Flavia Soares Louro Costal

Benfotiamina e Mito Q protegem ilhotas pancreáticas de rato em cultura dos efeitos pró-apoptóticos dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)

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

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Costal, Flavia Soares Louro
Benfotiamina e Mito Q protegem ilhotas pancreáticas de rato em cultura dos efeitos pró-apoptóticos dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) / Flavia Soares Louro Costal. -- São Paulo, 2011.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella.

Descritores: 1.Ilhotas pancreáticas 2.Produtos finais de glicação avançada 3.Apoptose 4.Estresse oxidativo 5.Tiamina/análogos & derivados 6.Ubiquinona/análogos & derivados 7.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-355/11

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

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

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

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

“Teus braços sempre se abrem quando preciso de abraço.

Teu coração sabe compreender quando preciso de um amigo.

Teus olhos sensíveis se endurecem quando preciso de uma lição.

Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas que precisava para voar.”

(Autor desconhecido)

Aos meus pais, Darci e Maurício; minhas irmãs, Bruna e Rosângela; e meu companheiro Gustavo esta conquista é nossa, pois vocês são a razão da minha vida....
Amo vocês!

Agradecimentos

A DEUS em primeiro lugar. Criador de todo o universo, autor da minha vida, que me deu a oportunidade de iniciar esta tese e forças para concluí - lo.

À Professora Maria Lúcia, que me acompanha desde 2006, quando permitiu meus primeiros passos no caminho da ciência e a quem devo muito pela minha formação como cientista e como pessoa.

À Érika Rodrigues que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Ao Alexandre Amaral pela ajuda.

Aos amigos do LIM 25 que trouxeram grandes contribuições a minha vida.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Resumo

Summary

1. Introdução 1

1.1 Diabetes 1

1.2 Produtos finais da glicação avançada (AGEs) 2

1.3 Ilhotas pancreáticas e estresse oxidativo 5

1.4 Sistema NADPH Oxidase 7

1.5 Apoptose das ilhotas pancreáticas 10

1.6. Benfotiamina 13

1.7 Mito Q 17

2. Objetivos 20

3. Material e Métodos 21

3.1 Isolamento de ilhotas de Langerhans de ratos 21

3.1.1 Canulação e digestão do pâncreas 22

3.1.2 Interrupção da digestão e purificação das ilhotas 22

3.2 Preparo da albumina glicada (AGEs) 23

3.3 Avaliação da expressão dos genes Ager, Scarb1 e CD36 por reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa (RT-PCR) 23

3.4 Padronização dos genes da β-actina, Ager, Bax, Bcl2 e Nfkb1 pela técnica de reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR). 26

3.5 Quantificação do conteúdo do mRNA dos genes Actb, Ager, Bax, 30

Bcl2 e Nfkb1

3.6 Padronização da técnica para detecção da apoptose celular pela análise da permeabilidade da membrana mitocondrial 32

3.7 Padronização da técnica para detecção de apoptose celular pela análise da permeabilidade da membrana mitocondrial utilizando microscopia confocal 35

3.8 Padronização da técnica para detecção de apoptose celular pela medida da atividade de caspase 3 36

3.9 Avaliação do índice de apoptose pela quantificação da fragmentação do DNA 39

3.10 Padronização da técnica para detecção de espécies reativas de oxigênio 40

3.11 Detecção de espécies reativas de oxigênio utilizando microscopia confocal 41

3.12 Medida da atividade da NADPH oxidase 42

3.13 Padronização da concentração de benfotiamina 43

3.14 Avaliação do índice de apoptose de ilhotas expostas a 5mg/mL de cada uma das três preparações de AGEs por 48, 72 e 96 horas 44

3.15 Avaliação do índice de apoptose de ilhotas expostas a 2 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL de AGEs por 24, 48, 72, 96 e 120 horas 45

3.16 Quantificação do conteúdo de mRNA dos genes Actb, Ager, Bax, Bcl2 e Nfkb1, em ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD 45

3.17 Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio por ilhotas expostas a AlbGAD por 24 e 48 horas 46

3.18 Atividade da NADPH oxidase em ilhotas expostas a AlbGAD por 24, 48 e 72 horas 46

3.19 Avaliação do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD e tratadas com benfotiamina ou com 1 µM de Mito Q por 72 horas 46

3.20 Quantificação do conteúdo de mRNA dos genes Actb, Ager, Bax, Bcl2 e Nfkb1, em ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD tratadas com benfotiamina ou comMito Q por 72 horas 47

3.21 Avaliação da geração de ROS por ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD tratadas com benfotiamina ou com Mito Q por 72 horas 47

3.22 Atividade da NADPH oxidase em ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD tratadas com benfotiamina ou com Mito Q por 72 horas 48

3.23 Análise estatística 48

4. Resultados 49

4.1. Avaliação por RT-PCR da expressão dos genes Ager, Scarb1 e CD36 49

4.2 Avaliação do índice de apoptose pela quantificação da fragmentação do DNA de ilhotas expostas a 5mg/mL de cada uma das três preparações de AGEs por 48, 72 e 96 horas 49

4.3 Avaliação do índice de apoptose celular de ilhotas expostas a 2 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL de AlbGAD ou albumina controle por 24, 48, 72 e 96 horas 52

4.3.1 Tempo de exposição de 24 horas 52

4.3.2 Tempo de exposição de 48 horas 54

4.3.3 Tempo de exposição de 72 horas 56

4.3.4 Tempo de exposição de 96 horas 58

4.3.5 Tempo de exposição de 120 horas 60

4.4 Avaliação da geração de ROS por ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD por 24 e 48 horas 62

4.4.1 Tempo de exposição de 24 horas 62

4.4.2 Tempo de exposição de 48 horas 62

4.5 Atividade da NADPH oxidase em ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD 63

4.5.1 Tempo de exposição de 24 horas 64

4.5.2 Tempo de exposição de 48 horas 64

4.5.3 Tempo de exposição de 72 horas 65

4.6 Avaliação da expressão dos genes Bax, Bcl2, Ager e Nfkb. 66

4.7 Ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD tratadas com 350 µM de benfotiamina por 72horas 69

4.7.1 Avaliação do índice de apoptose 69

4.7.2 Avaliação da geração de ROS 71

4.7.3 Avaliação da atividade da NADPH oxidase 73

4.7.4 Avaliação da expressão dos genes Bax, Bcl2, Ager e Nfkb1 73

4.8 Ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD tratadas com 1 µM de Mito Q por 72horas 76

4.8.1 Avaliação do índice de apoptose 77

4.8.2 Avaliação da geração de ROS 78

4.8.3 Avaliação da atividade da NADPH oxidase 80

4.8.4 Avaliação da expressão dos genes Bax, Bcl2, Ager e Nfkb1 80

5. Discussão 83

6. Conclusão 91

7. Referências bibliográficas 92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1 µM	Ilhotas tratadas com Mito Q
350 µM	Ilhotas tratadas com Benfotiamina
β	Beta
γ	Gama
µ	Micro
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A_{260}	Absorbância de 260 nm
A_{280}	Absorbância de 280 nm
Ac-DEVD-pNA	Acetil- Asp-Glut-Val-Asp-p- nitroanilida
Actb	Gene - β-actina
AIF	Fator indutor de apoptose
AlbCTR	Ilhotas não tratadas com albumina incubada com PBS
AlbGAD	Ilhotas tratadas com albumina glicada com glicolaldeído (GAD)
AlbGO	Ilhotas tratadas com albumina glicada com glioxal (GO)
AlbMGO	Ilhotas tratadas com albumina glicada com metilglioxal (MGO)
AlbGAD+BENFO	Ilhotas tratadas com AlbGAD e 350 µM de benfotiamina
AlbGAD+MITOQ	Ilhotas tratadas com AlbGAD e 1 µM de Mito Q
AGE	Produto final da glicação avançada (A*dvanced glycation end-*

	products)
Ager	Gene - Receptor de produtos finais da glicação avançada (RAGE)
APAF	Fator ativador de proteases apoptóticas
Bax	Gene - célula B de linfoma 2 associado a proteína X
Bad	Gene da Família Bcl-2 promotor da apoptose
BAEC	Células endoteliais de aorta de bovinos
BAX	Proteína - célula B de linfoma 2 associado a proteína X
Bcl2	Gene – célula B de linfoma 2
BCL2	Proteína - célula B de linfoma 2
BSA	Soro albumina bovina
°C	Graus celsius
C57BL/KsJ db/dB	Camundongos diabéticos
Ca^{2+}	Cálcio
CAD	DNAse ativada por caspase 3
Caspase	Cisteíno protease aspartil específica
CCCP	carbonil cianeto 3-clorofenilidrazona
CD36	Receptor de trombospondina
CD36	Gene - Receptor de trombospondina
cDNA	Ácido desoxiribonuclêico complementar
CO_2	Dióxido de Carbono
Colagenase	Clortridiopeptidase
CPT	Campotecina
Ct	*Threshold cycl*e

DAP	Ácido diaminopimélico
DEPC	Dietilpirocarbonato de sódio
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Nucleotídeos trifosfatos
DPI	Diphenylleneiodonium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de crescimento endotelial
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
et al.	E outros
E cols.	E colaboradores
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
g	Rotação em unidade de gravidade
g	Grama
GA3P	Gliceraldeído-3-fosfato
GAD	Glicolaldeído
GCL	Glutationa ligase
GCDCA	*Glycochenodeoxycholic acid*

GDP	Guanosina difosfato
GO	Glioxal
GTP	Guanosina trifosfato
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HBA_{1c}	Hemoglobina glicada
HBSS	Solução balanceada de Hank´s (*Hank´s Balanced Salt Solution*)
HEPES	Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1
h	Horas
ICAD	Forma inativa da CAD
IF	Ilhota recém extraída
IL-1	Interleucina-1
IL-6	interleucina-6
JC-1	marcador catiônico fluorescente iodeto de 5,5’,6,6’-tetracloro-1,1’,3,3’-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
KCL	Cloreto de Potássio
Kg	Kilograma
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M	Molar
MIN6	Linhagem de célula β de insulinoma de camundongo
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
mg	Miligrama
min	Minutos

MGO	Metilglioxal
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-kB	Fator nuclear κβ
Nfkb1	Gene - Fator nuclear κβ
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOX2	Protótipo das NADPH oxidases
O_2	Oxigênio
O^{2-}	Radical superóxido
OH	Radical hidroxil
OST-48	Receptor oligossacaril transferase - 48
p	Significância estatística
PARP	Proteínas de reparo de DNA
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDX-1	*Pancreatic duodenal homeobox-1*
pH	Potencial de hidrogeniônico
PKC	Proteína cinase C

PLC	Fosfolipase C
PMSF	Flúor fenilmetilsulfonil
pNA	Cromógeno p-nitroanilida
PVPI	Polivinilpirrolidona Iodo
RAGE	Receptor de produtos finais da glicação avançada
RLU	Unidades de luminescência relativa
RNA	Ácido ribonucleíco
ROS	Espécie reativa de oxigênio (*Reactive oxigen species)*
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Meio de cultura
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase pós transcrição reversa
RTq-PCR	Reação em cadeia da polimerase pós transcrição reversa quantitativa
s	Segundos
Scarb1	Gene - *Scavenger receptor class B, member 1*
SFB	Soro fetal bovino
sRAGE	Bloqueadores solúveis de RAGE
STZ	Estreptozotocina
TA	Temperatura ambiente
Taq	DNA polimerase
TBHP	Agente indutor de ROS terc-butil hidroperóxido
TNF	Fator de necrose tumoral
U	Unidade
UA	Unidade arbitrária

UAA	Unidade arbitrárias de Absorbância
V	Volts

RESUMO

Costal, FSL. Benfotiamina e Mito Q protegem ilhotas pancreáticas de rato em cultura dos efeitos pró-apoptóticos dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

A perda da função das células beta acelera a deterioração do controle metabólico em pessoas com diabetes tipo 2. Além da lipo- e da glicotoxicidade, os AGEs parecem contribuir para esse processo, promovendo a apoptose das ilhotas pancreáticas. Em outros tecidos, os AGEs interagem com seu receptor específico (RAGE), produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativando o NF-kB. Para investigar o efeito temporal dos AGEs sobre a apoptose de ilhotas, bem como o potencial de compostos antioxidantes para diminuir danos causados pelos AGEs, ilhotas pancreáticas de ratos foram tratadas durante 24, 48, 72, 96 e 120 h com AGEs gerados a partir de co-incubação de albumina de soro bovino (BSA) com D-gliceraldeído (GAD, 5 mg/mL) ou tampão fostato (controle). A apoptose foi avaliada pela quantificação do DNA fragmentado (ELISA), atividade de caspase 3 e detecção da permeabilidade da membrana mitocondrial (MitoProbe JC-1). O estresse oxidativo foi avaliado pela detecção de espécies de oxigênio (Image-iT LIVE Green) e a atividade da NADPH oxidase foi mensurada pelo método de quimioluminescência da lucigenina. A expressão dos genes *Bax*, *Bcl2* e *Nfkb1* foi avaliada por reação em cadeia da polimerase quantitativa após transcrição reversa (RT-qPCR). Em um dos tempos em que foi detectado o aumento da apoptose, o efeito de dois compostos antioxidantes foi avaliado: benfotiamina (350 µM), uma

vitamina B1 lipossolúvel, e Mito Q (1 µM), um derivado da ubiquinona com alvo seletivo para a mitocôndria. Em 24 e 48 h, os AGES promoveram um aumento do índice de apoptose em relação ao controle, concomitantemente com o aumento na expresssão do gene *Bcl2* (gene anti-apoptótico) e uma redução na expressão do gene *Nfkb1*. Em contraste, após 72, 96 h e 120 h, os AGEs promoveram um aumento do índice de apoptose em comparação com a condição de controle, concomitantemente com uma diminuição na expressão do gene *Bcl2* e um aumento na expressão do gene *Nfkb1*. Em 24 h, os AGEs promoveram uma diminuição do conteúdo de ROS nas ilhotas, enquanto que nos tempos de 48 e 72 h, os AGEs promoveram um efeito oposto. A benfotiamina e o Mito Q foram capazes de diminuir o índice de apoptose e o estresse oxidativo de ilhotas expostas aos AGEs por 72 h. Em conclusão, os AGEs exerceram um duplo efeito em cultura de ilhotas pancreáticas, sendo de proteção contra a apoptose após exposição curta, mas pró-apoptótica após exposição prolongada. O Mito Q e e a benfotiamina merecem ser adicionalmente estudados como drogas com o potencial de oferecer proteção às ilhotas pancreáticas em condições de hiperglicemia crônica.

Descritores: Ilhotas Pancreáticas, Produtos finais de glicação avançada, Apoptose, Estresse Oxidativo, Tiamina/análogos & derivados, Ubiquinona/análogos & derivados e Ratos Wistar.

SUMMARY

Costal, FSL. Benfotiamine and Mito Q protect rat pancreatic islets in culture from pro-apoptotic effects of advanced glycation end products (AGEs)[thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011.

Loss of beta cell function hastens the deterioration of metabolic control in people with type 2 diabetes. Besides lipo- and glucotoxicity, AGEs seem to contribute to this process by promoting islet apoptosis. In other tissues, AGEs interact with their specific receptors (RAGE) and elicit reactive oxygen species (ROS) generation and NF-kB activation. In order to investigate the temporal effect of AGEs on islet apoptosis as well as the potential of antioxidant compounds to decrease islet damage caused by AGEs, rat pancreatic islets were treated for 24, 48, 72, 96 and 120 h with either AGEs generated from co-incubation of bovine serum albumin (BSA) with D-glyceraldehyde (GAD, 5 mg/mL) or phosphate-buffered saline (PBS, control). Apoptosis was evaluated by quantification of DNA fragmentation (ELISA), caspase-3 enzyme activity and detection of mitochondrial permeability transition (MitoProbe JC-1). Oxidative stress was evaluated by oxygen species detection (Image-iT LIVE Green) and the activity of NADPH oxidase was measured by the lucigenin-enhanced chemiluminescence method. The expression of the genes *Bax*, *Bcl2* and *Nfkb1* was evaluated by reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). In one of the time points at which increased apoptosis was detected, the effect of two antioxidant compounds was evaluated: benfotiamine (350 µM), a liposoluble vitamin B1, and Mito Q (1 µM), a derivative of ubiquinone targeted to

mitochondria. In 24 and 48 h, AGEs elicited a significant decrease in the apoptosis rate in comparison to the control condition concomitantly with a significant increase in the RNA expression of the antiapoptotic gene *Bcl2* and a significant decrease in the *Nfkb1* RNA expression. In contrast, after 72 and 96 h, AGEs promoted a significant increase in the apoptosis rate in comparison to the control condition concomitantly with a significant decrease in *Bcl2* RNA expression and a significant increase in *Nfkb1* RNA expression. In 24 h, AGEs elicited a significant decrease in the islet content of ROS while after 48 and 72 h, AGEs promoted an opposite effect. Benfotiamine and Mito Q were able to decrease the apoptosis rate and the ROS content in islets exposed to AGEs for 72 h. In conclusion, AGEs exerted a dual effect in cultured pancreatic islets, being protective against apoptosis after short exposition but proapoptotic after prolonged exposition. Mito Q and benfotiamine deserve further evaluation as drugs that could offer islet protection in conditions of chronic hyperglycemia.

Descriptors: Islets of Langerhans; Glycosylation en products, advanced; Apoptosis; Oxidative Stress; Thiamine/analogs & derivatives; Ubiquinone/analogs & derivatives and Rats, Wistar.

