## RODRIGO NUNES LAMOUNIER

## Perfil de expressão de genes modulados pela Pioglitazona em ilhotas pancreáticas murídeas

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

Área de concentração: Endocrinologia e Metabologia

Orientador: Dra. Maria Lúcia Correa 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

| Lamounier<br>Perfil o<br>murídeas | ; Rodrigo Nunes<br>le expressão de genes modulados pela pioglitazona em ilhotas pancreáticas<br>/ Rodrigo Nunes Lamounier São Paulo, 2008     |
|-----------------------------------|---|
| Tese(de                           | putorado)Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  |
| Departam                          | ento de Clínica Médica .  |
| Área de                           | e concentração: Endocrinologia.   |
| Orienta                           | dora: Maria Lúcia Corrêa Giannella.   |
| Descrit<br>4.PPAR g<br>gênica     | tores: 1.Diabetes Mellitus 2.Ilhotas pancreáticas 3.Tiazolidinedionas<br>ama 5.Análise de seqüência com séries de oligonucleotídeos 6.Express |
| USP/FM/S                          | SBD-021/08  |

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular – LIM 25 –da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo a concessão de bolsa de estudo da FAPESP (processo nº 04/01816-5) e auxílio-pesquisa da FAPESP (processo nº 04/10797-4). Parte do trabalho foi realizada no Laboratório do Centro de Genômica Funcional do Instituto de Diabetes Obesidade e Metabolismo da Universidade da Pensilvânia, Fildadélfia, EUA, tendo, no período, sido financiado também pelo fundo de genômica funcional da célula beta (UO1 DK 56947) do NIDDK e o fundo do Centro de pesquisa em Diabetes e Endocrinologia (DERC) (P30 DK 19525).

Aos meus pais, Oscar e Teresa, A quem devo tudo.

#### Agradecimentos

Ao meu tio Júlio, pelo carinho e apoio fundamentais durante todo o período de realização deste trabalho.

Aos meus irmãos Valéria, André, Guilherme, Adércio, Najla e Camila, pelo afeto.

- Aos meus sobrinhos queridos Carolina, Deborah, Pedro, Arthur e Maria, que com sua alegria renovam nossas esperanças. "O mundo torna a começar."
- À Laila, pelo amor.
- A minha família, pela torcida.
- À Professora Maria Lúcia Cardillo C. Giannella, minha orientadora, pelo aprendizado intenso e pelo convívio aberto, profícuo e justo.
- Ao Professor Daniel Giannella-Neto, pela oportunidade de realizar este estudo.
- Aos colegas Cássio Negro Coimbra e Leonardo Sokolnik de Oliveira, parceiros neste projeto de pesquisa.
- Ao Professor Klaus Kaestner do Centro de Genômica Funcional da Faculdade de Medicina da Universidade da Pensilvânia, pela oportunidade enriquecedora de trabalhar neste grande centro de pesquisa.
- Ao biólogo Peter White, da UPenn, pelo grande aprendizado e pela amizade.
- À Janice Sepúlveda, minha parceira e amiga inestimável, pelo apoio constante.
- Ao biomédico Ricardo Rodrigues Giorgi, pela orientação nos momentos técnicos de dúvida e pela ajuda no momento da impressão da tese.
- Ao biólogo Marco Antônio Rêgo, que ajudou na preparação e anestesia dos animais.
- A biomédica Flávia Soares Louro Costal pela ajuda no processo de isolamento e cultivo das ilhotas.

- À técnica Maria Auxiliadora R. Higa, que fez alguns dos géis de agarose utilizados nesse estudo.
- À bióloga Maria Ângela Henriques Zanela Fortes, pelo apoio constante e aprendizado nas técnicas de biologia molecular.
- A Jean Jorge Silva de Souza, pelo prazer em compartilhar com sua inteligência e corretismo. Nobre colega e grande amigo.
- A todos os colegas do LIM-25, pelo apoio em diversos momentos durante a realização deste trabalho.
- À FAPESP pelo apoio à pesquisa e à transformação de idéias.
- Agradeço aos animais usados em pesquisas biomédicas pela sua contribuição inestimável ao avanço da medicina e à melhoria da qualidade de vida.

"O senhor escute meu coração, pegue no meu pulso. O senhor avista meus cabelos brancos... Viver – não é? – é muito perigoso. Por que ainda não se sabe. Porque aprender-a-viver é que é o viver, mesmo.

...

...

Qual é o caminho certo da gente? Nem pra frente, nem pra trás: só pra cima. Ou parar curto quieto. Feito os bichos fazem. Os bichos estão só é muito esperando? Mas, quem é que sabe como? Viver... O senhor já sabe: viver é etcétera...

Sertão é o sozinho. Compadre meu Quelemén diz: que eu sou muito sertão? Sertão é dentro da gente. "

Riobaldo, em Grande Sertão: Veredas.

João Guimarães Rosa.

"Toda Compreensão súbita é finalmente a revelação de uma aguda incompreensão. Todo momento de achar é um perder-se a si próprio. Talvez me tenha acontecido uma compreensão tão total quanto uma ignorância, e dela eu venha a sair intocado e inocente como antes. Qualquer entender meu nunca estará à altura dessa compreensão, pois viver é somente a altura a que posso chegar – meu único nível é viver. Só que agora, agora sei de um segredo. Que já estou esquecendo, ah sinto que já estou esquecendo..."

- vii -

Clarice Lispector

| Lista de abreviaturas  | xii   |
|--|-------|
| Lista de siglas  | xiii  |
| Lista de símbolos  | xvi   |
| Lista de figuras   | xviii |
| Lista de tabelas   | XX    |
| Resumo   | xxii  |
| Summary  | xxiv  |
| 1. Introdução  | 1     |
| 1.1. Uso Clínico das Tiazolidinedionas                                     | 5     |
| 1.2. PPARγ   | 7     |
| 2. Objetivo  | 12    |
| 3. Materiais e Métodos   | 13    |
| 3.1. Animais   | 13    |
| 3.2. Padronização da técnica de isolamento de ilhotas murídeas             | 13    |
| 3.2.1. Canulação e digestão do pâncreas                                    | 15    |
| 3.2.2. Interrupção da digestão e preparo da amostra para a purificação     |       |
| das ilhotas  | 17    |
| 3.2.3. Gradiente de HBSS-Ficoll para purificação das ilhotas               | 17    |
| 3.3. Avaliação das ilhotas obtidas: expressão de genes-chave e viabilidade |       |
| das células medida pela secreção de insulina                               | 19    |

(continua)

### Sumário

(continuação)

| 3.3.1. Extração de RNA total, síntese de DNA complementar e reação em car | deia |
|---|------|
| da polimerase (PCR) dos genes PDX-1, insulina-1, insulina-2,              |      |
| glucagon e somatostatina  | 20   |
| 3.3.2. Padronização da dosagem de insulina no meio de cultura             |      |
| pela técnica de ELISA   | 22   |
| 3.4. Preparo da solução de Pioglitazona                                   | 25   |
| 3.5. Delineamento experimental  | 26   |
| 3.6. Extração de RNA total e controle de qualidade do RNA extraído        | 27   |
| 3.7. Re-análise da integridade das amostras de RNA obtidas                |      |
| 3.8. Amplificação das amostras de RNA obtidas                             |      |
| 3.9. Hibridização das amostras na plataforma de microarranjo de DNA       | 33   |
| 3.9.1 Mouse Panchip 6.0   | 33   |
| 3.9.2 Marcação e hibridização das amostras nas lâminas                    | 34   |
| 3.9.3. Análise dos dados obtidos na hibridização dos microarranjos de DNA | 38   |
| 3.10. Confirmação dos resultados obtidos pela técnica de RTq-PCR          | 40   |
| 3.10.1. Síntese de cDNA   | 40   |
| 3.10.2. PCR em tempo Real   | 41   |

(continua)

### Sumário

(continuação)

| 3.10.3. Seleção do gene controle interno                              | 44 |
|---|----|
| 3.10.4. Análise estatística   | 45 |
| 4. Resultados   | 46 |
| 4.1. Viabilidade das ilhotas cultivadas pela secreção de insulina     | 46 |
| 4.2. Condições experimentais  | 46 |
| 4.2.1. Análise da integridade do RNA em gel de agarose                |    |
| denaturante   | 48 |
| 4.2.2. Integridade do RNA no equipamento Bioanalyser 2100             | 49 |
| 4.3. Rendimento da amplificação das amostras de RNA para hibridização | 55 |
| 4.4. Resultados da hibridização na plataforma Mouse Panchip 6.0       | 56 |
| 4.5. Análise de vias acometidas pelo Ingenuity® Systems               | 63 |
| 4.6. Resultados dos experimentos de RT-qPCR                           | 66 |
| 5. Discussão  | 70 |
| 6. Conclusão  | 85 |
| 7. Referências bibliográficas   | 83 |
| 8. Anexos   | 98 |

## Lista de abreviaturas

| Dr.     | Doutor          |
|---------|-----------------|
| et al.  | e outros        |
| e cols. | e colaboradores |
| Pio     | Pioglitazona    |

## Lista de siglas

| BSA   | Albumina sérica bovina; Bovine Serum Albumin           |
|-------|--|
| cDNA  | Ácido desoxiribonucléico complementar                  |
| DEPC  | Dietilpirocarbonato de sódio                           |
| DM    | Diabetes Mellitus                                      |
| DM1   | Diabetes Mellitus tipo 1                               |
| DM2   | Diabetes Mellitus tipo 2                               |
| DMSO  | Dimetilsulfóxido                                       |
| DNA   | Ácido desoxirribonucléico                              |
| dNTPs | Desorribonuleotídeos trifosfatados                     |
| DTT   | Ditiotreitol   |
| DTZ   | Ditizona   |
| EDTA  | Ácido etilenodiamino tetra-acético                     |
| EtOH  | Etanol, álcool etílico                                 |
| FC    | Diferença de expressão; Fold Change                    |
| FDR   | False Discovery Rate, taxa de descobrimento falso      |
| FGC   | Centro de genômica funcional; Functional Genomics Core |
| HBSS  | Solução balanceada de Hank's; Hank's Balanced Salt     |
|       | Solution   |
| HEPES | Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1;     |
|       | reagente tampão  |

(continua)

## Lista de siglas

(continuação)

| HK gene    | gene controle interno; Housekeeping                     |
|------------|---|
| IGT        | Tolerância à glicose diminuída, impaired glucose        |
|            | tolerance   |
| mQ         | MilliQ  |
| NGT        | Tolerância normal à glicose; normal glucose tolerance   |
| NIDDK      | National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney |
|            | Diseases  |
| NTC        | Controle branco, sem amostra; No Template Control       |
| ΡΡΑRγ      | Receptor ativado do peroxissomo gama                    |
| PPARα      | Receptor ativado do peroxissomo alfa                    |
| PVPI       | Polivinilpirrolidona Iodo                               |
| RTq-PCR    | Reação em cadeia da polimerase pós-transcrição reversa  |
|            | quantitativa  |
| q.s.p      | Quantidade suficiente para                              |
| rpm        | Rotações por minuto                                     |
| RIA        | Radioimunoensaio  |
| RPMI       | Meio de cultura cujo nome é um acrônimo oriundo do      |
|            | local onde foi desenvolvido; Roswell Park Memorial      |
|            | Institute   |
| RNA        | Ácido ribonucléico                                      |
| RNAm       | Ácido ribonucléico mensageiro                           |
| RNAse      | Ribonuclease que catalisa a hidrólise do RNA.           |
| (continua) |   |

## Lista de siglas

(continuação)

| RT-PCR | Reação em cadeia da polimerase pós-transcrição reversa |
|--------|--|
| SDS    | Dodecil sulfato de sódio, Sodium Dodecyl Sulfate       |
| SFB    | Soro fetal bovino                                      |
| SIEG   | Secreção de insulina estimulada por glicose            |
| SSC    | Tampão Sodium Chloride / Sodium Citrate                |
| STZ    | Estreptozotocina                                       |
| TZD    | Tiazolidinedionas                                      |

| °C              | graus celsius                                    |
|-----------------|--|
| ±               | mais ou menos                                    |
| <               | menor que  |
| >               | maior que  |
| cm              | centímetro                                       |
| cm <sup>2</sup> | centímetro quadrado                              |
| $CO_2$          | gás carbônico                                    |
| ddH2O           | água deionizada                                  |
| dL              | decilitro  |
| ERC             | tampão integrante do kit de purificação de cDNA. |
| g               | grama  |
| h               | hora   |
| kg              | kilograma  |
| L               | litro  |
| m               | metro  |
| М               | molar  |
| mg              | miligrama  |
| mL              | mililitro  |
| mm              | milímetro  |

(continua)

### Lista de símbolos

(continuação)

| mM             | milimolar                              |
|----------------|--|
| mmol           | milimol                                |
| ng             | nanograma                              |
| nm             | nanômetro                              |
| overnight      | de um dia para o outro                 |
| O <sub>2</sub> | oxigênio                               |
| рН             | media de alcalinidade ou de acidez     |
| RPE            | tampão utilizado no kit de purificação |
| RW1            | tampão utilizado no kit de purificação |
| S              | segundos                               |
| U              | unidade                                |
| μ              | densidade                              |
| μg             | micrograma                             |
| μL             | microlitro                             |
| μΜ             | micromolar                             |

# Lista de figuras

| Figura 1.  | Relação entre função da célula $\beta$ e resistência à insulina.  | 3     |
|------------|---|-------|
| Figura 2.  | Canulação do ducto e infusão de colagenase.                       | 15    |
| Figura 3.  | Padronização da digestão enzimática do pâncreas.                  | 16    |
| Figura 4.  | Gradiente de HBSS-Ficoll.   | 18    |
| Figura 5.  | Ilhota purificada e corada com DTZ após centrifugação             |       |
|            | em gradiente de HBSS-ficoll.                                      | 19    |
| Figura 6.  | Integridade das bandas relativas ao RNA ribossomal                |       |
|            | de ilhotas purificadas pelo Gradiente de Ficoll.                  | 20    |
| Figura 7.  | Géis representativos da reação de PCR para os genes               |       |
|            | Pdx-1, Insulina 1, Insulina 2, Glucagon e Somatostatina.          | 22    |
| Figura 8.  | Transformação das densidades óticas das seis soluções-padrão      | o em  |
|            | concentração de insulina pela aplicação da função Ln ve           | ersus |
|            | Logito.   | 25    |
| Figura 9.  | Delineamento experimental   | 27    |
| Figura 10. | Ilustração do chip para análise de integridade do RNA no          |       |
|            | equipamento Bioanalyzer.  | 29    |
| Figura 11. | Padrão eletroforético de análise das amostras de RNA.             | 30    |
| Figura 12. | Mouse Panchip 6.0 e a impressora NanoPrint <sup>TM</sup> Arrayer. | 34    |

## Lista de figuras

(continuação)

| Figura 13. | Delineamento do experimento com duas hibridizações de acordo |    |
|------------|--|----|
|            | com a concentração de glicose no meio de cultura.            | 35 |
| Figura 14. | Média da estabilidade de expressão (M) dos quatro genes HK   |    |
|            | testados nas 20 amostras de cDNA utilizadas no experimento.  | 45 |
| Figura 15. | Incremento percentual na concentração de insulina no meio de |    |
|            | cultura modulado pela glicose.                               | 46 |
| Figura 16. | Imagem de gel das amostras de RNA.                           | 48 |
| Figura 17. | Amostras de RNA analisadas no equipamento Bioanalyser.       | 49 |
| Figura 18. | Intensidade de sinal vermelho (Cy5) e verde (Cy3) na imagem  |    |
|            | obtida no experimento de microarranjo.                       | 58 |
| Figura 19. | Escore de intensidade de genes após hibridização com         |    |
|            | a plataforma Panchip.  | 59 |
| Figura 20. | Número de genes modulados pela Pioglitazona nas duas         |    |
|            | concentrações de glicose estudadas.                          | 60 |
| Figura 21. | Legenda dos símbolos utilizados nas figuras do Ingenuity.    | 63 |
| Figura 22. | Via relacionada ao Metabolismo lipídico em 5,6 mM.           | 64 |
| Figura 23. | Via relacionada à Morte celular e ao ciclo celular em 23 mM. | 65 |
| Figura 24. | Via relacionada ao Metabolismo lipídico e ciclo celular      |    |
|            | em 23 mM.  | 66 |

### Lista de tabelas

| Tabela 1.  | Seqüência dos amplímeros utilizados nas reações de RT-PCR                      | . 22                                   |  |  |
|------------|--|--|--|--|
| Tabela 2.  | Seqüência dos amplímeros utilizados nas reações de RT-qPCR                     |  |  |  |
|            | com respectiva eficiência calculada pelo método de Pfaffl                      | 43                                     |  |  |
| Tabela 3.  | Amostras de RNA obtidas do cultivo das ilhotas pancreáticas                    | 47                                     |  |  |
| Tabela 4.  | Rendimento das amostras de RNA amplificadas pelo <i>kit</i> Nugen <sup>®</sup> |  |  |  |
|            | a partir de 50 ng de RNA.  | 56                                     |  |  |
| Tabela 5.  | Genes modulados pela Pioglitazona em ambas as concentraçõ                      | Pioglitazona em ambas as concentrações |  |  |
|            | de glicose de acordo com o Panchip.  | 61                                     |  |  |
| Tabela 6.  | Confirmação pelo RT-qPCR de genes modulados pela                               |  |  |  |
|            | Pioglitazona em ilhotas expostas a 5,6 mM.                                     | 67                                     |  |  |
| Tabela 7.  | Genes modulados pela Pioglitazona em ilhotas expostas                          |  |  |  |
|            | a 23 mM de glicose confirmados pelo RT-qPCR                                    | 67                                     |  |  |
| Tabela 8.  | Genes pertencentes às vias biológicas identificadas pelo                       |  |  |  |
|            | Ingenuity <sup>®</sup> cuja expressão mostrou-se modulada pela                 |  |  |  |
|            | Pioglitazona na análise do RT-qPCR   | 68                                     |  |  |
| Tabela 9.  | Genes modulados pela concentração de glicose                                   |  |  |  |
|            | no meio de cultura   | 69                                     |  |  |
| Tabela 10. | Genes modulados para baixo no experimento contendo 5,6 ml                      | o contendo 5,6 mM                      |  |  |
|            | de glicose no meio de cultura  | 98                                     |  |  |
| Tabela 11. | ela 11. Genes modulados para cima no experimento contendo 5,6 m                |  |  |  |
|            | de glicose no meio de cultura  | 100                                    |  |  |

### Lista de tabelas

(continuação)

| Tabela 12. | Genes modulados para baixo no experimento contendo |     |
|------------|--|-----|
|            | 23 mM de glicose no meio de cultura.               |     |
|            | Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente     | 102 |
| Tabela 13. | Genes modulados para cima no experimento           |     |
|            | contendo 23 mM de glicose no meio de cultura.      |     |
|            | Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente.    | 109 |

#### Resumo

O receptor ativado do peroxissomo gama (PPAR-y) é regulador do metabolismo e diferenciação do tecido adiposo, sendo um alvo conhecido das tiazolidinedionas (TZD), utilizadas para o tratamento do diabetes tipo 2 (DM2). As TZD agem como um agente sensibilizador da ação da insulina nos tecidos periféricos e tem sido especulado que as TZDs podem ter um papel na função da célula β, prevenindo perda de massa e melhorando a sua viabilidade a longo prazo. Este efeito seria supostamente mediado pela transcrição de genes que favoreceriam a lipólise, diminuindo o conteúdo intracelular de triglicérides e, portanto, diminuindo a lipotoxicidade. Entretanto, alguns estudos também mostraram efeito nulo ou mesmo deletério das TZDs sobre as ilhotas pancreáticas. Na realidade, o papel de genes-alvo para o PPAR-y nas ilhotas pancreáticas é ainda pouco conhecido. Estudamos o perfil de expressão gênica induzido pelo tratamento com Pioglitazona (Pio), uma TZD aprovada e disponível para uso clínico no tratamento do DM2, em ilhotas pancreáticas murídeas em cultura primária, com concentrações normal e suprafisiológica de glicose no meio de cultura. As ilhotas foram obtidas de ratos wistar machos de dois meses de idade e isoladas pelo método do gradiente de Ficoll e então cultivadas em 5,6 mM ou 23 mM de glicose por 24h, sendo tratadas com Pio 10 µM ou DMSO 0,1% (veículo). A Pioglitazona foi cedida pela Takeda Farmacêutica, Osaka, Japão. O RNA foi extraído com Trizol e purificado com o kit RNeasy (Qiagen). As amostras foram marcadas e hibridizadas no microarranjo de cDNA Mouse Panchip 13k, usando-se cinco replicatas biológicas diferentes para cada condição. A análise estatística dos dados do microarranjo foi feita com o uso do programa significance analysis of microarrays (SAM) com uso de taxa de descobrimento falso (FDR) de 20%. A análise das vias acometidas foi feita com o

Ingenuity Pathway Analysis (www.ingenuity.com). Os resultados de expressão gênica foram confirmados por RT-qPCR. Em concentração de 5,6 mM de glicose no meio de cultura, 101 genes foram modulados pela Pio, sendo 49 regulados para cima, com aumento de sua expressão na presença da droga e 52 genes regulados para baixo. Em 23 mM de glicose, 1.235 genes foram afetados, sendo 621 para cima e 623 para baixo. A comparação entre as duas condições revelou 74 genes que foram modulados em ambas as concentrações de glicose. A análise das vias biológicas alteradas mostrou que genes relacionados ao metabolismo de lípides foram modulados em ambas as concentrações de glicose. Em 23 mM foi ainda significativo o grupo de genes relacionados a ciclo celular e morte celular que tiveram sua expressão modificada pela presença da droga na cultura. Este dado demonstrou que além de seus efeitos conhecidos nos adipócitos, o sensibilizador de insulina Pioglitazona modula a expressão de genes nas ilhotas pancreáticas, especialmente na presença de concentrações suprafisiológicas de glicose, afetando notadamente genes relacionados ao metabolismo lipídico, sendo vários deles ligados a lipogênese, como Srebf1, Scd2 e Fabp4 cujas expressões aumentaram em ambas as concentrações de glicose. Além disso foi observado aumento na expressão de genes com atividade pró-apoptótica como Tnf, Bad, Bax, Caspase4, Fadd e Myc. A Pioglitazona parece induzir um perfil gênico desfavorável em ilhotas pancreáticas mantidas em cultura em concentrações suprafisiológicas de glicose.

#### Summary

Peroxisome proliferator-activator receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) is a target for thiazolidinedione (TZD) antidiabetic drugs and a regulator of adipose tissue differentiation and metabolism. TZD act as an insulin sensitizing agent on peripheral tissues. It has been speculated that TZD could play a role on beta-cell function, preventing loss and improving viability in the long-term. This effect is supposed to be mediated through a potential benefit against lipotoxicity, favouring lypolisis and decreasing intracellular tryglicerides content. Nevertheless some studies also showed a lack or even a potential deleterious effect of TZD on islets. The role of PPAR-y target genes in pancreatic islets is actually still largely unclear. We studied the gene expression profile induced by the treatment with Pioglitazone (Pio), an approved TZD for T2DM therapy, on rat pancreatic islets primary culture both at normal and supraphysiological glucose medium concentrations. Islets were obtained from 2 month-old, male, wistar rats and isolated through the Ficoll gradient method and then cultured with 5.6 mM or 23 mM of glucose concentration for 24h, being treated with Pio 10 µM or DMSO 0.1% (vehicle). Pioglitazone was provided by Takeda Pharmaceuticals, Osaka, Japan. RNA was extracted with Trizol (Sigma) and purified with RNeasy kit (Qiagen). Samples were labeled and then hybridized on the Mouse PanChip 13k cDNA microarray, using 5 different biological replicates for each test condition. Statistical Analysis of the microarray data was performed using significance analysis of microarrays (SAM) with a false discovery rate of 20%. Pathways assessment was performed through Ingenuity Pathway Analysis (www.ingenuity.com). Gene expression results were confirmed through RT-qPCR. At 5.6 mM glucose 101 genes were modulated by Pio, 49 upregulated and 52 downregulated. At 23 mM, 1,235 genes were affected, 612

upregulated and 623 downregulated. Comparison between both conditions revealed 74 genes that were similarly modulated at both glucose concentrations. Pathway analysis of perturbed genes revealed biologically relevant networks related to lipid metabolism at both glucose medium concentrations. At 23 mM, cell cycle and cell death pathways were significant modulated as well. These data demonstrates that in addition to known effect in adipocytes, the insulin sensitizing agent Pioglitazone modulates gene expression in pancreatic islets, especially in the presence of supraphysiological glucose concentrations, affecting especially lipid metabolism and mechanisms of cell death and cell cycle. Considering the ontology of modulated genes it seems to be a trend towards lypogenesis (increased *Srebf1, Scd2* and *Fabp4* RNA expressions) with Pio treatment also enhancing the abundance of some genes considered to be pro apoptotic like *Tnf, Bad, Bax,* Caspase4, *Fadd* and *Myc*. Pioglitazone seems to induce a negative gene expression profile in islets cultured at high glucose concentrations.

### 1. Introdução

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina associados ou não a resistência à ação deste hormônio. Os extremos das manifestações clínicas, assim como aspectos fisiopatológicos, constituem-se nas bases para a classificação em DM tipo 1 (quadro clínico exuberante resultante do déficit quase absoluto de insulina) e DM tipo 2 (pacientes oligo ou assintomáticos com quadro de resistência insulínica associada a defeito parcial de secreção).

O DM tipo 2 (DM2) é a forma mais comum de DM em todas as partes do mundo e sua prevalência aumenta com a idade, surgindo geralmente após os 40 anos. Os pacientes apresentam capacidade secretória de insulina inadequada para suplantar a resistência insulínica concomitante e, como resultado, surge a hiperglicemia. Oitenta por cento dos pacientes são obesos, apresentam história familiar de DM e podem ser assintomáticos ao diagnóstico<sup>1</sup>. O desequilíbrio da relação entre função de célula  $\beta$  e sensibilidade à ação da insulina é central na patogênese da hiperglicemia no DM2. A homeostasia glicêmica depende de um sistema de retro-controle que envolve figado, tecidos periféricos (principalmente músculos) e células  $\beta$ pancreáticas. Trata-se da interação entre determinada herança genética que predispõe à disfunção de célula  $\beta$  e o ambiente em que se insere. Ambos os defeitos estão presentes na maioria dos pacientes, apesar de haver ainda muito debate sobre o real papel de cada um destes fatores na fisiopatologia do DM2<sup>2</sup>.

