Erika Rodrigues de Oliveira

**O efeito pró-apoptótico de oligômeros da amilina humana não é
potencializado pela lipotoxicidade em ilhotas pancreáticas de rato
em cultura**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo
Corrêa Giannella

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Erika Rodrigues de

O efeito pró-apoptótico de oligômeros da amilina humana não é potencializado pela lipotoxicidade em ilhotas pancreáticas de rato em cultura / Erika Rodrigues de Oliveira. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella.

Descritores: 1.Ilhotas pancreáticas 2.Diabetes mellittus tipo 2 3.Amilina
4.Receptores de incretinas 5.Lipídeos/toxicidade 6.Produutos finais de glicação
avançada 7.Apoptose

USP/FM/DBD-141/12

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suelly Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Dedico este trabalho aos meus pais, Anízio e Célia, pelo apoio, dedicação e carinho em todos os momentos.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Lúcia Giannella, minha orientadora, que me deu a oportunidade de ingressar nesta área da pesquisa e por todo o apoio e incentivo a mim concedido durante esta trajetória.

À Flávia Costal, por me ensinar a trabalhar no laboratório de ilhotas, pela amizade e pela imensa ajuda na realização deste trabalho.

Ao Alexandre Amaral e à Nelly Fabre pela amizade e pela ajuda de sempre.

Ao Leonardo Sokolnik e Cássio Coimbra, por terem me acompanhado durante a Iniciação Científica.

Ao Dr. Daniel Giannella pelo auxílio com as análises estatísticas.

À Ma. Alda Wakamatsu pela disposição em auxiliar nos ensaios de imunohistoquímica.

À Gabriela Castilho e Rodrigo Iborra pela paciência e auxílio nos ensaios de *Western blot*.

A toda equipe de funcionários e colegas do LIM 25 que sempre foram solícitos.

Aos meus irmãos Anizio Neto, Filipe e Fernanda por estarem sempre presentes.

À minha vó, Salete, por sempre me dar muita força, carinho e por torcer por mim.

Ao meu namorado, Alexandre Guimarães, pelo amor e atenção.

A toda minha amada família, pelo apoio.

A todos meus queridos amigos, pelo companheirismo e bons momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1 Diabetes <i>mellitus</i> tipo2	2
1.2 Amilina e o depósito amiloide	3
1.3 Depósito amiloide e DM2	8
1.4 Incretinas	16
1.5 Lipotoxicidade	18
1.6. Produtos finais de glicação avançada (AGEs)	21
2. Objetivos	24
3. Material e Métodos	25
3.1 Isolamento de ilhotas de Langerhans de ratos	26
3.1.1 Canulação e digestão do pâncreas	27
3.1.2 Interrupção da digestão e purificação das ilhotas	27
3.2 Padronização da técnica para detecção de apoptose celular pela medida da atividade de Caspase 3	28
3.3 Padronização da concentração de palmitato	30
3.4 Tratamento das ilhotas pancreáticas com amilina e palmitato para os experimentos de RT-qPCR, <i>Western blot</i> e de análise do índice de apoptose	32 34
3.5 Tratamento das ilhotas com oligômeros de amilina e albumina glicada para avaliação do índice de apoptose	

3.6 Quantificação do conteúdo do mRNA de <i>Gipr</i> e <i>Glp1r</i> por RT-qPCR	35
3.7 Avaliação do índice de apoptose celular pela quantificação da atividade proteolítica de caspase 3	39
3.8 Padronização da técnica de <i>Western blot</i>	39
3.9 Quantificação do conteúdo das proteínas GIPR e GLP1R por <i>Western blot</i>	42
3.10 Padronização da técnica de imunohistoquímica em cortes de pâncreas humano	42
3.11 Padronização da técnica de imunohistoquímica em ilhotas de rato	46
3.12 Análise estatística	48
4. Resultados	49
4.1. Quantificação do conteúdo do mRNA de <i>Gipr</i> e <i>Glp1r</i> por RT-qPCR	50
4.2 Avaliação do índice de apoptose celular pela quantificação da atividade proteolítica da caspase 3	55
4.3 Avaliação da expressão das proteínas GIPR e GLP1R por <i>Western blot</i>	56
5. Discussão	62
6. Conclusão	71
7. Referências bibliográficas	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

β	Beta
γ	Gama
μ	Micro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
A_{260}	Absorbância de 260 nm
A_{280}	Absorbância de 280 nm
Ac-DEVD-pNA	Acetil- Asp-Glut-Val-Asp-p- nitroanilida
<i>Actb</i>	Gene - β -actina
AGE	Produto final da glicação avançada (<i>Advanced glycation end-products</i>)
<i>Ager</i>	Gene - Receptor de produtos finais da glicação avançada (RAGE)
AGL	Ácido graxo livre
Akt	Homóloga celular ao oncogene viral v- Akt
AlbCTR	Ilhotas não tratadas com albumina incubada com PBS
AlbGAD	Ilhotas tratadas com albumina glicada com glicolaldeído (GAD)
AM	Ilhotas tratadas com amilina
ApoE	Apolipoproteína E
ATF-2	Fator ativador da transcrição 2
<i>Bax</i>	Gene - célula B de linfoma 2 associado a proteína X

<i>Bcl2</i>	Gene – célula B de linfoma 2
BCL2	Proteína- célula B de linfoma 2
BCL-xL	Proteína relacionada ao Bcl2
BSA	Soro albumina bovina
°C	Graus celsius
CAMP	Camptotecina
CD36	Receptor de trombospondina
CM	Linhagem de células beta pancreáticas de insulinoma humano
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	Dióxido de Carbono
CoA	Coenzima A
Acetil CoA	Acetil coenzima A
Colagenase	Clotridiopeptidase
CRRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CPE	Carboxi peptidil peptidase E
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CTR	Receptor da calcitonina
CTRL	Ilhotas sem tratamento
DEPC	Dietilpirocarbonato de sódio
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico

dNTP	Nucleotídeos trifosfatos
DPP-4	Dipeptil-peptidase-4
DTT	Dithiothreitol
EC50	Concentração 50% efetiva
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
et al.	E outros
E cols.	E colaboradores
FADD	Domínio de morte associado ao Fas
Fas	Receptor de morte celular
FDA	<i>Food and drugs administration</i>
FOXO-1	Proteína <i>Forkhead Box O1</i>
g	Rotação em unidade de gravidade
g	Grama
G3P	Gliceraldeído -3 -fosfato
GAD	Glicolaldeído
GIP	Peptídeo insulínico dependente de glicose
<i>Gipr</i>	Gene- receptor do peptídeo insulínico dependente de glicose
GIPR	Proteína- receptor do peptídeo insulínico dependente de glicose
GLP1	Peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1
<i>Glp1r</i>	Gene- receptor do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1
GLP1R	Proteína- receptor do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1

h	Horas
HIP	Rato transgênico para amilina humana
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBA _{1c}	Hemoglobina glicada
HBSS	Solução balanceada de Hank's (<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)
IAPP	Polipeptídeo amilóide da ilhota
IF	Ilhota fresca (recém- isolada)
IDE	Enzima que degrada insulina
INS-1E	Linhagem clonada de células beta pancreáticas derivadas de insulinoma de rato
JNK1	c- Jun N- terminal quinase 1
KCL	Cloreto de Potássio
Kg	Kilograma
L	Litro
M	Molar
mM	Milimolar
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MIN6	Linhagem de célula β de insulinoma de camundongo
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar

mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-κB	Fator nuclear κβ
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
OST-48	Receptor oligossacaril transferase - 48
p	Significância estatística
<i>p21</i>	Gene supressor de tumor p21
<i>p53</i>	Gene supressor de tumor p53
PARP	Poli-ADP-ribose polimerase
PBS	Tampão fosfato salino
PC 1/3	Prohormônio convertase 1/3
PC 2	Prohormonio convertase 2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDX-1	<i>Pancreatic duodenal homeobox-1</i>
pH	Potencial de hidrogeniônico
PI-3K	Fosfatidil- inositol 3 quinase
PKB	Proteína quinase B
pNA	Cromógeno p-nitroanilida
PVPI	Polivinilpirrolidona Iodo
RAGE	Receptor de produtos finais da glicação avançada

RAMP	Proteína modificadora da atividade do receptor
RE	Retículo endoplasmático
RINm5F	Linhagem de células beta pancreáticas de insulinoma de rato
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécie reativa de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Meio de cultura
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase pós transcrição reversa
RTq-PCR	Reação em cadeia da polimerase pós transcrição reversa quantitativa
s	Segundos
SAP	Amilóide P sérico
<i>Scarb1</i>	Gene - <i>Scavenger receptor class B, member 1</i>
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
STZ	Estreptozotocina
TA	Temperatura ambiente
Taq	DNA polimerase
TNF	Fator de necrose tumoral
U	Unidade
UA	Unidade arbitrária
UAA	Unidade arbitrárias de Absorbância
V	Volts
ZDF	Ratos Zucker diabéticos obesos

RESUMO

Oliveira, ER. O efeito pró-apoptótico de oligômeros da amilina humana não é potencializado pela lipotoxicidade em ilhotas pancreáticas de rato em cultura [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

O depósito de amilina é um achado histopatológico frequente em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM 2) e parece estar relacionado à disfunção da célula beta pancreática característica desta doença. Um estudo previamente desenvolvido em nosso laboratório verificou que oligômeros de amilina humana provocam diminuição na expressão do mRNA do gene que codifica o receptor do hormônio incretínico peptídeo insulínico dependente de glicose (*Gipr*) e aumento do índice de apoptose em ilhotas pancreáticas de rato mantidas em cultura. Considerando o importante papel do depósito amilóide e das incretinas na fisiopatologia do DM 2, os objetivos deste trabalho foram investigar (1) o efeito da amilina humana sobre a expressão dos receptores de incretinas e (2) a modulação de seu efeito tóxico por outras condições concomitantes presentes no DM, como a lipotoxicidade e os produtos finais de glicação avançada (AGEs). Para isto, foi realizada a avaliação da expressão do mRNA dos genes *Gipr* e *Glp1r* (receptor do peptídeo semelhante ao glucagon) por PCR em tempo real em ilhotas expostas apenas aos oligômeros de amilina humana (10 µM) por 4 e 8 h e em ilhotas expostas aos oligômeros e ao palmitato (0,5 mM) por 24 e 48 h; avaliação da expressão das proteínas GIPR e GLP1R por *Western blot* em ilhotas tratadas com oligômeros de amilina por 12 h; e avaliação do índice de apoptose pela quantificação da atividade de caspase 3 em ilhotas tratadas com oligômeros de amilina isoladamente, ou na

presença de palmitato (0,5mM) por 48 h ou 5 mg/ml de albumina glicada (AlbGAD) por 72 h. A amilina não provocou alteração na expressão dos genes *Gipr* e *Glp1r* após 4 h de exposição. Após 8 e 24 h de tratamento, os oligômeros modularam negativamente a expressão destes genes. Entretanto, o tratamento das ilhotas com amilina por 48 h resultou no aumento da expressão do mRNA dos receptores de incretinas. O tratamento simultâneo com palmitato não alterou o efeito modulatório da amilina sobre a expressão dos genes *Gipr* e *Glp1r* após 24 e 48 h. A exposição das ilhotas aos oligômeros de amilina por 12 h não causou alteração na expressão das proteínas GIPR e GLP1R. A lipotoxicidade e a albumina glicada não aumentaram o efeito pró-apoptótico da amilina sobre as ilhotas pancreáticas. Em conclusão, a redução na expressão gênica dos receptores de incretinas em ilhotas pancreáticas de rato expostas aos oligômeros de amilina, que poderia indicar um mecanismo adicional pelo qual a amilina exerceria seu efeito deletério sobre células beta, diminuindo o efeito insulínico induzido pelas incretinas em pacientes com DM 2, não foi constatada em relação à expressão protéica de GIPR e GLP1R no período de tempo estudado. O aumento na expressão do mRNA destes receptores provocado pela amilina após 48 horas de incubação poderia ser um mecanismo de compensação das células frente aos efeitos tóxicos dos oligômeros de amilina. O efeito pró-apoptótico da amilina humana sobre as células beta não parece ser potencializado pela lipotoxicidade ou por AGEs.

Descritores: Ilhotas Pancreáticas, Diabetes mellitus tipo 2, Amilina, Receptores de incretinas, Lipídeos/toxicidade, Produtos finais de glicação avançada, Apoptose.

SUMMARY

Oliveira, ER. The pro-apoptotic effect of human amylin oligomers is not potentiated by lipotoxicity in rat pancreatic islets in culture [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

The amyloid deposit is a common histopathological feature in patients with type 2 diabetes *mellitus* (T2DM) and it seems to be related to the pancreatic beta cell dysfunction characteristic of this disease. A study previously developed in our laboratory found that human amylin oligomers decrease mRNA expression of the glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor (*Gipr*) and increase apoptosis rate in rat pancreatic islets maintained in culture. Considering the important role of the amyloid deposition and of incretins in the pathophysiology of T2DM, the aims of the present study were to investigate (1) the effect of human amylin on the expression of incretin receptors and (2) the modulation of amylin toxicity by other concomitant conditions present in T2DM, as lipotoxicity and advanced glycation end products (AGEs). The evaluation of mRNA expression of *Gipr* and *Glp1r* (glucagon-like peptide -1 receptor) was performed by real time PCR in islets exposed only to human amylin oligomers (10 μ M) for 4 and 8 h, and in islets exposed to human amylin and palmitate (0,5 mM) for 24 and 48 h; GIPR and GLP1R protein expression was assessed by Western blot in islets treated with amylin oligomers by 12 h; apoptosis rate was evaluated by measuring caspase 3 activity in islets treated with amylin alone or combined to palmitate (0,5 mM) for 48 h or 5 mg/mL of glycated albumin (AlbGAD) for 72 h. Amylin did not affect the expression of *Gipr* and *Glp1r* mRNA following 4 h of exposure. Eight and 24 h after treatment, amylin negatively modulated the expression of these genes. However, treatment of the islets

for 48 h with amylin elicited an increase in mRNA expression of both incretin receptors. The simultaneous treatment with palmitate did not change the effects of amylin on the expression of *Gipr* and *Glp1r* mRNA after 24 and 48 h. Exposure of islets to amylin for 12 h caused no change in GIPR and GLP1R protein expression. Lipotoxicity and glycated albumin did not increase the pro-apoptotic effect of amylin on pancreatic islets. In conclusion, the reduction in mRNA expression of the incretin receptors on rat pancreatic islets exposed to amylin, which could indicate an additional mechanism whereby amylin exert its deleterious effect on beta cells, reducing the insulintropic effects of incretins in patients with T2DM was not confirmed regarding GIPR and GLP1R protein expression at the time period studied. The increased mRNA expression of these receptors caused by amylin after 48 h of incubation could be a compensation mechanism against the toxic effects of amylin oligomers. The pro-apoptotic effect of amylin on human beta cells does not appear to be potentiated by lipotoxicity or by advanced glycation end products.