1. Introdução

1.1 Diabetes

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

Diversas vias relacionadas com a hiperglicemia característica da doença podem contribuir para as complicações micro e macrovasculares, conferindo um importante papel à hiperglicemia na patogênese das complicações crônicas do DM. Os possíveis mecanismos implicados são: (1) aumento da ativação da via dos polióis, na qual a enzima aldose redutase reduz aldeídos gerados por espécies reativas de oxigênio em álcoois inativos e glicose em sorbitol, usando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) na sua forma reduzida como um cofator, (2) aumento da ativação da via das hexosaminas, que promove aumento na expressão de genes relacionados à fibrose endotelial, podendo levar a oclusão vascular, (3) ativação de proteína cinase C (PKC) que afeta a expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), do fator de crescimento endotelial (EGF) e do fator nuclear κβ(NF-kB) e (4) acúmulo de produtos finais da glicação avançada (AGEs), que serão explicados mais detalhadamente abaixo.[1-4]

Existe uma hipótese unificadora que considera o estresse oxidativo intracelular a via final comum pela qual as vias acima descritas acabam por desencadear as complicações crônicas no diabetes.[2]

1.2 Produtos finais da glicação avançada (AGEs)

Os AGEs derivam de uma ligação não enzimática entre um grupamento aldeído reativo na glicose com o grupo amino das proteínas, levando à formação dos produtos de Amadori, dos quais o mais conhecido é a hemoglobina glicada (HBA_{1c}). Outras reações ocorrem a partir deste ponto para produzir um grupo de compostos denominados AGEs (*advanced glycation end-products*), que se ligam irreversivelmente às proteínas. Essas modificações químicas das proteínas teciduais afetam a estrutura, função e *turnover* dessas proteínas, contribuindo para a patogênese das complicações macro e microvasculares.[5-7]A reação que resulta na formação dos AGEs acontece de forma espontânea e depende do grau e da duração da hiperglicemia.[5] Os AGEs se acumulam, por exemplo, em proteínas da matriz extracelular e contribuem para o processo natural do envelhecimento, entretanto, em indivíduos diabéticos, este acúmulo acontece de maneira precoce e mais rápida.[7]

Sabe-se que a taxa de formação de AGEs a partir de precursores dicarbonil derivados de glicose gerados no meio intracelular em condições de hiperglicemia é muito maior e mais rápida que a glicação resultante dos efeitos da glicose sobre as proteínas extracelulares. Os AGEs podem ser gerados, por exemplo, a partir da auto-oxidação intracelular da glicose a glioxal e da fragmentação do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em metilglioxal. Esses dicarbonils reativos intracelulares reagem com o grupamento amino de proteínas intra e extracelulares para formar os AGEs.[8]

A produção intracelular de precursores de AGEs lesa as células por três diferentes mecanismos: (1) modificação de proteínas intracelulares; (2) difusão para fora das células e modificação de proteínas de matriz extracelular, tais como o colágeno e a laminina e (3) difusão para fora das células e modificação de proteínas circulantes, como a albumina. Essas proteínas circulantes modificadas podem se ligar a receptores de membrana e ativar a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento que vão causar a angiopatia diabética.[4]

Os AGEs interagem com o receptores lactoferrina, *scavenger* tipo I e II, oligossacaril transferase - 48 (OST-48), 80K-H fosfoproteina, Galectina-3, CD36,[9,10] e com seu receptor específico (receptor de produtos finais da glicação avançada – RAGE), que desencadeia uma sinalização intracelular que induz a ativação do estresse oxidativo, aumenta a liberação de citocinas inflamatórias e promove um aumento da transcrição do NF-kB, levando a um quadro de inflamação crônica e consequente aumento de danos celulares e teciduais (Figura 1). [5-7]

Os RAGEs fazem parte da família de receptores das imunoglobulinas e estes receptores já foram caracterizados em vários tipos celulares, tais como monócitos, macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, células musculares lisas, células mesangiais, células nervosas e em ilhotas pancreáticas. A estrutura molecular dos RAGEs é composta por uma região extracelular, um domínio V, dois domínios C e uma pequena cauda citoplasmática.[5,7] Além de interagir com seus ligantes específicos AGEs, esses receptores são capazes de interagir com diversos ligantes inespecíficos como a amfoterina, peptídios β-amilóide, polipeptídios S/100 calgranulim e Mac-1.[10,11]

Já se demonstrou i*n vitro* que o acúmulo de AGEs prejudica a função das células β pancreáticas resultando em defeitos na secreção de insulina e redução de sua biossíntese.[12] Alguns mecanismos já foram descritos para explicar os efeitos deletérios dos AGEs sobre as células β, tais como aumento da expressão da cicloxigenase 2, que está intimamente relacionada à morte celular e inibição da secreção de insulina;[13] e o estresse oxidativo, capaz de desencadear o processo de apoptose com redução do número de células β.[14]

O uso *in vivo* de bloqueadores solúveis de RAGE (sRAGE) em modelos murídeos promoveu uma diminuição da transcrição de NF-kB, redução da expressão de citocinas inflamatórias, redução de arteriosclerose e atenuação da inflamação vascular.[10] Estudos adicionais em roedores sugeriram que o bloqueio do RAGE poderia ser benéfico na diminuição das complicações microvasculares do DM e na diminuição do estresse oxidativo de ilhotas pancreáticas.[14]

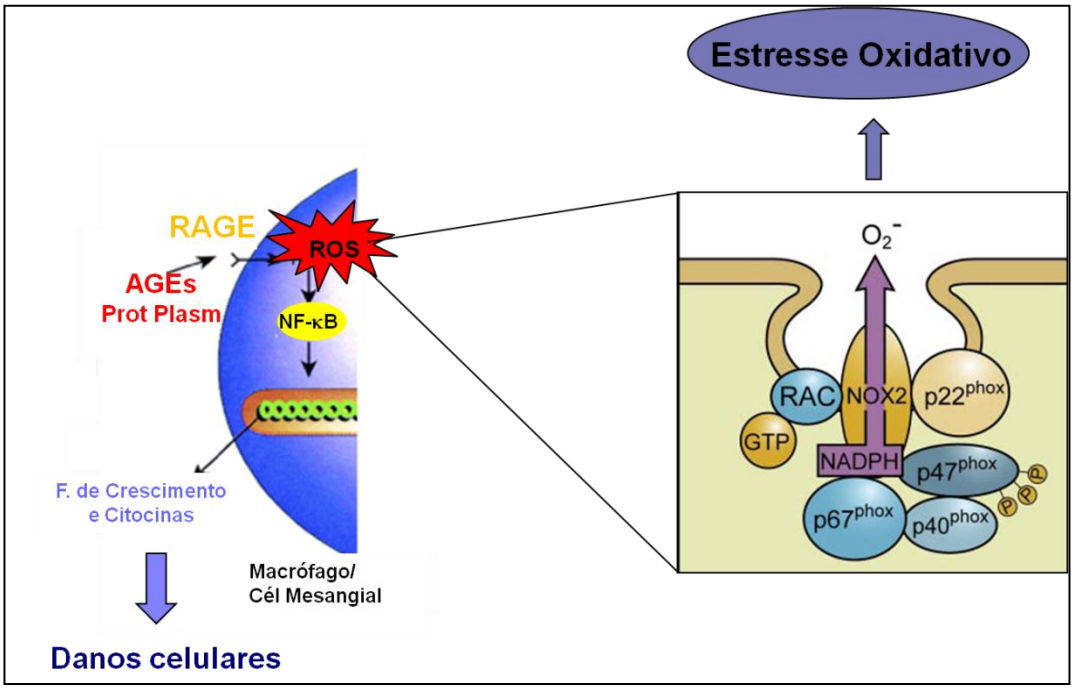


Figura 1: Ilustração de alguns mecanismos implicados nos efeitos deletérios dos produtos finais da glicação avançada (AGEs)após a ligação aos seus receptores específicos RAGEs.
AGE: Produto final da glicação avançada; RAGE: Receptor de produtos finais da glicação avançada; NF-kB: Fator nuclear κβ. Sistema NADPH oxidase 2: NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$: componentes citosólicos; $p22^{phox}$: subunidade regulatória; NOX2: subunidade catalítica; RAC: substrato doador de elétron NADPH; O^{2-}: Radical superóxido.

1.3 Ilhotas pancreáticas e estresse oxidativo

Durante o metabolismo, o oxigênio é reduzido à água e nesse processo, os produtos intermediários são o radical superóxido (O^{2-}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH), que conjuntamente são denominadas de espécies reativas de oxigênio (ROS: *reactive oxigen species*). Esses compostos têm meia vida ultracurta, pois a presença de um elétron não-pareado os faz reagir com moléculas de DNA, proteínas e lipídios. O estresse oxidativo se estabelece quando as defesas intracelulares anti-oxidantes são insuficientes para detoxificar os ROS ou, também, quando há produção excessiva de ROS.[15]

Acredita-se que nas ilhotas pancreáticas existam baixos índices de anti-oxidantes endógenos, como as enzimas superóxido dismutase, a catalase e glutationa peroxidase, motivo pelo qual os danos causados pelas ROS poderiam ser ainda maiores.[14,16,17] Em condições de hiperglicemia, existem seis vias principais que estão relacionadas com a formação de ROS: (1) auto-oxidação do gliceraldeído, (2) ativação da PKC, (3) formação dos AGEs, (4) metabolismo do sorbitol, (5) via da hexosamina e (6) fosforilação oxidativa.[16]

A combinação de concentrações suprafisiológicas de glicose e excesso de ROS em ilhotas pancreáticas leva a uma diminuição significativa na expressão do gene da insulina, por meio de uma redução nos fatores de transcrição PDX-1 e MafA; além disso, evidências apontam para um aumento na taxa de morte celular programada (apoptose)[18,19] pelas duas principais vias envolvidas neste processo, a"intrínseca", iniciada na membrana mitocondrial e que desencadeia o processo principalmente pela ativação do fator nuclear (NF-kB) e a via "extrínseca", sinalizada por citocinas inflamatórias e iniciada pela dimerização de receptores celulares que ativam um conjunto de cisteíno-proteases, aspartil específicas (caspases) iniciadoras e executoras do processo de apoptose.[20]

Tran e cols. demonstraram em ilhotas pancreáticas *in vitro* que o aumento da expressão da glutationa ligase (GCL), uma das enzimas responsáveis pela síntese da glutationa, preveniu a disfunção da célula β causada pelo estresse oxidativo induzido por interleucina-1β.[21] Animais transgênicos que superexpressam superóxido dismutase apresentam tolerância aumentada da célula β ao diabetes induzido por estresse oxidativo.[22] Esses e muitos outros trabalhos evidenciam a importância de

estratégias terapêuticas que reduzam o estresse oxidativo na proteção da célula β pancreática.[16]

1.4 Sistema NADPH Oxidase

Uma das vias relacionada com a formação de ROS é a Via da NADPH oxidase. As NADPH oxidases são proteínas que transferem elétrons através de membranas e catalisam a redução dependente de NADPH de O^2 a O^{2-}, gerando ROS. O protótipo das NADPH oxidases, a proteína NOX2, é responsável pelo *respiratory burst*, que é a produção aumentada de ROS pelos fagócitos após rápido consumo de oxigênio. Esses ROS participam diretamente da defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus, protozoários e fungos. Existem, no entanto, outras isoformas de NOX amplamente distribuídas nos tecidos que participam de vários processos fisiológicos e fisiopatológicos.[23]

A via da NADPH oxidase é um complexo enzimático. No caso da NOX2, é composto de um substrato GTPase relacionado a Ras (Rac2), de dois componentes de membrana, a subunidade catalítica NOX2 (ou $gp91^{phox}$) e a subunidade regulatória ($p22^{phox}$) que formam um heterodímero e se estabilizam mutuamente e também de três componentes citosólicos. Na ativação da NOX2 ocorrem a translocação dos fatores citosólicos $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$ para o complexo que está na membrana (Figura 2). Concomitantemente, Rac se dissocia de um inibidor e é ativado pela troca de GDP por GTP para que ocorra a ativação enzimática e produção de O^{2-} após a transferência de elétron do NADPH para a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e, a seguir para o oxigênio molecular. [24]

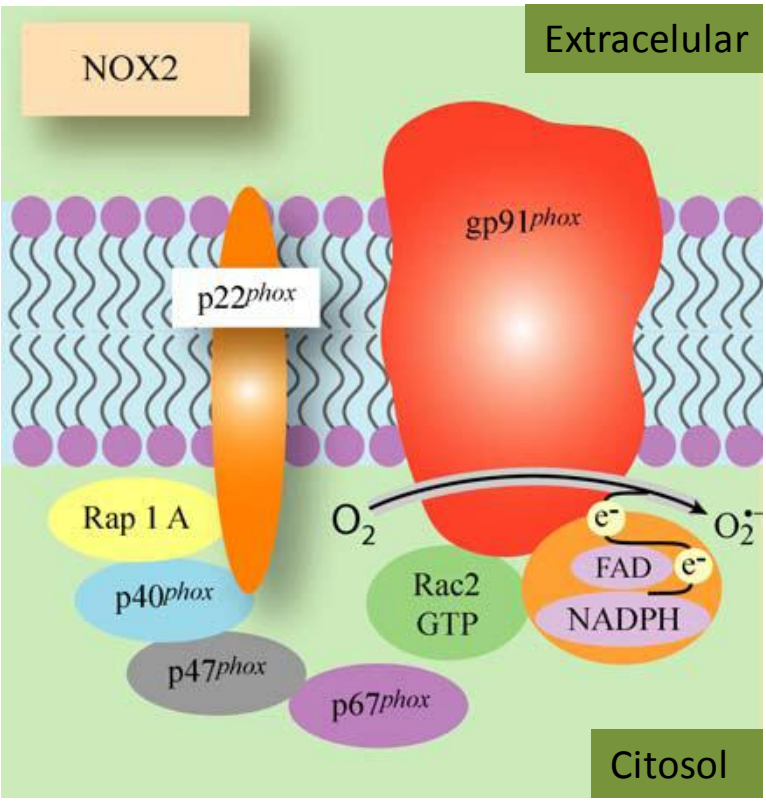


Figura 2: Sistema NADPH oxidase 2, com as subunidades catalíticas (NOX2 ou gp91^{phox}), a subunidade regulatória (p22^{phox}), os componentes citosólicos (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}), o substrato Rac2, o doador de elétron NADPH e o FAD, que participa da transferência de elétrons. Adaptado de Newsholme e cols.[24]

As proteínas homólogas da NOX2 fagocítica são conhecidas por família NOX, composta por sete membros: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2. De acordo com as características funcionais e estruturais, a família NOX é classificada em três grupos: (1) grupo NOX1 a NOX4, que interagem com a p22^{phox}; (2) grupo NOX5 e (3) grupo DUOX (DUOX1 e DUOX2).

Ilhotas pancreáticas de rato expressam o mRNA do *Nox1*, *Nox2* e *Nox4*. Embora a expressão do *Nox4* tenha sido reportada em ilhotas pancreáticas, sua função ainda não foi determinada.[24,25]

A presença da NOX2, o protótipo das NADPH oxidase, em ilhotas pancreáticas já foi caracterizada e em condições fisiológicas este sistema está implicado no

controle da secreção de insulina, possivelmente pela modulação do metabolismo de glicose e na homeostase do cálcio intracelular. [24-26]

O metabolismo de glicose ativa a fosfolipase C (PLC) que resulta na translocação da $p47^{phox}$ do citosol para a membrana. A rápida geração de O^{2-} e H_2O_2 medeia o aumento de Ca^{2+} intracelular, aumenta o metabolismo de glicose via ativação de enzimas específicas, resultando no aumento da secreção de insulina.[24]

Enquanto o ROS parece ser benéfico na regulação da secreção de insulina por meio do sistema NADPH oxidase, a produção crônica e a elevação do ROS a partir de um certo limiar parece desencadear o estresse oxidativo concomitantemente com a redução na secreção de insulina.[24]

A NOX das células β pode ser ativada pela glicose, ácidos graxos saturados, fatores endócrinos e algumas citocinas inflamatórias. Evidências sugerem que as citocinas envolvidas no DM estão diretamente relacionadas com a disfunção e destruição das células β e o aumento de geração de ROS pelo sistema NADPH oxidase está implicado na progressão das complicações microvasculares no DM.[24,27]

Um estudo demonstrou que camundongos diabéticos C57BL/KsJ-db/dB tiveram um aumento significante da massa de células β e um aumento do conteúdo de insulina após o tratamento com anti-oxidantes. Outro estudo em modelo animal para DM tipo 2 demonstrou um aumento na produção dos componentes do complexo NADPH oxidase, $gp91^{phox}$ $ep22^{phox}$ nas células β. Alguns estudos sugerem que o aumento crônico de glicose e palmitato *in vivo* ativam o sistema NADPH oxidase, aumentando o índice de apoptose das células β.[24,27,28]

A NOX2 é altamente expressa em células β em comparação a outros tipos celulares, assim a utilização de anti-oxidantes direcionados ao sistema NADPH

oxidase poderia ser benéfica na manutenção da função e da integridade das células β em situações de hiperglicemia, podendo ser utilizada no tratamento de pacientes com DM tipo 2.[24]

1.5 Apoptose das ilhotas pancreáticas

A apoptose, ou morte celular programada, é uma forma de morte celular que garante a eliminação de células indesejáveis do hospedeiro por meio da ativação de uma série coordenada de eventos executados por um conjunto exclusivo de proteínas.Um elemento chave no processo apoptótico é a ativação da família caspase, composta por pelo menos 14 membros de cisteína-proteases intracelulares aspartil-específicas.[29]

A célula saudável possui no citoplasma os zimógenos de caspase em sua forma inativa. Pertubaçoes extracelulares e intracelulares são capazes de ativar a apoptose, que é induzida por duas vias principais: a via extrínseca e a via intrínseca, 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 DNA e a externalização de um fosfolípide de membrana, que permite que as células mortas sejam reconhecidas precocemente pelos macrófagos adjacentes para serem fagocitadas sem extravasamento do conteúdo citoplasmático.[30]

Na via extrínseca ocorre a ativação dos receptores de morte celular, os quais são responsáveis pela ativação direta da caspase 8, que é uma caspase ativadora da apoptose; ela então ativa a caspase 3, que é uma caspase executora do processo de apoptose (Figura 3).[31]

A ativação da via intrínseca diminui a expressão do gene *Bcl2* (anti apoptótico) e aumenta a expressão do gene *Bax* (pró-apoptotico), com consequente permeabilização da membrana mitocondrial que resulta na saída do citocromo c e do fator indutor de apoptose (AIF) para o citoplasma. O AIF se desloca para o núcleo e o citocromo c juntamente com o fator indutor de proteases (APAF) ativam a caspase 9, que é uma caspase ativadora. Ocorre, então, a ativação da caspase 3 (executora) (Figura 3).[31]

A caspase 3 ativa a ICAD que é forma inativa da CAD, uma DNAse ativada por caspase 3, que então migra para o núcleo e juntamente com a AIF promove a fragmentação do DNA. Além disso, a caspase 3 juntamente com a caspase 7 inibem as proteínas de reparo de DNA (Poli ADP-ribose polimerase- PARP).[30,31]

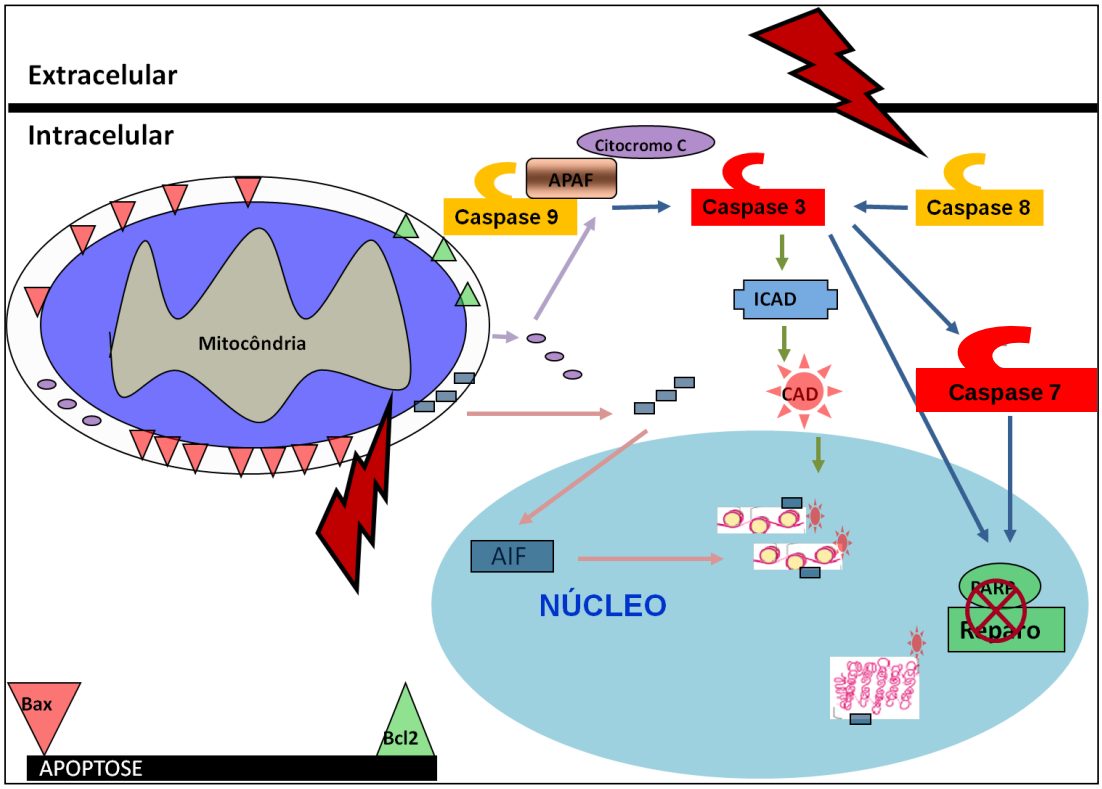


Figura 3: Ilustração representativa das principais proteínas envolvidas na apoptose ativada pela via intrínseca e extrínseca.
PARP: Poli ADP-ribose polimerase; CAD: Dnase ativada por caspase; ICAD: Dnase ativada por caspase inativada; Caspase: Cisteíno protease aspartil específica; Bcl2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*); Bax (BCL 2 associado a proteína X); APAF: Fator ativador de proteases apoptóticas; AIF: Fator indutor de apoptose de apoptose.

