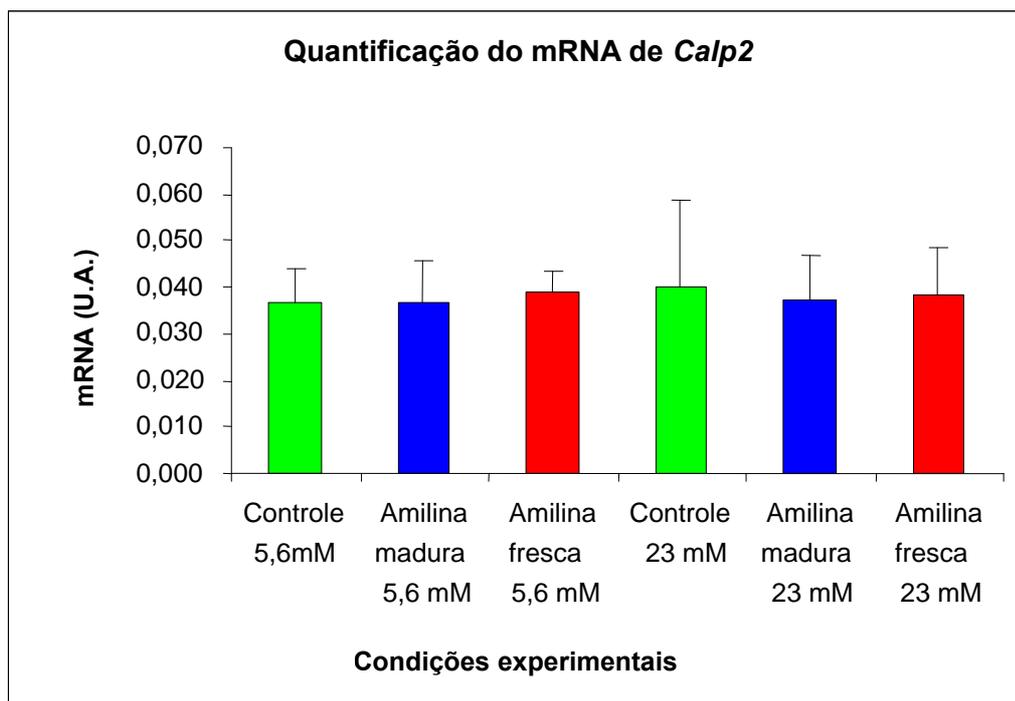


Figura 12: Quantificação do mRNA de *Calp2* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### 4.3.2 *Calr*

O gene que codifica a Calreticulina foi selecionado por fazer parte da via de Catabolismo de proteínas dependente de ubiquitina (GO), um processo identificado como modulado pela amilina madura em 23 mM de glicose e este gene foi negativamente regulado nesta condição. Esta alteração, entretanto, não se confirmou, pois não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de mRNA de *Calr* entre as diferentes condições experimentais na avaliação por RT-qPCR (Figura 13).

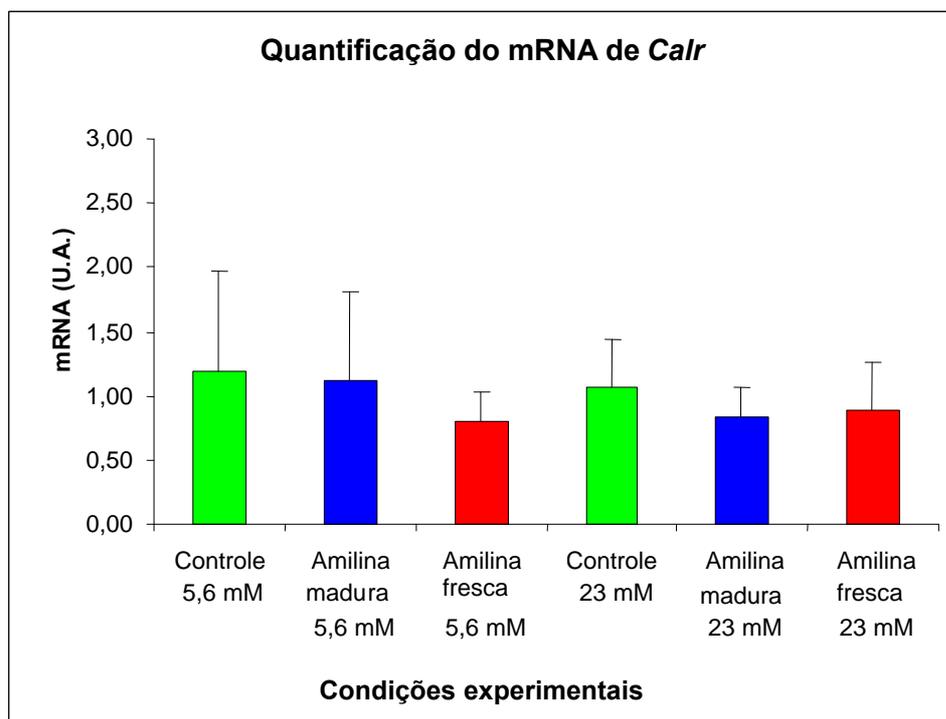


Figura 13: Quantificação do mRNA de *Calr* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### **4.3.3 Anxa I**

O gene que codifica a Anexina A1 foi selecionado por fazer parte da via de Regulação de apoptose (GO), um processo identificado como modulado pela amilina fresca em ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose e este gene foi positivamente regulado em ilhotas mantidas nesta condição, o que foi confirmado no experimento de RT-qPCR ( $P=0,009$ ). A expressão do mRNA de Anexina A1 também foi maior nas ilhotas tratadas com oligômeros de amilina quando comparada com as ilhotas tratadas com fibrilas maduras em concentração fisiológica de glicose ( $P<0,001$ ).

Nas ilhotas mantidas em concentração suprafisiológica de glicose, houve um aumento significativo no conteúdo de mRNA de Anexina A1 nas ilhotas tratadas com oligômeros de amilina em comparação às ilhotas controle ( $P=0,028$ ).

Houve ainda maior expressão de Anexina A1 nas ilhotas mantidas em concentração suprafisiológica de glicose em relação àquela mantidas em concentração fisiológica ( $P=0,045$ ). Estes dados estão ilustrados na Figura 14.

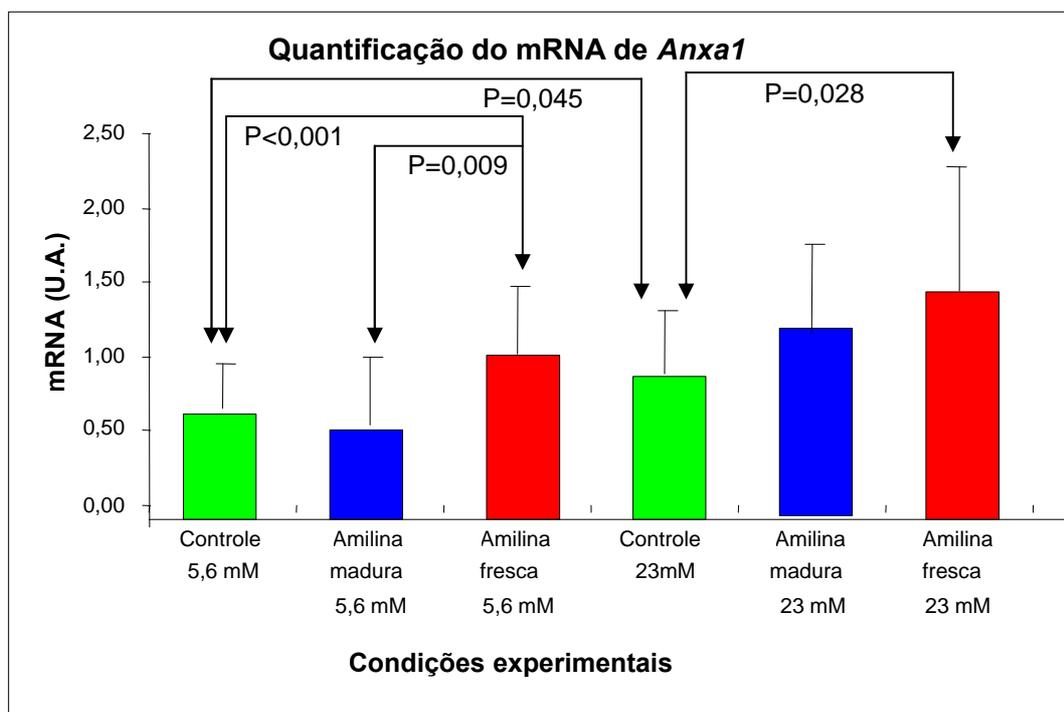


Figura 14: Quantificação do mRNA de *Anxa1* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### 4.3.4 *Pitpna*

O gene *Pitpna* codifica a proteína de transferência de fosfatidilinositol, que tem a função de transportar fosfolípidos do retículo endoplasmático para outras membranas. Este gene foi selecionado porque o retículo endoplasmático foi um componente celular significativamente afetado pelo tratamento com amilina fresca em ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose, tendo sido positivamente regulado nessa condição e negativamente regulado em ilhotas mantidas em 23 mM de glicose e tratadas com amilina madura. Essas alterações, entretanto, não foram confirmadas no experimento de RT-qPCR (Figura 15).