Keywords: Islets of Langerhans; Type 2 diabetes mellitus, Amylin; Incretin receptors; Lipids/toxicity; Glycosylation end products, advanced; Apoptosis.

Introdução

1. Introdução

1.1 Diabetes *mellitus* tipo 2

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica crônica que representa aproximadamente 90% de todos os casos de diabetes.¹ A etiologia específica do DM2 não está claramente estabelecida, mas sabe-se que ele ocorre em indivíduos geneticamente susceptíveis que são expostos a condições ambientais que precipitam o início da doença. Os principais fatores de risco incluem: sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$), sedentarismo, histórico familiar de diabetes e histórico de diabetes gestacional.²

O DM2 se caracteriza pela combinação de resistência à ação da insulina em tecidos periféricos (principalmente músculo, tecido adiposo e fígado) e a secreção deficiente deste hormônio pelas células beta pancreáticas.³ A capacidade secretória de insulina inadequada para suplantar a resistência insulínica concomitante resulta no quadro de hiperglicemia. Com a evolução da doença é observado um declínio progressivo na massa de células beta, provocado pelo aumento no índice de apoptose celular.⁴

A hiperglicemia crônica é um dos fatores presentes nos indivíduos com DM2 que contribuem para o comprometimento da função e da massa de células beta. A glicotoxicidade provoca nestas células: diminuição da sensibilidade à glicose, causando redução na secreção de insulina estimulada por glicose; diminuição na expressão de importantes fatores de transcrição associados à expressão do gene da insulina, como PDX-1; estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático e apoptose.⁵

Outro importante fator implicado na patogênese do DM2 é a elevação das concentrações de ácidos graxos livres (AGLs) em decorrência do aumento da lipólise no tecido adiposo visceral, também em consequência da resistência insulínica, gerando a lipotoxicidade. A exposição crônica a estes compostos provoca diminuição na secreção de insulina estimulada por glicose,⁶ estresse de retículo endoplasmático e apoptose de células beta *in vitro*.^{7,8} Os efeitos deletérios provocados pelas altas concentrações de glicose são potencializados pela ação dos ácidos graxos, dando origem a uma terceira condição, denominada “glicolipotoxicidade”.⁹

O depósito de amiloide nas ilhotas pancreáticas é um achado histopatológico característico dos pacientes portadores de DM2 que também faz parte dos fatores que comprometem a viabilidade de células beta nestes indivíduos, contribuindo para a fisiopatologia da doença. Trata-se de um material proteináceo composto de uma densa rede de fibrilas constituído principalmente pela proteína amilina.

1.2 Amilina e o depósito amiloide

A amilina é uma proteína de 37 aminoácidos sintetizada e armazenada juntamente com a insulina nos grânulos citoplasmáticos das células beta.¹⁰ A amilina é co-secretada com a insulina numa relação molar amilina: insulina de aproximadamente 1: 100.¹¹ O gene que codifica a amilina está localizado, em seres humanos, no cromossomo 12, contém 3 éxons e sua transcrição é controlada por uma sequência promotora ativada pelo fator de transcrição PDX-1. A expressão gênica da amilina é estimulada pela glicose e por outros hormônios, como a insulina e o glucagon.^{12,13}

A amilina, também conhecida por polipeptídeo amiloide da ilhota (IAPP: *islet amyloid polypeptide*) é derivada de um precursor maior, chamado preproIAPP, que contém 89 aminoácidos e uma sequência sinal na porção amino-terminal. Esta sequência é removida no retículo endoplasmático, dando origem ao proIAPP. No interior dos grânulos de secreção, o proIAPP é clivado pelas enzimas prohormônio convertase 1 (PC1/3) e 2 (PC2), e então resíduos na região carboxi-terminal são removidos enzimaticamente pela ação da carboxi peptidase E (CPE), o que resulta na formação do peptídeo maduro.¹⁴ A amilina possui uma meia-vida de aproximadamente 10 minutos¹⁵ e sofre ação da mesma enzima que degrada a insulina (IDE- *insulin- degrading enzyme*).¹⁶

A secreção de amilina pelas células beta ocorre, de forma geral, em decorrência dos mesmos fatores que estimulam a secreção de insulina, como a glicose. A exposição à alta concentração de glicose induz a expressão gênica e proteica de amilina em ilhotas humanas e de ratos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.¹⁷ Também observa-se aumento na expressão e secreção de amilina quando ilhotas de camundongos são expostas a elevadas concentrações de ácidos graxos.¹⁸ O aumento na concentração plasmática de amilina está diretamente relacionado a condições em que a resistência insulínica está presente.¹⁹ De forma semelhante, em estados patológicos associados à diminuição na função secretória de células beta, como é o caso do DM, a secreção de amilina se mostra diminuída tanto em resposta à administração de glicose via oral quanto intravenosa, sendo que esta diminuição ocorre paralelamente à redução na secreção de insulina.²⁰

Ainda não se identificou um receptor específico para a amilina, entretanto, a similaridade estrutural entre a amilina e a calcitonina, bem como com os CGRPs

(*calcitonin gene-related peptides*) e a adrenomodulina, resulta na ativação de um mesmo receptor, o receptor de calcitonina (CTR). A afinidade de cada ligante pelo CTR é regulada pela associação do receptor a uma proteína pertencente a um grupo conhecido como proteínas modificadoras da atividade do receptor (RAMPs). Heterodímeros entre o CTR e RAMP1 ou RAMP3 ligam-se preferencialmente à amilina, podendo ser receptores funcionais para esse peptídeo (Figura 1).^{21, 22} O receptor assim formado é um receptor com sete alças transmembrânicas ligado à proteína G.

Figura 1. Representação da associação CTR/RAMP como receptor para amilina. A especificidade do receptor de calcitonina (CTR) pelo seu ligante se dá pela formação heterodimérica entre o CTR e diferentes classes de RAMPs (proteínas modificadoras da atividade do receptor) no retículo endoplasmático (RE) seguido de transporte até a superfície celular. Heterodímeros entre CTR/RAMP1 (verde) ou CTR/RAMP3 (vermelho) resultam em receptores que se ligam preferencialmente à amilina (AM). C: extremidade carboxi-terminal, N: extremidade amino-terminal. Adaptado de Gibbons e cols.²³

As atividades biológicas da amilina conhecidas até o momento incluem: diminuição na secreção de glucagon (especialmente na fase pós-prandial), redução do peristaltismo gástrico, diminuição da ingestão alimentar e redução do peso corporal.²⁴ A amilina também exerce função sobre o metabolismo ósseo, estimulando a proliferação de osteoblastos e a mineralização óssea.^{25,26}

Devido a seus efeitos metabólicos, foi desenvolvido um análogo sintético da amilina humana, o pramlintide/Symilin. Em 2005 o medicamento foi aprovado pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) para ser administrado em associação com a insulina com o objetivo de obter a melhora do controle glicêmico pós-prandial em pacientes portadores de DM1 e DM2. Os resultados dos estudos clínicos que estão sendo conduzidos desde então reportam, em sua maioria, uma discreta diminuição no peso corporal, redução significativa nas concentrações de hemoglobina glicada (HbA_{1C}) e diminuição nas doses de insulina administradas.²⁷

A amilina humana possui também como característica a tendência a se agregar e se depositar nas ilhotas pancreáticas *in vivo*, dando origem ao depósito amiloide frequentemente observado em pacientes com DM2. Amiloide é um termo geral usado para designar agregados proteicos nos quais as moléculas adquirem lâminas de conformação beta que se ligam umas às outras através de, predominantemente, pontes de hidrogênio, dando origem a estruturas fibrilares estáveis.²⁸ Apesar de a amilina ser uma proteína conservada entre os mamíferos, apenas a amilina humana, a amilina de gato e a de primatas possuem esta propriedade de agregação espontânea e são capazes de causar efeitos deletérios sobre as células beta, enquanto formas não agregantes da proteína, como a amilina de rato, não exercem efeito citotóxico.²⁹ Acredita-se que a região da amilina entre as posições

20 e 29, conhecida por sequência amiloidogênica, esteja envolvida na formação de fibrilas amiloides pelo peptídeo humano, e que a presença de três aminoácidos prolina nesta região seja a responsável pela inibição do processo de agregação da proteína em ratos.³⁰

Ainda não se sabe quais fatores estão associados ao desenvolvimento do depósito amiloide em pacientes com DM2. Acredita-se que possa estar relacionado à hipersecreção de amilina associada à hiperinsulinemia, em resposta à resistência insulínica.³¹

Devido à rápida capacidade de agregação da amilina *in vitro*, é necessário que haja um controle sobre a sua conformação *in vivo*. Desta forma, uma possível desregulação na ação de chaperonas poderia comprometer a estabilidade da proteína, favorecendo sua polimerização e consequente formação do amiloide.²⁹ Estudos demonstram que a insulina e a pró-insulina exercem ação inibitória sobre a formação das fibrilas de amilina e, portanto, seriam importantes na manutenção da estabilidade da proteína no interior dos grânulos de secreção.^{32,33} Um possível aumento na relação amilina: insulina, como observado em animais diabéticos mantidos em hiperglicemia crônica³⁴ e em ilhotas humanas expostas a concentrações suprafisiológicas de glicose *in vitro*³⁵ poderiam contribuir para o surgimento do amiloide intracelular.

Estudos utilizando camundongos transgênicos para a amilina humana demonstraram que o aumento do consumo de gorduras na dieta ou, também, alterações no metabolismo lipídico poderiam ser os fatores responsáveis pelo desenvolvimento do depósito amiloide.³⁶⁻³⁹ Além disso, foi demonstrado que os ácidos graxos são capazes de acelerar a polimerização da amilina *in vitro* e provocar o aparecimento de material intragranular anormal em células beta de ilhotas de

camundongos transgênicos para amilina humana em cultura, sugerindo o envolvimento dos ácidos graxos no início do surgimento do amiloide intracelularmente.⁴⁰

Além da amilina, também estão presentes no depósito amiloide o amiloide P sérico (SAP: *serum amyloid P*), a apolipoproteína E (apo E) e o proteoglicano heparan sulfato perlecan, que possivelmente poderiam afetar o processo de amiloidogênese, uma vez que estes componentes também estão presentes em outras formas de amiloides associados a condições patológicas (como o depósito de beta-amiloide na doença de Alzheimer).⁴¹

1.3 Depósito amiloide e DM2

O depósito amiloide pancreático foi descrito pela primeira vez em 1901, pelo patologista Eugene Opie como uma degeneração hialina presente nas ilhotas pancreáticas de indivíduos com DM.⁴² Estudos posteriores demonstraram que esta é uma característica frequente em pacientes com DM2, estando presente em até 90% destes indivíduos.⁴³ Em estudo conduzido por Maloy e cols., o amiloide esteve presente em 59% dos pacientes diabéticos estudados, entretanto, quando o grupo foi subdividido quanto às formas de tratamento, todos aqueles que recebiam insulina apresentavam o depósito amiloide, estabelecendo assim, uma possível associação entre a prevalência do amiloide pancreático e a gravidade da doença.⁴⁴ Na Figura 2, pode-se observar a presença do depósito amiloide em ilhotas de um portador de DM2 em comparação às ilhotas de um indivíduo não diabético.

Figura 2. Cortes histológicos de pâncreas de indivíduo com DM2 (A) e de indivíduo não diabético (B) marcados com imunofluorescência para insulina (vermelho) e depósito amiloide (verde). Hull e cols.⁴⁵

Diversas evidências demonstram o possível papel do amiloide na patogênese do DM2. Estudos em primatas demonstraram que o surgimento do depósito amiloide precede o início da hiperglicemia, sendo que a quantidade do mesmo relaciona-se diretamente com o progresso da doença⁴⁶ e também está associado à redução da massa de células beta.⁴⁷ Além disso, o rato transgênico HIP, que carrega o gene da amilina humana sob o controle da sequência promotora do gene da insulina, desenvolve depósito amiloide, DM2 e apresenta uma redução de aproximadamente 60% no número de células beta, servindo como modelo experimental para o DM2.⁴⁸ Em humanos, tem sido demonstrado que depósito amiloide está diretamente relacionado à diminuição da massa de células beta observada em pacientes com DM2, associado ao aumento do índice de apoptose destas células.^{4,49}

A inibição da expressão de proIAPP por meio do uso de RNA de interferência,⁵⁰ bem como o tratamento com peptídeo inibidor da agregação da amilina⁵¹, previnem a morte celular causada pelo amiloide, melhorando a viabilidade

de células beta em ilhotas pancreáticas humanas mantidas em cultura, corroborando a importância do depósito amiloide sobre a massa de células beta.

Também é importante levar em consideração que, além do efeito tóxico direto, o depósito amiloide localizado entre as ilhotas e os capilares sanguíneos poderia agir como uma barreira física, prejudicando o suprimento de glicose e outros nutrientes para as células beta. Da mesma forma, o depósito amiloide poderia prejudicar a chegada da insulina sintetizada pelas células beta na corrente sanguínea.³¹

Recentemente, tem se questionado o papel do depósito amiloide na perda da viabilidade de ilhotas pancreáticas transplantadas em indivíduos com diabetes tipo 1 (DM1). Westermarck e cols. conduziram estudos em que puderam constatar que ilhotas humanas transplantadas sob a cápsula renal, no fígado ou no baço de camundongos imunodeficientes passavam a apresentar depósito amiloide duas semanas após o transplante.^{52,53} Além disso, também observou-se que mesmo as ilhotas humanas não transplantadas, sendo apenas mantidas em cultura, também desenvolviam o amiloide após duas semanas *in vitro*.⁵⁴ A análise histológica do enxerto de quatro pacientes falecidos anos após terem recebido o transplante de ilhotas revelou a presença do depósito amiloide em três deles, confirmando o achado em transplante clínico.⁵⁵

Um estudo conduzido por Udayasankar e cols. demonstrou que camundongos diabéticos imunodeficientes que recebiam transplante de ilhotas cujos doadores eram camundongos transgênicos que expressavam amilina humana, voltavam a apresentar hiperglicemia cerca de cinco semanas após o transplante. A análise histológica dos enxertos de ilhotas deste grupo demonstrou que havia a presença de depósito

amiloide, diminuição do volume e aumento do índice de apoptose de células beta em comparação com o grupo controle (doadores não-transgênicos), nos quais os camundongos se mantiveram normoglicêmicos durante todo o período de tempo estudado. O surgimento do amiloide precedeu a recorrência da hiperglicemia e o acúmulo do mesmo relacionou-se diretamente com a perda de massa das células beta, sugerindo que o depósito amiloide possa fazer parte dos fatores não-imunes que provocam a morte de células beta em ilhotas transplantadas, colaborando para o insucesso do procedimento no longo prazo.⁵⁶

Acredita-se que o depósito amiloide represente um processo contínuo, no qual monômeros de amilina começam a se arranjar formando pequenos agregados (denominados “oligômeros”) que se polimerizam até formar a amilina fibrilar madura. Estudos mais recentes apontam que os oligômeros intermediários constituam a forma tóxica da amilina.⁵⁷