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 efetoras. No DM tipo 2, um desarranjo metabólico está associado a produção de mediadores inflamatórios em tecidos insulino-sensíveis com concentrações elevadas de mediadores como a

interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF) na circulação periférica. Também tem sido sugerido que a glicose induz a síntese de interleucina-1 (IL-1) pela própria célula β, a qual atuaria de maneira autócrina na indução de apoptose, em um mecanismo semelhante ao observado no DM tipo 1.[21]

Acredita-se que os mecanismos que poderiam explicar a redução da capacidade de secreção de insulina e da massa de células β por apoptose observadas no DM tipo 2 são (1) o depósito de amilóide nas ilhotas; (2) a glicotoxicidade, que promove um aumento local de interleucina 1β, a ativação do NF-kB e a baixa expressão do gene anti-apoptótico *Bcl2* e (3) a lipotoxicidade, que também causa redução da expressão do gene *Bcl2* e consequente ativação de caspases executoras do processo de apoptose.[22,32,33]

1.6. Benfotiamina

A tiamina, também conhecida como vitamina B1, desempenha um importante papel no metabolismo como coenzima de cerca de 24 enzimas, entre elas podemos destacar a piruvato desidrogenase envolvida na produção de energia do ciclo de Krebs e a transcetolase, importante para o metabolismo de lipídeos, glicose e aminoácidos.[34]

A tiamina já foi muito utilizada no tratamento da neuropatia diabética, sem, no entanto, trazer melhora expressiva dos sintomas. Um derivado lipossolúvel da tiamina, a benfotiamina, pertence à família das alitiaminas[35]e difere das moléculas hidrofílicas pela presença de um anel tiazólico aberto que, quando o composto se torna biologicamente ativo, é fechado por uma reação redutora intracelular.[36] A benfotiamina foi desenvolvida no Japão na década de 50 como uma alternativa à

tiamina para o tratamento da deficiência de vitamina B1, devido a sua maior biodisponibilidade.[37] Administrada por via oral, a benfotiamina tem sido utilizada no tratamento da neuropatia diabética com resultados muito mais interessantes não apenas na sintomatologia, como também na melhora da função neuronal avaliada por medidas objetivas.[38-41] Recentemente, este composto passou a ser estudado não apenas na neuropatia diabética, mas também no contexto das outras complicações microvasculares, explorando seu potencial na prevenção destas complicações.

Concentrações aumentadas dos intermediários triosefosfato da via glicolítica, tais como o gliceraldeído-3-fosfato (GA3P), estão envolvidas na ativação das vias relacionadas às complicações. Uma estratégia farmacológica que evitasse o acúmulo de triosefosfatos em vigência da hiperglicemia poderia suprimir as vias relacionadas às complicações crônicas do DM. Uma forma de se fazer isso poderia ser a ativação da via pentose-fosfato pelo aumento da atividade da transcetolase e estímulo para a conversão de GA3P e frutose-6-fosfato para ribose-5-fosfato, um composto menos tóxico para as células (Figura 4).[42]A tiamina é o cofator da transcetolase.

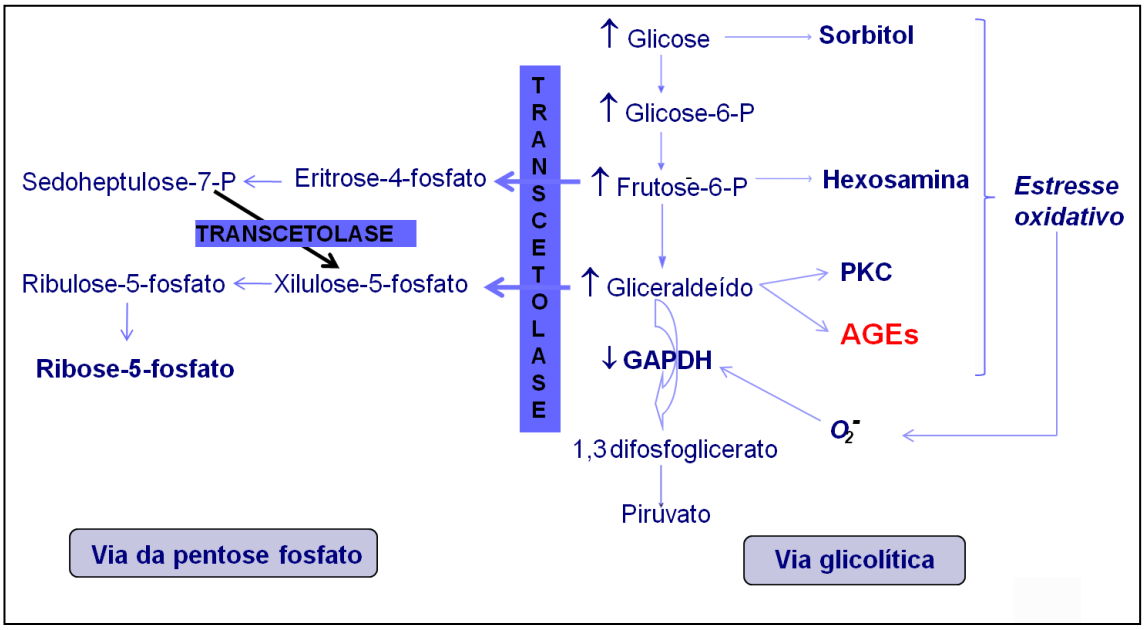


Figura 4: Desvio metabólico de trioses fosfato da via glicolítica (gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato) para a via da pentose fosfato pela ativação da enzima transcetolase.

Uma deficiência de tiamina é encontrada no DM tipo 1, 2[3,43] e no DM induzido por estreptozotocina em ratos.[42] Assim, a deficiência de tiamina pode resultar na redução da atividade da transcetolase, o que seria mais um fator de risco para o desenvolvimento das complicações, juntamente com a hiperglicemia crônica. Estudos demonstraram que a atividade da transcetolase é reduzida em músculo esquelético de ratos diabéticos e que este déficit é revertido com a suplementação oral de benfotiamina. Similarmente, a benfotiamina melhora a atividade da transcetolase em células endoteliais de bovinos e normaliza a atividade desta enzima em retina de ratos diabéticos.[2] Além disso, altas doses de tiamina e benfotiamina aumentaram a expressão da transcetolase no glomérulo renal e previniram o desenvolvimento da nefropatia diabética incipiente em ratos diabéticos.[44]

Hammes e cols. demonstraram que a benfotiamina possui propriedades anti-oxidantes, e é capaz de bloquear três das quatro vias implicadas nas complicações

crônicas: a vias das hexosaminas, dos AGEs e da PCK.[2] Um estudo de Berrone e cols. reportou o efeito da tiamina e da benfotiamina sobre a quarta via, a via dos polióis, demonstrando a correção da ativação desta via em células endoteliais expostas à altas concentrações de glicose.[45] Coletivamente, esses resultados indicam que a suplementação com benfotiamina pode restaurar a função fisiológica da transcetolase em diferentes tecidos de animais diabéticos tipo 1.[42,46] A benfotiamina também previne a expressão do NF-kB induzida pela hiperglicemia na retina de ratos diabéticos.[2,4,35]

A benfotiamina, muito provavelmente por mecanismos que envolvem a ativação da proteína cinase PKB/Akt, o estímulo da síntese de óxido nítrico (NO) e a ativação de diferentes fatores de crescimento, melhora a cicatrização em ratos diabéticos, estimula a angiogênese e inibe a apoptose pela diminuição de proteínas pró-apoptóticas (Bad, caspase 3) e aumento de proteínas anti-apoptóticas (BCL-2), melhorando a sobrevivência de células endoteliais.[4,47-50]

Schmid e cols. demonstraram que a benfotiamina diminui danos oxidativos ao DNA induzido por agente mutagênico (4-nitroquinoline-1-oxide NQO), o que sugere uma ação anti-oxidante da benfotiamina.[51]

Estudos também demonstraram que a benfotiamina diminui a apoptose de células de retina bovina e humana expostas a altas concentrações de glicose,[52,53] e protege contra a disfunção contrátil de células cardíacas de ratos diabéticos, diminuindo o conteúdo de AGEs, a expressão de RAGE e a quebra de colágeno.[54]

Esses resultados indicam que o tratamento de pacientes diabéticos com benfotiamina ou derivados da vitamina B1 pode prevenir ou adiar o desenvolvimento

de complicações causadas pelo DM, além de agir na promoção da angiogênese e como possível agente anti-apoptótico.[53,55]

1.7 Mito Q

Conforme previamente comentado, o desenvolvimento das complicações vasculares e neurológicas no DM está intimamente ligado ao estresse oxidativo. Nesta situação, aprodução aumentada de elétrons na cadeia respiratória e a formação de ROS promovem um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial com liberação de citocromo c e do APAF-1 da mitocôndria para o citoplasma. A combinação dessas proteínas resulta na ativação de caspase 9, uma protease ativadora do processo apoptótico e compreende o ponto de não retorno do desfecho de morte celular.[56,57] A utilização de um agente que reduza os danos oxidativos na mitocôndria é uma boa estratégia terapêutica na prevenção da morte celular, entretanto, a maior limitação consiste na inabilidade de se aumentar as concentrações de anti-oxidantes na mitocôndria.[57]

A cadeia respiratória apresenta um componente anti-oxidante que se localiza dentro do núcleo lipídico da membrana mitocondrial conhecido como co-enzima Q ou ubiquinona. Após recebimento de dois elétrons dos complexos I ou II da cadeia respiratória mitocondrial, forma-se um produto reduzido, o ubiquinol. O ubiquinol tem sido apresentado como um anti-oxidante que doa um átomo de hidrogênio do grupo hidroxila para um radical lipídico peroxidado e determina uma diminuição da peroxidação lipídica no interior da membrana mitocondrial.[57] A cadeia respiratória, subsequentemente, recicla ubiquinona para ubiquinol, restaurando sua função anti-oxidante.[58]

A baixa solubilidade do ubiquinona em água dificulta seu uso *in vitro*, e em animais, a dieta rica em ubiquinona tem que ser feita por várias semanas para aumentar a sua concentração nas mitocôndrias. Por essas razões, foi desenvolvido um análogo da ubiquinona com alvo seletivo para a mitocôndria conhecido como MitoQ. Esta molécula sofreu uma modificação estrutural, a adição de um cátion trifenilfosfônio lipídico, e essa transformação molecular lipofílica possibilitou o transporte da substância através da membrana mitocondrial e o acúmulo dentro desta organela.[57,59]

O Mito Q parece possuir efeito protetor em alguns tipos celulares e a sua ação principal pode estar relacionada com a diminuição da peroxidação lipídica.[56] Em 2004, Anuradha e cols. evidenciaram que o Mito Q em baixas concentrações (1µM) protege células endoteliais de aorta de bovinos tratadas com 25mM de glicose de danos oxidativos e da apoptose, muito provavelmente pela inibição do estresse oxidativo, restauração da função proteossomal e preservação da permeabilidade da membrana mitocondrial, o que impede a liberação de citocromo c e a ativação da caspase 9 iniciadora do processo de apoptose e da caspase 3 executora do processo. Já se demonstrou um papel protetor do Mito Q sobre células endoteliais, células nervosas e fibroblastos na Ataxia de Friedrerih.[56,57]

A adição de Mito Q em cultura de hepatócitos de rato impediu (1) a redução da concentração intracelular de Ca^{2+}; (2) a expressão da óxido nítrico sintase 3 (NOS-3); (3) a produção de NO e (4) a ativação da caspase 3 com consequente redução da apoptose induzida por ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA).[60]

Apesar da existência de alguns poucos estudos que indicam que os AGEs promovam estresse oxidativo e apoptose de células β pancreáticas, a agressão das

ilhotas pancreáticas por proteínas modificadas por glicação não é tradicionalmente considerada um fator causal da perda de massa de células β nos portadores de DM 2, como a glicotoxicidade, a lipotoxicidade e o depósito amilóide.

Dados adicionais explorando os efeitos dos AGEs sobre as ilhotas pancreáticas e potenciais intervenções que possam modular esses efeitos podem aumentar a compreensão sobre a natureza progressiva do DM 2 e sugerir novas abordagens para preservação da massa de células β.

2. Objetivos

Considerando-se as evidências a partir de alguns poucos estudos de que os AGEs, o objetivo deste projeto foi investigar os efeitos da albumina glicada sobre as ilhotas pancreáticas e avaliar o efeito de dois compostos que apresentam ação anti-oxidante, a benfotiamina e o Mito Q.

Para tanto, ilhotas pancreáticas de rato mantidas em cultura expostas aos AGEs foram tratadas ou não com benfotiamina e com Mito Q para a avaliação:

- do índice de apoptose;
- da produção de espécies reativas de oxigênio;
- da atividade do sistema NADPH oxidase;
- da expressão de genes relacionados à apoptose.

3. Material e Métodos

3.1 Isolamento de ilhotas de Langerhans de ratos

Os ratos Wistar adultos utilizados neste trabalho são provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina da USP. O manuseio dos animais assim como seu cuidado foi aprovado sob o Protocolo de Pesquisa n° 1189/07, pela Comissão de Ética para Análise de projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

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

3.1.1 Canulação e digestão do pâncreas

A solução de Colagenase tipo V (Sigma) foi preparada com diluição em solução de HBSS para uma concentração de 0,7mg/mL. Após a injeção intraductal de 10 mL, o pâncreas foi separado do intestino com auxílio de uma tesoura e transferido para uma placa de Petri, sendo lavado em Solução Salina Balanceada Hanks (HBSS) suplementada com antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina). O baço foi retirado juntamente com o excesso de tecido gorduroso e o pâncreas foi cortado em pedaços grandes e colocado em um tubo de 50 mL contendo 5 mL de HBSS, que foi levado ao banho-maria a 37 °C para a digestão com a colagenase.

3.1.2 Interrupção da digestão e purificação das ilhotas

Após o final da etapa de digestão, a solução com as ilhotas foi transferida para um tubo de 50 mL contendo 30 mL de meio de cultura RPMI 1640 com 10% soro fetal bovino (SFB) a 4º C, com o objetivo de interromper a ação da enzima e finalizar a digestão. Após lavagens e centrifugações, o material foi filtrado em malha de aço inoxidável de 600 μm e procedeu-se à purificação por gradiente utilizando-se o Histopaque 1077 (Sigma). Após centrifugação e lavagens, as ilhotas foram contadas e analisadas quanto a sua pureza. As ilhotas foram distribuídas em frascos de cultura de maneira que não ultrapasse a densidade de 4 ilhotas/cm^2, que é descrita como mais adequada, e levadas à estufa a 37ºC, 95% de O_2 e 5% de CO_2.

3.2 Preparo da albumina glicada (AGEs)

Albumina bovina (BSA) isenta de ácidos graxos (40 mg) foi incubada na presença de 10 mM de glicolaldeído (AlbGAD),10 mM de glioxal (AlbGO) ou 50 mM de metilglioxal (AlbMGO), dissolvido em tampão fosfato NaCl 137 mmol/L; Na_2HPO_4 4 mmol/L; KCl 2 mmol/L; K_2PO_4 1 mmol/L (PBS) com EDTA pH=7,4. Albumina controle (AlbCTR) foi preparada em solução salina tamponada com fosfato (PBS).

As incubações foram realizadas sob condições estéreis, banho de água a 37°C, com agitação por quatro dias. A seguir, as amostras foram dialisadas contra PBS e esterilizadas em filtro de 0,22 μm. Após o preparo, as amostras foram acondicionadas a menos 70°C até o seu uso.[61]

3.3 Avaliação da expressão dos genes *Ager*, *Scarb1* e *CD36* por reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa (RT-PCR)

Para confirmar que as ilhotas pancreáticas possuem receptores capazes de se ligar aos AGES, utilizamos a técnica de RT-PCR para caracterizar a presença de RNA mensageiro (mRNA) dos seguintes genes:

- *Ager*, que codifica o RAGE, receptor específico de AGEs;
- *Scarb1*, que codifica o *scavenger receptor class B, member 1*, um receptor que reconhece HDL e medeia a captação seletiva de colesterol esterificado de HDL (mas não HDL-apolipoproteínas), mas que também é considerado um receptor de AGEs;
- *Cd36*, que codifica o receptor de trombospondina, capaz de se ligar a vários ligantes, tais como ácidos graxos, colágeno, trombospondina, LDL oxidada e AGEs.

O RNA total de ilhotas recém isoladas (ilhotas frescas, IF) foi extraído segundo protocolo do reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies). Um mL de Trizol foi adicionado a um *pellet* de 1.000 ilhotas e após vigorosa homogeneização, a amostra foi incubada por 10 min em temperatura ambiente (TA) e em seguida adicionados 266 μL de clorofórmio. Após nova homogeneização, a amostra foi incubada por 10 min em TA 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 TA. 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 *pellet*. Realizou-se, então, nova centrifugação por 5 min a 7.500 g em temperatura de 4° C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA assim obtido foi ressuspendido em 30 μL de água tratada com 0,1% dietilpirocarbonato (DEPC) e 0,1 mM de EDTA.