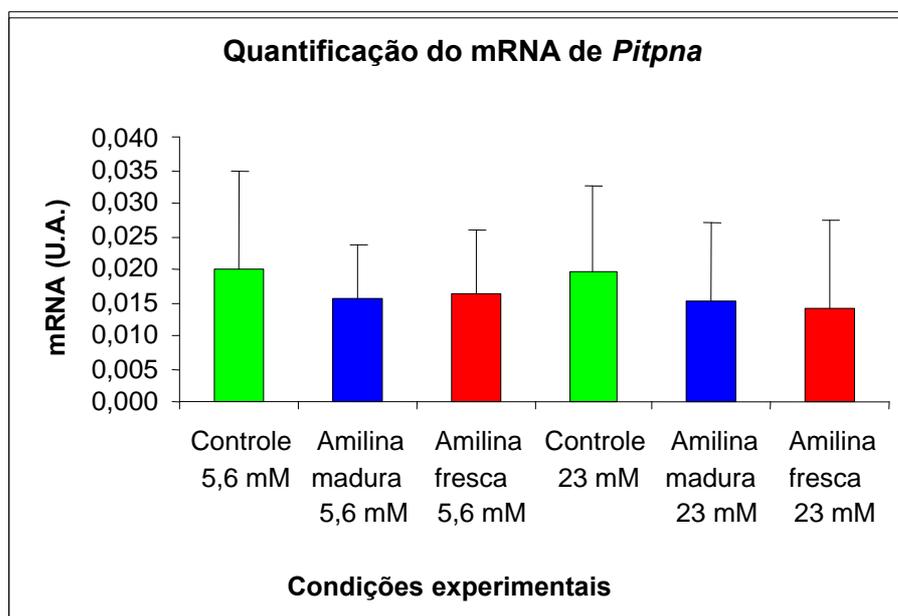


Figura 15: Quantificação do mRNA de *Pitpna* nas diferentes condições experimentais estudadas.

### 4.3.5 *Atp5j*

O gene *Atp5j* codifica a subunidade D da ATP sintase, que faz parte do Complexo V mitocondrial, que participa do processo de Síntese de ATP acoplada ao transporte de próton e foi selecionado por sua participação na Fosforilação oxidativa, uma via significativamente afetada pela amilina madura em ilhotas mantidas em concentração suprafisiológica de glicose. Ainda, o mRNA de *Atp5j* foi positivamente modulado pelo tratamento com amilina fresca em ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose. Esta alteração, entretanto, não foi confirmada no experimento de RT-qPCR, onde não se observou nenhuma diferença estatística entre as condições experimentais estudadas (Figura 16).

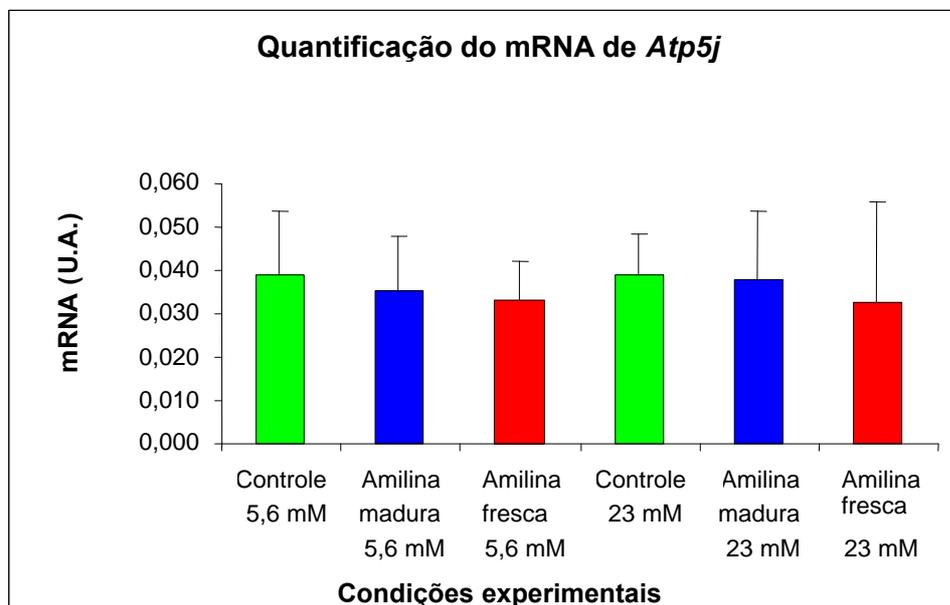


Figura 16: Quantificação do mRNA de *ATP5j* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### **4.3.6. *Gipr***

O gene que codifica o receptor do GIP foi selecionado por sua importante participação na secreção de insulina e por fazer parte do processo celular de Resposta a Nutrientes, que foi significativamente modulado pelo tratamento com amilina madura em ilhotas mantidas em concentração suprafisiológica de glicose. Ainda, este gene foi negativamente modulado em ilhotas mantidas em 5,6 mM de glicose tratadas com amilina madura, entretanto esta diferença não atingiu significância estatística quando quantificada por RT-qPCR ( $P=0,09$ ). Por outro lado, o tratamento de ilhotas mantidas em 5,6 mM de glicose com oligômeros de amilina promoveu uma diminuição significativa no conteúdo de mRNA de *Gipr* em relação às ilhotas controles ( $P=0,014$ ) e em relação à fibrilas maduras ( $P=0,001$ ).

Ilhotas mantidas em concentração suprafisiológica de glicose apresentaram diminuição no conteúdo de mRNA do *Gipr* quando comparadas às ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose ( $P=0,025$ ) (Figura 17).

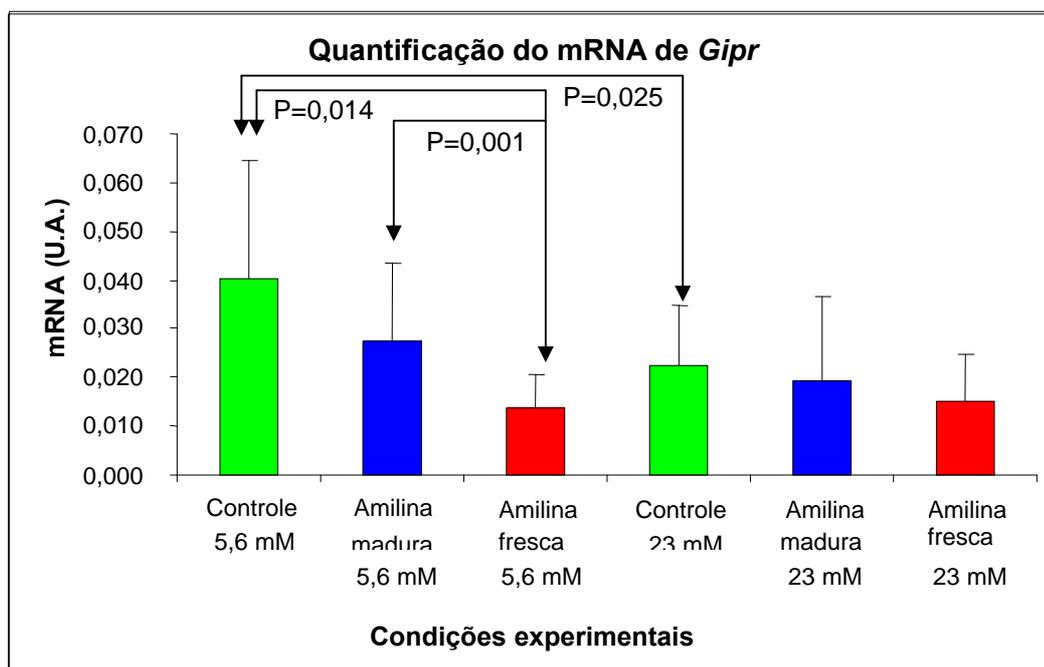


Figura 17: Quantificação do mRNA de *Gipr* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### 4.3.7 *Bcl2*

Embora o gene *Bcl2* não tenha sido identificado como diferencialmente expresso após tratamento das ilhotas pancreáticas com as preparações de amilina testadas, ele foi estudado nas diferentes condições experimentais devido à sua importante participação no processo de apoptose. Não houve diferenças estatisticamente significativas na expressão do *Bcl2* nas condições experimentais estudadas (Figura 18).

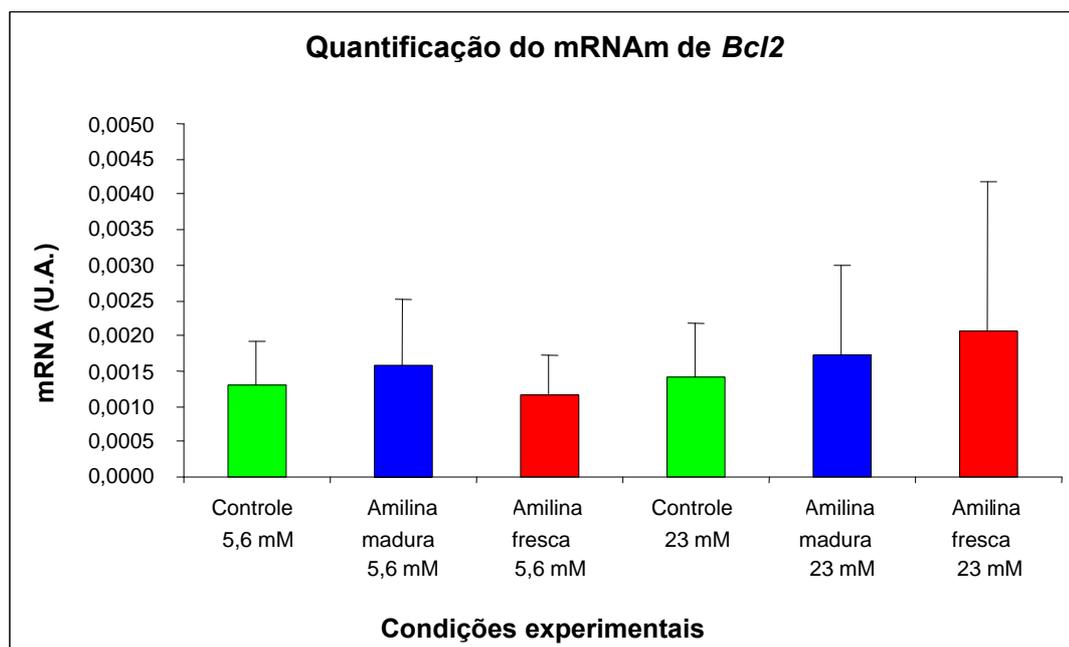


Figura 18: Quantificação do mRNA de *Bcl2* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### 4.3.8 *Dbp*

O gene *Dbp* codifica a proteína de ligação do sítio D do promotor da albumina e foi selecionado por sua participação no processo celular de Regulação negativa da transcrição, significativamente modulado pelo tratamento com amilina madura em ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose. Ainda, este gene foi negativamente modulado pelo tratamento com oligômeros de amilina em concentração fisiológica de glicose, entretanto esta alteração não foi confirmada por RT-qPCR (Figura 19).