A comparação da toxicidade de duas preparações de amilina, uma contendo preponderantemente oligômeros, outra composta em maior parte por fibrilas maduras da proteína, em células de linhagem de insulinoma de ratos RINm5F expostas por 24 horas a 10 μ M de cada uma das preparações revelou que o tratamento com as fibrilas intermediárias de amilina provocou maior porcentagem de morte celular em relação ao tratamento com as fibrilas maduras, sugerindo que os oligômeros de amilina sejam os principais responsáveis pela citotoxicidade da proteína.⁵⁸ Em estudo realizado por Bai e cols. nas células RINm5F, a concentração de amilina recém-preparada (e, portanto, rica em oligômeros) capaz de induzir a morte celular em 50% das células (EC50) foi definida em 10 μ M e o tempo de tratamento em que a morte celular atinge metade do valor máximo foi de 24 horas.⁵⁹

Zhang e cols. demonstraram em células RINm5F e em células CM (originadas de insulinoma humano) que o tratamento com amilina humana recém-preparada na concentração de 10 μ M em tempos variados induziu a atividade de caspase-8 (ativadora de apoptose) e caspase-3 (efetora de apoptose) de maneira tempo-dependente, sendo este efeito pró-apoptótico mediado, pelo menos em parte, pela ativação das proteínas JNK1, c-jun, ATF-2 e p38 MAPK. O tratamento destas mesmas células com amilina de rato não resultou em morte celular, ressaltando a ausência de citotoxicidade desta amilina sobre as células beta.^{60,61}

O tratamento de células RINm5F com oligômeros de amilina humana promove a indução de apoptose por meio do aumento na expressão do mRNA de *p53* e *p21*, que estão relacionadas positivamente com o processo de apoptose.⁶² O mesmo tratamento em células INS-1E, também derivada de insulinoma de rato, provoca efeito pró-apoptótico relacionado a uma diminuição significativa na fosforilação e atividade da proteína AKT, inibição da fosforilação de FOXO1 e inibição da translocação de PDX-1 para o núcleo da célula.⁶³

Células RINm5F, CM e ilhotas de camundongo expostas aos oligômeros de amilina apresentam um índice de apoptose mais elevado associado ao aumento na expressão do receptor de morte celular Fas e de seu respectivo domínio de morte FADD (*Fas-associated death domain*), sendo que o uso de anticorpos bloqueadores anti Fas/FasL suprime o efeito pró-apoptótico da amilina. O achado sugere que o aumento na expressão e ativação de Fas em células beta provocados pela amilina poderia constituir um evento molecular presente na patogênese do DM2, de forma semelhante ao que ocorre no DM1 após a agressão auto-imune.⁶⁴

Subramanian e cols. demonstraram que a amilina humana endógena também é capaz de induzir a apoptose de células beta *in vitro* por meio das vias intrínseca e extrínseca, dependente da sinalização da via JNK. Ilhotas de camundongos transgênicos que expressam o gene da amilina humana, quando mantidas em cultura por 48 e 144 h em concentração suprafisiológica de glicose (16.7 mM), apresentam maior índice de apoptose de células beta em decorrência da ativação de JNK e aumento da expressão do mRNA dos genes relacionados à apoptose *Fas*, *Fadd*, *Bim* e de caspase 3 em comparação a ilhotas de animais não-transgênicos.⁶⁵

Estudos demonstram que o sistema oxidativo celular também é afetado pelos oligômeros de amilina⁶⁶⁻⁶⁸. O tratamento de células INS-1E com amilina recém-preparada resultou em apoptose celular e aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS- *reactive oxygen species*) de maneira dose-dependente.⁶⁶ O aumento no estresse oxidativo celular também foi constatado em ilhotas de camundongos transgênicos para amilina humana mantidas em cultura por 48 horas em comparação com ilhotas de animais não-transgênicos mantidas sob as mesmas condições.⁶⁷

Alguns estudos *in vitro* demonstram que o papel citotóxico da amilina está diretamente relacionado com a indução de estresse de retículo endoplasmático nas células beta.^{69,70} Entretanto, o estudo do depósito amiloide *in vivo*, por meio da análise histológica de pâncreas de animais transgênicos para amilina humana ou de pacientes diabéticos, demonstrou que não há associação deste componente com o aumento na expressão de marcadores de estresse de retículo, sugerindo que este mecanismo não esteja envolvido no efeito deletério do amiloide em ilhotas pancreáticas mantidas sob concentrações fisiológicas de amilina, ao contrário dos

estudos *in vitro*, em que as células foram expostas a concentrações de amilina consideradas suprafisiológicas.⁷¹

Outros mecanismos pelos quais os oligômeros de amilina humana podem induzir morte celular são desestabilização da integridade⁷² e formação de poros na membrana celular.⁷³ O contato da amilina humana com membranas de bicamada lipídica provoca aumento na condutância das mesmas, tornando-as mais permeáveis a íons, dentre eles, o cálcio, cujo influxo é um importante indutor de morte celular. Ao mesmo tempo, o contato da amilina de rato com estas membranas não causa modificação na condutância destas estruturas.

Os achados de oligômeros de amilina humana intracelular em dois modelos de camundongos transgênicos abrem a possibilidade de citotoxicidade induzida por amilina de início intracelular⁷⁴ após a falha de mecanismos que normalmente previnem a oligomerização da amilina humana no citoplasma da célula, o que poderia levar à ruptura de membranas intracelulares.

Embora existam inúmeras evidências que favorecem a hipótese de que os oligômeros intermediários constituam a forma tóxica da amilina humana, a citotoxicidade de formas fibrilares de outras proteínas amiloidogênicas, tais como a amilóide beta1–40⁷⁵ e a proteína priônica fibrilar,⁷⁶ bem como relatos de fibrilas maduras de amilina induzindo vias de transdução de sinal relacionadas à resposta inflamatória em células da microglia⁷⁷ e citotoxicidade em uma linhagem de células produtoras de insulina⁷⁸ demonstram que os mecanismos pelos quais a amilina humana é deletéria não estão completamente estabelecidos. Essa constatação também é exemplificada por achados recentes que sugerem que o dano celular não é causado

por espécies de amilina específicas, tais como os oligômeros, mas pelo processo de crescimento da fibrila sobre a membrana celular.⁵⁷

Devido à necessidade de estudos que permitam uma melhor compreensão das bases moleculares dos efeitos da amilina sobre as células beta, um projeto desenvolvido em nosso laboratório explorou, por microarranjos de cDNA, o perfil de expressão gênica de ilhotas pancreáticas expostas a fibrilas maduras de amilina humana (“amilina madura”) e a oligômeros de amilina de tamanho intermediário (“amilina fresca”), bem como o índice de apoptose de ilhotas tratadas com as duas formas de amilina.⁷⁹ Tanto as fibrilas maduras quanto os oligômeros exerceram um efeito pró-apoptótico sobre as ilhotas, sendo este efeito significativamente mais pronunciado com os oligômeros de amilina. O índice de apoptose associado às duas formas de amilina não foi modulado pela concentração de glicose no meio de cultura (experimentos foram realizados em 5,6 e 23 mM de glicose). Além disso, vias biológicas relacionadas ao processo de apoptose foram moduladas no experimento de micro-arranjos de DNA apenas após o tratamento com os oligômeros de amilina, em concordância com os dados mais recentes da literatura, que apontam os oligômeros como sendo mais deletérios que as fibrilas maduras de amilina.

Alguns genes identificados nos ensaios de micro-arranjos foram validados por reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) e um dos achados mais interessantes foi a confirmação de que o mRNA do *Gipr* (que codifica o receptor de peptídeo insulínico dependente de glicose– [GIP]) é regulado negativamente pelos oligômeros de amilina em ilhotas mantidas em concentração fisiológica de glicose, o que sugere que esse possa ser um mecanismo adicional pelo qual as fibrilas intermediárias de amilina sejam deletérias para a célula

beta pancreática,⁷⁹ com o depósito amiloide participando na patogênese da diminuição da resposta insulínica ao GIP já observada nos pacientes com DM2.⁸⁰ O achado de diminuição do conteúdo do mRNA de *Gipr* em ilhotas mantidas em concentração suprafisiológica de glicose em comparação às ilhotas mantidas em concentração fisiológica está de acordo com dados da literatura que demonstram expressão reduzida desse gene em ilhotas de ratos mantidas em hiperglicemia crônica.^{81,82}

1.4 Incretinas

Incretinas são hormônios polipeptídicos produzidos no trato gastrointestinal e secretados durante a absorção de nutrientes, que agem sobre as células beta e aumentam a secreção de insulina. O conceito incretina foi criado quando se observou que a secreção de insulina em resposta à glicose administrada por via oral é maior do que a secreção de insulina em resposta à glicose administrada por via intravenosa, mesmo quando as concentrações de glicemia são semelhantes. Esse efeito otimiza a resposta de insulina durante as refeições e limita a variação da glicemia pós-prandial.⁸³

A primeira incretina identificada foi chamada de GIP, do inglês, *gastric inhibitory polypeptide*, devido a sua capacidade de inibir a secreção ácida do estômago de cães. Posteriormente, o uso de preparações mais puras demonstrou que este peptídeo tem a capacidade de estimular a secreção de insulina em animais e em seres humanos e passou a ser denominado *glucose dependent insulintropic polypeptide*.⁸⁴ O GIP é produzido pelas células K do duodeno e jejuno proximal, em resposta à ingestão de nutrientes, principalmente lipídeos e glicose, e exerce suas

ações quando se liga ao seu receptor específico (GIPR). O GIPR é um receptor que contém sete alças transmembrânicas associado à proteína G e é expresso em diversos tecidos, dentre eles o pâncreas, estômago, intestino delgado, tecido adiposo, coração e diversas regiões do sistema nervoso central (SNC).⁸⁵ Após ser liberado pelas células enteroendócrinas, o GIP se liga a receptores específicos na célula beta pancreática e estimula a secreção de insulina. O GIP também estimula a transcrição do gene da insulina, assim como a expressão de sensores de glicose nas células beta. Ainda no pâncreas, o GIP inibe a apoptose e estimula a proliferação destas células. Estudos demonstram que os mecanismos envolvidos neste aspecto protetor do GIP incluem a ativação da via PI-3K/Akt-PKB, MAPK, redução na atividade de caspase 3, diminuição na expressão do gene pró-apoptótico *Bax* e aumento da expressão do gene anti-apoptótico *Bcl2*.^{86,87} A inibição do GIPR por antagonistas do seu receptor ou por inativação do gene que o codifica (GIPR/-) causa intolerância à glicose e secreção de insulina insuficiente em ratos.⁸⁸ O GIP é inativado na circulação sanguínea pela ação da enzima proteolítica dipeptidil-peptidase 4 (DPP-4).⁸⁹

Outra importante incretina é o GLP-1 (*Glucagon-Like peptide-1*). O GLP-1 é produzido e secretado pelas células L, localizadas no íleo distal e cólon, após a ingestão de alimentos. Seu receptor, o GLP-1R também é um receptor com sete alças transmembrânicas associado à proteína G que é expresso no pâncreas, coração, rim, estômago, intestino, diversas regiões do SNC, dentre outros. Além de estimular a secreção de insulina dependente de glicose, o GLP-1 exerce diversas outras ações no pâncreas. Ele tem a capacidade de promover a transcrição do gene de insulina, estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) e sua biosíntese, recompondo a reserva de insulina das células beta.⁹⁰ Além disso, o GLP-1 restaura a sensibilidade à insulina

das células beta por meio do aumento na expressão dos transportadores de glicose e da enzima glicoquinase⁹¹ e inibe a secreção de glucagon.⁹² O uso de agonistas de GLP-1 estimula a proliferação e inibe a apoptose de células beta em modelos animais. A inibição do processo de apoptose está relacionada com a diminuição nos níveis de proteínas pró-apoptóticas como caspase 3 ativa e poli-ADP-ribose polimerase (PARP) clivada, e aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 e BCL-XL.^{85,86} A inibição da ação do GLP-1 pelo bloqueio de seu receptor diminui a tolerância à glicose e reduz a secreção de insulina estimulada por glicose tanto em seres humanos como em animais. De forma semelhante, animais que não expressam GLP1R (GLP1R^{-/-}) apresentam leve hiperglicemia e intolerância à glicose, associadas à redução na secreção de insulina em resposta à glicose.⁹³ Assim como o GIP, o GLP-1 é inativado *in vivo* pela ação da enzima DPP-4.⁸⁹

1.5 Lipotoxicidade

O DM2 está associado a um aumento na concentração plasmática de AGLs.⁹⁴ A elevação de AGLs no plasma de forma crônica provoca efeitos adversos sobre a ação e secreção de insulina.⁹⁵ Este conjunto de efeitos prejudiciais causados pelo acúmulo ectópico de lipídeos em tecido não-adiposo é comumente referido como “lipotoxicidade”.⁹⁶

Os AGLs contribuem para a resistência insulínica em tecidos periféricos por meio de diferentes mecanismos. Um dos primeiros mecanismos aventados foi a competição entre os AGLs e a glicose como substratos para oxidação. Acredita-se que o metabolismo de AGLs provoca aumento intramitocondrial nas proporções Acetil- CoA/ CoA e NADH / NAD⁺, com subsequente inativação da enzima

piruvato desidrogenase, o que provoca acúmulo de citrato intracelular, culminando na inibição da fosfofrutoquinase, uma enzima passo- limitante do processo de glicólise. O acúmulo de glicose-6-fosfato inibe a atividade da hexoquinase II, resultando no aumento da concentração de glicose intracelular e diminuição da captação de glicose.⁹⁷ Esta foi a primeira hipótese criada para se explicar a inibição da oxidação de glicose pelos ácidos graxos e, desde então, tem sido complementada por estudos adicionais.⁹⁸ Já foi demonstrado que o excesso de AGLs pode causar resistência insulínica por provocar estresse mitocondrial e acúmulo de intermediários lipídicos incompletamente oxidados.⁹⁹ Também já foi constatado que a elevada concentração de AGLs pode alterar diretamente a sinalização intracelular da insulina, afetando o transporte de glicose.¹⁰⁰ Além disso, o excesso de AGLs estimula a gliconeogênese hepática por meio da indução da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose-6-fosfatase, contribuindo para o estabelecimento do quadro de hiperglicemia.⁹⁵

Estudos em humanos sugerem que a elevação de AGLs plasmáticos em sujeitos saudáveis exerce efeito estimulatório sobre a secreção de insulina, mas pode contribuir para a perda progressiva da massa de células beta em indivíduos com predisposição genética ao desenvolvimento do DM.⁹⁴ Apesar de flutuações nas concentrações de AGLs serem necessárias para o funcionamento normal das células beta, a exposição prolongada a altas concentrações destes compostos exercem um impacto negativo sobre a massa e função deste tipo celular.¹⁰¹ Estudos *in vitro* utilizando ilhotas isoladas demonstram que os ácidos graxos saturados, especialmente o palmitato, exercem efeito tóxico sobre as células beta, afetando a

secreção de insulina e induzindo a apoptose, ao passo que ácidos graxos monoinsaturados, como o oleato, exercem efeito protetor.¹⁰²