A análise da pureza do material foi feita por espectrofotometria, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, utilizando o equipamento NanoDrop ND-3300 (NanoDrop Techonologies). Somente foram utilizadas amostras que apresentavam uma relação ABS260/ABS280 ≥ 1,8.

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foram utilizados 5 μg do RNA total e 2,0 μL de hexâmero (na concentração de 1 μg/μL), que foram adicionados a um tubo tipo *eppendorf* que foi levado ao termociclador na temperatura de 70 °C por 10 min e a seguir, colocado no gelo por 47 s. Ao mesmo tubo, foram adicionados 4,0 μL de tampão (5x), 2,0 μL de DTTa 0,1 M e 1,0 μL de dNTP *mix* (10 mM de cada dNTP. 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 (Superscript TM II Reverse Transcriptase - Invitrogen) voltando-se mais uma vez ao termociclador por 50 min a 42 °C e 15 min a 70 °C para inativar a reação.

A PCR para os genes *Actb* (β-actina, controle interno), *Ager*, *Scarb1* e *Cd36* foi realizada em um volume final de 25 μL de reação, utilizando-se aproximadamente 2,0 μg de cDNA como *template*. As PCR continham: tampão (1x, GIBCO Life Technologies), 1,5 mM $MgCl_2$ (GIBCO), 0,2 μM dNTP Mix (GIBCO), 0,2 μM de uma solução de 10 μM de cada *primer*, localizados em éxons diferentes do gene, a fim de evitar a amplificação de DNA genômico (Tabela 1) e 1 U de Taq DNA polimerase (GIBCO).

As amostras foram incubadas durante 5 min a 94º C para a desnaturação das dupla-fitas de cDNA em termociclador (Mastercycler gradient - Eppendorf). A seguir, foram submetidas a 40 ciclos (30 s a 94º C, 30 s a 57 ºC, 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.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados na reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa (RT-PCR).

Primer	**Sequência *forward***	**Sequencia *reverse***	**Tamanho do fragmento (pb)**
Actb	5´-CAACCTTCTTGCAGCTCCTC-3´	5´-TCCATATCGTCCCAGTTGGT-3´	300
Ager	5´-AAGGAGAAGGCCTTTACCACA-3´	5´-TCTCAGGCTCTGCATCTTCA-3´	157
Scarb1	5´-CGGCGTTATCATGATTCTCA-3´	5´-GGTTGACCACCTCGAAGAAG-3´	152
Cd36	5´-TGTGTTTGGAGGCATTCTCA-3´	5´-TGCACGTCAAAGATCCAAAA-3´	153

3.4 Padronização dos genes da *β-actina, Ager, Bax, Bcl2 e Nfkb1* pela técnica de reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR).

A RT-qPCR consiste na aferição da quantidade de um produto amplificado a cada ciclo da PCR. 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.

Para a quantificação do conteúdo do mRNA, foram desenhados *primers* em éxons diferentes do gene, a fim de evitar a amplificação de DNA genômico (Tabela 2). Como normalizador das reações de PCR, foi utilizado o gene que codifica a β-actina (*Actb*). Os *primers* para amplificação dos genes *Actb, Ager, Bax, Bcl2 e Nfkb1* foram construídos com auxílio do programa *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu).

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados na reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR).

Primer	**Sequência *forward***	**Sequência *reverse***	**Tamanho do fragmento (pb)**
Actb	5'-CAACCTTCTTGCAGCTCCTC-3'	5'-TCCATATCGTCCCAGTTGGT-3'	300
Ager	5'-AAGGAGAAGGCCTTTACCACA-3'	5'-TCTCAGGCTCTGCATCTTCA-3'	157
Bax	5'-TAAAGTGCCCGAGCTGAT-3'	5'-CAAAGATGGTCACTGTCTGC-3'	147
Bcl2	5'-ACATCGCTCTGTGGATGAC-3'	5'-ACTTGTGGCCCAGGTATG-3'	204
Nfkb1	5´- AGTTCCGAAAGGATCGTCGT-3´	5´- GGCGCCAGGACCTTACTC-3´	194

Para a padronização da amplificação dos genes da *Actb, Ager, Bax, Bcl2* e *Nfkb1*utilizou-se o RNA total extraído de ilhotas pancreáticas recém isoladas. A análise da pureza do material foi feita por espectrofotometria, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, utilizando o equipamento NanoDrop ND-3300.Somente foram utilizadas amostras que apresentavam uma relação ABS260/ABS280 ≥ 1,8.

Para a síntese de cDNA, foram utilizados 200 ng de RNA total e seguido o protocolo do conjunto de reagentes *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Invitogen, EUA), onde o RNA total é incubado com 2,5 μM de oligo(dT)20, 2,5 ng/μL de *primers* randômicos, 10 mM $MgCl_2$, mistura de nucleotídeos e uma transcriptase reversa. Esta mistura foi incubada a 25ºC por 10 min e depois a 50ºC por 30 min. A reação foi finalizada aquecendo o tubo a 85ºC por 5 min e, a seguir, colocada no gelo. Para a degradação da fita de RNA da molécula híbrida (RNA:cDNA), a amostra foi tratada com 2 U de RNAse por 20 min a 37ºC. Ao final do processo, o cDNA foi quantificado e diluído com água livre de nuclease com concentração final de 100 ng/μL.

Durante a padronização, foi determinada a melhor temperatura de *annealing* dos *primers* para *Actb, Ager, Bax, Bcl2* e *Nfkb1* (Tabela 3). A temperatura ideal é aquela na qual não há amplificação inespecífica durante a reação de PCR. Foi constatada a especificidade da reação por meio de uma curva de dissociação, sendo que a reação é considerada específica para os produtos de PCR analisados quando a curva de dissociação contém apenas um pico de fluorescência em uma determinada temperatura (Figura 5). Para o gene referência *Actb* foram padronizadas duas temperaturas de *annealing* (58 e 60 °C), que são as diferentes temperaturas de *annealing* dos genes alvos. Para a análise da expressão dos genes *Ager, Bax, Bcl2*

utilizou-se a temperatura de 58 °C e para o gene *Nfkb1*, utilizou-se a temperatura de 60 °C.

Tabela 3. Temperatura de *annealing* dos *primers* utilizados nas reações polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR).

Genes	**Temperatura de *annealing***
Actb	58 °C e 60 °C
Ager	58 °C
Bax	58 °C
Bcl2	58 °C
Nfkb1	60 °C

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento StepOnePlus – Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando-se o estojo comercial *Platinum® SYBR® Green q-PCR Supermix- UDG* (Invitrogen). O SYBR Green 1 é um corante utilizado como fluoróforo que 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 ocorrem nos comprimentos de onda de 494 nm e 521 nm, respectivamente. Essas reações foram realizadas conforme recomendações do fabricante com algumas modificações, como mostrado a seguir:

Platinum® SYBR® Green q-PCR Supermix- UDG	12,5 µL
Primer Forward (10 pmoles/µL)	0,5 µL
Primer Reverse (10 pmoles/µL)	0,5 µL
Água estéril q.s.p.	9,0 µL
cDNA	2,5 µL

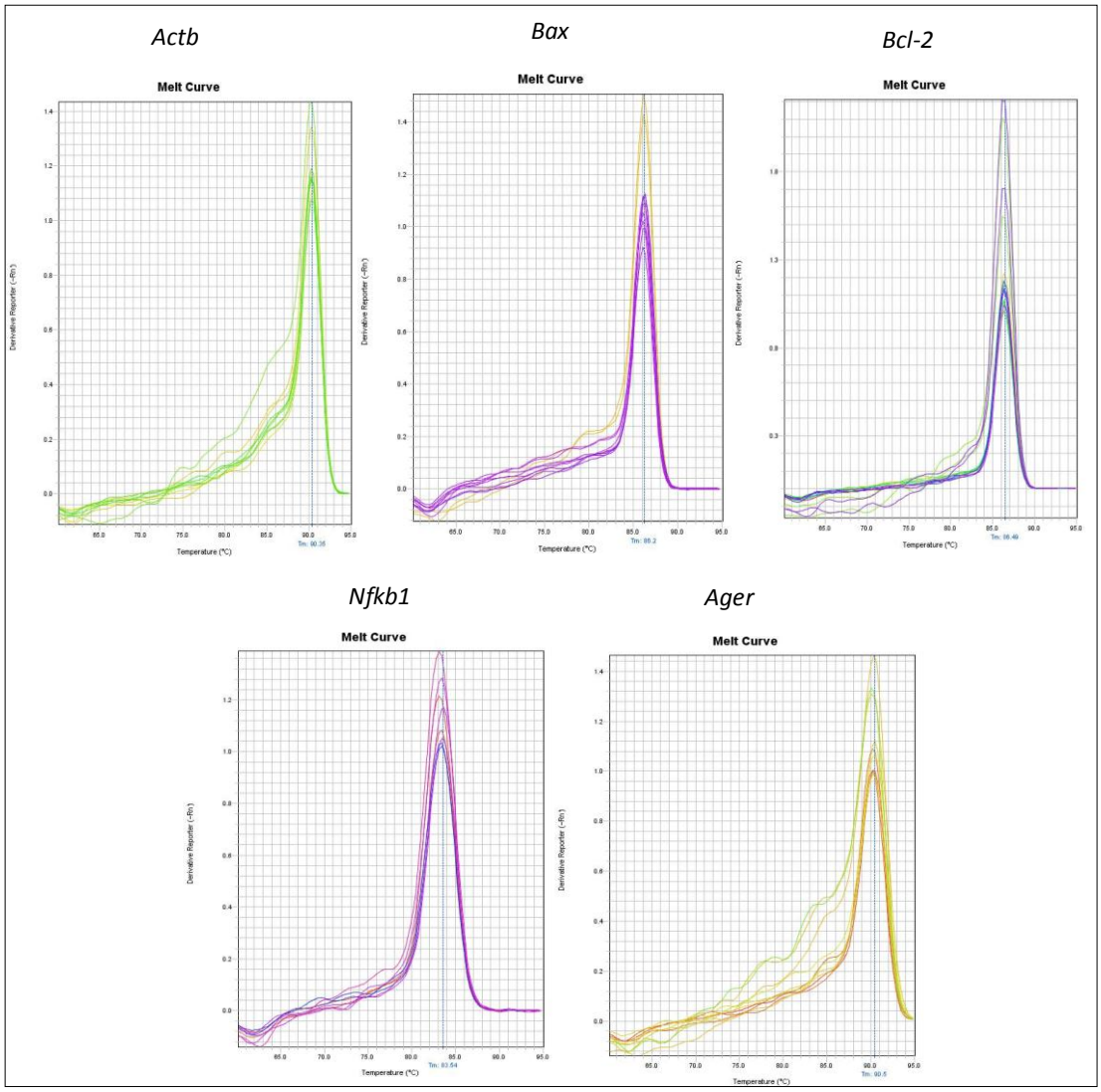


Figura 5. Gráficos mostrando as curvas de dissociação para os genes *Actb*, *Ager*, *Bax*, *Bcl2* e *Nfkb1*.

As amostras foram incubadas durante 10 min a 95º C para a desnaturação das dupla-fitas de cDNA. A seguir, foram submetidas a 40 ciclos (15 s a 95º C, 45 s a 58-60°C e 90 s a 72° C) e, após o último ciclo, foi realizada a etapa de extensão final pela incubação por 4 min a 72°C.

3.5 Quantificação do conteúdo do mRNA dos genes *Actb, Ager, Bax, Bcl2* e *Nfkb1*

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 detectada. Para a quantificação relativa do produto de amplificação, foi realizado um experimento para calcular a eficiência de amplificação de cada um dos pares de *primer*. Este dado é importante para o cálculo final da expressão do gene-alvo em relação ao gene-normalizador. Uma amostra de cDNA de ilhotas recém isoladas (IF) foi diluída 1:5, 1:50, 1:500 e 1:5.000 para a amplificação dos genes *Actb, Ager, Bax* e *Bcl2* e uma mesma amostra foi diluída 1:2, 1:4 1:8 e 1:16 para a amplificação do gene *Nfkb1*para a realização da PCR em tempo real. Foi construído um gráfico colocando o valor de Ct em função da diluição da amostra, conforme demonstrado na Figura 6. A inclinação (*slope*) desta reta foi utilizada para o cálculo de eficiência de amplificação conforme a fórmula: $Eficiência\ de\ amplificação = 10^{(-1/SLOPE)}$

A comparação da eficiência de amplificação dos genes pode ser realizada pela subtração dos valores do CT do gene alvo dos valores do gene referência *Actb* e a diferença é “plotada” contra o logaritmo da quantidade da amostra inicialmente

colocada. Se a inclinação da reta ou *slope* for menor que 0,1, a eficiência de amplificação é comparável entre o gene alvo e o gene controle e o método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ pode ser utilizado. Como as eficiências da amplificação dos genes em estudo e do controle interno não foram comparáveis, o modelo matemático descrito por Pfaffl foi utilizado para o cálculo da quantificação relativa, o qual baseia-se na seguinte fórmula:[62]

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

Sendo que, “R” é o razão que descreve a expressão relativa entre o gene alvo e o gene de referência *Actb*). O “E” é a eficiência de amplificação na reação, tanto do gene alvo como do gene de referência. O ΔCP dos genes alvo é a diferença do CP (ilhotas recém-isoladas – amostra), assim como o ΔCP do gene referência (*Actb*), é a diferença de seu controle (ilhota recém isolada – amostra).

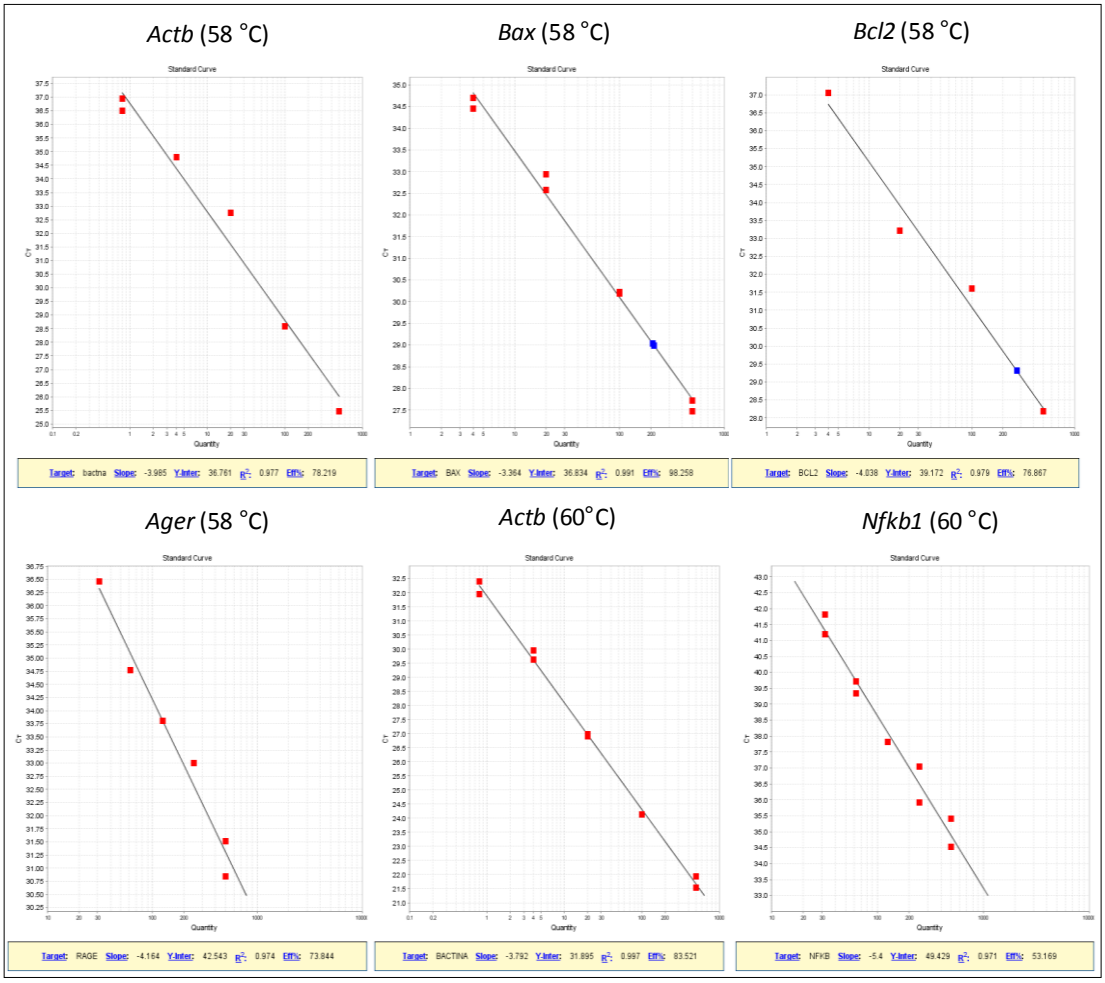


Figura 6. Eficiência de amplificação dos pares de *primers* que amplificam os genes *Actb*, *Ager*, *Bax*, *Bcl2*, *Actb* (60°C) e *Nfkb1* utilizados na PCR em tempo real.

3.6 Padronização da técnica para detecção da apoptose celular pela análise da permeabilidade da membrana mitocondrial

A detecção de morte celular pela análise da permeabilidade da membrana mitocondrial foi realizada utilizando-se o estojo comercial *MitoProbe*^{TM} *JC-1 Assay Kit* (Molecular Probes). A permeabilidade mitocondrial é o evento que determina o início da apoptose celular mediada pela via intrínseca. O colapso no gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial leva à inserção de proteínas pró-apoptóticas membros da família BCL2, que acabam por formar poros que permitem a

saída do citocromo c para o citoplasma e consequente formação do apoptossomo, composto pelo complexo citocromo c, caspase 9 e APAF. A perda do potencial de membrana mitocondrial como marcador do processo de apoptose pode ser detectado pelo marcador catiônico fluorescente iodeto de 5,5’,6,6’-tetracloro-1,1’,3,3’-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1).

Durante a incubação, o JC-1 penetra nas células normais e apoptóticas. Nas células não apoptóticas, este reagente lipofílico que possui cargas positivas entra na membrana mitocondrial que possui carga negativa, se agrega e emite uma fluorescência vermelha. Nas células apoptóticas, a perda do potencial de membrana impede que o reagente se acumule dentro da mitocôndria, e ele fica distribuído pela célula. Esta forma dispersa do reagente emite fluorescência verde, permitindo uma fácil distinção entre as células apoptóticas e não apoptóticas.