A incidência crescente de obesidade, que é um fator importante para surgimento de resistência insulínica, está levando o DM2 a proporções epidêmicas em todo o mundo. Estima-se que em 2010 mais de 220 milhões de pessoas terão diabetes no mundo, com um crescimento mundial de 46% em relação ao ano 2000, sendo este aumento de 23,5% na Europa e América do Norte e de 50,5% na América Latina, África e Ásia. O impacto disso é enorme. Pacientes com diabetes têm uma morbidade e mortalidade bastante aumentada principalmente por problemas micro e macrovasculares. Retinopatia diabética e edema macular ocorrem isolados ou de maneira associada em 40 a 50% dos pacientes com DM2, sendo o diabetes a principal causa de cegueira adquirida nos Estados Unidos. É também uma das principais causas de insuficiência renal dialítica e a principal causa de amputação não traumática de membros inferiores. Pacientes com DM2 têm um risco duas a quatro vezes maior de apresentar acidente vascular cerebral ou infarto agudo do miocárdio<sup>3</sup>.

Fisiologicamente, a secreção de insulina pela célula  $\beta$  é um fenômeno modulado pela sensibilidade à ação do hormônio. Indivíduos que apresentam resistência à ação da insulina possuem maior capacidade de resposta secretória de insulina à glicose e a outros secretagogos do que aqueles insulino-sensíveis, que têm uma resposta menor. Esta relação entre sensibilidade e secreção insulínica não é linear e fica mais bem representada por uma hipérbole (Figura 1). Avaliações transversais em indivíduos com alto risco para desenvolver DM2, mesmo com tolerância normal à glicose, evidenciam já a presença de deficiência de secreção pela célula  $\beta$ . O acompanhamento prospectivo de índios Pima, população com uma das mais altas incidências de DM2 em todo o mundo, que evoluíram desde a tolerância normal à glicose (NGT) à intolerância (IGT) e posteriormente ao DM2, demonstrou a interdependência da função secretória com a sensibilidade à ação insulínica na manutenção do equilíbrio glicêmico. A secreção aguda de insulina diminuiu 27% na transição de NGT para IGT e mais 57% ao progredir para diabetes. Por outro lado, a sensibilidade insulínica diminuiu em 31%, de maneira contínua, até o diagnóstico de diabetes nesta população. Portanto, defeitos na secreção e ação da insulina ocorrem precocemente na patogênese do DM2<sup>3,4</sup>.



Figura 1: Relação entre função da célula  $\beta$  e resistência à insulina Adaptado de *Weyer C*. e cols.<sup>2</sup>, DM = Diabetes Mellitus; NGT=Tolerância normal à glicose; IGT: Tolerância à glicose diminuída

Indivíduos com resistência insulínica freqüentemente apresentam-se com uma constelação de características como obesidade visceral, dislipidemia aterogênica, hipertensão arterial, hiperinsulinemia e tolerância à glicose diminuída, estado próinflamatório e pró-trombótico, com fibrinólise prejudicada e disfunção endotelial. Além disso, a própria deficiência da ação periférica da insulina faz com que haja aumento da lipólise, com liberação de ácidos graxos livres (AGL), que por sua vez alteram a função secretória da célula β (lipotoxicidade).

Desde a publicação dos resultados do *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT), que demonstraram uma redução significativa das complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) em diabéticos tipo 1 submetidos a um tratamento intensivo da hiperglicemia<sup>5</sup>, efeito posteriormente

em relação às complicações macrovasculares<sup>6</sup>, tem-se observado também intensificado os esforços para a obtenção da normoglicemia no tratamento do diabetes. Similarmente, em relação aos pacientes com DM2, o United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) também demonstrou o beneficio do controle glicêmico em relação à prevenção das complicações de longo-prazo. Mais além, dados do UKPDS mostraram ainda que a função da célula β já está bastante diminuída por ocasião do diagnóstico e continua diminuindo com a evolução da doença, sendo determinante para o seu caráter progressivo, com a necessidade de uso de terapia combinada com associação de várias medicações para se manter glicemia adequada<sup>7,8</sup>. A importância da piora da função secretória da célula  $\beta$  como fator imperativo na evolução de estados de intolerância glicêmica para o diagnóstico de diabetes e para a piora da glicemia foi também demonstrada em estudo prospectivo recentemente publicado<sup>9</sup>. A despeito das diversas opções terapêuticas que vêm surgindo nos últimos anos para o tratamento do diabetes, especificamente para a preservação da função secretória do pâncreas em longo prazo, não existe ainda uma opção terapêutica que comprovadamente ofereça este benefício. O uso precoce de insulinoterapia nos pacientes com DM2 parece ser uma das alternativas que podem ser úteis nesse sentido. De maneira semelhante, alguns dados da literatura sugerem potencial beneficio na preservação ou recuperação das células  $\beta$  com o uso das tiazolidinedionas e, mais recentemente, com os novos medicamentos da nova classe terapêutica dos incretinomiméticos<sup>10</sup>.

### 1.1. Uso Clínico das Tiazolidinedionas

Respondendo por mais de 90% dos casos de diabetes no mundo e com fisiopatologia bastante relacionada à obesidade, o DM2 apresenta como aspecto central no seu desenvolvimento a resistência à ação periférica da insulina, que por sua vez está relacionada a um grupo de alterações que incluem hiperinsulinemia resultante, hipertensão arterial, dislipidemia, hiperuricemia, hipercoagulabilidade e microalbuminúria<sup>11</sup>.

A homeostase glicêmica normal é mantida por três processos interrelacionados: a secreção de insulina, a produção hepática de glicose e a captação de glicose pela célula periférica<sup>12</sup>. O tratamento do DM2 tem evoluído muito nos últimos anos com a utilização de medicamentos que atuam em cada um desses processos.

As tiazolidinedionas (TZD), também conhecidas como glitazonas, são uma classe de drogas relativamente recente, cuja ação se caracteriza predominantemente pela diminuição da resistência periférica à ação da insulina. As TZD foram aprovadas para uso clínico em 1997, quando a Troglitazona, o protótipo da classe, entrou para o mercado. Em 1999, foram aprovadas para uso também a Pioglitazona e a Rosiglitazona. Em 2000, a Troglitazona foi retirada do mercado devido a relatos de lesão hepatocelular idiossincrásica, levando a insuficiência hepática fulminante<sup>13</sup>.

Do ponto de vista clínico, as TZD proporcionam eficácia hipoglicemiante comparável à da metformina e das sulfoniluréias, reduzindo a glicemia de jejum em 30-60 mg/dL e a HbA<sub>1</sub>C em  $1-1,5\%^{14}$ . Além de seu efeito hipoglicemiante, as TZD apresentam outros efeitos sobre o perfil metabólico, tais como aumento do HDL

colesterol, aumento do LDL colesterol e efeito variável sobre os triglicérides, havendo relato de diminuição destes com o uso de Pioglitazona.

Há evidências provenientes de estudos clínicos de que o tratamento com TZD, além de atuar sobre a sensibilidade insulínica, tenha efeito também sobre a função da célula  $\beta$ , promovendo recuperação da função secretória. Um estudo em pacientes com IGT demonstrou que a administração de Troglitazona induziu um aumento na capacidade da célula  $\beta$  em responder à sobrecarga de glicose<sup>15</sup>. Outro estudo, com diabéticos tipo 2, mostrou que o tratamento com Troglitazona por 12 semanas resultou em diminuição da glicemia plasmática, aumento na sensibilidade à insulina e diminuição da relação pró-insulina/insulina, sugerindo uma alteração não apenas na sensibilidade, mas também na função da célula  $\beta$ , já que a relação pró-insulina/insulina é um marcador da eficiência da máquina secretória<sup>16,17</sup>.

Em um estudo caso-controle, em que foram observados pacientes com DM2 com média de 16 anos de diagnóstico tratados com Troglitazona após falha terapêutica da associação de sulfoniluréia e metformina, foi observada melhora no teste de estímulo de peptídeo C (pós-refeição), sugerindo recuperação da função da célula  $\beta$ , em comparação aos controles não tratados com TZD<sup>18</sup>. O mesmo grupo avaliou posteriormente, em um estudo clínico envolvendo pequeno número de pacientes com DM2 (n=17) mal controlados com uso de sulfoniluréia e metformina, o efeito da adição de insulina ou Rosiglitazona ao tratamento, por seis meses. Ao final do estudo, o grupo tratado com Rosiglitazona (n=8) apresentou aparente recuperação da função da célula  $\beta$ , evidenciada pela diminuição da relação pró-insulina/insulina e ainda pela melhora da secreção de insulina em relação à sensibilidade de insulina aferida (o chamado *disposition index*), sendo que esses efeitos foram independentes da glicotoxicidade<sup>19</sup>.

Em outro estudo clínico prospectivo, randomizado e duplo-cego, Buchanan e colaboradores avaliaram mulheres com história de diabetes gestacional, com alto risco para desenvolvimento de diabetes e tratadas com Troglitazona ou placebo. Após uma média de acompanhamento de 30 meses, as mulheres tratadas com TZD apresentaram menor incidência de diabetes e mantiveram preservada a função secretória do pâncreas, que piorou no grupo tratado com placebo<sup>20</sup>.

#### **1.2. PPARγ**

O PPARγ pertence a uma superfamília de receptores nucleares juntamente com o PPARα e o PPAR  $\beta/\delta^{21}$ . Como outros membros desta família, o PPARγ contém um domínio de transativação AF-2 dependente do ligante em sua região Cterminal, um domínio de ligação ao DNA altamente conservado composto por dois dedos de zinco e um domínio de ativação AF-1 independente do ligante na região NH2 terminal<sup>22</sup>. Até o momento, vários ligantes naturais e sintéticos do PPARγ já foram descritos. Estas moléculas, de natureza lipofílica, incluem ácidos graxos e derivados, tais como 15-desoxi-delta 12,14-prostaglandina J2 e compostos sintéticos tais como as TZD<sup>23</sup>. Em presença do ligante, o PPARγ modifica sua estrutura conformacional, o que estimula sua heterodimerização com o receptor de retinóide X (RXR) e facilita o recrutamento de co-fatores necessários para a ativação da transcrição, controlando a expressão de genes que contêm repetições da seqüência consenso AGGTCA espaçada por um nucleotídeo, denominada elementos de resposta ao PPAR. O PPAR $\gamma$  está expresso em vários tecidos de mamíferos adultos, em geral em níveis baixos, sendo sua expressão mais elevada no tecido adiposo, intestino grosso e células hematopoiéticas, e mais baixa em rim, fígado, musculatura lisa e esquelética, intestino delgado e pâncreas<sup>24</sup>.

Embora o músculo esquelético seja o principal tecido envolvido na utilização de glicose, está bem estabelecido que o tecido adiposo também é necessário para a homeostase adequada da glicose, já que camundongos e humanos lipoatróficos são extremamente resistentes à insulina<sup>25</sup>. Ainda não está completamente esclarecido qual é o tecido responsável pela atividade de redução da glicemia dos ligantes do PPARγ.

Os estímulos à adipogênese após ativação do PPARγ ocorrem secundariamente ao aumento da expressão de genes que promovem captação e estoque de ácidos graxos e à repressão de genes que induzem lipólise e liberação de gorduras. O tratamento com TZD favorece a redistribuição de tecido adiposo, diminuindo os depósitos viscerais em relação ao tecido subcutâneo<sup>26</sup>, além de promover uma mudança na população celular que resulta em mais adipócitos recémdiferenciados menores e menos adipócitos maduros e maiores<sup>27</sup>. Este remodelamento do tecido adiposo aumentaria a utilização de glicose mediada por insulina, pois os adipócitos menores são mais responsivos à ação insulínica<sup>28</sup>.

O RNA mensageiro e a proteína PPAR $\gamma$  são encontrados nas células pancreáticas, mas os efeitos da estimulação do PPAR $\gamma$  no pâncreas são ainda discutidos, ao contrário do tecido adiposo, em que as implicações da ativação do PPAR já foram mais profundamente descritas e exploradas<sup>29</sup>.

Embora a ativação do PPAR $\gamma$  não melhore agudamente a secreção de insulina<sup>30</sup>, há evidências de que a sua ativação possa restaurar ou proteger a função da célula  $\beta$  da falência e da apoptose durante o desenvolvimento do DM2, apesar de que dados contrários também têm sido relatados, sendo discutidos a seguir.

A elevação de AGL associados a hiperglicemia leva a alteração na homeostase energética das células, o que resulta no acúmulo intracelular de gordura nas células  $\beta$ , ilustrando o fenômeno conhecido como glico e lipotoxicidade, bem descrito na fisiopatologia do DM2 em humanos<sup>31</sup>. Ratos pré-diabéticos Zucker Diabetic Fatty (ZDF) desenvolvem obesidade por serem homozigotos para uma mutação no receptor da leptina e, durante sua evolução, apresentam disfunção da célula β associada ao acúmulo de triglicérides intracelular e hiperglicemia. Em trabalho com ratos ZDF, o tratamento dos roedores com Troglitazona inibiu o acúmulo de gordura nas ilhotas, prevenindo a perda de massa de células  $\beta$  observada nos controles não tratados. O tratamento com a droga preveniu também alterações mitocondriais e preservou a secreção de insulina glicose-dependente<sup>32</sup>. Outro estudo semelhante, em que ratos ZDF foram tratados com Rosiglitazona, demonstrou que o tratamento com a TZD preveniu a perda de massa de célula β, mantendo a proliferação das ilhotas<sup>33</sup>. Um trabalho *in vitro*, com ilhotas extraídas de ratos ZDF, mostrou que a adição de Troglitazona (10 µM) por 48h no meio de cultura, diminuiu o conteúdo de triglicérides das ilhotas, melhorando a secreção de insulina estimulada por glicose e arginina<sup>34</sup>.

A melhora da viabilidade celular após a administração de uma TZD também foi observada em camundongos tratados com estreptozotocina (STZ). O tratamento com Troglitazona preveniu a hiperglicemia induzida pela STZ nos controles e ainda evitou o processo de insulite induzida nos animais controles tratados com STZ, sugerindo assim, que a ativação do PPAR preveniu a morte celular nas ilhotas<sup>35</sup>. Além disso, um elemento de resposta funcional ao PPAR $\gamma$  foi encontrado na região promotora do gene do GLUT-2, a proteína responsável pelo transporte de glicose nas células  $\beta^{36}$ .

Esses achados corroboram a hipótese de que a restauração ou proteção da função das células  $\beta$  mediada pelo PPAR $\gamma$  contribua, ao menos parcialmente, para a melhora na homeostase glicêmica promovida pelas TZD em pacientes diabéticos<sup>37</sup>.

Por outro lado, estudo realizado em células HIT-T15, uma linhagem clonal de células  $\beta$  de Hamster, mostrou que a Troglitazona estimulou agudamente de modo significativo a secreção de insulina, de forma dose-dependente, até o tempo de 60 min. Mas a incubação prolongada (24h) com Troglitazona, na dose de  $10^{-4}$ M, diminuiu significativamente o conteúdo de insulina da célula  $\beta$  e inibiu a secreção de insulina. Durante tratamento continuado por até cinco dias, a Troglitazona inibiu a taxa de proliferação celular, reduziu de maneira dose-dependente o conteúdo de insulina na ilhota e aumentou a apoptose celular medida pela fragmentação de DNA<sup>38</sup>. Cnop e colaboradores testaram a hipótese de que as TZD diminuiriam a lipotoxicidade nas ilhotas em cultura. Assim, à cultura de células  $\beta$  isoladas de ratos *Wistar* foram adicionados palmitato e oleato, a fim de induzir a lipotoxicidade, e Troglitazona (10 µM), no grupo tratado. Ao final, contrariando relatos anteriores, o grupo tratado pela Troglitazona apresentou mais apoptose induzida por ácidos graxos (aumento de 10-20%, p<0,05)<sup>39</sup>.

Em outro estudo, foi feita cultura primária de ilhotas pancreáticas de ratos Wistar, em que Troglitazona (10  $\mu$ M) foi adicionada às culturas com concentração normal (5,6 mM) e aumentada (16,7 mM) de glicose no meio. No meio com níveis fisiológicos de glicose, a TZD diminuiu a secreção de insulina pelas ilhotas e
diminuiu o conteúdo de insulina das células. No meio com alta concentração de glicose, a presença de Troglitazona aumentou a secreção de glucagon (hormônio hiperglicemiante)<sup>40</sup>. Nakamichi e colaboradores, usando uma linhagem de célula  $\beta$  de insulinoma de camundongo (células MIN-6), estudaram o efeito do tratamento das células com Pioglitazona no meio (10  $\mu$ M, por 24h) isoladamente ou em associação com a indução da expressão de PPAR $\gamma$  por adenovírus. As células dessa linhagem não apresentaram expressão detectável de PPAR $\gamma$ , assim a Pioglitazona isoladamente não apresentou nenhum efeito nas células que não expressavam o PPAR $\gamma$ . Entretanto, a presença do receptor induzido pelo adenovírus diminuiu a secreção de insulina estimulada por glicose (SIEG), assim como a biossíntese de insulina. Esses efeitos foram potencializados pela adição de Pioglitazona, sugerindo que o PPAR $\gamma$ 

A associação entre a redução da esteatose (acúmulo de gordura) das ilhotas e a prevenção das alterações morfológicas é consistente, mas não prova uma relação de causa-efeito entre elas, principalmente diante de alguns resultados na direção contrária. As TZDs podem agir reduzindo os altos níveis de expressão de várias enzimas lipogênicas, levando a diminuição intracelular de triglicérides, mas não está claro como estas drogas promovem estoque de energia nos adipócitos e dissipação de energia nas ilhotas. Desta forma, os mecanismos moleculares envolvidos na eventual proteção das células  $\beta$  ainda precisam ser elucidados. Além disso, muitos dos dados publicados são de humanos ou roedores tratados com o medicamento, o que deixa a dúvida se os efeitos benéficos relatados na função da célula  $\beta$  seriam decorrentes da melhora do controle glicêmico ou também da resistência insulínica, ou mesmo relacionados a um efeito direto de TZDs nas ilhotas, através de ativação do PPARy.

## 2. Objetivo

Considerando-se as evidências de que as TZD poderiam ter um efeito direto sobre a preservação das células  $\beta$  e que os mecanismos envolvidos neste efeito ainda estão pouco elucidados, o objetivo deste projeto foi a prospecção de genes diferencialmente expressos em ilhotas pancreáticas murídeas tratadas e não tratadas com Pioglitazona, cultivadas em concentrações fisiológica e supra-fisiológica de glicose no meio de cultura.

#### 3. Materiais e Métodos

## 3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 2 meses de idade pesando aproximadamente 300 g. Os animais foram fornecidos pelo centro de bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), de acordo com protocolo de pesquisa aprovado por este centro e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da USP. Os animais foram tratados de acordo com os padrões e normas do Centro de bioterismo, recebendo água e ração padrão à vontade.

## 3.2. Padronização da técnica de isolamento de ilhotas murídeas

A técnica de isolamento de ilhotas pancreáticas é laboriosa e sujeita a grande variabilidade. Apesar das várias descrições disponíveis na literatura, a maioria dos procedimentos relatados é caracterizada por baixa reprodutibilidade <sup>42,43</sup>. Há poucas descrições detalhadas de todos os passos do isolamento, técnica nunca antes realizada em nosso laboratório, portanto padronizada para a realização do presente trabalho.

Para a realização dos experimentos, todos os materiais foram autoclavados ou também filtrados, seguindo protocolo de antissepsia de acordo com padrões estabelecidos <sup>44</sup>. O procedimento cirúrgico foi feito em sala específica para cirurgia em animais, seguindo-se os protocolos de antissepsia. Os ratos foram sedados com uso de éter etílico, por inalação e, posteriormente, anestesiados com solução de

quetamina (Ketalar<sup>®</sup>- Pfizer<sup>®</sup>, 50 mg/mL) + xilazina (Rompun<sup>®</sup> - Bayer<sup>®</sup>, 20 mg/mL), sendo que a solução era misturada, na proporção de 8:2, respectivamente, e aplicada via intra-peritoneal no volume de 0,2 mL/100 g de peso do animal, considerando-se as doses preconizadas de quetamina de 50 a 75 mg/Kg e de xilazina de 5 a 10 mg/Kg<sup>45</sup>. A seguir, a anti-sepsia do abdômen foi feita com solução de Polivinilpirrolidona Iodo (PVPI 10%).

A cavidade abdominal foi aberta com tesoura. Após localização e exposição, o ducto biliar foi pinçado em sua extremidade distal com o auxílio de uma pinça hemostática, a fim de se evitar a dispersão da enzima para o intestino, garantindo a plena insuflação do pâncreas (Figura 2). A canulação do ducto biliar foi feita pela introdução de um escalpe (25G) por meio de pequeno corte feito com micro-tesoura no terço proximal do ducto, fazendo-se amarração com fio algodão 4-0 em torno do catéter introduzido, evitando extravasamento retrógrado da solução de enzima injetada.

Para insuflação do pâncreas e digestão dos ácinos foi utilizada a colagenase tipo V (Sigma-Aldrich, EUA), específica para a digestão de tecido pancreático, diluída em solução de Hank's, ou *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS). O pâncreas retirado foi então incubado a 37°C para digestão do tecido exócrino, bem mais abundante.

O processo de isolamento das ilhotas pelo método do Ficoll é conveniente pela manipulação mínima das ilhotas, o que é importante para diminuir o risco de contaminação da cultura primária, além de possibilitar um rendimento satisfatório para os experimentos. Inicialmente, tentou-se reproduzir dois protocolos descritos na literatura, um deles utilizando gradiente descontínuo de Ficoll (densidades 25%, 23% e 11%)<sup>46</sup> e o segundo utilizando Histopaque<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, EUA) na densidade de

1.077<sup>47</sup>. Os dois protocolos resultaram em preparações muito impuras e, portanto, modificamos uma vez mais a metodologia, adaptando aspectos da técnica já descrita anteriormente<sup>48</sup> que é detalhada abaixo.



**Figura 2. Canulação do ducto e infusão de colagenase** A: Localização do ducto biliar e pinçamento da ramificação que vai para o intestino delgado; B: Introdução da colagenase tipo V diluída em HBSS pelo ducto biliar, insuflando o pâncreas

## 3.2.1. Canulação e digestão do pâncreas

A solução de Colagenase tipo V (Sigma-Aldrich, EUA) foi preparada em solução de HBSS a 0,7 mg/mL. Após a injeção intraductal de 10 mL (Figura 2), o pâncreas foi separado do intestino com auxílio de uma tesoura e transferido para uma placa de Petri, sendo lavado em solução de HBSS suplementada com antibióticos (100.000 U/mL de penicilina + 100.000 µg/ml de estreptomicina). O baço foi retirado juntamente com o excesso de tecido gorduroso e o pâncreas foi cortado em pedaços grandes e colocado em um tubo 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 min, a amostra era lentamente homogeneizada e alíquotas retiradas e colocadas em placas de 24 poços onde foram coradas com Ditizona (DTZ) (Sigma-Aldrich, EUA),

para visualização das ilhotas. A DTZ é um corante seletivo para as células β pancreáticas, permitindo assim a visualização das ilhotas, que adquirem cor avermelhada <sup>49</sup>. A solução de DTZ foi preparada com diluição de 10 mg de DTZ em 4 mL de solução de Hanks e 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), (Sigma-Aldrich, EUA). Com este procedimento, pode-se monitorizar o andamento do processo de digestão e o momento adequado para a sua interrupção (Figura 3), ou seja, quando se visualizam ilhotas livres de tecido acinar, cuidando-se para que não aconteça digestão excessiva do material (Figura 3D).



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

3.2.2. Interrupção da digestão e preparo da amostra para a purificação das ilhotas

Ao final da etapa de digestão, a solução com as ilhotas foi transferida para um tubo de 50 mL contendo 30 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) acrescido de soro fetal bovino (SFB), (Cultilab, Brasil) a 10% à temperatura de 4°C, com o objetivo de interromper a ação da enzima, finalizando a digestão. A amostra foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta descartável de 10 mL e o volume completado com RPMI/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, ressuspendido em 30 mL de RPMI/SFB a 4°C e homogeneizado. A amostra foi então retirada do tubo por meio de uma seringa de 10 mL acoplada a um gelco calibre 18G e filtrada em malha de aço inoxidável de 600 µm, com o objetivo de reter o tecido exócrino, separando-o das ilhotas. A solução foi transferida para um novo tubo de 50 mL, lavou-se o tubo com mais 15 mL de meio RPMI/SFB a 4°C para evitar perda de tecido, filtrando-se, novamente, na mesma malha. A amostra foi novamente centrifugada a 1.000 rpm por 5 min a 4°C.

## 3.2.3. Gradiente de HBSS-Ficoll para purificação das ilhotas

As soluções de Ficoll DL tipo 400 (Sigma-Aldrich, EUA) foram deixadas à temperatura ambiente, para o procedimento com as ilhotas. Após a retirada do sobrenadante, o precipitado de tecido foi ressuspendido em 8 mL de Solução de HBSS-Ficoll  $\mu$  =1.110, constituída de 0,340 g/mL de Ficoll e 0,00894 g/mL de

tampão HEPES 1M (Invitrogen, Life Technologies, EUA). A seguir, acrescentou-se cuidadosamente 5 mL de uma solução de HBSS-Ficoll  $\mu =1.096$  (0,297 g/mL de Ficoll e 8,94 mg/ml de HEPES). Sobre esta segunda camada, coloca-se 5 mL de uma solução de HBSS-Ficoll  $\mu =1.069$  (0,212 g/mL de Ficoll e 8,94 mg/ml de HEPES) e, finalmente, 5 mL de uma solução de HBSS-Ficoll  $\mu =1.037$  (0,111 g/mL de Ficoll e 8,94 mg/ml de HEPES), obtendo-se então o seguinte gradiente de densidades: 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) procedeu-se à retirada, com uso de pipeta automática de 1000  $\mu$ L das células localizadas na interface entre as densidades  $\mu =1069/1096$  do HBSS-Ficoll, onde as ilhotas se concentram (Figura 4).