As células beta pancreáticas são particularmente susceptíveis aos efeitos deletérios provocados pelo excesso de AGLs por possuírem uma capacidade limitada em estocar triacilglicerol, favorecendo o acúmulo de metabólitos lipídicos tóxicos (como ceramida, diacilglicerol, e outros) que são desviados para vias metabólicas prejudiciais à homeostase celular.¹⁰³ A exposição crônica de células beta aos AGLs induz múltiplos mecanismos de toxicidade, incluindo o acúmulo de malonil-CoA, aumento na oxidação e esterificação de ácidos graxos, aumento da síntese de ceramida, indução da apoptose e ativação do estresse oxidativo e de RE.⁹⁵

Ilhotas de rato mantidas em cultura por sete dias na presença de concentrações elevadas de AGLs apresentam aumento no índice de apoptose associado ao aumento na fragmentação de DNA, aumento da atividade de caspase 3 e aumento na expressão de genes pró-apoptóticos.⁹⁵ Ilhotas humanas incubadas sob condição semelhante exibem aumento no acúmulo intracelular de triglicerídeos, diminuição no conteúdo e na secreção de insulina e aumento na taxa de apoptose relacionada à redução na expressão do mRNA do gene anti-apoptótico *Bcl2*.¹⁰⁴ Em ilhotas de ratos Zucker diabéticos obesos (ZDF), demonstrou-se que os AGLs induzem a apoptose de células beta paralelamente ao aumento na síntese de ceramida e de óxido nítrico (NO).^{105,106} Também já foi demonstrado, em células INS-1, que os AGLs induzem apoptose em associação com uma diminuição na fosforilação da AKT.¹⁰⁷

1.6 Produtos finais de glicação avançada (AGEs)

A via envolvida na formação dos AGEs está relacionada com a hiperglicemia crônica característica do DM. Os AGEs derivam de uma ligação não enzimática entre um grupamento aldeído reativo na glicose com o grupo amino das proteínas, levando à formação dos produtos de Amadori, dos quais o mais conhecido é a hemoglobina glicada (HBA_{1c}). Outras reações ocorrem a partir deste ponto para produzir um grupo de compostos denominados AGEs (*advanced glycation end-products*), que se ligam irreversivelmente às proteínas, afetando suas estruturas e funções biológicas, o que contribui para a patogênese das complicações macro e microvasculares.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

A geração de AGEs é maior no meio intracelular, em função da alta reatividade de intermediários do metabolismo da glicose.¹¹¹ Os AGEs podem ser gerados, por exemplo, a partir da auto-oxidação intracelular da glicose a glioxal e da fragmentação do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em metilglioxal. Esses dicarboníls reativos intracelulares reagem com o grupamento amino de proteínas intra e extracelulares para formar os AGEs.¹¹²

Os AGEs formados intracelularmente podem levar à lesão celular por modificar proteínas intracelulares ou podem se difundir para fora das células e modificar proteínas de matriz e proteínas circulantes. Essas últimas, quando modificadas, podem ligar-se a receptores de membrana e ativar a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento que vão causar a angiopatia diabética.¹¹¹

Os AGEs interagem com o receptores lactoferrina, *scavenger* tipo I e II, oligossacaril transferase - 48 (OST-48), 80K-H fosfoproteína, Galectina-3, CD36,^{113,114} e com seu receptor específico (receptor de produtos finais da glicação avançada – RAGE), que desencadeia uma sinalização intracelular que induz a

ativação do estresse oxidativo, aumenta a liberação de citocinas inflamatórias e promove um aumento da transcrição do NF- κ B, levando a um quadro de inflamação crônica e consequente aumento de danos celulares e teciduais.^{108,110,115}

Já se demonstrou *in vitro* que o acúmulo de AGEs prejudica a função das células beta pancreáticas resultando em defeitos na secreção de insulina e redução de sua biossíntese.¹¹⁶ Alguns mecanismos já foram descritos para explicar os efeitos deletérios dos AGEs sobre as células beta, tais como aumento da expressão da ciclooxigenase 2,¹¹⁷ e o estresse oxidativo, capaz de desencadear o processo de apoptose com redução do número de células beta.¹¹⁸ Um estudo desenvolvido em nosso laboratório constatou que a exposição de ilhotas pancreáticas de rato a albumina modificada por glicação por 72 e 96 horas provoca aumento no índice de apoptose e na produção de ROS.¹¹⁹

Em resumo, há vários mecanismos propostos para explicar a redução da massa de células beta ao longo da evolução do DM2, mas a interação do depósito amiloide com a lipotoxicidade e com os AGEs foi pouco explorada na literatura. Da mesma forma, a relação entre receptores incretínicos e amilina nunca foi avaliada. Por essas razões, esses aspectos foram abordados no presente trabalho.

Objetivos

2. Objetivos

Tendo em vista a participação do depósito amiloide e das incretinas na fisiopatologia do DM2 e os resultados do projeto previamente desenvolvido em nosso laboratório, o objetivo deste projeto foi investigar o efeitos dos oligômeros de amilina sobre a expressão dos receptores das incretinas GIP e GLP-1 e sobre o índice de apoptose de ilhotas pancreáticas de rato, e sua modulação pela lipotoxicidade e pelos AGEs.

Para tanto, foram avaliados em ilhotas pancreáticas de rato mantidas em cultura tratadas com oligômeros de amilina em presença ou não de palmitato:

1. A expressão do mRNA de *Gipr* e *Glp1r*;
2. A expressão das proteínas GIPR e GLP-1R;
3. O índice de apoptose celular.

O índice de apoptose celular também foi avaliado em ilhotas pancreáticas de rato mantidas em cultura tratadas com oligômeros de amilina e expostas ou não à albumina glicada.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Isolamento de ilhotas de Langerhans de ratos

Ratos Wistar adultos provenientes do biotério central de Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram utilizados. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa- CCAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 0573/09). O isolamento das ilhotas foi realizado pelas seguintes etapas:

Ratos Wistar pesando de 250 a 350 g (dois meses de idade) foram sedados com uso de isoflurano por inalação e, posteriormente, anestesiados com solução de quetamina + xilazina (0,2 mL/100 g de peso do animal) via intraperitoneal. A seguir, a antisepsia do abdomen foi feita com solução de polivinilpirrolidona iodo (PVPI 10%). A cavidade abdominal foi aberta com tesoura e após localização e exposição do ducto biliar e sua ramificação que vai para o intestino delgado, o ducto foi pinçado em sua extremidade distal com o auxílio de uma pinça hemostática, a fim de se evitar dispersão da enzima para o intestino, levando à insuflação do pâncreas. A canulação do ducto biliar foi feita pela introdução de um escalpe (25G) por meio de pequeno corte feito com microtesoura no terço proximal do ducto. Fez-se uma amarração com fio algodão 4-0 em torno do cateter introduzido no ducto, para evitar extravasamento retrógrado da solução de enzima injetada. Ao final da cirurgia, os animais foram submetidos à decapitação.

3.1.1 Canulação e digestão do pâncreas

A solução de Colagenase tipo V (Sigma) foi preparada com diluição em solução de *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS) para uma concentração de 0,7 mg/mL. Após a injeção intraductal de 10 mL, o pâncreas foi separado do intestino com auxílio de uma tesoura e transferido para uma placa de Petri, sendo lavado em solução de HBSS. 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, que foi levado ao banho-maria a 37 °C para a digestão com a colagenase.

3.1.2 Interrupção da digestão e purificação das ilhotas

Após o 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 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e com antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) a 4° C, com o objetivo de interromper a ação da enzima e finalizar a digestão. Após lavagens e centrifugações, o material foi filtrado em malha de aço inoxidável de 600 µm e procedeu-se à purificação por gradiente utilizando-se o Histopaque 1077 (Sigma). Após centrifugação e lavagens, as ilhotas foram contadas e analisadas quanto a sua pureza. As ilhotas foram distribuídas em frascos de cultura e levadas à estufa a 37°C e 5% de CO₂.

3.2 Padronização da técnica para detecção de apoptose celular pela medida da atividade de caspase 3

Após a indução de apoptose nas células, há um aumento da atividade proteolítica da caspase-3, proporcionando a clivagem de seus substratos e a liberação do cromógeno que, por sua vez, pode ser detectado por espectrofotometria. Desta forma, comparando os valores de absorbância das amostras controle e das amostras tratadas, é possível determinar o nível de atividade proteolítica de caspase-3 para cada uma delas, o que reflete o índice de apoptose.

A medida da atividade de caspase-3 foi realizada com o estojo comercial *Caspase-3 Colorimetric Activity Assay kit* (Chemicon International, Temecula, CA) pela utilização de substratos contendo o cromógeno p-nitroanilida (pNA). A padronização da medida da atividade de caspase-3 foi realizada da seguinte maneira: grupos de 200, 300, 400 e 500 ilhotas foram cultivadas em placas de cultura em duplicata e tratadas com o agente indutor de apoptose camptotecina (CPT- controle positivo da reação- 0,2 µg/mL), em meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos, 10% SFB e com 5,6 mM de glicose durante 4 horas. Como controle da reação, foram utilizados grupos de 200, 300, 400 e 500 ilhotas mantidas em cultura sob as mesmas condições, porém na ausência do agente indutor de apoptose (CAMP). Os grupos de ilhotas foram coletados e lavados com 10 mL de solução de HBSS. A seguir, as ilhotas foram centrifugadas a 800xg durante 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi suspenso em 1 mL de HBSS e centrifugado a 400xg por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em 200 µL de tampão de lise. Após 10 min de incubação no gelo, as células foram centrifugadas a 10.000xg por 5 min, o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo de

1,5 mL. Uma alíquota de 10 μ L da amostra foi utilizada para a realização do ensaio de Bradford para a normalização dos dados pela quantidade de proteínas totais. Para tanto, 10 μ L de cada amostra foram adicionados a 200 μ L do corante azul de Comassi (Bradford Reagent, Sigma Aldrich) As amostras foram incubadas por 5 min e a leitura foi realizada por espectrofotometria (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies) usando o comprimento de onda de 595 nm.

Para o ensaio de atividade proteolítica de caspase-3, 70 μ L de amostra foram colocados individualmente em placas de 96 poços aglomerados e a seguir as células foram incubadas com 20 μ L de tampão de ensaio e 10 μ L de substrato colorimétrico contendo acetil-Asp-Glut-Val-Asp-p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA). Após incubação a 37°C durante 2 h com proteção da luz, as amostras foram lidas no luminômetro Anthos Lucy 3 (Anthos Labtec Instruments, Austrália) utilizando-se o comprimento de onda de 405 nm e utilizando-se como referência o filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos em Unidades Arbitrárias de Absorbância (U.A.A.) dividindo-se o valor da absorbância pela quantidade de proteína obtida pela técnica de Bradford em cada amostra. Os resultados da padronização foram expressos pela média das amostras em duplicata de cultura $\pm$ o desvio padrão.

Durante a padronização concluiu-se que os experimentos deveriam ser feitos com a utilização de 300 ilhotas, pois a partir deste número observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo de ilhotas controle e o grupo de ilhotas tratadas com o agente indutor de apoptose, conforme demonstrado na Figura 3.

Figura 3. Gráfico representativo da padronização da técnica de detecção do índice de apoptose celular pela medida da atividade da caspase-3. CTRL: ilhotas não tratadas com camptotecina. CAMP: ilhotas tratadas com camptotecina. Duplicatas biológicas realizadas em duplicata, * $p < 0,05$

3.3 Padronização da concentração de palmitato

Com o objetivo de determinar a concentração e o tempo de exposição necessários para se observar o efeito tóxico do palmitato sobre as células, ilhotas foram extraídas e submetidas ao tratamento com palmitato (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) diluído em metanol nas concentrações de 0,3 ou 0,5 mM em meio de cultura por 24 ou 48 h em meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), 2% de SFB e 5,6 mM de glicose. As ilhotas controles foram expostas apenas ao metanol em uma concentração final de 0,1% no meio de cultura. Após este período, as ilhotas foram retiradas dos frascos de cultura e procedeu-se à avaliação do índice de apoptose celular por meio da quantificação da atividade de caspase-3 segundo o protocolo descrito acima.

A partir dos resultados obtidos (Figura 4) decidiu-se adotar como modelo de lipotoxicidade o palmitato na concentração de 0,5 mM por 48 h, já que desta forma

foi possível observar um aumento no índice de apoptose celular em relação ao grupo controle mais próximo de um valor estatisticamente significante.

Figura 4. Gráficos representativos dos resultados da padronização da concentração e do tempo de exposição ao palmitato capazes de induzir apoptose de ilhotas pancreáticas. Ilhotas foram mantidas em concentração fisiológica de glicose (5,6 mM) e expostas a expostas ao metanol 0,1% (Controle) ou ao palmitato (0,3 ou 0,5 mM) por 24 h (A) ou 48 h (B). Duplicata biológica realizada em duplicata. Valores de “p” em relação ao controle.

3.4 Tratamento das ilhotas pancreáticas com amilina e palmitato para os experimentos de RT-qPCR, *Western blot* e de análise do índice de apoptose

Após o isolamento, as ilhotas foram mantidas em cultura por 24 h em meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos, 2% de SFB e 5,6 mM de glicose. Após este período, as ilhotas foram submetidas às seguintes condições experimentais: (1) ilhotas tratadas com oligômeros de amilina na concentração final de 10 μ M, (2) ilhotas tratadas com palmitato na concentração final de 0,5 mM, (3) ilhotas tratadas com palmitato e oligômeros de amilina e (4) ilhotas sem tratamento (controle). As ilhotas foram mantidas em cultura nestas condições por 24 ou 48 h em meio RPMI 1640, com 2% SFB e 5,6 mM de glicose. Os oligômeros de amilina foram obtidos após a ressuspensão do liofilizado da proteína amilina humana (Bachem, Torrance, EUA) em água deionizada imediatamente antes da adição ao meio de cultura. Nas condições controle e oligômeros de amilina, metanol foi acrescentado ao meio de cultura para se obter a mesma concentração final que aquela presente nas condições palmitato e oligômeros de amilina com palmitato.

Considerando que a baixa qualidade da proteína extraída das ilhotas mantidas em cultura por estes períodos de tempo prolongados (24 e 48 h) impossibilitou a realização da técnica de *Western blot* de forma satisfatória, reduzimos o tempo de cultura pré-tratamento (de 24 para 2 h) e avaliamos o tempo de exposição mínimo necessário para se observar o efeito modulatório negativo dos oligômeros de amilina humana sobre a expressão do mRNA de *Gipr* e *Glp1r* (4 e 8 h). Levando em conta a média de tempo existente entre a redução na expressão do mRNA do gene e a subsequente redução da expressão proteica, as ilhotas foram tratadas por 12 e 15 h

para posterior avaliação da expressão das proteínas GIPR e GLP1R por *Western blot*.

O delineamento experimental do estudo está representado na Figura 5.

Figura 5. Esquematização do delineamento experimental do estudo demonstrando o tratamento das ilhotas pancreáticas com amilina e palmitato para os experimentos de RT-qPCR, *Western blot* e de análise do índice de apoptose.