Logo após o isolamento, duas alíquotas contendo 50 ilhotas foram transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min. O precipitado de células foi suspendido em 500 μL de HBSS. Ao grupo de ilhotas controle, foi adicionado apenas 7 μL do corante JC-1. Ao grupo que serviria como controle positivo, foi adicionado, além do corante, 1 μL de carbonil cianeto 3-clorofenilidrazona (CCCP), um agente indutor de apoptose. A seguir, as células foram incubadas a 37°C por 20 min na estufa a 5% de CO_2. Após diversas lavagens, as ilhotas foram suspendidas em 200 μL de HBSS e a suspensão de células foi analisada com microscopia de fluorescência, utilizando o microscópio Zeiss Axiovert 200® (Carl Zeiss, Alemanha) utilizando filtros para visualização de fluorescência verde (527 nm) e vermelha (590 nm). Os resultados foram analisados dividindo-se o

valor de coloração verde pelo valor de coloração vermelha, calculados pelo *software* AxioVision. Quanto maior o valor dessa relação, maior o índice de apoptose.

Para complementar a padronização desse teste, também realizamos um experimento utilizando o agente indutor de apoptose estreptozotocina (STZ). Após o isolamento, semeamos 50 ilhotas em dois poços aglomerados. Estas ilhotas foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 μg/ml de estreptomicina) e 10% de SFB. Em apenas um dos grupos foi adicionado STZ na concentração de 1 mM (controle positivo). Após 24 horas, as ilhotas foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas e procedeu- se à coloração e análise das imagens conforme descrito acima.

Para a análise estatística da avaliação de apoptose pelo *estojo comercial* JC-1 foi utilizado o programa SPSS versão 16 e foi realizada a prova não-paramétrica de Mann-Whitney. A hipótese denulidade foi rejeitada sempre que o valor de *P* era menor que 5%.

Desta forma, foi possível detectar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de ilhotas tratadas com os agentes indutores de apoptose (CCCP ou STZ) e seus respectivos grupos controle, conforme demonstrado nas Figuras 7 e 8.

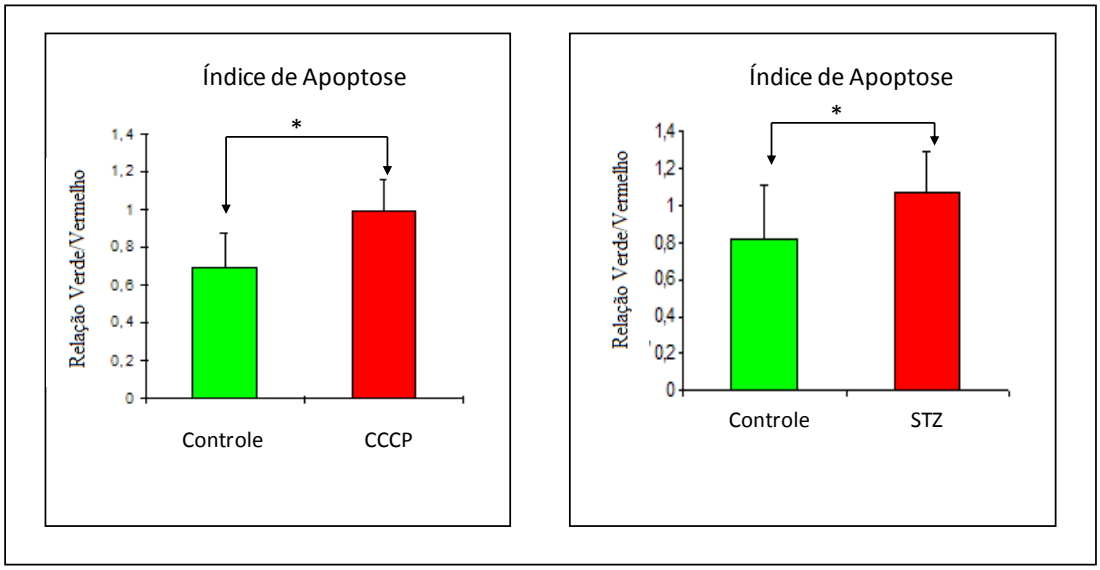


Figura 7. Gráficos representativos dos resultados da padronização da técnica de avaliação do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas pela análise da permeabilidade da membrana mitocondrial (*p<0,05).

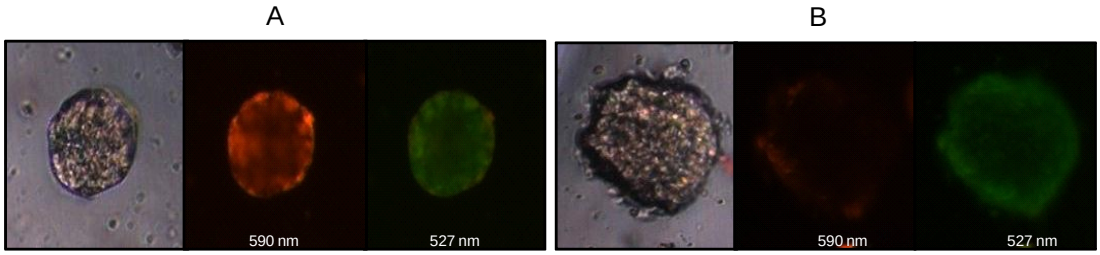


Figura 8: Ilhotas visualizadas ao microscópio de fluorescência nos comprimentos de onda 590 nm (coloração vermelha) e 527 nm (coloração verde). No painel A, observa-se ilhota cultivada durante 24 horas na ausência de STZ (controle negativo) e no painel B observa-se ilhota cultivada durante 24 horas em presença de STZ (controle positivo).

3.7 Padronização da técnica para detecção de apoptose celular pela análise da permeabilidade da membrana mitocondrial utilizando microscopia confocal

A detecção de morte celular pela análise da permeabilidade da membrana mitocondrial foi realizada utilizando-se o *estojo comercial MitoProbe™ JC-1 Assay Kit* (Molecular Probes).

Logo após o isolamento, duas alíquotas contendo 50 ilhotas foram transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min. O precipitado de células foi suspendido em 200 μL de HBSS. Ao grupo de ilhotas controle, foi adicionado 7 μL do corante JC-1. A seguir, as células foram incubadas na geladeira *overnight*. Após adição de ácido diaminopimélico (DAP) para a coloração do núcleo das células (1:500 μL) e diversas lavagens, as ilhotas foram suspendidas em 20 μL de tampão de glicerol mais PBS. As lâminas foram preparadas e analisadas com microscopia de fluorescência utilizando o módulo confocal ZEISS LSM 510 Meta / UV (Carl Zeiss, Alemanha) com filtros para visualização de fluorescência verde (527 nm) e vermelha (590 nm). As imagens são analisadas visualmente, sendo que a coloração vermelha indica que não há apoptose e a coloração verde indica apoptose.

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

A medida da atividade de caspase 3 foi realizada com o *estojo comercial Caspase 3 Colorimetric Activity Assay Kit* (Chemicon International, Temecula, CA) pela utilização de substratos contendo o cromógeno p-nitroanilida (pNA). Após a indução de apoptose, a atividade proteolítica de caspase 3 aumenta, proporcionando a clivagem de seus substratos e a liberação do cromógeno que, por sua vez, pode ser detectado por espectrofotometria. Desta forma, comparando os valores de absorbância contidos entre as amostras controle e as amostras tratadas, é possível determinar a atividade proteolítica de caspase 3 para cada uma delas, o que reflete o índice de apoptose.

A padronização da medida da atividade de caspase 3 foi realizada da seguinte maneira: grupos de 200, 300, 400 e 500 ilhotas foram cultivadas em placas de cultura em duplicata e tratadas com o agente indutor de apoptose camptotecina (CPT-controle positivo da reação), em meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos, 10% de SFB e com 5,6 mM de glicose durante 4 h. Como controle da reação, foram utilizados grupos de 200, 300, 400 e 500 ilhotas mantidas em cultura sob as mesmas condições, porém na ausência do agente indutor de apoptose. Os grupos de ilhotas foram retirados da cultura e lavados com 10 mL de solução de HBSS. A seguir, as ilhotas foram centrifugadas a 2.100 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi suspendido em 1mL de HBSS e centrifugado a 1.500 rpm por 10 min. O precipitado foi ressuspendido em 200µL de tampão de lise. Após 10 min de incubação no gelo, as células foram centrifugadas a 10.000g por 5min, o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Uma alíquota de 10 µL da amostra foi utilizada para a realização do ensaio de Bradford para a normalização dos dados pela quantidade de proteína total. Para tanto, 10 µL de cada amostra foram adicionados a 200 µL do corante azul de Comassi (Bradford Reagent, Sigma Aldrich). As amostras foram incubadas por 5 min e a leitura foi realizada por espectrofotometria (Nanodrop ND-1000) usando o comprimento de onda de medida de 595 nm.

Para o ensaio de atividade proteolítica de caspase 3, 70 µL de amostra foram colocados individualmente em placas de 96 poços aglomerados e a seguir as células foram incubadas com 20 µL de tampão de ensaio e 10 µL de substrato colorimétrico contendo acetil- Asp-Glut-Val-Asp-p- nitroanilida (Ac-DEVD-pNA). Após incubação a 37°C durante 2 h com proteção da luz, as amostras foram lidas no

luminômetro Anthos Lucy 3 (Anthos Labtec Instruments, Austrália) utilizando-se o comprimento de onda de medida de 405 nm e utilizando- se como referência o filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos em Unidades Arbitrárias de Absorbância (UAA) dividindo-se o valor da absorbância pela quantidade de proteína obtida pela técnica de Bradford em cada amostra. Os resultados da padronização foram expressos pela média das amostras em duplicata de cultura ± o desvio padrão. Durante a padronização concluiu- se que os experimentos deveriam ser feitos com a utilização de 300 ilhotas, pois a partir deste número observou- se diferença estatisticamente significante entre o grupo de ilhotas controle e o grupo de ilhotas tratadas com o agente indutor de apoptose (Figura 9).

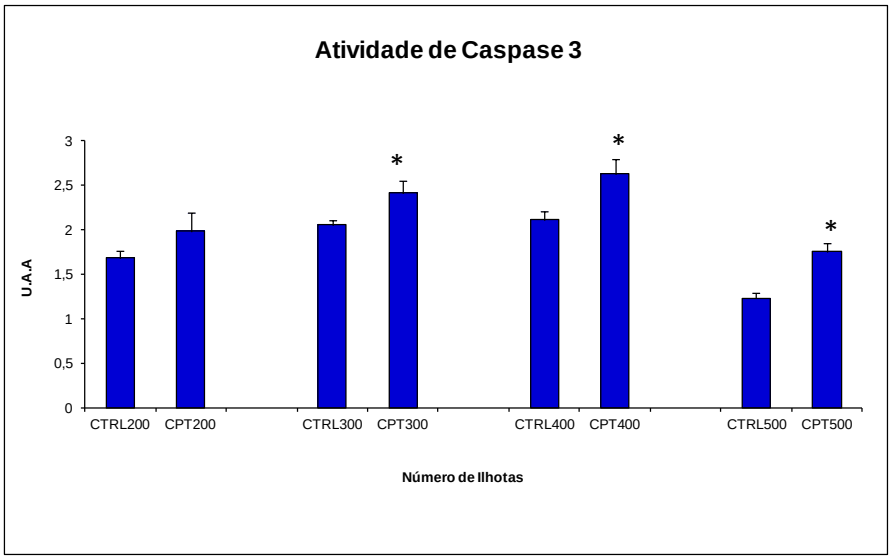


Figura 9. Gráfico representativo do resultado da padronização da quantidade de ilhotas necessárias para a medida de atividade proteolítica da caspase 3. CTRL: ilhotas não tratadas com camptotecina; CPT: ilhotas tratadas com camptotecina; U.A.A: unidades arbitrárias de absorbância. (*p<0,05)

3.9 Avaliação do índice de apoptose pela quantificação da fragmentação do DNA

Para a detecção de morte celular pela quantificação da fragmentação do DNA, utilizou-se o *estojo comercial* C*ell death detection* ELISA^{PLUS} (Boering Mannheim, Mannheim), que já havia sido padronizado em nosso laboratório. Este *estojo comercial* analisa o DNA fragmentado associado à histona (oligonucleossomo), evento final característico do processo apoptótico. Após a retirada das ilhotas tratadas dos poços aglomerados, 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 ressuspendidas 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 diluído na razão de 1:10 e 20 μL da solução de diluição foram colocados na microplaca do *estojo comercial* que contém estreptavidina e incubadas durante 2 h a 200rpm, com dois anticorpos monoclonais: 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 microplaca pela estreptavidina. A microplaca foi lavada três vezes com 300 μL de tampão de incubação para remover os componentes das células que não fazem parte da reação imunológica, adiciona-se o substrato (ABTS) ao poço e a solução é incubada durante 15 min a 200 rpm. Para análise, utilizamos o valor de absorbância das amostras emitido pelo luminômetro anthos Lucy 3 (Anthos Labtec Instruments) do qual se subtrai o valor de absorbância *background* (sem amostra, mas com os reagentes). A

seguir, o valor obtido foi dividido pelo valor de absorbância das ilhotas recém isoladas (IF), o que nos dá uma unidade arbitrária de absorbância (UAA).

3.10 Padronização da técnica para detecção de espécies reativas de oxigênio

A detecção de ROS foi realizada pelo estojo comercial *Image-iT ™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection* (Molecular Probes, EUA) que se baseia no uso do reagente Carboxi-H2DCFDA, um marcador fluorescente para ROS em células vivas. Para a padronização da técnica, as ilhotas foram isoladas e duas alíquotas contendo 100 ilhotas foram transferidas para tubos de 15 mL, centrifugadas a 2.100 rpm por 10 min. O grupo de ilhotas controle (ilhotas recém- isoladas) foi corado pela adição de 500 μL de solução contendo Carboxi- H2DCFDA (25μM) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), por 30 min a 37°C. Após este período, as ilhotas foram lavadas três vezes com HBSS e analisadas no microscópio Zeiss Axiovert 200® (Carl Zeiss, Alemanha) com filtros para visualização de fluorescência verde (527 nm). Como controle positivo da reação, ao outro grupo de ilhotas foi adicionado 1 mL de solução contendo 100 μM do agente indutor de ROS terc-butil hidroperóxido (TBHP) diluído em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. As ilhotas foram incubadas com esta solução por 60 min em estufa a 37°C. Após este período, as ilhotas foram lavadas com HBSS e centrifugadas a 3.000 rpm por 7 min. O precipitado foi ressuspendido em HBSS e procedeu-se à coloração e análise das ilhotas conforme descrito anteriormente. O Carboxi-H2DCFDA atravessa a membrana destas células e é desacetilado por estearases não específicas presentes no citoplasma. Em presença de ROS, a fluoresceína reduzida associada ao marcador é oxidada, emite coloração verde e pode ser detectada em microscópio de

fluorescência com filtros de detecção para visualização de fluorescência verde. Foi possível detectar diferença significante entre o grupo de ilhotas tratadas com o agente indutor de ROS (TBHP) e o grupo de ilhotas controle. Os resultados foram expressos de acordo com a média da densidade de fluorescência verde emitida por cada grupo de ilhotas (Figura 10). Quanto maior a intensidade de fluorescência verde, maior a quantidade local de ROS.

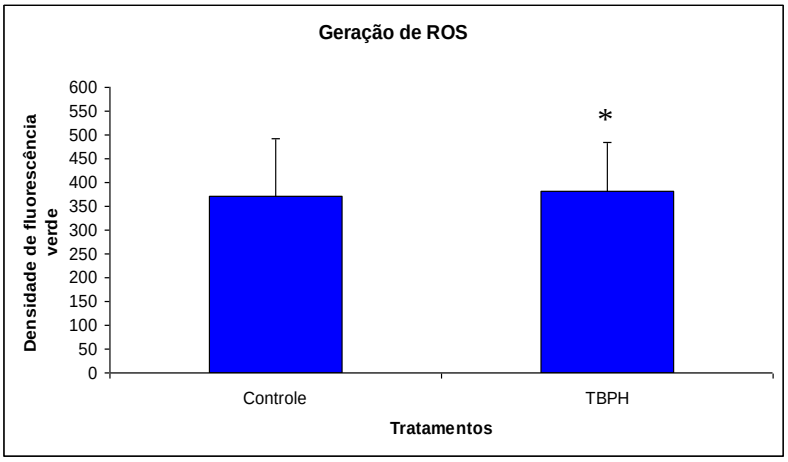


Figura 10. Gráfico representativo dos resultados da padronização do teste de detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em ilhotas. TBPH: terc-butil hidroperóxido, indutor de espécies reativas de oxigênio. (*p< 0,05)

3.11 Detecção de espécies reativas de oxigênio utilizando microscopia confocal

A detecção de ROS foi realizada pelo *estojo comercial Image-iT ™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection* (Molecular Probes, EUA), descrita anteriormente. As ilhotas tratadas e controle foram transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min. O precipitado de células foi suspendido em 200 µL de HBSS e foram adicionados 5µL de solução contendo Carboxi-H2DCFDA (25µM) diluído em DMSO. A seguir, as células foram incubadas na geladeira *overnight*. Após adição de DAP (1:500 µL) e diversas lavagens, as ilhotas

foram suspendidas em 20 µL de tampão de glicerol mais PBS. As lâminas foram preparadas e analisadas por microscopia de fluorescência utilizando o módulo confocal ZEISS LSM 510 Meta/UV (Carl Zeiss, Alemanha) com filtro para visualização de fluorescência verde (527 nm). As imagens foram analisadas visualmente, sendo que quanto maior a intensidade de fluorescência verde, maior a quantidade local de ROS.

3.12 Medida da atividade da NADPH oxidase

A atividade da NADPH oxidase foi medida pelo método de quimioluminescência da lucigenina. Cerca de 300 ilhotas tratadas com albumina controle e com albumina glicada (AlbGAD) durante 24, 48 e 72 h foram homogeneizadas em 300 µL de tampão de lise (20mM KH_2PO_4, pH 7,0; 1 mM EGTA; 1mM flúor fenilmetilsulfonil [PMSF]; 10 µL/mL aprotinina e um coquetel de inibidores de protease 40 µL), utilizando um homogeneizador Dounce (100 vezes no gelo). O homogeneizado foi submetido a baixa velocidade de centrifugação (800g) por 10 min a 4 °C para remover as células intactas. Alíquotas do sobrenadante (50 µL) foram adicionadas a 450 µL de tampão de reação (50mM de tampão fosfato, pH 7,0; 1 mM EGTA; 150 mM de sacarose; 5 µM de lucigenina e 100 µM de NADPH). A emissão de fóton em unidades de luminescência relativa (RLU) foi medida a cada 20 s por 10 min no Luminômetro Turner TD-20e (Turner Designs, Califórnia, EUA). A produção de superóxido foi expressa como RLU/20s/mg. A concentração de proteína foi medida pelo método Bradford.[63]

Para identificar qual a via de produção de superóxido, o homogeneizado foi pré-incubado com difenileno-eiodônio (DPI, um inibidor da via da NADPH oxidase)

e rotenona (inibidor da via mitocondrial), a 20 e 100 mM de concentração final respectivamente por 10 min.[63] No caso da produção de superóxido ocorrer pela via NADPH oxidase, haverá uma redução na produção de superóxido quando as ilhotas foram incubadas com DPI, mas não quando as ilhotas forem incubadas com rotenona (inibidor da via mitocondrial).