**Figura 4. Gradiente de HBSS-Ficoll** Observa-se as diferentes densidades e a interface (1069/1096) onde as ilhotas se concentram após a centrifugação

As ilhotas foram colocadas em tubo de 50 mL e adicionou-se RPMI/SFB e 5,6 mM de glicose q.s.p. 50 mL. Após centrifugação a 1.000 rpm por 5 min a 4 °C (freios desligados) - este procedimento foi repetido por três vezes para retirar todo o HBSS-Ficoll presente nas ilhotas - o sobrenadante foi retirado e o precipitado, ressuspendido em 5 mL de meio RPMI 1640 com 2% SFB e 5,6 mM de glicose, para cultivo. 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). O rendimento final oscilou entre 1.000 a 1.500 ilhotas por pâncreas. As ilhotas foram distribuídas em frascos de cultura de maneira que não se ultrapassasse a densidade de 4 ilhotas/cm<sup>2</sup>, descrita como a mais adequada<sup>43</sup>, e levadas à estufa a 37°C. Em até 24 horas, a maioria das ilhotas viáveis adere ao frasco de cultura.



Figura 5. Ilhota purificada e corada com DTZ após centrifugação em gradiente de HBSS-ficoll

3.3 Avaliação das ilhotas obtidas: expressão de genes-chave e viabilidade das células medida pela secreção de insulina.

3.3.1 Extração de RNA total, síntese de DNA complementar e reação em cadeia da polimerase (PCR) para os genes Pdx-1, insulina-1, insulina-2, glucagon e somatostatina

Para confirmar a natureza endócrina do tecido obtido após a purificação por gradiente de Ficoll, foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) para amplificar os genes que codificam as proteínas *pancreatic and duodenal homeobox gene 1* (PDX-1), insulina-1, insulina-2, glucagon e somatostatina.

O RNA total de ilhotas mantidas por 24 horas em cultura foi extraído segundo protocolo do reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies, EUA). Utilizando-se um mL de Trizol para um precipitado de 1.000 ilhotas, de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante. O precipitado de RNA obtido foi ressuspendido em 30  $\mu$ L de água tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC) e 0,1 mM de EDTA.

A qualidade da preparação de RNA foi avaliada pela análise da integridade do RNA após eletroforese com gel de agarose, sendo que as bandas relativas ao RNA ribossômico 18S e 28S foram bem visíveis e apresentaram-se íntegras (Figura 6).



Figura 6. Avaliação da qualidade do RNA total extraído de ilhotas purificadas por Gradiente de Ficoll, verificando-se a integridade das bandas relativas ao RNA ribossomal

Também foi realizada a quantificação e avaliação da pureza do RNA através da medição da absorvância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, constatando-se uma relação ABS260/ABS280  $\geq$  1,8, portanto adequada.

Para a síntese de cDNA foram utilizados 5 µg do RNA total, 2,0 µl de hexâmero 1µg/µL, sendo incubado ao termociclador para aquecer a 70 °C por 10 min e depois a amostra foi colocada no gelo por 1 min. No mesmo tubo foi adicionado 4,0 µL de tampão da enzima (5x), 2,0 µL de ditiotreitol (DTT) a 0,1 M e 1,0 µL da mistura dos desorribonuleotídeos trifosfatados dATP, dCTP, dGTP e dTTP 10 mM cada (dNTP *mix*). A reação foi novamente incubada no termociclador por 10 min, a 25 °C e 2 min a 42 °C e a seguir foi adicionado 1 µL (200 U) da transcriptase reversa - *Superscript TM II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Life Science, EUA) voltando-se mais uma vez ao termociclador por 50 min a 42 °C e 15 min a 70 °C para inativar a reação.

A PCR para os genes Pdx-1, insulina–1, insulina–2, glucagon e somatostatina foi realizada em um volume final de 25 µL, utilizando-se aproximadamente 2,0 µg de cDNA como *template*. As reações de PCR continham: 1X PCR *buffer* (Invitrogen, Life Technologies, EUA), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Life Technologies, EUA), 0,2 µM dNTP *mix* (Invitrogen, Life Technologies, EUA), 0,2 µL de uma solução de 10 µM de cada um dos amplímeros iniciadores da reação (*amplímeros*) (Tabela 1) e 1 U da enzima Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, EUA).

As amostras foram incubadas durante 5 min a 94° C em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf AG, Alemanha). A seguir, foram submetidas a 40 ciclos (30 s a 94° C, 30 s a 57 °C, e 45 s a 72° C) e após o último ciclo foi realizada a etapa de extensão final pela incubação por 4 min a 72° C. Os géis de agarose demonstrando os produtos da reação de PCR para os genes Pdx-1, insulina-1, insulina-2, glucagon e somatostatina são demonstrados na Figura 7.

| Gene ID | Gene          | Símbolo | Primer forward        | Primer reverse       | Tamanho do fragmento |
|---------|---------------|---------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| 24505   | Insulina - 1  | Ins1    | GTACCTGGTGTGTGGGGGAAC | CTGCCCCTCTACCAACTGG  | 199                  |
| 24506   | Insulina - 2  | Ins2    | TGTGGTTCTCACTTGGTGGA  | ACCTTCAGACCTTGCACTG  | 155                  |
| 29535   | PDX - 1       | Pdx1    | CATGTTTTCTGCGTGCTCTG  | TCTATCAGCAATGTGCCACC | 168                  |
| 24952   | glucagon      | Gcg     | GTGCCTTGGGAACACTCAAC  | TCATCCGGAACCTGG      | 200                  |
| 24797   | somatostatina | Sst     | TCAAGCTCGGCTGTCTGAG   | AGGTCTGCCAACTCGAACC  | 307                  |

Tabela 1. Seqüência dos amplímeros utilizados nas reações de RT-PCR.

CAACCTTCTTGCAGCTCCTC

81822

β-Actina

Actb



TCCATATCGTCCCAGTTGGT

Figura 7. Géis representativos da PCR para os genes *Pdx-1*, Insulina 1, Insulina 2, Glucagon e Somatostatina

## 3.3.2. Avaliação da viabilidade das ilhotas pela secreção de insulina

Para avaliar a viabilidade funcional das ilhotas isoladas foi dosada a insulina secretada pela técnica de ELISA, utilizando-se o *Kit rat/mouse insulin ELISA kit – 96 well plate* (Linco Research, EUA). Dez ilhotas foram semeadas em placas de 24 poços aglomerados e cultivadas em meio RPMI/SFB e 5,6 mM de glicose, durante 48 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 albumina sérica bovina (BSA) *RIA grade* fator V (Sigma-Aldrich, EUA).

300

Para a avaliação da cinética de secreção de insulina, retirou-se o meio de cultura, lavou-se as ilhotas com 1 mL de HBSS, colocando-se o tampão de Krebs suplementado com 1,67 mM de glicose. Após incubação de 1 hora na estufa a  $37^{\circ}$ C, o tampão foi retirado e armazenado a  $-20^{\circ}$  C. As ilhotas foram novamente lavadas com HBSS e adicionou-se o tampão de Krebs suplementado com 16,7 mM de glicose. Após nova incubação de 1 hora na estufa a  $37^{\circ}$ C, o tampão foi removido e armazenado a  $-20^{\circ}$  C até o momento da dosagem.

O ensaio de ELISA foi padronizado da seguinte maneira: diluiu-se 50 mL do tampão de lavagem (10X) em 450 mL de H<sub>2</sub>O mQ, de forma a torná-lo 1X concentrado. Após lavar-se três vezes cada poço, que vem revestido de anticorpo monoclonal anti-insulina de rato, com 300  $\mu$ L do tampão de lavagem, retirou-se o tampão invertendo a placa e batendo sobre papel absorvente várias vezes. Colocou-se 80  $\mu$ L da solução de detecção do anticorpo (anti-anticorpo anti-insulina biotinilado) em cada poço. Como as amostras são livres de componentes de matriz, adicionou-se 10  $\mu$ L de tampão de ensaio (fosfosalina 0,05M, pH 7,4 com EDTA 0,025M e 0,08% de azida sódica com 1% de BSA) em todos os poços e, a seguir, adicionou-se 10  $\mu$ L dos dois calibradores do *kit*, das seis soluções-padrão em ordem crescente de concentração (0,2; 0,5; 1; 2,5 e 10 ng/mL), 1  $\mu$ L de solução "branca" e as amostras desconhecidas (meios de cultura condicionados por 10 ilhotas).

As amostras testadas foram diluídas 1:10 para que "entrassem na curva" com o tampão de ensaio. Após uma hora, as placas foram cobertas e incubadas por duas horas em temperatura ambiente em um agitador com velocidade controlada entre 400 a 500 rpm. O adesivo foi então removido e a placa virada sobre um papel absorvente para remoção da solução residual do poço. Após três lavagens com 300 µL de tampão de lavagem, removeu-se o tampão residual, adicionou-se 100  $\mu$ L de solução enzimática (estreptavidina) em cada poço e finalmente, cobriu-se com o adesivo. Após nova incubação em agitador por 30 min em temperatura ambiente, retirou-se a cobertura e a solução enzimática. A placa foi lavada seis vezes com 300  $\mu$ L de tampão. Retirou-se novamente o tampão, adicionou-se 100  $\mu$ L de substrato (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina tamponada) em cada poço e a placa foi fechada novamente com o adesivo, e agitada por 15 min. Uma cor azul de intensidade proporcional à concentração de insulina aparece nos poços. Removeu-se o adesivo e se adicionou 100  $\mu$ L de solução 0,3M de HCl, a fim de se interromper a reação. Homogeneizou-se a solução e, após a adição do ácido, a cor azul tornou-se amarela, como esperado.

A leitura das amostras foi realizada em comprimento de onda de 450 nm e 620 nm (branco), no luminômetro Anthos Lucy 3 (Anthos Labtec Instruments, Austrália) durante cinco min. A concentração foi calculada pela redução dos dados obtidos na leitura em absorbância (DO) da curva padrão (Figura 8) pela transformação:

Logito (Y) = (DO-S0)/(1+(DO-S0))

Onde S0 é o padrão zero.

Obteve-se a concentração de insulina em ng/mL pela interpolação na curva Ln[INS] x Logito dos valores de DO das amostras de acordo com a equação da reta obtida pela regressão linear dos mínimos quadrados:

Logito (Y)= $a+b \times \ln[INS]$ 

Onde <u>a</u> é o valor da intercepção no eixo Y e <u>b</u> é o ângulo de inclinação da reta ("*slope*").



Figura 8. Transformação das densidades óticas das seis soluções-padrão em concentração de insulina pela aplicação da função Ln *versus* Logito

Para a avaliação da viabilidade funcional, as ilhotas foram cultivadas em meio RPMI/SFB e 5,6 mM de glicose. Os ensaios para avaliação da cinética de secreção de insulina foram realizados em duplicata após 48 horas e sete dias do isolamento, nas mesmas ilhotas, conforme descrito.

## 3.4. Preparo da solução de Pioglitazona

O sal em pó liofilizado de Pioglitazona foi gentilmente cedido pelo fabricante, Takeda *Pharmaceuticals*, Osaka, Japão.

Para o preparo de soluções de trabalho que permitissem a obtenção de concentrações finais no meio de cultura de 10 µM de Pioglitazona (peso molecular de 392,90 Dáltons), a droga foi diluída em DMSO, de forma que a concentração final

do DMSO não ultrapassasse 0,1% após adição da Pioglitazona ao meio de cultura. As ilhotas não tratadas com a droga receberam a mesma quantidade de DMSO adicionado ao meio de cultura e foram submetidas aos mesmos procedimentos de lavagem e trocas de meio de cultura. A concentração de Pioglitazona utilizada no estudo foi baseada em publicações anteriores, estudos de titulação com TZDs e orientação do fabricante. Num estudo de ativação de diferentes tipos de PPAR humanos pela Pioglitazona e Rosiglitazona, Sakamoto e cols. mostraram que na concentração de 10  $\mu$ M a Pioglitazona atinge efeito máximo de ação no PPAR $\gamma$ , com intensidade semelhante à Rosiglitazona a 1  $\mu$ M. Nessa concentração de 10  $\mu$ M, a Pioglitazona também ativa o PPAR $\alpha^{50,51}$ .

### **3.5. Delineamento experimental**

Considerando a complexidade dos estudos de microarranjos de DNA, em que um número muito grande de genes é avaliado, é desejável um desenho experimental relativamente simples, a fim de possibilitar uma solução estatística viável produzindo conclusões claras a partir dos dados obtidos. Aspectos como o número de replicatas biológicas, a objetividade do desenho experimental e os cuidados com fatores externos são fundamentais para conferir poder estatístico aos achados. <sup>52,53</sup> Esses aspectos foram considerados para o delineamento do estudo de maneira a restringir as variáveis, ficando definido o número adequado de cinco replicatas biológicas para cada condição (Figura 9).

Após o isolamento, as ilhotas foram mantidas em cultura por 18h em meio RPMI 1640, suplementado com 2% de SFB e 5,6 mM de glicose. Passado este período as ilhotas foram submetidas ao tratamento com Pioglitazona, 10  $\mu$ M, nas duas concentrações de glicose (5,6 mM e 23 mM) e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final da incubação, as ilhotas foram transferidas para um tubo de 50 mL, centrifugadas a 10.000 rpm, por 5 min, o sobrenadante foi descartado e foi extraído o RNA das ilhotas. As ilhotas foram então vigorosamente homogeneizadas com Trizol e armazenadas a -80°C para posterior extração de RNA total.



Figura 9. Delineamento experimental

#### 3.6. Extração de RNA total e controle de qualidade do RNA extraído

Para a extração de RNA total das ilhotas a ser utilizado na hibridização com as lâminas de microarranjos de DNA, foi utilizado um protocolo baseado na lise das células com Trizol e subseqüente isolamento do RNA total pelo método de cromatografia (RNeasy Mini Kit, Qiagen, EUA), um dos métodos propostos e padronizados para extração de RNA para procedimentos de hibridização<sup>54</sup>. O procedimento foi feito rigorosamente de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante e o RNA obtido foi eluído em água livre de ribonuclease (RNAse) e armazenado a -80°C.

A análise da integridade foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 1% contendo formaldeído (denaturante), sendo aplicados 500 ng da amostra no gel para avaliação das bandas correspondentes às frações 28S e 18S do RNA ribossomal. A quantificação e análise da pureza do material foi feita inicialmente por espectrofotometria ultravioleta, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, utilizando-se o equipamento NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EUA). Foram consideradas ótimas amostras com uma relação Abs260/Abs280 entre 1,8 e 2,2.

## 3.7. Re-análise da integridade das amostras de RNA obtidas

O Centro de Genômica Funcional da Universidade da Pensilvânia (UPenn), na Filadélfia, Estados Unidos (*Functional Genomics Core, University of Pennsylvania, School of Medicine – FGC-UPenn*)<sup>55</sup> é reconhecido por sua excelência em estudos de expressão gênica com uso da tecnologia de lâminas de microarranjos de DNA, sendo responsável pela fabricação e produção do *Mouse Panchip 6.0*, uma lâmina composta de cDNA de pâncreas de camundongo, que apresenta boa reprodutibilidade e confiabilidade, já o sido utilizada em diversas publicações<sup>56</sup>. Os experimentos de amplificação de RNA, hibridização, análise dos microarranjos de DNA e confirmação por RT-PCR em tempo real (RTq-PCR) foram realizados neste laboratório da UPenn.

Seguindo o protocolo de preparação das amostras para hibridização e microarranjos de DNA do FGC-UPenn (FGC-*standard operating procedure*)<sup>57</sup>,

todas as amostras de RNA foram re-analisadas quanto à sua integridade, através do equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA). Trata-se de uma plataforma de microfluidos, em que um *chip* com microeletrodos é carregado com as amostras e submetido à análise no aparelho, conectado a um computador com o respectivo *software*. Obtivemos alíquotas de 1,2  $\mu$ L de cada amostra em tubos de 1,5 mL, essas alíquotas foram incubadas a 70°C por dois min, depois foi feita centrifugação rápida (*spin*) e as amostras foram colocadas no gelo. O *chip* de RNA foi colocado na plataforma de impressão (Figura 10) e foram aplicados as amostras e os respectivos reagentes de acordo com o protocolo do fabricante. A análise da integridade da amostra é feita de acordo com o padrão eletroforético (Figura 11) e ainda pela imagem gel-símile produzida de cada amostra.



Figura 10. Ilustração do *chip* para análise de integridade do RNA no equipamento *Bioanalyzer* Indicação do poço adequado para 1<sup>a</sup> aplicação do *gel-mix* corante (A), aplicações seguintes do *gel-mix* corante (B), aplicação do marcador (C) e do padrão (D), conforme protocolo estabelecido.



A. Gráfico representando amostra de RNA íntegro



B. Gráfico representando amostra de RNA parcialmente degradado



C. Gráfico representando amostra de RNA totalmente degradado

Figura 11. Padrão eletroforético de análise das amostras de RNA

#### 3.8. Amplificação das amostras de RNA obtidas

Para o processo de marcação e hibridização nas lâminas de microarranjos de DNA são necessários 20 µg de RNA por amostra, ou 2 µg de cDNA. Como não houve disponibilidade desta quantidade de amostra, o que era já esperado pelo rendimento de RNA tipicamente obtido a partir de ilhotas em cultura, foi feita a amplificação do material, gerando cDNA.

A seleção das amostras a serem amplificadas para hibridização se deu de acordo com os resultados do equipamento *Bioanalyser* e ainda pela disponibilidade de RNA (rendimento), considerando-se a necessidade para eventual repetição do procedimento e ainda para produção de cDNA para os experimentos de RT-qPCR. Para amplificação do material utilizamos o *kit* Ovation<sup>™</sup> Aminoallyl<sup>™</sup> RNA *Amplification and labeling System* (NuGEN *Technologies*, EUA) <sup>58</sup>. A partir de uma amostra de 50 ng de RNA total, obtêm-se microgramas de cDNA.

As amostras foram aliquotadas na quantidade de 500 ng em tubos de 1,5 mL e completado o volume para 50  $\mu$ L de solução total, com H<sub>2</sub>0 livre de RNAse. Desta alíquota diluída, retiramos 5 $\mu$ L (50 ng) que foi pipetado em tubos de 0,2 mL. O processo constitui-se de 3 etapas:

- 1) Síntese da 1ª fita de cDNA usando-se um *amplímero* DNA/RNA;
- 2) Síntese da 2<sup>a</sup> fita de cDNA;
- 3) Amplificação e purificação do cDNA por processo isotérmico SPIA<sup>TM</sup>.

Preparou-se o *Tampão Mix* para a síntese da primeira fita, assim como a respectiva enzima para a reação e o *Primer Mix* para esta fase. Após adicionar 2  $\mu$ L do *Primer* às amostras de RNA aliquotadas nos tubos de 0,2 mL, agitou-se o tubo e procedeu-se a um *spin* na centrífuga por 2 s, os tubos foram então colocados no termociclador pré-aquecido a 65°C por 5 min, para *annealing* do amplímero e depois foram retornados imediatamente para o gelo. Preparou-se o *Master Mix* da 1<sup>a</sup> etapa adicionando-se 12  $\mu$ L do tampão e 1  $\mu$ L da enzima, para cada amostra. Os tubos que haviam sido processados no termociclador receberam um *spin* e depois se adicionou a cada tubo 13  $\mu$ L do *Mix* preparado. Após discreta agitação, os tubos foram levados

ao termociclador pré-aquecido, tendo sido incubados a 48°C por 60 min, aquecidos a 70°C por 15 min e retornados ao gelo, imediatamente. Os tubos foram então agitados discretamente e passou-se à próxima etapa de síntese da 2ª fita. Adicionou-se 18 µL do tampão de 2ª fita, para cada amostra; juntamente com 2 µL da respectiva enzima, para formar o Máster Mix de síntese de 2ª fita. Após misturar o Mix por pipetagem, adicionou-se em cada amostra 20 µL deste Mix. Os tubos foram, então, colocados em um termociclador pré-aquecido para incubação a 37°C, por 30 min e depois 75°C, por 15 min, esfriando-se imediatamente e retornando as amostras para o gelo. Os tubos foram discretamente agitados e, em seguida, foi realizada a amplificação. Os reagentes Primer Mix SPIATM, Tampão e a enzima foram descongelados e homogeneizados para o preparo do *Máster Mix*, com a adição de 8 µL de *Primer*, 72 µL do tampão e 40 µL da enzima, para cada amostra. Depois da homogeneização, adicionou-se 120 µL do Mix a cada reação. Os tubos foram então homogeneizados, rapidamente centrifugados e a seguir o volume total da reação (160  $\mu$ L) foi dividido em 2 tubos, permanecendo 80 µL neste tubo original e sendo transferidos 80 µL para um novo tubo de 0,2 mL. Os tubos foram então colocados no termociclador préaquecido a 50°C, por 90 min, depois ficaram a 95°C por 5 min e foram, a seguir, esfriados imediatamente no gelo.

Procedeu-se à purificação do cDNA, com o uso do *kit QIAquick*<sup>®</sup> *PCR Purification Kit* (Qiagen<sup>®</sup>, EUA). Em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 800  $\mu$ L do tampão PB do sistema Qiagen<sup>®</sup>. Todos os 160  $\mu$ L da reação de amplificação foram pipetados neste tubo com o tampão. Adicionou-se 10  $\mu$ L de acetato de sódio 3M, pH 5,5 (Ambion<sup>®</sup>, EUA) a fim de se otimizar a ligação do cDNA à membrana da coluna. Pipetou-se 480  $\mu$ L da solução obtida e as colunas foram colocadas na centrífuga, por um min a 13.000 rpm. Descartou-se o fluido que passou para o tubo coletor. Adicionou-se o restante da amostra à coluna. Repetiu-se a centrifugação. A coluna foi recolocada nos tubos e foi feita a lavagem com 700  $\mu$ L do tampão PE, ressuspendido em etanol a 80%. Novamente, realizou-se centrifugação por um min a 13.000 rpm. Descartou-se o fluido que passa ao tubo coletor. Repetiu-se a lavagem mais uma vez, com o mesmo volume de 700  $\mu$ L e, após nova centrifugação por um min a 13.000 rpm, descartou-se o fluido que passou para o tubo coletor. Reposicionou-se a coluna no mesmo tubo e repetiu-se mais uma vez a centrifugação, a fim de secar a coluna. A seguir, a coluna foi colocada em um novo tubo de 1,5 mL e a eluição do cDNA foi feito com 30  $\mu$ L de água (livre de nuclease), à temperatura ambiente. Após deixar a coluna repousar por 5 min, procedeu-se à centrifugação (13.000 rpm, um min). O cDNA assim obtido foi então mensurado através do equipamento Nanodrop, considerando-se ideal a relação 260/280 acima de 1,80.

# 3.9. Hibridização das amostras na plataforma de microarranjo de DNA

## 3.9.1 Mouse Panchip 6.0

A plataforma de microarranjo *Mouse Panchip 6.0* foi lançada em abril de 2005 e contém 13.059 cDNAs de camundongo escolhidos pela sua expressão nos vários estágios do desenvolvimento pancreático, muitos dos quais não foram encontrados em plataformas comerciais. Trata-se de uma versão melhorada do *PanChip 5*, com a adição de mais de 1.000 cDNAs relevantes para o desenvolvimento pancreático e para vias envolvidas na função endócrina do pâncreas. As sondas são ampliadas de transcritos verificados pela seqüência completa e reconhecidos por estarem envolvidos no desenvolvimento pancreático e metor vias relacionadas ao controle glicêmico. Pela homologia entre genes de

camundongos e ratos, esta plataforma tem sido usada também para estudos em tecidos de ratos<sup>59</sup>. O FGC imprime além do *Mouse Panchip* 6.0, o *Human Panchip* e o *Mouse Promoter Chip* 5A e 5B, como o uso de uma impressora robotizada desenhada exclusivamente para impressão de microarranjos (Figura 12).



Figura 12. *Mouse Panchip 6.0* (acima) e a impressora *NanoPrint*<sup>™</sup> *Arrayer and Stealth*<sup>™</sup> *Microarray Pins*, utilizada para a impressão da plataforma

## 3.9.2 Marcação e hibridização das amostras nas lâminas

Para o processo de hibridização<sup>60</sup> dos cDNAs obtidos de ilhotas tratadas com as lâminas de microarranjos, o experimento foi desenhado da seguinte maneira: dois experimentos de hibridização, sendo um com as ilhotas cultivadas a 5,6 mM de glicose, tratadas com Pioglitazona ou DMSO e outro com as amostras cultivadas em 23 mM de glicose no meio. As amostras tratadas com a TZD foram marcadas com o corante vermelho Cy5 e foram hibridizadas com as respectivas amostras controle, tratadas com DMSO e marcadas com o corante verde, Cy3, nas mesmas concentrações de glicose no meio. Foi utilizado o corante *Enzo's Cyanine 5-NHS Ester Pack* e *Enzo's Cyanine 3-NHS Ester Pack* (Enzo Life Sciences, EUA). (Figura 13)



Figura 13. Delineamento do experimento com duas hibridizações de acordo com a concentração de glicose no meio de cultura

Após descongelamento das amostras, o volume correspondente à quantidade de 4  $\mu$ g de cada amostra de cDNA foi pipetado no respectivo tubo e completado o volume para 15  $\mu$ L com tampão de bicarbonato de sódio 0,1M, pH 9,0, que estava à temperatura ambiente. Prepararam-se então os corantes fluorescentes Cy3 e Cy5. Os corantes foram ressuspendidos nos tubos originais com 3  $\mu$ L de DMSO, misturados com a própria pipeta. Adicionou-se o volume total da solução do corante à respectiva amostra. Esta reação foi incubada por uma hora, protegida da luz. Após este tempo, as reações marcadas com corante verde Cy3, foram adicionadas às respectivas amostras controle marcadas com Cy5. Prosseguiu-se então à purificação e eluição do produto combinado, utilizando-se o kit MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen, EUA). Adicionou-se a cada reação 10 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,5 e, a seguir acrescentou-se 300 µL do tampão ERC às amostras marcadas e as colunas MinElute foram colocadas, devidamente identificadas, nos tubos coletores de 2 mL. Toda a amostra foi pipetada na coluna e centrifugou-se por 1 min a 13.000 rpm. Descartouse o eluído e recolocou-se a coluna no mesmo tubo. Seguiu-se então com a lavagem da coluna adicionando-se 750 µL do tampão RPE, nova centrifugação e, depois de descartado o líquido que passou ao tubo coletor, repetiu-se a lavagem, com nova centrifugação. Depois de descartado o liquido, repetiu-se a centrifugação para secar a coluna. As colunas foram colocadas em novo tubo de 1,5 mL e adicionou-se, diretamente na membrana, 18,5 µL de H<sub>2</sub>O para eluição e após dois min procedeu-se à centrifugação por um min a 13.000 rpm.