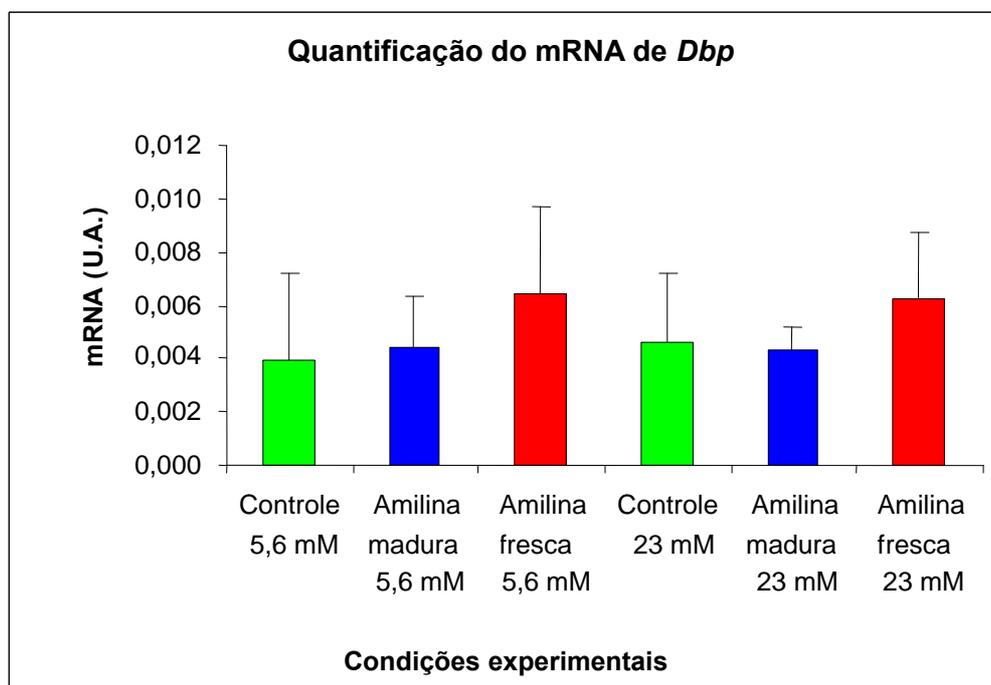


Figura 19 - Quantificação do mRNA de *Dbp* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### 4.3.9 *Sepw1*

O gene *Sepw1* codifica a selenoproteína W, uma proteína com ação antioxidante dependente de glutathiona e foi selecionado por sua participação no processo de Resposta ao estresse oxidativo, que foi regulado pelo tratamento de ilhotas com fibrilas maduras em concentração suprafisiológica de glicose, condição na qual este gene foi negativamente modulado. Esta alteração, no entanto, não foi confirmada por RT-qPCR (Figura 20).

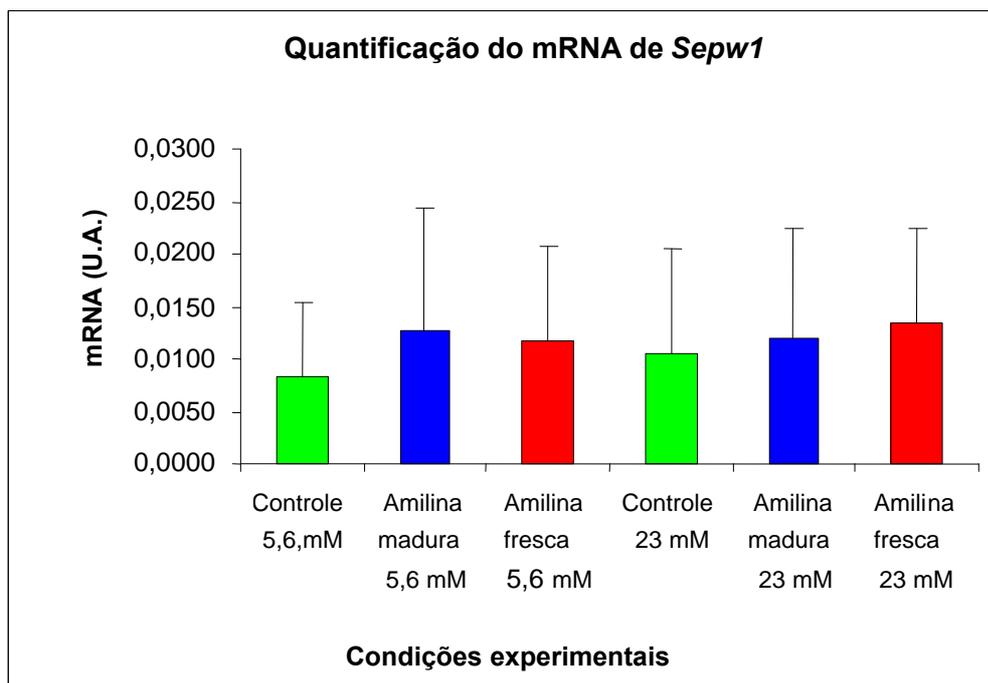


Figura 20 - Quantificação do mRNA de *Sepw1* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### **4.3.10 *Nos2***

O gene *Nos2* codifica a enzima óxido nítrico sintase 2, envolvida na síntese de óxido nítrico e foi selecionado por sua participação no processo de Biossíntese de óxido nítrico, via regulada pelo tratamento com oligômeros de amilina em concentração suprafisiológica de glicose. Ainda, este gene foi positivamente modulado pelo tratamento com oligômeros de amilina em concentração fisiológica de glicose.

A alteração encontrada no microarranjo foi confirmada pelo RT-qPCR, pois houve maior expressão de mRNA de *Nos2* em ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose tratadas com oligômeros de amilina em

relação às ilhotas controle ( $P=0,028$ ) e também em relação às ilhotas tratadas com fibrilas maduras ( $P=0,03$ ).

Em concentração suprafisiológica de glicose também houve um aumento na quantidade de mRNA de *Nos2* nas ilhotas tratadas com oligômeros de amilina em comparação às ilhotas controle ( $P=0,011$ ) e às tratadas com fibrilas maduras ( $P<0,001$ ). As ilhotas mantidas em 23 mM de glicose e tratadas com amilina madura mostraram uma diminuição na quantidade de mRNA de *Nos2* em relação às ilhotas controle também mantidas em concentração suprafisiológica de glicose ( $P=0,007$ ) (Figura 21).

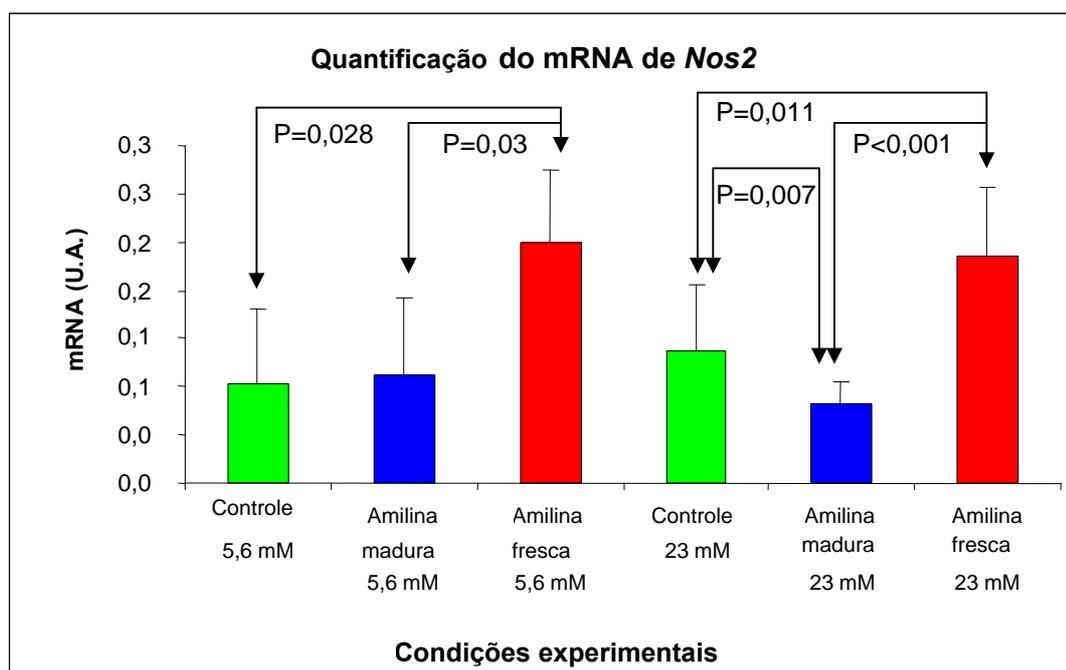


Figura 21 - Quantificação do mRNA de *Nos2* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### **4.3.11 *Xdh***

O gene *Xdh* codifica a xantina desidrogenase, uma enzima com funções no metabolismo de purinas e cuja ação gera espécies reativas de oxigênio, razão pela qual foi selecionada para ser adicionalmente avaliada. A expressão deste gene se mostrou maior em ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose tratadas com fibrilas de amilina em relação às controles. Esta alteração não se confirmou pela metodologia de RT-qPCR, porém observou-se uma diminuição da quantidade deste mRNA nas ilhotas tratadas com oligômeros de amilina em relação às ilhotas controle ( $P < 0,001$ ) e às ilhotas tratadas com fibrilas de amilina ( $P < 0,001$ ) em concentração fisiológicas de glicose.

Em concentração suprafisiológica de glicose, observou-se uma diminuição nos níveis de mRNA de *Xdh* nas ilhotas tratadas com oligômeros de amilina em comparação às ilhotas controle ( $P < 0,001$ ) e às tratadas com fibrilas de amilina ( $P < 0,001$ ). Houve, ainda, uma diminuição nos níveis desse mRNA nas ilhotas tratadas com fibrilas de amilina em relação às ilhotas controle ( $P = 0,039$ ), porém de menor magnitude do que a observada nas ilhotas tratadas com oligômeros de amilina.