3.13 Padronização da concentração de benfotiamina

Após o isolamento, 100 ilhotas foram semeadas em triplicata em poços aglomerados, tratadas ou não (CTR) com 150 µM, 200 µM, 250 µM, 300µM e 350 µM de benfotimina emantidas em cultura por 72 h em estufa a 5% de CO_2em meio RPMI 1640 contendo 5 mg/mL de AlbGAD, 23 mM de glicose, antibióticos e 10% de SFB. Estas ilhotas foram analisadas com a técnica de detecção de morte celular por ELISA que utiliza o *estojo comercial* C*ell death detection* ELISA^{PLUS} (Boering Mannheim, Mannheim).

Observou-se uma diminuição significante na taxa de apoptose de ilhotas tratadas com 250 µM, 300µM e 350 µM de Benfotiamina em relação às ilhotas não tratadas (Figura 11). A concentração de 350 µM foi selecionada para os experimentos.

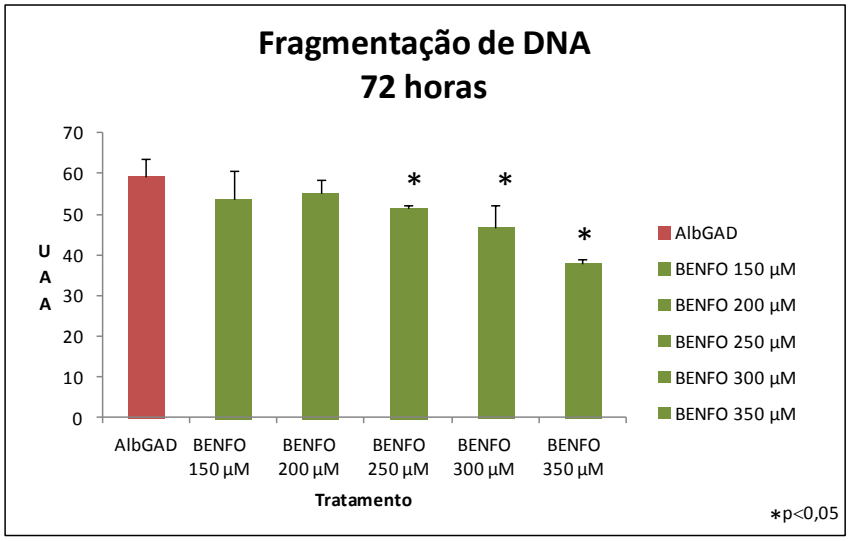


Figura 11: Gráfico representativo do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas expostas a 5mg/mL de AlbGADtratadas com 150 µM (BENFO 150 µM), 200 µM (BENFO 200 µM), 250 µM ((BENFO 250 µM), 300 µM (BENFO 300 µM) e 350 µM (BENFO 350 µM) de benfotimina, e de ilhotas não tratadas (CTRL) por 72 h (n=6) e (*p<0,05).

3.14 Avaliação do índice de apoptose de ilhotas expostas a 5mg/mL de cada uma das três preparações de AGEs por 48, 72 e 96 horas

Com o objetivo de determinar que preparação de AGEs exerceria maior efeito pró-apoptótico sobre as ilhotas, decidimos tratá-las com três diferentes preparações na concentração de 5 mg/mL por 48, 72 e 96 horas.

Após o isolamento, 100 ilhotas foram semeadas em triplicata e tratadas em poços aglomerados com 5mg/L de uma das três preparações de AGEs, quais sejam: AlbGAD, AlbGO ou AlbMGO, gentilmente cedidas pela Prof. Marisa Passarelli do Laboratório de Lípides da FMUSP e preparados conforme protocolo previamente descrito.[61] Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como controle (AlbCTR). As ilhotas foram mantidas em cultura por 48, 72 e 96 horas em estufa a 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 contendo 23 mM de glicose, antibióticos e 10% de SFB em temperatura de 37ºC.

Para a de detecção de morte celular, utilizou-se o *estojo comercial* C*ell death detection* ELISA^{PLUS} (Boering Mannheim, Mannheim).

3.15 Avaliação do índice de apoptose de ilhotas expostas a 2 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL de AGEs por 24, 48, 72, 96 e 120 horas

Após o isolamento, 100 ilhotas foram semeadas em triplicata e tratadas em poços aglomerados com 2 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL de AlbGAD, ou apenas com AlbCTR e mantidas em cultura por 24, 48, 72, 96 e 120 horas em estufa a 5% de CO_2em meio RPMI 1640 contendo 23 mM de glicose, antibióticos e 10% de SFB em temperatura de 37ºC.

Para a de detecção de morte celular, utilizou-se o *estojo comercial* C*ell death detection* ELISA^{PLUS} (Boering Mannheim, Mannheim) e o *estojo comercial MitoProbe^{TM} JC-1 Assay Kit* (Molecular Probes) que analisa a permeabilidade da membrana mitocondrial.

3.16 Quantificação do conteúdo de mRNA dos genes *Actb, Ager, Bax, Bcl2 e Nfkb1*, em ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD

Após a padronização, 200 ilhotas recém isoladas foram semeadas e tratadas em poços aglomerados com 5 mg/mL de AlbGAD ou apenas AlbCTR e mantidas em cultura por 24, 48, 72 e 96 em estufa a 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 contendo 23 mM de glicose, antibióticos e 10% de SFB em temperatura de 37ºC. Após o tempo de cultivo as ilhotas foram colocadas em 1 mL de Trizol e armazenadas a menos 80°C para posterior extração do RNA.

3.17 Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio por ilhotas expostas a AlbGAD por 24 e 48 horas

Após o isolamento, 100 ilhotas foram semeadas e tratadas em poços aglomerados com5 mg/mL de AlbGAD ou apenas com AlbCTR e mantidas em cultura por 24 e 48 h em estufa a 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 contendo 23 mM de glicose, antibióticos e 10% de SFB em temperatura de 37ºC.

A detecção das ROS foi realizada pelo estojo comercial *Image-iT ™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection* (Molecular Probes).

3.18 Atividade da NADPH oxidase em ilhotas expostas a AlbGAD por 24, 48 e 72 horas

Após o isolamento, 300 ilhotas foram semeadas e tratadas em poços aglomerados com5 mg/mL de AlbGAD ou apenas com AlbCTR e mantidas em cultura por 24, 48 e 72 h em estufa a 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 contendo 23 mM de glicose, antibióticos e 10% de SFB em temperatura de 37ºC. Ao final dos períodos de incubação, as ilhotas foram coletadas e submetidas ao protocolo explicado no item 3.12.

3.19 Avaliação do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD e tratadas com benfotiamina ou com 1 µM de Mito Q por 72 horas

Após o isolamento, ilhotas foram semeadas em poços aglomerados em triplicata e expostas a 5mg/mL de AlbGAD. As ilhotas foram tratadas ou não (AlbGAD) com 350 µM de benfotiamina (AlbGAD+BENFO) ou 1 µM de MitoQ

(AlbGAD+MITOQ) e mantidas em cultura por 72 h em estufa a 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 contendo 23 mM de glicose, antibióticos e 10% de SFB.

Para a de detecção de morte celular, utilizou-se o *estojo comercial* C*ell death detection* ELISA^{PLUS} (Boering Mannheim, Mannheim) e o *estojo comercial Caspase 3 Colorimetric Activity Assay Kit* (Chemicon International, Temecula, CA) que analisa a atividade da caspase 3.

3.20 Quantificação do conteúdo de mRNA dos genes *Actb, Ager, Bax, Bcl2 e Nfkb1,* em ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD tratadas com benfotiamina ou comMito Q por 72 horas

Após o isolamento, 200 ilhotas foram semeadas em poços aglomerados em triplicata e expostas a 5 mg/mL de AlbGAD. As ilhotas foram tratadas ou não (AlbGAD) com 350 µM de benfotimina (AlbGAD+BENFO) ou 1 µM de MitoQ (AlbGAD+MITOQ) e mantidas em cultura por 72 h em estufa a 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 contendo 23 mM de glicose, antibióticos e 10% de SFB. Após o tempo de cultivo as ilhotas foram colocadas em 1 mL de Trizol e armazenadas a menos 80°C para posterior extração do RNA.

3.21 Avaliação da geração de ROS por ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD tratadas com benfotiamina ou com Mito Q por 72 horas

Após o isolamento, 100 ilhotas foram semeadas em poços aglomerados em triplicata e expostas a 5 mg/mL de AlgGAD. As ilhotas foram tratadas ou não (AlbGAD) com 350 µM de benfotimina (AlbGAD+BENFO) ou 1 µM de MitoQ

(AlbGAD+MITOQ) e mantidas em cultura por 72 h em estufa a 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 contendo 23 mM de glicose, antibióticos e 10% de SFB.

A detecção das ROS foi realizada pelo estojo comercial *Image-iT ™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection* (Molecular Probes)

3.22 Atividade da NADPH oxidase em ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD tratadas com benfotiamina ou com Mito Q por 72 horas

Após o isolamento, 300 ilhotas foram semeadas em poços aglomerados em triplicata e expostas a 5 mg/mL de AlgGAD. As ilhotas foram tratadas ou não (AlbGAD) com 350 µM de benfotimina (AlbGAD+BENFO) ou 1 µM de MitoQ (AlbGAD+MITOQ) e mantidas em cultura por 72 h em estufa a 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 contendo 23 mM de glicose, antibióticos e 10% de SFB.

3.23 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa JMP starter e foi realizada a prova não-paramétrica de Mann-Whitney. A hipótese de nulidade foi rejeitada sempre que o valor de *P* era menor que 5%.

4. Resultados

4.1. Avaliação por RT-PCR da expressão dos genes *Ager, Scarb1* e *CD36*

Conforme demonstrado na Figura 12, as ilhotas pancreáticas de rato recém isoladas expressam o mRNA dos genes que codificam o RAGE (*Ager*), o *scavenger receptor class B, member* 1 (*Scarb1*) e o Cd36, todos ligantes de AGEs.

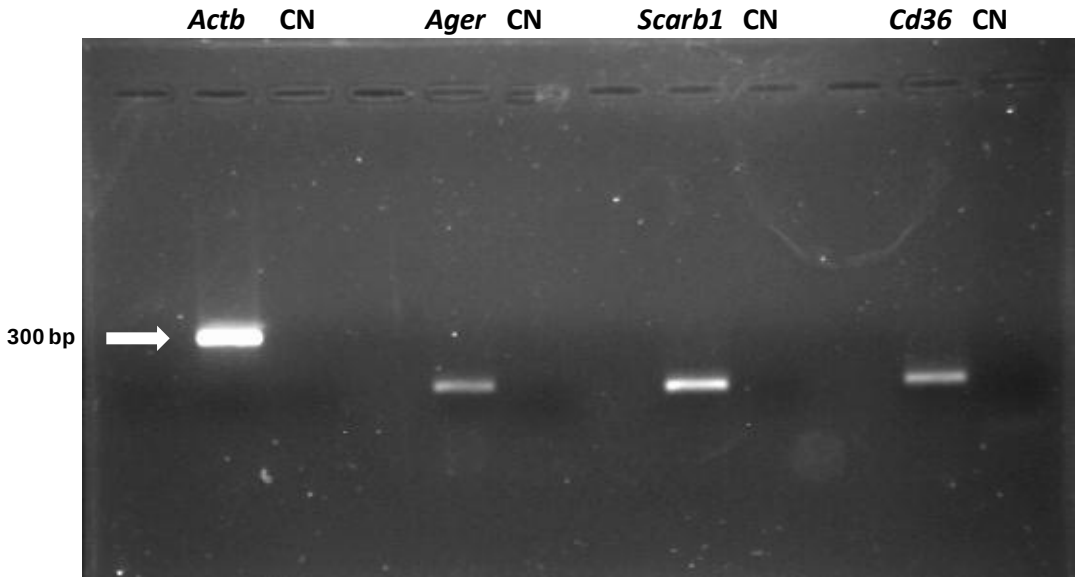


Figura 12. Gel de agarose corado com brometo de etídeo evidenciando a amplificação de fragmentos dos genes *Actb*, *Ager*, *Scarb1* e *Cd36* em ilhotas pancreáticas de ratos. CN= Controle negativo

4.2 Avaliação do índice de apoptose pela quantificação da fragmentação do DNA de ilhotas expostas a 5mg/mL de cada uma das três preparações de AGEs por 48, 72 e 96 horas

Observou-se uma diminuição no índice de apoptose celular nas ilhotas expostas às três preparações de AGEs (albGAD, albGO ou albMGO) em relação às ilhotas expostas a AlbCTR no período de 48 horas (Figura 13). Após 72 horas,

observou-se um aumento no índice de apoptose nas ilhotas expostas a AlbGAD e AlbMGO em relação às ilhotas expostas à AlbCTR, entretanto não se observou diferença no índice de apoptose celular entre as ilhotas expostas a AlbGO e as ilhotas expostas a AlbCTR (Figura 14). Após 96 horas, observou-se um aumento no índice de apoptose das ilhotas expostas a AlbGAD, AlbGO e AlbMGO em relação às ilhotas expostas à AlbCTR (Figura 15).

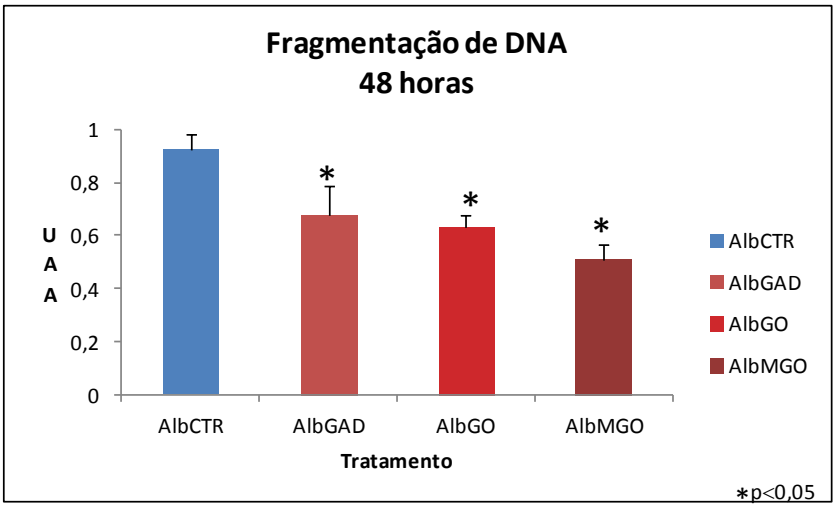


Figura 13: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de uma das três preparações de AGEs (albumina glicolaldeído [AlbGAD], albumina glioxal [AlbGO] ou albumina metilglioxal [AlbMGO]) ou de albumina controle (AlbCTR) após 48 horas de cultivo. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05 em relação a albumina controle (AlbCTR).

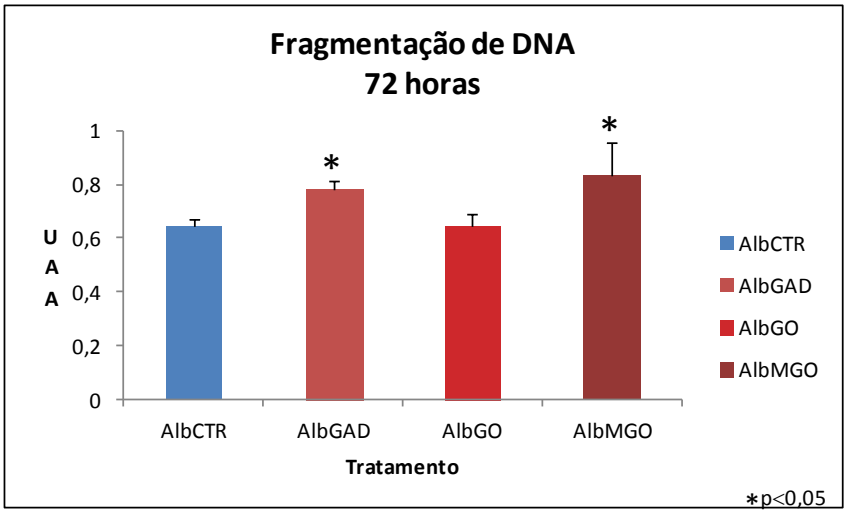


Figura 14: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de uma das três preparações de AGEs (albumina glicolaldeído [AlbGAD], albumina glioxal [AlbGO] ou albumina metilglioxal [AlbMGO]) ou de albumina controle (AlbCTR) após 72 horas de cultivo. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6),*p<0,05 em relação a albumina controle (AlbCTR).

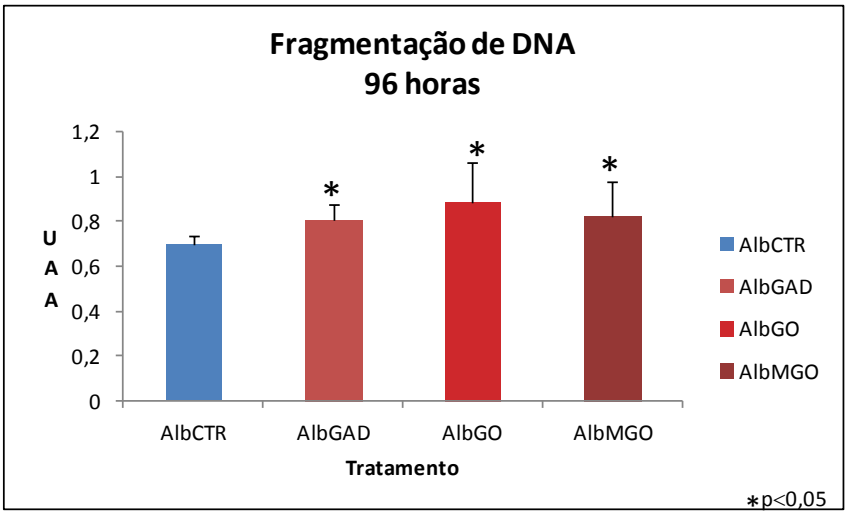


Figura 15: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5mg/mL de uma das três preparações de AGEs (albumina glicolaldeído [AlbGAD], albumina glioxal [AlbGO] ou albumina metilglioxal [AlbMGO]) ou de albumina controle (AlbCTR) após 96 horas de cultivo. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata, (n=6), *p<0,05 em relação a albumina controle (AlbCTR).

4.3 Avaliação do índice de apoptose celular de ilhotas expostas a 2 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL de AlbGAD ou albumina controle por 24, 48, 72 e 96 horas

4.3.1 Tempo de exposição de 24 horas

As ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD apresentaram um índice de apoptose menor que o grupo tratado com AlbCTR após 24 h de exposição (Figura 16).

