Cassio Negro Coimbra

**Efeito da Pioglitazona sobre a viabilidade funcional e o índice de
apoptose de ilhotas pancreáticas muríneas em cultura**

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

Área de concentração: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa
Giannella

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Giannella Neto

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Coimbra, Cassio Negro

Efeito da Pioglitazona sobre a viabilidade funcional e o índice de apoptose de ilhotas pancreáticas muríneas em cultura / Cássio Negro Coimbra. -- São Paulo, 2008.

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

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella.

Co-orientador: Daniel Giannella Neto.

Descritores: 1.Ilhotas pancreáticas 2.Tiazolidinedionas 3.Diabetes mellitus
4.Apoptose 5.PPAR gama 6.Ratos Wistar 7.Técnicas de cultura de células

USP/FM/SBD-153/08

Esta tese esta de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

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

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

**À minha esposa Christiane Nicolau Coimbra, meu filho Lucas Nicolau
Coimbra, meus pais Eraldo M.M.Coimbra e Janete Negro Coimbra**

Agradecimentos

À Professora Maria Lúcia C.Corrêa Giannella, que me acompanha desde 1999, quando permitiu meus primeiros passos no caminho da ciência e me apoiando em todos os momentos.

Ao Professor Daniel Giannella Neto, grande mestre das ciências e da vida, a quem devo muito de minha formação como cientista e como indivíduo.

Ao Professor Ricardo Giorgi que me ensinou no início de meus trabalhos como pensar ciência

À minha tia Ellen Mara Negro Filardi, que proporcionou a realização de meus estudos

Ao meu tio Cantídio Salvador Filardi, que proporcionou a realização de meus estudos

À minha irmã Liege Negro Coimbra pelo carinho de todos os momentos e pela ajuda com o bebê Lucas

Ao Leonardo Sokolnik de Oliveira, grande amigo que me acompanha desde o começo desta empreitada

À Flávia Louro Costal que muito contribuiu para a realização deste trabalho

À Angela Maria Fortes sempre disposta a rir das situações mais difíceis

Ao colega Rodrigo Nunes Lamounier que sofreu comigo grande parte das angústias deste trabalho

À minha sogra Ester Matiko Muramoto pelo carinho e pela ajuda com o bebê Lucas

À Tia Emiko Muramoto pelo carinho e pela ajuda com o bebê Lucas

Ao Alexandre Raposo do Amaral pela ajuda com a informática

Aos colegas Ana Mercedes Cavaleiro, Marco Rego e Maria Auxiliadora pelo companheirismo destes anos

A todos os colegas do LIM25 que passaram pelo laboratório e trouxeram grandes contribuições a minha vida

Aos Ratos Wistar sacrificados que proporcionaram os questionamentos aqui apresentados

À Unidade do Fígado pelo apoio a esta pesquisa

À FAPESP pelo apoio a este trabalho

Vou te encontrar vestida de cetim,
Pois em qualquer lugar esperas só por mim
E no teu beijo provar o gosto estranho
Que eu quero e não desejo, mas tenho que encontrar
Vem, mas demore a chegar.
Eu te detesto e amo morte, morte, morte
Que talvez seja o segredo desta vida
Morte, morte, morte que talvez
seja o segredo desta vida.

Canto para minha morte

Raul Seixas e Paulo Coelho

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xi
Lista de figuras	xvii
Lista de tabelas	xxii
Resumo	xxiii
Summary	xxv
1.Introdução	1
1.1.Pâncreas	1
1.2. As células β: Transcrição, Síntese e Secreção de Insulina	2
1.3. Diabetes Mellitus	4
1.4. PPAR γ	6
1.5. Uso Clínico das Tiazolidinedionas	7
1.6. Tiazolidinedionas e Secreção de Insulina	9
1.7. Apoptose	10
1.8. Apoptose da célula β	19
1.9. Tiazolidinedionas e Apoptose	20
2. Objetivos	23
3. Materiais e Métodos	24
3.1. Técnica de isolamento de ilhotas muríneas	24
3.1.1. Canulação e digestão enzimática do pâncreas	25
3.1.2. Interrupção da digestão e preparo da amostra para a purificação das ilhotas	29
3.1.3. Gradiente de HBSS-Ficoll para purificação das ilhotas	29
3.2. Extração de RNA total, síntese de DNA complementar e PCR dos genes <i>Pdx1</i>, <i>Ins1</i>, <i>Ins2</i>, <i>Gcg</i> e <i>Sst</i>	33

3.3. Padronização da dosagem de insulina no meio de cultura pela técnica de ELISA e avaliação da viabilidade funcional das ilhotas purificadas pelo Gradiente de Ficoll	39
3.4. Padronização da dosagem do conteúdo total de insulina pela técnica de ELISA	46
3.5. Padronização da técnica de RT-qPCR (reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa relativa) para os genes <i>Bax</i>, <i>Bcl2</i> e β-<i>actina</i>	49
3.5.1. Quantificação do Produto da RT-qPCR	51
3.6. Padronização da técnica de detecção do índice de apoptose celular por ELISA	57
3.7. Padronização da técnica de detecção do índice de apoptose celular por medida da atividade de caspase-3	60
3.8. Preparo da Pioglitazona	64
3.9. Delineamento experimental para a avaliação da expressão de genes relacionados à apoptose, do índice de apoptose e da viabilidade funcional de ilhotas muríneas tratadas ou não com Pioglitazona	64
3.10. Análise Estatística	66
4 . Resultados	69
4.1. Efeito da Pioglitazona sobre a viabilidade funcional das ilhotas pancreáticas	69
4.1.1 Secreção de insulina estimulada por glicose por ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose	69
4.1.2. Secreção de insulina estimulada por glicose por ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose	71

4.1.3 Conteúdo total de insulina em ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose	73
4.1.4 Conteúdo total de insulina em ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose	75
4.1.5. Resumo dos resultados obtidos na análise da secreção de insulina após estímulo com glicose e do conteúdo total de insulina	77
4.2. Efeito da Pioglitazona sobre a expressão de genes relacionados à apoptose e sobre o índice de apoptose de ilhotas pancreáticas	79
4.2.1. Expressão dos genes relacionados à apoptose em ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose	79
4.2.2. Expressão dos genes relacionados à apoptose em ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose	82
4.2.3. Índice de apoptose avaliado pela medida de fragmentação de DNA de ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose	85
4.2.4. Índice de apoptose avaliado pela medida de fragmentação de DNA de ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose	87
4.2.5. Índice de apoptose avaliado pela medida da atividade proteolítica da caspase-3 de ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose	89
4.2.6. Resumo dos resultados obtidos na análise da expressão de genes relacionados à apoptose e do índice de apoptose avaliado pela medida da fragmentação de DNA e da atividade proteolítica da caspase-3	91
5. Discussão	93
6. Conclusões	102
7. Referências	103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

10 μ M	Ilhotas Tratadas com pioglitazona
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Densidade
μ	Micro
μ g	Micrograma
μ g/ml	Micrograma por mililitro
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
A ₂₆₀	Absorbância de 260 nm
A ₂₈₀	Absorbância de 280 nm
<i>Actb</i>	β -actina
ADP	Adenosina difosfato
AIF	Fator indutor de apoptose
Apaf-1	Fator ativador de proteases apoptóticas
ATP	Adenosina trifosfato
<i>Bax</i>	Gene - célula B de linfoma 2 associado a proteína X
Bax	Proteína - célula B de linfoma 2 associado a proteína
X	
<i>Bak</i>	Gene – Bcl 2 antagonista
<i>Bcl2</i>	Gene - célula B de linfoma 2
Bcl2	Proteína - célula B de linfoma 2

BSA	Soro-albumina bovina
BSA V	Soro-fração V de albumina bovina
°C	Graus celsius
C57BL/KsJ db/db	Camundongos obesos e diabéticos
CARD	Domínio recrutador de caspase
Caspase	Cisteíno protease aspartil específica
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementar
CO ₂ :	Dióxido de carbono
Colagenase	Clostridiopeptidase
CTRL	Ilhotas não tratadas com Pioglitazona
DED	Pró domínio de morte efetivo
DEPC	Dietilpirocarbonato de sódio
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Nucleotídeos trifosfatados
DO	Densitometria ótica
DTZ	Ditizona
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
et al.	E outros
e cols.	E colaboradores

EtOH	Etanol
FADD	Domínio de morte associado ao Fas
FasL	Ligante de Fas
Ficoll	Polissacarídeo
g	Gramma
<i>Gsg</i>	Gene glucagon
<i>Glut2</i>	Gene do transportador de glicose tipo 2
Glut2	Proteína do transportador de glicose tipo 2
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBSS	Solução balanceada de Hank's (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HEPES	Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1
IGT	Tolerância à glicose diminuída
IL 1	Interleucina 1
IL 6	Interleucina 6
<i>Ins 1</i>	Gene da Insulina 1
<i>Ins 2</i>	Gene da Insulina 2
INS-1	Linhagem de células β de insulinoma de rato
KCl	Cloreto de potássio
kDa	QuiloDalton
kg	Quilograma
Krebs	Tampão de secreção de insulina
L	Litro
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio

MIN6	Linhagem de célula β de insulinoma de camundongo
mQ	MilliQ
mL	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligrama
min	Minuto
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NIH	<i>National Institute of Health</i>
p	Significância estatística
p	Braço curto de um cromossomo
$p53$	Gene p53
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pdx-1	<i>Pancreatic duodenal homeobox-1</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Marcador de peso molecular
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de
peroxissomos gama	
PPAR α	Receptor ativado por proliferadores de
peroxissomos alfa	
PVPI	Polivinilpirrolidona Iodo
Q	Quantil

q.s.p	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Meio de cultura
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase pós transcrição reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase pós transcrição reversa quantitativa
RXR	Receptor de retinóide X
s	Segundos
SFB	Soro fetal bovino
STZ	Estreptozotocina
<i>splicing</i>	Processamento do mRNA
Sst	Somatostatina
TA	Temperatura ambiente
<i>Taq</i>	DNA polimerase
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-2	Fator de necrose tumoral 2
TNFR-1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TRADD	Domínio de morte associado ao TNF
TRIS-HCl	Tris(hidroximetil) aminometano hidrocloreto

TRIS-SO ₄	Tris(hidroximetil) aminometano sulfato
TZD	Tiazolidinedionas
UCP2	Proteína desacopladora - 2
V	Volts

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Figura representativa das principais proteínas envolvidas no processo de apoptose, em células não apoptóticas, situação na qual as caspases estão em sua forma inativa (zimógenos) 16
- Figura 2.** Figura representativa das principais proteínas envolvidas na apoptose ativada pela via extrínseca (Fas-FasL ou TNF). 17
- Figura 3.** Figura representativa das principais proteínas envolvidas na apoptose ativada pela via intrínseca ou mitocondrial. 18
- Figura 4.** Localização do ducto biliar e pinçamento da ramificação que vai para o intestino delgado 26
- Figura 5.** Canulação do ducto biliar e introdução da colagenase tipo V diluída em HBSS 27
- Figura 6.** Acompanhamento da digestão enzimática do pâncreas por meio da visualização das ilhotas pancreáticas coradas em vermelho pela ditizona. A: 5 min de digestão; B: 10 min de digestão; C: 15 min de digestão; D: 20 min de digestão. (Aumento de 100 vezes). 28
- Figura 7.** Gradiente de HBSS-Ficoll, mostrando as diferentes densidades e a camada onde as ilhotas estão localizadas após a centrifugação. 31
- Figura 8.** Ilhota purificada e corada com ditizona após centrifugação em gradiente de HBSS-ficoll 32
- Figura 9.** Integridade das bandas relativas ao RNA ribossomal de ilhotas purificadas pelo Gradiente de Ficoll. 35
- Figura 10.** Géis representativos da reação de PCR para os genes *Pdx1*, insulina 1 (*Ins1*), insulina 2 (*Ins2*), glucagon (*Gcg*) e somatostatina (*Sst*). 38

- Figura 11.** Transformação das densidades óticas das seis soluções-padrão em concentração de insulina pela aplicação da função Ln *versus* logito. 44
- Figura 12.** Incremento em relação ao basal na concentração de insulina no meio de cultura condicionado por ilhotas expostas a 16,7 mM de glicose (estimuladas) em relação a ilhotas mantidas em 1,67 mM de glicose (não estimuladas, Basal) após 24, 48 e 72 horas de cultivo em condições fisiológicas de glicose. 45
- Figura 13.** Padronização da dosagem do conteúdo total de insulina pela técnica de ELISA. O gráfico demonstra as medidas da absorbância observadas no luminômetro de amostras não submetidas (SS) e submetidas (S) à sonicação. As amostras sonicadas foram diluídas 1:20 (S20), 1:50 (S50), 1:100 (S100), 1:150 (S150) e 1:200 (S200). 48
- Figura 14.** Gráfico demonstrando a diferença de eficiência de amplificação dos genes *Bax*, *Bcl2* e β -actina por RT-qPCR 53
- Figura 15.** Gráfico demonstrando as curvas de dissociação para os genes *Bax*, *Bcl2* e β -actina. 55
- Figura 16.** Gel de agarose demonstrando o produto da reação de cada um dos genes padronizados. 56
- Figura 17.** Gráfico demonstrando a curva de diluição de células tratadas com 1 mM de estreptozotocina (STZ) e ilhotas recém extraídas (IF), 10, 50, 100, 1.000 e 5.000 vezes diluídas. U.A.A.: unidade arbitrária de absorbância. 59
- Figura 18.** Gráfico representativo da padronização da quantidade de ilhotas necessárias para a realização dos experimentos de medida da atividade proteolítica da caspase-3. CTRL: ilhotas frescas; CMP: ilhotas tratadas com o agente indutor de apoptose camptotecina. U.A.A: unidade arbitrária de densitometria. 63

Figura 19. Gráfico de Sakamoto et al. demonstrando a ativação do receptor PPAR γ por seus agonistas sintéticos. Experimento realizado em células COS-1. **67**

Figura 20. Delineamento experimental para avaliação da expressão de genes relacionados à apoptose, do índice de apoptose e da viabilidade funcional de ilhotas muríneas tratadas ou não com Pioglitazona e mantidas em concentrações fisiológica (5,6 mM) e supra-fisiológica (23 mM) de glicose. **68**

Figura 21. Gráficos demonstrando o incremento na secreção de insulina em relação ao basal após estímulo com glicose em ilhotas mantidas em cultura em concentrações fisiológicas de glicose (5,6 mM) tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo. **70**

Figura 22. Gráficos demonstrando o incremento em relação ao basal na secreção de insulina após estímulo com glicose em ilhotas mantidas em cultura em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo. **72**

Figura 23. Gráficos demonstrando o conteúdo total de insulina em ilhotas mantidas em cultura em concentrações fisiológicas de glicose (5,6 mM) tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo. U.A.A: unidade arbitrária de absorbância. **74**

Figura 24. Gráficos demonstrando o conteúdo total de insulina em ilhotas mantidas em cultura em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo. U.A.A: unidade arbitrária de absorbância. **76**

Figura 25. Gráficos representativos da expressão do gene *Bax* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose (5,6mM)

tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo 80

Figura 26. Gráficos representativos da expressão do gene *Bcl2* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose (5,6mM) tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo. 81

Figura 27. Gráficos representativos da expressão do gene *Bax* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo. 83

Figura 28. Gráficos representativos da expressão do gene *Bcl2* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo. 84

Figura 29. Gráficos representativos do índice de apoptose avaliado pela medida de fragmentação de DNA de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose (5,6 mM) tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48, 72 e 168 horas de cultivo. U.A.A: unidade arbitrária de absorbância 86

Figura 30. Gráficos representativos do índice de apoptose avaliado pela medida de fragmentação de DNA de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48, 72 e 168 horas de cultivo. U.A.A: unidade arbitrária de absorbância 88

Figura 31. Gráficos representativos do índice de apoptose avaliado pela medida da atividade proteolítica da caspase-3 em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com 10 μ M de Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 48 e 72 horas de cultivo. U.A.A: unidade arbitrária de absorbância

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Seqüência dos *primers* (5' – 3') utilizados nas reações de RT-PCR e RT-qPCR em tempo real. **37**
- Tabela 2.** Resumo dos resultados obtidos na análise da secreção de insulina após estímulo com glicose e do conteúdo total de insulina em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações fisiológicas (5,6 mM) e supra-fisiológicas (23 mM) de glicose tratadas com Pioglitazona em relação a ilhotas tratadas somente com o veículo nos tempos 24, 48 e 72 horas. **78**
- Tabela 3.** Resumo dos resultados obtidos na análise da expressão de genes relacionados à apoptose e do índice de apoptose (avaliado pela medida da fragmentação do DNA e da atividade proteolítica da caspase-3) em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações fisiológicas (5,6 mM) e supra-fisiológicas (23 mM) de glicose tratadas com Pioglitazona em relação a ilhotas tratadas somente com o veículo nos tempos 24, 48 e 72 horas. **92**

RESUMO

Coimbra, CN. Efeito da Pioglitazona sobre a viabilidade funcional e o índice de apoptose de ilhotas pancreáticas muríneas em cultura.[tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008

Acredita-se que a diminuição progressiva da massa de células β observada durante a evolução do diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) ocorra por apoptose deste tipo celular. As tiazolidinedionas (TZDs), uma classe de medicamentos utilizada no tratamento do DM 2, atuam como ligantes dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR) γ e α e promovem diminuição da resistência periférica à insulina. Embora existam estudos controversos, tem se especulado que as TZDs possam exercer efeitos diretos sobre as células β pancreáticas, prevenindo a perda por apoptose e melhorando a sua viabilidade. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos diretos da Pioglitazona (PIO) na concentração de 10 μ M sobre a viabilidade funcional e o índice de apoptose de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos Wistar expostas a concentrações fisiológica (5,6 mM) e suprafisiológica (23 mM) de glicose durante 24, 48 e 72 horas. A viabilidade funcional foi avaliada pela análise da secreção de insulina estimulada por glicose e do conteúdo total de insulina nas ilhotas. O índice de apoptose foi avaliado pela medida da fragmentação do DNA, da expressão do RNAm dos genes *Bcl2* (anti-apoptótico) e *Bax* (pró-apoptótico) e da atividade proteolítica da caspase-3 em ilhotas tratadas e não tratadas com a PIO. Em 5,6 mM de glicose, não se observou efeito significativo sobre a secreção de insulina, mas a avaliação do conteúdo total de insulina evidenciou uma diminuição transitória nas ilhotas tratadas com PIO por 24 horas, seguida por um aumento no conteúdo de insulina quando as ilhotas foram cultivadas por 48 e 72 horas em presença da droga.