3.5 Tratamento das ilhotas com oligômeros de amilina e albumina glicada para avaliação do índice de apoptose

Para a preparação da albumina glicada (AGE), albumina bovina (BSA) isenta de ácidos graxos (40 mg) foi incubada na presença de 10 mM de glicolaldeído (AlbGAD) dissolvido em tampão fosfato NaCl 137 mmol/L; Na₂HPO₄ 4 mmol/L; KCl 2 mmol/L; K₂PO₄ 1 mmol/L (*Phosphate Buffered Saline*. PBS) com EDTA pH=7,4. Albumina controle (AlbCTR) foi preparada em solução salina tamponada com PBS. As incubações foram realizadas sob condições estéreis, banho de água a 37°C, com agitação por quatro dias. A seguir, as amostras foram dialisadas contra PBS e esterilizadas em filtro de 0,22 µm. Após o preparo, as amostras foram acondicionadas a - 70°C até o seu uso.¹²⁰

Após o isolamento, as ilhotas foram mantidas em cultura por 24 h em meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos, 2% de SFB e 23 mM de glicose com 5 mg/mL de AlbCTR ou AlbGAD. Após este período, as ilhotas foram submetidas às seguintes condições experimentais: (1) ilhotas tratadas com oligômeros de amilina na concentração final de 10 µM, (2) ilhotas tratadas com 5 mg/mL de AlbGAD, (3) ilhotas tratadas com AlbGAD e oligômeros de amilina e (4) ilhotas tratadas com 5 mg/ml de AlbCTR (controle). As ilhotas foram mantidas em cultura nestas condições por 48 h em meio RPMI 1640, com 2% SFB e 23 mM de glicose. Após este período, as ilhotas foram submetidas à avaliação do índice de apoptose celular pela quantificação da atividade proteolítica de caspase-3. O delineamento experimental está representado na Figura 6.

Figura 6. Delineamento experimental do estudo para avaliação do índice de apoptose em ilhotas expostas aos oligômeros de amilina e à albumina glicada (AlbGAD).

3.6 Quantificação do conteúdo do mRNA de *Gipr* e *Glp1r* por RT-qPCR

Para a extração de RNA total das ilhotas, foi utilizado um protocolo baseado na lise das células com Trizol e subsequente isolamento do RNA total pelo método de cromatografia (RNeasy Mini Kit, Qiagen), conforme recomendações do fabricante. O RNA total extraído e purificado foi quantificado e avaliado quanto à sua pureza no equipamento NanoDrop ND-3300 (NanoDrop Technologies, EUA). Foram consideradas amostras ótimas aquelas que apresentaram uma relação Abs260/Abs280 entre 1,8 e 2,1. A análise da integridade do material foi feita pela avaliação das bandas correspondentes ao RNA ribossomal 18S e 28S após eletroforese em gel de agarose. Para a síntese de cDNA foram utilizados 500 ng de RNA total seguindo-se o protocolo do conjunto de reagentes *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Invitogen, E.U.A).

Para a realização dos experimentos de RT-qPCR foi utilizado o sistema *Taqman*, que consiste no uso de sondas fluorescentes que se ligam especificamente a

uma região interna do produto de PCR. Como normalizador das reações, foi utilizado o gene que codifica a β -actina (*Actb*) e como calibrador foi usado cDNA de ilhotas recém-extraídas.

Para os ensaios foram utilizados os seguintes *primers* inventoriados pela *Applied Biosystem* (Foster City, E.U.A.): *Actb* (Rn00667869_m1), *Gipr* (Rn00562325_m1) e *Glp1r* (Rn_00562406). Foi constatada a especificidade da reação pela ausência de bandas de tamanho diferente do esperado na análise por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Foi realizado um experimento para calcular a eficiência de amplificação de cada um dos pares de *primer*. Este dado é importante para o cálculo final da expressão do gene-alvo em relação ao gene normalizador. Uma amostra de cDNA de ilhotas foi diluída 1:5, 1:50 e 1:500 e foi realizado uma PCR com cada par de *primer* em cada uma destas diluições. Foi construído um gráfico colocando o valor de Ct de cada diluição de cDNA em função da diluição da amostra. A inclinação (*slope*) desta reta foi utilizada para o cálculo de eficiência de amplificação conforme a fórmula:

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

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *StepOnePlus* (*Applied Biosystems*). Cada reação foi preparada com 1,0 μL de *Taqman Gene Expression Assays* (20x), 10 μL de *Taqman Universal PCR Master Mix* e 5 μL de cDNA (100 ng) para um volume final de reação de 20 μL . As amostras foram incubadas durante 10 min a 95° C para a desnaturação das dupla-fitas de cDNA. A seguir, foram submetidas a 40 ciclos (15 s a 95° C, 1 min a 60 °C).

A semelhança das eficiências de amplificação dos pares de *primers* do gene-alvo e do gene normalizador da reação (Figura 7) permitiu a utilização do seguinte modelo matemático para o cálculo da expressão relativa de cada amostra:

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

ΔCt = Ct do gene em estudo - Ct do gene normalizador (β -actina)

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt da amostra - ΔCt do calibrador ¹²¹.

Figura 7. Gráficos representativos das eficiências de amplificação dos pares de *primers* que amplificam os genes *Gpr*, *Glp1r* e *Actb* na PCR em tempo real.

3.7 Avaliação do índice de apoptose celular pela quantificação da atividade proteolítica de caspase-3

Após os tratamentos com oligômeros de amilina, palmitato ou albumina glicada, as ilhotas foram retiradas de cultura e submetidas à avaliação do índice de apoptose celular pela quantificação da atividade de caspase-3 utilizando o estojo comercial *Caspase-3 Colorimetric Activity Assay kit* (Chemicon International, Temecula, CA) conforme padronização descrita anteriormente.

3.8 Padronização da técnica de *Western blot*

Logo após o término do processo de isolamento, 300 ilhotas foram separadas, transferidas para um tubo *eppendorf* e lavadas com HBSS. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução de lise gelado (tampão RIPA- 50 mM Tris HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Igepal; 0,25% Ácido Deoxicólico; 0,1% SDS; 1 mM EDTA pH 8) suplementado com 10 µL de coquetel de inibidores de protease (Sigma Aldrich) por 30 min à 4°C. Após este período, o lisado celular foi centrifugado a 10.000xg por 1 min, tendo então o sobrenadante sido aliquoteado e estocado à -70°C. As proteínas foram quantificadas pelo ensaio de Bradford e as amostras foram submetidas ao processo de concentração utilizando-se a coluna *Amicon Ultra- 03* kDa (Millipore) segundo as instruções do fabricante.

Alíquotas do sobrenadante contendo 100 µg de proteína total foram misturadas com tampão de carregamento de proteína (4% SDS; 0,1 M Tris pH 8,9; 2 mM EDTA; 0,1% azul de bromofenol; 20% glicerol; 0,25 M DTT) e, em seguida, foram aquecidas à 94°C por 5 min e aplicadas nas canaletas do gel. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida na concentração de 10% por 4 h, a 120V. O

padrão de massa molecular utilizado foi o *Full Range Rainbow* (Amersham Biosciences).

Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose por um processo de eletrotransferência semi-seco em aparelho especial (*ECL Semi- Dry Transfer Unit*- Amersham) na presença de tampão de transferência adequado (10% tampão Tris Glicina- Sigma; 18% Metanol; 0,4% SDS) em amperagem constante de 100 mA por 35 min. Para verificação do processo de transferência, as membranas foram coradas com uma solução de 0,2% do corante Ponceau. Em seguida, foram lavadas três vezes com solução de PBS contendo 1% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas por 1 h com leite em pó desnatado a 5% em PBS-T, sob agitação.

As membranas foram incubadas por 18 h a 4°C com um dos anticorpos primários: anticorpo anti beta-actina produzido em camundongo ([42 kDa] A-4700, Sigma) diluído 1:1.000, ou anticorpo anti GIPR produzido em cabra ([53 kDa] SC- 69417, Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:200, ou anticorpo anti GLP1R produzido em coelho ([53 kDa] SC- 66911, Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:200. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T e foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados à peroxidase diluídos na razão 1:1.000 em PBS-T por 1 h. As membranas foram lavadas novamente, secas e a marcação foi revelada por quimioluminescência com luminol (Millipore) seguindo as recomendações do fabricante, sendo as leituras realizadas no aparelho ImageQuantTM 350 (Amersham Biosciences).

De acordo com a padronização descrita, utilizando proteína total extraída de ilhotas recém-isoladas, foi possível identificar as bandas correspondentes às proteínas de estudo, conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8. Representação dos resultados da padronização da técnica de *Western blot* para detecção das proteínas beta-actina, GIPR e GLP1R.

Como mencionado anteriormente, a padronização da técnica foi feita utilizando a proteína extraída de ilhotas logo após o isolamento. Entretanto, ao utilizarmos proteínas provenientes de ilhotas mantidas em culturas e tratadas, notamos um decaimento na qualidade da proteína extraída de forma diretamente proporcional ao tempo de cultivo celular. Por esta razão, testamos o tempo máximo que as ilhotas poderiam ser mantidas em cultura sem acarretar prejuízo à qualidade da proteína. Para isso, ilhotas foram isoladas, mantidas em cultura por 2 h em meio RPMI 1640, com 2% SFB e 5,6 mM de glicose e, em seguida, foi feita a troca do meio de cultura e as ilhotas foram cultivadas sob as mesmas condições por 8, 14, 16 e 18h. Foi feita a extração da proteína total das ilhotas e um ensaio de *Western blot* com beta-actina. Desta forma, constatamos que a qualidade da proteína extraída não era afetada de forma significativa quando as ilhotas eram cultivadas por até 16 h (Figura 9).

Figura 9. Representação do ensaio de *Western blot* com beta-actina para avaliação da qualidade da proteína extraída de ilhotas mantidas em cultura por 8, 12, 14, 16 e 18 h em meio RPMI 1640, com 2% SFB e 5,6 mM de glicose em comparação com ilhotas recém-isoladas (IF- “ilhota fresca”).

3.9 Quantificação do conteúdo das proteínas GIPR e GLP1R por *Western blot*

Após o isolamento, as ilhotas foram mantidas em cultura e submetidas aos tratamentos com oligômeros de amilina e palmitato conforme demonstrado no delineamento experimental do estudo e procedeu-se à análise da expressão das proteínas GIPR e GLP1R por *Western blot* de acordo com a padronização descrita no item anterior. As leituras das membranas foram realizadas no aparelho ImageQuant™ 350 (GE Healthcare, EUA) e a densitometria das bandas foi feita utilizando-se o *software* ImageQuant TL (GE Healthcare, EUA).

3.10 Padronização da técnica de imunohistoquímica em cortes de pâncreas humano

Pelas dificuldades técnicas relacionadas à metodologia de *Western blot*, procedemos à padronização da técnica de imunohistoquímica como uma metodologia alternativa para avaliação da expressão das proteínas GIPR e GLP1R. Como controle positivo para a padronização desta técnica foram utilizados cortes histológicos de tecido pancreático humano.

Foi realizada a desparafinização de cortes de pâncreas humano de 3 µm de espessura, do material incluído em parafina por meio da incubação inicial com xilol a 60°C por 15 min, seguido de uma segunda incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 min. A hidratação dos cortes foi feita em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 80% e 70%). A recuperação antigênica foi realizada mediante incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 (Merck, E.U.A.) por 40 min, sendo posteriormente lavadas com água destilada.

Procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída em metanol por 10 min, três vezes, e então as lâminas foram lavadas novamente com água destilada, seguida de lavagem com solução salina tamponada com PBS 10 mM pH 7,4 por 5 min. O bloqueio de proteínas foi realizado por meio de incubação com Cas Block (Zymed) por 10 min a 37°C.

Os anticorpos primários GIPR e GLP1R (Santa Cruz Biotechnologies) foram diluídos em solução de BSA (SIGMA, E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN₃ (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS. As lâminas foram incubadas com os anticorpos diluídos (GIPR- 1:50; GLP1R- 1:50, 1:100, 1:200) em câmara úmida por 30 min a 37°C e 18 h a 4°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o bloqueador pós-primário (Post PrimaryBlock, Novo Link Max Polymer Detection System, Newcastle, Reino Unido), por 30 min a 37°C. Após lavagens com PBS, procedeu-se a incubação com NovoLink (Polimer) do mesmo estojo comercial por 30 min a 37°C.

As lâminas foram novamente lavadas e seguiu-se a revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, E.U.A.) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfoxido (Labsynth) a 1% em PBS, em

banho de 5 min a 37°C, a contracoloração com Hematoxilina de Harris por 1 min e imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguida de lavagens em água corrente e água destilada. A desidratação dos cortes foi feita em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto, diafanização em banhos de xilol e montagem em meio permanente (Entellan Merck) com lamínula.

De acordo com a padronização da técnica, as diluições dos anticorpos anti GIPR e anti GLP1R foram definidas como 1:50 e 1:100, respectivamente. Desta forma, foi possível obter a melhor marcação específica contra a proteína alvo, conforme demonstrado nas Figuras 10 e 11.

Figura 10. Fotomicrografias de tecido de pâncreas humano com imunomarcção positiva para GIPR. Aumentos de 50, 100, 200 e 400 vezes.

Figura 11. Fotomicrografias de tecido de pâncreas humano com imunomarcção positiva para GLP1R. Aumentos de 50, 100, 200 e 400 vezes.

3.11 Padronização da técnica de imunohistoquímica em ilhotas de rato

Cerca de 500 ilhotas foram isoladas e mantidas em cultura por 24 h. Após este período, as células foram coletadas, transferidas para tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL, lavadas com HBSS e incubadas por 10 min com 1 mL de solução de formalina tamponada. As células foram centrifugadas a 800xg por 5 min e lavadas duas vezes com HBSS. A seguir, as ilhotas foram incubadas com 1 mL de etanol absoluto e, no período final de incubação, foram adicionados 20 µL de eosina com o intuito de facilitar a visualização do *pellet* de células. As ilhotas foram centrifugadas e submetidas novamente à incubação com etanol. Após esta etapa, as células foram incubadas duas vezes com 1 mL de xilol por 1 min e centrifugadas. Ao *pellet* assim formado foram adicionados vagarosamente cerca de 200 µL de parafina líquida (60°C). O material permaneceu incubado a 60°C por 10 min para possibilitar a precipitação das ilhotas, seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 min e a -20 °C por mais 10 min. A parafina em estado sólido contendo o *pellet* de ilhotas foi submetida ao reemblocamento em parafina. Foram obtidos cortes de 3 µm em micrótomo rotativo que foram desparafinados por meio da incubação inicial com xilol a 60°C por 15 min, seguido de uma segunda incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 min e hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 80% e 70%). Após lavagem com água destilada, os corte foram submetidos à técnica de imunohistoquímica conforme a padronização descrita no item anterior.