Pode-se detectar também um aumento da expressão deste mRNA em ilhotas expostas a concentração suprafisiológica de glicose em relação à ilhotas expostas a uma concentração fisiológica. ( $P < 0,001$ ). Estes resultados estão ilustrados na Figura 22.

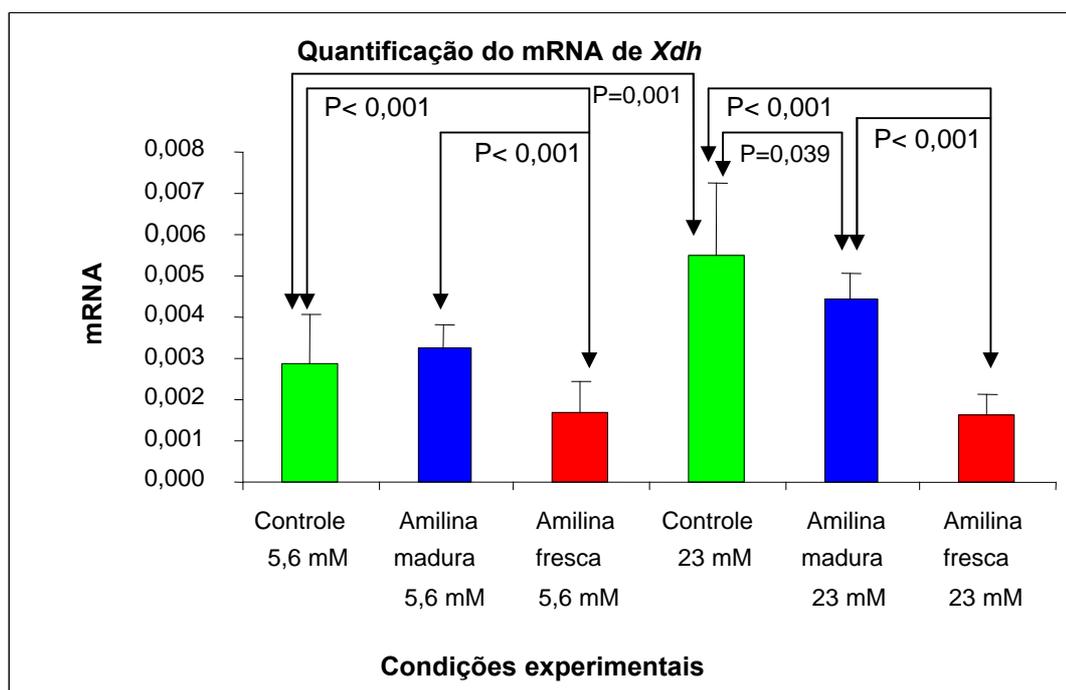


Figura 22 - Quantificação do mRNA de *Xdh* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### 4.3.12 *Eif2b5*

O gene *Eif2b5* codifica a subunidade 5 do fator 2B de iniciação da tradução eucariótica, uma proteína cuja expressão é induzida em Resposta a nutrientes, uma das vias moduladas por fibrilas de amilina em concentração suprafisiológica de glicose. Ainda, este gene teve expressão aumentada nas ilhotas mantidas em concentração suprafisiológica de glicose tratadas com amilina madura em relação às ilhotas controle. Este resultado não foi reproduzido quando analisado com a técnica de RT-qPCR (Figura 23).

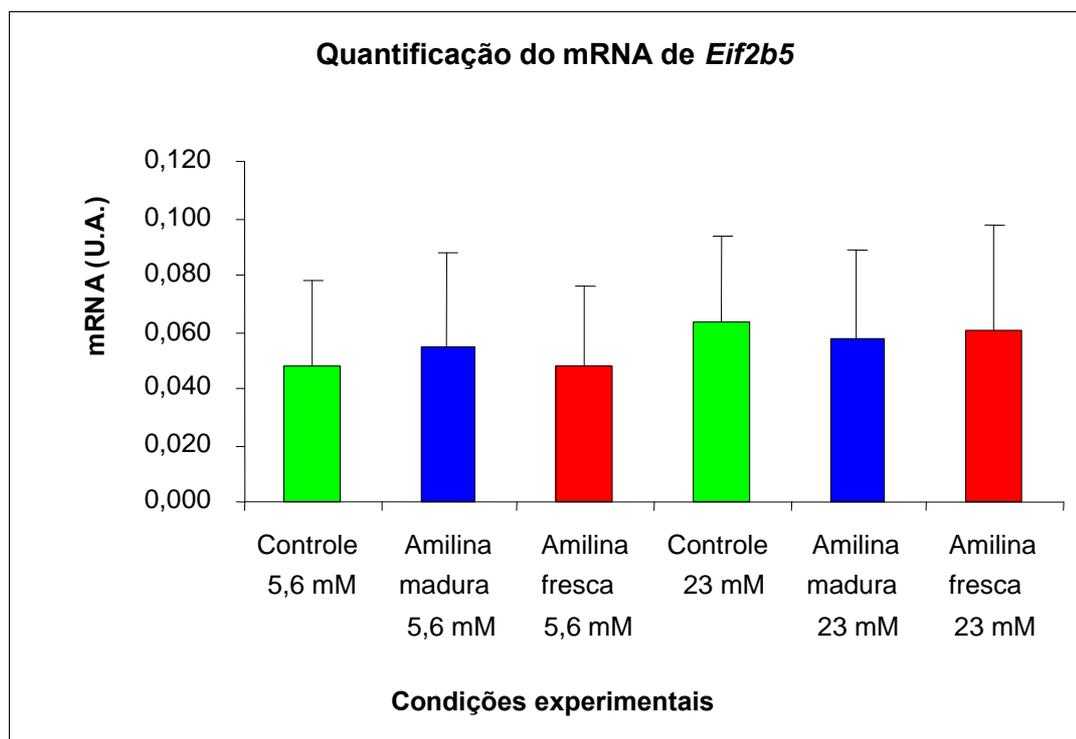


Figura 23 - Quantificação do mRNA de *Eif2b5* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### **4.3.13 *Rab5a***

O gene *Rab5a* codifica uma proteína que pertence à família do oncogene *Ras* e foi selecionada por participar na Regulação da endocitose, uma das vias moduladas em ilhotas mantidas em concentração suprafisiológica de glicose e tratadas com oligômeros de amilina. Ainda, este gene teve expressão aumentada nas ilhotas tratadas com oligômeros de amilina em concentração fisiológica de glicose, que não foi confirmada pela análise por RT-qPCR.

Em concentração suprafisiológica de glicose, detectou-se um aumento estatisticamente significativo nos níveis deste mRNA nas ilhotas

tratadas com oligômeros de amilina em relação às ilhotas controle ( $P=0,043$ ) e em relação àquela tratadas com fibrilas de amilina ( $P=0,034$ ) (Figura 24).

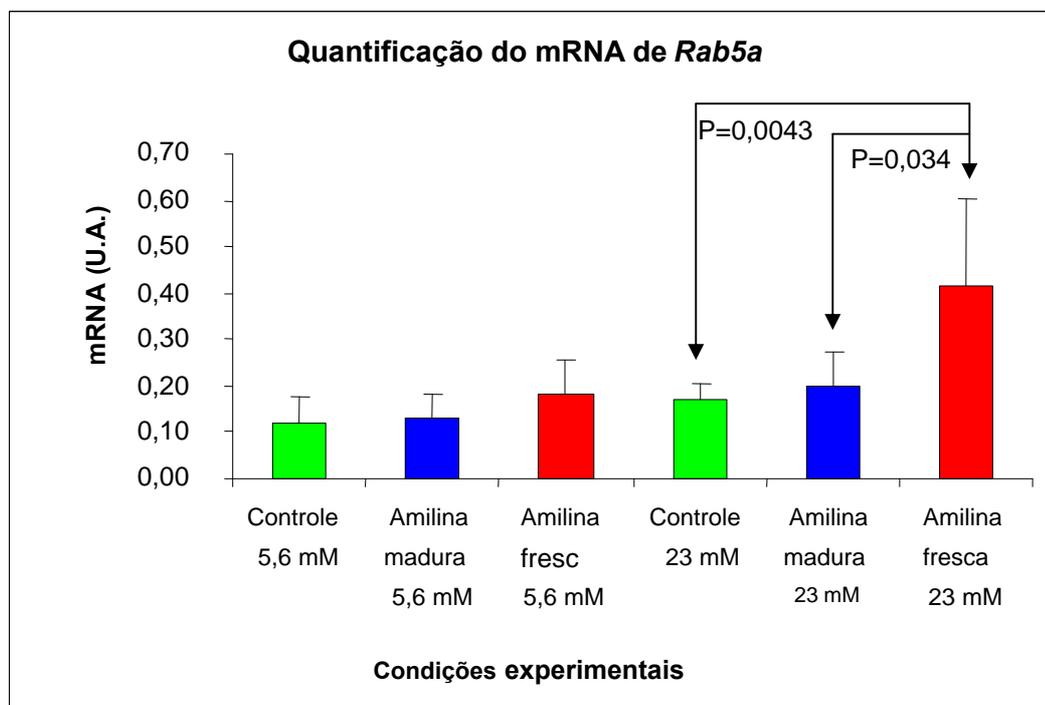


Figura 24 - Quantificação do mRNA de *Rab5a* nas diferentes condições experimentais estudadas.

#### 4.3.14 *Lin7a*

O gene *Lin7a*, também conhecido como *Veli1*, codifica a proteína homóloga ao lin-7, que participa no trânsito intracelular de vesículas. Este gene foi selecionado por que o componente celular Vesícula foi modulado em ilhotas mantidas em concentração suprafisiológica de glicose após tratamento com oligômeros de amilina. Ainda, a expressão deste gene aumentou em ilhotas tratadas com oligômeros de amilina em concentração

fisiológica de glicose, entretanto esta alteração não foi confirmada quando analisada por RT-qPCR (Figura 25).