O tampão de pré-hibridização (5x SSC, 0,1% SDS e 1% BSA) já estava em aquecimento a 42°C, assim como o tampão de hibridização 2X (50% formamida, 10x SSC, 0,2% SDS). As 10 lâminas foram então colocadas dentro da jarra de *Coplin*, com o tampão de pré-hibridização (50 mL, 42°C). A pré-hibridização durou entre 40 e 45 min. Após pré-hibridização as lâminas foram enxaguadas em água deionizada (ddH<sub>2</sub>O), por mergulhamento. A seguir foram imersas em outra jarra, contendo isopropanol e foram imediatamente centrifugadas a 600 rpm, por 5 min (este passo foi feito com agilidade, a fim de se evitar que as lâminas secassem de maneira irregular).

Às amostras marcadas, foi adicionado de 2,5  $\mu$ L *de Mouse Cot-1* DNA<sup>®</sup> (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) (Invitrogen, EUA) e 2,5  $\mu$ L de oligo-dT (1  $\mu$ g/ $\mu$ L). As amostras foram então desnaturadas a 95°C, por 5 min. As lâminas secas após centrifugação foram dispostas nas câmeras de hibridização (*Corning Hybridization chamber*, Corning, EUA), cujos orifícios nos cantos de cada câmara foram preenchidos com 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O a fim de garantir umidade na hibridização, evitando-se que o material secasse durante o processo. Após a desnaturação das amostras por 5 min, elas foram rapidamente centrifugadas e, logo em seguida foram adicionados 22,5  $\mu$ L do tampão de hibridização para um volume final de 45  $\mu$ L. As amostras foram então aplicadas nas lâminas e, após cobertura com lamínula, as lâminas foram incubadas nas câmaras de hibridização a 42°C, por 18h. O tampão de lavagem 2 (0,2x SSC; 0,1% SDS) foi deixado a 42°C, para ser usado na lavagem das lâminas no dia seguinte.

Após incubação, as lamínulas foram retiradas mergulhando-se suavemente as lâminas em Béquer de 500 mL contendo o tampão de lavagem 1 (2x SSC; 0,1% SDS, temperatura ambiente) e a respectiva lâmina foi colocada em estante de metal imersa no mesmo tampão, até que todas as lamínulas foram retiradas. Depois, a estante de metal com as lâminas foi transferida para outra jarra de *Coplin*, contendo o tampão de lavagem 2 (42°C), sendo mantida em agitação suave por 5 min. A seguir, a estante foi transferida para uma última jarra, contendo o tampão de lavagem 3 (0,2x SSC), com agitação suave e constante, por 5 min, à temperatura ambiente. A estante com as lâminas foi então levada para centrifugação a 600 rpm, por 5 min para secagem. Procedeu-se imediatamente à leitura no *Scanner* de microarranjos G2565AA (Agilent Technologies, EUA).

A análise das imagens resultantes da leitura no *scanner* foi feita com o *software* GenePix Pro 5.1 (Molecular Devices Inc, EUA).

### 3.9.3. Análise dos dados obtidos na hibridização dos microarranjos de DNA

A mediana da intensidade foi obtida para cada ponto e importada no programa matemático de uso aberto "R", que é usado para o processamento dos dados e normalização. A razão de expressão de cada elemento no microarranjo foi calculado em termos de M  $(\log_2(vermelho/verde))$  e A  $((\log_2(vermelho) + \log_2(verde))/2)$ .

Os dados foram filtrados para a eliminação de elementos controle positivos (âncoras Cy3 e elementos pontos-repórter) e os elementos marcados como "ruins" durante a análise da imagem (*"flagged bad"*). Os valores de "M" foram normalizados pelo método *Print tip Lowess* usando-se o pacote "marray" de processamento de microarranjos do programa "R". A análise estatística foi feita com "R" usando-se o pacote Limma e o pacote SAM - *Statistical Analysis of Microarray*<sup>61</sup> (versão 3.1) do *programa* "R", uma ferramenta para análise de dados de expressão gênica de microarranjos na identificação de genes diferencialmente expressos entre duas condições<sup>62,63</sup>.

Os dados do microarranjo estão disponíveis para consulta através do banco de dados RAD (*RNA abundance database*)<sup>64</sup>.

Para obtenção da lista de genes diferencialmente expressos o SAM usa o método de "Taxa de Descobrimento Falso", *False Discovery Rate* (FDR). O FDR baseia-se no valor de q da taxa de descobertas falsas, ou seja, dentre aquele universo de figuras consideradas como significativamente positivas (ou diferencialmente expressas), quantas são, na verdade, nulas. Em contra-ponto ao valor de p que baseia-se na taxa de falsos positivos, ou seja, na percentagem de negativos (ou nulos) que teriam sido considerados positivos. O FDR tem sido considerado uma medida sensível no balanço entre figuras verdadeiramente positivas e falsos positivos<sup>65,66</sup>.

Neste estudo foi usada análise não pareada com FDR de 20% para a lista final de cada hibridização, maximizando a sensibilidade, sem impactar na acurácia do dados obtidos. Os valores de q para cada ponto, ou gene, do microarranjo são obtidos em tabelas, de maneira que quanto menor o valor, mais significativo o resultado. A lista foi ainda filtrada para resultados com diferença de expressão – *Fold Change* (FC) mínima de 1,2, para cima ou para baixo.

A análise das vias gênicas moduladas pelo tratamento com Pioglitazona nas duas concentrações de glicose (5,6 e 23 mM) foi feita a partir da lista de genes diferencialmente expressos obtidos na hibridização dos microarranjos de DNA com o software Ingenuity Pathways Analysis 5.0 (Ingenuity Systems, EUA). Trata-se de um arquivo de dados contendo identificadores gênicos e seus respectivos valores de expressão que foram carregados no aplicativo, relacionado com um banco de dados de publicações, mantido por um equipe de PhDs dedicados na construções das conexões e vias gênicas. Cada identificador gênico (Entrez Gene ID) foi mapeado com seu correspondente gene objeto na base de dados do Ingenuity. Uma diferença de expressão (FC) de 1,3 foi utilizada como ponto de corte para a identificação dos genes cuja regulação de expressão foi diferente de maneira significativa, além de FDR de 10%. Esses genes, chamados genes-foco, são submetidos a uma rede global molecular desenvolvida pelas informações contidas no Ingenuity Pathways Knowledge Base. Redes de relação contendo esses genes-foco são geradas na forma de algoritmos, baseados na sua conectividade. O Ingenuity é uma ferramenta disponível através da web (www.ingenuity.com), de acesso restrito e tem sido utilizado em inúmeras publicações em revistas científicas internacionais de grande impacto. Foram considerados para análise funcional os genes da lista cuja diferença de expressão (FC) esteve acima de 1,3, relacionados com funções biológicas ou doenças de acordo com a base de dados de vias do *Ingenuity*. O teste exato de Fisher é usado pelo sistema para calcular o valor de significância *p*, determinando a probabilidade de que cada função biológica assinalada a determinado conjunto de dados tenha se dado por acaso.

## 3.10. Confirmação dos resultados obtidos pela técnica de RTq-PCR

#### 3.10.1. Síntese de cDNA

As reações de RT-qPCR foram feitas com cDNA obtido a partir do RNA extraído de ilhotas tratadas ou não com Pioglitazona. Quinhentos nanogramas da amostra de RNA de cada condição experimental foram diluídos em H<sub>2</sub>O para volume total de 10  $\mu$ L. A seguir, adicionou-se 1  $\mu$ L de oligo-dT (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) e 1  $\mu$ L de *mix* de dNTP (10 mM) (Qiagen, EUA), aqueceu-se o tubo a 65°C por 5 min e colocou-se as amostras no gelo por dois min. Procedeu-se, então, à adição de:

- 4 µL 5x First Strand Buffer
- 2 µL 0,1M DTT
- 1 µL Rnasin<sup>®</sup> (Promega, EUA)

A mistura foi aquecida a 42°C por 2 min e adicionou-se, então, 1  $\mu$ L da enzima Transcriptase Reversa, Superscript II (Invitrogen, EUA). Após aquecimento a 42°C por 50 min e a 70°C por 15 min, as amostras foram armazenadas a -20°C. O produto final desta reação, em um volume de 20  $\mu$ L foi diluído em H<sub>2</sub>0 isenta de RNase para um volume total de 450  $\mu$ L. Desta solução final, utilizou-se 2  $\mu$ L para cada reação de PCR quantitativo.

## 3.10.2. PCR em tempo Real

As reacões de PCR foram feitas usando-se o kit  $SYBR^{\text{\tiny (B)}}$  GreenER<sup>TM</sup> qPCR SuperMix Universal (Invitrogen<sup>®</sup>). Utilizou-se 10  $\mu$ M de cada um dos amplímeros (forward e reverse) dos genes testados, 2 µL de cDNA e 0,3 µL do corante de referência incluído no kit (Rox), diluído 2:15, na concentração indicada pelo fabricante, para um volume total da reação de 20 µL. As reações foram realizadas usando-se o programa SYBR Green (com curva de dissociação) no sistema quantitativo PCR Multiplex (Stratagene<sup>®</sup>), equipamento Mx3000<sup>™</sup>. Os parâmetros de ciclagem foram 95°C por 10 min, depois 40 ciclos de 95°C (30 seg), 58°C (1 min.) e 72°C (30 seg), seguido por análise da curva de dissociação. Todas as reações foram feitas com 5 replicatas biológicas e 3 replicatas técnicas, com normalização pelo corante de referência (Rox). A intensidade de expressão de cada gene foi obtida pelos valores de CT (Threshold cycle) ou limiar do ciclo, no qual o aumento no sinal associado à fase exponencial de amplificação do produto de PCR começa a ser detectada. O CT é o número do ciclo calculado no qual o produto do PCR atinge um limiar de detecção. Trata-se do ciclo em que a fluorescência detectada é estatisticamente diferente do efeito de fundo (background). O CT é inversamente proporcional ao log do número de cópias da amostra, de maneira que quanto maior a expressão de determinado gene na amostra, menos ciclos são necessários para o alcance do CT<sup>67</sup>.Os experimentos foram desenhados em placas de 96 poços.

Os amplímeros usados nas reações foram desenhados com auxílio do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu) (Tabela 2). Todos os amplímeros tiveram sua eficiência de amplificação comparada à eficiência de amplificação do gene

42

controle interno, tendo sido selecionados também de acordo com este critério, de modo que as eficiências de amplificação de todos os genes testados foram semelhantes à eficiência do gene controle interno, possibilitando o uso do  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para se comparar a expressão gênica.

Para a quantificação relativa dos produtos de amplificação, foi feita a análise da eficiência de amplificação dos genes alvos e do controle interno. Para isso, foram realizadas curvas com diluições seriadas do cDNA das ilhotas, em 1:1, 1:10, 1:100 e um amostra branca (NTC), para cada um dos amplímeros estudados. Cada uma das diluições foi amplificada por RT-qPCR nas mesmas condições, em que foi observada também a especificidade das curvas de dissociação de cada amplímero. Para cada gene foi testado pelo menos dois pares de amplímeros. A comparação da eficiência dos genes pode ser realizada pela subtração dos valores do CT do gene alvo dos valores do gene controle (Gapdh) e a diferença é plotada contra o logaritmo da quantidade da amostra (template) inicialmente colocada. O cálculo da eficiência foi feito com o uso do programa REST<sup>©</sup> de avaliação de expressão relativa por RTqPCR<sup>68</sup>. A determinação das eficiências do gene controle (*housekeeping*, HK) e dos genes-alvo foi feita com o cálculo da inclinação da reta (slope) de pontos de CT obtidos em relação à concentração de cDNA presente na amostra, através de um algoritmo logarítmico, como um indicador de linearidade desse alinhamento logarítmico, usando-se coeficiente de correlação de Pearson. As eficiências (E) do RT-qPCR foram calculadas de acordo com a fórmula:  $E = 10^{[-1/slope]} 69$ .

| Entrez Gene<br>ID | Símbolo  | Primer forward        | Primer reverse           | Eficiência |
|-------------------|----------|-----------------------|--------------------------|------------|
| 313210            | Abca1    | CATGACAGGACTGGACACCAA | GGTTCTCCCCTTCTGCAGGT     | 2.03       |
| 81822             | Actb     | GGGAAATCGTGCGTGACATT  | GCGGCAGTGGCCATCTC        | 2.1        |
| 64639             | Bad      | GAGCTTAGCCCTTTTCGAGGA | AACCCTCAAATTCATCGCTCA    | 2.15       |
| 24887             | Bax      | ACACCTGAGCTGACCTTGGAG | CACGTCAGCAATCATCCTCTG    | 2.12       |
| 24245             | Camk2b   | ACGTGCTAACCTGGCTGTTGT | CTAGAGGAGCACCCTCCCAGT    | 2.04       |
| 79451             | Fabp4    | ATCACCCCAGATGACAGGAAA | CTTTCCATCCCACTTCTGCAC    | 2.15       |
| 24383             | Gapdh    | GTTACCAGGGCTGCCTTCTCT | AACTTGCCGTGGGTAGAGTCA    | 2.03       |
| 24385             | Gck      | CCTGGGCTTCACCTTCTCCTT | GAGGCCTTGAAGCCCTTGGT     | 1.98       |
| 25351             | Glut2    | CACTGGCTGCCTTtAGCAACT | CCAGCAAAAAGGAAGAACACG    | 2.05       |
| 24451             | Hmox1    | CAACCCCACCAAGTTCAAACA | AGGCGGTCTTAGCCTCTTCTG    | 2.02       |
| 24465             | Hprt1    | GCGAAAGTGGAAAAGCCAAGT | GCCACATCAACAGGACTCTTGTAG | 2.1        |
| 24505             | Ins1     | TGTCAAACAGCACCTTTGTGG | CGGGACTTGGGTGTGTAGAAG    | 2.22       |
| 24506             | Ins2     | GGGGAGCGTGGATTCTTCTAC | GTGCCAAGGTCTGAAGGTCAC    | 2.1        |
| 64194             | Insig    | GGGCTAAGGGCAGCAGTAAGT | CTGAGCGAGACCTGGAGATGT    | 1.95       |
| 81678             | ltpr2    | GGCCTTGGACTTGTCTCACAC | GCAGAGTGTGGCTTCCTGTCT    | 2.06       |
| 25330             | Lipe     | TCTGCTTCTCCCTCTCGTCTG | CAAAATGGTCCTCCGTCTCTG    | 2.01       |
| 24539             | Lpl      | CTCCTACTTCCGCTGGTCAGA | CTCCCTGGCACAGAAGATGAC    | 2.14       |
| 24577             | Мус      | AGATCAGCAACAACCGCAAAT | TACGCTTCAGCTCGTTTCTCC    | 2.09       |
| 24604             | Npy      | TCCAGCCCTGAGACACTGATT | CACATGGAAGGGTCTTCAAGC    | 1.95       |
| 25747             | Ppara    | CGACATCATGGAACCCAAGTT | TAGCAGCCACAAAAAGGGAAA    | 2.2        |
| 25664             | Pparg    | GGATGTCTCACAATGCCATCA | CAGACTCTGGGTTCAGCTGGT    | 2.07       |
| 94167             | Prdx6    | AATGGCACCAAAACATTCTCG | CCCTGCAGTCACCAACACATA    | 2.1        |
| 140910            | Sc4mol   | TGCAGCTGGCAACTAACATTG | GAAGAGTTCTCATCCCGCAGA    | 1.99       |
| 246074            | Scd1     | ATCATGTTGGGTGCCTTATCG | CTCCAGCCAGCCTCTTGTCTA    | 2.17       |
| 83792             | Scd2     | GGGAAGAGCCCTTCAGACCTA | CCCAGTGCTACGGTTTGAGTC    | 2.07       |
| 24617             | Serpine1 | CAACCCACTACGCCTTCACTC | CCTGGGTCATCCTTCATAGCA    | 2.04       |
| 25139             | Slc2a4   | CTGACAGGGCAAGGATGGTAG | CCTGGAGGGGAACAAGAAAGT    | 2.09       |
| 24787             | Sod2     | GCAAGGTCGCTTACAGATTGC | AGTAAGCGTGCTCCCACACAT    | 2.08       |
| 78968             | Srebf1   | CAGCTGATGGAGACAGGGAGT | GGTAGCCATGCTGGAACTGAC    | 1.85       |
| 300095            | Srebf2   | CTGCAGCCTCAAGTGCAAAG  | CAGTGTGCCATTGGCTGTCT     | 1.93       |
| 117526            | Tbp      | GGGATTGTACCACAGCTCCAA | GCAGTTGTTCGTGGCTCTCTT    | 2.2        |
| 25720             | Tcf12    | CCGTGGCAGTCATCCTTAGTC | CTGACGCAGCAGAGACCTTTT    | 1.98       |
| 24835             | Tnf      | GCTCACAAGGCTGCTGAAGAT | AGGGAACAGTCTGGGAAGCTC    | 1.88       |
| 366518            | Tnfrsf14 | CCTGACCTGTCAAAGCTGGTC | TGGTAGGCCGATCTAGCTGAA    | 1.99       |
| 54315             | Ucp2     | AAGACCATTGCACGAGAGGAA | GTCATGAGGTTGGCTTTCAGG    | 2.02       |

Tabela 2. Seqüência dos amplímeros utilizados nas reações de RT-qPCR com respectiva eficiência calculada pelo método de Pfaffl<sup>68</sup>

### 3.10.3. Seleção do gene controle interno

Todos os valores de CT foram normalizados pela expressão do gene controle interno, *Gapdh*, que foi escolhido dentre quatro genes controle interno avaliados como o que apresentou menor variação entre as amostras estudadas. A análise da estabilidade de expressão (Figura 14) dos genes candidatos a controle interno foi feita através do programa *GeNorm*®, uma ferramenta de análise de genes controle interno em experimentos de RT-qPCR que permite a avaliação da estabilidade da expressão de determinado gene em um dado conjunto de amostras de cDNA, por meio da medida M, de estabilidade, em que o maior M denota a menor estabilidade (ou seja, maior variabilidade na sua expressão)<sup>70</sup>. Para a utilização desse programa, foi feito um experimento de RTqPCR, incluindo todas as 20 amostras incluídas no experimento de microarranjo e os quatro candidatos a gene controle interno selecionados, ou seja, *Hprt, Gapdh, Tbp* e *Actb*, com todas as reações montadas a partir de um mesmo *mix*, compondo o experimento, sendo que cada amostra foi testada em triplicata técnica, portanto 60 curvas para cada amplímero testado.



Figura 14. Média da estabilidade de expressão (M) dos quatro genes HK testados nas 20 amostras de cDNA utilizadas no experimento

## 3.10.4. Análise estatística

Os dados dos experimentos de RT-qPCR foram analisados através do teste t de *Student* para confirmar a significância dos achados do RT-qPCR na mesma direção de diferença de expressão prevista no microarranjo. Foi utilizado teste nãopareado, bi-caudal, estabelecendo-se valor de corte de significância p de 0,05, para todos os genes testados.

## 4. Resultados

## 4.1. Viabilidade das ilhotas cultivadas pela secreção de insulina

O incremento percentual na concentração de insulina no meio de cultura condicionado por ilhotas expostas a 16,7 mM de glicose (estimuladas) em relação a ilhotas mantidas em 1,67 mM de glicose (controle) nos diferentes tempos de cultivo, avaliado pela técnica ELISA é demonstrado na Figura 15. O incremento percentual na concentração de insulina no meio condicionado por ilhotas estimuladas foi semelhante nos tempos 48 horas e sete dias em cultura.



Figura 15. Incremento percentual na concentração de insulina no meio de cultura modulado pela glicose. Ilhotas expostas a 16,7 mM de glicose (estimuladas por uma hora) em relação a ilhotas mantidas em 1,67 mM de glicose (controle) após 48 horas e após 7 dias de cultivo, respectivamente

## 4.2. Condições experimentais

As amostras de RNA obtidas a partir do cultivo e tratamento das ilhotas pancreáticas estão demonstradas na Tabela 3.
Pioglitazona 10 µM (Pio 10) ou veículo (DMSO 0,1%) em presença de concentrações fisiológicas (5,6 mM) ou supra-fisiológicas (23 mM) de glicose quantificadas no Nanodrop Total RNA (ng) Amostras Condição na/ul 260/280

Tabela 3. Amostras de RNA obtidas a partir do cultivo das ilhotas pancreáticas tratadas com

|    | oonaişao     | ng/u   | 200/200 | Teta Hitri (Hg) |
|----|--------------|--------|---------|-----------------|
| 1  | DMSO 5,6mM   | 71,49  | 2,13    | 2001,72         |
| 3  | Pio 10 5,6mM | 82,9   | 1,97    | 2321,2          |
| 7  | DMSO 23mM    | 77,26  | 2,02    | 2163,28         |
| 9  | Pio 10 23mM  | 200,33 | 2,10    | 5609,24         |
| 13 | Basal 5,6 mM | 72,6   | 2,01    | 2032,8          |
| 21 | DMSO 5,6mM   | 95,7   | 1,55    | 2679,6          |
| 22 | Pio 10 5,6mM | 85,7   | 1,56    | 2399,6          |
| 23 | DMSO 23mM    | 111,4  | 1,55    | 3119,2          |
| 24 | DMSO 23mM    | 94,8   | 1,52    | 2654,4          |
| 25 | Pio 10 23mM  | 121,1  | 1,89    | 3390,8          |
| 26 | Pio 10 23mM  | 107,2  | 1,52    | 3001,6          |
| 27 | DMSO 5,6mM   | 253,2  | 1,59    | 7089,6          |
| 28 | DMSO 5,6mM   | 236,9  | 1,62    | 6633,2          |
| 29 | Pio 10 5,6mM | 218,3  | 1,63    | 6112,4          |
| 30 | Pio 10 5,6mM | 231,3  | 1,6     | 6476,4          |
| 31 | DMSO 23mM    | 463,6  | 1,67    | 12980,8         |
| 32 | Pio 10 23mM  | 567    | 1,66    | 15876           |
| 33 | Basal 5,6mM  | 591,4  | 1,68    | 16559,2         |
| 34 | Basal 5,6mM  | 491,2  | 1,63    | 13753,6         |
| 35 | DMSO 23mM    | 254,6  | 1,68    | 7128,8          |
| 36 | Pio 10 23mM  | 327,4  | 1,69    | 9167,2          |
| 37 | DMSO 5,6mM   | 85     | 1,61    | 2380            |
| 38 | Pio 10 5,6mM | 413,6  | 1,67    | 11580,8         |
| 39 | DMSO 23mM    | 85,4   | 1,66    | 2391,2          |
| 40 | Pio 10 23mM  | 232,2  | 1,65    | 6501,6          |
| 41 | DMSO 5,6mM   | 102,7  | 1,65    | 2875,6          |
| 42 | Pio 10 5,6mM | 270,9  | 1,72    | 7585,2          |
| 45 | DMSO 5,6mM   | 253,5  | 1,78    | 7098            |
| 46 | Pio 10 5,6mM | 217,8  | 1,7     | 6098,4          |
| 47 | DMSO 23mM    | 102,4  | 2,1     | 2867,2          |
| 48 | Pio 10 23mM  | 134,5  | 2,13    | 3766            |
| 49 | DMSO 23mM    | 248,5  | 2,09    | 6958            |
| 50 | Pio 10 23mM  | 341,6  | 2,11    | 9564,8          |
| 51 | Basal 5,6 mM | 184,6  | 2,1     | 5168,8          |
| 52 | Basal 5,6 mM | 297,9  | 2,1     | 8341,2          |
| 53 | Basal 5,6 mM | 473,4  | 2,09    | 13255,2         |
| 54 | Basal 5,6 mM | 442,5  | 2,09    | 12390           |
| 55 | Basal 5,6 mM | 466    | 2,09    | 13048           |
| 56 | DMSO 5,6mM   | 454,4  | 2,09    | 12723,2         |
|    |              |        |         |                 |

# 4.2.1. Análise da integridade das amostras de RNA obtidas em gel de agarose denaturante

Na Figura 16 pode-se observar a integridade das amostras de RNA das diferentes condições experimentais avaliadas após eletroforese em gel de agarose denaturante a 1%.



Figura 16. Imagem de gel das amostras de RNA submetidas a eletroforese em gel de agarose denaturante a 1% evidenciando as bandas correspondentes às frações 28S e 18S do RNA ribossomal

#### 4.2.2. Integridade do RNA no equipamento Bioanalyser 2100

Na Figura 17, pode-se observar a integridade das amostras de RNA das diferentes condições experimentais avaliadas no equipamento Bioanalyser 2100. Com exceção das amostras número 47 e 51, que foram excluídas, todas as demais foram consideradas íntegras e adequadas para hibridização.













#### equipamento Bioanalyser 2100







Figura 17. Amostras de RNA das amostras biológicas das diferentes condições experimentais submetidas à análise no equipamento *Bioanalyser* 2100



Figura 17. Amostras de RNA das replicatas biológicas das diferentes condições experimentais submetidas à análise no equipamento *Bioanalyser* 2100



55



Figura 17. Amostras de RNA das replicatas biológicas das diferentes condições experimentais submetidas à análise no equipamento *Bioanalyser* 2100 (conclusão)

### 4.3. Rendimento da amplificação das amostras de RNA para hibridização

Na Tabela 4, pode-se observar o rendimento da reação de amplificação das amostras de RNA.

| Amostra | s ng/ul | 260/280 | Total |
|---------|---------|---------|-------|
| 1       | 141,8   | 1,85    | 6805  |
| 9       | 152,8   | 1,85    | 7335  |
| 24      | 137,7   | 1,85    | 6609  |
| 26      | 149,2   | 1,86    | 7162  |
| 27      | 130,5   | 1,86    | 6262  |
| 29      | 134,4   | 1,87    | 6449  |
| 30      | 139,6   | 1,85    | 6702  |
| 31      | 134,5   | 1,84    | 6457  |
| 35      | 147,4   | 1,86    | 7073  |
| 37      | 149,8   | 1,84    | 7190  |
| 38      | 107,3   | 1,87    | 5151  |
| 39      | 131,8   | 1,86    | 6324  |
| 40      | 128,2   | 1,87    | 6152  |
| 41      | 127,5   | 1,86    | 6121  |
| 42      | 161,2   | 1,85    | 7740  |
| 45      | 133,1   | 1,85    | 6389  |
| 46      | 141,7   | 1,85    | 6802  |
| 48      | 147,3   | 1,84    | 7072  |
| 49      | 110,9   | 1,87    | 5321  |
| 50      | 125.7   | 1.86    | 6034  |

RNA

Tabela 4. Rendimento das amostras de RNA amplificadas pelo kit Nugen<sup>®</sup> a partir de 50 ng de

#### 4.4. Resultados da hibridização na plataforma Mouse Panchip 6.0

Para a hibridização nas lâminas de microarranjos de DNA foram utilizadas as amostras amplificadas indicadas na Tabela 4. Conforme demonstrado na Figura 18, após a leitura no *scanner*, todas as amostras obtiveram intensidade de sinal satisfatória para a análise de genes diferencialmente expressos.