Desta forma, não foi possível obter uma imunomarcção positiva intensa o suficiente para permitir uma avaliação semi-quantitativa da expressão das proteínas GIPR (Figura 12) e GLP1R (Figura 13) nas ilhotas, motivo pelo qual a metodologia não foi utilizada no estudo.

Figura 12. Fotomicrografias de cortes histológicos de ilhotas de ratos com imunomarcacão positiva para GIPR. Aumento de 400 vezes.

Figura 13. Fotomicrografias de cortes histológicos de ilhotas de ratos com imunomarcacão positiva para GLP1R. Aumento de 400 vezes.

3.12 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa JMP. Na análise dos resultados de experimentos de avaliação de expressão gênica contendo mais de duas condições experimentais foi aplicado o teste não paramétrico Dwass-Steel-Chritchlow-Fligner. Nos experimentos de avaliação da expressão gênica e de expressão proteica contendo apenas duas condições experimentais, foi aplicado o teste da mediana. Para a análise dos dados dos experimentos de avaliação do índice de apoptose, foi feita a comparação entre as diferentes condições experimentais utilizando-se a análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Tukey-Kramer.

A hipótese de nulidade foi rejeitada sempre que o valor de P era menor que 5%. Os dados foram apresentados como média $\pm$ DP (desvio padrão).

Resultados

4. Resultados

4.1 Quantificação do conteúdo do mRNA de *Gipr* e *Glp1r* por RT-qPCR

A avaliação da expressão do mRNA de *Gipr* e *Glp1r* em ilhotas expostas à amilina humana e à lipotoxicidade por 24 h revelou que o tratamento com oligômeros de amilina foi capaz de modular negativamente a expressão de ambos os receptores, enquanto o palmitato não provocou alterações na expressão destes genes em relação ao grupo controle (Figura 14). A mesma avaliação feita após 48 h de tratamento demonstrou que os oligômeros de amilina provocaram um aumento na expressão do mRNA de *Gipr* e *Glp1r* enquanto o palmitato isoladamente modulou positivamente apenas a expressão de *Gipr* (Figura 15). Após 4 h de exposição, a amilina não provocou efeito modulatório sobre a expressão do mRNA de *Gipr* e *Glp1r* (Figura 16), o que só ocorreu após 8 h de exposição, condição em que os oligômeros de amilina modularam negativamente a expressão destes genes (Figura 17).

Figura 14. Gráficos representativos da expressão do mRNA dos genes *Gipr* e *Glp1r* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentração fisiológica de glicose (5,6 mM) expostas a 0,1% de metanol (Controle), a 0,5 mM de Palmitato, a 10 μ M de oligômeros de amilina ou a oligômeros de amilina + Palmitato durante 24 horas. Três experimentos independentes com triplicatas biológicas realizadas em duplicata. *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Figura 15. Gráficos representativos da expressão do mRNA dos genes *Gipr* e *Glp1r* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentração fisiológica de glicose (5,6 mM) expostas a 0,1% de metanol (Controle), a 0,5 mM de Palmitato, a 10 μ M de oligômeros de amilina ou a oligômeros de amilina + Palmitato durante 48 horas. Dois experimentos independentes com triplicatas biológicas realizadas em duplicata. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle,; † $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com palmitato.

Figura 16. Gráficos representativos da expressão do mRNA dos genes *Gipr* e *Glp1r* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentração fisiológica de glicose (5,6 mM) sem tratamento (Controle) ou expostas a 10 μ M de oligômeros de amilina (Amilina) durante 4 horas. Dois experimentos independentes com triplicatas biológicas realizadas em duplicata.

Figura 17. Gráficos representativos da expressão do mRNA dos genes *Gipr* e *Glp1r* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentração fisiológica de glicose (5,6 mM) sem tratamento (Controle) ou expostas a 10 μ M de oligômeros de amilina (Amilina) durante 8 horas. Dois experimentos independentes com triplicatas biológicas realizadas em duplicata, *p<0,05.

4.2 Avaliação do índice de apoptose celular pela quantificação da atividade proteolítica da caspase-3

A avaliação do índice de apoptose das ilhotas expostas à amilina humana e à lipotoxicidade por 48 h demonstrou que a taxa de apoptose celular aumentou quando as ilhotas foram expostas aos oligômeros de amilina, sendo que esta ação não foi potencializada pelo palmitato no período de tempo avaliado (Figura 18).

A quantificação da taxa de apoptose em ilhotas expostas os oligômeros de amilina por 48 h e à albumina glicada (AlbGAD) por 72 horas revelou que os AGEs também não potencializam o efeito pró-apoptótico da amilina (Figura 19).

Figura 18. Gráfico representativo do índice de apoptose das ilhotas pancreáticas nas diferentes condições experimentais. Ilhotas pancreáticas foram mantidas em concentração fisiológica de glicose (5,6 mM) expostas a 0,1% de metanol (Controle), a 0,5 mM de Palmitato, a 10 μ M de oligômeros de amilina ou a oligômeros de amilina (10 μ M) + Palmitato (0,5 mM) durante 48 horas. Três experimentos independentes com triplicatas biológicas realizadas em duplicata, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; † $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com palmitato.

Figura 19. Gráfico representativo do índice de apoptose das ilhotas pancreáticas nas diferentes condições experimentais. Após pré-incubação por 24 horas com 5 mg/mL de albumina controle (AlbCTR) ou de albumina glicada (AlbGAD), as ilhotas pancreáticas foram mantidas em concentração suprafisiológica de glicose (23 mM) expostas a 5mg/ mL de AlbCTR, a 5 mg/ mL de AlbGAD, a 10 μ M de oligômeros de amilina + AlbCTR ou a oligômeros de amilina (10 μ M) + AlbGAD durante 48 horas. Três experimentos independentes com triplicatas biológicas realizadas em duplicata, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.3 Avaliação da expressão das proteínas GIPR e GLP1R por *Western blot*

A avaliação da expressão das proteínas GIPR e GLP1R nas ilhotas expostas à amilina humana e à lipotoxicidade após os tempos de exposição de 24 e 48 h não pôde ser realizada. Durante a realização dos experimentos, percebemos que a qualidade das proteínas extraídas destas células era bastante inferior àquelas extraídas das ilhotas utilizadas no processo de padronização (ilhotas recém-isoladas) e, por isso, não conseguimos obter resultados satisfatórios nos ensaios de *Western blot* das ilhotas tratadas nos períodos de tempo mais longos, conforme demonstrado na Figura 20 para a expressão do GIPR após 24 h de tratamento.

Após 12 horas de tratamento, os oligômeros de amilina não provocaram alteração na expressão das proteínas GIPR e GLP1R, conforme demonstrado nas

Figuras 21 e 22, respectivamente. Não foi possível realizar a densitometria das bandas correspondentes ao GIPR e ao GLP1R nas membranas de *Western blot* do experimento no qual a exposição à amilina foi realizada durante 15 h, devido à baixa intensidade das bandas referente às proteínas alvo, provavelmente em função da presença muito próxima de uma banda inespecífica bastante intensa (Figura 23).

A morfologia das ilhotas expostas ou não aos oligômeros de amilina por 15 h estão representadas na Figura 24. Nota-se que a integridade das ilhotas pancreáticas está mais preservada nos ilhotas não expostas à amilina.

Figura 20. Representação dos resultados dos ensaios de *Western blot* para GIPR em ilhotas tratadas por 24 horas. (C+: ilhotas recém-isoladas; M: marcador de peso molecular; 1: ilhotas controle; 2: ilhotas tratadas com palmitato (0,5 mM); 3: ilhotas tratadas com oligômeros de amilina (10 μ M); 4: ilhotas tratadas com oligômeros de amilina + palmitato).

Figura 21. Representação dos experimentos de Western blot conduzidos para avaliação da expressão da proteína GIPR em ilhotas pancreáticas mantidas em cultura em concentração fisiológica de glicose (5,6 mM) sem tratamento (CTRL) ou tratadas com 10 μ M de oligômeros de amilina humana (AM) por 12 horas. Dois experimentos independentes com triplicatas biológicas.

Figura 22. Representação dos experimentos de Western blot conduzidos para avaliação da expressão da proteína GLP1R em ilhotas pancreáticas mantidas em cultura em concentração fisiológica de glicose (5,6 mM) sem tratamento (CTRL) ou tratadas com 10 μ M de oligômeros de amilina humana (AM) por 12 horas. Dois experimentos independentes com triplicatas biológicas.

Figura 23. Representação do ensaios de *Western blot* conduzidos para avaliação da expressão das proteínas GIPR e GLP1R em ilhotas pancreáticas mantidas em cultura em concentração fisiológica de glicose (5,6 mM) sem tratamento (CTRL) ou tratadas com 10 μ M oligômeros de amilina humana (AM) por 15 horas. Um experimento com triplicatas biológicas.

Figura 24. Fotomicrografias de ilhotas pancreáticas de rato mantidas em cultura em concentração fisiológica de glicose (5,6 mM) por 15 horas sem tratamento (A) ou tratadas com oligômeros de amilina humana (B). Aumentos de 50, 100, 200 e 400 vezes.

Discussão

5. Discussão

O DM2 é uma condição caracterizada por uma perda progressiva da massa e da função de células beta ao longo do curso da doença.¹²² Tem sido demonstrado que dentre os fatores que exercem efeitos deletérios sobre a função destas células estão o depósito amiloide, a glico e a lipotoxicidade. Há evidências de que os oligômeros de amilina constituem a forma mais tóxica do amiloide, porém ainda existem dúvidas em relação aos mecanismos envolvidos na citotoxicidade exercida pelos oligômeros de amilina sobre as células beta e como este fator interage com outras condições concomitantes presentes no diabetes, como a hiperglicemia e a hiperlipemia.

O estudo prévio desenvolvido em nosso laboratório, de análise do perfil de expressão gênica de ilhotas pancreáticas de rato expostas à amilina humana com o uso da técnica de microarranjos de cDNA, resultou em achados que sugeriram que os oligômeros de amilina poderiam modular negativamente a expressão do gene que codifica o receptor de GIP (*Gipr*) após 24 horas de exposição. No mesmo estudo foi abordado o papel da glicotoxicidade sobre os efeitos deletérios da forma agregante da amilina nas ilhotas *in vitro*, porém nenhum tipo de modulação pela glicose foi observado.

Considerando a importância do efeito das incretinas sobre o controle glicêmico pós-prandial e sua implicação na fisiopatologia do DM2, resolvemos investigar o papel dos oligômeros de amilina sobre a expressão dos receptores de GIP e GLP-1 em ilhotas pancreáticas de rato mantidas em cultura. Apesar de o estudo do nosso laboratório não ter evidenciado a modulação da expressão do mRNA de *Glp1r* em ilhotas tratadas com oligômeros de amilina, resolvemos incluir este receptor devido à importância do GLP-1 no controle glicêmico.

Após constatarmos a ausência de modulação dos efeitos tóxicos da amilina pela glicotoxicidade, procedemos à análise de outra condição metabólica presente no DM2, a qual classicamente se atribui um efeito deletério sobre as células beta: a lipotoxicidade. Dados na literatura apontam que os ácidos graxos poderiam exercer um papel importante na formação do amiloide, uma vez que estudos *in vivo* demonstram que modelos de animais transgênicos para amilina humana só passam a desenvolver o depósito amiloide após submissão a dietas hiperlipídicas.³⁶⁻³⁸

Conforme demonstrado em nossos experimentos e segundo dados prévios da literatura, os ácidos graxos são capazes de exercer efeitos tóxicos sobre as ilhotas pancreáticas *in vitro* apenas a partir de tempos de exposição mais prolongados. Um estudo conduzido por Kharroubi e cols. avaliou o efeito do palmitato (0,5 mM) sobre ilhotas de rato em cultura após diferentes tempos de exposição e revelou que o composto só passa a exercer efeito tóxico significativo sobre estas células após 72 horas de tratamento, ao contrário do observado em tempos mais curtos (24 e 48 horas).⁷ Também já foi demonstrado que o ácido palmítico é capaz de exercer efeitos tóxicos sobre ilhotas humanas e linhagens de células beta de rato em tempos de exposição mais precoces apenas quando age sinergicamente com altas concentrações de glicose.¹²³ Por esta razão, além de realizarmos os estudos utilizando o tempo de exposição de 24 horas, também estendemos a avaliação para 48 horas, mesmo sabendo que este ainda não seria o tempo de exposição suficiente para observarmos um efeito pró-apoptótico significativo do palmitato sobre as ilhotas, mas trata-se do tempo máximo que poderia ser utilizado para se trabalhar com a amilina *in vitro*.

Após 24 horas de exposição, o tratamento das ilhotas com oligômeros de amilina provocou uma diminuição na expressão do mRNA tanto de *Gipr* quanto de *Glp1r*, enquanto o palmitato não provocou alterações na expressão destes genes. Estes dados confirmam os resultados do estudo anterior, onde havíamos observado uma modulação negativa de *Gipr* pelos oligômeros de amilina, e nos permitiu constatar que o mesmo ocorre com o receptor de GLP-1.

A literatura tem abordado muito a redução do efeito incretina, ou seja, a diminuição da secreção de insulina em resposta aos hormônios gastrointestinais GIP e GLP-1 participando da fisiopatologia do DM2.⁸⁰ Esses dois hormônios, juntos, contribuem para 50–70% da resposta de insulina pós-prandial após a ingestão oral de glicose, o que cai para 20% nos portadores de DM 2. As razões para essa perda da atividade das incretinas ainda é apenas parcialmente compreendida.¹²⁴

Uma possível redução na secreção destes hormônios pelos portadores de DM2 tem sido descartada, levando em conta os resultados dos estudos mais recentes. Em relação ao GIP, a maioria dos estudos tem demonstrado que pacientes com DM2 apresentam secreção deste hormônio maior ou igual a de indivíduos saudáveis.¹²⁵ Há controvérsia quanto aos dados envolvendo a secreção de GLP-1, porém a maior parte dos estudos reporta que a secreção deste hormônio em resposta à glicose via oral é semelhante entre indivíduos diabéticos e controles saudáveis, apesar de haver relatos de pequena redução na secreção deste polipeptídeo em pacientes com DM2.¹²⁶ Uma meta-análise recentemente publicada não corroborou a existência de um defeito na secreção do GLP-1 e atribuiu os achados discordantes nos diferentes estudos a fatores relacionados às características basais das populações estudadas que poderiam modular as concentrações de GLP-1, tais como grau de obesidade e idade (maior

peso e idade mais avançada estão associados a maiores concentrações de GLP-1), concentrações plasmáticas de glucagon (maior glucagonemia está associada a menores concentrações de GLP-1), além de uso de medicamentos, tais como metformina e acarbose, que podem elevar as concentrações de GLP-1.¹²⁷

Diante desses resultados, a hipótese que tem sido mais aceita atualmente é que a redução do efeito incretina não se deva a diminuições nas concentrações de GIP e GLP-1, mas que o efeito insulínico das incretinas, especialmente do GIP, esteja diminuído nos pacientes com DM2, uma vez que nestes indivíduos observa-se uma resistência à ação deste hormônio.¹²⁸ No entanto, permanece a dúvida se esta menor resposta da célula beta ao GIP é um defeito específico para esta incretina ou se simplesmente reflete o comprometimento geral da célula beta observado nos portadores de DM2.