Em relação à avaliação da apoptose, observou-se uma diminuição na expressão do RNAm do gene *Bax* nas ilhotas tratadas com PIO por 24 horas, entretanto, após 48 e 72 horas, houve um aumento da expressão do RNAm deste gene nas ilhotas tratadas com a droga. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão do RNAm do gene *Bcl2* em nenhum dos tempos estudados e a avaliação da apoptose determinada pela medida da fragmentação do DNA somente demonstrou uma diminuição do índice de apoptose após 48 horas de tratamento com a PIO. Em 23 mM de glicose, a PIO promoveu um aumento transitório na secreção de insulina estimulada por glicose e no conteúdo total de insulina (após 48 horas), no entanto, após 72 horas, observou-se diminuição significativa no conteúdo total de insulina. Em relação à apoptose, o tratamento com PIO determinou um aumento do índice de apoptose medido pela fragmentação do DNA e da atividade proteolítica da caspase-3 após 48 e 72 horas e uma diminuição da expressão do RNAm do gene *Bcl2* nos tempos 24 e 48 horas. Os resultados do presente estudo sugerem que os efeitos diretos da PIO sobre as ilhotas pancreáticas muríneas em cultura variam de acordo com a concentração de glicose a qual as ilhotas estão expostas: em concentração fisiológica de glicose, a PIO parece exercer efeitos diretos benéficos, enquanto em concentração suprafisiológica de glicose, ela exerce efeitos diretos deletérios sobre a viabilidade funcional e o índice de apoptose de ilhotas pancreáticas muríneas em cultura.

Descritores: Ilhotas pancreáticas, Tiazolidinedionas, Diabetes mellitus, Apoptose, PPAR gama

SUMMARY

Coimbra, CN. Effect of pioglitazone on the functional viability and apoptosis rate of culture murine pancreatic islets. [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2008

The progressive decrease in β -cell mass observed during the evolution of type 2 diabetes (T2DM) is believed to occur due to cell apoptosis. Thiazolidinediones (TZDs), a class of agents used for the treatment T2DM, act as ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ and α and decrease peripheral insulin resistance. Although still controversial, some studies have shown a direct effect of TZDs on pancreatic β -cell, preventing cell loss due to apoptosis and improving their viability. The objective of this study was to evaluate the direct effects of 10 μ M Pioglitazone (PIO) on functional viability and apoptosis rate of islets isolated from Wistar rats exposed to physiological (5.6 mM) and supraphysiological (23 mM) glucose concentrations during 24, 48 and 72 hours. The functional viability was evaluated by the analysis of insulin secretion after glucose challenge and of islet total insulin content. Apoptosis rate was evaluated by measurement of DNA fragmentation, of *Bcl2* (antiapoptotic) and *Bax* (proapoptotic) mRNA expression and of proteolytic activity of caspase-3 in pancreatic islets treated or not with PIO. At 5.6 mM glucose concentration, no significant effects in insulin secretion were observed, while a transitory decrease (after 24 hours) followed by an increase in total insulin content was observed in islets treated with PIO for 48 and 72 hours. Regarding apoptosis, a lower expression of *Bax* mRNA was detected in islets treated with PIO for 24 hours, followed, however, by an increase in the expression of this gene after 48 and 72 hours of drug exposition. PIO treatment did not promote

significant changes in *Bcl2* mRNA expression, while decreased the apoptosis rate measured by DNA fragmentation only after 48 hours of exposition. At 23 mM glucose concentration, PIO treatment elicited a transitory increase in insulin secretion after glucose challenge and in islet total insulin content after 48 hours followed by a decrease in the islet total insulin content after 72 hours. Concerning apoptosis, PIO treatment determined an increase in the apoptose rate measured by DNA fragmentation and by proteolytic activity of caspase-3 after 48 and 72 hours and a decrease in *Bcl2* mRNA expression after 24 and 48 hours. These findings suggest that the direct effects of PIO on pancreatic islets depend on glucose concentration to which they are exposed: while under physiological glucose concentration the direct effects seem to be beneficial, under supraphysiological glucose concentration, PIO exerts direct deleterious effects on the functional viability and on the apoptosis rate of murine pancreatic islets.

Keywords: Pancreatic islets, Thiazolidinediones, Diabetes mellitus, Apoptosis, PPAR gamma

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pâncreas

O pâncreas desempenha um importante papel na manutenção da homeostase metabólica, pela síntese e secreção de enzimas e hormônios. Diversas doenças estão diretamente ligadas a disfunções deste órgão, dentre elas podemos destacar o Diabetes Mellitus, que afeta cerca de 30 milhões de pessoas ao redor do mundo. Em seres humanos, o órgão pesa de 70 - 150 g e mede de 15 – 25 cm. Está conectado ao duodeno pela ampola de Vater, onde o ducto pancreático se junta ao ducto biliar comum. O pâncreas nos seres humanos é dividido em quatro regiões, cabeça, pescoço, corpo e cauda, localizadas da porção proximal para a porção distal, respectivamente. Em ratos, esta caracterização ainda não está bem definida¹. O pâncreas de mamíferos é composto de três tipos de tecido: acinar, ductal e endócrino. O pâncreas exócrino é composto por células acinares, de aspecto piramidal, e é caracterizado pela presença de inúmeros grânulos de secreção, que secretam enzimas digestivas (proteases, amilases, lipases e nucleases), pelo ducto pancreático até o intestino.

O pâncreas endócrino compreende cerca de 1-3% do órgão e é composto por cinco tipos celulares principais (α , β , δ , ϵ e PP) que produzem, respectivamente, os seguintes hormônios, glucagon, insulina, somatostatina, grelina e polipeptídeo pancreático. A insulina e o glucagon agem de maneira antagônica na regulação da homeostase glicêmica. A somatostatina e o polipeptídeo pancreático controlam a produção de outros hormônios e enzimas e a função da grelina, até o momento, ainda não está bem caracterizada². Estas células estão organizadas em estruturas

denominadas ilhotas pancreáticas ou ilhotas de Langerhans. Em seres humanos, as ilhotas medem aproximadamente 0,3 mm de diâmetro e estão organizadas em torno de pequenos capilares, para dentro dos quais as células secretam seus hormônios. Em ratos, as células α , que correspondem a cerca de 10% das células das ilhotas, estão localizadas na periferia e as células δ , que compreendem uma pequena porcentagem das células totais, também estão situadas na periferia da ilhota. As células PP estão dispersas no tecido endócrino e exócrino em pequena quantidade. A localização e o número das células ϵ ainda são objetos de discussão ^{3, 4, 5}

1.2. As células β : Transcrição, Síntese e Secreção de Insulina

As células β compreendem cerca de 50-75% das células da ilhota pancreática, dependendo da espécie estudada. Em ratos, elas ocupam a região central da ilhota e comunicam-se por meio de junções comunicantes do tipo *gap*. Além da insulina, as células β secretam outros peptídeos em pequenas quantidades: amilina e outros peptídeos co-secretados com a insulina, de função ainda não totalmente esclarecida.

O gene da insulina está localizado na região 11p15.5. O pré-RNA de insulina em muitas espécies possui dois íntrons, a sequência genômica desses íntrons apresenta-se pouco similar entre as espécies, entretanto, a posição desses íntrons é altamente conservada. A maioria das espécies possui um único gene de insulina, no entanto, em ratos e camundongos, existe uma duplicação deste gene, muito provavelmente devido à pressão seletiva que resultou em uma segunda cópia do gene que apresenta uma perda do segundo íntron. O gene ancestral leva o nome de

Insulina 2 (*Ins 2*) e o gene duplicado foi denominado Insulina 1 (*Ins 1*) ⁶. A síntese e a secreção da molécula de insulina são processos complexos que ocorrem em diversas etapas e necessitam da participação de inúmeros fatores, tais como, alguns aminoácidos, hormônios peptídicos, nucleotídeos e sobretudo, a glicose. Ao longo do tempo, tem sido demonstrado que a glicose é responsável pela indução da maioria dessas etapas, incluindo a transcrição do RNAm da pré-pró-insulina, o processamento do RNAm, a estabilização deste RNAm, a tradução em proteína e até mesmo o processamento da pró-insulina em insulina. A quantidade de RNAm disponível no citoplasma para a tradução da pré-pró-insulina depende da produção de RNAm de insulina e da degradação do mesmo ^{6, 7}. Existe uma correlação pequena entre a transcrição e a tradução do RNAm de insulina, sendo comprovado um atraso de horas entre a inibição da transcrição e a suspensão da tradução, muito provavelmente devido a grande quantidade de RNAm de pré-pró-insulina já presente no citoplasma, que é da ordem de 10-15% do RNAm total presente na ilhota ⁸. A transcrição do gene da insulina depende de diversos fatores de transcrição responsivos a glicose, dentre os quais podemos destacar o PDX 1, também responsável pela manutenção do fenótipo da célula β e do desenvolvimento do pâncreas e o MAFA, que atua como domínio iniciador da transcrição. A tradução do RNAm de insulina resulta na produção da pré-pró-insulina, uma proteína de 11,5 kDa. Aproximadamente 30 a 60 segundos após a síntese da pré-pró-insulina no retículo endoplasmático, a porção “pré” é removida enzimaticamente e dá origem a uma proteína de 9 kDa denominada pró-insulina, que é transportada para o complexo de Golgi. A pró-insulina é então “empacotada” em grânulos de secreção e convertida em insulina e peptídeo C, que serão estocados até serem secretados ou

degradados. A insulina possui 5,808 kDa e é composta por duas cadeias de aminoácidos conectadas uma a outra por ligações dissulfeto⁹. A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pela célula β pancreática, e como citado anteriormente, a glicose é o secretagogo mais importante. A glicose é transportada para o interior da célula β por uma proteína integral de membrana, denominada GLUT 2. Após entrar na célula β , o metabolismo de glicose gera ATP, resultando em uma elevação da relação ATP/ADP no citoplasma, que provoca o fechamento dos canais de potássio e conseqüente despolarização da membrana celular, com a abertura dos canais de cálcio sensíveis à voltagem. O aumento do influxo de cálcio para a célula β resulta em despolarização suplementar da membrana plasmática e desencadeia o processo de exocitose dos grânulos de insulina.¹⁰

1.3. Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina associados ou não à resistência a ação deste hormônio. A elevação da glicemia pode estar acompanhada de outras alterações bioquímicas e de manifestações clínicas cuja gravidade depende do grau de déficit insulínico, das condições ambientais e da evolução das complicações crônicas nos vasos sangüíneos (micro e macroangiopatia diabética). Os extremos das manifestações clínicas e a patogênese constituem-se nas bases para a classificação em DM tipo 1 (doença auto-imune que cursa com quadro clínico

exuberante resultante do déficit quase absoluto de insulina) e DM tipo 2 (pacientes oligo ou assintomáticos com predomínio de resistência insulínica).

O DM é uma das doenças endócrinas mais prevalentes em todas as populações, e sua prevalência varia de acordo com o grupo étnico e região geográfica. O aumento universal da incidência da doença se dá as custas, principalmente, do DM tipo 2 ¹¹. De acordo com o Estudo Multicêntrico da Prevalência do Diabetes Melito no Brasil ¹², realizado entre junho de 1986 a julho de 1988, a taxa de prevalência de DM na população brasileira na faixa etária entre 30 e 69 anos, ajustada por idade, variou de 5,22% em Brasília a 9,66% em São Paulo. A relação entre o sexo masculino e feminino foi de 1:1,44. Atualmente, cerca de 12 milhões de brasileiros são portadores de DM e estima-se que destes, 7,8 milhões de indivíduos tenham o diagnóstico confirmado, enquanto 4,0 milhões não sabem que têm a doença. De acordo com dados do Ministério da Saúde (DATASUS), durante o ano de 1997, a taxa de mortalidade por DM no Brasil foi de 17,24%, representando 27.515 indivíduos falecidos especificamente por DM.

O DM tipo 2 é a forma mais comum de DM em todas as partes do mundo ¹³ e sua prevalência aumenta com a idade, surgindo geralmente após os 40 anos. Estes pacientes apresentam capacidade secretória de insulina inadequada para suplantar a resistência insulínica concomitante e, como resultado, advém a hiperglicemia. Oitenta por cento dos pacientes são obesos, apresentam história familiar de DM e podem ser assintomáticos ao diagnóstico. A resistência insulínica é o evento central de um grupo de alterações que incluem a hiperinsulinemia resultante, hipertensão arterial, dislipidemia, hiperuricemia, hipercoagulabilidade e microalbuminúria. ¹⁴

1.4. PPAR γ

O PPAR γ pertence a uma superfamília de receptores nucleares juntamente com o PPAR α e o PPAR β/δ .¹⁵ Até o momento, vários ligantes naturais e sintéticos para o PPAR γ já foram descritos, entre eles ácidos graxos e derivados e compostos sintéticos, tais como as tiazolidinedionas (TZDs).¹⁶ Em presença do ligante, o PPAR γ sofre uma modificação de sua estrutura conformacional, o que estimula sua heterodimerização com o receptor de retinóide X (RXR) e facilita o recrutamento de cofatores necessários para a ativação da transcrição de genes relacionados com o metabolismo lipídico, homeostase glicêmica e proliferação celular.

O PPAR γ está expresso em vários tecidos de mamíferos adultos em níveis muito baixos.¹⁷ O PPAR γ 1 está expresso em níveis elevados no tecido adiposo, intestino grosso e células hematopoiéticas, enquanto sua expressão é baixa em rins, fígado, musculatura lisa e esquelética, intestino delgado e pâncreas.

Ainda não está completamente esclarecido qual é o tecido responsável pela atividade de redução da glicemia dos ligantes do PPAR γ . Embora o músculo esquelético seja o principal tecido envolvido na utilização da glicose, está bem estabelecido que o tecido adiposo também é necessário para a homeostase adequada da glicose, uma vez que camundongos e humanos lipoatróficos são extremamente resistentes à insulina.¹⁸

Os estímulos para adipogênese após ativação do PPAR γ ocorrem secundariamente ao aumento da expressão de genes que promovem captação e estoque de ácidos graxos e à repressão de genes que induzem lipólise e liberação de

ácidos graxos. O tratamento com TZDs favorece a redistribuição de tecido adiposo, diminuindo os depósitos viscerais em relação ao tecido subcutâneo ¹⁹, além de promover uma mudança na população celular que resulta em mais adipócitos recém-diferenciados menores e menos adipócitos maduros maiores ²⁰. Este remodelamento do tecido adiposo aumentaria a utilização de glicose mediada por insulina, pois os adipócitos menores são mais responsivos à insulina ²¹, melhorando a resistência insulínica. Tanto o RNAm como a proteína PPAR γ são encontrados nas células pancreáticas ²².

1.5. Uso Clínico das Tiazolidinedionas

A homeostase glicêmica normal é mantida por três processos inter-relacionados: a secreção de insulina, a produção hepática de glicose e a captação de glicose pelas células periféricas. ²³ O tratamento do DM tipo 2 tem evoluído muito nos últimos anos com a utilização de medicamentos que atuam em cada um destes processos. Em relação à secreção insulínica, estão disponíveis as sulfoniluréias e os secretagogos de ação rápida (glinidas), além da própria insulina, indicada nos casos de falência das sulfoniluréias. A supressão da produção hepática de glicose é o efeito principal da metformina, que também apresenta pequeno efeito no aumento da sensibilidade periférica à insulina. ²⁴

As TZDs, também conhecidas por glitazonas, são uma nova classe terapêutica cuja ação se caracteriza predominantemente pela diminuição da resistência periférica à insulina. As TZDs foram aprovadas para uso clínico em 1997, quando a Troglitazona, o protótipo da classe, entrou para o mercado. Em

1999, foram aprovadas para uso também a Pioglitazona e a Rosiglitazona. Em 2000, a Troglitazona foi retirada do mercado devido a relatos de lesão hepatocelular idiossincrásica, levando a insuficiência hepática fulminante.²⁵

Do ponto de vista clínico, as TZDs proporcionam eficácia hipoglicemiante semelhante à da metformina e das sulfoniluréias, reduzindo a glicemia de jejum em 30-60 mg/dL e a HbA_{1c} em 1-1,5%.²⁶ Além de seu efeito hipoglicemiante, as TZDs apresentam outros efeitos sobre o perfil metabólico, tais como aumento do HDL colesterol, aumento do LDL colesterol e efeito variável sobre os triglicérides, havendo relato de diminuição destes com o uso de Pioglitazona. Há evidências de que o tratamento com TZDs, além de atuar sobre a sensibilidade insulínica, melhore a função da célula β , promovendo recuperação da função secretória. Um estudo em pacientes com tolerância à glicose diminuída (IGT) demonstrou que a administração de Troglitazona induziu um aumento na capacidade da célula β em responder à sobrecarga de glicose.²⁷ Um outro estudo em diabéticos tipo 2 mostrou que o tratamento com Troglitazona por 12 semanas resultou em diminuição da glicemia plasmática, aumento na sensibilidade à insulina e diminuição da relação pró-insulina/insulina, sugerindo uma alteração não apenas na sensibilidade, mas também na função da célula β .²⁸ Em um estudo caso-controle, pacientes com DM tipo 2 com média de 16 anos de diagnóstico foram tratados com Troglitazona após falha terapêutica da associação de sulfoniluréia e metformina e apresentaram melhora no teste de estímulo de peptídeo C (pós-refeição), sugerindo recuperação da função da célula β .²⁹

1.6. Tiazolidinedionas e Secreção de Insulina

O papel das TZDs e a função do PPAR γ sobre a secreção de insulina necessitam de maiores esclarecimentos, uma vez que os dados presentes na literatura são contraditórios.