Após normalização e análise pelo SAM, o programa gera um gráfico de genes diferencialmente expressos, em que se obtém o escore de intensidade observado em relação ao escore esperado. Quando o observado é igual ao esperado, a expressão foi semelhante entre teste e controle. Na Figura 19, pode-se observar que a maior parte dos elementos do microarranjo não teve expressão alterada pelo tratamento com Pioglitazona em ambas as concentrações de glicose. A figura foi gerada considerando-se um FDR de 10%. Observa-se que em 5,6 mM, há apenas alguns pontos cuja expressão foi diferente e aparecem em verde na parte baixa do gráfico, porque o escore observado foi menor que o esperado (expressão gênica diminuída pelo tratamento com Pioglitazona), e outros poucos cuja expressão foi aumentada e aparecem como pontos vermelhos na parte mais alta do gráfico (expressão aumentou com o tratamento). Em 23 mM o número de genes modulados pela Pioglitazona foi maior.



Figura 18. Intensidade de sinal vermelho (Cy5) e verde (Cy3) na imagem obtida do experimento de microarranjo. Antes (painéis da esquerda) e após normalização (painéis da direita) para as amostras cultivadas em 5,6 mM (Pio 56) e 23 mM (Pio 23), respectivamente



Figura 19. Escore de intensidade de genes após hibridização com plataforma *Panchip*. Os pontos vermelhos indicam os genes regulados para cima nas ilhotas tratadas com Pioglitazona e os pontos em verde indicam os genes regulados para baixo nas ilhotas tratadas com Pioglitazona nos experimentos realizados nas concentrações fisiológicas (PIO 5.6) e supra-fisiológicas (PIO 23) de glicose

A lista de genes diferencialmente expressos entre ilhotas tratadas e não tratadas com a Pioglitazona foi obtida com a utilização de um FDR de 20% e diferença de expressão mínima de 1,2 para baixo ou para cima. Em concentrações fisiológicas de glicose (5,6 mM) 101 elementos foram modulados pela Pioglitazona, sendo 49 para cima (*upregulated*) e 52 para baixo (*downregulated*) (Anexo A). Em condições suprafisiológicas de glicose (23 mM), 1.235 elementos foram modulados pela droga em cultura, sendo que 612 para cima e 623 para baixo (Anexo B).



Figura 20. Número de genes modulados pela Pioglitazona nas duas concentrações de glicose estudadas

A comparação entre as duas condições revelou 74 genes que foram modulados nas duas concentrações de glicose (sobreposição) (Tabela 5). Em anexo estão as tabelas com as listas de genes diferencialmente expressos em 5,6 mM de glicose e os 200 mais expressos no experimento em 23 mM, de acordo com o FC.

Tabela 5. Genes modulados pela Pioglitazona em ambas as concentrações de glicose de acordo com o *Panchip*. Elementos comuns nas listas originárias das duas hibridizações a 5,6 e 23 mM de glicose, tendo sido modulados em ambas as condições pela Pioglitazona

| ELEMENT_ID | GENE_ID       | Nome          | Pio56_FC | Pio56_FDR | Pio23_FC | Pio23_FDR |
|------------|---------------|---------------|----------|-----------|----------|-----------|
| 14182773   | 11770; 64697  | Fabp4; Keg1   | 1,579    | 7,06      | 1,419    | 3,96      |
| 14182239   | 216150        | Cdc34         | 1,542    | 0         | 1,342    | 3,96      |
| 14188181   | 19123; 55982  | Proc; Paxip1  | 1,495    | 7,06      | 1,258    | 11,29     |
| 14190818   | 232875        | LOC232875     | 1,357    | 17,95     | 1,242    | 11,29     |
| 14183523   |               | IMAGE=6433664 | 1,344    | 7,06      | 1,413    | 3,96      |
| 14179854   |               | IMAGE=6433776 | 1,337    | 17,95     | 1,261    | 9,34      |
| 14182325   | 18536         | Pcm1          | 1,284    | 14,57     | 1,346    | 3,96      |
| 14183468   | 72119         | Tpx2          | 1,283    | 14,57     | 1,291    | 5,02      |
| 14178627   | 238722        | Zfp72         | 1,276    | 7,06      | 1,283    | 3,96      |
| 14191786   |               | IMAGE=6433559 | 1,275    | 14,57     | 1,425    | 3,96      |
| 14178728   | 70394         | Kptn          | 1,275    | 14,57     | 1,358    | 3,96      |
| 14191445   | 11770         | Fabp4         | 1,273    | 14,57     | 1,372    | 3,96      |
| 14184417   | 12321         | Calu          | 1,268    | 14,57     | 1,317    | 3,96      |
| 14186082   | 74199         | Vit           | 1,268    | 14,57     | 1,374    | 3,96      |
| 14184699   | 223922        | Atf7          | 1,265    | 14,57     | 1,304    | 3,96      |
| 14179821   | 26456         | Sema4g        | 1,26     | 14,57     | 1,402    | 3,96      |
| 14181994   |               | IMAGE=6433555 | 1,259    | 14,57     | 1,278    | 3,96      |
| 14186889   |               | IMAGE=6433581 | 1,259    | 14,57     | 1,335    | 3,96      |
| 14179890   | 66771         | 4933439F18Rik | 1,252    | 14,57     | 1,369    | 3,96      |
| 14191719   | 80750         | BC004022      | 1,247    | 17,95     | -1,336   | 2,3       |
| 14180144   | 67444         | llkap         | 1,244    | 14,57     | 1,321    | 3,96      |
| 14181733   | 217351        | Tnrc6c        | 1,244    | 17,95     | 1,345    | 3,96      |
| 14178915   | 228807        | Zfp341        | 1,241    | 17,95     | 1,31     | 3,96      |
| 14185113   | 320480        | 6430537K16Rik | 1,239    | 17,95     | 1,254    | 3,96      |
| 14180723   | 16551         | Kif11         | 1,237    | 17,95     | 1,397    | 3,96      |
| 14182511   | 107227        | D930010J01Rik | 1,236    | 14,57     | 1,202    | 3,96      |
| 14184240   | 170571        | Cntnap4       | 1,234    | 17,95     | 1,352    | 3,96      |
| 14187240   | 21677         | Tead2         | 1,221    | 17,95     | 1,246    | 3,96      |
| 14183809   | 71242         | 5133400G04Rik | 1,217    | 17,95     | 1,331    | 3,96      |
| 14184106   | 13000; 381903 | Csnk2a2; Alg8 | 1,216    | 17,95     | 1,325    | 3,96      |
| 14187332   | 68572         | lct1          | 1,216    | 17,95     | 1,289    | 3,96      |
| 14191441   | 67153         | Rnaseh2b      | 1,213    | 17,95     | 1,324    | 3,96      |
| 14184094   | 20637         | Snrp70        | 1,213    | 14,57     | 1,209    | 8,18      |
| 14178020   | 106769        | AW061004      | 1,212    | 17,95     | 1,252    | 3,96      |
| 14186312   | 230737        | Gnl2          | 1,211    | 17,95     | 1,256    | 5,02      |
| 14189589   | 17308         | Mgat1         | 1,211    | 17,95     | 1,208    | 6,47      |
| 14185316   | 218952        | Plekhc1       | 1,207    | 17,95     | 1,306    | 3,96      |
| 14187502   | 67178         | Zmat5         | 1,207    | 17,95     | 1,209    | 6,47      |
| 14183853   | 109778        | Blvra         | 1,203    | 17,95     | 1,328    | 3,96      |

| ELEMENT_ID | GENE_ID        | Nome                   | Pio56_FC | Pio56_FDR | Pio23_FC | Pio23_FDR |
|------------|----------------|------------------------|----------|-----------|----------|-----------|
| 14189752   | 23986          | Peci                   | -1,82    | 0         | -1,734   | 0         |
| 14189180   | 26554          | Cul3                   | -1,71    | 0         | -1,497   | 1,48      |
| 14181624   | 19692          | Reg1                   | -1,53    | 10,94     | 1,2      | 3,96      |
| 14182892   |                | IMAGE=6437108          | -1,473   | 0         | -1,489   | 0         |
| 14178851   | 73652          | 2210408F21Rik          | -1,44    | 0         | -1,499   | 0         |
| 14177996   |                | IMAGE=6437106          | -1,363   | 0         | -1,397   | 0         |
| 14189033   | 232023         | AW146242               | -1,352   | 10,94     | -1,378   | 0         |
| 14180504   | 67958          | 2610101N10Rik          | -1,344   | 0         | -1,202   | 19,38     |
| 14180186   | 20616          | Snap91                 | -1,333   | 0         | -1,355   | 0         |
| 14179881   | 13039          | Ctsl                   | -1,317   | 10,94     | -1,333   | 0         |
| 14185137   | 67160          | Eef1g                  | -1,31    | 15,41     | -1,325   | 0         |
| 14178981   | 29811          | Ndrg2                  | -1,293   | 0         | -1,268   | 0         |
| 14182949   | 68603          | Pmvk                   | -1,293   | 0         | -1,222   | 0         |
| 14178908   | 67936          | Wdr55                  | -1,293   | 0         | -1,311   | 0         |
| 14182580   | 12449          | Ccnf                   | -1,291   | 0         | -1,382   | 0         |
| 14182163   | 15381          | Hnrpc                  | -1,291   | 15,41     | -1,296   | 1,48      |
| 14181952   | 16569          | Kif3b                  | -1,291   | 10,94     | -1,458   | 1,48      |
| 14179293   |                | IMAGE=6435546          | -1,279   | 10,94     | -1,252   | 2,3       |
| 14179692   | 21374          | Тbр                    | -1,275   | 10,94     | -1,29    | 0         |
| 14189508   | 20163          | Rsu1                   | -1,27    | 15,41     | -1,368   | 3,96      |
| 14181990   | 114741; 382090 | Supt16h; 4922501C03Rik | -1,265   | 10,94     | -1,226   | 19,38     |
| 14182689   |                | IMAGE=6435769          | -1,261   | 10,94     | -1,299   | 0         |
| 14178000   | 328329         | Mast4                  | -1,261   | 0         | -1,215   | 6,47      |
| 14187458   | 269224         | Pask                   | -1,261   | 15,41     | -1,345   | 8,18      |
| 14181303   | 382066         | Prdm10                 | -1,261   | 15,41     | -1,389   | 2,3       |
| 14183557   | 27528          | D0H4S114               | -1,258   | 10,94     | -1,306   | 0         |
| 14186564   | 76703          | Cpb1                   | -1,256   | 17,95     | -1,558   | 10,52     |
| 14178371   |                | IMAGE=6435636          | -1,254   | 10,94     | -1,368   | 0         |
| 14179077   | 20733          | Spint2                 | -1,249   | 17,95     | 1,324    | 3,96      |
| 14179806   | 70693          | Gpr125                 | -1,244   | 15,41     | -1,3     | 0         |
| 14185118   | 320995         | Rfxdc1                 | -1,236   | 15,41     | -1,203   | 2,3       |
| 14187585   | 16597          | Klf12                  | -1,226   | 15,41     | -1,42    | 1,48      |
| 14181357   | 110094         | Phka2                  | -1,225   | 15,41     | -1,261   | 6,47      |
| 14178909   | 63856          | Tbn                    | -1,218   | 10,94     | -1,238   | 0         |

Tabela 5. Genes modulados pela Pioglitazona em ambas as concentrações de glicose de acordo com o *Panchip*. Elementos comuns nas listas originárias das duas hibridizações a 5,6 e 23 mM de glicose, tendo sido modulados em ambas as condições pela Pioglitazona

(conclusão)

### 4.5. Análise de vias acometidas pelo Ingenuity® Systems

Para identificar as vias moduladas pela Pioglitazona, a lista de genes resultante da análise do experimento de microarranjo na plataforma *PanChip* foi submetida ao programa *Ingenuity*<sup>®</sup>. Em concentrações fisiológicas de glicose (5,6 mM) apenas a via relacionada ao Metabolismo lipídico foi afetada de maneira significativa pela Pioglitazona. Em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) mais vias foram significativamente moduladas pela Pioglitazona; vias essas relacionadas a Ciclo celular, Morte celular e Metabolismo lipídico. Outras funções moleculares e celulares também relacionadas de maneira significativa à lista de genes do experimento de microarranjos inclui ainda Morfologia celular (p<0,02) e Transporte molecular (p<0,03).

Na Figura 21, estão demonstradas as legendas dos símbolos utilizados nas Figuras 22, 23 e 24, que ilustram as vias obtidas nas análises realizadas pelo programa *Ingenuity*<sup>®</sup>.



Legenda das figuras do Ingenuity®

Figura 21. Legenda dos símbolos utilizados nas figuras que ilustram as vias obtidas nas análises do programa Ingenuity<sup>®</sup>



Figura 22. Via relacionada ao Metabolismo lipídico. Significativamente modulada pela Pioglitazona em ilhotas expostas a 5,6 mM de glicose, (p=0,04)



Figura 23. Via relacionada à Morte celular e ao ciclo celular. Significativamente modulada pela Pioglitazona em ilhotas expostas a 23 mM de glicose, (p<0,001)



Figura 24. Via relacionada a Metabolismo lipídico e ciclo celular. Significativamente modulada pela Pioglitazona em ilhotas expostas a 23 mM de glicose, (p=0,0003)

### 4.6. Resultados dos experimentos de RT-qPCR

A partir da análise feita pelo *Ingenuity*<sup>®</sup> *Systems*, alguns dos genes identificados como diferencialmente expressos foram selecionados para confirmação por RT-qPCR. Nas Tabelas 6 e 7, estão demonstrados, respectivamente, os genes modulados pela Pioglitazona em ilhotas expostas a 5,6 mM e a 23 mM de glicose. Nessas tabelas, pode-se observar a diferença de expressão, *fold change* (FC), obtida na análise dos resultados dos microarranjos de DNA, bem como o FC obtido na confirmação pelo RT-qPCR, com respectivo valor de *p*.

|        | PanChip |      | RTqPCR |         |
|--------|---------|------|--------|---------|
| Genes  | FC      | FDR  | FC     | p-value |
| Fabp4  | 1,6     | 14,6 | 5,8    | 0,02    |
| Insig1 | 1,4     | 14,6 | 2,0    | 0,05    |
| Scd1   | 1,5     | 14,6 | 1,2    | 0,32    |
| Scd2   | 1,4     | 14,6 | 1,9    | 0,03    |
| Sc4mol | 1,3     | 18,0 | 1,2    | 0,44    |

Tabela 6. Confirmação pelo RT-qPCR de genes modulados pela Pioglitazona em ilhotas expostas a 5,6 mM. Pode-se observar valores de FC obtidos na análise dos resultados dos microarranjos de DNA e no RT-qPCR

Tabela 7. Genes modulados pela Pioglitazona em ilhotas expostas a 23 mM de glicose, confirmados pelo RT-qPCR. Pode-se os observar valores de *fold change* obtidos na análise dos resultados dos microarranjos de DNA e no RT-qPCR. Os valores negativos indicam que a expressão do gene foi menor em presença de Pioglitazona

|        | PanChip |      | RTqPCR |         |
|--------|---------|------|--------|---------|
| Genes  | FC      | FDR  | FC     | p-value |
| Actb   | 1,4     | 6,5  | 1,6    | 0,17    |
| Bad    | 1,4     | 5,0  | 1,4    | 0,05    |
| Bax    | 1,3     | 4,0  | 1,5    | 0,02    |
| Camk2b | 1,3     | 9,3  | 1,2    | 0,42    |
| Fabp4  | 1,4     | 4,0  | 5,0    | 0,02    |
| Hmox1  | 1,4     | 7,3  | 3,4    | 0,04    |
| ltpr2  | 1,3     | 4,0  | 1,5    | 0,04    |
| Npy    | -1,3    | 2,3  | -2,7   | 0,19    |
| Prdx6  | 1,4     | 11,4 | 1,3    | 0,34    |
| Sod2   | 1,4     | 6,7  | 4,5    | 0,02    |

Os genes identificados na Tabela 8 foram estudados pelo RT-qPCR, por desempenharem papéis importantes em algumas das vias biológicas identificadas

como significativamente moduladas pela Pioglitazona, após análise no programa Ingenuity<sup>®</sup> e mostraram expressão modulada pelo tratamento com Pioglitazona.

Tabela 8. Genes pertencentes às vias biológicas identificadas pelo *Ingenuity* cuja expressão mostrou-se modulada pela Pioglitazona na análise do RT-qPCR. Pode-se observar os valores de *fold change* obtidos no RT-qPCR. Valor negativo indica que a expressão do gene foi menor na presença da droga

|       | Genes  | FC   | p-value |
|-------|--------|------|---------|
|       | Aldob  | -1,8 | 0,05    |
|       | Lipe   | 2,0  | 0,03    |
| 23mM  | Мус    | 2,0  | 0,04    |
|       | Scd2   | 1,5  | 0,01    |
|       | Srebf1 | 1,33 | 0,03    |
|       | Tnf    | 3,6  | 0,05    |
| 5,6mM | Srebf1 | 1,3  | 0,02    |

Alguns genes que codificam proteínas-chaves para a função das ilhotas pancreáticas e outros relacionados ao sistema PPAR $\gamma$  foram estudados quanto à sua expressão nas diferentes condições experimentais por RT-qPCR, mesmo não tendo aparecido na lista de genes diferencialmente expressos após análise dos microarranjos de DNA. Foram eles os genes que codificam a insulina 1 (*Ins1*), a insulina 2 (*Ins2*), a glucoquinase (*Gck*), o transportador de glicose 2 (GLUT2) (*Slc2a2*), o PPAR $\gamma$  (*Pparg*), o PPAR $\alpha$  (*Ppara*), a proteína de membrana mediadora de efluxo de colesterol e fosfolípides (*Abca1*), a lipoproteína lipase (*LpI*) e a proteína desacopladora 2 (*Ucp2*). Nenhum desses genes acima apresentou modulação de sua expressão em função do tratamento com Pioglitazona neste estudo.

Utilizando-se os dados obtidos com os experimentos de RT-qPCR, foi possível comparar, dentro do universo de amostras estudado, o efeito da

concentração de glicose no meio de cultura na expressão daqueles genes estudados. Para esta avaliação foi comparada a expressão dos genes nas ilhotas tratadas com DMSO 0,1% em 23 mM de glicose àquela das amostras tratadas com DMSO em 5,6 mM. Portanto não foram considerados os valores referentes às amostras tratadas com Pioglitazona, apenas as amostras controle, nas respectivas concentrações de glicose. Os genes cuja expressão foi modulada pela glicose no meio de cultura estão identificados na Tabela 9.

Tabela 9. Genes modulados pela glicose. Comparou-se a expressão em ilhotas controle cultivadas com veículo (DMSO) em 23 mM de glicose com aquelas cultivadas em 5,6 mM. Os valores negativos indicam que a expressão do gene foi menor em 23 mM de glicose

| Genes  | FC   | p-value |
|--------|------|---------|
| Fabp4  | -1,7 | 0,02    |
| Prdx6  | 1,9  | 0,06    |
| Insig1 | 3,7  | 0,01    |
| Scd2   | 1,7  | 0,04    |
| Srebf1 | -1,4 | 0,04    |
| Aldob  | 5,3  | 0,00    |
| Camk2b | 6,2  | 0,00    |
| Sc2a4  | 4,9  | 0,01    |
| Bad    | -1,7 | 0,02    |
| Lipe   | -2,3 | 0,00    |
| Bax    | -1,7 | 0,02    |
| Мус    | -3,1 | 0,07    |
| Ppara  | -4,0 | 0,01    |
| Ucp2   | 1,4  | 0,01    |
| Sc4mol | 4,2  | 0,00    |
| Lpl    | -3,8 | 0,02    |

#### 5. Discussão

A obtenção de ilhotas pancreáticas para estudos em cultura primária é um procedimento bastante laborioso e variável. No processo de padronização dessa técnica em nosso laboratório, foi despendida uma grande quantidade de tempo até que se conseguissem resultados consistentes, com ilhotas viáveis e que se mantivessem em cultura pelo prazo necessário sem contaminações. Após tentativas repetidas com o método de *hand picking*, que reiteradamente resultava em contaminação bacteriana nas culturas, foi padronizado o método do gradiente de Ficoll, considerando-se e adaptando a experiência disponível na literatura<sup>71,72,73</sup>.

Ainda no que se refere à metodologia deste estudo, a técnica de hibridização de microarranjos de DNA é também complexa, sendo sujeita a diversos fatores. Apesar desses experimentos terem sido realizados em um centro de referência em estudos de microarranjo, tanto para a própria Universidade da Pensilvânia quanto para outros laboratórios de pesquisa nos Estados Unidos, diversas dificuldades metodológicas foram vivenciadas, o que obrigou a realização da técnica repetidas vezes até que se obtivessem imagens das lâminas com qualidade de sinal suficiente para a análise dos dados obtidos. Um dos problemas técnicos enfrentados foi a falha no corante vermelho (Cy5), provavelmente relacionada aos níveis elevados de ozônio atmosférico no verão no nordeste dos Estados Unidos, o que fez com que fosse preparada uma sala com filtros de ozônio, para garantir a qualidade do experimento quando da realização de nova tentativa. Este é um problema conhecido e relatado por outros pesquisadores, assim como por fabricantes de plataformas comerciais<sup>74,75,76</sup>.

O experimento final de hibridização resultou em intensidades de corante vermelho e verde satisfatórias e após análise da imagem e dos dados, confirmou que a ativação do PPARγ por uma TZD, a Pioglitazona, modula efetivamente a expressão gênica em ilhotas pancreáticas, sendo este efeito mais evidente nas ilhotas incubadas em concentrações suprafisiológicas de glicose no meio de cultura (23 mM), em que mais de 1.200 genes tiveram sua expressão influenciada pela presença da Pioglitazona. Em concentrações fisiológicas de glicose (5,6 mM), o efeito da Pioglitazona foi menos pronunciado, com pouco mais de 100 genes modulados, sendo que aproximadamente a metade deles teve sua expressão diminuída pela droga.

Conforme esperado, diversos genes também foram modulados pelas concentrações de glicose no meio de cultura. Os dados na literatura são bastante variáveis a respeito do efeito de concentrações suprafisiológicas de glicose sobre a expressão gênica em ilhotas pancreáticas. Diferentes metodologias, com diferentes tempos de cultura e concentrações de glicose empregadas tornam difícil que se tire conclusões definitivas. Há desde trabalhos que mostram aumento da expressão do gene de insulina em ilhotas incubadas em níveis suprafisiológicos de glicose por períodos curtos até relatos de redução da SIEG após dias de cultura com concentrações mais elevadas de glicose no meio<sup>77,78</sup>. Por outro lado, alguns pesquisadores mostraram que a exposição de ilhotas a altos níveis de glicose no meio potencializou a tendência a apoptose induzida por citocinas e STZ quando comparadas ao controle, com relato de aumento de expressão de genes relacionados à apoptose<sup>79</sup>. No presente estudo, no qual a exposição a 23 mM de glicose se deu por período curto, não houve alteração na expressão dos genes da insulina 1 e 2, bem como de genes-chave que codificam a glucoquinase, o GLUT-2 ou o PPARy. Entretanto, houve diminuição na expressão de genes relacionados à apoptose com aumento da expressão de genes lipogênicos como Scd e Fabp4 e diminuição da expressão dos genes *Srebf1* e *Ppara*. Flamez e cols., em estudo com células  $\beta$  purificadas de ratos, mostraram que a incubação em 10 mM de glicose por 24h comparada à concentração de 3 mM modulou a expressão de 17 genes relacionados à apoptose e reparo de síntese de DNA, sendo 13 deles modulados para baixo. Eles observaram ainda aumento da expressão de genes lipogênicos como o *Scd*, mas aumento também na expressão do *Srebf1*<sup>80</sup>. Outros autores já haviam descrito a diminuição na expressão do *Ppara* e o estímulo à expressão do gene *Ucp2* em meio de cultura com maior concentração de glicose<sup>81,82</sup>. O estímulo à expressão da UCP2, com concentrações elevadas de glicose tem sido apontado como um dos mecanismos para o defeito na SIEG induzida pela glicotoxicidade e por estresse oxidativo<sup>83</sup>.

No tocante aos genes modulados pela ação da Pioglitazona nas ilhotas em cultura, houve uma concentração de genes relacionados ao metabolismo de lípides. A estearoil-CoA desaturase (SCD) é uma enzima passo-limitante na síntese de ácidos graxos monoinsaturados como o oleato, necessários para a produção de triglicérides e ésteres de colesterol. Existem três isoformas descritas em camundongos, sendo que a isoforma 1 apresenta homologia com a única forma descrita em humanos<sup>84</sup>. A transcrição da *Scd1* é estimulada pelo fator de transcrição *Srebf1* e por outro lado, a presença da desaturase é também necessária para a indução da expressão do *Srebf1*<sup>85</sup>. Apesar de trabalho recentemente publicado ter mostrado que a Pioglitazona não altera a expressão e atividade hepática da SCD em ratos ZDF<sup>86</sup>, estudos em humanos mostraram que a Rosiglitazona, outra TZD, aumenta a expressão de *Scd* em adipócitos, o que favorece a lipogênese, e poderia estar relacionado a melhora na sensibilidade periférica à ação da insulina<sup>87</sup>. Em outro estudo em camundongos obesos deficientes em leptina, a perda de *Scd1* resultou em diminuição da secreção de insulina e piora do diabetes<sup>88</sup>.