Questiona-se ainda a possível diminuição na expressão dos receptores de GIP em células beta de pacientes portadores de DM2.¹²⁹ Já foi demonstrado que ratos diabéticos obesos (VDF- *Vancouver diabetic fatty Zucker*) apresentam redução na secreção de insulina estimulada por GIP, associada à diminuição na expressão do mRNA e da proteína de GIPR nas ilhotas pancreáticas.¹³⁰ Além disso, a análise de ilhotas de ratos submetidos à pancreatectomia parcial e mantidos em hiperglicemia crônica mostram redução na expressão gênica de GIPR e de GLP1R.⁸² Estes achados sugerem que alterações na expressão destes receptores possam estar associados à fisiopatologia do DM2.

A redução na expressão do mRNA de *Gipr* e *Glp1r* nas ilhotas pancreáticas de rato após incubação durante 24 horas com amilina observada no presente estudo, poderia sugerir que a redução do efeito incretina observada no DM2 também poderia

ser consequência dos efeitos deletérios da amilina sobre as células beta, contribuindo para a diminuição da secreção pós-prandial de insulina. Entretanto, não foi possível avaliar a expressão das proteínas GIPR e GLP1R por *Western blot* após este período de exposição, pois a manutenção das ilhotas em cultura acarreta a perda da viabilidade celular, resultando em degradação proteica. Por este motivo, avaliamos o tempo de exposição mínimo necessário para se observar o efeito modulatório negativo da amilina sobre a expressão dos genes *Gipr* e *Glp1r*. Deste modo, constatamos que este tempo mínimo de tratamento das ilhotas com oligômeros de amilina seria 8 horas. Considerando o intervalo de tempo existente entre a redução na expressão do mRNA de um gene e a subsequente diminuição na expressão da respectiva proteína, avaliamos a expressão de GIPR e GLP1R por *Western blot* após 12 horas de tratamento¹³¹. Após este período de exposição, a amilina não foi capaz de exercer modulação sobre a expressão proteica dos receptores de incretinas, portanto, não refletindo a redução observada na expressão gênica de *Gipr* e *Glp1r*.

O tratamento das ilhotas por 48 horas, entretanto, evidenciou um efeito inverso, no qual a amilina modulou positivamente a expressão dos genes *Gipr* e *Glp1r*. Levando em consideração que a ativação destes receptores está relacionada com a ativação de vias que estimulam a proliferação e sobrevivência de células beta, o aumento na expressão do mRNA destes receptores provocado pela amilina após 48 horas de incubação poderia ser um mecanismo de compensação das células frente aos efeitos tóxicos dos oligômeros de amilina.

Em razão da limitação técnica imposta pelos ensaios de avaliação de expressão proteica, ainda restam dúvidas se, em períodos de exposição mais prolongados (acima de 12 horas) seria possível detectar uma redução na expressão

proteica e, ainda, se este efeito da amilina sobre a expressão de GIPR e GLP1R prevaleceria *in vivo*. É digno de nota mencionar que a maior parte dos estudos em cultura celular que investiga os efeitos da amilina sobre ilhotas pancreáticas ou sobre linhagens de células beta o faz em períodos menores que 24 horas e ainda, que esse período já é suficiente para a amilina induzir apoptose significativa das ilhotas, conforme observamos em estudo anterior realizado por nosso grupo.

O tratamento das ilhotas com palmitato por 48 horas provocou um aumento na expressão do mRNA de *Gipr*. Um estudo conduzido por Lynn e cols. demonstrou que o palmitato aumenta a expressão gênica e proteica de GIPR na linhagem de células beta INS 823/13 após 24 horas de exposição secundariamente à ligação e ativação de PPAR γ (receptor ativado por proliferadores do peroxisoma). Entretanto, em presença de alta concentração de glicose, o palmitato exerce efeito contrário, e modula negativamente a expressão de GIPR. Dados do estudo demonstram que, mesmo com o aumento na expressão de GIPR, não há aumento na secreção de insulina estimulada por GIP em ilhotas de rato, sugerindo que o GIPR possa ter outra função em células beta, além da indução da secreção de insulina.⁸¹

A avaliação do índice de apoptose das ilhotas expostas à amilina e à lipotoxicidade pela quantificação da atividade de caspase-3 (caspase efetora do processo de apoptose) demonstrou que os oligômeros de amilina exercem efeito tóxico sobre as ilhotas pancreáticas *in vitro*, sendo que este efeito pró-apoptótico da amilina não foi modulado pelo palmitato.

O achado de que camundongos transgênicos para o gene da amilina humana apenas desenvolvem o depósito amiloide após ingestão prolongada de dieta rica em lipídios sugeriam que a presença de ácidos graxos era importante para a formação do

depósito amiloide. Nossos achados sugerem que a citotoxicidade da amilina humana não é potencializada pelo palmitato, ao menos *in vitro*, nas condições experimentais testadas. Possíveis explicações para justificar os efeitos da dieta rica em lipídios no desenvolvimento do depósito amiloide observado *in vivo* poderiam ser: (1) a indução da expressão de amilina pelo palmitato, já demonstrada em linhagem de células MIN6 e em ilhotas pancreáticas de camundongos¹⁸, (2) aumento da secreção de amilina estimulada pela dieta hiperlipídica³⁹ e (3) estímulo para a polimerização da amilina por ácidos graxos.⁴⁰

Além da lipotoxicidade, também avaliamos o efeito dos AGEs sobre o efeito citotóxico da amilina. Dados da literatura apontam que os AGEs desempenham um importante papel no desenvolvimento do depósito amilóide, uma vez que há evidências da existência de amilina glicada em pacientes com DM2 e de que a amilina modificada por glicação é mais propensa à polimerização e mais tóxica em comparação ao peptídeo não glicado.¹³²

A avaliação do índice de apoptose das ilhotas expostas à amilina e à albumina glicada demonstrou novamente que os oligômeros de amilina exercem efeito pró-apoptótico sobre as ilhotas pancreáticas após 48 horas, sendo que este efeito não foi potencializado pela exposição à albumina glicada por 72 horas. Esse tempo foi escolhido, pois um estudo realizado em nosso laboratório havia demonstrado que em tempos de exposição de 24 e 48 horas, os AGEs diminuem o índice de apoptose das ilhotas pancreáticas, enquanto o aumenta após 72 horas.¹¹⁹ Nenhum trabalho da literatura havia investigado os efeitos dessa associação sobre as ilhotas pancreáticas, mas há dados que demonstram que células que hiperexpressam receptores de AGEs (RAGE) ficam hipersensibilizadas para a morte celular induzida por peptídeo

amiloide beta.¹³³ Entretanto, dados do nosso laboratório demonstram que, após o período de 72 horas, o tratamento das ilhotas com albumina glicada não provoca alteração na expressão do gene que codifica o RAGE (*Ager*) em comparação à condição controle.¹¹⁹ A ausência de significância estatística no experimento no qual se avaliou o índice de apoptose de ilhotas tratadas com AGE por 72 horas, que foi inesperada, pode refletir o efeito pró-apotótico muito mais importante da amilina em comparação ao AGE, de forma que na análise estatística que considera todos os grupos experimentais, a significância estatística do AGE em relação ao controle não apareça. Esse importante efeito da amilina sobre a apoptose também poderia justificar a falta de modulação de seu efeito por outras condições sabidamente associadas à apoptose das ilhotas pancreáticas, como os AGEs e a lipotoxicidade.

Conclusão

6. Conclusão

Em conclusão, após 8 e 24 horas de exposição, a amilina provoca diminuição na expressão do mRNA de *Gipr* e *Glp1r*. Entretanto, a alteração observada no mRNA destes receptores não se refletiu na expressão das proteínas GIPR e GLP1R no período de tempo avaliado (12 horas). Após 48 horas, o efeito é inverso e os oligômeros passam a exercer modulação positiva sobre a expressão destes genes. Nas condições experimentais avaliadas, a modulação na expressão gênica dos receptores de incretinas pela amilina e seu efeito pró-apoptótico sobre as ilhotas não são influenciados pela lipotoxicidade. O efeito pró-apoptótico da amilina também não foi modulado pela presença de AGEs.

7. Referências Bibliográficas

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. Dec 2001;414(6865):782-787.
2. Association AD. Standards of medical care in diabetes-2011. Vol 34. *Diabetes Care*; 2011:S11-61.
3. Ferrannini E. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev*. Aug 1998;19(4):477-490.
4. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. Jan 2003;52(1):102-110.
5. Jonas JC, Bensellam M, Duprez J, Elouil H, Guiot Y, Pascal SM. Glucose regulation of islet stress responses and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. Nov 2009;11 Suppl 4:65-81.
6. McGarry JD, Dobbins RL. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia*. Feb 1999;42(2):128-138.
7. 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-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology*. Nov 2004;145(11):5087-5096.
8. Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L, et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci*. Jul 2008;121(Pt 14):2308-2318.
9. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*. May 2008;29(3):351-366.

10. Lukinius A, Wilander E, Westermark GT, Engström U, Westermark P. Co-localization of islet amyloid polypeptide and insulin in the B cell secretory granules of the human pancreatic islets. *Diabetologia*. Apr 1989;32(4):240-244.
11. Dechenes CJ, Verchere CB, Andrikopoulos S, Kahn SE. Human aging is associated with parallel reductions in insulin and amylin release. *Am J Physiol*. Nov 1998;275(5 Pt 1):E785-791.
12. Mulder H, Ahrén B, Sundler F. Islet amyloid polypeptide and insulin gene expression are regulated in parallel by glucose in vivo in rats. *Am J Physiol*. Dec 1996;271(6 Pt 1):E1008-1014.
13. Shepherd LM, Campbell SC, Macfarlane WM. Transcriptional regulation of the IAPP gene in pancreatic beta-cells. *Biochim Biophys Acta*. Nov 2004;1681(1):28-37.
14. Ionescu-Tirgoviste C. The role of the pancreatic amyloid in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Proc. Rom. Acad.* 2010;1:21-34.
15. Lutz TA, Geary N, Szabady MM, Del Prete E, Scharrer E. Amylin decreases meal size in rats. *Physiol Behav*. Dec 1995;58(6):1197-1202.
16. Bennett RG, Duckworth WC, Hamel FG. Degradation of amylin by insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem*. Nov 2000;275(47):36621-36625.
17. Alarcon C, Verchere CB, Rhodes CJ. Translational Control of Glucose-Induced Islet Amyloid Polypeptide Production in Pancreatic Islets. *Endocrinology*. Mar 2012.
18. Qi D, Cai K, Wang O, et al. Fatty acids induce amylin expression and secretion by pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Jan 2010;298(1):E99-E107.
19. Kautzky-Willer A, Thomaseth K, Pacini G, et al. Role of islet amyloid polypeptide secretion in insulin-resistant humans. *Diabetologia*. Feb 1994;37(2):188-194.

20. Enoki S, Mitsukawa T, Takemura J, et al. Plasma islet amyloid polypeptide levels in obesity, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* Jan 1992;15(1):97-102.
21. Christopoulos G, Perry K, Morfis M, et al. Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol.* 1999 Jul 1999;56(1):235-242.
22. Muff R, Bühlmann N, Fischer JA, Born W. An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology.* Jun 1999;140(6):2924-2927.
23. Gibbons C, Dackor R, Dunworth W, Fritz-Six K, Caron KM. Receptor activity-modifying proteins: RAMPing up adrenomedullin signaling. *Mol Endocrinol.* Apr 2007;21(4):783-796.
24. Woods SC, Lutz TA, Geary N, Langhans W. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Jul 2006;361(1471):1219-1235.
25. Cornish J, Callon KE, Cooper GJ, Reid IR. Amylin stimulates osteoblast proliferation and increases mineralized bone volume in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 1995;207(1):133-139.
26. Villa I, Melzi R, Pagani F, Ravasi F, Rubinacci A, Guidobono F. Effects of calcitonin gene-related peptide and amylin on human osteoblast-like cells proliferation. *Eur J Pharmacol.* Dec 2000;409(3):273-278.
27. Hoogwerf BJ, Doshi KB, Diab D. Pramlintide, the synthetic analogue of amylin: physiology, pathophysiology, and effects on glycemic control, body weight, and selected biomarkers of vascular risk. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(2):355-362.
28. Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). *N Engl J Med.* Jun 1980;302(23):1283-1292.

29. Haataja L, Gurlo T, Huang CJ, Butler PC. Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocr Rev.* May 2008;29(3):303-316.
30. Green J, Goldsbury C, Mini T, et al. Full-length rat amylin forms fibrils following substitution of single residues from human amylin. *J Mol Biol.* Feb 2003;326(4):1147-1156.
31. Höppener JW, Nieuwenhuis MG, Vroom TM, Ahrén B, Lips CJ. Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus: consequence or cause? *Mol Cell Endocrinol.* Nov 2002;197(1-2):205-212.
32. Westermark P, Li ZC, Westermark GT, Leckström A, Steiner DF. Effects of beta cell granule components on human islet amyloid polypeptide fibril formation. *FEBS Lett.* Feb 1996;379(3):203-206.
33. Janciauskiene S, Eriksson S, Carlemalm E, Ahrén B. B cell granule peptides affect human islet amyloid polypeptide (IAPP) fibril formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 1997;236(3):580-585.
34. Pieber TR, Stein DT, Ogawa A, et al. Amylin-insulin relationships in insulin resistance with and without diabetic hyperglycemia. *Am J Physiol.* Sep 1993;265(3 Pt 1):E446-453.
35. Novials A, Sarri Y, Casamitjana R, Rivera F, Gomis R. Regulation of islet amyloid polypeptide in human pancreatic islets. *Diabetes.* Oct 1993;42(10):1514-1519.
36. Verchere CB, D'Alessio DA, Palmiter RD, et al. Islet amyloid formation associated with hyperglycemia in transgenic mice with pancreatic beta cell expression of human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 1996;93(8):3492-3496.
37. Westermark GT, Gebre-Medhin S, Steiner DF, Westermark P. Islet amyloid development in a mouse strain lacking endogenous islet amyloid polypeptide (IAPP) but expressing human IAPP. *Mol Med.* Dec 2000;6(12):998-1007.