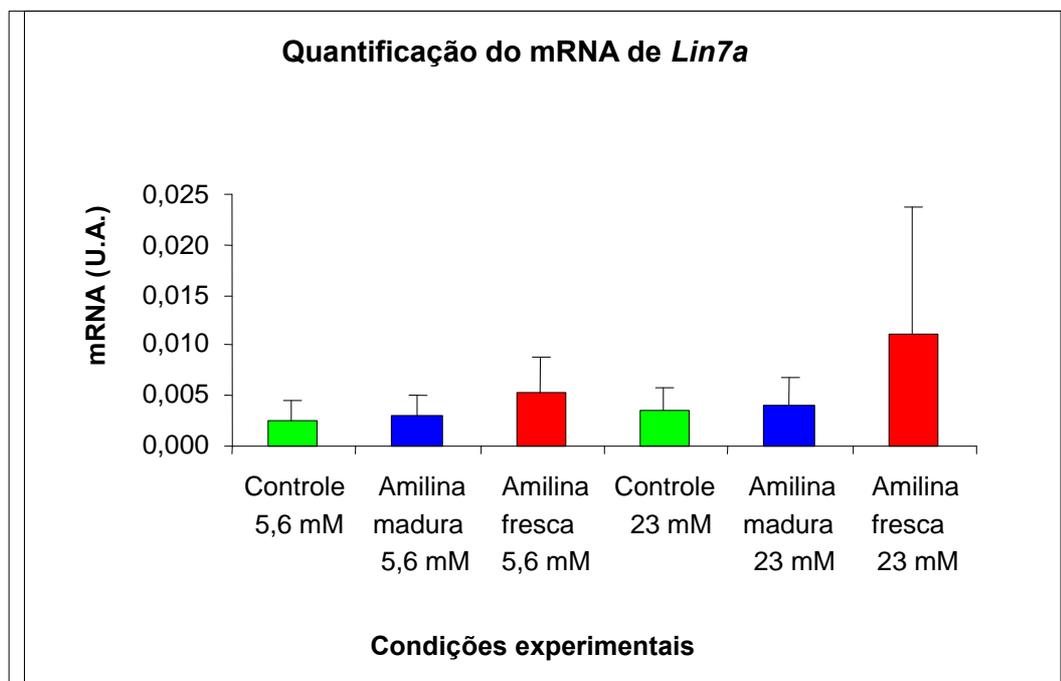


Figura 25 - Quantificação do mRNA de *Lin7a* nas diferentes condições experimentais estudadas.

## 5. DISCUSSÃO

Pacientes portadores de DM 2 apresentam uma diminuição da secreção de insulina (Pfeifer, Halter *et al.*, 1981) bem como um depósito amilóide nas ilhotas pancreáticas (Cooper, Willis *et al.*, 1987), mas os mecanismos moleculares associados aos efeitos da amilina sobre as células das ilhotas pancreáticas ainda não estão totalmente esclarecidos.

Diversos trabalhos já demonstraram que a amilina humana apresenta um efeito pró-apoptótico, e os trabalhos mais recentes têm ressaltado os efeitos deletérios das fibrilas intermediárias (oligômeros) de amilina sobre linhagens de células  $\beta$  e mesmo sobre ilhotas muríneas e humanas purificadas (Bai, Saafi *et al.*, 1999b; Zhang, Liu *et al.*, 2003b; Konarkowska, Aitken *et al.*, 2006d; Casas, Gomis *et al.*, 2007c). Os primeiros trabalhos que detectaram a citotoxicidade da amilina humana, entretanto, foram realizados com a amilina madura (Lorenzo, Razzaboni *et al.*, 1994c).

Apesar das limitações inerentes à metodologia de microarranjos de DNA, que avalia somente o conteúdo celular de RNA, o que não necessariamente reflete os níveis e o estado de ativação das proteínas intracelulares, o uso de plataformas de microarranjos de DNA possibilita que se tenha uma idéia geral das vias que estão sendo moduladas em cada uma das situações estudadas, razão pela qual optamos pelo uso desta técnica na comparação dos efeitos de oligômeros de amilina e de fibrilas maduras sobre ilhotas pancreáticas de ratos. Na tentativa de melhor mimetizar *in vitro* o ambiente ao qual a ilhota está exposta *in vivo* no paciente diabético,

optamos por realizar os tratamentos não somente em concentrações fisiológicas de glicose (5,6 mM), como também em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM), mesmo sabendo que não estaríamos reproduzindo completamente o ambiente ao qual a ilhota de um paciente com DM 2 está exposta, já que não consideramos a presença, por exemplo, da lipotoxicidade.

O único estudo prévio realizado com a mesma abordagem experimental de avaliar a expressão gênica com microarranjos de DNA analisou apenas os efeitos de oligômeros de amilina em células da linhagem MIN6 (Casas, Gomis *et al.*, 2007d) mantidas em concentração fisiológica de glicose, mas é difícil fazer uma comparação dos resultados, pois os mesmos dependem da forma de análise estatística dos dados, bem como dos genes representados em cada uma das plataformas.

A análise das vias significativamente moduladas pelas preparações de amilina demonstrou que a exposição de ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose a oligômeros de amilina modulou, entre outros, processos relacionados à Resposta ao Estresse e à Apoptose, o que vai ao encontro da literatura no que diz respeito à indução de apoptose pelos oligômeros de amilina (Lorenzo, Razzaboni *et al.*, 1994b; Janson, Ashley *et al.*, 1999b; Zhang, Liu *et al.*, 1999b; Zhang, Liu *et al.*, 2003a; Konarkowska, Aitken *et al.*, 2006c; Meier, Kayed *et al.*, 2006a). Além disso, o retículo endoplasmático (RE) apareceu como um componente celular significativamente modulado apenas nesta condição experimental, o que chamou a atenção pelo fato de um trabalho recente ter atribuído aos

oligômeros de amilina a capacidade de induzir estresse de RE, o qual estaria envolvido na apoptose da célula  $\beta$  (Casas, Gomis *et al.*, 2007e).

O tratamento com as fibrilas maduras em concentração fisiológica de glicose modulou vias completamente diferentes daquelas moduladas pelos oligômeros de amilina, incluindo processos relacionados à Regulação negativa da transcrição, Proteólise e Processos Catabólicos, mas não se identificou o RE ou qualquer outro componente celular como especificamente modulado. Embora esses dados não permitam que se conclua sobre o grau de citotoxicidade das fibrilas maduras de amilina, pode-se sugerir que se ela for realmente citotóxica, ela o é por mecanismos diferentes daqueles envolvidos na citotoxicidade dos oligômeros.

Nas ilhotas expostas a concentração suprafisiológica de glicose, o tratamento com oligômeros de amilina deixou de modular as vias relacionadas a Estresse e Apoptose, surgindo como moduladas vias relacionadas aos processos de Regulação da endocitose, Regulação do crescimento celular e Biossíntese de óxido nítrico. O RE também deixou de aparecer como um componente celular significativamente afetado. Esses dados parecem sugerir que, neste modelo experimental de exposição aguda, a glicose poderia até proteger dos efeitos deletérios dos oligômeros de amilina, no entanto, para confirmar esta hipótese, seria necessário avaliar a citotoxicidade da amilina em diferentes concentrações de glicose o que, até onde sabemos, nunca foi investigado na literatura.

Da mesma forma que o observado na presença de concentração fisiológica de glicose, na concentração suprafisiológica, as fibrilas maduras

de amilina modularam vias completamente diferentes dos oligômeros. Interessante notar que, nesta condição experimental, os processos afetados parecem estar mais relacionados à alta concentração de glicose que à própria amilina, como exemplificado pelas vias de Resposta a nutriente, Processos metabólicos de monossacarídeos, Metabolismo de espécies reativas de oxigênio e Fosforilação oxidativa. No entanto, como as ilhotas nessa condição experimental foram comparadas a ilhotas não tratadas com amilina, mas expostas a mesma concentração elevada de glicose, é possível que as fibrilas maduras de amilina tenham exacerbado alguns dos efeitos da alta concentração de glicose.

Pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão gênica na célula  $\beta$  pela glicose. Tem sido sugerido que o metabolismo da glicose altere a expressão de genes diretamente na transcrição, seja por interferir com proteínas que já estejam ligadas ao complexo de pré-iniciação, seja por modificar concentrações de fatores de transcrição no núcleo (Schuit, Flamez *et al.*, 2002). Portanto, pode-se supor que em altas concentrações, a glicose interfira com a expressão gênica induzida pelas duas formas de amilina, modulando diretamente a expressão de genes que não são afetados em ilhotas expostas exclusivamente à amilina na concentração fisiológica de glicose.

Os resultados obtidos nos experimentos de microarranjos de DNA precisam ser validados por outras técnicas, especialmente quando não se utilizam muitas replicatas biológicas, como foi o caso do presente estudo. Os critérios de seleção de genes para validação podem se basear tanto na

magnitude de diferença de expressão como na via biológica a qual o gene pertence. Optamos por selecionar os genes com base na relevância da via biológica da qual ele faz parte, pois é possível que pequenas diferenças de expressão também apresentem conseqüências biológicas relevantes.

Na avaliação das vias biológicas, o processo de Apoptose apareceu significativamente modulado apenas nas ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose que foram tratadas com oligômeros de amilina. Por sua importância no processo de perda de massa de células  $\beta$ , alguns dos genes selecionados para confirmação são relacionados a apoptose. Este mecanismo de morte celular programada pode ser ativado basicamente por duas vias: 1) via extrínseca: iniciada pela ativação de receptores de morte celular (receptor de FAS, receptor de TNF) e a 2) via intrínseca: ativada por uma via independente de receptores de morte. Esta via pode ser ativada por um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, causando a liberação para o citoplasma de moléculas pró-apoptóticas ou também pela perda da função mitocondrial essencial para a sobrevivência celular.

Um grupo de proteínas que controla a permeabilidade da membrana mitocondrial pertence à família BCL. Este grupo é constituído por 20 membros que podem ser divididos em dois grupos: 1) anti-apoptose, do qual faz parte a proteína BCL-2 e 2) pró-apoptose, do qual fazem parte as proteínas BAX e BAD, entre outras. Estas proteínas controlam a permeabilidade ao citocromo-c e ao fator indutor da apoptose (AIF) na membrana mitocondrial. Uma vez no citoplasma, o citocromo-c se liga à Apaf-1, e forma-se um complexo capaz de ativar as pró-caspases 2 e 9. A

caspase-9 por sua vez ativa a pró-caspase 3, que então passa a exercer sua atividade proteolítica como uma caspase efetora da apoptose.