No presente estudo, as ilhotas cultivadas em 5,6 mM de glicose tratadas com Pioglitazona apresentaram aumento da expressão do fator de transcrição Srebf1, que controla a síntese de ácidos graxos, além de aumento na expressão de Scd1 e Scd2, sugerindo um favorecimento à síntese de lípides nas ilhotas. Camundongos transgênicos com expressão induzida de Srebf1 em células β pancreáticas apresentaram perda de secreção insulínica dependente de glicose e perda de massa de ilhotas<sup>89</sup>. Para seu efeito lipogênico, a SREBF1 deve ser translocado do retículo endoplasmático para o complexo de golgi, o que é inibido pela proteína codificada pelo gene Insig1, que também diminui a expressão de Srebf1 no figado<sup>90,91</sup>. No presente estudo, concomitantemente à expressão aumentada de Srebf1, houve aumento da expressão do *Insig1* nas ilhotas tratadas com Pioglitazona e cultivadas em concentração fisiológica de glicose, o que poderia atenuar o efeito final prósíntese de lípides da droga sobre as ilhotas. O gene Sc4mol, relacionado à síntese de colesterol, também teve sua expressão aumentada. Corroborando o efeito da Pioglitazona sobre as vias relacionadas ao metabolismo lipídico nas ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose, foi observado ainda aumento na expressão do gene *Fabp4*, que codifica um fator de transcrição que é alvo conhecido de PPAR<sub>y</sub> em adipócitos e está relacionado com aumento de resposta inflamatória e aterogênese<sup>92</sup>. Uysal e cols. mostraram que camundongos *ob/ob* deficientes em FABP4 apresentaram melhora da secreção insulínica, do controle glicêmico e do metabolismo lipídico. Alguns estudos já relataram aumento nos níveis séricos de FABP4 em pacientes tratados com TZD 93,94.

Portanto, os resultados obtidos em concentrações fisiológicas de glicose sugerem que a Pioglitazona pode favorecer a síntese de lípides nas ilhotas. É interessante notar que dentre os genes identificados como tendo sua expressão diminuída pela Pioglitazona na análise das lâminas *Panchip* está o gene *Reg1*, que codifíca uma proteína relacionada à regeneração e neogênese de ilhotas. A expressão aumentada de *Reg1* é relatada em situações de progressão para o diabetes, o que tem sido relacionado a um mecanismo compensatório de defesa, na tentativa de aumentar a população de células secretoras de insulina, contrabalançando fatores diabetogênicos <sup>95</sup>. Assim, a diminuição da expressão deste gene pode sugerir que nas condições estudadas as ilhotas não estão precisando lançar mão de mecanismos compensatórios para aumentar a população de células viáveis e dessa maneira, o efeito final da Pioglitazona em concentrações fisiológicas de glicose pode não ser deletério para a ilhota.

Em concentrações suprafisiológicas de glicose, a Pioglitazona também determinou a modulação de genes relacionados ao metabolismo lipídico, levando de maneira semelhante ao aumento de expressão dos genes *Fabp4*, *Srebf1* e *Scd2*. O aumento de expressão de *Apoa1* também observado nessa condição sinaliza para o efeito da Pioglitazona sobre o PPARa, já que tem sido descrito que o efeito dos fibratos, agonistas de PPARa, nos níveis plasmáticos de Apoa1, mediada pelo PPARa<sup>96</sup>.

O efeito máximo na ativação do PPAR $\gamma$  é semelhante para Pio e para a Rosiglitazona, sendo que a concentração em cultura de Pioglitazona a 10  $\mu$ M equivale à de Rosiglitazona a 1  $\mu$ M. Por outro lado, ambas ativam de maneira semelhante o PPAR $\alpha$ , a 10  $\mu$ M. Portanto, na mesma dose em que é plenamente ativa para o PPAR $\gamma$ , e mais usada nos estudos experimentais, a Pio também o é para o PPAR $\alpha$ , ao contrário da Rosiglitazona, que é mais seletiva. Em outros estudos a mesma concentração de Pio aqui utilizada, de 10  $\mu$ M, determinou um aumento na secreção de Apo A-I de 1,4 (FC) em uma linhagem de células humanas de hepatoma<sup>50</sup>.

Ainda no metabolismo de lípides, nas ilhotas cultivadas em concentração suprafisiológica de glicose também foi observado aumento na expressão do gene *Lipe*, que codifica a lipase hormônio sensível (também chamada de Hsl), cuja expressão tem um papel reconhecido na secreção de insulina na célula  $\beta^{97}$ . A lipase hormônio sensível catalisa a hidrólise de triglicérides, diacilglicerol e ésteres de colesteril e estudos com ilhotas de camundongos sem expressão de Lipe (*knockout*) revelam acúmulo intracelular de triglicérides e defeito na secreção de insulina estimulada por glicose<sup>98,99</sup>.

Conforme descrito, em presença de 23 mM de glicose o tratamento com Pioglitazona promoveu um efeito bem mais pronunciado na modulação gênica, aumentando em 12 vezes o número de genes modulados pela Pio, influenciando não apenas genes relacionados ao metabolismo de lípides, como também outros relacionados ao ciclo celular e à morte celular.

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<sup>100</sup>. Portanto, pode-se supor que em altas concentrações, a glicose interfere com a atividade transcricional relacionada ao ligante do PPAR $\gamma$ , modulando diretamente a expressão de genes que não são afetados em ilhotas expostas exclusivamente ao ligante, em concentrações físiológicas de glicose. Entretanto, como neste estudo a resposta transcricional à Pio e aos níveis suprafisiológicos de glicose foram determinados em 24h e sem adição de

inibidores de síntese protéica, é provável que parte desta regulação gênica observada não seja derivada diretamente da ligação da Pio ao PPARγ, mas sim resultante da alteração de expressão de outros reguladores de transcrição afetados pela combinação de glicose elevada associada à presença de Pioglitazona.

Nesta rede de genes acometidos, o *Tnf*, que codifica o Fator de Necrose Tumoral, também teve sua expressão aumentada em mais de três vezes pelo tratamento com a Pioglitazona em ilhotas expostas a altas concentrações de glicose. O TNF é uma citoquina fundamental no mecanismo de agressão de doenças autoimunes e, por controlar a expressão de diversos genes, também tem sido relacionado com a regulação de funções relacionadas ao remodelamento tissular, mobilidade celular, ciclo celular e apoptose, além de ser apontado como um dos participantes no mecanismo de perda de massa de células  $\beta$  em diabéticos, ativando a via relacionada ao fator de transcrição NFKB, uma das vias-chave para a apoptose dessas células<sup>101,102</sup>. Os dados obtidos pela análise do *Panchip* mostraram que a Pioglitazona promoveu uma diminuição da expressão do gene *Nfkb*, o que poderia contrabalançar os efeitos deletérios da expressão aumentada do TNF, no entanto, considerando a complexa regulação da proteína NFKB, é difícil definir a direção dos efeitos finais sobre a viabilidade das ilhotas.

O gene *Ywhab* cuja expressão diminuiu em ilhotas tratadas com Pioglitazona expostas a 23 mM de glicose na análise dos resultados do *Panchip*, codifica uma monoxigenase que tem efeito anti-apoptótico, por favorecer a fosforilação e inativação do gene pró-apoptótico *Bad*, cuja expressão foi aumentada pela Pioglitazona nessa concentração suprafisiológica de glicose<sup>103</sup>. Estes achados, juntamente com a expressão aumentada de outros genes pró-apoptóticos, como *Bax*, *Myc* (descrito como indutor de apoptose através do gene *Bax* em ilhotas pancreáticas<sup>104</sup>) *Fadd* e Caspase-4, este último um gene que codifica um efetor da apoptose celular e cuja expressão pode ser aumentada pelo  $\text{TNF}^{105}$ , sugerem que, em presença de 23 mM de glicose, a Pioglitazona poderia ter um efeito que favorecesse a apoptose celular. Além disso, o gene *Lcn2* (oncogene 24p3), que codifica a proteína Lipocalina 2 e é considerado um promotor de apoptose em alguns sistemas celulares<sup>106</sup>, também teve sua expressão aumentada pela Pio. Em experimentos com linhagem de células de tumor de cólon, o tratamento com uma TZD estimulou a expressão do gene *Lcn2* e diminuiu a expressão do *Reg1*, à semelhança do que observamos com as ilhotas neste estudo<sup>107</sup>.

Esses resultados também estão de acordo com dados ainda não publicados obtidos em nosso laboratório, nos quais o índice de apoptose de ilhotas, a 23 mM de glicose, aumentou em relação às ilhotas controle após 48 e 72 horas de exposição à Pioglitazona 10  $\mu$ M.

O gene *Hmox1*, que codifica a Heme-oxigenase 1, teve sua expressão estimulada pelo tratamento com a Pioglitazona. Esta enzima apresenta atividade oxiredutora e sua transdução em células  $\beta$  preveniu apoptose induzida por TNF humano recombinante associado à cicloheximida<sup>108</sup>. Outro gene que codifica enzima com atividade antioxidante e anti-apoptótica e teve sua expressão aumentada pela Pioglitazona foi o *Sod2* (superoxido-desmutase ou MnSOD2), cuja indução pode prevenir apoptose induzida por citocinas<sup>109</sup>.

Um transportador de colesterol intracelular, o ABCA1, foi proposto como um alvo das TZDs nas células  $\beta$  e como necessário para a ação benéfica dessas drogas sobre as ilhotas<sup>110</sup>, mas o estudo desse gene por RT-qPCR não demonstrou modulação pela Pioglitazona no presente trabalho. Similarmente, a UCP2, cuja

expressão esteve relacionada ao mecanismo de proteção das TZD nas ilhotas<sup>111</sup>, não teve sua expressão alterada conforme resultado da análise por RT-qPCR.

Dados derivados de estudos experimentais <sup>32,33,34</sup> e clínicos <sup>20,37</sup> sugerem que as TZD podem exercer efeitos benéficos na célula β através de mecanismos como a diminuição da lipotoxicidade<sup>112</sup>, proteção contra estresse oxidativo e contra apoptose <sup>113</sup>. Este estudo, desenhado para se aprofundar no conhecimento dos mecanismos potenciais dos efeitos da Pioglitazona nas ilhotas, demonstra que a Pio promove uma resposta transcricional direta em ilhotas pancreáticas, que é bastante mais pronunciada em condições suprafisiológicas de glicose.

Parton e colaboradores <sup>114</sup> que investigaram o perfil de expressão gênica de ilhotas murídeas mantidas em cultura por 16h em meio contendo 3 mM de glicose, utilizaram um agonista específico do PPAR $\gamma$  (GW-347845), que modulou a expressão de 49 dos 9563 genes avaliados. Um aumento substancial do número de genes afetados (284) foi observado quando ilhotas hiperexpressando o PPAR $\gamma$  foram tratadas com GW-347845.

O presente estudo, em que 101 de 13.059 genes foram modulados em 5,6 mM de glicose, sugere, como o estudo de Parton, que a expressão gênica em ilhotas não é muito sensível à TZD em concentrações fisiológicas de glicose e com expressão fisiológica de PPAR- $\gamma$ . Outra semelhança entre os estudos foi a não modulação dos genes *Ucp2* e Glucoquinase, reconhecidos por terem papel importante no metabolismo da ilhota e previamente apontados como genes-alvo do PPAR- $\gamma$ <sup>115,116</sup>.

Tem sido proposto que os eventuais benefícios das TZD nas células  $\beta$  poderiam estar relacionados à diminuição de lipotoxicidade <sup>34</sup>. A ativação do PPAR<sub> $\gamma$ </sub> aumentou a expressão de genes que favorecem a eliminação de ácidos graxos <sup>115</sup>, o que, de certa forma, é inusitado já que a ativação de PPAR- $\gamma$  por TZD favorece a

lipogênese em outros tecidos como o tecido adiposo<sup>29</sup>. Esse efeito não foi observado no presente estudo, no qual as ilhotas apresentavam apenas expressão fisiológica, endógena, do PPAR-γ.

O papel do acúmulo de lípides como um dos mecanismos de disfunção da célula  $\beta$  no DM tipo 2 já é bastante conhecido, entretanto Cnop e cols. mostraram uma relação inversa entre a toxicidade induzida por AGL e o conteúdo celular de triglicérides em células  $\beta$  de ratos. Os autores especulam que a habilidade da célula  $\beta$  de produzir e acumular triglicérides no citoplasma pode servir como um mecanismo citoprotetor contra apoptose induzida por AGL prevenindo aumento intracelular de radicais graxos tóxicos<sup>117</sup>. Por outro lado diversos estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que na presença de níveis elevados de glicose, a exposição a níveis patológicos de AGL leva a acúmulo intracelular de triglicérides nas células  $\beta$  e prejuízo na secreção de insulina, na expressão do gene da insulina e na viabilidade celular, realçando o papel do SREBF1 e da UCP 2<sup>118,119</sup>.

Neste estudo, o tratamento das ilhotas com Pioglitazona modulou efetivamente genes relacionados ao metabolismo lipídico em ambas as concentrações de glicose, aumentando a expressão de alguns genes lipogênicos sabidamente alvos das TZD nos adipócitos. Como também houve aumento da expressão de alguns poucos genes relacionados ao catabolismo lipídico, não é possível estabelecer aqui de maneira inequívoca, se o balanço favorece vias de síntese ou de degradação de ácidos graxos.

A modulação de diversos genes relacionados à morte celular em ilhotas expostas simultaneamente à Pioglitazona e a concentrações suprafisiológicas de glicose gera desconfiança quanto ao efeito final das glitazonas sobre as ilhotas pancreáticas. O aumento da expressão de genes anti-oxidantes poderia sugerir um efeito benéfico da Pioglitazona sobre as ilhotas, mas o fato de não ter ocorrido em presença de concentrações fisiológicas de glicose, situação em que genes "deletérios" também não foram modulados, sugere que o aumento observado apenas em concentrações suprafisiológicas de glicose seja um marcador do sofrimento da célula  $\beta$  que estaria caminhando para a morte celular<sup>120</sup>.

Apesar das limitações inerentes à abordagem experimental utilizada neste estudo, 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 moduladas pela droga que se está estudando. Idealmente, esta ferramenta deve ser associada com outras abordagens experimentais e, no caso do presente estudo, experimentos complementares estão sendo realizados com o objetivo de se melhor caracterizar os efeitos diretos da Pioglitazona sobre as ilhotas pancreáticas. Conforme anteriormente comentado, os resultados obtidos nos experimentos que avaliaram o índice de apoptose de ilhotas pancreáticas expostas à Pioglitazona sugerem que em concentrações suprafisiológicas de glicose, esta droga esteja associada à maior apoptose celular.

Portanto, a regulação de genes relacionados a morte celular em ilhotas simultaneamente expostas a Pioglitazona e concentrações suprafisiológicas de glicose aumentam as dúvidas quanto ao benefício das TZD em condições de hiperglicemia. É possível que os benefícios indiretos *in vivo* da Pioglitazona nas ilhotas, secundário à melhora na resistência periférica à ação da insulina, compensem esses efeitos diretos potencialmente deletérios da droga. Ademais, além da glicotoxicidade, outras condições não avaliadas neste estudo têm papel importante na perda de massa de célula β observada nos pacientes com DM tipo 2, como a

lipotoxicidade e a deposição excessiva de polipeptídeo amilóide (IAPP) na ilhota. Enquanto alguns estudos sustentam o efeito anti-apoptótico de TZD em condições de lipotoxicidade e na presença de IAPP<sup>121,122</sup>, há também relato de aumento de apoptose, induzida por ácidos graxos, com a presença de TZD<sup>39</sup>.

Estes dados reforçam a necessidade de estudos prospectivos, controlados e de longo prazo, desenhados especificamente para se avaliar os efeitos das TZD na função da célula  $\beta$ , especialmente em situações em que a glicotoxicidade seja mais relevante que a lipotoxicidade, como em pacientes com diabetes auto-imune latente do adulto (LADA), para quem as TZD têm sido consideradas como uma potencial arma terapêutica possivelmente por causa de seus efeitos anti-inflamatórios e anti-auto-imunidade <sup>123,124,125</sup>.

## 6. Conclusões

1. Na concentração de 10  $\mu$ M, a Pioglitazona modulou a expressão gênica em ilhotas pancreáticas murídeas, especialmente naquelas cultivadas em meio de cultura com concentrações suprafisiológicas de glicose;

2. Em concentrações fsiológicas de glicose, a Pioglitazona modulou genes relacionados ao Metabolismo lipídico;

3. Em concentrações suprafisiológicas de glicose, a Pioglitazona modulou genes relacionados ao Metabolismo lipídico, Ciclo celular e Morte celular, o que sugere que nessa situação, a Pioglitazona apresente um efeito direto deletério sobre as ilhotas pancreáticas.
#### 6. Referências Bibliográficas

1 Nathan DM, Cagliero E. Diabetes Mellitus. In: Felig P, Frohman LA. Endocrinology and Metabolism (4 Ed). United States of America: McGraw-Hill Company 2001:827-926.

2 Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory disfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. J Clin Invest 1999;104:787-794.

3 Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature 2001;414:782–787.

4 Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. Diabetologia 2003;46:3-19.

5 DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993;329:977-986.

6 The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. N Engl J Med 2005;353:2643-2653.

7 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998;352:837–853.

8 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). Lancet 1998;352:854–865.

9 Festa A, Williams K, D'Agostino R Jr, Wagenknecht LE and Haffner SM. The Natural Course of β-Cell Function in Nondiabetic and Diabetic Individuals. Diabetes 2006;55:1114–1120.

10 Wajchenberg BL. β-Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical Treatment. Endocr Rev 2007;28(2):187–218.

11 Reaven GM. Banting Lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 1988;37:1595-1607.

12 De Fronzo RA. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. Diabetes 1988;37:667-87.

13 Zangeneh F, Kudva YC, Basu A. Insulin Sensitizers. Mayo Clin Proc 2003;78:471-79.

14 Inzucchi SE. Oral Antihyperglycemic Therapy for Type 2 Diabetes. JAMA 2002;287:360-372.

15 Cavaghan MK, Ehrmann DA, Byrne MM, Polonsky KS. Treatment with the oral antidiabetic agent troglitazone improves beta cell responses to glucose in subjects with impaired glucose tolerance. J Clin Invest 1997;100:530-7.

16 Prigeon RL, Kahn SE, Porte D. Effect of troglitazone on B cell Function, Insulin Sensitivity, and Glycemic Control in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. J Clin Endocrinol Metab 1988;83:819-23.

17 Roder ME, Porte DJ, Schwartz RS, Kahn SE. Disproportionately elevated proinsulin levels reflect the degree of impaired  $\beta$ -cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:604-608.

18 Ovalle F, Bell DSH. Clinical evidence of thiazolidinedone-induced improvement of pancreatic  $\beta$ -cell function in patients with type 2 diabetes mellitus. Diab Obes Metab 2002;4:56-59.

19 Ovalle F, Bell DSH. Effect of Rosiglitazone Versus Insulin on the Pancreatic  $\beta$ cell Function of Subjects With Type 2 Diabetes. Diabetes Care 2004;27:2585–2589.

20 Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, Ochoa C, Tan S, Berkowitz K, Hodis HN and Azen SP. Preservation of Pancreatic  $\beta$ -Cell Function and Prevention of Type 2 Diabetes by Pharmacological Treatment of Insulin Resistance in High-Risk Hispanic Women. Diabetes 2002;51:2796–2803.

21 Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr Rev 1999;20:649–688.

22 Wilson TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and metabolic disease. Annu Rev Biochem 2001;70:341–367.

23 Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15deoxy-112,14 prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR  $\gamma$ . Cell 1995;83:803–812.

24 Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR  $\beta$  and  $\gamma$  in the adult rat. Endocrinology 1995;137:354–366.

25 Garg A, Peshock RM, Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). J Clin Endocrinol Metab 1999;84:170–174.

26 Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean ME. Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 1999;22:288–293.

27 Hallakou S, Doare L, Foufelle F, Kergoat M, Guerre-Millo M, Berthault MF, Dugail I, Morin J, Auwerx J, Ferré P. Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. Diabetes 1997;46:1393–1399.

28 Mauriege P, Imbeault P, Langin D, Lacaille M, Alméras N, Tremblay A, Després JP. Regional and gender variations in adipose tissue lipolysis in response to weight loss. J Lipid Res 1999;40:1559–1571.

29 Gurnell M. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2005;19(4):501–523.

30 Dubois M, Pattou F, Kerr-Conte J, Gmyr V, Vandewalle B, Desreumaux P, Auwerx J, Schoonjans K, Lefebvre J. Expression of peroxisome proliferatoractivated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. Diabetologia 2000;43:1165–1169.

31 Kashyap S, Belfort R, Castaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarino L, DeFronzo R, Cusi K. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. Diabetes 2003;52:2461-2474.

32 Higa M, Zhou YT, Ravazzola M, Baetens D, Orci L, Unger RH. Troglitazone prevents mitochondrial alterations, beta cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:11513–11518.

33 Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T, Buckingham RE.  $\beta$  cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats: rosiglitazone prevents the rise in net cell death. Diabetes 2001;50:1021–1029.

34 Shimabukuro M, Zhou Y, Lee Y, and Unger RH. Troglitazone Lowers Islet Fat and Restores Beta Cell Function of Zucker Diabetic Fatty Rats. J Biol Chem 1998;273(6):3547–3550.

35 Ogawa J, Takahashi S, Fujiwara T, Fukushige J, Hosokawa T, Izumi T, Kurakata S, Horikoshi H. Troglitazone can prevent development of type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin in mice. Life Sci 1999;65:1287–1296.

36 Kim HI, Kim JW, Kim SH, Cha JY, Kim KS, Ahn YH. Identification and functional characterization of the peroxisomal proliferator response element in rat GLUT2 promoter. Diabetes 2000;49:1517–1524.

37 Cavaghan MK, Ehrmann DA, Byrne MM, Polonsky KS. Treatment with the oral antidiabetic agent troglitazone improves beta cell responses to glucose in subjects with impaired glucose tolerance. J Clin Invest 1997;100:530–537.

38 Othani KI, Shimizu H, Sato N and Mori M. Troglitazone (CS-045) inhibits  $\beta$ -cell proliferation rate following stimulation of insulin secretion in HIT-T15 cells. Endocrinology 1998;139:172-178.

39 Cnop M, Hannaert JC, Pipeleers DG. Troglitazone does not protect rat pancreatic  $\beta$  cells against free fatty acid-induced cytotoxicity. Biochem Pharmacol 2002;63:1281-1285.

40 Bollheimer LC, Troll S, Landauer H, Wrede CE, Schölmerich J and Buettner R. Insulin-sparing effects of troglitazone in rat pancreatic islets. J Mol Endocrinol 2003;31:61–69.

41 Nakamichi Y, Kikuta T, Ito E, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Ishida H and Nagamatsu S. PPAR- $\gamma$  overexpression suppresses glucose-induced proinsulin biosynthesis and insulin release synergistically with pioglitazone in MIN6 cells. Biochem Biophys Res Comm 2003;306:832–836.

42 Wolters GH, Van Suylichem PT, van Deijnen JH, van Schilfgaarde R. Factors influencing the isolation process of islets of Langerhans. Horm Metab Res Suppl 1990;25:20-26.

43 Haan BJ, Faas M, Spijker H, Willigen J, Haan A, and Vos P. Factors Influencing Isolation of Functional Pancreatic Rat Islets. Pancreas 2004;29:e15–e22.

44 Vierck JL, Byrne K, Priya S, Dodson MV. Ten Commandments for preventing contamination of primary cell cultures. Methods in Cell Science 2000;22:33-41.

45 http://www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio/bioterio\_apostilha.pdf. Acessado em 29 de maio de 2007.

46 Gotoh M, Maki T, Kiyoizumi T, Satomi S, Monaco AP. An improved method for isolation of mouse pancreatic islet. Transplantation 1985;40:437-38.

47 Nakano K, Suga S, Takeo T, Ogawa Y, Suda T, Kanno T and Waki M. Intracellular Ca2+ modulation of ATP-Sensitive K+ channel activity in acetylcholine-induced activation of rat pancreatic  $\beta$ -cells. Endocrinology 2002;143(2):569-576.

48 Cattan P, Berney T, Schena S, Molano D, Pileggi A, Vizzardelli C, Ricordi C and Inverardi L. Early assessment of apoptosis in isolated islets of Langerhans. Transplantation 2001;71:857–862.

49 Shiroi A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, Takahashi Y. Identification of Insulin-Producing Cells Derived from Embryonic Stem Cells by Zinc-Chelating Dithizone. Stem Cells 2002;20:284-329.

50 Sakamoto J, Kimura H, Moriyama S, Odaka, H, Momose Y, Sugiyama Y and Sawada H. Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. Biochem Biophys Res Commun 2000;278:704–711.

51 Blumentrath J, Neye H and Verspohl EJ. Effects of retinoids and thiazolidinediones on proliferation, insulin release, insulin mRNA, GLUT2 transporter protein and mRNA of INS-1 cells. Cell Biochem Funct 2001;19:159-169.

52 Allison DB, Cui X, Page GP and Sabripour Mahyar. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. Nature Reviews 2006;7:55-65.

53 Manduchi E, White P. Issues related to experimental design and normalization. RE: Mouse and Human PancChips. Available at:

http://www.cbil.upenn.edu/EPConDB/Downloads.shtml. Acessado em 31 de maio de 2007.

54 RNA Extraction - Functional Genomics Core Standard Methods.

http://www.cbil.upenn.edu/EPConDB/Downloads/Protocols/index.shtml. Acessado em 01 de junho de 2007.

55 Available at: http://www.med.upenn.edu/kaestnerlab/. Acessado em 01 de junho de 2007.

56 Kaestner KH, Lee CS, Scearce LM, Brestelli JE, Arsenlis A, Le PP, Lantz KA, Crabtree J, Pizarro A, Mazzarelli J, Pinney D, Fischer S, Manduchi E, Stoeckert CJ Jr, Gradwohl G, Clifton SW, Brown JR, Inoue H, Cras-Méneur C, Permutt MA. Transcriptional Program of the Endocrine Pancreas in Mice and Humans. Diabetes 2003;52:1604-1610.

57 RNA Quality Assessment Protocol.

http://www.cbil.upenn.edu/EPConDB/Downloads/Protocols/index.shtml. Acessado em 01 de junho de 2007.

58 http://www.nugeninc.com/pdfs/WT\_Ovation\_UserGuide.pdf. Acessado em 01 de junho de 2007.

59 Hardy OT, Hohmeier HE, Becker TC, Manduchi E, Doliba NM, Gupta RK, White P, Stoeckert CJ Jr, Matschinsky FM, Newgard CB, Kaestner KH. Functional genomics of the {beta}-cell: SCHAD regulates insulin secretion independent of K+ currents. Mol Endocrinol 2007;21(3):765-773.

#### 60

http://www.cbil.upenn.edu/EPConDB/Downloads/Protocols/FGC\_Indirect\_Labelling .pdf. Acessado em 01 de junho de 2007.

61 http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/. Acessado em 07 de junho de 2007.

62 Disponível em: http://www.bepress.com/sagmb/vol3/iss1/art3/. Acessado em 22 de junho de 2007.

63 Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98(9):5116-5121.