38. Hull RL, Andrikopoulos S, Verchere CB, et al. Increased dietary fat promotes islet amyloid formation and beta-cell secretory dysfunction in a transgenic mouse model of islet amyloid. *Diabetes*. Feb 2003;52(2):372-379.
39. Westermark GT, Leckström A, Ma Z, Westermark P. Increased release of IAPP in response to long-term high fat intake in mice. *Horm Metab Res*. May 1998;30(5):256-258.
40. Ma Z, Westermark GT. Effects of free fatty acid on polymerization of islet amyloid polypeptide (IAPP) in vitro and on amyloid fibril formation in cultivated isolated islets of transgenic mice overexpressing human IAPP. *Mol Med*. Dec 2002;8(12):863-868.
41. Marzban L, Park K, Verchere CB. Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. *Exp Gerontol*. Apr 2003;38(4):347-351.
42. Opie EL. THE RELATION OF DIABETES MELLITUS TO LESIONS OF THE PANCREAS. HYALINE DEGENERATION OF THE ISLANDS OF LANGERHANS. *J Exp Med*. Mar 1901;5(5):527-540.
43. Westermark P. Amyloid and polypeptide hormones: what is their relationship? Vol 1. *Int. J. Exp. Clin. Invest* 1994:47-60.
44. Maloy AL, Longnecker DS, Greenberg ER. The relation of islet amyloid to the clinical type of diabetes. *Hum Pathol*. Oct 1981;12(10):917-922.
45. Hull RL, Westermark GT, Westermark P, Kahn SE. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. Aug 2004;89(8):3629-3643.
46. Guardado-Mendoza R, Davalli AM, Chavez AO, et al. Pancreatic islet amyloidosis, beta-cell apoptosis, and alpha-cell proliferation are determinants of islet remodeling in type-2 diabetic baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 2009;106(33):13992-13997.

47. de Koning EJ, Bodkin NL, Hansen BC, Clark A. Diabetes mellitus in *Macaca mulatta* monkeys is characterised by islet amyloidosis and reduction in beta-cell population. *Diabetologia*. May 1993;36(5):378-384.
48. Butler AE, Jang J, Gurlo T, Carty MD, Soeller WC, Butler PC. Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes. *Diabetes*. Jun 2004;53(6):1509-1516.
49. Clark A, Wells CA, Buley ID, et al. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res*. Dec 1988;9(4):151-159.
50. Marzban L, Tomas A, Becker TC, et al. Small interfering RNA-mediated suppression of proislet amyloid polypeptide expression inhibits islet amyloid formation and enhances survival of human islets in culture. *Diabetes*. Nov 2008;57(11):3045-3055.
51. Potter KJ, Scrocchi LA, Warnock GL, et al. Amyloid inhibitors enhance survival of cultured human islets. *Biochim Biophys Acta*. Jun 2009;1790(6):566-574.
52. Westermark P, Eizirik DL, Pipeleers DG, Hellerström C, Andersson A. Rapid deposition of amyloid in human islets transplanted into nude mice. *Diabetologia*. May 1995;38(5):543-549.
53. Westermark GT, Westermark P, Nordin A, Törneltius E, Andersson A. Formation of amyloid in human pancreatic islets transplanted to the liver and spleen of nude mice. *Ups J Med Sci*. 2003;108(3):193-203.
54. Westermark P, Andersson A, Westermark GT. Is aggregated IAPP a cause of beta-cell failure in transplanted human pancreatic islets? *Curr Diab Rep*. Jun 2005;5(3):184-188.

55. Westermark GT, Davalli AM, Secchi A, et al. Further evidence for amyloid deposition in clinical pancreatic islet grafts. *Transplantation*. Jan 2012;93(2):219-223.
56. Udayasankar J, Kodama K, Hull RL, et al. Amyloid formation results in recurrence of hyperglycaemia following transplantation of human IAPP transgenic mouse islets. *Diabetologia*. Jan 2009;52(1):145-153.
57. Khemtémourian L, Killian JA, Höppener JW, Engel MF. Recent insights in islet amyloid polypeptide-induced membrane disruption and its role in beta-cell death in type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res*. 2008;2008:421287.
58. Konarkowska B, Aitken J, Kistler J, Zhang S, Cooper G. The aggregation potential of human amylin determines its cytotoxicity towards islet beta-cells. *FEBS J*. 2006 Aug 2006;273(15):3614-3624.
59. Bai JZ, Saafi EL, Zhang S, Cooper GJ. Role of Ca²⁺ in apoptosis evoked by human amylin in pancreatic islet beta-cells. *Biochem J*. Oct 1999;343 Pt 1:53-61.
60. Zhang S, Liu J, Dragunow M, Cooper GJ. Fibrillogenic amylin evokes islet beta-cell apoptosis through linked activation of a caspase cascade and JNK1. *J Biol Chem*. Dec 2003;278(52):52810-52819.
61. Zhang S, Liu H, Liu J, Tse CA, Dragunow M, Cooper GJ. Activation of activating transcription factor 2 by p38 MAP kinase during apoptosis induced by human amylin in cultured pancreatic beta-cells. *FEBS J*. Aug 2006;273(16):3779-3791.
62. Zhang S, Liu J, Saafi EL, Cooper GJ. Induction of apoptosis by human amylin in RINm5F islet beta-cells is associated with enhanced expression of p53 and p21WAF1/CIP1. *FEBS Lett*. Jul 1999;455(3):315-320.
63. Fan R, Li X, Gu X, Chan JC, Xu G. Exendin-4 protects pancreatic beta cells from human islet amyloid polypeptide-induced cell damage: potential

involvement of AKT and mitochondria biogenesis. *Diabetes Obes Metab.* Sep 2010;12(9):815-824.

64. Zhang S, Liu H, Yu H, Cooper GJ. Fas-associated death receptor signaling evoked by human amylin in islet beta-cells. *Diabetes.* Feb 2008;57(2):348-356.
65. Subramanian SL, Hull RL, Zraika S, Aston-Mourney K, Udayasankar J, Kahn SE. cJUN N-terminal kinase (JNK) activation mediates islet amyloid-induced beta cell apoptosis in cultured human islet amyloid polypeptide transgenic mouse islets. *Diabetologia.* Jan 2012;55(1):166-174.
66. Li XL, Xu G, Chen T, et al. Phycocyanin protects INS-1E pancreatic beta cells against human islet amyloid polypeptide-induced apoptosis through attenuating oxidative stress and modulating JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* Jul 2009;41(7):1526-1535.
67. Zraika S, Hull RL, Udayasankar J, et al. Oxidative stress is induced by islet amyloid formation and time-dependently mediates amyloid-induced beta cell apoptosis. *Diabetologia.* Apr 2009;52(4):626-635.
68. Lim YA, Rhein V, Baysang G, et al. Abeta and human amylin share a common toxicity pathway via mitochondrial dysfunction. *Proteomics.* Apr 2010;10(8):1621-1633.
69. Casas S, Gomis R, Gribble FM, Altirriba J, Knuutila S, Novials A. Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway is a downstream endoplasmic reticulum stress response induced by extracellular human islet amyloid polypeptide and contributes to pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes.* Sep 2007;56(9):2284-2294.
70. Huang CJ, Lin CY, Haataja L, et al. High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes.* Aug 2007;56(8):2016-2027.

71. Hull RL, Zraika S, Udayasankar J, Aston-Mourney K, Subramanian SL, Kahn SE. Amyloid formation in human IAPP transgenic mouse islets and pancreas, and human pancreas, is not associated with endoplasmic reticulum stress. *Diabetologia*. Jun 2009;52(6):1102-1111.
72. Janson J, Ashley R, Harrison D, McIntyre S, Butler P. The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes*. 1999 Mar 1999;48(3):491-498.
73. Mirzabekov TA, Lin MC, Kagan BL. Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *J Biol Chem*. Jan 1996;271(4):1988-1992.
74. Lin CY, Gurlo T, Kayed R, et al. Toxic human islet amyloid polypeptide (h-IAPP) oligomers are intracellular, and vaccination to induce anti-toxic oligomer antibodies does not prevent h-IAPP-induced beta-cell apoptosis in h-IAPP transgenic mice. *Diabetes*. May 2007;56(5):1324-1332.
75. Okada T, Wakabayashi M, Ikeda K, Matsuzaki K. Formation of toxic fibrils of Alzheimer's amyloid beta-protein-(1-40) by monosialoganglioside GM1, a neuronal membrane component. *J Mol Biol*. Aug 2007;371(2):481-489.
76. Novitskaya V, Bocharova OV, Bronstein I, Baskakov IV. Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. *J Biol Chem*. May 2006;281(19):13828-13836.
77. Yates SL, Burgess LH, Kocsis-Angle J, et al. Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem*. Mar 2000;74(3):1017-1025.
78. Janciauskiene S, Ahrén B. Different sensitivity to the cytotoxic action of IAPP fibrils in two insulin-producing cell lines, HIT-T15 and RINm5F cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 1998;251(3):888-893.
79. Oliveira LS. *Perfil de expressão de genes modulados pela amilina em ilhotas pancreáticas de rato*. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2008.

80. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. Jan 1986;29(1):46-52.
81. Lynn FC, Thompson SA, Pospisilik JA, et al. A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) receptor expression in beta cells. *FASEB J*. Jan 2003;17(1):91-93.
82. Xu G, Kaneto H, Laybutt DR, et al. Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes*. Jun 2007;56(6):1551-1558.
83. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. Intestinal factors in the control of insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. Oct 1965;25(10):1317-1324.
84. Brown JC, Dryburgh JR, Ross SA, Dupré J. Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide. *Recent Prog Horm Res*. 1975;31:487-532.
85. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. May 2007;132(6):2131-2157.
86. Kim SJ, Winter K, Nian C, Tsuneoka M, Koda Y, McIntosh CH. Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of bax expression. *J Biol Chem*. Jun 2005;280(23):22297-22307.
87. Ehses JA, Casilla VR, Doty T, et al. Glucose-dependent insulintropic polypeptide promotes beta-(INS-1) cell survival via cyclic adenosine monophosphate-mediated caspase-3 inhibition and regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*. Oct 2003;144(10):4433-4445.
88. Tseng CC, Kieffer TJ, Jarboe LA, Usdin TB, Wolfe MM. Postprandial stimulation of insulin release by glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP). Effect of a specific glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor antagonist in the rat. *J Clin Invest*. Dec 1996;98(11):2440-2445.

89. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes*. Sep 1995;44(9):1126-1131.
90. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 1987;84(10):3434-3438.
91. Holz GG, Kühtreiber WM, Habener JF. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature*. Jan 1993;361(6410):362-365.
92. Heller RS, Kieffer TJ, Habener JF. Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas. *Diabetes*. May 1997;46(5):785-791.
93. Scrocchi LA, Brown TJ, MaClusky N, et al. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med*. Nov 1996;2(11):1254-1258.
94. Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*. Dec 2008;9(4):329-343.
95. Del Prato S. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabet Med*. Dec 2009;26(12):1185-1192.
96. Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis*. Dec 2009;14(12):1484-1495.
97. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. Jul 2000;106(2):171-176.
98. Hue L, Taegtmeyer H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Sep 2009;297(3):E578-591.

99. Brøns C, Vaag A. Skeletal muscle lipotoxicity in insulin resistance and type 2 diabetes. *J Physiol.* Aug 2009;587(Pt 16):3977-3978.
100. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev.* Apr 2007;87(2):507-520.
101. Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. *Regul Pept.* Feb 2008;146(1-3):4-11.
102. Lupi R, Del Prato S. Beta-cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. *Diabetes Metab.* Feb 2008;34 Suppl 2:S56-64.
103. Cusi K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* Aug 2010;10(4):306-315.
104. Lupi R, Dotta F, Marselli L, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes.* May 2002;51(5):1437-1442.
105. Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 1998;95(5):2498-2502.
106. Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, Wang MY, Newgard CB, Unger RH. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J Biol Chem.* Dec 1998;273(49):32487-32490.
107. Wrede CE, Dickson LM, Lingohr MK, Briaud I, Rhodes CJ. Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem.* Dec 2002;277(51):49676-49684.
108. Lin L. RAGE on the Toll Road? *Cell Mol Immunol.* Oct 2006;3(5):351-358.

109. Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. Jun 2006;29(6):1420-1432.
110. Wautier JL, Guillausseau PJ. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab*. Nov 2001;27(5 Pt 1):535-542.
111. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. Dec 2001;414(6865):813-820.
112. Brownlee M, Aiello L, Friedman E, Vinik A, Nesto R, Boulton A. *Complications of Diabetes Mellitus*. 10 Ed ed. Philadelphia: Saunders2003.
113. Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 1994;91(24):11704-11708.
114. Ramasamy R, Vannucci S, Yan S, Herold K, Yan S, Schmidt A. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*. Jul 2005;15(7):16R-28R.
115. Huebschmann A, Regensteiner J, Vlassara H, Reusch J. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. Jun 2006;29(6):1420-1432.
116. Kooptiwut S, Kebede M, Zraika S, et al. High glucose-induced impairment in insulin secretion is associated with reduction in islet glucokinase in a mouse model of susceptibility to islet dysfunction. *J Mol Endocrinol*. Aug 2005;35(1):39-48.
117. Shanmugam N, Todorov I, Nair I, Omori K, Reddy M, Natarajan R. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic islets treated with high glucose or ligands of the advanced glycation endproduct-specific receptor (AGER), and in islets from diabetic mice. *Diabetologia*. Jan 2006;49(1):100-107.
118. Kaneto H, Fujii J, Myint T, et al. Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J*. Dec 1996;320 (Pt 3):855-863.

119. Costal FS. *Benfotiamine and Mito Q protect rat pancreatic islets in culture from pro-apoptotic effects of advanced glycation end products (AGEs)*, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.
120. Machado AP, Pinto RS, Moysés ZP, Nakandakare ER, Quintão EC, Passarelli M. Aminoguanidine and metformin prevent the reduced rate of HDL-mediated cell cholesterol efflux induced by formation of advanced glycation end products. *Int J Biochem Cell Biol.* Mar 2006;38(3):392-403.
121. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:85.
122. Porte D, Kahn SE. beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. *Diabetes.* Feb 2001;50 Suppl 1:S160-163.
123. El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, et al. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology.* Sep 2003;144(9):4154-4163.
124. Meier JJ, Nauck MA. Is the diminished incretin effect in type 2 diabetes just an epi-phenomenon of impaired beta-cell function? *Diabetes.* May 2010;59(5):1117-1125.
125. Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev.* Dec 2008;60(4):470-512.
126. Nauck MA. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications. *Am J Med.* Jan 2011;124(1 Suppl):S3-18.
127. Nauck MA, Vardarli I, Deacon CF, Holst JJ, Meier JJ. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia.* Jan 2011;54(1):10-18.
128. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of

synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* Jan 1993;91(1):301-307.

129. Holst JJ, Gromada J, Nauck MA. The pathogenesis of NIDDM involves a defective expression of the GIP receptor. *Diabetologia.* Aug 1997;40(8):984-986.
130. Lynn FC, Pamir N, Ng EH, McIntosh CH, Kieffer TJ, Pederson RA. Defective glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetes.* May 2001;50(5):1004-1011.
131. Pan QR, Li WH, Wang H, et al. Glucose, metformin, and AICAR regulate the expression of G protein-coupled receptor members in INS-1 beta cell. *Horm Metab Res.* Nov 2009;41(11):799-804.
132. Soldatos G, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Advanced-glycation end products in insulin-resistant states. *Curr Hypertens Rep.* Apr 2005;7(2):96-102.
133. Hadding A, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. Overexpression of receptor of advanced glycation end products hypersensitizes cells for amyloid beta peptide-induced cell death. *Biochim Biophys Acta.* Apr 2004;1691(1):67-72.