Por sua importância no processo de apoptose, o gene *Bcl2* foi avaliado nas condições experimentais estudadas, mesmo sem ter sido identificado com diferencialmente expresso no experimento de microarranjo de DNA. Da mesma forma que descrito para as células RINm5F (Zhang, Liu *et al.*, 1999a), o tratamento com oligômeros de amilina não modulou os níveis de mRNA de *Bcl2* no presente estudo.

Outra proteína que está envolvida no processo de apoptose e cujo mRNA foi detectado como diferencialmente expresso é a Anexina A1. Ela foi descrita no final da década de 70, e tem propriedades de ligação ao cálcio e aos fosfolípidos de membrana (Lim e Pervaiz, 2007). Na linhagem celular de câncer de pulmão A549, a Anexina A1 exerce efeitos inibitórios sobre a proliferação celular, que parecem ser secundários a uma supressão da ciclina D1 (Croxtall e Flower, 1992).

A primeira associação positiva da Anexina A1 com o processo de apoptose surgiu da observação de que células que sofrem apoptose nas glândulas mamárias pós-lactação expressam grande quantidade desta proteína (Mckanna, 1995). A transfecção de monócitos com o gene da Anexina A1 causou morte celular por apoptose espontânea em 70% das células após cinco dias de cultivo, o que esteve associado à maior ativação da caspase-3 (Solito, De Coupade *et al.*, 2001) e à quebra da homeostasia de cálcio intracelular (Solito, Kamal *et al.*, 2003). Durante o processo de apoptose, a Anexina A1 migra para o núcleo. A relevância desta migração

ainda não está bem clara, mas sabe-se que ela é inibida pela superexpressão do *Bcl2* (Ishido, 2005).

Neste estudo, detectou-se um aumento no conteúdo de mRNA de Anexina A1 quando as ilhotas foram tratadas com oligômeros de amilina tanto em concentração fisiológica, quanto suprafisiológica de glicose. Este achado fala a favor de um maior potencial citotóxico dos oligômeros de amilina em relação às fibrilas maduras. É interessante notar que a expressão de Anexina A1 aumentou em todas as condições experimentais nas quais as ilhotas foram expostas a concentração suprafisiológica de glicose e esta proteína já havia sido implicada na secreção de insulina induzida por glicose. Ohnishi e colaboradores demonstraram, em ilhotas pancreáticas muríneas, a presença de Anexina A1 dentro dos grânulos de secreção de insulina que aumentava significativamente após administração oral de glicose. Além disso, a fosforilação da Anexina A1 aumentou em ilhotas isoladas expostas a 20 mM de glicose, em sincronia com a secreção de insulina (Ohnishi, Tokuda *et al.*, 1995). Os achados do presente estudo sugerem que altas concentrações de glicose também modulem o conteúdo de mRNA de Anexina A1 nas células  $\beta$ , e dado o papel desta proteína no processo de apoptose, levantam a possibilidade da Anexina A1 poder ser uma ligação entre hiperglicemia crônica e aumento da apoptose.

Além da mitocôndria, outra organela envolvida na ativação do processo de apoptose é o RE, que é uma organela com a função de síntese, dobramento, modificação e tráfego de proteínas pela célula. O RE também é um importante regulador da homeostase do cálcio intracelular. Quando o RE

é exposto a uma proteína mal dobrada, desenvolve-se a chamada “resposta a proteínas mal dobradas”.

As funções da via de “resposta a proteínas mal dobradas” no RE são diminuir o estresse na organela, restaurar sua homeostase e prevenir a morte celular. Isto se dá pela: 1) diminuição da chegada de novas proteínas ao RE, 2) aumento da expressão de chaperonas, cuja finalidade é de conferir maior estabilidade às proteínas que estão sendo sintetizadas e prevenir sua agregação (Groenendyk e Michalak, 2005), 3) aumento da degradação das proteínas mal formadas pelo sistema de ubiquitina-proteossoma. No caso das etapas citadas não serem suficientes, a apoptose é deflagrada. O estresse de RE resulta também na fosforilação da proteína eIF2, que então causa uma diminuição global do processo de tradução dos mRNA (Wek, Jiang *et al.*, 2006), o que poderia exacerbar os efeitos da redução de expressão de alguns genes.

A exposição de células MIN6 e de ilhotas pancreáticas humanas a oligômeros de amilina é capaz de induzir estresse de RE, que estaria envolvido na apoptose das célula  $\beta$ . Os autores sugerem que a sobrecarga de cálcio intracelular induzida pelos oligômeros de amilina preceda o estresse de RE, pois as chaperonas necessitam de concentrações adequadas de cálcio para sua atividade. Assim, alterações na homeostasia do cálcio poderiam disparar o acúmulo de proteínas mal dobradas e ativar a resposta de estresse de RE (Casas, Gomis *et al.*, 2007b) e o estresse oxidativo (Cai, Li *et al.*, 2003).

Quando a linhagem celular de ratos NIH3T3 foi tratada com Tapsigargina, que aumenta a permeabilidade da membrana do RE, causa efluxo de cálcio e ativa o estresse de RE, verificou-se que a enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS-2) estava envolvida na produção de radicais livres mediada pelo estresse de RE e quando estas mesmas células eram pré-tratadas com um inibidor de NOS-2, o estresse oxidativo induzido por estresse de RE era praticamente abolido. Os autores sugeriram, assim, que a NOS-2 medeia a subvia de estresse de RE causada por efluxo de cálcio (Hsieh, Su *et al.*, 2007).

Ao contrário das enzimas óxido nítrico (NO) sintases endotelial e neuronal, constitutivamente expressas e envolvidas na geração de NO para vasodilatação e processos de sinalização celular, a NOS-2 é uma fonte citotóxica de NO (Maréchal, Mattioli *et al.*, 2007), assim, o aumento do mRNA de *Nos2* nas ilhotas pancreáticas tratadas com os oligômeros de amilina tanto em concentração fisiológica como suprafisiológica de glicose sugere que as fibrilas intermediárias de amilina exerçam efeitos deletérios sobre as ilhotas e poderia sugerir, ainda, uma ligação entre a hipótese levantada por Casas e colaboradores (Casas, Gomis *et al.*, 2007b), que sugerem que a sobrecarga de cálcio intracelular induzida pelos oligômeros de amilina preceda o estresse de RE, e a hipótese levantada por Hsieh e colaboradores (Hsieh, Su *et al.*, 2007), que sugerem que a NOS-2 medeia a subvia de estresse de RE causada por efluxo de cálcio.

Uma vez que o estresse oxidativo também já foi aventado para explicar a citotoxicidade relacionada à agregação da amilina, pela formação

de peróxido de hidrogênio durante a formação das fibrilas (Masad, Hayes *et al.*, 2007), o gene *Xdh*, que codifica a enzima xantina oxidoreductase, também foi avaliado. Esta enzima catalisa a oxidação de hipoxantina a xantina e de xantina a ácido úrico, as duas últimas reações da degradação das purinas. Sabe-se que, ao transferir elétrons das xantinas ao NAD<sup>+</sup> e ao oxigênio, esta enzima produz NADH e espécies reativas de oxigênio (superóxido e peróxido de hidrogênio). No presente estudo, detectou-se uma diminuição na expressão do mRNA de *Xdh* em ilhotas tratadas com oligômeros de amilina tanto em concentração fisiológica, como supra-fisiológica de glicose concomitantemente ao aumento da expressão da *Nos2*. Interessantemente, já se demonstrou que o NO ou seu subproduto, peroxinitrito, é capaz de regular negativamente a atividade da XDH (Godber, Doel *et al.*, 2000).

Não é possível deduzir, a partir destes resultados, se a menor expressão da *Xdh* em ilhotas que foram tratadas com oligômeros de amilina poderia ser um mecanismo de compensação da célula, que está sofrendo os efeitos deletérios das fibrilas intermediárias de amilina e tenta diminuir a geração de espécies reativas de oxigênio, ou se a diminuição da expressão desta enzima contribui ainda mais para o sofrimento da célula na medida em que diminui os mecanismos anti-oxidantes celulares, uma vez que o produto da reação que ela catalisa, o ácido úrico, tem ação anti-oxidante (Becker, 1993) (Squadrito, Cueto *et al.*, 2000).

Outro gene cuja expressão foi positivamente regulada pelos oligômeros de amilina foi o *Rab5a*, que codifica uma proteína que regula

positivamente o processo de endocitose. A RAB5, que pertence a uma família de GTPases, alterna-se entre o estado ativo, ligado a GTP e o estado inativo, ligado a GDP. Ela está localizada na membrana plasmática, nas vesículas revestidas por clatrina e nos endossomos, e por mediar a fusão de vesículas e a separação de receptores nos endossomos, parece regular o tráfego endocítico de receptores acoplados a proteína G. Os ligantes desses receptores iniciam vários processos regulatórios que contribuem para a sua desensibilização, endocitose e *down-regulation*. A desensibilização é um processo adaptativo que tem por objetivo limitar a resposta celular após uma exposição prolongada ao ligante (Prossnitz E.R., 2004). Considerando que o receptor de amilina é um receptor acoplado a proteína G, o aumento da expressão de mRNA de *Rab5a* nas ilhotas tratadas com oligômeros de amilina poderia ser uma resposta ao aumento desse ligante no meio extracelular, no entanto, ele somente ocorreu nas ilhotas mantidas em concentração suprafisiológica de glicose.

O achado de Lainfenfeld e colaboradores que identificou a RAB5 como mediadora de uma via de sinalização da proteína precursora do amilóide que leva a apoptose neuronal em um modelo de estudo da Doença de Alzheimer (Lainfenfeld, Patzek *et al.*, 2007), sugere, entretanto, que o aumento da expressão desse gene possa estar envolvido nos efeitos deletérios dos oligômeros de amilina sobre as ilhotas pancreáticas.