Embora a ativação do PPAR γ não melhore agudamente a secreção de insulina, um elemento de resposta funcional ao PPAR γ foi encontrado na região promotora do gene do *Glut2*³⁰, a proteína responsável pelo transporte de glicose nas células β . Assim, um estímulo para a expressão do GLUT2 mediado pelo PPAR γ aumentaria a captação de glicose e desencadearia os passos iniciais que levam à liberação de insulina. Estes achados corroboraram a hipótese de que a restauração ou proteção da função das células β mediada pelo PPAR γ contribua, ao menos parcialmente, para a melhora na homeostase glicêmica promovida pelas TZDs em pacientes diabéticos. Ilhotas isoladas de camundongos C57BL/KsJ db/db, animais obesos e diabéticos que foram tratados com Pioglitazona por 12 semanas, demonstraram restauração da secreção de insulina estimulada por glicose em comparação a ilhotas isoladas de animais não tratados, sugerindo um efeito benéfico das TZDs sobre a função das células β ³¹, que poderia ser indireto, secundário à melhora da resistência insulínica e conseqüente menor sobrecarga da célula β .

Em contra partida, alguns estudos têm demonstrado que as glitazonas podem diminuir a secreção de insulina. Em 2006, Zhang et al. demonstraram que a adição de Pioglitazona na dose de 10 μ M a ilhotas humanas em cultura promoveu um

aumento transitório da secreção de insulina após alguns minutos de exposição à droga imediatamente seguido por uma diminuição na secreção de insulina ³².

As células da linhagem MIN6, células β originadas de insulinoma de camundongo, não expressam PPAR γ . A super expressão do PPAR γ nestas células causou diminuição da biossíntese e da secreção de insulina. Além disso, quando estas células foram tratadas com Pioglitazona, esta diminuição se exacerbou ainda mais ³³. Em ilhotas pancreáticas de ratos, a super expressão do PPAR γ também promoveu uma diminuição na secreção de insulina induzida por glicose, aventando-se a hipótese de que esta diminuição ocorra devido a uma redução das concentrações de ATP intracelular secundária a um aumento da expressão da proteína desacopladora 2 (UCP 2), o que provocaria, em última análise, uma diminuição da exocitose dos grânulos de insulina ³⁴. Estas alterações também foram observadas em células da linhagem de insulinoma de ratos INS 1, que também apresentaram diminuição da secreção de insulina e aumento de UCP 2 após super expressão de PPAR γ ³⁵.

1.7. Apoptose

A apoptose, ou morte celular programada, é uma forma de morte celular destinada a eliminar células indesejáveis do hospedeiro pela ativação de uma série coordenada de eventos executados por um conjunto exclusivo de proteínas. A apoptose ocorre nos seguintes contextos gerais: durante o desenvolvimento, como um mecanismo homeostático para manter as populações celulares nos tecidos; como um mecanismo de defesa, como nas reações imunes; quando as células são lesadas por uma doença ou agentes nocivos e no envelhecimento ^{36, 37}.

Para que ocorra a execução da apoptose é necessária a ativação coordenada de moléculas sinalizadoras (extracelulares e intracelulares), receptores, enzimas e genes que regulam proteínas envolvidas no processo. O primeiro grupo de moléculas que se deve destacar como elemento chave do processo apoptótico são as caspases, que fazem parte de uma família de proteínas que atua exclusivamente no processo apoptótico ³⁸. Esta família é constituída por pelo menos 14 membros de cisteína proteases intracelulares aspartil-específicas que apresentam diversas propriedades em comum: (1) possuem um resíduo cisteína que, quando a proteína é ativada, é responsável pela clivagem de resíduos de ácido aspártico, o que promove a ativação ou desativação das suas proteínas-alvo; (2) possuem um domínio peptídico ativo e bem conservado; (3) os precursores dessas proteínas são zimógenos conhecidos como pró-caspases; (4) o domínio N terminal das pró-caspases contém uma estrutura extremamente diversificada necessária para ativação; (5) são capazes de se auto-ativar e de ativarem umas as outras. Esta ativação, por sua vez, leva à formação de um heterodímero com duas subunidades e dois heterodímeros distintos, resultando na formação de um complexo enzimático e ativo heterotetramérico ^{39 40}. A família das caspases é dividida em três subfamílias, de acordo com a sequência de aminoácidos e conseqüente função desempenhada pela proteína. A subfamília I é composta pela Caspase-2, Caspase-8, Caspase-9 e Caspase-10, que desempenham o papel de ativadoras do processo de apoptose. A subfamília II é composta pelas Caspase-3, Caspase-6 e Caspase-7, que desempenham o papel de executoras do processo. A subfamília III é composta pelas Caspase-1, Caspase-4, Caspase-5, Caspase-11, Caspase-12, Caspase-13 e Caspase-14, que desempenham um importante papel em processos inflamatórios.³⁸

A célula saudável possui no citoplasma os zimógenos de caspase em sua forma inativa (Figura 1). Perturbações extracelulares e intracelulares são capazes de ativar a apoptose, que é induzida por duas vias principais: a via extrínseca (Figura 2) e a via intrínseca (Figura 3), esta última também conhecida como via mitocondrial, sendo que ambas convergem para a ativação de pró-caspases em caspases ativas, e têm como produto final a fragmentação típica do DNA⁴¹.

A via extrínseca é ativada pela indução da sinalização de morte por receptores celulares conhecidos como receptores de morte ativadores de pró-caspases, os quais são responsáveis pela ativação direta de caspases ativadoras, principalmente as Caspases-8 e -10, que possuem um pró-domínio de morte efetivo (DED). Para estes domínios, os sinalizadores de morte mais conhecidos são o ligante de Fas (FasL) e o fator de necrose tumoral 2 (TNF-2) que podem ser reconhecidos diretamente por receptores de morte específicos localizados na membrana celular, respectivamente, o receptor de Fas e o receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR-1). A ligação dessas proteínas aos seus receptores favorece a formação de estruturas denominadas, respectivamente, domínio de morte associado ao Fas (FADD) e domínio de morte associado ao TNF (TRADD) e promovem a homodimerização desses receptores e conseqüente formação dos domínios de morte efetivos (DEDs). A seguir, estes domínios de morte que estão presentes na membrana das células vão interagir com os domínios de morte presentes nas pró-caspases ativadoras com conseqüente oligomerização, por exemplo, da pró-caspase-8 localizada no citosol das células. Este complexo, formado por duas subunidades lineares presentes na pró-caspase-8, é denominado complexo sinalizador indutor de morte (DISC) e determina a sinalização final para a auto-ativação da caspase-8. A

partir deste ponto, a sinalização varia de acordo com o tipo celular. Em algumas células, a caspase-8 ativada ativa diretamente outras caspases, principalmente a caspase-3 executora do processo, que além de inibir proteínas de reparo do DNA (PARP) é capaz de digerir proteínas do citoesqueleto celular. Em outros tipos celulares, a caspase-8 pode não ser ativada de maneira muito intensa, não ativando diretamente a caspase-3 .

Sinalizações intracelulares podem desencadear a apoptose e, neste caso, a via mitocondrial, ou via intrínseca, é ativada. Alguns exemplos de situações nas quais esta via é ativada incluem danos ao DNA, isquemia celular, diminuição de fatores de crescimento, exposição celular a drogas quimioterápicas e à radiação ultravioleta e estresse oxidativo. Nestas condições, a permeabilização da membrana mitocondrial resultará na saída de proteínas pró-apoptóticas por sua membrana, como o citocromo c que juntamente com o fator indutor de proteases apoptóticas (APAF) e a caspase-9 formará um complexo denominado apoptossomo, responsável pela clivagem de caspases executoras do processo. Além do citocromo c, outras proteínas migram da membrana mitocondrial para o citoplasma, como o fator indutor de apoptose (AIF), que atua diretamente no núcleo da célula proporcionando a clivagem do DNA e de outras proteínas e o smac/DIABLO, que se liga ao inibidor de proteases apoptóticas (IAP) e impede sua ação, favorecendo a formação do apoptossomo. Dessa forma, a permeabilização da membrana mitocondrial determina uma cascata de eventos subsequentes que resultam em morte celular. Este evento é controlado principalmente por proteínas membros da família BCL-2 . O mecanismo pelo qual os membros da família BCL-2 regulam a saída destas proteínas permanece desconhecido, entretanto, três hipóteses têm sido aventadas: (1) a primeira delas

sugere que os membros da família BCL-2 formem canais na membrana mitocondrial que facilitem o transporte das proteínas; (2) os membros da família BCL-2 interagiriam com outras proteínas para formar os canais; (3) Os membros da família BCL-2 induziriam uma ruptura na parte externa da membrana mitocondrial ⁴². De qualquer maneira, após a saída do citocromo c, do fator indutor de apoptose (AIF) e de outras proteínas pró-apoptóticas, ocorre a ativação da apoptose. O AIF age diretamente no núcleo e promove, juntamente com outras proteínas, a fragmentação típica do DNA. O citocromo c se liga ao APAF-1 (fator ativador de proteases apoptóticas) presente no citoplasma e formam um complexo ativador que se liga a um outro domínio de morte presente em caspases ativadoras do processo, conhecido como domínio recrutador de caspase (CARD) que convertem as pró-caspases-2 e -9 em caspases ativadas. A caspase-9 especificamente, na forma de apoptossomo, converte diretamente a pró-caspase-3 em caspase 3, que é executora do processo de apoptose. Por esta razão, a via mitocondrial também é conhecida como via caspase-9 dependente . ³⁸

Os genes *Bcl2* e *Bax*, membros da família de genes *Bcl2*, estão entre os mais bem caracterizados genes reguladores da apoptose, sendo que a proteína BCL-2 funciona como uma repressora da apoptose e a proteína BAX como promotora da morte celular. Já se demonstrou que a atividade anti-apoptótica da proteína BCL-2 é proporcional ao seu nível de expressão, sendo que os níveis relativos das proteínas BAX e BCL-2 determinam a suscetibilidade da célula para entrar em apoptose ^{43, 44}.

As proteínas BAX e BAK são funcionalmente redundantes. Quando ocorre a perda de apenas uma dessas proteínas, poucas anormalidades celulares são evidenciadas, entretanto, a perda das duas proteínas causa uma marcante

proliferação celular ⁴⁵. Nenhum trabalho na literatura demonstrou que os níveis relativos do RNAm do gene *Bax per se* é capaz de determinar a susceptibilidade da célula entrar em apoptose. Em contra partida, já se demonstrou que o nível de expressão do gene *Bcl2* é proporcional a sua atividade anti-apoptótica, e que a expressão deste gene *per se* pode ser utilizada como um marcador da susceptibilidade celular à apoptose. Vários estudos já demonstraram que a super expressão do *Bcl2* protege diversos tipos celulares de entrar em apoptose em diferentes condições experimentais, incluindo retirada de fatores de crescimento do meio de cultura, estresse oxidativo e isquemia, que sabidamente estimulam a via intrínseca de apoptose ^{46, 47, 48, 49}.

As células apoptóticas exibem características típicas que decorrem dos eventos sucintamente explicados anteriormente, entre elas, quebra do DNA em fragmentos grandes de 50 a 300 kb, com clivagem internucleossômica subsequente, em fragmentos de 180 a 200 pares de bases, por endonucleases dependentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Este evento é favorecido pelo fator indutor de apoptose (AIF) descrito anteriormente e pela proteína CAD (DNase ativada por caspase) que está presente no citoplasma em sua forma inativa (ICAD) e após ser ativada, migra para o núcleo e promove a fragmentação do DNA. O evento final na formação do corpúsculo apoptótico é a externalização de um fosfolípide de membrana denominado fosfatidilserina nas camadas externas da membrana plasmática, que permite que as células mortas sejam reconhecidas precocemente pelos macrófagos adjacentes para serem fagocitadas sem extravasamento do conteúdo citoplasmático. ⁵⁰

Figura 1. Figura representativa das principais proteínas envolvidas no processo de apoptose, em células não apoptóticas, situação na qual as caspases estão em sua forma inativa (zimógenos).

IAP: Inibidor de proteases apoptóticas; **PARP:** Poli ADP-ribose polimerase ; **APAF-1:** Fator ativador de proteases apoptóticas; **ICAD:** DNase ativada por caspase inativada; **Pró-caspase:** cisteína protease aspartil específica inativada; **BCL2** (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) ; **BAX** (BCL 2 associado a proteína X); **BAK** (proteína antagonista de *BCL2* promotora de morte celular)

Figura 2. Figura representativa das principais proteínas envolvidas na apoptose ativada pela via extrínseca (Fas-FasL ou TNF).

FADD: Domínio de morte associado ao FAS; Domínio de morte associado ao TNF; **IAP:** Inibidor de proteases apoptóticas; **PARP:** Poli ADP-ribose polimerase; **APAF-1:** Fator ativador de proteases apoptóticas; **CAD:** DNase ativada por caspase; **ICAD:** DNase ativada por caspase inativada; **Caspase:** Cisteína protease aspartil específica; **Pró-caspase:** cisteína protease aspartil específica inativada; **BCL2** (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) ; **BAX** (BCL 2 associado a proteína X); **BAK** (proteína antagonista de *BCL2* promotora de morte celular).

Figura 3. Figura representativa das principais proteínas envolvidas na apoptose ativada pela via intrínseca ou mitocondrial.

IAP: Inibidor de proteases apoptóticas; **smac/Diablo:** Ativador de caspase secundário derivado da mitocôndria; **AIF:** Fator indutor de apoptose; **PARP:** Poli ADP-ribose polimerase; **APAF-1:** Fator ativador de proteases apoptóticas; **CAD:** DNase ativada por caspase; **ICAD:** DNase ativada por caspase inativada; **Caspase:** Cisteína protease aspartil específica; **Pró-caspase:** cisteína protease aspartil específica inativada; **BCL2** (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) ; **BAX** (BCL 2 associado a proteína X); **BAK** (proteína antagonista de *BCL2* promotora de morte celular).

1.8. Apoptose da célula β

A falha na produção de insulina pelas células β do pâncreas é uma característica comum do DM tipo 1 e tipo 2. Várias evidências sugerem que a apoptose seja a principal forma de morte das células β nestas desordens. A célula β é particularmente sensível ao estímulo apoptótico devido às características inerentes ao seu fenótipo especializado. No DM tipo 1, a reação auto-imune anti-célula β ativa o sinal apoptótico por intermédio de altas concentrações de mediadores inflamatórios no micro-ambiente da ilhota ou por meio de células T efectoras. No DM tipo 2, um desarranjo metabólico está associado a produção de mediadores inflamatórios em tecidos insulino-sensíveis, com níveis elevados de citocinas como a interleucina-6 (IL-6) e o TNF na circulação periférica. Também tem sido sugerido que a hiperglicemia induza síntese de interleucina-1 (IL-1) pela própria célula β , que atuaria de maneira autócrina na indução da apoptose, em um mecanismo semelhante ao observado no DM tipo 1.⁵¹ Outros mecanismos que poderiam explicar a apoptose da célula β no DM tipo 2 são o depósito de amilóide nas ilhotas e a lipotoxicidade.⁵²

A destruição das células β durante o processo de isolamento de ilhotas pancreáticas para transplante ocorre devido ao estresse celular que pode resultar em dano à função e à sobrevivência da célula β .⁵³ O tempo de isquemia prolongado, a privação de nutrientes, a presença de citocinas inflamatórias e endotoxinas têm sido implicados na destruição das ilhotas pós-isolamento. Thomas et al. exploraram a hipótese de que as ilhotas humanas são caracterizadas por um perfil pró-apoptótico. Especificamente, foi investigada a hipótese de que o gene promotor de apoptose

BAX é mais expresso em ilhotas humanas em comparação ao gene anti-apoptótico *BCL2*. Pela técnica quantitativa de PCR em tempo real, demonstrou-se que a expressão do RNAm do gene *BAX* era significativamente maior em ilhotas quando comparado com a expressão deste gene no baço. Em contraste, o nível de expressão do RNAm do gene *BCL2* em ilhotas não foi significativamente diferente dos níveis deste no baço. Baseado nestes resultados, os autores sugerem que a perda das células β ocorra por apoptose e que a redução ou a regulação da expressão destes genes em ilhotas poderia ajudar a preservar o número de células β após o transplante de ilhotas.⁵⁴ Além disso, freqüentemente existe perda de ilhotas após o processo de isolamento, pois as mesmas ficam fragilizadas pela digestão enzimática e mecânica e comprovadamente apresentam um perfil pró-apoptótico.⁵⁵

1.9. Tiazolidinedionas e Apoptose

A regulação da massa de células β ainda é pouco compreendida, sabe-se, porém, que o número de células reflete o balanço entre a replicação das células e a morte celular⁵⁶. Quando a glicemia e os níveis de ácidos graxos livres são elevados, a homeostase energética nas células está alterada, resultando em acúmulo intracelular de triglicérides nas células β . O tratamento com as TZDs inibe o acúmulo intracelular de triglicérides nas células β devido ao aumento da oxidação dos ácidos graxos, retardando a falência celular em roedores obesos pré-diabéticos⁵⁷. A associação entre a redução da esteatose das ilhotas e a prevenção das alterações morfológicas é consistente, mas não prova uma relação de causa-efeito entre elas. Sabe-se que as TZDs reduzem os altos níveis de expressão de algumas enzimas

lipogênicas em ilhotas, o que justificaria a diminuição intracelular de triglicérides, mas não está claro como estas drogas promovem estoque de energia nos adipócitos e dissipação de energia nas ilhotas.