64 Manduchi E, Grant GR, He H, Liu J, Mailman MD, Pizarro AD, Whetzel PL, Stoeckert CJ Jr. RAD and the RAD Study-Annotator: an approach to collection, organization and exchange of all relevant information for high-throughput gene expression studies. Bioinformatics 2004;20(4):452-459.

65 Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(16):9440-9445.

66 Storey J.D. A direct approach to false discovery rates. J Roy Stat Soc Ser B 2002;64:479-498.

67 Livak DJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25:402-408.

68 Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L. Relative expression software tool (REST<sup>©</sup>) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research 2002;30(9):e36.

69 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. Nucleic Acids Research 2001;29(9):2002-2007.

70 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 2002;3(7): research0034.1–research0034.11.

71 Kakinoki K, Fujino Y, Suzuki Y, Li S, Tanioka Y, Sakai T, Kuroda Y. Superiority of the Two-Layer Method Before Islet Isolation Confirmed by In Vivo Viability Assessment. Transplantation 2005;79(11):1516-1521.

72 Field J, Farney A, Sutherland DER. Improved Islet isolation from rat pancreas using 35% bovine serum albumin in combination with dextran gradient separation. Transplantation 1996;61(10):1554-1556.

73 Kinasiewicz A, Juszczak M, Pachecka J, Fiedor P. Pancreatic islets isolation using different Protocols with in situ and intraductal Collagenase injection. Physiol Res 2004;53:327-333.

74 Fare TL, Coffey EM, Dai H, He YD, Kessler DA, Kilian KA, Koch JE, LeProust E, Marton MJ, Meyer MR, Stoughton RB, Tokiwa GY, Wang Y. Effects of Atmosferic Ozone on Microarray Data Quality. Anal Chem 2003;75:4672-4675.

75 http://www.genomics.princeton.edu/dunham/ozone.html. Acessado em 11 de junho de 2007.

76 Improving Microarray Results by Preventing Ozone-Mediated Fluorescent Signal Degradation. Agilent Technologies.

http://www.chem.agilent.com/scripts/LiteraturePDF.asp?iWHID=37397.

77 Leibiger B, Wahlander K, Berggren PO, Leibiger IB. Glucose-stimulated insulin biosynthesis depends on insulin-stimulated insulin gene transcription. J Biol Chem 2000;275:30153-30156.

78 Ling Z, Kiekens R, Mahler T, Schuit FC, Pipeleers-Marichal M, Sener A, Kloppel G, Malaisse WJ, Pipeleers DG. Effects of cronically elevated glucose levels on the functional properties of rat pancreatic beta cells. Diabetes 1996;45:1774-1782.

79 Mellado-Gil JM, Aguilar-Diosdado M. High glucose potentiates cytokine- and streptozotocin-induced apoptosis of rat islet cells: effect on apoptosis-related genes. J Endocrinol 2004;183(1):155-162.

80 Flamez D, Berger V, Kruhøffer M, Orntoft T, Pipeleers D, Schuit FC. Critical Role for Cataplerosis via Citrate in Glucose-Regulated Insulin Release. Diabetes 2002;51:2018–24.

81 Roduit R, Morin J, Masse F, Segall L, Roche E, Newgard CB, Assimacopoulos-Jeannet F, Prentki M. Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene in the pancreatic beta-cell. J Biol Chem 2000;275:35799–35806. 82 Li LX, Skorpen F, Egeberg K, Jørgensen IH, Grill V. Induction of uncoupling protein 2 mRNA in beta-cells is stimulated by oxidation of fatty acids but not by nutrient oversupply. Endocrinology 2002;143(4):1371-1377.

83 Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST, Lowell BB. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic b cell dysfunction. J Clin Invest 2003;112:1831–1842.

84 Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. Prog Lipid Res 2004;43(2):91-104.

85 Tabor DE, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA. Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. J Biol Chem 1999;274(29):20603-20610.

86 Toyama T, Kudo N, Hibino Y, Mitsumoto A, Nishikawa M, Kawashima Y. Effects of Pioglitazone on Stearoyl-CoA Desaturase in Obese Zucker fa/fa Rats. J Pharmacol Sci 2007;104(2):137-145.

87 Risérus U, Tan GD, Fielding BA, Neville MJ, Currie J, Savage DB, Chatterjee VK, Frayn KN, O'Rahilly S, Karpe F. Rosiglitazone increases indexes of stearoyl-CoA desaturase activity in humans: link to insulin sensitization and the role of dominant-negative mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Diabetes 2005;54(5):1379-1384.

88 Flowers JB, Rabaglia ME, Schueler KL, Flowers MT, Lan H, Keller MP, Ntambi JM, Attie AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 improves insulin sensitivity in lean mice but worsens diabetes in leptin-deficient obese mice. Diabetes 2007;56(5):1228-1239.

89 Takahashi A, Motomura K, Kato T, Yoshikawa T, Nakagawa Y, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Toyoshima H, Yamada N, Shimano H. Transgenic Mice Overexpressing Nuclear SREBP-1c in Pancreatic β-Cells. Diabetes 2005;54:492–499.

90 Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D. Crucial Step in Cholesterol Homeostasis: Sterols Promote Binding of SCAP to INSIG-1, a Membrane Protein that Facilitates Retention of SREBPs in ER. Cell 2002;110:489–500.

91 Takaishi K, Duplomb L, Wang MY, Li J, Unger RH. Hepatic insig-1 or -2 overexpression reduces lipogenesis in obese Zucker diabetic fatty rats and in fasted/refed normal rats. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101(18):7106-7111.

92 Spiegelman BM and Flier JS. Adipogenesis and Obesity: Rounding Out the Big Picture. Cell 1996;87:377–389.

93 Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. Endocrinology 2000;141(9):3388-3396.

94 Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, Heras M, Masana L. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. Atherosclerosis 2007;195(1):e150-e158

95 Qiu L, List EO, Kopchick JJ. Differentially expressed proteins in the pancreas of diet-induced diabetic mice. Mol Cell Proteomics 2005;4(9):1311-1318.

96 Staels B and Auwerx J. Regulation of apoA-I gene expression by fibrates. Atherosclerosis 1998;137(suppl.): S19–S23.

97 Peyot ML, Nolan CJ, Soni K, Joly E, Lussier R, Corkey BE, Wang SP, Mitchell GA, Prentki M. Hormone-Sensitive Lipase has a role in lipidsignaling for insulin secretion but is nonessential for the incretin action of Glucagon-Like Peptide 1. Diabetes 2004;53:1733–1742.

98 Shen WJ, Liang Y, Wang J, Harada K, Patel S, Michie SA, Osuga J, Ishibashi S, Kraemer FB. Regulation of hormone-sensitive lipase in islets. Diab Res Clin Pract 2007;75:14–26.

99 Roduit R, Masiello P, Wang SP, Li H, Mitchell GA, Prentki M. A role for hormone-sensitive lipase in glucose-stimulated insulin secretion: a study in hormone-sensitive lipase-deficient mice. Diabetes 2001;50:1970–1975.

100 Schuit F, Flamez D, De Vos A, and Pipeleers D. Glucose-Regulated Gene Expression Maintaining the Glucose-Responsive State of  $\beta$ -Cells. Diabetes 2002;51(Suppl. 3):S326–S332.

101 McDermott MF. TNF and TNFR biology in health and disease. Cell Mol Biol Res 2001;47(4):619-635.

102 Kharroubi I, Ladrière L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappa B and endoplasmic reticulum stress. Endocrinology 2004;145(11):5087-5096.

103 Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. Mol Cell 2000;6(1):41-51.

104 Dansen TB, Whitfield J, Rostker F, Brown-Swigart L and Evan GI. Specific Requirement for Bax, Not Bak, in Myc-induced Apoptosis and Tumor Suppression in Vivo. JBC 2001;281(16):10890-10895.

105 Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. Apoptosis 2003;8(3):237-249.

106 Roudkenar MH, Kuwahara Y, Baba T, Roushandeh AM, Ebishima S, Abe S, Ohkubo Y, Fukumoto M. Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions. J Radiat Res 2007;48(1):39-44.

107 Gupta RA, Brockman JA, Sarraf P, Wilson TM, DuBois RN. Target Genes of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  in Colorectal Cancer Cells. JBC 2001;276(32):29681–29687.

108 Li YX, Li G, Dong WP, Lu DR, Tan JM. Protection of human islets from induction of apoptosis and improved islet function with HO-1 gene transduction. Chin Med J 2006;119(19):1639-1645.

109 Eizirik DL, Sandler S, Palmer JP. Repair of pancreatic β-cells: a relevant phenomenon in early IDDM? Diabetes 1993;42:1383–1389.

110 Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, Vasanji Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS, Verchere CB, Hayden MR. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. Nat Med 2007;13(3):340-347.

111 Tian JY, Li G, Gu YY, Zhang HL, Zhou WZ, Wang X, Zhu HD, Luo TH, Luo M. Role and mechanism of rosiglitazone on the impairment of insulin secretion induced by free fatty acids on isolated rat islets. Chin Med J 2006;119(7):574-580.

112 Matsui J, Terauchi Y, Kubota N, Takamoto I, Eto K, Yamashita T, Komeda K, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Noda M, Kadowaki T. Pioglitazone reduces islet triglyceride content and restores impaired glucose-stimulated insulin secretion in heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma- deficient mice on a high-fat diet. Diabetes 2004;53:2844–2854.

113 Saitoh Y, Chun-Ping C, Noma K, Ueno H, Mizuta M, Nakazato M. Pioglitazone attenuates fatty acid-induced oxidative stress and apoptosis in pancreatic beta-cells. Diabetes Obes Metab 2007; Jun 26: [Epub ahead of print].

114 Parton LE, Diraison F, Neill SE, Ghosh SK, Rubino MA, Bisi JE, Briscoe CP, Rutter GA. Impact of PPAR gamma overexpression and activation on pancreatic islet gene expression profile analyzed with oligonucleotide microarrays. Am J Physiol Endocrinol Metab 2004;287(3):E390-E404.

115 Kim HI, Cha JY, Kim SY, Kim JW, Roh KJ, Seong JK, Lee NT, Choi KY, Kim KS, Ahn YH. Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  upregulates Glucokinase gene expression in  $\beta$ -cells. Diabetes 2002;51:676-685.

116 Tian JY, Li G, Gu YY, Zhang HL, Zhou WZ, Wang X, Zhu HD, Luo TH, Luo M. Role and mechanism of rosiglitazone on the impairment of insulin secretion induced by free fatty acids on isolated rat islets. Chin Med J 2006;119(7):574-580.

117 Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. Diabetes 2001;50(8):1771-77.

118 McGarry JD, Dobbins RL. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. Diabetologia 1999;42:128–38.

119 Poitout V. β-Cell Lipotoxicity: Burning Fat into Heat? Endocrinology 2004;145(8):3563–65.

120 Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y, Leeman R, Kutlu B, Kruhoffer M, Orntoft T, Eizirik DL. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic  $\beta$  cells. J Biol Chem 2001;276:48879–86.

121 Lin CY, Gurlo T, Haataja L, Hsueh WA and Butler PC. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  by Rosiglitazone protects human islet cells against human islet amyloid polypeptide toxicity by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. J Clin Endocrinol Metab 2005;90(12):6678–6686.

122 Pickavance LC, Widdowson PS, Foste JR, Williams G, Wilding JPH. Chronic treatment with the thiazolidinedione, MCC-555, is associated with reductions in nitric oxide synthase activity and  $\beta$ -cell apoptosis in the pancreas of the Zucker Diabetic Fatty rat. Int J Exp Pathol 2003;84:83-89.

123 Pozzilli P, Di Mario U. (2001) Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of adults): definition, characterization and potential prevention. Diabetes Care 24:1460–1467.

124 Beales PE, Pozzilli P. (2002) Thiazolidinediones for the prevention of diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse: implications for human type 1 diabetes. Diab Metab Res Rev 18:114–117. 125 Zhou Z, Li X, Huang G et al. (2005) Rosiglitazone combined with insulin preserves islet beta cell function in adult-onset latent autoimmune diabetes (LADA).Diabetes Metab Res Rev 21:203–208.

# 7. Anexos

#### Anexo A

Tabela 10. Genes modulados para baixo no experimento contendo 5,6 mM de glicose no meio de cultura.

| ELEMENT_ID | GENE_ID             | Nome               | FC    | FDR  |
|------------|---------------------|--------------------|-------|------|
| 14189752   | 23986               | Peci               | -1,82 | 0    |
| 14189180   | 26554               | Cul3               | -1,71 | 0    |
| 14181072   | 114228              | Prss1              | -1,64 | 0    |
| 14179237   | 114228              | Prss1              | -1,58 | 10,9 |
| 14182613   | 19692               | Reg1               | -1,53 | 10,9 |
| 14187176   |                     | IMAGE=6437289      | -1,53 | 18,0 |
| 14185341   |                     | IMAGE=6437085      | -1,52 | 7,1  |
| 14187177   | 70661               | BC033915           | -1,49 | 10,9 |
| 14178233   | 52551               | Sgta               | -1,49 | 10,9 |
| 14182892   |                     | IMAGE=6437108      | -1,47 | 0    |
| 14190788   | 69060               | Pnlip              | -1,44 | 15,4 |
| 14178851   | 73652               | 2210408F21Rik      | -1,44 | 0    |
| 14184120   | 19934               | Rpl22              | -1,42 | 15,4 |
| 14185909   | 69060               | Pnlip              | -1,41 | 18,0 |
| 14177996   |                     | IMAGE=6437106      | -1,36 | 0    |
| 14189033   | 232023              | AW146242           | -1,35 | 10,9 |
| 14180504   | 67958               | 2610101N10Rik      | -1,34 | 0    |
| 14180186   | 20616               | Snap91             | -1,33 | 0    |
| 14187595   | 11973               | Atp6v1e1           | -1,33 | 10,9 |
| 14179881   | 13039               | Ctsl               | -1,32 | 10,9 |
| 14185137   | 67160               | Eef1g              | -1,31 | 15,4 |
| 14179428   | 11852               | Rhob               | -1,31 | 15,4 |
| 14183176   | 212123              | BC057552           | -1,31 | 15,4 |
| 14181585   | 17724; 17725; 22410 | Rnr1; Rnr2; Wnt10b | -1,31 | 15,4 |
| 14178981   | 29811               | Ndrg2              | -1,29 | 0    |
| 14182949   | 68603               | Pmvk               | -1,29 | 0    |

#### Anexo A

Tabela 10. Genes modulados para baixo no experimento contendo 5,6 mM de glicose no meio de cultura. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID        | Nome                   | FC    | FDR  |
|------------|----------------|------------------------|-------|------|
| 14178908   | 67936          | Wdr55                  | -1,29 | 0    |
| 14181952   | 16569          | Kif3b                  | -1,29 | 10,9 |
| 14182580   | 12449          | Ccnf                   | -1,29 | 0    |
| 14182163   | 15381          | Hnrpc                  | -1,29 | 15,4 |
| 14180039   | 55980          | Impa1                  | -1,28 | 18,0 |
| 14179293   |                | IMAGE=6435546          | -1,28 | 10,9 |
| 14179692   | 21374          | Тbр                    | -1,28 | 10,9 |
| 14189508   | 20163          | Rsu1                   | -1,27 | 15,4 |
| 14179487   | 57810          | Cdon                   | -1,27 | 15,4 |
| 14186039   |                | IMAGE=5938998          | -1,27 | 18,0 |
| 14181990   | 114741; 382090 | Supt16h; 4922501C03Rik | -1,27 | 10,9 |
| 14181303   | 382066         | Prdm10                 | -1,26 | 15,4 |
| 14182689   |                | IMAGE=6435769          | -1,26 | 10,9 |
| 14187458   | 269224         | Pask                   | -1,26 | 15,4 |
| 14178000   | 328329         | Mast4                  | -1,26 | 0    |
| 14183557   | 27528          | D0H4S114               | -1,26 | 10,9 |
| 14186564   | 76703          | Cpb1                   | -1,26 | 18,0 |
| 14178371   |                | IMAGE=6435636          | -1,25 | 10,9 |
| 14179077   | 20733          | Spint2                 | -1,25 | 18,0 |
| 14179806   | 70693          | Gpr125                 | -1,24 | 15,4 |
| 14185118   | 320995         | Rfxdc1                 | -1,24 | 15,4 |
| 14179544   | 73847          | 5430432M24Rik          | -1,23 | 15,4 |
| 14187585   | 16597          | Klf12                  | -1,23 | 15,4 |
| 14181357   | 110094         | Phka2                  | -1,23 | 15,4 |
| 14178909   | 63856          | Tbn                    | -1,22 | 10,9 |
| 14180166   |                | IMAGE=6433254          | -1,20 | 18,0 |

## Anexo B

Tabela 11. Genes modulados para cima no experimento contendo 5,6 mM de glicose no meio de cultura.

| ELEMENT_ID | GENE_ID      | NAME          | FC   | FDR  |
|------------|--------------|---------------|------|------|
| 14182773   | 11770; 64697 | Fabp4; Keg1   | 1,58 | 7,1  |
| 14182239   | 216150       | Cdc34         | 1,54 | 0    |
| 14188181   | 19123; 55982 | Proc; Paxip1  | 1,50 | 7,1  |
| 14178190   | 20249        | Scd1          | 1,48 | 14,6 |
| 14180947   | 231070       | Insig1        | 1,41 | 14,6 |
| 14181627   | 20250        | Scd2          | 1,41 | 14,6 |
| 14190818   | 232875       | LOC232875     | 1,36 | 18   |
| 14183523   |              | IMAGE=6433664 | 1,34 | 7,1  |
| 14179854   |              | IMAGE=6433776 | 1,34 | 18   |
| 14188094   | 68626        | Elac2         | 1,34 | 18   |
| 14183346   | 66234        | Sc4mol        | 1,32 | 18   |
| 14182325   | 18536        | Pcm1          | 1,28 | 14,6 |
| 14183468   | 72119        | Трх2          | 1,28 | 14,6 |
| 14178627   | 238722       | Zfp72         | 1,28 | 7,1  |
| 14178728   | 70394        | Kptn          | 1,28 | 14,6 |
| 14191786   |              | IMAGE=6433559 | 1,28 | 14,6 |
| 14191445   | 11770        | Fabp4         | 1,27 | 14,6 |
| 14184417   | 12321        | Calu          | 1,27 | 14,6 |
| 14186082   | 74199        | Vit           | 1,27 | 14,6 |
| 14181624   | 19692        | Reg1          | 1,27 | 14,6 |
| 14184699   | 223922       | Atf7          | 1,27 | 14,6 |
| 14179821   | 26456        | Sema4g        | 1,26 | 14,6 |
| 14181994   |              | IMAGE=6433555 | 1,26 | 14,6 |
| 14186889   |              | IMAGE=6433581 | 1,26 | 14,6 |
| 14183151   | 107503       | Atf5          | 1,25 | 14,6 |
| 14184738   | 330836       | SIc7a6        | 1,25 | 18   |

## Anexo B

Tabela 11. Genes modulados para cima no experimento contendo 5,6 mM de glicose no meio de cultura. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID       | NAME          | FC   | FDR  |
|------------|---------------|---------------|------|------|
| 14179890   | 66771         | 4933439F18Rik | 1,25 | 14,6 |
| 14191719   | 80750         | BC004022      | 1,25 | 18   |
| 14181733   | 217351        | Tnrc6c        | 1,24 | 18   |
| 14180144   | 67444         | llkap         | 1,24 | 14,6 |
| 14178915   | 228807        | Zfp341        | 1,24 | 18   |
| 14185113   | 320480        | 6430537K16Rik | 1,24 | 18   |
| 14180723   | 16551         | Kif11         | 1,24 | 18   |
| 14182511   | 107227        | D930010J01Rik | 1,24 | 14,6 |
| 14189081   | 80281         | Cttnbp2nl     | 1,24 | 18   |
| 14184240   | 170571        | Cntnap4       | 1,23 | 18   |
| 14183101   | 80885         | Gpr109a       | 1,23 | 14,6 |
| 14187240   | 21677         | Tead2         | 1,22 | 18   |
| 14183809   | 71242         | 5133400G04Rik | 1,22 | 18   |
| 14184106   | 13000; 381903 | Csnk2a2; Alg8 | 1,22 | 18   |
| 14187332   | 68572         | lct1          | 1,22 | 18   |
| 14184094   | 20637         | Snrp70        | 1,21 | 14,6 |
| 14191441   | 67153         | Rnaseh2b      | 1,21 | 18   |
| 14178020   | 106769        | AW061004      | 1,21 | 18   |
| 14189589   | 17308         | Mgat1         | 1,21 | 18   |
| 14186312   | 230737        | Gnl2          | 1,21 | 18   |
| 14187502   | 67178         | Zmat5         | 1,21 | 18   |
| 14185316   | 218952        | Plekhc1       | 1,21 | 18   |
| 14183853   | 109778        | Blvra         | 1,20 | 18   |

Tabela 12. Genes modulados para baixo no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente.

| ELEMENT_ | ID GENE_ID | NAME          | FC     | FDR   |
|----------|------------|---------------|--------|-------|
| 14189752 | 23986      | Peci          | -1,734 | 0     |
| 14188162 | 347722     | Centg2        | -1,675 | 16,23 |
| 14186665 | 244141     | Nars2         | -1,597 | 19,38 |
| 14186564 | 76703      | Cpb1          | -1,558 | 10,52 |
| 14178066 | 192167     | NIgn1         | -1,544 | 16,23 |
| 14189474 | 14682      | Gnaq          | -1,542 | 11,29 |
| 14178851 | 73652      | 2210408F21Rik | -1,499 | 0     |
| 14189180 | 26554      | Cul3          | -1,497 | 1,48  |
| 14182892 |            | IMAGE=6437108 | -1,489 | 0     |
| 14192248 | 19983      | Rpl5          | -1,479 | 10,52 |
| 14180541 | 67121      | Mastl         | -1,472 | 17,44 |
| 14191909 | 613258     | A730017L22Rik | -1,469 | 19,38 |
| 14181952 | 16569      | Kif3b         | -1,458 | 1,48  |
| 14189870 | 216963     | Git1          | -1,451 | 0     |
| 14184202 |            | IMAGE=5939862 | -1,45  | 5,02  |
| 14185168 | 54609      | UbqIn2        | -1,45  | 2,3   |
| 14180450 | 70984      | 4931406C07Rik | -1,444 | 2,3   |
| 14188163 |            | IMAGE=6435640 | -1,441 | 2,3   |
| 14178415 | 64602      | Ireb2         | -1,433 | 16,23 |
| 14186045 | 108123     | Napg          | -1,432 | 10,52 |
| 14188127 | 20928      | Abcc9         | -1,431 | 6,47  |
| 14188486 | 211378     | 6720489N17Rik | -1,425 | 8,18  |
| 14188199 | 229534     | Pbxip1        | -1,423 | 16,23 |
| 14178869 | 69207      | Sfrs11        | -1,421 | 3,96  |
| 14188604 | 59025      | Usp14         | -1,42  | 5,02  |
| 14187585 | 16597      | Klf12         | -1,42  | 1,48  |
| 14183538 | 17184      | Matr3         | -1,42  | 16,23 |

Tabela 12. Genes modulados para baixo no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID | NAME          | FC     | FDR   |
|------------|---------|---------------|--------|-------|
| 14190682   | 21872   | Tjp1          | -1,414 | 2,62  |
| 14180214   | 319957  | A830061P03Rik | -1,413 | 13,32 |
| 14178311   | 78521   | B230219D22Rik | -1,411 | 13,32 |
| 14188264   | 19317   | Qk            | -1,411 | 2,3   |
| 14180618   | 11538   | Adnp          | -1,408 | 3,96  |
| 14184713   | 22381   | Wbp5          | -1,406 | 11,29 |
| 14178331   |         | IMAGE=6430311 | -1,405 | 0     |
| 14190019   | 66127   | 1110014L15Rik | -1,404 | 19,38 |
| 14191662   | 67581   | Tbc1d23       | -1,404 | 10,52 |
| 14182104   | 72008   | Zfyve19       | -1,404 | 17,44 |
| 14186174   | 22763   | Zfr           | -1,403 | 19,38 |
| 14190324   | 16432   | ltm2b         | -1,403 | 2,62  |
| 14180267   | 15251   | Hif1a         | -1,402 | 0     |
| 14181788   | 56811   | Dkk2          | -1,401 | 13,32 |
| 14177996   |         | IMAGE=6437106 | -1,397 | 0     |
| 14191348   | 19122   | Prnp          | -1,396 | 2,62  |
| 14186915   | 11487   | Adam10        | -1,395 | 13,32 |
| 14178800   | 17184   | Matr3         | -1,393 | 16,23 |
| 14178932   | 211378  | 6720489N17Rik | -1,389 | 2,3   |
| 14181303   | 382066  | Prdm10        | -1,389 | 2,3   |
| 14192573   | 244579  | Tnrc9         | -1,388 | 9,34  |
| 14179717   | 66142   | Cox7b         | -1,388 | 14,92 |
| 14182144   | 101685  | Spty2d1       | -1,386 | 6,47  |
| 14189500   | 12540   | Cdc42         | -1,383 | 9,34  |
| 14182580   | 12449   | Ccnf          | -1,382 | 0     |
| 14182702   | 66142   | Cox7b         | -1,381 | 16,23 |
| 14185278   | 382423  | 4921506J03Rik | -1,38  | 1,48  |
| 14190981   | 15114   | Hap1          | -1,379 | 6,47  |
| 14189033   | 232023  | AW146242      | -1,378 | 0     |