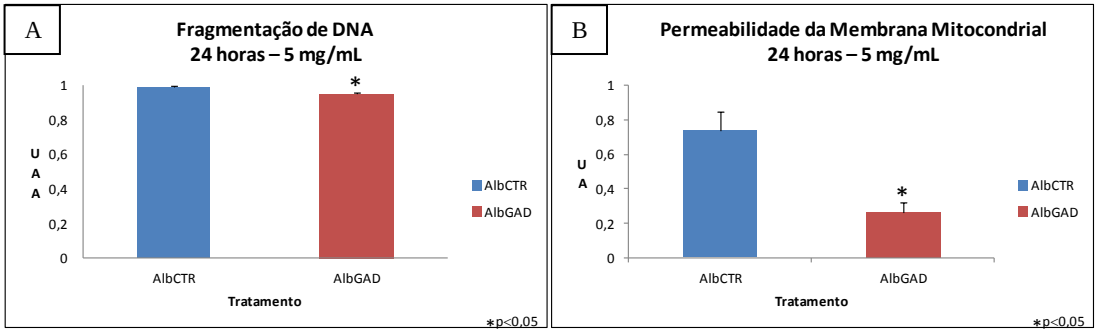


Figura 16: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 24h de cultivo. A: Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6); B: aproximadamente 100 ilhotas, *p<0,05.

As imagens das ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD evidenciaram um índice de apoptose menor (coloração vermelha predominante) que as ilhotas expostas a AlbCTR após 24 h de exposição (Figura 17).

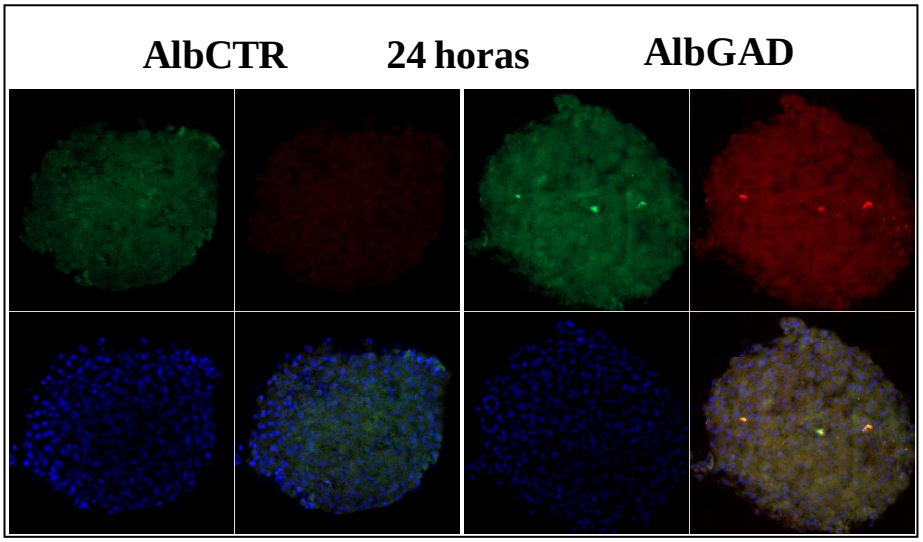


Figura 17: Imagens representativas do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 24 h de cultivo. No sentido horário: células apoptóticas (filtro para visualização de fluorescência verde [527 nm]), células não apoptóticas (filtro para visualização de fluorescência vermelha [590 nm]), imagens sobrepostas e núcleo corado com DAP.

4.3.2 Tempo de exposição de 48 horas

Após 48 horas de exposição, observou-se uma diminuição no índice de apoptose celular nas ilhotas expostas a 2 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/ml de AlbGAD em relação às ilhotas expostas à AlbCTR (Figura 18).

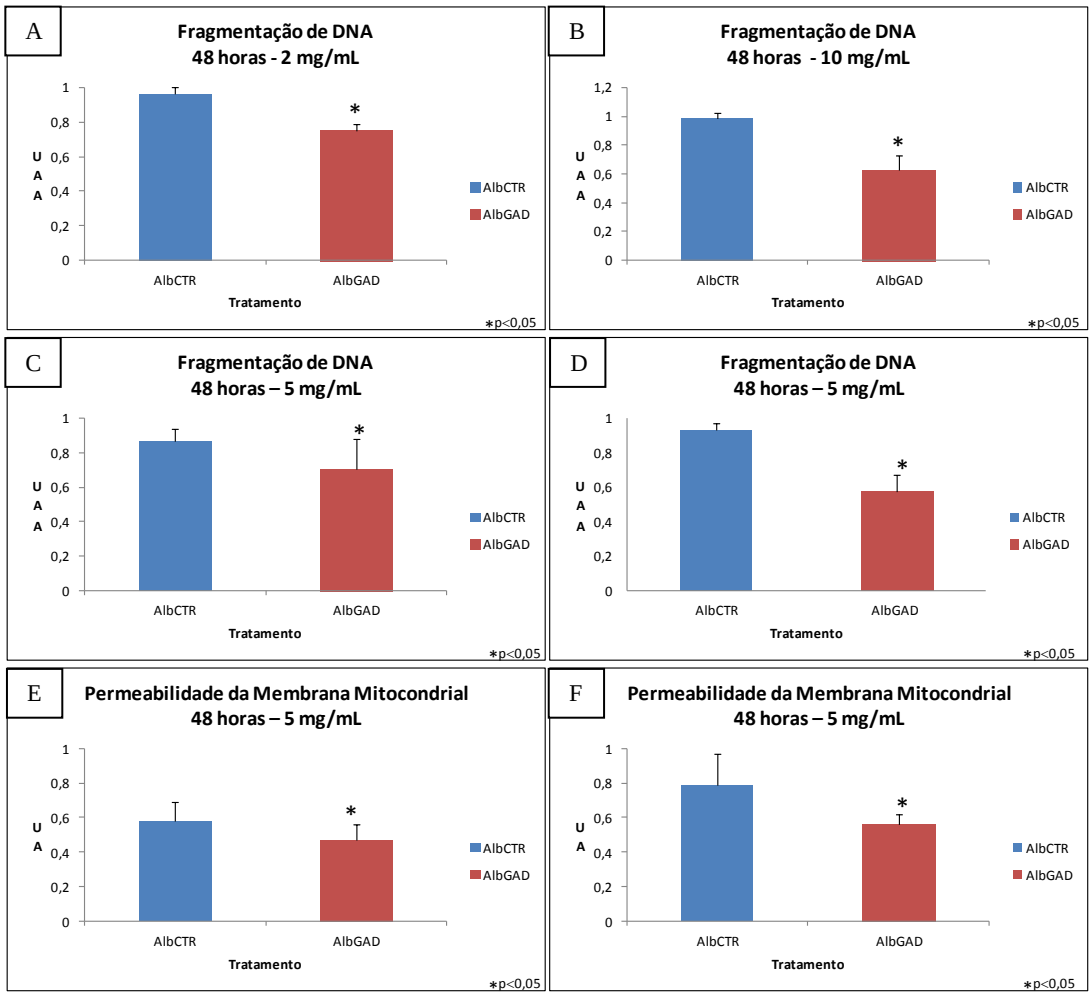


Figura 18: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com 2, 5 ou 10 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 48 horas de cultivo. A-D: Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), E-F: aproximadamente 100 ilhotas, *p<0,05.

As imagens das ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD evidenciaram um índice de apoptose menor (coloração vermelha predominante) que as ilhotas expostas a AlbCTR após 48 h de exposição (Figura 19).

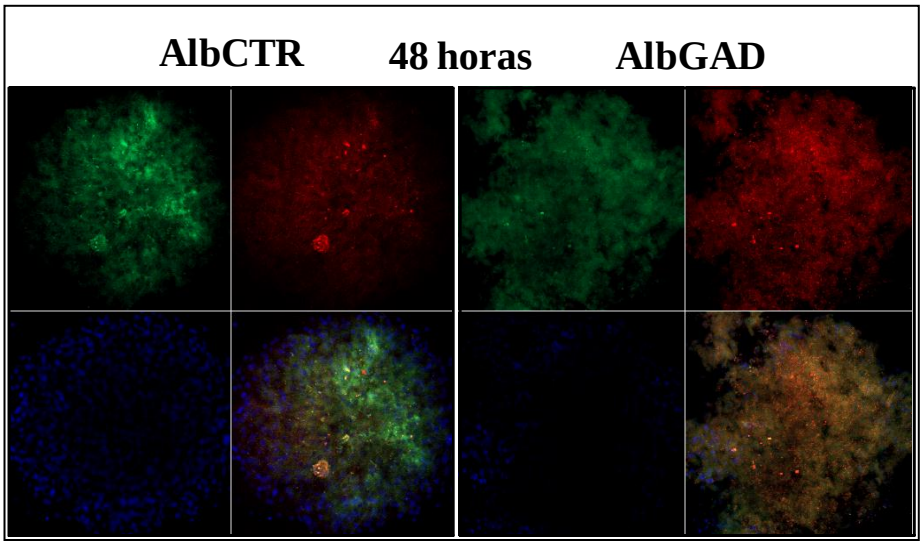


Figura 19: Imagens representativas do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 48 horas de cultivo. No sentido horário: células apoptóticas (filtro para visualização de fluorescência verde [527 nm]), células não apoptóticas (filtro para visualização de fluorescência vermelha [590 nm]), imagens sobrepostas e núcleo corado com DAP.

4.3.3 Tempo de exposição de 72 horas

Após 72 horas, observou-se um aumento no índice de apoptose de ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGADe m relação às ilhotas expostas a AlbCTR, entretanto não houve diferença no índice de apoptose de ilhotas expostas a 2 mg/mL de AlbGAD em relação às ilhotas expostas à AlbCTR (Figura 20).

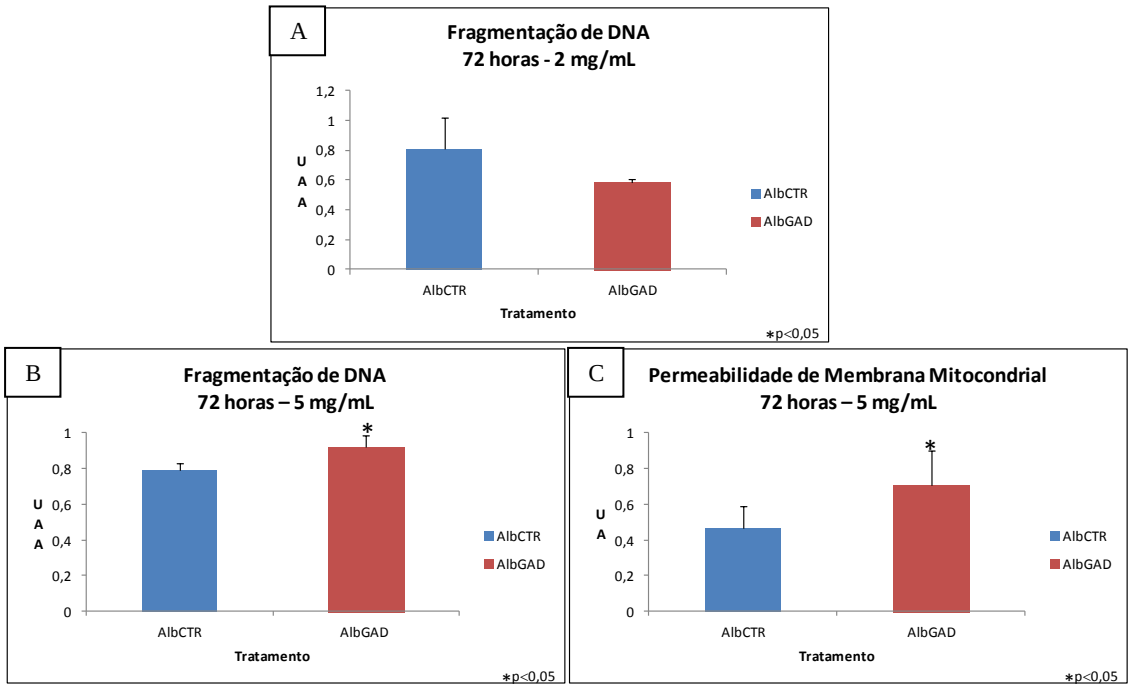


Figura 20: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 2 mg/mL e 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 72 horas de cultivo. A e B:, C:, (*p<0,05).A e B: Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6),C: aproximadamente 100 ilhotas, *p<0,05.

As imagens das ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD evidenciaram um índice de apoptose maior (coloração verde predominante) que as ilhotas expostas a AlbCTR após 72 h de exposição (Figura 21).

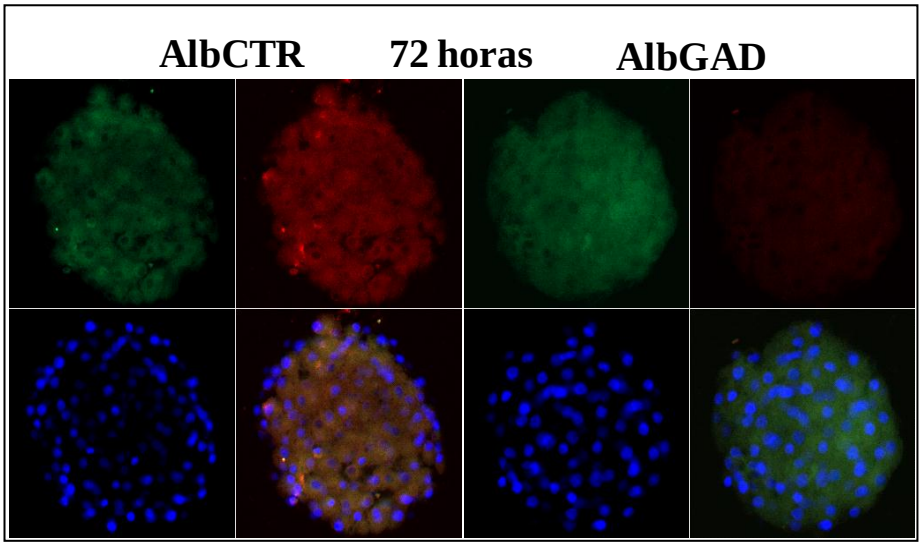


Figura 21: Imagens representativas do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou a albumina controle (AlbCTR) após 72 h de cultivo. No sentido horário: células apoptóticas (filtro para visualização de fluorescência verde [527 nm]), células não apoptóticas (filtro para visualização de fluorescência vermelha [590 nm]), imagens sobrepostas e núcleo corado com DAP.

4.3.4 Tempo de exposição de 96 horas

Após 96 horas, observou-se um aumento no índice de apoptose de ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD em relação às ilhotas expostas a AlbCTR, entretanto não houve diferença no índice de apoptose de ilhotas tratadas com 2 mg/mL de AlbGAD em relação às ilhotas expostas a AlbCTR (Figura 22).

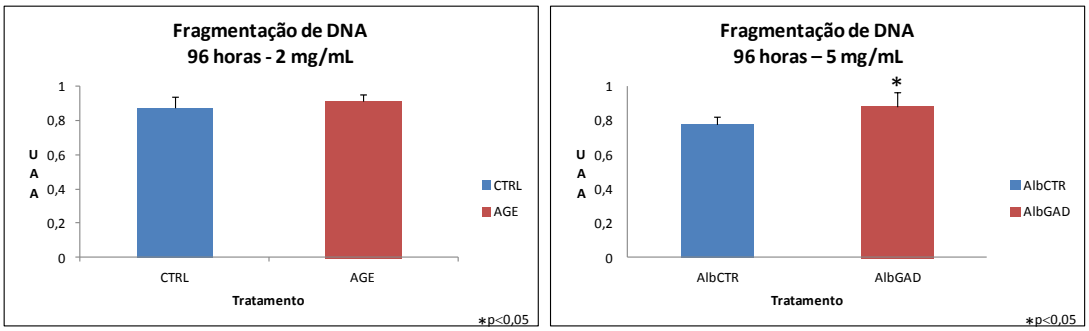


Figura 22: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 96 horas de cultivo. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05.

As imagens das ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD evidenciaram um índice de apoptose maior (coloração verde predominante) que as ilhotas expostas a AlbCTR após 96 h de exposição (Figura 23).

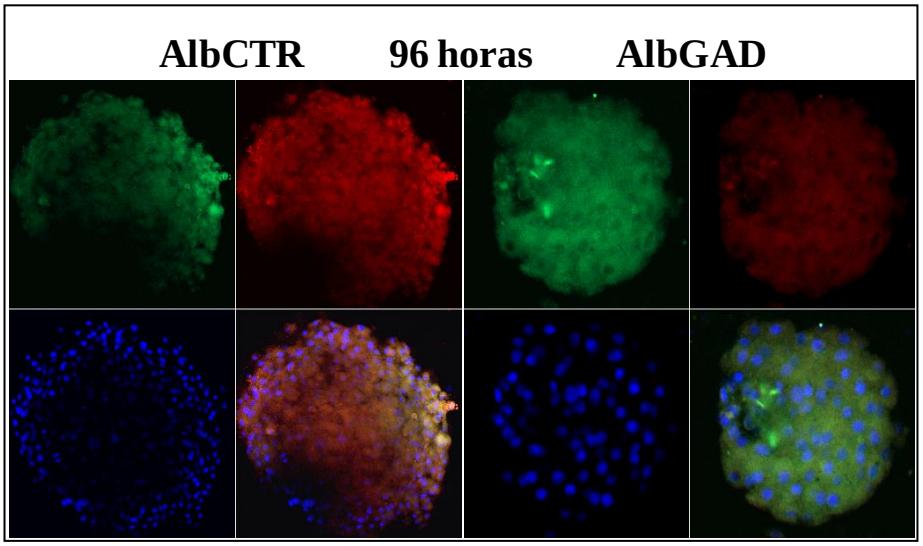


Figura 23: Imagens representativas do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 96 h de cultivo. No sentido horário: células apoptóticas (filtro para visualização de fluorescência verde [527 nm]),células não apoptóticas (filtro para visualização de fluorescência vermelha [590 nm]), imagens sobrepostas e núcleo corado com DAP.

4.3.5 Tempo de exposição de 120 horas

Observou-se um aumento no índice de apoptose de ilhotas expostas a 2 mg/mL e a 5 mg/mL de AlbGAD em relação às ilhotas expostas a AlbCTR (Figura 24).