Em 2004, Zeender e colaboradores demonstraram que a Pioglitazona na concentração de 1 μ M promoveu uma proteção contra apoptose induzida por IL-1 β e concentrações supra fisiológicas de glicose em ilhotas pancreáticas humanas ⁵⁸. Recentemente, Vandewalle et al. demonstraram efeitos benéficos da Rosiglitazona sobre a secreção de insulina e na prevenção da apoptose, em ilhotas expostas a lipotoxicidade por um mecanismo dependente de PPAR γ através da redução de iNOS e restauro dos níveis de ATP intracelular. Neste mesmo trabalho, os autores levantam a hipótese de que a droga promova efeitos benéficos indiretos e independentes de PPAR γ , relacionados à diminuição do estresse oxidativo secundariamente ao aumento das enzimas superóxido desmutase e UCP2 (proteína desacopladora 2).⁵⁹

O tratamento de células MIN6 expostas a condições supra-fisiológicas de glucose e palmitado com Pioglitazona na concentração de 10 μ M demonstrou que esta glitazona determinou recuperação parcial da secreção de insulina e da produção de ATP intracelular, suprimiu o acúmulo de triglicérides intracelular, diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio, e reduziu a apoptose celular ⁶⁰.

Diversos grupos, entretanto, já demonstraram um efeito indutor de apoptose das TZDs em vários tipos celulares. Othani et al. demonstraram em células da linhagem de insulinomas HIT- T15 que durante tratamento continuado por até cinco dias, a Troglitazona inibiu a taxa de proliferação celular, reduziu de maneira dose-dependente o conteúdo de insulina e aumentou o índice de apoptose celular ⁶¹.

Cnop et al. testaram a hipótese de que as TZDSs diminuiriam a lipotoxicidade em ilhotas em cultura. Assim, à cultura de ilhotas isoladas a partir de ratos *Wistar*, foram adicionados palmitato e oleato, a fim de induzir a lipotoxicidade, e Troglitazona na concentração de 10 μ M. Ao final, contrariando relatos anteriores, o grupo tratado pela Troglitazona apresentou mais apoptose induzida por ácidos graxos em relação às células não tratadas ⁶².

A Troglitazona na concentração de 30 μ M inibiu a proliferação celular em linhagem de células derivada de câncer de fígado humano (HepG2), via ativação de caspase 3, redução da expressão do gene *BCL2* e aumento da expressão dos genes *BAX* e *BAK*. ⁶³ Além disso, a indução de apoptose após ativação do PPAR γ foi observada em células tumorais de câncer de bexiga ⁶⁴, de leucemia pró mielocítica ⁶⁵, de carcinoma de pulmão não pequenas células ⁶⁶ e até mesmo em macrófagos ⁶⁷, as TZDs também contribuem para um aumento da taxa de apoptose. Um efeito pró-apoptótico da Troglitazona foi demonstrado em células de músculo liso vascular, pela ativação de *p53* e *Gadd* ⁶⁸. Demonstrou-se, ainda, para este mesmo tipo celular, que tanto a Rosiglitazona ⁶⁹ quanto a Pioglitazona ⁷⁰ induziram a apoptose, sendo que para esta última, este efeito somente foi observado em condições supra-fisiológicas de glicose, muito provavelmente mediada pelo fator de crescimento transformante tipo 1 β (TGF-1 β). A maior parte dos estudos em cultura celular que demonstrou um efeito pró-apoptótico das TZDs utilizou doses elevadas destas drogas.

Tendo em vista que os efeitos diretos das TZDs sobre as ilhotas pancreáticas ainda não são completamente compreendidos, estudos adicionais são necessários para que se chegue a um melhor entendimento das reais implicações do tratamento com estas drogas sobre a preservação e a função das células β .

2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto foi estudar os efeitos diretos das TZDs sobre ilhotas pancreáticas muríneas em cultura expostas a concentrações fisiológicas e supra-fisiológicas de glicose, avaliando:

- a viabilidade funcional, pela análise da secreção de insulina após estímulo com glicose e do conteúdo total de insulina de ilhotas pancreáticas mantidas em cultura tratadas e não tratadas com Pioglitazona;
- o índice de apoptose, pela análise da fragmentação de DNA e da atividade proteolítica da caspase-3 em ilhotas pancreáticas mantidas em cultura tratadas e não tratadas com Pioglitazona;
- a expressão de genes da família *Bcl2* em ilhotas pancreáticas mantidas em cultura tratadas e não tratadas com Pioglitazona.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Técnica de isolamento de ilhotas murídeas

Apesar das inúmeras referências desta metodologia na literatura, são poucas aquelas que fazem a descrição detalhada de todos os passos do isolamento, razão pela qual foi necessário um período de aproximadamente 12 meses para a padronização e otimização desta técnica, que nunca havia sido feita em nosso laboratório.

Para a realização dos experimentos, todos os materiais foram autoclavados ou, também, filtrados. Ratos Wistar machos pesando de 250 a 350 g (2 meses de idade) foram anestesiados com solução de quetamina + xilazina (0,2 mL/100 g de peso do animal) via intra-peritoneal e controlados com éter etílico, em seguida foi feita a anti-sepsia do abdômen com solução de Iodo Polvidine (PVPI). A cavidade abdominal foi aberta com tesoura, o ducto biliar localizado e a ramificação que vai para o intestino delgado pinçada para evitar dispersão da enzima (Figura 4). Um pequeno corte com tesoura no terço proximal do ducto biliar foi realizado para introdução do escalpe (25G) e após a introdução, o local foi amarrado para evitar refluxo da enzima, tomando-se o cuidado para não perfurar o ducto. Inicialmente, tentamos reproduzir dois protocolos descritos na literatura, um deles utilizando gradiente descontínuo de Ficoll (densidades 25%, 23% e 11%) ⁷¹ e o segundo utilizando Histopaque (Sigma) na densidade de 1,077 ⁷². Os primeiros protocolos utilizados resultaram em preparações muito impuras, razão pela qual modificamos a metodologia, adaptando a técnica descrita por Ricordi et al. ⁷³, que

descrevemos detalhadamente a seguir. Esta técnica apresenta boa reprodutibilidade, bom rendimento, de cerca de 650 ilhotas em ratos fêmeas e 850 ilhotas em ratos macho por pâncreas e as ilhotas não contaminam quando mantidas em cultura por períodos prolongados ⁷⁴.

3.1.1. Canulação e digestão enzimática do pâncreas

Após a injeção de 10 mL da solução de Colagenase tipo V (Sigma) a 0,7 mg/mL diluída em solução de HBSS (Figura 5), o pâncreas foi separado do intestino com uma tesoura, transferido para uma placa de Petri e lavado em solução de HBSS suplementada com antibióticos (100.000 U/mL de penicilina e 100.000 µg/ml de estreptomicina). O baço foi retirado juntamente com o excesso de tecido gorduroso, linfonodos e vasos sanguíneos maiores e o pâncreas foi cortado em pedaços grandes e colocado em um tubo graduado de 50 mL contendo 5 mL de HBSS. A amostra foi levada ao banho-maria a 37 °C para a digestão com a colagenase. A cada 5 minutos, a amostra foi lentamente homogeneizada e alíquotas foram retiradas e colocadas em placas de 24 poços onde eram coradas com Ditizona (DTZ, Sigma), que se liga às moléculas de zinco nos grânulos de insulina e permite a visualização das ilhotas, que adquirem cor avermelhada. Com este procedimento, verifica-se o andamento do processo de digestão e o momento da interrupção (Figura 6), que deve ocorrer quando se visualizam ilhotas livres de tecido acinar (Figura 6D).

Figura 4. Localização do ducto biliar e pinçamento da ramificação que vai para o intestino delgado.

Figura 5. Canulação do ducto biliar e introdução da collagenase tipo V diluída em HBSS.

Figura 6. Acompanhamento da digestão enzimática do pâncreas por meio da visualização das ilhotas pancreáticas coradas em vermelho pela ditizona. A: 5 min de digestão; B: 10 min de digestão; C: 15 min de digestão; D: 20 min de digestão. (Aumento de 100 vezes).

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

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

3.1.3. Gradiente de HBSS-Ficoll para purificação das ilhotas

O Ficoll (DL – tipo 400 – Sigma) deve ser retirado da geladeira e deixado a temperatura ambiente por pelo menos 30 min antes do uso. Após a retirada do sobrenadante, o precipitado de tecido foi suspenso em 8 mL de

Solução de HBSS-Ficoll $\mu = 1,110$. A seguir, foi acrescentado, cuidadosamente, 5 mL de uma solução de HBSS-Ficoll $\mu = 1,096$. Sobre esta segunda camada, foi colocado 5 mL de uma solução de HBSS-Ficoll $\mu = 1,069$ e finalmente, 5 mL de uma solução de HBSS-Ficoll $\mu = 1,037$, obtendo-se o seguinte gradiente descontínuo; 1,110 – 1,096 – 1,069 – 1,037. Após centrifugação a 2.000 rpm por 20 min a 20 °C (com freios da centrífuga desligados), as ilhotas localizadas na interface entre as densidades $\mu = 1,069/1,096$ do HBSS-Ficol 1 (Figura 7) foram retiradas cuidadosamente com pipeta de 1 mL. As ilhotas foram colocadas em um tubo de 50 mL e foi adicionado RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e 5,6 mM de glicose q.s.p. 50 mL. Após centrifugação a 1.000 rpm por 5 min a 4 °C (com os freios da centrífuga desligados), este procedimento foi repetido por três vezes para retirar todo o HBSS-Ficoll presente nas ilhotas, o sobrenadante foi retirado e o precipitado suspenso em 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e 5,6 mM de glicose. Após homogeneização, uma alíquota de 50 μ L foi corada com 25 μ L de DTZ para contagem e verificação da pureza das ilhotas isoladas na preparação (Figura 8). O rendimento final oscila entre 650 a 850 ilhotas por pâncreas. As ilhotas foram distribuídas em frascos de cultura de maneira que não ultrapassassem a densidade considerada ideal de 4 ilhotas/cm² ⁷⁵ e levadas à estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Figura 7. Gradiente de HBSS-Ficoll, mostrando as diferentes densidades e a camada onde as ilhotas estão localizadas após a centrifugação.

Figura 8. Ilhota purificada e corada com ditizona após centrifugação em gradiente de HBSS-ficoll.

3.2. Extração de RNA total, síntese de DNA complementar e PCR dos genes

Pdx1, Ins1, Ins2, Gcg e Sst

Para confirmar a natureza endócrina do tecido obtido após a purificação por gradiente de Ficoll, utilizamos a técnica de RT-PCR (reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa) para avaliar a expressão dos genes *Pdx1*, *Ins1*, *Ins2*, *Gcg* e *Sst*.

O RNA total de ilhotas mantidas por 24 horas em cultura foi extraído segundo protocolo do reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies). Um mL de Trizol foi adicionado a um precipitado de 1.000 ilhotas e, após vigorosa homogeneização, a amostra foi incubada por 10 min em temperatura ambiente e em seguida adicionados 266 µL de clorofórmio. Após nova homogeneização, a amostra foi incubada por 10 min em temperatura ambiente e centrifugada por 15 min a 12.000 g a temperatura de 4° C. A camada superior aquosa foi transferida para um novo tubo, foram adicionados 666 µL de álcool isopropílico 100% e procedeu-se à incubação por 5 min em temperatura ambiente. Após nova centrifugação por 10 min a 12.000 g em temperatura de 4° C, o sobrenadante foi desprezado e 1.300 µL de álcool etílico 75% foram adicionados ao precipitado. Realizou-se, então, nova centrifugação por 5 min a 7.500 g em temperatura de 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA assim obtido foi suspenso em 30 µL de água tratada com 0,1% dietilpirocarbonato (DEPC) e 0,1 mM EDTA.

A qualidade da preparação de RNA foi avaliada pela análise da integridade do RNA após eletroforese com gel de agarose, onde as bandas relativas ao RNA ribossomal 18S e 28S foram bem visíveis e apresentaram-se íntegras

(Figura 9). Também foi realizada a leitura da solução de RNA nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, constatando-se uma relação ABS260/ABS280 adequada (1,8) no equipamento NanoDrop ND-3300 (NanoDrop Technologies, EUA). Para a síntese de cDNA foram utilizados 5 µg do RNA total, 2,0 µl de hexâmero 1 µg/µL, a seguir a reação foi levada a um termociclador para aquecer a 70 °C por 10 min e colocada em gelo por 47 segundos. No mesmo tubo foi adicionado 4,0 µL de tampão (5x), 2,0 µL de DTT a 0,1 M e 1,0 µL de dNTP *mix* (cada um dos desoxinucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP na concentração de 10 mM). A reação foi novamente levada ao termociclador por 10 min, a 25 °C e 2 min a 42 °C, e, a seguir, foi adicionado 1 µL (200 U) da enzima que realiza a transcrição reversa do RNA (SuperscriptTM II Reverse Transcriptase - Invitrogen) e a reação foi novamente levada ao termociclador por 50 min a 42 °C e 15 min a 70 °C para inativar a reação

Figura 9. Integridade das bandas relativas ao RNA ribossomal de ilhotas purificadas pelo Gradiente de Ficoll.

A reação de PCR para os genes *Pdx1*, *Ins1*, *Ins2*, *Gcg* e *Sst* foi realizada em um volume final de 25 μ L de reação, utilizando-se aproximadamente 2,0 μ g de cDNA como *template*. As reações de PCR continham: 1X PCR *buffer* (GIBCO Life Technologies), 1,5 mM $MgCl_2$ (GIBCO Life Technologies), 0,2 μ M dNTP *mix* (GIBCO Life Technologies), 1 U de Taq DNA Polymerase (GIBCO Life Technologies) e 0,2 μ M de cada um dos *primers* que foram desenhados para amplificação dos genes, *primers* esses localizados em exons diferentes para cada gene (Tabela 1), para que não houvesse amplificação de possível DNA genômico presente nas amostras de RNA. Todos os *primers* foram construídos com auxílio do programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu>).

As amostras foram incubadas durante 5 min a 94° C para a denaturação das dupla- fitas de cDNA em termociclador (Mastercycler gradient - Eppendorf). A seguir, foram submetidas a 40 ciclos (30 s a 94° C, 30 s a 57 °C, e 45 s a 72° C) e, após o último ciclo, foi realizada a etapa de extensão final pela incubação por 4 min a 72° C. O gel de agarose demonstrando os produtos da reação de PCR para os genes *Pdx*, *Ins*, *Ins2*, *Gcg* e *Sst* é demonstrado na Figura 10.

Tabela 1. Seqüência dos *primers* (5' – 3') utilizados nas reações de RT-PCR e RT-qPCR em tempo real.

Genes	Seqüência <i>forward</i>	Seqüência <i>reverse</i>	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Pdx1</i>	CATGTT TTC TGC GTGCTCTG	TCTATCAGCAATGTGCCACC	168
<i>Ins1</i>	GTA CCTGGTGTGTGGGAAC	CTGCCCCTCTACCAACTGG	199
<i>Ins2</i>	TGTGGT TCT CACTTG GTGGA	ACCTTCAGACCTTGCACTG	155
<i>Gcg</i>	GTGCCTTG GAACACTCAAC	TCATCCGGAACCTGG	200
<i>Sst</i>	TCAAGCTCGGCTGTCTGAG	AGGTCTGCCAACTCGAACC	307
<i>Bax</i>	TAAAGTGCCCGAGCTGAT	CAAAGATGGTCACTGTCTGC	147
<i>Bcl2</i>	ACATCGCTCTGTGGATGAC	ACTTGTGGCCAGGTATG	204
<i>Actb</i>	CAACCTTCTTGCAGCTCCTC	TCCATATCGTCCCAGTTGGT	300

Figura 10. Géis representativos da reação de PCR para os genes *Pdx1*, insulina 1 (*Ins1*), insulina 2 (*Ins2*), glucagon (*Gcg*) e somatostatina (*Sst*).

3.3. Padronização da dosagem de insulina no meio de cultura pela técnica de ELISA e avaliação da viabilidade funcional das ilhotas purificadas pelo Gradiente de Ficoll

Os ensaios para avaliação da secreção de insulina estimulada por glicose foram realizados com o *Kit rat/mouse insulin ELISA kit – 96 well plate* (Linco Research, St Louis, USA). Dez ilhotas foram semeadas em placas de 24 poços aglomerados em quadruplicata, cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos, com 10% SFB e com 5,6 mM de glicose durante 24, 48 e 72 horas. O ensaio para avaliação da secreção de insulina foi realizado em 1 mL de tampão de Krebs suplementado com 1,67 mM ou 16,7 mM de glicose e albumina de soro bovino (BSA) *RIA grade* fator V (SIGMA). As soluções foram mantidas na estufa por 15 min antes da utilização, em um béquer, para serem gaseificadas com 5% de CO₂.

Para a avaliação da secreção de insulina após estímulo com glicose, as ilhotas foram retiradas e colocadas em tubos graduados de 15 mL e os poços foram lavados com 7 mL de HBSS com o objetivo de retirar todas as células dos poços. Os tubos foram centrifugados a 1.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as ilhotas foi suspenso em 1 mL de tampão de Krebs suplementado com 1,67 mM de glicose. A seguir, as células foram novamente colocadas em placas de 24 poços aglomerados. Após incubação de 2 horas para a sincronização das células na estufa a 37°C e 5% de CO₂, o tampão foi retirado, as ilhotas foram novamente lavadas com 7 mL de HBSS e centrifugadas a 1.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as células foi suspenso em 1 mL de tampão de Krebs. Em um grupo de dez ilhotas em duplicata,

o tampão de Kreb's foi suplementado com 1,67 mM de glicose e no outro grupo de dez ilhotas em duplicata, o tampão de Kreb's foi suplementado com 16,7 mM de glicose. Após nova incubação de 1 hora na estufa a 37°C, 500 µL do sobrenadante foi removido com o auxílio de microscópio para não remover nenhuma célula da placa e armazenado a -20° C em tubos de 1,5 mL até o momento da dosagem. As ilhotas também foram removidas da placa, após terem sido lavadas com 7 mL de Hank's e armazenadas a -20° C em tubo 1,5 mL para posterior extração de DNA, utilizado para normalizar os valores de insulina obtidos.