A diminuição da expressão do *Gipr* induzido pelo tratamento com oligômeros de amilina em concentração fisiológica de glicose foi um dos achados mais interessantes observados no presente estudo e sugere uma

participação do depósito amilóide na diminuição da resposta insulínica ao GIP observada nos pacientes com DM 2 (Nauck, Heimesaat *et al.*, 1993). Além disso, o achado de diminuição do conteúdo do mRNA do *Gipr* em ilhotas mantidas em concentração suprafisiológica de glicose em comparação às ilhotas mantidas em concentração fisiológica está de acordo com dados da literatura que demonstram expressão reduzida desse gene em ilhotas de ratos mantidos em hiperglicemia crônica (Lynn, Thompson *et al.*, 2003; Xu, Kaneto *et al.*, 2007).

A principal limitação desse estudo foi o pequeno número de replicatas biológicas utilizadas no experimento de microarranjos de DNA. Recomenda-se que se faça um maior número de replicatas, pois se sabe que esta metodologia está sujeita à variabilidade mesmo quando realizada dentro de condições relativamente controladas. Potenciais fontes de variabilidade são a localização de cada um dos pontos correspondentes aos genes avaliados na lâmina e a realização da marcação das sondas e da hibridização em dias diferentes. Assim, os resultados de várias réplicas biológicas são mais consistentes e confiáveis (Lee M.L. *et al.*, 2000).

Além disso, há a questão da heterogeneidade dos animais utilizados nos experimentos. Sabe-se que as condições dos animais usados no isolamento das ilhotas pancreáticas interferem nas características das células obtidas, o que também contribui para a variabilidade inerente ao modelo experimental (Haan BJ *et al.*, 2004) Esses aspectos levantados explicam porque, dentre os genes selecionados para a validação, apenas uma pequena parcela teve a expressão diferencial confirmada nos

experimentos de RT-qPCR. É possível que para alguns genes, como o *Dbp* e o *Lin7a*, uma diferença estatisticamente significativa fosse alcançada nos experimentos de validação se um maior número de experimentos fosse realizado.

Acreditamos, entretanto, que os genes cuja expressão diferencial foi confirmada no permitem concluir que somente os oligômeros (e não as fibrilas maduras) de amilina modulam genes relacionados a apoptose (*Anxa1*, *Rab5a*) e ao estresse oxidativo (*Nos2* e *Xdh*), o que vai ao encontro dos estudos mais recentes que atribuem às fibrilas intermediárias de amilina um papel na citotoxicidade das células  $\beta$ . Um achado novo do presente estudo foi a identificação do receptor de GIP como alvo de regulação negativa pelos oligômeros de amilina, o que sugere que esse possa ser um mecanismo adicional pelo qual essas fibrilas intermediárias de amilina sejam deletérias para a célula  $\beta$  pancreática.

Mesmo com a crítica ao pequeno número de replicatas, a análise das vias gerou dados interessantes, já que evidenciou o processo Apoptose e o componente RE como significativamente modulados apenas pelos oligômeros de amilina e não pelas fibrilas maduras em ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose. Os resultados dos experimentos que avaliaram a resposta às duas formas de amilina em concentração suprafisiológica de glicose merecem estudos adicionais, pois após tratamento com oligômeros de amilina, o processo Apoptose e o componente RE deixaram de ser modulados, de forma que experimentos que avaliem diretamente o índice de apoptose nas ilhotas

mantidas nesta condição devem ser futuramente realizados para complementar a investigação.

## 6. CONCLUSÃO

A comparação entre os efeitos de oligômeros e de fibrilas maduras de amilina sobre o perfil de expressão gênica de ilhotas pancreáticas de rato evidencia que essas formas de amilina modulam vias biológicas diferentes, indicando que desencadeiem mecanismos intracelulares distintos. A expressão gênica em resposta às duas formas de amilina estudadas parece ser modulada pela concentração de glicose a qual as ilhotas estão expostas.

As diferenças de magnitude de expressão no mRNA dos genes *Anxa1*, *Rab5a*, *Nos2* e *Xdh* após tratamento com as duas formas de amilina sugerem que apenas os oligômeros de amilina exerçam efeitos citotóxicos sobre as ilhotas pancreáticas.

A redução da expressão do mRNA do gene *Gipr* induzida pelos oligômeros de amilina sugere que esse possa ser um mecanismo adicional pelo qual essas fibrilas intermediárias de amilina sejam deletérias para a célula  $\beta$  pancreática.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baggio L; Drucker D. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* [S.I.], v. 132, n. 6, p. 2131-57, 2007 May 2007a.

Bai J *et al.* Role of Ca<sup>2+</sup> In Apoptosis evoked by human amylin in pancreatic islet beta-cells. *Biochem J* [S.I.], v. 343 pt 1, p. 53-61, 1999 Oct 1999a.

Becker B. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 14, n. 6, p. 615-31, Jun 1993.

Brown J *et al.* Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide. *Recent Prog Horm Res* [S.I.], v. 31, p. 487-532, 1975.

Buteau J *et al.* Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipototoxicity. *Diabetologia* [S.I.], v. 47, n. 5, p. 806-15, 2004 May 2004.

Butler A *et al.* Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (hip rat): a new model for type 2 diabetes. *Diabetes* [S.I.], v. 53, n. 6, p. 1509-16, 2004 Jun 2004.

Cai H *et al.* Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* [S.I.], v. 63, n. 2, p. 325-31, Feb 2003.

Casas S *et al.* Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway is a downstream endoplasmic reticulum stress response induced by extracellular human islet amyloid polypeptide and contributes to pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes* [S.I.], v. 56, n. 9, p. 2284-94, 2007 Sep 2007a.

Cattan P *et al.* Early assessment of apoptosis in isolated islets of langerhans. *Transplantation* [S.I.], v. 71, n. 7, p. 857-62, 2001 Apr 2001.

Chance W *et al.* Anorexia Following the systemic injection of amylin. *Brain Res* [S.I.], v. 607, n. 1-2, p. 185-8, 1993 Apr 1993.

Chen W *et al.* Expression cloning and receptor pharmacology of human calcitonin receptors from mcf-7 cells and their relationship to amylin receptors. *Mol Pharmacol* [S.I.], v. 52, n. 6, p. 1164-75, 1997 Dec 1997.

Choi S *et al.* Involvement of Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptotic signals in palmitate-induced min6n8a beta cell death. *Mol Cell Endocrinol* [S.I.], v. 272, n. 1-2, p. 50-62, 2007 Jun 2007.

Christopoulos G *et al.* Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol* [S.I.], v. 56, n. 1, p. 235-42, 1999 Jul 1999.

Cnop M *et al.* Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* [S.I.], v. 54 suppl 2, p. S97-107, 2005 Dec 2005.

Cooper G *et al.* Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 84, n. 23, p. 8628-32, 1987 Dec 1987.

Croxtall J; Flower R. Lipocortin 1 mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 89, n. 8, p. 3571-5, 1992 Apr 1992.

De Haan B *et al.* Factors influencing isolation of functional pancreatic rat islets. *Pancreas* [S.I.], v. 29, n. 1, p. E15-22, 2004 Jul 2004.

De Koning E *et al.* Diabetes mellitus in macaca mulatta monkeys is characterised by islet amyloidosis and reduction in beta-cell population. *Diabetologia* [S.I.], v. 36, n. 5, p. 378-84, 1993 May 1993.

Dechenes C *et al.* Human aging is associated with parallel reductions in insulin and amylin release. *Am J Physiol* [S.I.], v. 275, n. 5 pt 1, p. E785-91, 1998 Nov 1998.

Di Matteo M *et al.* Superoxide, nitric oxide, peroxynitrite and cytokine combinations all cause functional impairment and morphological changes in rat islets of langerhans and insulin secreting cell lines, but dictate cell death by different mechanisms. *Apoptosis* [S.I.], v. 2, n. 2, p. 164-77, 1997.

Drucker D *et al.* Glucagon-like peptide i stimulates insulin gene expression and increases cyclic amp levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 84, n. 10, p. 3434-8, 1987 May 1987.

Efanova I *et al.* Glucose And tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. a process dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Biol Chem* [S.I.], v. 273, n. 50, p. 33501-7, 1998 Dec 1998.

Fineman M *et al.* The human amylin analog, pramlintide, reduces postprandial hyperglucagonemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res* [S.I.], v. 34, n. 9, p. 504-8, 2002 Sep 2002.

Gedulin B *et al.* Role of endogenous amylin in glucagon secretion and gastric emptying in rats demonstrated with the selective antagonist, AC187. *Regul Pept* [S.I.], v. 137, n. 3, p. 121-7, 2006 Dec 2006.

Godber B *et al.* Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* [S.I.], v. 275, n. 11, p. 7757-63, Mar 2000.

Goldsbury C *et al.* Amyloid fibril formation from full-length and fragments of amylin. *J Struct Biol* [S.I.], v. 130, n. 2-3, p. 352-62, 2000 Jun 2000.

Goldsbury C *et al.* Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy. *J Mol Biol* [S.I.], v. 285, n. 1, p. 33-9, 1999 Jan 1999.

Green J *et al.* Full-length rat amylin forms fibrils following substitution of single residues from human amylin. *J Mol Biol* [S.I.], v. 326, n. 4, p. 1147-56, 2003 Feb 2003.

Groenendyk J; Michalak M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Pol* [S.I.], v. 52, n. 2, p. 381-95, 2005.

Harmon J *et al.* Antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content and decreased insulin gene mrna level in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* [S.I.], V. 50, n. 11, p. 2481-6, 2001 Nov 2001.

Harris M *et al.* Comparison of diabetes diagnostic categories in the U.S. population according to the 1997 American Diabetes Association and 1980-1985 World Health Organization diagnostic criteria. *Diabetes Care* [S.I.], v. 20, n. 12, p. 1859-62, 1997 Dec 1997.

Harris MI *et al.* Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care* [S.I.], v. 21, n. 4, p. 518-24, 1998 Apr 1998.

Hartter E *et al.* Basal and stimulated plasma levels of pancreatic amylin indicate its co-secretion with insulin in humans. *Diabetologia* [S.I.], v. 34, n. 1, p. 52-4, 1991 Jan 1991.

Hay D *et al.* Pharmacological discrimination of calcitonin receptor: receptor activity-modifying protein complexes. *Mol Pharmacol* [S.I.], v. 67, n. 5, p. 1655-65, 2005 May 2005.