Tabela 12. Genes modulados para baixo no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

|            |         |               | =0     |       |
|------------|---------|---------------|--------|-------|
| ELEMENT_ID | GENE_ID | NAME          | FC     | FDR   |
| 14179099   | 54401   | Ywhab         | -1,378 | 8,18  |
| 14192261   | 12988   | Csk           | -1,378 | 8,18  |
| 14192391   | 19328   | Rab12         | -1,376 | 11,29 |
| 14178475   |         | IMAGE=634849  | -1,376 | 17,44 |
| 14186375   | 22240   | Dpysl3        | -1,375 | 10,52 |
| 14188488   | 66892   | Eif4e3        | -1,375 | 14,92 |
| 14184361   | 76936   | Hnrpm         | -1,373 | 13,32 |
| 14183444   | 107869  | Cth           | -1,372 | 13,32 |
| 14189508   | 20163   | Rsu1          | -1,368 | 3,96  |
| 14185538   | 12916   | Crem          | -1,368 | 5,02  |
| 14178371   |         | IMAGE=6435636 | -1,368 | 0     |
| 14178476   | 18645   | Pfn2          | -1,365 | 13,32 |
| 14184481   | 235956  | BC012278      | -1,362 | 11,29 |
| 14192418   | 18674   | SIc25a3       | -1,36  | 1,48  |
| 14184061   | 14190   | Fgl2          | -1,36  | 14,92 |
| 14191629   | 218693  | Paip1         | -1,359 | 1,48  |
| 14186912   | 18148   | Npm1          | -1,358 | 16,23 |
| 14184503   | 239985  | Arid1b        | -1,358 | 2,3   |
| 14187381   | 230163  | Aldob         | -1,358 | 16,23 |
| 14182468   | 14066   | F3            | -1,357 | 10,52 |
| 14184956   | 240396  | Rkhd2         | -1,356 | 8,18  |
| 14180186   | 20616   | Snap91        | -1,355 | 0     |
| 14180787   | 59025   | Usp14         | -1,354 | 11,29 |
| 14180313   | 329877  | Dennd4c       | -1,354 | 11,29 |
| 14185045   | 66967   | Edem3         | -1,353 | 14,92 |
| 14192561   | 109624  | Cald1         | -1,353 | 14,92 |
| 14183170   | 58800   | Trpm7         | -1,353 | 16,23 |
| 14189407   | 19684   | Rdx           | -1,353 | 13,32 |

(continua)

Tabela 12. Genes modulados para baixo no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID       | NAME                | FC     | FDR   |
|------------|---------------|---------------------|--------|-------|
| 14187756   | 71878         | 2310007D09Rik       | -1,352 | 0     |
| 14186632   | 72701         | Zfp618              | -1,352 | 5,02  |
| 14185076   | 105853        | Mal2                | -1,349 | 8,18  |
| 14190421   | 54375         | Azin1               | -1,349 | 8,18  |
| 14187318   | 13136         | Cd55                | -1,348 | 16,23 |
| 14190739   | 15312         | Hmgn1               | -1,348 | 9,34  |
| 14192020   | 66142         | Cox7b               | -1,346 | 19,38 |
| 14191319   | 15078         | H3f3a               | -1,346 | 11,29 |
| 14180112   | 17191         | Mbd2                | -1,345 | 11,29 |
| 14187458   | 269224        | Pask                | -1,345 | 8,18  |
| 14192277   | 66922         | Rras2               | -1,344 | 6,47  |
| 14189431   | 21912         | Tspan7              | -1,344 | 14,92 |
| 14188778   | 19046         | Ppp1cb              | -1,342 | 14,92 |
| 14182985   | 242960        | Fbxl5               | -1,342 | 2,62  |
| 14186065   | 98758         | Hnrpf               | -1,342 | 2,3   |
| 14190711   | 14376         | Ganab               | -1,339 | 9,34  |
| 14187922   | 67864         | Yipf4               | -1,338 | 3,96  |
| 14184507   | 22110         | Tspyl1              | -1,338 | 1,48  |
| 14189156   | 18148; 384382 | Npm1; A430108E01Rik | -1,336 | 11,29 |
| 14180565   | 235072        | 39332               | -1,336 | 16,23 |
| 14180633   | 223455        | 39147               | -1,336 | 13,32 |
| 14182254   | 80750         | BC004022            | -1,336 | 2,3   |
| 14180392   | 56372         | 1110004F10Rik       | -1,335 | 6,47  |
| 14189867   | 110147        | Ehmt2               | -1,333 | 11,29 |
| 14179881   | 13039         | Ctsl                | -1,333 | 0     |
| 14185874   | 230163        | Aldob               | -1,332 | 17,44 |
| 14189829   | 59025         | Usp14               | -1,331 | 9,34  |
| 14189610   | 15529         | Sdc2                | -1,331 | 0     |

Tabela 12. Genes modulados para baixo no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID | NAME          | FC     | FDR   |
|------------|---------|---------------|--------|-------|
| 14180087   | 26885   | Casp8ap2      | -1,33  | 8,18  |
| 14186457   | 54401   | Ywhab         | -1,327 | 11,29 |
| 14181105   | 67299   | Dock7         | -1,327 | 2,3   |
| 14179990   | 12739   | Cldn3         | -1,325 | 0     |
| 14185137   | 67160   | Eef1g         | -1,325 | 0     |
| 14179715   | 20384   | Sfrs5         | -1,325 | 10,52 |
| 14191192   | 12361   | Cask          | -1,324 | 14,92 |
| 14186371   | 69227   | 2810407C02Rik | -1,322 | 17,44 |
| 14187584   | 22589   | Atrx          | -1,322 | 1,48  |
| 14189669   | 218210  | Nup153        | -1,322 | 2,62  |
| 14182851   | 75412   | 2610021A01Rik | -1,322 | 9,34  |
| 14184972   | 216190  | Dip3b         | -1,321 | 10,52 |
| 14189029   | 20823   | Ssb           | -1,32  | 16,23 |
| 14190080   | 380856  | AA987161      | -1,32  | 19,38 |
| 14189924   | 269614  | Pank4         | -1,32  | 5,02  |
| 14190712   | 226442  | Zfp281        | -1,319 | 3,96  |
| 14186527   | 243529  | H1fx          | -1,319 | 0     |
| 14177963   | 19088   | Prkar2b       | -1,318 | 8,18  |
| 14191589   | 56200   | Ddx21         | -1,318 | 9,34  |
| 14178723   | 11538   | Adnp          | -1,317 | 6,47  |
| 14190035   | 213541  | Ythdf2        | -1,317 | 3,96  |
| 14190795   | 12068   | Bet1          | -1,316 | 10,52 |
| 14179207   | 230770  | Tmem39b       | -1,315 | 19,38 |
| 14185008   | 18552   | Pcsk5         | -1,313 | 2,3   |
| 14187387   | 108767  | Pnrc1         | -1,312 | 5,02  |
| 14185505   | 13669   | Eif3s10       | -1,312 | 19,38 |
| 14192159   | 101476  | Plekha1       | -1,311 | 7,26  |
| 14183255   | 70174   | 2210409B22Rik | -1,311 | 14,92 |

Tabela 12. Genes modulados para baixo no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID      | NAME          | FC     | FDR   |
|------------|--------------|---------------|--------|-------|
| 14190587   | 24128        | Xrn2          | -1,311 | 9,34  |
| 14192416   | 66440        | Cdc26         | -1,311 | 11,29 |
| 14178908   | 67936        | Wdr55         | -1,311 | 0     |
| 14178756   | 21807        | Tsc22d1       | -1,31  | 2,3   |
| 14183925   | 71795        | Pitpnc1       | -1,31  | 14,92 |
| 14192462   | 14955        | H19           | -1,31  | 2,62  |
| 14190883   | 192287       | SIc25a36      | -1,309 | 2,3   |
| 14179072   | 26554        | Cul3          | -1,309 | 19,38 |
| 14180043   | 20742        | Spnb2         | -1,308 | 8,18  |
| 14182012   | 20430        | Cyfip1        | -1,308 | 6,47  |
| 14188356   | 109054       | Pfdn4         | -1,307 | 11,29 |
| 14182515   | 18983        | Cnot7         | -1,306 | 16,23 |
| 14183557   | 27528        | D0H4S114      | -1,306 | 0     |
| 14184978   | 231464       | Cnot6l        | -1,306 | 14,92 |
| 14181550   | 27061; 54375 | Bcap31; Azin1 | -1,304 | 6,47  |
| 14188138   | 16211        | Kpnb1         | -1,304 | 8,18  |
| 14187993   | 13821        | Epb4.1I1      | -1,304 | 14,92 |
| 14191052   | 67180        | Yipf5         | -1,304 | 13,32 |
| 14187422   | 20196        | S100a13       | -1,304 | 8,18  |
| 14190216   | 15407        | Hoxb1         | -1,304 | 7,26  |
| 14180412   | 15360        | Hmgcs2        | -1,303 | 3,96  |
| 14187558   |              | IMAGE=6436611 | -1,303 | 14,92 |
| 14181519   | 11655        | Alas1         | -1,303 | 13,32 |
| 14188866   | 21847        | Klf10         | -1,303 | 8,18  |
| 14186616   | 110750       | Cse1I         | -1,302 | 1,48  |
| 14191044   | 14681        | Gnao1         | -1,302 | 19,38 |
| 14190906   | 67685        | Dyx1c1        | -1,301 | 10,52 |
| 14182839   | 14489        | Mtpn          | -1,3   | 10,52 |

Tabela 12. Genes modulados para baixo no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID       | NAME            | FC     | FDR   |
|------------|---------------|-----------------|--------|-------|
| 14185931   | 170719        | Oxr1            | -1,3   | 19,38 |
| 14183569   | 110796        | Tshz1           | -1,3   | 14,92 |
| 14182292   | 22746         | Zfp85-rs1       | -1,3   | 13,32 |
| 14179097   | 68441         | Rraga           | -1,3   | 19,38 |
| 14192522   | 234366; 67781 | Gatad2a; IIf2   | -1,3   | 2,3   |
| 14188719   | 18619         | Penk1           | -1,3   | 0     |
| 14179806   | 70693         | Gpr125          | -1,3   | 0     |
| 14180544   | 110532; 13859 | Adarb1; Eps15l1 | -1,3   | 16,23 |
| 14181238   | 20363         | Sepp1           | -1,299 | 7,26  |
| 14182689   |               | IMAGE=6435769   | -1,299 | 0     |
| 14192221   | 18033         | Nfkb1           | -1,299 | 11,29 |
| 14185460   | 72007         | Fndc3b          | -1,298 | 14,92 |
| 14182163   | 15381         | Hnrpc           | -1,296 | 1,48  |
| 14186507   | 104625        | Cnot6           | -1,296 | 2,3   |
| 14183748   | 56705         | Ranbp9          | -1,296 | 14,92 |
| 14181414   | 22210         | Ube2b           | -1,296 | 7,26  |
| 14187378   | 101214        | Tra2a           | -1,295 | 16,23 |
| 14184059   | 229725        | Clcc1           | -1,295 | 17,44 |
| 14190865   | 66989         | Kctd20          | -1,295 | 2,3   |
| 14181093   | 22375         | Wars            | -1,295 | 16,23 |
| 14180788   | 58799         | Crbn            | -1,294 | 2,3   |
| 14186341   | 74133         | 1200011M11Rik   | -1,294 | 2,3   |
| 14186571   | 72736         | Txndc1          | -1,294 | 3,96  |
| 14192224   | 20813         | Srp14           | -1,294 | 2,3   |
| 14190418   | 11931         | Atp1b1          | -1,293 | 9,34  |
| 14179150   | 67213         | Cmtm6           | -1,293 | 1,48  |
| 14192311   | 192196        | Luc712          | -1,293 | 19,38 |
| 14183242   | 18475         | Pafah1b2        | -1,293 | 13,32 |

(conclusão).

Tabela 13. Genes modulados para cima no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente.

| ELEMENT_ID | GENE_ID      | NAME          | FC   | FDR  |
|------------|--------------|---------------|------|------|
| 14181832   | 76497        | Ppp1r11       | 1,65 | 7,3  |
| 14181213   | 234734       | Aars          | 1,50 | 4,0  |
| 14183674   | 319476       | Lrtm1         | 1,49 | 6,5  |
| 14181878   | 13884        | Es1           | 1,47 | 14,9 |
| 14182882   | 19188        | Psme2         | 1,47 | 9,3  |
| 14181846   | 16819        | Lcn2          | 1,46 | 14,9 |
| 14178805   | 235627       | Nbeal2        | 1,45 | 10,5 |
| 14183154   | 17716; 17717 | ND1; ND2      | 1,44 | 19,4 |
| 14191786   |              | IMAGE=6433559 | 1,43 | 4,0  |
| 14182773   | 11770; 64697 | Fabp4; Keg1   | 1,42 | 4,0  |
| 14179259   | 11461        | Actb          | 1,42 | 6,5  |
| 14187668   | 17711; 17722 | CYTB; ND6     | 1,41 | 17,4 |
| 14183523   |              | IMAGE=6433664 | 1,41 | 4,0  |
| 14187590   | 18854        | Pml           | 1,41 | 4,0  |
| 14182449   | 20656        | Sod2          | 1,40 | 6,5  |
| 14179821   | 26456        | Sema4g        | 1,40 | 4,0  |
| 14179429   | 15368        | Hmox1         | 1,40 | 7,3  |
| 14180723   | 16551        | Kif11         | 1,40 | 4,0  |
| 14183791   | 30053        | Reg3d         | 1,40 | 4,0  |
| 14184606   | 11758        | Prdx6         | 1,40 | 9,3  |
| 14189144   | 216188       | Aldh1l2       | 1,40 | 4,0  |
| 14179137   | 18507        | Pax5          | 1,39 | 9,3  |
| 14179109   | 17436        | Mod1          | 1,38 | 6,5  |
| 14184082   | 74471        | 4933440N22Rik | 1,38 | 4,0  |
| 14186082   | 74199        | Vit           | 1,37 | 4,0  |
| 14188933   | 17150        | Mfap2         | 1,37 | 4,0  |
| 14191445   | 11770        | Fabp4         | 1,37 | 4,0  |

Tabela 13. Genes modulados para cima no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID | NAME          | FC   | FDR  |
|------------|---------|---------------|------|------|
| 14184271   | 12015   | Bad           | 1,37 | 5,0  |
| 14179890   | 66771   | 4933439F18Rik | 1,37 | 4,0  |
| 14179377   | 227659  | Slc2a6        | 1,36 | 4,0  |
| 14179232   | 329575  | LOC329575     | 1,36 | 4,0  |
| 14184284   |         | IMAGE=945914  | 1,36 | 4,0  |
| 14179104   | 98932   | Myl9          | 1,36 | 10,5 |
| 14180293   | 66475   | Rps23         | 1,36 | 4,0  |
| 14178728   | 70394   | Kptn          | 1,36 | 4,0  |
| 14190302   | 21770   | Ppp2r5d       | 1,36 | 10,5 |
| 14179191   | 20847   | Stat2         | 1,36 | 4,0  |
| 14179711   | 236539  | Phgdh         | 1,36 | 6,5  |
| 14187002   | 30053   | Reg3d         | 1,35 | 4,0  |
| 14189069   | 20357   | Sema5b        | 1,35 | 6,5  |
| 14184240   | 170571  | Cntnap4       | 1,35 | 4,0  |
| 14189027   |         | IMAGE=6436072 | 1,35 | 4,0  |
| 14184260   |         | IMAGE=578146  | 1,35 | 4,0  |
| 14182325   | 18536   | Pcm1          | 1,35 | 4,0  |
| 14181733   | 217351  | Tnrc6c        | 1,35 | 4,0  |
| 14184026   | 14237   | Foxd4         | 1,35 | 5,0  |
| 14188758   | 229512  | Smg5          | 1,34 | 4,0  |
| 14185199   | 20377   | Sfrp1         | 1,34 | 4,0  |
| 14182239   | 216150  | Cdc34         | 1,34 | 4,0  |
| 14179579   | 434800  | 4930428E23Rik | 1,34 | 4,0  |
| 14181722   | 67871   | Mrrf          | 1,34 | 4,0  |
| 14179178   | 66594   | Uqcr          | 1,34 | 4,0  |
| 14181824   | 103236  | Csnk1g2       | 1,34 | 4,0  |
| 14185221   | 11806   | Apoa1         | 1,34 | 4,0  |

Tabela 13. Genes modulados para cima no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID       | NAME          | FC   | FDR  |
|------------|---------------|---------------|------|------|
| 14188936   | 77087         | Ankrd11       | 1,34 | 7,3  |
| 14186889   |               | IMAGE=6433581 | 1,34 | 4,0  |
| 14184570   | 67399         | Pdlim7        | 1,33 | 11,3 |
| 14190537   | 67390         | Rnmtl1        | 1,33 | 4,0  |
| 14191735   | 67480         | Ccdc49        | 1,33 | 4,0  |
| 14191330   | 12363         | Casp4         | 1,33 | 5,0  |
| 14188828   | 16985         | Lsp1          | 1,33 | 4,0  |
| 14179386   | 26377         | Dapp1         | 1,33 | 4,0  |
| 14183809   | 71242         | 5133400G04Rik | 1,33 | 4,0  |
| 14179056   | 56373         | Cpb2          | 1,33 | 4,0  |
| 14183853   | 109778        | Blvra         | 1,33 | 4,0  |
| 14191005   | 106068        | Slc45a4       | 1,33 | 6,5  |
| 14184179   | 60596         | Gucy1a3       | 1,33 | 5,0  |
| 14184106   | 13000; 381903 | Csnk2a2; Alg8 | 1,33 | 4,0  |
| 14190671   | 50755         | Fbxo18        | 1,33 | 4,0  |
| 14191441   | 67153         | Rnaseh2b      | 1,32 | 4,0  |
| 14191334   | 14082         | Fadd          | 1,32 | 4,0  |
| 14179481   | 20733         | Spint2        | 1,32 | 4,0  |
| 14182718   | 16439         | ltpr2         | 1,32 | 4,0  |
| 14179484   | 18208         | Ntn1          | 1,32 | 4,0  |
| 14183490   | 15129         | Hbb-b1        | 1,32 | 4,0  |
| 14180144   | 67444         | llkap         | 1,32 | 4,0  |
| 14181841   | 109900        | Asl           | 1,32 | 5,0  |
| 14190294   | 67067         | 2010100012Rik | 1,32 | 4,0  |
| 14178364   | 17246         | Mdm2          | 1,32 | 9,3  |
| 14184287   | 70163         | 2210415F13Rik | 1,32 | 8,2  |
| 14185276   | 18081         | Ninj1         | 1,32 | 4,0  |
| 14180587   | 12846         | Comt          | 1,32 | 10,5 |
| 14181293   | 50880         | Scly          | 1,32 | 4,0  |

Tabela 13. Genes modulados para cima no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID | NAME          | FC   | FDR  |
|------------|---------|---------------|------|------|
| 14185540   | 56233   | Hdac7a        | 1,32 | 8,2  |
| 14183765   | 13710   | Elf3          | 1,32 | 4,0  |
| 14179080   | 216440  | 4632413K17Rik | 1,32 | 6,5  |
| 14188968   | 224697  | Adamts10      | 1,32 | 4,0  |
| 14184417   | 12321   | Calu          | 1,32 | 4,0  |
| 14178178   | 20971   | Sdc4          | 1,32 | 13,3 |
| 14182420   | 18618   | Pemt          | 1,31 | 6,5  |
| 14190584   |         | IMAGE=6436481 | 1,31 | 4,0  |
| 14178152   | 94275   | Maged1        | 1,31 | 6,5  |
| 14191971   | 18030   | Nfil3         | 1,31 | 5,0  |
| 14181225   | 114663  | Impa2         | 1,31 | 4,0  |
| 14178915   | 228807  | Zfp341        | 1,31 | 4,0  |
| 14183046   | 17523   | Мро           | 1,31 | 4,0  |
| 14186385   | 77310   | C030010B13Rik | 1,31 | 4,0  |
| 14191188   | 57441   | Gmnn          | 1,31 | 4,0  |
| 14187845   | 22377   | Wbp1          | 1,31 | 6,5  |
| 14179757   | 103135  | Usp52         | 1,31 | 4,0  |
| 14184958   | 12323   | Camk2b        | 1,31 | 9,3  |
| 14187535   | 18002   | Nedd8         | 1,31 | 4,0  |
| 14185316   | 218952  | Plekhc1       | 1,31 | 4,0  |
| 14191333   | 12028   | Bax           | 1,31 | 4,0  |
| 14178876   | 11883   | Arsa          | 1,31 | 7,3  |
| 14181822   | 66943   | Pqlc1         | 1,31 | 6,5  |
| 14181155   | 22019   | Tpp2          | 1,31 | 5,0  |
| 14184231   | 641340  | Nrbf2         | 1,31 | 6,5  |
| 14182510   |         | IMAGE=6430369 | 1,31 | 4,0  |
| 14179082   | 18193   | Nsd1          | 1,30 | 5,0  |
| 14179120   | 13813   | Eomes         | 1,30 | 19,4 |

Tabela 13. Genes modulados para cima no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID | NAME          | FC   | FDR  |
|------------|---------|---------------|------|------|
| 14184699   | 223922  | Atf7          | 1,30 | 4,0  |
| 14179892   | 68493   | 1110007M04Rik | 1,30 | 5,0  |
| 14189184   | 65254   | Dpysl5        | 1,30 | 6,5  |
| 14185414   | 67763   | Prpsap1       | 1,30 | 6,5  |
| 14187077   | 19246   | Ptpn1         | 1,30 | 13,3 |
| 14187436   | 67458   | Ergic1        | 1,30 | 4,0  |
| 14181043   | 14325   | Ftl1          | 1,30 | 13,3 |
| 14180672   | 17095   | Lyl1          | 1,30 | 5,0  |
| 14183860   | 27999   | D6Wsu176e     | 1,30 | 4,0  |
| 14188775   | 385658  | Gm1752        | 1,30 | 4,0  |
| 14186241   | 24069   | Sufu          | 1,30 | 4,0  |
| 14178168   | 84113   | Ptov1         | 1,30 | 8,2  |
| 14186461   | 14560   | Gdf10         | 1,30 | 4,0  |
| 14180008   | 58992   | F12           | 1,30 | 5,0  |
| 14177985   | 14276   | Folr2         | 1,30 | 5,0  |
| 14185808   | 20973   | Syngr2        | 1,30 | 4,0  |
| 14179355   | 233410  | Zfp592        | 1,30 | 6,5  |
| 14189895   | 216527  | Ccm2          | 1,30 | 4,0  |
| 14182408   | 26896   | Crsp2         | 1,29 | 5,0  |
| 14181730   | 74585   | Sppl3         | 1,29 | 4,0  |
| 14185596   | 12091   | Glb1          | 1,29 | 4,0  |
| 14181341   | 20022   | Polr2j        | 1,29 | 4,0  |
| 14183468   | 72119   | Tpx2          | 1,29 | 5,0  |
| 14181720   | 56615   | Mgst1         | 1,29 | 7,3  |
| 14191053   | 13132   | Dab2          | 1,29 | 16,2 |
| 14188588   | 52065   | Mfhas1        | 1,29 | 6,5  |
| 14181792   | 320538  | D130059P03Rik | 1,29 | 4,0  |

Tabela 13. Genes modulados para cima no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID | NAME          | FC   | FDR  |
|------------|---------|---------------|------|------|
| 14187998   | 16002   | lgf2          | 1,29 | 4,0  |
| 14180518   |         | IMAGE=6435517 | 1,29 | 4,0  |
| 14187332   | 68572   | lct1          | 1,29 | 4,0  |
| 14180100   | 17242   | Mdk           | 1,29 | 6,5  |
| 14184286   | 12913   | Creb3         | 1,29 | 5,0  |
| 14185748   | 71371   | Arid5b        | 1,29 | 4,0  |
| 14183055   | 107753  | Lgals2        | 1,29 | 4,0  |
| 14189891   | 70369   | Bag5          | 1,29 | 4,0  |
| 14179879   |         | IMAGE=6436062 | 1,29 | 10,5 |
| 14178135   | 237400  | Rkhd1         | 1,29 | 5,0  |
| 14181230   | 54613   | St3gal6       | 1,29 | 4,0  |
| 14178627   | 238722  | Zfp72         | 1,28 | 4,0  |
| 14179697   | 432479  | 4930404N11Rik | 1,28 | 6,5  |
| 14190312   |         | IMAGE=6435473 | 1,28 | 4,0  |
| 14192328   | 109218  | Tmem139       | 1,28 | 4,0  |
| 14185333   | 19655   | Rbmx          | 1,28 | 6,5  |
| 14189185   | 84004   | Mcam          | 1,28 | 16,2 |
| 14184836   | 70911   | Phyhipl       | 1,28 | 5,0  |
| 14190579   | 73750   | Whrn          | 1,28 | 5,0  |
| 14182351   | 212390  | 6430524H05Rik | 1,28 | 4,0  |
| 14178562   | 11750   | Anxa7         | 1,28 | 4,0  |
| 14185138   | 70885   | Ints10        | 1,28 | 4,0  |
| 14179328   | 217449  | Ttc15         | 1,28 | 8,2  |
| 14186738   | 280662  | Afm           | 1,28 | 5,0  |
| 14188151   | 72325   | 1300018I17Rik | 1,28 | 5,0  |
| 14178818   | 11807   | Apoa2         | 1,28 | 5,0  |
| 14181994   |         | IMAGE=6433555 | 1,28 | 4,0  |
| 14186419   | 66352   | Blzf1         | 1,28 | 7,3  |
| 14178203   | 17121   | Mxd3          | 1,28 | 5,0  |
|            |         |               |      |      |

Tabela 13. Genes modulados para cima no experimento contendo 23 mM de glicose no meio de cultura. Listagem dos 200 por FC, por ordem decrescente. (continuação)

| ELEMENT_ID | GENE_ID      | NAME             | FC   | FDR  |
|------------|--------------|------------------|------|------|
| 14181652   | 18111        | Nnat             | 1,28 | 7,3  |
| 14179085   | 232406       | BC035044         | 1,28 | 4,0  |
| 14178758   | 98932        | Myl9             | 1,28 | 17,4 |
| 14186974   | 67622        | Mxra7            | 1,28 | 5,0  |
| 14189926   | 21346        | TagIn2           | 1,28 | 7,3  |
| 14181484   | 16800        | Arhgef2          | 1,28 | 4,0  |
| 14185809   | 225049       | Ttc7             | 1,28 | 4,0  |
| 14180670   | 67187        | Zmynd19          | 1,28 | 5,0  |
| 14192531   | 13003        | Cspg2            | 1,28 | 4,0  |
| 14187653   | 21982; 56040 | Tmem165; Rplp1   | 1,27 | 8,2  |
| 14188788   | 67712        | SIc25a37         | 1,27 | 4,0  |
| 14187921   | 232187       | Smyd5            | 1,27 | 9,3  |
| 14179931   | 67179        | Ccdc25           | 1,27 | 6,5  |
| 14179117   | 21405        | Tcf1             | 1,27 | 8,2  |
| 14178221   | 15395        | Hoxa10           | 1,27 | 4,0  |
| 14191719   | 80750        | BC004022         | 1,27 | 4,0  |
| 14188830   | 217125       | Samd14           | 1,27 | 8,2  |
| 14191906   |              | GENBANK=CF623083 | 1,27 | 9,3  |
| 14183830   |              | IMAGE=6433448    | 1,27 | 4,0  |

(conclusão).