O DNA das ilhotas foi extraído da seguinte maneira: após descongelamento, as ilhotas foram centrifugadas a 1.100 rpm por 10 min em temperatura ambiente, o sobrenadante foi desprezado e ao precipitado adicionou-se 500 µL de tampão (3M NaCl e 0,4M de EDTA), 5 µL de proteinase K (na concentração de 20 mg/mL) e 5 µL de SDS 10%. As amostras foram incubadas a 60 °C por 1 hora. Após a incubação, foi adicionado 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio homogeneizando com *vórtex*, o tubo foi centrifugado por 13.000 rpm durante 10 min, e o sobrenadante onde está o DNA foi retirado para um novo tubo de 1,5 mL. A etapa anterior foi repetida e novamente o sobrenadante foi retirado para um novo tubo de 1,5 mL. A seguir, adicionou-se 450 µL de isopropanol e 50 µL de acetato de sódio 3M e, após homogeneização por inversão, o tubo foi novamente centrifugado a 13.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1 mL de etanol 70% ao precipitado. Após repetição da centrifugação a 13.000 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em 15 µL de H₂O mQ. O DNA foi quantificado no equipamento NanoDrop ND-3300 (NanoDrop Technologies).

O ensaio de ELISA foi padronizado da seguinte maneira; diluiu-se 50 mL do tampão de lavagem (10X) em 450 mL de H₂O mQ, de forma a torná-lo (1X) concentrado. Após lavar três vezes cada poço, que vem revestido de anticorpo monoclonal anti-insulina de rato, com 300 µL do tampão de lavagem, retirou-se o tampão invertendo a placa e batendo sobre papel absorvente, várias vezes. A seguir foi adicionado 80 µL da solução de detecção do anticorpo (anti – anticorpo, anti - insulina biotinizado) em cada poço. Como as amostras são livres de componentes de matrix, adicionamos 10 µL de tampão de ensaio (fosfosalina 0,05M, pH 7,4 com EDTA 0,025M e 0,08% de azida sódica com 1% de BSA) em todos os poços e, a seguir, adicionou-se 10 µL dos dois calibradores, das seis soluções-padrão em ordem crescente de concentração (0,2; 0,5; 1; 2,5 e 10 ng/mL), uma solução “branca” e as amostras desconhecidas (meios de cultura condicionados por 10 ilhotas) em diferentes poços da placa de ELISA. Durante a padronização, percebemos que para que as concentrações das amostras a serem testadas caíssem “dentro da curva dos padrões”, as mesmas deveriam ser diluídas na razão de 1:10 (ilhotas tratadas com 1,67 mM de glicose) e 1:20 (ilhotas tratadas com 16,7mM de glicose) com o tampão de ensaio. A placa foi então coberta com o adesivo e incubada durante 2 horas em temperatura ambiente em um agitador com velocidade controlada entre 400 a 500 rpm. O adesivo foi removido e a placa virada sobre um papel absorvente para remoção da solução residual do poço. Após três lavagens com 300 µL de tampão de lavagem, adicionou-se 100 µL de solução enzimática (estreptavidina) em cada poço e a placa foi coberta com adesivo. A placa foi novamente incubada em agitador com velocidade moderada por 30 min em temperatura ambiente, o adesivo foi removido e

a solução enzimática foi descartada por inversão da placa. Os poços foram lavados seis vezes com 300 µL de tampão de lavagem e , a seguir, adicionou-se 100 µL de substrato (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina tamponada) em cada poço e a placa foi levada para agitação por 15 min. Uma cor azul de intensidade proporcional à concentração de insulina apareceu nos poços. O adesivo foi removido e 100 µL de solução 0,3M de HCl foi adicionada afim de interromper a reação. A placa foi homogeneizada e, após a adição do ácido, a cor azul torna-se amarela e determina o fim da atividade enzimática. A leitura das amostras foi realizada em absorbância de 450 nm e 620 nm (branco), no luminômetro Anthos Lucy 3 (Anthos Labtec Instruments-Austrália) durante 5 min. O cálculo da concentração foi padronizado pela redução dos dados obtidos de leitura em absorbância (DO) da curva padrão pela transformação:

$$\text{Logito (Y)} = (\text{DO}-\text{S0})/(\text{1}+(\text{DO}-\text{S0}))$$

Onde S0 é o padrão zero.

Obtém-se a concentração de insulina em ng/mL pela interpolação na curva $\text{Ln}[\text{INS}] \times \text{Logito}$ dos valores de DO das amostras, de acordo com a equação da reta obtida pela regressão linear dos mínimos quadrados:

$$\text{Logito (Y)} = a + b \times \text{Ln}[\text{INS}]$$

Onde **a** é o valor da intecepção no eixo Y e **b** é o ângulo de inclinação (“slope”) (Figura 11).

O incremento em relação ao basal foi obtido da seguinte maneira: o valor registrado em ng/mL das ilhotas estimuladas pela glicose (16,7 mM) foi multiplicado pelo valor da diluição, dividido pela sua concentração de DNA, multiplicado por 100 e dividido pelo valor das ilhotas não estimuladas (1,67 mM de

glicose) em ng/mL de insulina multiplicado pela sua diluição, dividido pela sua concentração de DNA:

$$\text{Incremento em relação ao basal} = \frac{[\text{ilhotas estimuladas (ng/mL de insulina x diluição / [DNA])}] - [\text{ilhotas não estimuladas (ng/ml de insulina x diluição / [DNA])}]$$

Os resultados dos experimentos foram expressos pela mediana (linha transversal), pelo intervalo interquartil entre 25 e 75% (caixa) e pelos valores máximos e mínimos (barras). A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pela prova não-paramétrica de Kruskal-Wallis para a comparação dos experimentos com mais de dois grupos. Observou-se um incremento em relação ao basal estatisticamente significativo nas concentrações de insulina no meio de cultura condicionado por ilhotas cultivadas por 24, 48 e 72 horas em meio suplementado com 16,7 mM de glicose (ilhotas estimuladas) em relação às ilhotas mantidas em 1,67 mM de glicose (ilhotas não estimuladas), o que demonstra a viabilidade funcional das ilhotas extraídas com a metodologia padronizada (Figura 12).

Figura 11. Transformação das densidades óticas das seis soluções-padrão em concentração de insulina pela aplicação da função Ln *versus* logito.

Figura 12. Incremento em relação ao basal na concentração de insulina no meio de cultura condicionado por ilhotas expostas a 16,7 mM de glicose (estimuladas) em relação a ilhotas mantidas em 1,67 mM de glicose (não estimuladas, Basal) após 24, 48 e 72 horas de cultivo em condições fisiológicas de glicose.

3.4. Padronização da dosagem do conteúdo total de insulina pela técnica de ELISA

Os ensaios para avaliação do conteúdo total de insulina foram realizados com o *Kit rat/mouse insulin ELISA kit – 96 well plate* (Linco Research, St Louis, USA). O conteúdo total de insulina reflete a insulina armazenada nos grânulos no interior das células β pancreáticas. Dez ilhotas foram semeadas em placas de 24 poços aglomerados em quadruplicata, cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos, com 10% SFB e com 5,6 mM de glicose durante 24 horas. As células foram retiradas do meio de cultura e centrifugadas durante 10 minutos a 1500 rpm, a seguir o sobrenadante foi retirado e ao precipitado foram adicionados 200 μ L de Tris-HCL contendo 1 mM de EDTA (SIGMA). As células foram sonicadas a 30W de potência em um comprimento de onda de 20 khz durante 20 s, colocadas imediatamente em gelo após a sonicação e armazenadas a -20°C até o momento da dosagem por ELISA. O ensaio de ELISA foi realizado conforme padronização descrita no ensaio de secreção de insulina. Com o objetivo de observar a melhor diluição para análise do conteúdo total de insulina, bem como a eficiência da técnica de sonicação, realizamos a comparação entre amostras sonicadas (S) e amostras sonicadas e diluídas nas razões de 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:150 e 1:200. Além disso, os resultados foram comparados com o de ilhotas expostas às mesmas condições de cultura, porém sem sonicação (SS). A diluição foi escolhida (1:150) com base na diferença significativa observada entre esta condição e a de amostras não diluídas (S), que apresentam a absorbância máxima no luminômetro (Figura 13).

Posteriormente, esta diluição foi utilizada para a análise das ilhotas tratadas e não tratadas com Pioglitazona.

Figura 13: Padronização da dosagem do conteúdo total de insulina pela técnica de ELISA. O gráfico demonstra as medidas da absorbância observadas no luminômetro de amostras não submetidas (SS) e submetidas (S) à sonicação. As amostras sonicadas foram diluídas 1:20 (S20), 1:50 (S50), 1:100 (S100), 1:150 (S150) e 1:200 (S200).

O conteúdo de insulina nos resultados dos experimentos foi obtido da seguinte maneira: o valor registrado em ng/mL das ilhotas é multiplicado pelo valor da diluição e dividido pela sua concentração de DNA, utilizado para normalizar a reação.

$$\text{Conteúdo de Insulina} = (\text{ng/mL de insulina} \times \text{diluição} / [\text{DNA}])$$

3.5. Padronização da técnica de RT-qPCR (reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa relativa) para os genes *Bax*, *Bcl2* e *β-actina*.

A RT-qPCR consiste na aferição da quantidade de um produto amplificado a cada ciclo da reação em cadeia da polimerase. Utilizam-se reagentes fluorescentes para identificar o sinal, e o resultado obtido na fase exponencial da reação é extrapolado, de modo a obter a quantidade inicial de amostra.

Estas reações foram realizadas no equipamento Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Austrália), utilizando-se o conjunto de reagentes *SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen Corporation-EUA)*. Nesta reação a transcrição reversa do RNA em cDNA e a reação de PCR com o SYBR Green I como fluoróforo ocorrem em uma única etapa. Esse corante emite um sinal de fluorescência ao se ligar às moléculas dupla-fitas de DNA, sendo que a excitação e emissão máxima do SYBR Green I ocorre nos comprimentos de onda de 494 nm e 521 nm, respectivamente.

Para a padronização da amplificação do gene da β -actina (controle interno da reação) e dos genes alvo (*Bax* e *Bcl2*), utilizou-se o RNA total extraído de ilhotas recém-isoladas (IF). As reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicata. A reação para cada gene analisado foi cuidadosamente padronizada quanto à temperatura de *annealing* e o número ideal de ciclos de amplificação, com a finalidade de evitar qualquer amplificação inespecífica. Cada reação foi preparada com concentração de 75 mM final de cada um dos *primers* para os genes *Bax*, *Bcl2* e β -actina, 7,5 μ L de 2X SYBR® *Green Reaction Mix* (0,4 mM de cada dNTP e 6 mM $MgSO_4$), 0,2 μ L (0,5 U) da enzima *SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix* e 100 ng de RNA, para um volume final de reação de 20 μ L. Inicialmente, ocorre a transcrição reversa a 50 °C por 30 min, seguida de incubação a 95 °C por 15 min. Na reação de amplificação dos genes *Bax*, *Bcl2* e β -actina, foram utilizadas as seguintes temperaturas e intervalos de tempo: 95 °C por 20 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 30 s; em 40 ciclos e 72 °C por 5 min.

Os *primers* utilizados nas reações foram desenhados de modo que cada par estivesse localizado em exons diferentes (Tabela 1), para que não houvesse amplificação de possível DNA genômico contaminante presente nas amostras de RNA.

A intensidade de expressão de cada gene foi obtida pelos valores de CT (*Threshold cycle*) que é o número do ciclo calculado no qual o produto do PCR atinge um limiar de detecção, quando o aumento no sinal emitido pelo fluoróforo associado à fase exponencial de amplificação do produto de PCR começa a ser detectada⁷⁶.

3.5.1. Quantificação do Produto da RT-qPCR

Para a quantificação relativa do produto de amplificação, foi feita a análise da eficiência de amplificação dos genes alvos e do gene controle interno. Para isso, foram realizadas curvas com diluições seriadas de RNA das ilhotas recém-isoladas, partindo-se de 481,36 ng de RNA e fazendo-se uma diluição seriada de 1:10, até 5 pontos, para cada um dos genes estudados. Cada uma das diluições foi amplificada por RT-qPCR nas mesmas condições.

A comparação da eficiência de amplificação dos genes foi realizada pela subtração dos valores do CT do gene alvo dos valores do CT do gene controle (β -actina) e a diferença foi “plotada” contra o logaritmo da quantidade da amostra inicialmente colocada. Se a inclinação da reta ou *slope* fosse menor que 0,1, a eficiência de amplificação era considerada comparável entre o gene alvo e o gene controle, e o método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ pôde ser utilizado ⁷⁷. Como a eficiência da amplificação dos genes em estudo e do controle interno não foram comparáveis, (Figura 14), o modelo matemático descrito por Pfaffl ⁷⁸ foi utilizado para o cálculo da quantificação relativa, o qual baseia-se na seguinte fórmula:

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo}}(\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{referência}})^{\Delta CP_{\text{referência}}(\text{controle} - \text{amostra})}}$$

Sendo que “R” é o razão que descreve a expressão relativa entre o gene alvo e o gene de referência (β -actina). O “E” é a eficiência de amplificação na

reação, tanto do gene alvo como do gene de referência. Os valores da eficiência de amplificação dos genes em estudo são obtidos pela realização, de uma única vez, das suas respectivas curvas com diluição seriada, conforme descrito inicialmente. O ΔCP dos genes alvos é a diferença do CP (ilhotas recém-isoladas – amostra), assim como o ΔCP do gene referência (β -actina), é a diferença de seu controle (ilhota recém isolada – amostra).

Figura 14. Gráfico demonstrando a diferença de eficiência de amplificação dos genes *Bax*, *Bcl2* e β -actina por RT-qPCR

A especificidade da reação de RT-qPCR foi verificada realizando-se a curva de dissociação. A reação é considerada específica para os produtos de PCR analisados quando a curva de dissociação contém apenas um pico em uma determinada temperatura (Figura 15). Esta especificidade também foi demonstrada após eletroforese do produto da reação em gel de agarose, que demonstrou a presença de uma única banda amplificada para cada um dos genes estudados (Figura 16).

Figura 15: Gráfico demonstrando as curvas de dissociação para os genes *Bax*, *Bcl2* e β -actina.

Figura 16: Gel de agarose demonstrando o produto da reação de cada um dos genes padronizados.

3.6. Padronização da técnica de detecção do índice de apoptose celular por ELISA

A técnica de detecção de morte celular foi padronizada utilizando-se o *Kit Cell death detection ELISA^{PLUS}* (Boering Mannheim, Mannheim, Germany) ⁷⁹. Para a análise do DNA fragmentado associado à histona (oligonucleossomo), evento final característico do processo apoptótico, após a clivagem do DNA por endonucleases CA^{2+} dependentes, semeamos 50 ilhotas em poços aglomerados, em duplicata, logo após o isolamento. Estas ilhotas foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos, 10% SFB e 5,6 mM de glicose e 1 mM de estreptozotocina (STZ), um agente indutor de apoptose (controle positivo)⁸⁰ por 24 horas. Paralelamente, 50 ilhotas frescas, recém extraídas, em duplicatas, também foram utilizadas. As amostras foram diluídas nas razões 1:10, 1:50, 1:100, 1:1.000 e 1:5.000, a fim de otimizar a concentração adequada para a análise dos resultados.

Após a retirada das células dos frascos de cultura, procedeu-se à centrifugação a 1.300 rpm por 10 min e o sobrenadante, que contém o DNA de células necróticas, foi removido. As células foram incubadas e suspendidas em tampão de lise por 30 min a temperatura ambiente. Após a lise, as células foram novamente submetidas à centrifugação a 1.300 rpm por 10 min para precipitação dos núcleos íntegros. Uma alíquota do sobrenadante, que contém a fração citoplasmática e o DNA fragmentado das células apoptóticas, foi diluída nas razões descritas acima e 20 μ L da solução de cada umas das diluições foram colocados na micro-placa do *kit* que contém estreptavidina e incubadas durante 2 horas a 200 rpm, com dois anticorpos monoclonais contendo anti-histona (H11-4), marcado com biotina, e anti-

DNA (M-CA-33), conjugado a peroxidase. Durante a incubação, o complexo anticorpo-nucleossomo se liga à micro-placa pela estreptavidina. A micro-placa foi lavada três vezes com 300 μ L de tampão de incubação para remover os componentes das células que não fazem parte da reação imunológica, adicionou-se o substrato (ABTS) ao poço e a solução foi incubada durante 15 min a 200 rpm. Mediu-se a absorbância no comprimento de onda de 405 nm para a quantificação do complexo formado, utilizando-se um filtro de 495 nm como referência. Estas reações lidas no luminômetro anthos Lucy 3 (Anthos Labtec Instruments, Austrália) durante 5 min. A diluição escolhida para análise foi a de 1:10, de acordo com a curva demonstrada na Figura 17. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de absorbância, subtraindo-se do valor obtido, o valor de absorbância do *background* (sem amostra, mas com os reagentes) e posteriormente dividindo-se este valor pelo controle positivo do *Kit*, a fim de observar a melhor diluição para análise de ilhotas francamente apoptóticas (tratadas com STZ) e de ilhotas recém extraídas (IF) que posteriormente foram usadas como referência para análise das ilhotas tratadas e não tratadas com Pioglitazona.

Figura 17: Gráfico demonstrando a curva de diluição de células tratadas com 1 mM de estreptozotocina (STZ) e ilhotas recém extraídas (IF), 10, 50, 100, 1.000 e 5.000 vezes diluídas. U.A.A.: unidade arbitrária de absorbância.

3.7. Padronização da técnica de detecção do índice de apoptose celular por medida da atividade de caspase-3

Tanto a via extrínseca como a via intrínseca da apoptose convergem para a ativação de pró-caspase-3 em caspase-3 ativa, que desempenha o papel de executora do processo de apoptose ⁴¹. A medida da atividade de caspase-3 foi realizada com o *kit ApoTarget Caspase3/ CPP32 colorimetric protease assay kit* (Bio Source International, Inc. California USA) ⁸¹ pela utilização de substratos contendo o cromógeno p-nitroanilida (pNA). Após a indução de apoptose nas células, a atividade proteolítica da caspase 3 aumenta, proporcionando a clivagem dos seus substratos e a liberação do cromógeno, que por sua vez pode ser detectado por espectrofotometria. Desta forma, comparando as absorbâncias obtidas entre as amostras controle e as amostras tratadas, foi possível determinar o nível de atividade proteolítica para cada uma delas, o que reflete o índice de apoptose.