Heitmeier M *et al.* Interferon-gamma increases the sensitivity of islets of langerhans for inducible nitric-oxide synthase expression induced by interleukin 1. *J Biol Chem* [S.I.], v. 272, n. 21, p. 13697-704, May 1997.

Holtz W *et al.* Oxidative stress-triggered unfolded protein response is upstream of intrinsic cell death evoked by parkinsonian mimetics. *J Neurochem* [S.I.], v. 99, n. 1, p. 54-69, Oct 2006.

Holz GT *et al.* Pancreatic Beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature* [S.I.], v. 361, n. 6410, p. 362-5, 1993 Jan 1993.

Hsieh Y *et al.* Differential endoplasmic reticulum stress signaling pathways mediated by inos. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 359, n. 3, p. 643-8, Aug 2007.

Höppener J *et al.* Islet Amyloid and type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* [S.I.], v. 343, n. 6, p. 411-9, 2000 Aug 2000.

Ishido M. Overexpression of BCL-2 inhibits nuclear localization of annexin i during tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in porcine renal LLC-PK1 cells. *Regul Pept* [S.I.], v. 124, n. 1-3, p. 45-51, 2005 Jan 2005.

Janson J *et al.* The Mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 491-8, 1999 Mar 1999a.

Kang Y *et al.* Regulation of programmed cell death in neuronal cells by nitric oxide. *In Vivo* [S.I.], v. 18, n. 3, p. 367-76.

Kharroubi I *et al.* Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* [S.I.], v. 145, n. 11, p. 5087-96, 2004 Nov 2004.

Kilpatrick E; Robertson R. Differentiation between glucose-induced desensitization of insulin secretion and beta-cell exhaustion in the HIT-T15 cell line. *Diabetes* [S.I.], v. 47, n. 4, p. 606-11, 1998 Apr 1998.

Konarkowska B *et al.* The aggregation potential of human amylin determines its cytotoxicity towards islet beta-cells. *Febs J* [S.I.], v. 273, n. 15, p. 3614-24, 2006 Aug 2006a.

Kong M *et al.* Infusion of pramlintide, a human amylin analogue, delays gastric emptying in men with IDDM. *Diabetologia* [S.I.], v. 40, n. 1, p. 82-8, 1997 Jan 1997.

Laifenfeld D *et al.* RAB5 mediates an amyloid precursor protein signaling pathway that leads to apoptosis. *J Neurosci* [S.I.], v. 27, n. 27, p. 7141-53, Jul 2007.

Lee MI; Kuo FC; Whitmore GA; Sklar J. *Pnas* [S.I.], v. 97, n. 18, p. 9834-39, Aug 29, 2000.

Lillioja S *et al.* Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. longitudinal and cross-sectional studies in pima indians. *N Engl J Med* [S.I.], v. 318, n. 19, p. 1217-25, 1988 May 1988.

Lim L; Pervaiz S. Annexin 1: The new face of an old molecule. *Faseb J* [S.I.], v. 21, n. 4, p. 968-75, 2007 Apr 2007.

Lorenzo A *et al.* Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* [S.I.], v. 368, n. 6473, p. 756-60, 1994 Apr 1994a.

Lukinius A *et al.* Co-localization of islet amyloid polypeptide and insulin in the b cell secretory granules of the human pancreatic islets. *Diabetologia* [S.I.], v. 32, n. 4, p. 240-4, 1989 Apr 1989.

Lynn F *et al.* A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor expression in beta cells. *Faseb J* [S.I.], v. 17, n. 1, p. 91-3, 2003 Jan 2003.

Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 66, n. 8, p. 1433-40, 2003 Oct 2003.

Marzban L *et al.* Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. *Exp Gerontol* [S.I.], v. 38, n. 4, p. 347-51, 2003 Apr 2003.

Marzban L *et al.* Role of beta-cell prohormone convertase (PC)1/3 in processing of pro-islet amyloid polypeptide. *Diabetes* [S.I.], v. 53, n. 1, p. 141-8, 2004 Jan 2004.

Marechal A *et al.* Activation of peroxynitrite by inducible nitric-oxide synthase: a direct source of nitrative stress. *J Biol Chem* [S.I.], v. 282, n. 19, p. 14101-12, May 2007.

Masad A *et al.* Copper-mediated formation of hydrogen peroxide from the amylin peptide: a novel mechanism for degeneration of islet cells in type-2 diabetes mellitus? *Febs Lett* [S.I.], v. 581, n. 18, p. 3489-93, 2007 Jul 2007.

Mcintyre N *et al.* Intestinal Factors in the control of insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* [S.I.], v. 25, n. 10, p. 1317-24, 1965 Oct 1965.

Mckanna J. Lipocortin 1 in apoptosis: mammary regression. *Anat Rec* [S.I.], v. 242, n. 1, p. 1-10, 1995 May 1995.

Mclatchie L *et al.* Ramps regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* [S.I.], v. 393, n. 6683, p. 333-9, 1998 May 1998.

Meier J *et al.* Inhibition of human iapp fibril formation does not prevent beta-cell death: evidence for distinct actions of oligomers and fibrils of human iapp. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 291, n. 6, p. E1317-24, 2006 Dec 2006a.

Mirzabekov T *et al.* Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *J Biol Chem* [S.I.], v. 271, n. 4, p. 1988-92, 1996 Jan 1996.

Mokdad A *et al.* The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *Jama* [S.I.], v. 286, n. 10, p. 1195-200, 2001 Sep 2001.

Muff R *et al.* An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology* [S.I.], v. 140, n. 6, p. 2924-7, 1999 Jun 1999.

Nauck M *et al.* Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* [S.I.], v. 91, n. 1, p. 301-7, 1993 Jan 1993.

Ohnishi M *et al.* Involvement of annexin-i in glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets. *Endocrinology* [S.I.], v. 136, n. 6, p. 2421-6, 1995 Jun 1995.

Olson L *et al.* Reduction of insulin gene transcription in hit-t15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 Transcription factor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 92, n. 20, p. 9127-31, 1995 Sep 1995.

Pfeifer M *et al.* Insulin Secretion in diabetes mellitus. *Am J Med* [S.I.], v. 70, n. 3, p. 579-88, 1981 Mar 1981.

Pieper G *et al.* Reactive oxygen and reactive nitrogen as signaling molecules for caspase 3 activation in acute cardiac transplant rejection. *Antioxid Redox Signal* [S.I.], v. 10, n. 6, p. 1031-40, Jun 2008.

Prossnitz ER. Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors. *Life Sciences* [S.I.], v.75, n. 8, p.893-89, Jul 2004.

Pitocco D *et al.* Hypouricemia linked to an overproduction of nitric oxide is an early marker of oxidative stress in female subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* [S.I.], v. 24, n. 4, p. 318-23.

Roden M *et al.* Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* [S.I.], v. 97, n. 12, p. 2859-65, 1996 Jun 1996.

Roth J *et al.* Antiobesity effects of the beta-cell hormone amylin in diet-induced obese rats: effects on food intake, body weight, composition, energy expenditure, and gene expression. *Endocrinology* [S.I.], v. 147, n. 12, p. 5855-64, 2006 Dec 2006a.

Schuit F *et al.* Glucose-regulated gene expression maintaining the glucose-responsive state of beta-cells. *Diabetes* [S.I.], v. 51 Suppl 3, p. S326-32, 2002 Dec 2002.

Solito E *et al.* Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 133, n. 2, p. 217-28, 2001 May 2001.

Solito E *et al.* A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *Faseb J* [S.I.], v. 17, n. 11, p. 1544-6, 2003 Aug 2003.

Squadrito G *et al.* Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 376, n. 2, p. 333-7, Apr 2000.

Tanaka Y *et al.* A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 99, n. 19, p. 12363-8, 2002 Sep 2002.

Tseng C *et al.* Postprandial stimulation of insulin release by glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP). effect of a specific glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor antagonist in the rat. *J Clin Invest* [S.I.], v. 98, n. 11, p. 2440-5, 1996 Dec 1996.

Verchere C *et al.* Islet amyloid formation associated with hyperglycemia in transgenic mice with pancreatic beta cell expression of human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 93, n. 8, p. 3492-6, 1996 Apr 1996.

Wang J *et al.* The prohormone convertase enzyme 2 (PC2) is essential for processing pro-islet amyloid polypeptide at the NH<sub>2</sub>-terminal cleavage site. *Diabetes* [S.I.], v. 50, n. 3, p. 534-9, 2001 Mar 2001.

Wang X *et al.* Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology* [S.I.], v. 140, n. 10, p. 4904-7, 1999 Oct 1999.

Wang X *et al.* Glucagon-like peptide-1 causes pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic beta-cells by a cyclic adenosine monophosphate/protein kinase a-dependent mechanism. *Endocrinology* [S.I.], v. 142, n. 5, p. 1820-7, 2001 May 2001.

Warram J *et al.* Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type ii diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* [S.I.], v. 113, n. 12, p. 909-15, 1990 Dec 1990.

Wek R *et al.* Coping with stress: EIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* [S.I.], V. 34, N. PT 1, P. 7-11, 2006 Feb 2006.

Xu G *et al.* Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes* [S.I.], v. 56, n. 6, p. 1551-8, 2007 Jun 2007.

Yates S *et al.* Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem* [S.I.], v. 74, n. 3, p. 1017-25, 2000 Mar 2000.

Young A. Inhibition of gastric emptying. *Adv Pharmacol* [S.I.], v. 52, p. 99-121, 2005.

Yuan J *et al.* Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* [S.I.], v. 7, p. 85, 2006.

Zhang S *et al.* Fibrillogenic amylin evokes islet beta-cell apoptosis through linked activation of a caspase cascade and JNK1. *J Biol Chem* [S.I.], v. 278, n. 52, p. 52810-9, 2003 Dec 2003a.

Zhang S *et al.* Induction of apoptosis by human amylin in RINM5F islet beta-cells is associated with enhanced expression of P53 and P21WAF1/CIP1. *Febs Lett* [S.I.], v. 455, n. 3, p. 315-20, 1999 Jul 1999a.

Zimmet P *et al.* Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* [S.I.], v. 414, n. 6865, p. 782-7, 2001 Dec 2001.