A padronização da medida da atividade de caspase-3 foi realizado da seguinte maneira: Grupos de 200, 250, 500 e 1.000 ilhotas foram cultivadas em placas de cultura de 75 cm² em quadruplicata tratadas com camptotecina, um alcalóide comumente utilizado na indução de apoptose ⁸² (controle positivo da reação; CMP), 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, 250, 500 e 1.000 ilhotas recém extraídas (CTRL). Os grupo de ilhotas foram retirados da cultura (CMP) ou coletados após o isolamento (CTRL) e foram lavados com 8 mL de tampão de Hank's. A seguir, as ilhotas foram centrifugadas a 4.100 rpm durante 11 min, o sobrenadante foi retirado e o

precipitado foi suspenso em 1 mL de tampão de Hank's. Uma alíquota de 500 μ L foi passada para um tubo de 1,5 mL, procedeu-se, então, a uma centrifugação a 4.100 rpm durante 11 min, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 50 μ L do tampão de lise. Após 10 min de incubação no gelo, as células foram centrifugadas por 1 min a 9.500 rpm, o sobrenadante foi retirado e colocado em um novo tubo de 1,5 mL (solução mãe). Com a outra alíquota de 500 μ L, foi realizado o ensaio de Bradford para a normalização dos dados pela quantidade de proteína. Para tanto, utilizamos placa de 96 poços aglomerados com 10 μ L de amostra e 200 μ L do corante azul de comassie diluído na razão de 1:5. As amostras foram incubadas durante 5 min e a leitura foi realizada nos comprimentos de onda 620 nm como filtro de medida e 450 nm como filtro de referência. Para o ensaio da atividade proteolítica da caspase-3, utilizaram-se placas de 96 poços aglomerados, que foram lavadas com 300 μ L de tampão de diluição no início do ensaio. Os 40 μ L restantes no tubo foram colocados individualmente em placas de 96 poços aglomerados e a seguir, as células foram incubadas com 50 μ L de DTT em uma concentração final de 10 mM. Adicionou-se 5 μ L de substrato colorimétrico contendo acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida (DEVD-pNA) em uma concentração final de 200 μ M e após incubação a 37°C durante 2 horas com proteção da luz, as amostras foram lidas com filtro de 405 nm. Os resultados foram expressos em Unidades Arbitrárias de Absorbância (U.A.A.) dividindo-se o valor da absorbância pela quantidade de proteínas obtida pela técnica de Bradford. Os resultados da padronização foram expressos pela média das amostras em quadruplicata de cultura e duplicata experimental $\pm$ o Desvio Padrão. Durante a padronização, concluiu-se que os experimentos deveriam ser feitos com a utilização de 1.000 ilhotas, pois somente

com esse número observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo de ilhotas controle e o grupo de ilhotas tratadas com o agente indutor de apoptose camptotecina (Figura 18).

Figura 18: Gráfico representativo da padronização da quantidade de ilhotas necessárias para a realização dos experimentos de medida da atividade proteolítica da caspase-3. CTRL: ilhotas frescas; CMP: ilhotas tratadas com o agente indutor de apoptose camptotecina. U.A.A: unidade arbitrária de densitometria.

3.8. Preparo da Pioglitazona

Para a realização dos experimentos, obtivemos o sal da Pioglitazona, gentilmente cedido por (Takeda Chemical Industries, Ltd.Osaka, Japão). Para o preparo das soluções de trabalho que permitissem a obtenção de concentrações finais no meio de cultura de 10 μ M de Pioglitazona (peso molecular de 392,90 Dáltons), a droga foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) ⁸³, de forma que a concentração final do DMSO no meio de cultura não ultrapassasse 0,1%. As ilhotas não tratadas com a droga foram tratadas com meio de cultura contendo a mesma proporção de DMSO. A Pioglitazona ou o seu veículo (DMSO) foram acrescentados imediatamente após o isolamento das ilhotas pancreáticas e mantidos no meio de cultura durante todo o período de estudo, quando eram acrescentados a cada troca de meio (a cada dois dias). No experimento para análise da viabilidade funcional pela avaliação da secreção de insulina, tanto a Pioglitazona quanto o veículo foram acrescentados ao tampão Kreb's durante a sincronização celular e durante o estímulo com a glicose.

3.9. Delineamento experimental para a avaliação da expressão de genes relacionados à apoptose, do índice de apoptose e da viabilidade funcional de ilhotas muríneas tratadas ou não com Pioglitazona

Dois ou três experimentos independentes foram realizados para cada condição estudada, em duplicatas biológicas e, cada uma dessas, em duplicata técnica. Quando da realização de três experimentos, o efeito considerado foi aquele observado em pelo menos dois dos experimentos. Originalmente, havíamos nos propostos a estudar as ilhotas tratadas nas concentrações de 1 e 10 μ M de

Pioglitazona, concentrações essas baseadas no trabalho de Sakamoto et al, que avaliaram, em um ensaio de transativação realizado em células COS-1 transfectadas com plasmídeo *reporter*, a ativação do receptor PPAR γ por seus agonistas sintéticos Pioglitazona (Pio), Rosiglitazona (Rosi), Troglitazona (Tro) e um derivado das TZDs que não está disponível comercialmente (AD-5061). Este estudo demonstrou que a Pioglitazona nas doses de 1 e 10 μ M ativa de maneira significativa o PPAR γ em comparação à situação controle (0,1% DMSO) e que, dentre as doses testadas, a de 10 μ M foi a que promoveu a ativação máxima desses receptores⁸³ (Figura 19).

Apesar de um trabalho publicado em 2004 ter demonstrado que a Pioglitazona na dose de 1 μ M promoveu proteção contra apoptose induzida por IL-1 β e concentrações supra-fisiológicas de glicose em ilhotas pancreáticas humanas⁵⁸, abandonamos esta concentração no presente estudo, pois alguns experimentos preliminares não demonstraram qualquer ação da droga nesta concentração quando comparada com a situação controle (dados não demonstrados). Todos os experimentos foram realizados em concentração fisiológica (5,6 mM) de glicose e com o objetivo de melhor mimetizar *in vitro* os estímulos aos quais as ilhotas podem ser submetidas *in vivo* no paciente diabético, estudamos uma segunda concentração de glicose (23 mM). Optamos por avaliar exposições prolongadas à Pioglitazona (24, 48 e 72 horas), já que a maior parte dos estudos até o momento realizados havia analisado apenas períodos mais curtos de tratamento. Chegamos a estudar uma semana (168 horas) de tratamento para os experimentos de avaliação do índice de apoptose (dois experimentos independentes que serão demonstrados), no entanto, pela necessidade de trocas do meio de cultura a cada dois dias, percebeu-se

que havia uma perda do número de ilhotas neste período, o que poderia interferir nos resultados, razão pela qual o estudo deste tempo foi descontinuado. O delineamento experimental pode ser observado na Figura 20.

3.10. Análise Estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos pela mediana (linha transversal), pelo intervalo interquartilico entre 25 e 75% (caixa) e pelos valores máximos e mínimos (barras). A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pela prova não paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney para a comparação dos experimentos com dois grupos. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o valor de $p < 0,05$. As variáveis conteúdo de insulina, da expressão dos genes e do índice de apoptose foram transformadas em quantis (Q), sendo que a transformação posiciona o valor x (número a ser transformado) na ordenação dos valores da variável do menor para o maior valor, dentro dos extremos ($0 < x < 1$).

Figura 19: Gráfico de Sakamoto et al. demonstrando a ativação do receptor PPAR γ por seus agonistas sintéticos. Experimento realizado em células COS – 1.

Figura 20: Delineamento experimental para avaliação da expressão de genes relacionados à apoptose, do índice de apoptose e da viabilidade funcional de ilhotas muríneas tratadas ou não com Pioglitazona e mantidas em concentrações fisiológica (5,6 mM) e supra-fisiológica (23 mM) de glicose.

* O tempo de 168 horas somente foi utilizado na avaliação da fragmentação de DNA

4 . RESULTADOS

4.1. Efeito da Pioglitazona sobre a viabilidade funcional das ilhotas pancreáticas

4.1.1 Secreção de insulina estimulada por glicose por ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose

Para a avaliação da secreção de insulina em resposta ao estímulo com glicose em ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose, três experimentos independentes foram realizados nos tempos de 24, 48 e 72 horas de cultivo. A Pioglitazona não determinou efeito estatisticamente significativo sobre a secreção de insulina nas ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose (Figura 21).

Figura 21: Gráficos demonstrando o incremento na secreção de insulina em relação ao basal após estímulo com glicose em ilhotas mantidas em cultura em concentrações fisiológicas de glicose (5,6 mM) tratadas com Pioglitazona (10 µM) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo.

4.1.2. Secreção de insulina estimulada por glicose por ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose

Para a avaliação da secreção de insulina em resposta ao estímulo com glicose em ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose, três experimentos independentes foram realizados nos tempos de 24, 48 e 72 horas de cultivo. A Pioglitazona não determinou efeito estatisticamente significativo sobre a secreção de insulina nas ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose após 24 e 72 horas de cultivo, no entanto, em 48 horas, a Pioglitazona determinou um aumento estatisticamente significativo na secreção de insulina induzida por glicose (Figura 22).

Figura 22: Gráficos demonstrando o incremento em relação ao basal na secreção de insulina após estímulo com glicose em ilhotas mantidas em cultura em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com Pioglitazona (10 µM) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo.

4.1.3 Conteúdo total de insulina em ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose

Para a avaliação do conteúdo total de insulina em ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose, dois experimentos independentes foram realizados nos tempos de 24, 48 e 72 horas de cultivo. Em 24 horas de cultivo, observamos uma diminuição estatisticamente significativa no conteúdo total de insulina em ilhotas tratadas com a Pioglitazona em relação às ilhotas mantidas apenas com o veículo de diluição da droga, entretanto, um aumento no conteúdo total de insulina foi observado nas ilhotas mantidas por 48 e 72 horas de cultivo em concentrações fisiológicas de glicose (Figura 23).

Figura 23: Gráficos demonstrando o conteúdo total de insulina em ilhotas mantidas em cultura em concentrações fisiológicas de glicose (5,6 mM) tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo. U.A.A: unidade arbitrária de absorbância.

4.1.4 Conteúdo total de insulina em ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose

Para a avaliação do conteúdo de insulina em ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose, dois experimentos independentes foram realizados nos tempos de 24, 48 e 72 horas de cultivo. Em 24 horas de cultivo, não observamos efeitos significativos sobre o conteúdo total de insulina das ilhotas tratadas com a Pioglitazona em relação ao controle, entretanto em 48 horas de cultivo, a Pioglitazona determinou um aumento do conteúdo de insulina estatisticamente significativo em relação às ilhotas controle, efeito este que não foi sustentado, uma vez que se observou uma diminuição estatisticamente significativa no conteúdo total de insulina quando as células foram cultivadas por 72 horas em concentrações supra-fisiológicas de glicose (Figura 24).

Figura 24: Gráficos demonstrando o conteúdo total de insulina em ilhotas mantidas em cultura em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com Pioglitazona (10 µM) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo. U.A.A: unidade arbitrária de absorbância.

4.1.5. Resumo dos resultados obtidos na análise da secreção de insulina após estímulo com glicose e do conteúdo total de insulina

Um resumo dos achados obtidos na análise dos efeitos da Pioglitazona sobre a secreção estática de insulina após estímulo com glicose e sobre o conteúdo total de insulina em ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas (5,6 mM) e supra-fisiológicas (23 mM) de glicose está demonstrado na Tabela 2. Os resultados em verde evidenciam um possível efeito benéfico da droga, enquanto os resultados em vermelho evidenciam um possível efeito deletério.

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos na análise da secreção de insulina após estímulo com glicose e do conteúdo total de insulina em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações fisiológicas (5,6 mM) e supra-fisiológicas (23 mM) de glicose tratadas com Pioglitazona em relação a ilhotas tratadas somente com o veículo nos tempos 24, 48 e 72 horas.

	FISIOLÓGICAS	SUPRA-FISIOLÓGICAS	TEMPO
Secreção de Insulina	INALTERADA	INALTERADA	24 horas
	INALTERADA	AUMENTADA	48 horas
	INALTERADA	INALTERADA	72 horas
Conteúdo de Insulina	DIMINUÍDO	INALTERADA	24 horas
	AUMENTADO	AUMENTADO	48 horas
	AUMENTADO	DIMINUÍDO	72 horas

4.2. Efeito da Pioglitazona sobre a expressão de genes relacionados à apoptose e sobre o índice de apoptose de ilhotas pancreáticas

4.2.1. Expressão dos genes relacionados à apoptose em ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose

Para a avaliação da expressão dos genes relacionados à apoptose em ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose, três experimentos independentes foram realizados. Após análise segundo o modelo matemático descrito por Pfaffl ⁷⁸, em 24 horas evidenciou-se uma diminuição estatisticamente significativa na expressão do gene *Bax* nas ilhotas tratadas com Pioglitazona em relação às ilhotas não tratadas, entretanto, após 48 e 72 horas de cultivo, houve um aumento estatisticamente significativo na expressão do gene *Bax* nas ilhotas tratadas com Pioglitazona (10 μ M) em relação às ilhotas não tratadas (Figura 25). Não foram observadas diferença estatisticamente significativas na expressão do gene *Bcl2* em 24, 48 ou 72 horas de cultivo entre as ilhotas pancreáticas tratadas e não tratadas com Pioglitazona (Figura 26).

* $p < 0,05$

Figura 25: Gráficos representativos da expressão do gene *Bax* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose (5,6mM) tratadas com Pioglitazona (10μM) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo.

*** $p < 0,05$**

Figura 26: Gráficos representativos da expressão do gene *Bcl2* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose (5,6mM) tratadas com Pioglitazona (10 μM) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo.

4.2.2. Expressão dos genes relacionados à apoptose em ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose

Para a avaliação da expressão dos genes relacionados à apoptose em ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose, três experimentos independentes foram realizados. A análise segundo o modelo matemático descrito por Pfaffl⁷⁸ demonstrou que em 24 horas de cultivo não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *Bax* nas ilhotas tratadas com Pioglitazona em relação às ilhotas não tratadas, entretanto, após 48 horas de cultivo houve uma diminuição estatisticamente significativa na expressão deste gene nas ilhotas tratadas com Pioglitazona em relação às ilhotas não tratadas. Esta diminuição não foi sustentada após 72 horas de cultivo, quando se observou um aumento estatisticamente significativo na expressão do gene *Bax* nas ilhotas tratadas com Pioglitazona em relação às ilhotas não tratadas (Figura 27).

Quanto ao gene *Bcl2*, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa na expressão deste gene nas ilhotas tratadas com Pioglitazona em relação às ilhotas não tratadas em 24 horas de cultivo e esta diferença se manteve quando as células foram cultivadas por 48 horas. Após cultivo por 72 horas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão do gene *Bcl2* (Figura 28).

Figura 27: Gráficos representativos da expressão do gene *Bax* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com Pioglitazona (10 μ M) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo.

* $p < 0,05$

Figura 28: Gráficos representativos da expressão do gene *Bcl2* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com Pioglitazona (10μM) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48 e 72 horas de cultivo.

4.2.3. Índice de apoptose avaliado pela medida de fragmentação de DNA de ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose

Para a avaliação do índice de apoptose de ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose, três experimentos independentes foram realizados. Conforme demonstrado na Figura 29, não houve diferenças estatisticamente significativas no índice de apoptose de ilhotas tratadas com Pioglitazona em relação às ilhotas não tratadas após 24, 72 e 168 horas de cultivo, entretanto, houve uma diminuição estatisticamente significativa no índice de apoptose de ilhotas tratadas com Pioglitazona em relação às ilhotas não tratadas após 48 horas de cultivo.

Figura 29: Gráficos representativos do índice de apoptose avaliado pela medida de fragmentação de DNA de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose (5,6 mM) tratadas com Pioglitazona (10µM) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48, 72 e 168 horas de cultivo. U.A.A: unidade arbitrária de absorbância

4.2.4. Índice de apoptose avaliado pela medida de fragmentação de DNA de ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose

Para a avaliação do índice de apoptose de ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose, três experimentos independentes foram realizados. Conforme demonstrado na Figura 30, em 24 horas de cultivo não houve diferença estatisticamente significativa no índice de apoptose de ilhotas tratadas com Pioglitazona em relação às ilhotas não tratadas, entretanto, houve um aumento estatisticamente significativo no índice de apoptose de ilhotas tratadas com Pioglitazona em relação às ilhotas não tratadas após 48, 72 e 168 horas de cultivo.

Figura 30: Gráficos representativos do índice de apoptose avaliado pela medida de fragmentação de DNA de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com Pioglitazona (10µM) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 24, 48, 72 e 168 horas de cultivo. U.A.A: unidade arbitrária de absorbância

4.2.5. Índice de apoptose avaliado pela medida da atividade proteolítica da caspase-3 de ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose

A avaliação o índice de apoptose pela medida da atividade proteolítica da caspase-3 foi realizada com o objetivo de confirmar os achados previamente encontrados em ilhotas tratadas com Pioglitazona mantidas em condições supra-fisiológicas de glicose, que apresentaram um aumento do índice de apoptose na análise de fragmentação do DNA após 48 e 72 horas de cultivo.

Em dois experimentos independentes, observou-se um aumento estatisticamente significativo na atividade proteolítica da caspase-3 nas ilhotas tratadas com Pioglitazona em relação às ilhotas não tratadas (Figura 31).

* p<0,05

Figura 31: Gráficos representativos do índice de apoptose avaliado pela medida da atividade proteolítica da caspase-3 em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com 10 μM de Pioglitazona (10 μM) ou apenas com o veículo da droga (CTRL) após 48 e 72 horas de cultivo. U.A.A.: unidade arbitrária de absorbância

4.2.6. Resumo dos resultados obtidos na análise da expressão de genes relacionados à apoptose e do índice de apoptose avaliado pela medida da fragmentação de DNA e da atividade proteolítica da caspase-3

Um resumo dos achados obtidos na avaliação dos efeitos da Pioglitazona sobre a expressão dos genes *Bax* e *Bcl2* e sobre o índice de apoptose avaliado pela medida da fragmentação de DNA e da atividade proteolítica da caspase-3 em ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas (5,6 mM) e supra-fisiológicas (23 mM) de glicose está demonstrado na Tabela 3. Os resultados em verde evidenciam um possível efeito benéfico da droga, enquanto os resultados em vermelho evidenciam um possível efeito deletério da Pioglitazona.

Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos na análise da expressão de genes relacionados à apoptose e do índice de apoptose (avaliado pela medida da fragmentação do DNA e da atividade proteolítica da caspase-3) em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações fisiológicas (5,6 mM) e supra-fisiológicas (23 mM) de glicose tratadas com Pioglitazona em relação a ilhotas tratadas somente com o veículo nos tempos 24, 48 e 72 horas.

Efeito da Pioglitazona	FISIOLÓGICAS	SUPRA-FISIOLÓGICAS	PERÍODO
Bax - mRNA	MENOR	IGUAL	24 horas
	MAIOR	MENOR	48 horas
	MAIOR	MAIOR	72 horas
Bcl-2 - mRNA	IGUAL	MENOR	24 horas
	IGUAL	MENOR	48 horas
	IGUAL	IGUAL	72 horas
Índice de Apoptose Fragmentação de DNA	IGUAL	IGUAL	24 horas
	MENOR	MAIOR	48 horas
	IGUAL	MAIOR	72 horas
	IGUAL	MAIOR	168 horas
Índice de Apoptose Atividade de Caspase 3	não realizado	MAIOR	48 horas
	não realizado	MAIOR	72 horas

5. DISCUSSÃO

A implantação de um procedimento bem sucedido de isolamento de ilhotas pancreáticas murídeas demandou aproximadamente 12 meses, período superior ao que havíamos inicialmente previsto. Apesar do constante intercâmbio com outros grupos que isolam ilhotas murídeas em São Paulo, muitas dificuldades foram encontradas até se chegar a um procedimento de boa reprodutibilidade e que resultasse em uma preparação pura, com pequena quantidade de tecido acinar. Além disso, a manipulação da preparação de ilhotas fora do fluxo laminar, necessária para a realização da técnica de *hand-picking*, resultou em contaminações bacterianas quando as ilhotas eram mantidas por mais de 24 horas em cultura. O problema das contaminações somente foi contornado após a padronização da purificação das ilhotas por meio do gradiente descontínuo com HBSS - Ficoll, adaptado da técnica descrita por Ricordi et al. . Esta técnica apresenta boa reprodutibilidade e rendimento, além de não necessitar de manipulações fora do fluxo laminar, mantendo as culturas de ilhotas livres de contaminação nos períodos estudados.

A destruição das ilhotas durante o processo de isolamento se deve ao estresse que ocorre durante as etapas de digestão e purificação, que pode resultar em dano a função e a sobrevivência da célula β .⁸⁴ O tempo de isquemia prolongado, a privação de nutrientes, a presença de citocinas inflamatórias e endotoxinas, entre outros, têm sido implicados como fatores patogênicos para a destruição das ilhotas , o que pode comprometer o sucesso de experimentos realizados *in vitro* . Para assegurar a natureza endócrina das células isoladas com a técnica padronizada, bem como sua viabilidade funcional, as ilhotas foram caracterizadas durante a digestão

enzimática pela coloração com ditizona ⁸⁵, e, após o término do procedimento, confirmou-se a expressão dos genes da insulina, glucagon, somatostatina e *Pdx1* nas ilhotas recém-isoladas, assim como a capacidade de secreção de insulina em resposta ao estímulo com glicose, no ensaio de incubação estática ⁸⁶. Pôde-se observar um incremento em relação ao basal estatisticamente significativo nas concentrações de insulina, da ordem de três a sete vezes, nas ilhotas mantidas por 24, 48 e 72 horas em cultura. É interessante observar que, embora não tenha havido diferenças estatisticamente significativas, em decorrência da variabilidade na secreção, parece existir uma tendência a um aumento na secreção de insulina com o passar do tempo. Isso poderia ser explicado por uma “recuperação” funcional da ilhota após o estresse do isolamento, o que é suportado por dados prévios da literatura. Além disso, durante a padronização da técnica de ELISA para avaliação do índice de apoptose celular, ilhotas recém-extraídas foram utilizadas juntamente com ilhotas tratadas com estreptozotocina (francamente apoptóticas, usadas como controle positivo) e se pôde observar os baixos índices de apoptose das ilhotas recém-extraídas em relação às tratadas com estreptozotocina, corroborando a viabilidade das ilhotas obtidas pela técnica de isolamento que está sendo utilizada.

A Pioglitazona é um ligante do PPAR γ e do PPAR α que, conforme descrito após ensaio de transativação, é capaz de ativar tanto o PPAR γ 1 como o PPAR α nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M, concentrações estas que foram inicialmente selecionadas para a realização dos experimentos aqui propostos. Nos experimentos iniciais para a avaliação da expressão dos genes relacionados à apoptose, observamos que a concentração de 10 μ M, que corresponde a uma concentração superior àquela observada nos estudos de farmacocinética da

Pioglitazona quando esta é administrada na dose máxima, exercia efeitos mais perceptíveis, enquanto na concentração de 1 μM , que corresponde a uma concentração farmacológica observada após administração de doses submáximas de Pioglitazona, quase não foram observadas modulações gênicas. Por esta razão, optamos por continuar estudando apenas a concentração de 10 μM , que é a mais utilizada na literatura. Os tempos de 24, 48 e 72 horas foram selecionados com o objetivo de se avaliar os efeitos de tratamentos mais prolongados sobre as ilhotas pancreáticas.

Os resultados obtidos em concentrações fisiológicas de glicose sugerem que, nesta condição, a Pioglitazona possa ter um efeito benéfico sobre a viabilidade funcional das ilhotas após exposições mais prolongadas. Embora a análise da secreção estática de insulina não tenha demonstrado um efeito significativo da Pioglitazona em nenhum dos tempos estudados, a avaliação do conteúdo total de insulina evidenciou uma diminuição transitória da insulina nas ilhotas tratadas com Pioglitazona por 24 horas, seguida por um aumento no conteúdo de insulina quando as ilhotas foram cultivadas por 48 e 72 horas.

Apesar de alguns trabalhos em linhagens de insulinoma de roedores terem demonstrado que as TZDs inibem a secreção estática de insulina, especialmente após incubações prolongadas^{87,88}, existem limitações quanto a se tirar conclusões com base em experimentos realizados nestas linhagens, principalmente sabendo que as TZDs influenciam a taxa de proliferação dessas células⁸⁷. Em relação aos efeitos das TZDs avaliados em ilhotas pancreáticas, um trabalho em ilhotas humanas de doadores de pâncreas diabéticos e não diabéticos demonstrou um aumento da secreção de insulina induzido pela Pioglitazona 10 μM

imediatamente após a perfusão da mesma apenas nas ilhotas de doadores não diabéticos, no entanto, este aumento foi imediatamente seguido por uma diminuição na secreção de insulina. Em outro estudo realizado em cultura primária de ilhotas pancreáticas muríneas, a Troglitazona na concentração de 10 μM promoveu uma diminuição da secreção de insulina em ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose após períodos de duas a cinco horas de tratamento⁸⁹.

Embora esses dois estudos realizados em ilhotas expostas por curtos períodos de tempo às TZDs tenham demonstrado um efeito inibitório dessas drogas sobre a secreção de insulina, o achado de um aumento do conteúdo total de insulina em nosso estudo sugere que, em ilhotas mantidas por períodos mais prolongados em concentrações fisiológicas de glicose, a Pioglitazona possa ter um efeito benéfico sobre a produção de insulina, efeito este que não se reflete, entretanto, na secreção de insulina em resposta ao estímulo com glicose. Esta ausência de repercussão sobre a secreção de insulina também foi reportada por Zeender et al.⁵⁸, que não observaram alterações na cinética de secreção de insulina após a incubação prolongada (96 horas) de ilhotas humanas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose com Pioglitazona 1 μM .

Em relação à avaliação da apoptose, os genes *Bcl2* e *Bax* estão entre os mais bem caracterizados reguladores deste processo, participando da via mitocondrial, sendo a proteína BCL2 repressora e a BAX promotora da morte celular. A atividade anti-apoptótica do *Bcl2* é proporcional ao nível de expressão de seu RNAm, sendo que os níveis relativos de *Bax* e *Bcl2* determinam a suscetibilidade da célula entrar em apoptose^{43, 44}, razão pela qual consideramos o estudo da expressão do RNAm desses dois genes relevantes. A outra técnica

utilizada na avaliação da apoptose das ilhotas foi a que mensura a apoptose por meio da quantificação do DNA fragmentado associado à histona (oligonucleossomo), uma das características patológicas que definem a apoptose⁵⁰.

Nas ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose, evidenciou-se uma diminuição de expressão do gene *Bax* estatisticamente significativa nas ilhotas tratadas com Pioglitazona em 24 horas de cultivo em relação às ilhotas não tratadas, entretanto, após 48 e 72 horas, houve um aumento estatisticamente significativo da expressão deste gene nas ilhotas tratadas com a droga. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão do gene *Bcl2* em nenhum dos tempos estudados e a avaliação do índice de apoptose determinado pela fragmentação do DNA somente demonstrou modulação pela Pioglitazona em 48 horas de cultivo, sendo que nos tempos 24, 72 e 168 horas, não foram detectadas alterações significativas em relação às células não tratadas. Desta forma, a ausência de modulações na expressão do gene *Bcl2* concomitantemente a ausência de modificações no índice de apoptose em três dos quatro tempos estudados parece refletir o melhor valor preditivo dos níveis de expressão do RNAm do *Bcl2* para o desfecho apoptose em comparação aos níveis de expressão do RNAm do *Bax*. De fato, não há trabalhos na literatura que demonstrem que o nível relativo do RNAm do gene *Bax per si* seja capaz de determinar a susceptibilidade da célula entrar em apoptose. Em contra partida, já se demonstrou que os níveis de expressão do RNAm do gene *Bcl2* são proporcionais a sua atividade anti-apoptótica, e que o nível de expressão deste gene *per si* pode ser utilizado como indicador de apoptose^{46, 47, 90, 91}. Os achados referentes ao índice de apoptose estão de acordo com os resultados publicados por Zeender et al.⁵⁸, que não observaram modificações no

índice de apoptose após incubação prolongada de ilhotas humanas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose com Pioglitazona 1 e 5 μ M.

Assim, os resultados deste estudo parecem apontar para um efeito benéfico, ainda que sutil, da Pioglitazona sobre as ilhotas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose nas condições estudadas, com aumento do conteúdo total de insulina após as exposições mais prolongadas e uma diminuição transitória do índice de apoptose. Este achado abre a possibilidade de utilização da Pioglitazona no meio de cultura contendo concentração fisiológica de glicose durante o período em que ilhotas pancreáticas isoladas aguardam utilização para transplante, na tentativa de melhorar o conteúdo total de insulina, e, conseqüentemente, a viabilidade funcional das células a serem transplantadas.

Os pacientes diabéticos tipo 2 apresentam capacidade secretória de insulina inadequada para suplantar a resistência insulínica concomitante e, como resultado, advém a hiperglicemia. Nesses pacientes, o tratamento com as glitazonas tem como principal objetivo a diminuição da resistência periférica à insulina, entretanto, tem sido demonstrado que o tratamento com essas drogas também melhora a função da célula β , causando recuperação da função secretória^{27, 92}. Este efeito pode ser secundário à menor demanda resultante da diminuição da resistência insulínica ou ainda, pode resultar de um efeito direto da droga sobre as células β .

A avaliação da viabilidade funcional de ilhotas pancreáticas tratadas com Pioglitazona também foi realizada em condições que mimetizassem um ambiente hiperglicêmico. Os resultados obtidos em concentrações supra-fisiológicas de glicose demonstraram que a Pioglitazona aumenta a secreção de insulina transitoriamente, já que somente nos experimentos realizados após 48 horas de

cultivo a droga promoveu um aumento estatisticamente significativo na secreção de insulina estimulada por glicose, bem como um aumento no conteúdo total de insulina. O resultado de diminuição do conteúdo total de insulina observado após 72 horas, no entanto, sugere um efeito deletério da Pioglitazona sobre a viabilidade funcional das ilhotas expostas cronicamente à droga.

Efeitos positivos de Pioglitazona 1 μ M sobre a secreção de insulina por ilhotas humanas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose foram relatados por Zeender et al.⁵⁸ após 96 horas de exposição à droga. A ausência de efeitos estimulatórios sobre a secreção de insulina em 72 horas observada no presente estudo poderia ser devida às diferentes concentrações de Pioglitazona utilizada nos dois estudos, ou, ainda, ao índice de apoptose aumentado das ilhotas pancreáticas expostas à Pioglitazona observado em nosso estudo.

A diferença na concentração de Pioglitazona também está sendo aventada para explicar as diferenças observadas entre nosso estudo e o estudo de Zeender⁵⁸ nos resultados do índice de apoptose das ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose. Este autor observou que a Pioglitazona diminuiu o índice de apoptose de ilhotas mantidas em 33 mM de glicose após 96 horas de exposição à droga na concentração de 1 μ M e após 48 horas de exposição à droga na concentração de 5 μ M. Em nosso estudo, observamos um aumento do índice de apoptose de ilhotas mantidas em 23 mM de glicose expostas à Pioglitazona 10 μ M após 48, 72 e 168 horas de cultivo.

A Pioglitazona em presença de concentrações supra-fisiológicas de glicose já foi associada a um efeito pró-apoptótico em células de músculo liso vascular, porém na concentração de 100 μ M, dez vezes maior do que a utilizada em

nosso estudo. Este efeito ocorreu simultaneamente ao aumento da expressão da citocina pró-inflamatória TGF-1 β que, ao ser suprimida por um antagonista, inibiu a ação pró-apoptótica da droga, sugerindo o envolvimento desta citocina no mecanismo de indução de apoptose pela Pioglitazona em presença de concentrações elevadas de glicose⁷⁰, que, por si só, já favorecem um perfil pró-inflamatório em ilhotas pancreáticas.⁹³

Uma vez que o aumento do índice de apoptose medido pela fragmentação do DNA ocorreu simultaneamente a uma diminuição da expressão do RNAm do gene anti-apoptótico *Bcl2*, considerado um bom preditor de morte celular e a um aumento da atividade proteolítica da caspase-3, os resultados relacionados à apoptose de ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose e expostas cronicamente à Pioglitazona nos parecem consistentes e nos permitem sugerir que, nesta condição, a Pioglitazona exerça efeitos deletérios sobre as ilhotas pancreáticas.

Em conclusão, a Pioglitazona parece exercer efeitos diretos benéficos sobre ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações fisiológicas de glicose e efeitos diretos deletérios sobre ilhotas mantidas em concentrações supra-fisiológicas de glicose. É possível que os efeitos benéficos indiretos das TZDs sobre as ilhotas pancreáticas, resultantes da melhora da ação insulínica nos tecidos periféricos, se sobreponham a eventuais efeitos deletérios diretos que a droga possa exercer sobre as ilhotas em condições de hiperglicemia. Também não se pode ignorar que, além da glicotoxicidade, outras condições não abordadas neste trabalho possuem um importante papel na perda de massa de células β no DM tipo 2, tais como a lipotoxicidade e o depósito amilóide, para os quais existem estudos indicando efeitos

anti-apoptóticos das TZDs^{94, 95}, também por serem definitivamente confirmados, já que, para a lipotoxicidade, existe um relato de piora do índice de apoptose de ilhotas expostas a ácidos graxos⁶².

As diferenças nos efeitos diretos da Pioglitazona sobre ilhotas pancreáticas muríneas conforme a concentração de glicose observadas no presente estudo também são corroboradas por outro estudo desenvolvido em nosso laboratório com uma plataforma de microarranjos de DNA, que demonstrou que, em presença de 5,6 mM de glicose, a Pioglitazona na concentração de 10 μ M ativa de forma relevante apenas uma via gênica relacionada ao metabolismo lipídico, enquanto em presença de 23 mM de glicose, são ativadas de maneira relevante vias gênicas relacionadas a ciclo celular e a apoptose, sendo que um número muito mais expressivo de genes foi modulado em presença de concentrações supra-fisiológicas de glicose, demonstrando a importância de se estudar as duas condições metabólicas

As restrições para que se tirem conclusões voltadas para a prática clínica a partir de estudos realizados *in vitro* em células não humanas são bem conhecidas, mas os resultados obtidos nestes modelos experimentais não devem ser desconsiderados. Esse estudo reforça a necessidade de estudos clínicos de longo prazo especificamente desenhados com o objetivo de avaliar os efeitos das TZDs sobre a preservação da função das células β , especialmente em situações nas quais a glicotoxicidade seja mais relevante que a lipotoxicidade, como é caso de pacientes com diabetes autoimune latente do adulto (LADA), nos quais as TZDs têm sido consideradas como potencial possibilidade terapêutica devido as suas propriedades anti-inflamatórias e anti-autoimunes.^{96, 97, 98}

6. CONCLUSÕES

1. Os efeitos diretos da Pioglitazona sobre as ilhotas pancreáticas muríneas em cultura variam de acordo com as concentrações de glicose as quais as ilhotas estão expostas;
2. Em concentração fisiológica de glicose, a Pioglitazona parece exercer efeitos diretos benéficos sobre a viabilidade funcional e o índice de apoptose;
3. Em concentração supra-fisiológica de glicose, a Pioglitazona exerce efeitos diretos deletérios sobre a viabilidade funcional e o índice de apoptose de ilhotas pancreáticas muríneas.

7. REFERÊNCIAS

-
- ¹ Slack J.M.W. Developmental biology of the pancreas. *Development Biology* 121, 1569-1580, 1995
- ² Collombat P, Sorensen J.H., Krull J, Berger J, Riedel D, Herrera P L, Serup P and Mansouri A. Embryonic endocrine pancreas and mature β -cells acquire α and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *J. Clin. Invest.* 117:961–970, 2007.
- ³ Bonner-Weir S Morphological evidence for pancreatic polarity of beta-cell within islets of Langerhans. *Diabetes* 37:616-621, 1988.
- ⁴ Legg P.G. 1967 The fine structure and innervation of the beta and delta cells in the islet of Langerhans of the cat. *Zeitschrift für Zellforschung* 80:307- 321, 1967.
- ⁵ Heller R.S., Jenny M, Collombat P., Mansouri A., Tomasetto C., Madsen O.D., Mellitzer G, Gradwohl G., Serup P. ,Genetic determinants of pancreatic ϵ -cell development* *Developmental Biology* 286 217 – 224, 2005.
- ⁶ Wang J, Shen L, Najafi H, Kolberg J, Matschinsky M.F, Urdea M, and German M. Regulation of insulin preRNA splicing by glucose *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, pp. 4360–4365, 1997

⁷Welsh M, Scherberg N, Gilmore R and Steiner D.F. Translational control of insulin biosynthesis, evidence for regulation of elongation, initiation and signal-recognition-particle-mediated translational arrest by glucose. *Biochem. J.* (1986) 235, 459-467

⁸ Doyle M.E. and Egan J.M. Pharmacological Agents That Directly Modulate Insulin Secretion. *Pharmacol Rev* 55:105–131, 2003

⁹ Ren J., Jin P., Wang E., Liu E., Harlan D.M., Li X. and Stroncek D.F. Pancreatic islet cell therapy for type I diabetes: understanding the effects of glucose stimulation on islets in order to produce better islets for transplantation. *Journal of Translational Medicine* 5:1, 2007.

¹⁰ Haber E.P., Curi R., Carvalho C.R.O., Carpinelli A.R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos *Arq Bras Endocrinol Metab* 45/3:219-227, 2001

¹¹ Keen H & Barnes DJ. 1997. The diagnosis and classification of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. In: *Textbook of Diabetes*, ed. Blackwell Science. Oxford, 2^o edição.

¹² Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care* 15:1509-16, 1992.

¹³ Nathan DM, Cagliero E. Diabetes Mellitus. In: Felig P, Frohman LA. Endocrinology and Metabolism (4 Ed). United States of America: McGraw-Hill Company. 827-926, 2001

¹⁴ Reaven GM. Banting Lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 37:1595-1607, 1988.

¹⁵ Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr Rev 20:649–88, 1999.

¹⁶ Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-deoxy-112,14 prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . Cell 83:803–12, 1995.

¹⁷ Braissant O, Foulle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR β and γ in the adult rat. Endocrinology 137:354–66, 1995.

¹⁸ Garg A, Peshock RM, Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). J Clin Endocrinol Metab 84:170–74, 1999.

¹⁹ Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean ME. Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22:288–93, 1999.

²⁰ Hallakou S, Doare L, Foufelle F, Kergoat M, Guerre-Millo M, et al. Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. *Diabetes* 46:1393–99, 1997.

²¹ Mauriege P, Imbeault P, Langin D, Lacaille M, Almeras N, et al. Regional and gender variations in adipose tissue lipolysis in response to weight loss. *J. Lipid Res* 40:1559–71, 1999.

²² Dubois M, Pattou F, Kerr-Conte J, Gmyr V, Vandewalle B, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. *Diabetologia* 43:1165–69, 2000.

²³ De Fronzo RA. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37: 667-87, 1988.

²⁴ Johansen K. Efficacy of metformin in the treatment of NIDDM: meta analysis. *Diabetes Care* 22: 33-7, 1999.

²⁵ Zangeneh F, Kudva YC, Basu A. Insulin Sensitizers. *Mayo Clin Proc.* 78: 471- 9, 2003.

-
- ²⁶ Inzucchi SE. Oral Antihyperglycemic Therapy for Type 2 Diabetes. JAMA 287: 360-372, 2002.
- ²⁷ Cavaghan MK, Ehrmann DA, Byrne MM, Polonsky KS. Treatment with the oral antidiabetic agent troglitazone improves beta cell responses to glucose in subjects with impaired glucose tolerance. J Clin Invest 100: 530-7, 1997.
- ²⁸ Prigeon RL, Kahn SE, Porte D. Effect of troglitazone on B cell Function, Insulin Sensitivity, and Glycemic Control in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. J Clin Endocrinol Metab 83: 819-23, 1998.
- ²⁹ Ovalle F, Bell DSH. Clinical evidence of thiazolidinedione-induced improvement of pancreatic β -cell function in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetes, Obesity and Metabolism 4: 56-9, 2002.
- ³⁰ Kim HI, Kim JW, Kim SH, Cha JY, Kim KS, Ahn YH. Identification and functional characterization of the peroxisomal proliferator response element in rat GLUT2 promoter. Diabetes 49:1517–24, 2000.
- ³¹ Kawasaki F., Matsuda M., Kanda Y., Inoue H., and Kaku K. Structural and functional analysis of pancreatic islets preserved by pioglitazone in db/db mice Am J Physiol Endocrinol Metab 288: E510–E518, 2005.

³²Zhang F., Sjöholm A., Zhang Q., Pioglitazone acutely influences glucose-sensitive insulin secretion in normal and diabetic human islets *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351 750–755, 2006

³³ Nakamichi Y., Kikuta T., Ito E., Imaizumi M. O., Nishiwaki C., Ishida H and Nagamatsu S. PPAR- γ overexpression suppresses glucose-induced proinsulin biosynthesis and insulin release synergistically with pioglitazone in MIN6 cells. *Biochemical and biophysical research communications* vol. 306 (4) 832-836, 2003

³⁴ Ito E., Ozawa S., Takahashi K., Tanaka T., Katsuta H, Yamaguchi S., Maruyama M., Takizawa M., Katahira H., Yoshimoto K., Nagamatsu S. and Ishida H. PPAR- γ overexpression selectively suppresses insulin secretory capacity in isolated pancreatic islets through induction of UCP-2 protein *Biochemical and biophysical research communications*. 324(2) 810-814, 2004.

³⁵ Tordjman K., Standley K.N., Mizrahi C.B., Leone T.C., Coleman T., Kelly D.P. and Semenkovich C.F. PPAR suppresses insulin secretion and induces UCP2 in insulinoma cells. *J. Lipid Res.* 43:936–943, 2002.

³⁶ Wylie A.H. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 53: 451 - 65 , 1997

-
- ³⁷ Jacobson M.D. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347, 1997.
- ³⁸ Fan T.J., Han L.H., Cong R.S. and Liang J. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37(11): 719–727, 2005.
- ³⁹ Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 24: 5137–5148, 2005.
- ⁴⁰ Salvasen G.S., Dixit V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91: 443 - 46 , 1997.
- ⁴¹ Sylvie D., Annelyse D., Michael S., Franck M., Mario D., Marc D., An introduction to the molecular mechanism of apoptosis. *new york academy of sciences* 1010 1-8, 2003.
- ⁴² Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805), 770-776, 2000
- ⁴³ Brady H.J., Gomez G.G. Bax: the pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *Int J Biochem Cell Biol*; 30: 647- 50. 1998
- ⁴⁴ Yin X.M., Oltvai Z.N., Korsmeyer S.J. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369: 321 – 3, 1994

-
- ⁴⁵ Willis S., Day C.L., Hinds M.G. and Huang D.C.S. The Bcl 2 regulated apoptotic pathway. *Journal of Cell Science* 116, 4053-4056, 2003.
- ⁴⁶ Zhong, L.-T., Saraan, T., Kane, D. J., Charles, A. C., Mah, S. P., Edwards, R. H. and Bredesen, D. E. Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 4533-4537, 1993
- ⁴⁷ Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nunez, G., Miesfeld, R. L. and Distelhorst, C. W. Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum associated Ca²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6569-6573, 1994
- ⁴⁸ Shimazaki, K., Ishida, A. and Kawai, N. Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neurosci. Res.* 20, 95-99, 1994
- ⁴⁹ Lawrence, M. S., Ho, D. Y., Sun, G. H., Steinberg, G. K. and Sapolsky, R. M. Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS against neurological insults in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 16, 486-496, 1996
- ⁵⁰ Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 53: 491 - 08 , 1997.

⁵¹ Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochemical Pharmacology* 66: 1433-40 – 2003.

⁵² Leonardi O, Mints G, Hussain MA. Beta-cell apoptosis in the pathogenesis of human type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 149: 99-02, 2003.

⁵³ Davalli AM, Scaglia L, Zangen DH, et al. Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period: dynamic changes in structure and function. *Diabetes* 45: 1161 - 67, 1996.

⁵⁴ Thomas D, Yang H, Boffa DJ et al. Proapoptotic Bax is hyperexpressed in isolated human islets compared with antiapoptotic BCL-2. *Transplantation* 74: 1489-96, 2002.

⁵⁵ Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369: 321 – 23 1994.

⁵⁶ Bonner-Weir S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* 141:1926-1929, 2000.

-
- ⁵⁷ Moritake H, Yan-Ting Z, Mariella R, Danielle B, Lelio O and Roger HU. Troglitazone prevents mitochondrial alterations, b cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11513–8, 1999.
- ⁵⁸ Zeender E., Maedler K, Bosco D, Berney T, Donath Y.M. and Halban P. A. Pioglitazone and Sodium Salicylate Protect Human Cells against Apoptosis and Impaired Function Induced by Glucose and Interleukin-1 *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(10):5059–5066, 2004.
- ⁵⁹ Vandewalle B, Moerman E, Lefebvre B, Defrance F, Gmyr V, Lukowiak B, Kerr Conte J, Pattou F. PPARgamma-dependent and -independent effects of rosiglitazone on lipotoxic human pancreatic 366(4):1096-101. *Epub* 2007
- ⁶⁰ Saitoh Y, Chun-Ping C, Noma K, Ueno H, Mizuta M, Nakazato M. Pioglitazone attenuates fatty acid-induced oxidative stress and apoptosis in pancreatic beta-cells. *Diabetes Obes Metab.* 2007
- ⁶¹ Othani KI, Shimizu H, Sato N and Mori M. Troglitazone (CS-045) inhibits β -cell proliferation rate following stimulation of insulin secretion in HIT-T15 cells. *Endocrinology* 1998;139:172-178.
- ⁶² Cnop M, Hannaert JC, Pipeleers DG. Troglitazone does not protect rat pancreatic β cells against free fatty acid-induced cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 2002;63:1281-1285.

⁶³ Li Y., Deng H., Zhao J.M., Dai D., Tan X.Y., PPAR γ pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells. *World J Gastroenterol*; 9(6):1220-1226 2003.

⁶⁴ Guan Y.F., Zhang Y.H., Breyer R.M., Davis L., Breyer M.D. Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) in Human Transitional Bladder Cancer and its Role in Inducing Cell Death Correspondence. *Neoplasia*, 4, 330-339, 1999

⁶⁵ Hirase N, Yanase T., Mu Y.M., Muta K., Umemura T., Takayanagi R., Nawata H. Thiazolidinedione Induces Apoptosis and Monocytic Differentiation in the Promyelocytic Leukemia Cell Line HL60. *Oncology*; 57:17-26, 1999

⁶⁶ Satoh T., Toyoda M., Hoshino H., Monden T., Yamada M., Shimizu H., Miyamoto K. and Mori M., 1 Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells *Oncogene*. 21, 2171-2180, 2002

⁶⁷ Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B (1998) Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273:25573–25580, 1998.

-
- ⁶⁸ Okura T., Nakamura M., Takata Y., Watanabe S., Kitami Y., Hiwada K. Troglitazone induces apoptosis via the p53 and Gadd45 pathway in vascular smooth muscle cells *European Journal of Pharmacology* 407 227–235, 2000.
- ⁶⁹ Berthold I.G., Berthold H.K., Weber A.A., Ko Y., Seul C., Sachinidis H.V.A. Troglitazone and rosiglitazone induce apoptosis of vascular smooth muscle cells through an extracellular signal-regulated kinase-independent pathway *Arch Pharmacol.* 363 :215–221, 2001.
- ⁷⁰ Ruiz E., Redondo S., Gordillo-Moscoso A., Tejerina T. Pioglitazone induces apoptosis in human vascular smooth muscle cells from diabetic patients involving the TGF-beta/ALK-4/5/7/Smad2 signaling pathway. *JPET American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 10 1124, 2007
- ⁷¹ Gotoh M, et al .An improved method for isolation of mouse pancreatic islet. *Transplantation* 40: 437-438, 1985
- ⁷² Nakano K, Suga S, Takeo T, Ogawa Y, Suda T, Kanno T and Waki M. Intracellular Ca²⁺ modulation of sensitive K⁺ channel activity in acetylcholine-induced activation of rat pancreatic β -cells. *Endocrinology* 143(2): 569-576

-
- ⁷³ Cattan P, Berney T, Schena S, Molano D, Pileggi A, Vizzardelli C, Ricordi C and Inverardi L. Early assessment of apoptosis in isolated islet of Langerhans. *Transplantation* 71, 857–862
- ⁷⁴ Coimbra C.N., Lamounier R.N., Sokolnik L.O., Leite A.R., Giannella M.L.C.C., Método alternativo de isolamento de ilhotas pancreáticas muríneas por gradiente de Ficoll. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 19: S976, 2005
- ⁷⁵ Haan BJ, Faas M, Spijker H, Willigen J, Haan A, and Vos P. Factors Influencing Isolation of Functional Pancreatic Rat Islets, *Pancreas* 29:e15–e22, 2004.
- ⁷⁶ Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream *Experimental Hematology*, 30 (6) 503-512, 2002.
- ⁷⁷ Livak DJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ *Methods*..25:402-408, 2001.
- ⁷⁸ Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*., 29 (9): 2002-07, 2001.
- ⁷⁹ Piro S., Anello M., Pietro C.D., Lizzio M.N., Patane G., Rabuazzo A.M., Vigneri R., Purrello M. and Purrello F. Chronic Exposure to Free Fatty Acids or High

Glucose Induces Apoptosis in Rat Pancreatic Islets: Possible Role of Oxidative Stress. *Metabolism*. 51(10), 1340-1347, 2002.

⁸⁰ Morgan NG, Cable HC, Newcombe NR, Williams GT: Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis. *Biosci Rep* 14 243-250, 1994.

⁸¹ Jaescheke H., Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J. Immunol.* 160(7): 3480 – 3486, 1998

⁸² T Shimizu and Y Pommier. Camptothecin-induced apoptosis in p53-null human leukemia HL60 cells and their isolated nuclei: effects of the protease inhibitors Z-VAD-fmk and dichloroisocoumarin suggest an involvement of both caspases and serine proteases. *Leukemia* 11, 1238–1244, 1997

⁸³ Sakamoto j, Kimura H, Moriyama S, Odaka, H, Momose Y, Sugiyama Y and Sawada H. Activation of Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Subtypes by Pioglitazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278, 704–711 (2000)

⁸⁴ Davalli AM, Scaglia L, Zangen DH, et al. Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period: dynamic changes in structure and function. *Diabetes* 45: 1161 - 67, 1996.

⁸⁵ Hansen WA, Christie MR, Kahn R, Norgaard A, Abel I, Petersen AM, Jorgensen DW, Baekkeskov S, Nielsen JH, Lernmark A, Supravital dithizone staining in the isolation of human and rat pancreatic islets Diabetes Res. 1989 Feb;10(2):53-7.

⁸⁶ Bennet W, Orkland BJ, Sundberg B, Bradhorst D, Mathias D, Brendel, Richards A, White DJ, Nilsson BO, Groth CG2 and Korsgren O Expression of complement regulatory proteins on islet of langerhans : a comparison between human islet and isolated islet from normal and hDAF transgenic pigs. 72, 312–319, July 27(2), 2001

⁸⁷ Othani KI, Shimizu H, Sato N and Mori M. Troglitazone (CS-045) inhibits b-cell proliferation rate following stimulation of insulin secretion in HIT-T15 cells. Endocrinology 139: 172-8, 1998.

⁸⁸ Nakamichi Y, Kikuta T, Ito E, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Ishida H and Nagamatsu S. PPAR- γ overexpression suppresses glucose-induced proinsulin biosynthesis and insulin release synergistically with pioglitazone in MIN6 cells. Biochem Biophys Res Comm 2003;306:832–836.

⁸⁹ Bollheimer LC, Troll S, Landauer H, Wrede CE, Schölmerich J and Buettner R. Insulin-sparing effects of troglitazone in rat pancreatic islets. J Mol Endocrinol 2003;31:61–69.

⁹⁰ Shimazaki, K., Ishida, A. and Kawai, N. Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neurosci. Res.* 20, 95-99, 1994.

⁹¹ Lawrence, M. S., Ho, D. Y., Sun, G. H., Steinberg, G. K. and Sapolsky, R. M. Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS against neurological insults in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 16, 486-496, 1996.

⁹² Prigeon RL, Kahn SE, Porte D. Effect of troglitazone on B cell Function, Insulin Sensitivity, and Glycemic Control in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 819-23, 1988.

⁹³ Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka H, Spinas G, Kaiser N, Halban P and Marc Y. Donath Glucose-induced β -cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* 2002; 110 : 851–860.

⁹⁴ Lin C.Y., Gurlo T., Haataja L., Hsueh W.A and Butler P.C. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ by Rosiglitazone Protects Human Islet Cells against Human Islet Amyloid Polypeptide Toxicity by a Phosphatidylinositol 3_-Kinase-Dependent Pathway *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(12):6678–6686, 2005

⁹⁵Pickavance L.C., Widdowson P.S., *John R. Foste J.R., Williams G and John P. H. Wilding J.P.H. Chronic treatment with the thiazolidinedione, MCC-555, is associated with reductions in nitric oxide synthase activity and β -cell apoptosis in the pancreas of the Zucker Diabetic Fatty rat International journal of experimental pathology vol. 84, (2), 83-89 2003

⁹⁶ Pozzilli P, Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of adults): definition, characterization and potential prevention. Diabetes Care 24:1460–1467.2001

⁹⁷ Beales PE, Pozzilli P. Thiazolidinediones for the prevention of diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse: implications for human type 1 diabetes. Diab Metab Res Rev 18:114–117. 2002

⁹⁸ Zhou Z, Li X, Huang G et al. Rosiglitazone combined with insulin preserves islet beta cell function in adult-onset latent autoimmune diabetes (LADA).Diabetes Metab Res Rev 21:203–208. 2005