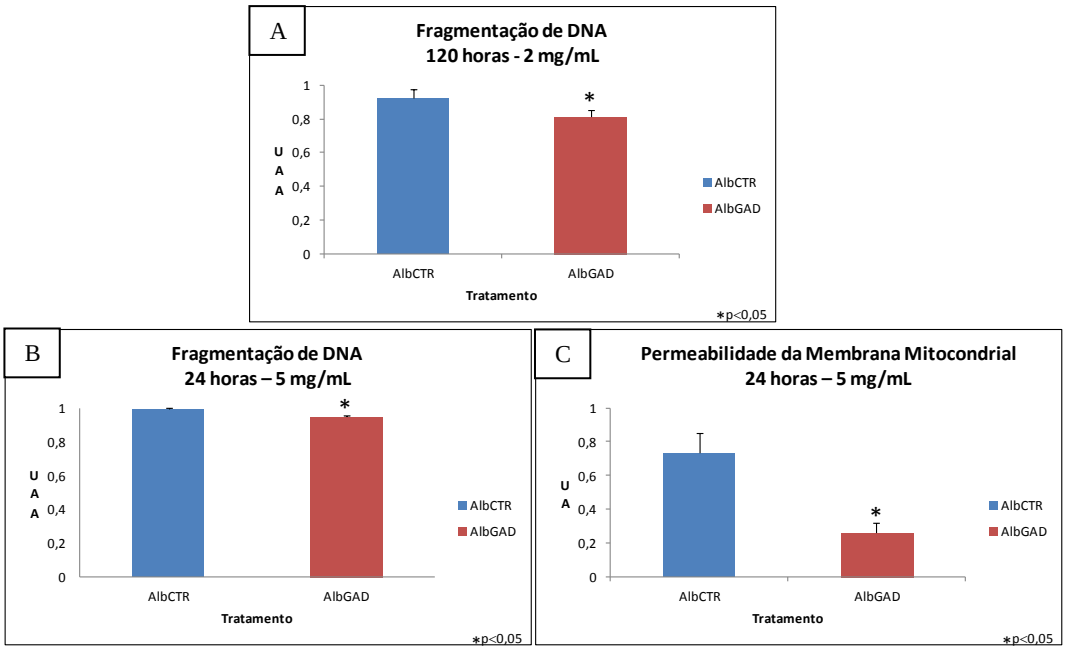


Figura 24: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 2 mg/mL e 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 120 horas de cultivo. A e B: Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6),C:aproximadamente 100 ilhotas, *p<0,05.

As imagens das ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD evidenciaram um índice de apoptose maior (coloração verde predominante) que as ilhotas expostas a AlbCTR após 120 h de exposição (Figura 25).

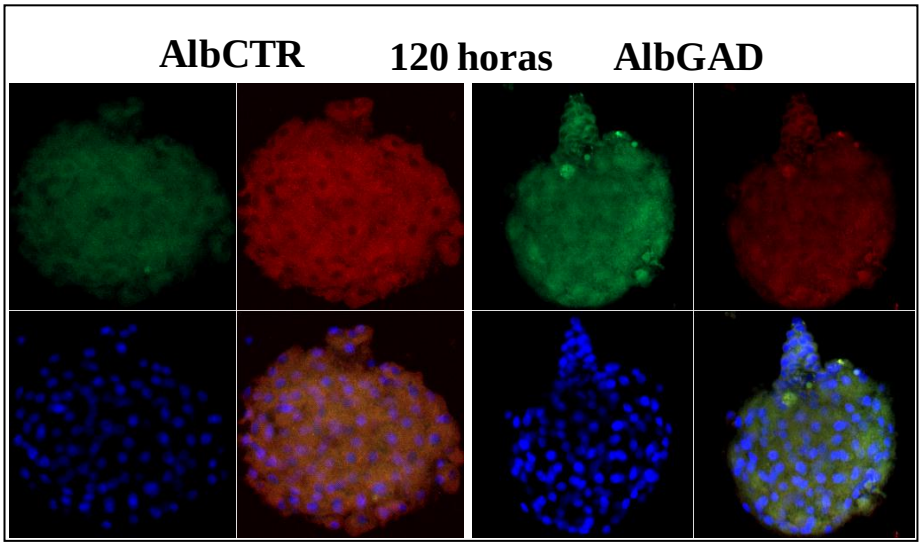


Figura 24: Imagens representativas do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) tratadas com 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou com albumina controle (AlbCTR) após 120 h de cultivo. No sentido horário: células apoptóticas (filtro para visualização de fluorescência verde [527 nm]), células não apoptóticas (filtro para visualização de fluorescência vermelha [590 nm]), imagens sobrepostas e núcleo corado com DAP.

4.4 Avaliação da geração de ROS por ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD por 24 e 48 horas

4.4.1 Tempo de exposição de 24 horas

As ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD apresentaram uma menor geração de ROS que as ilhotas expostas aAlbCTR após 24 h de cultivo (Figura 26).

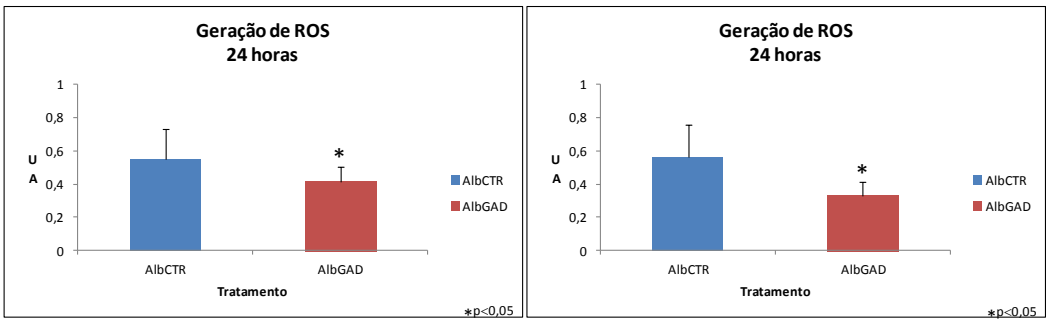


Figura 26: Gráficos representativos dageração de espécies reativas de oxigênio (ROS)em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 24 horas de cultivo. Aproximadamente 100 ilhotas, (*p<0,05).

4.4.2 Tempo de exposição de 48 horas

As ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD apresentaram uma maior geração de ROS que as ilhotas tratadas com AlbCTR após 48 h de cultivo (Figura 27).

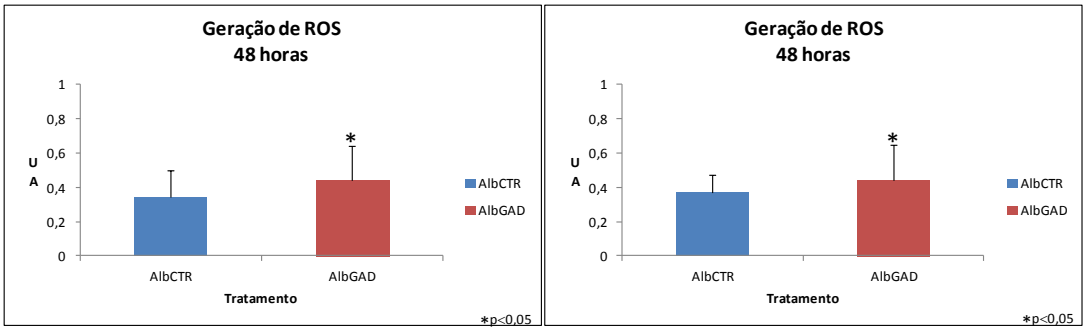


Figura 27: Gráficos representativos dageração de espécies reativas de oxigênio (ROS)em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albuminacontrole (AlbCTR) após 48 horas de cultivo. Aproximadamente 100 ilhotas, *p<0,05.

4.5 Atividade da NADPH oxidase em ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD

Os resultados demonstrados na Figura 28 evidenciam que a produção de superóxido das ilhotas tratadas com AlbCTR ou AlbGAD ocorre por ativação da via NADPH oxidase, pois houve um redução na produção de superóxido quando as ilhotas foram incubadas com o DPI, um inibidor da via NADPH oxidase, o que não aconteceu quando as ilhotas foram incubadas com a rotenona, um inibidor da via mitocondrial.

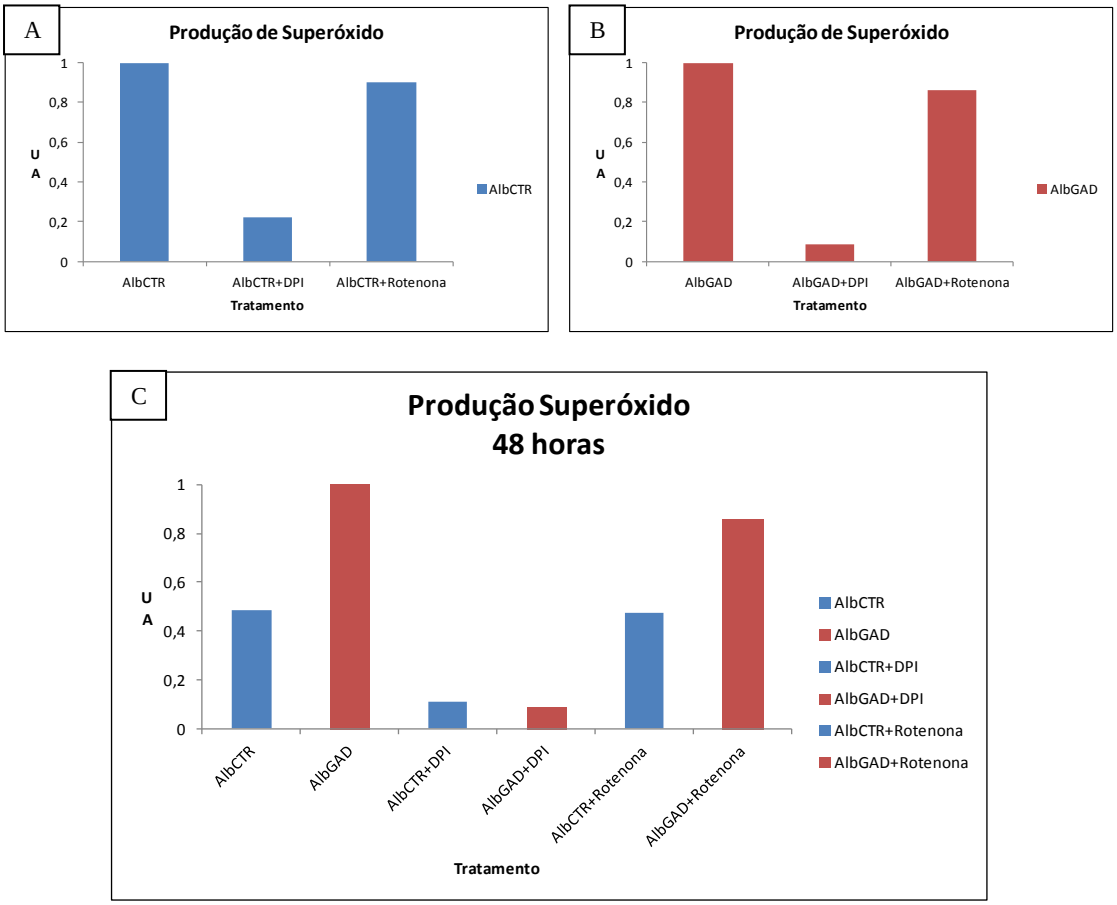


Figura 28: Gráficos representativos da produção de superóxido por ilhotas expostas a albumina GAD (AlbGAD) ou a albumina controle (AlbCTR) incubadas ou não com DPI ou com rotenona durante 48 horas em um mesmo experimento. A: gráfico representativo das ilhotas tratadas com AlbCTR, B: gráfico representativo das ilhotas tratadas com AlbGAD e C: gráfico representativo das ilhotas tratadas com AlbCTR e AlbGAD.

4.5.1 Tempo de exposição de 24 horas

No período de 24 h não houve diferença na atividade da NADH oxidase em ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD em relação às ilhotas expostas a AlbCTR. (Figura 29).

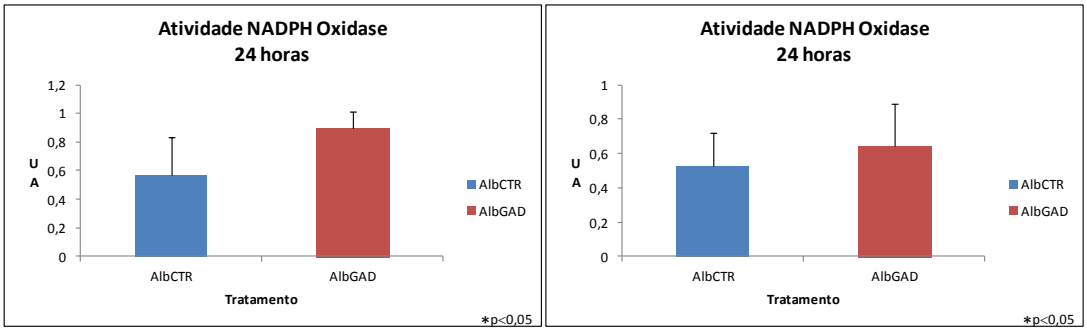


Figura 29: Gráficos representativos da atividade da NADPH oxidase emilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 24 horas de cultivo. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05.

4.5.2 Tempo de exposição de 48 horas

As ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD apresentaram uma atividade da NADPH oxidase maior que as ilhotas expostas a AlbCTR após 48 h de exposição (Figura 30).

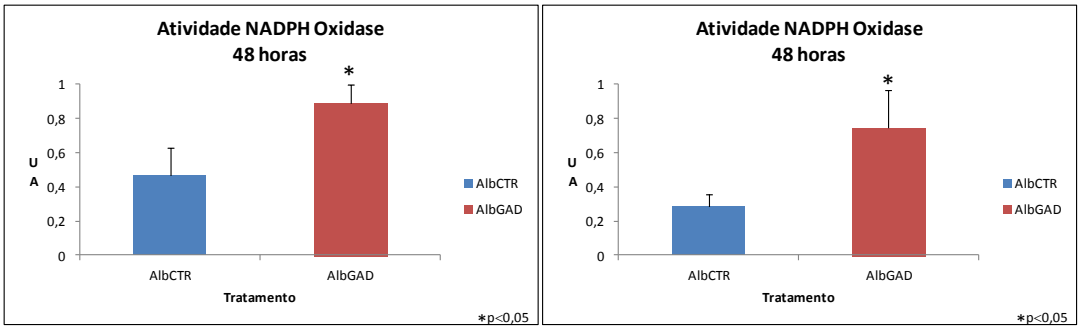


Figura 30: Gráficos representativos da atividade da NADPH oxidase de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 48 horas de cultivo. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05.

4.5.3 Tempo de exposição de 72 horas

As ilhotas expostas a 5 mg/mL de AlbGAD apresentaram uma atividade da NADPH oxidase maior que as ilhotas expostas aAlbCTR após 72 h de exposição (Figura 31).

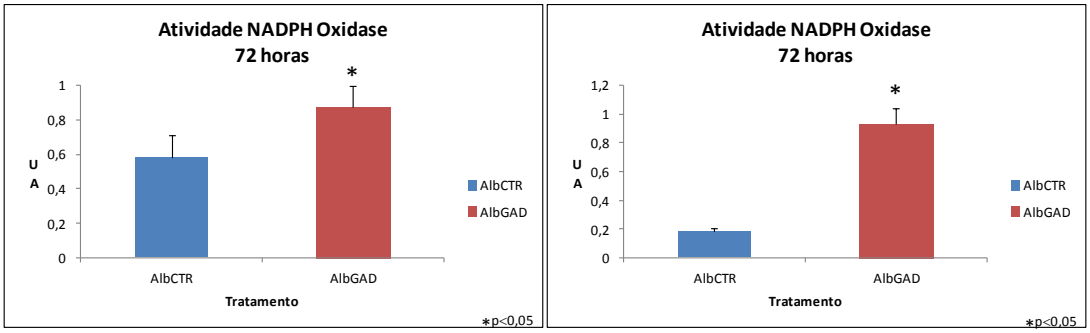


Figura 31: Gráficos representativos da atividade da NADPH oxidase de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) após 72 horas de cultivo. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05.
]

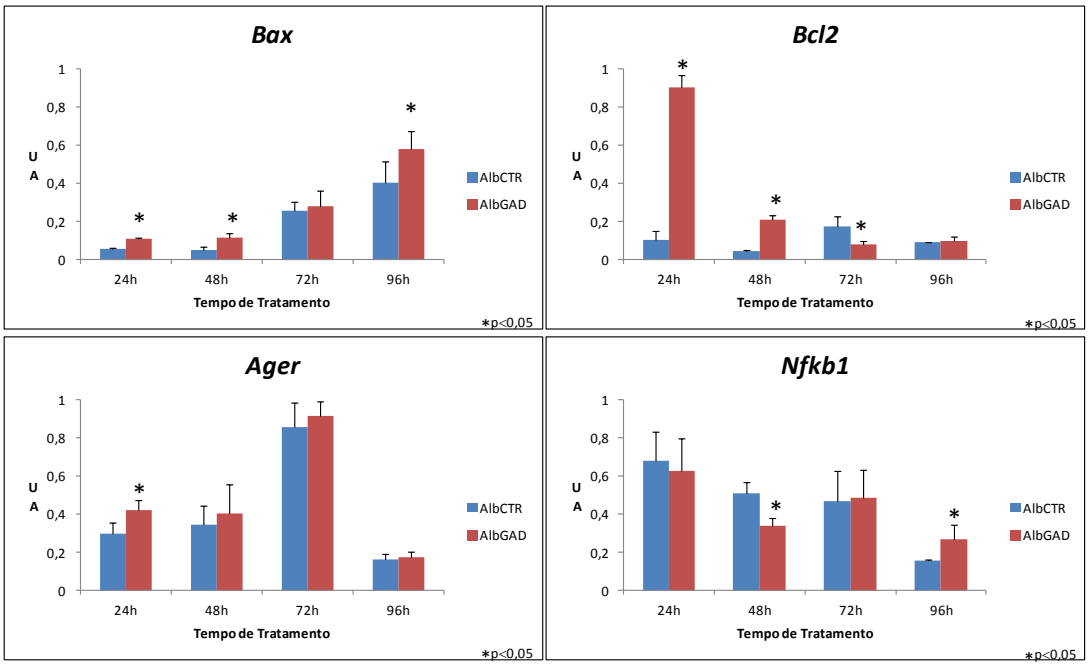
4.6 Avaliação da expressão dos genes *Bax, Bcl2, Ager* e *Nfkb.*

Os resultados de dois experimentos independentes para avaliar a expressão dos genes *Bax, Bcl2, Ager* e *Nfkb1* estão demonstrados nas Figuras 32.

Houve um aumento da expressão do gene anti-apoptótico *Bcl2* nas ilhotas tratadas com AlbGAD nos tempos de 24 e 48 h, diminuição da expressão nas ilhotas tratadas com AlbGAD por 72 ou 96 h e o aumento da expressão do gene pró-apoptótico *Bax* nas ilhotas tratadas com AlbGAD por 24, 48 e 96 h. A expressão do gene *Ager* aumentou nas ilhotas tratadas com AlbGAD após 24 horas de exposição nos dois experimentos independentes e diminuiu em 96 h em apenas um dos experimentos. A expressão do gene *Nfkb1* diminuiu nas ilhotas tratadas com AlbGAD em 48 h ou 24 h e aumentou nas ilhotas tratadas com AlbGAD em 96 horas nos dois experimentos.

A figura 33 demonstra a relação *Bax*/*Bcl2*, que determina a susceptibilidade da célula entrar em apoptose.[64] A relação *Bax/Bcl2* evidencia que o próprio cultivo das ilhotas (na situação controle) modula a expressão do mRNA do gene pró-apoptótico *Bax* ao longo do tempo. As ilhotas tratadas com AlbGAD por 24 e 48 h possuem uma menor relação *Bax*/*Bcl2*, em relação às células tratadas com AlbGAD por 72 e 96 h.

A



B

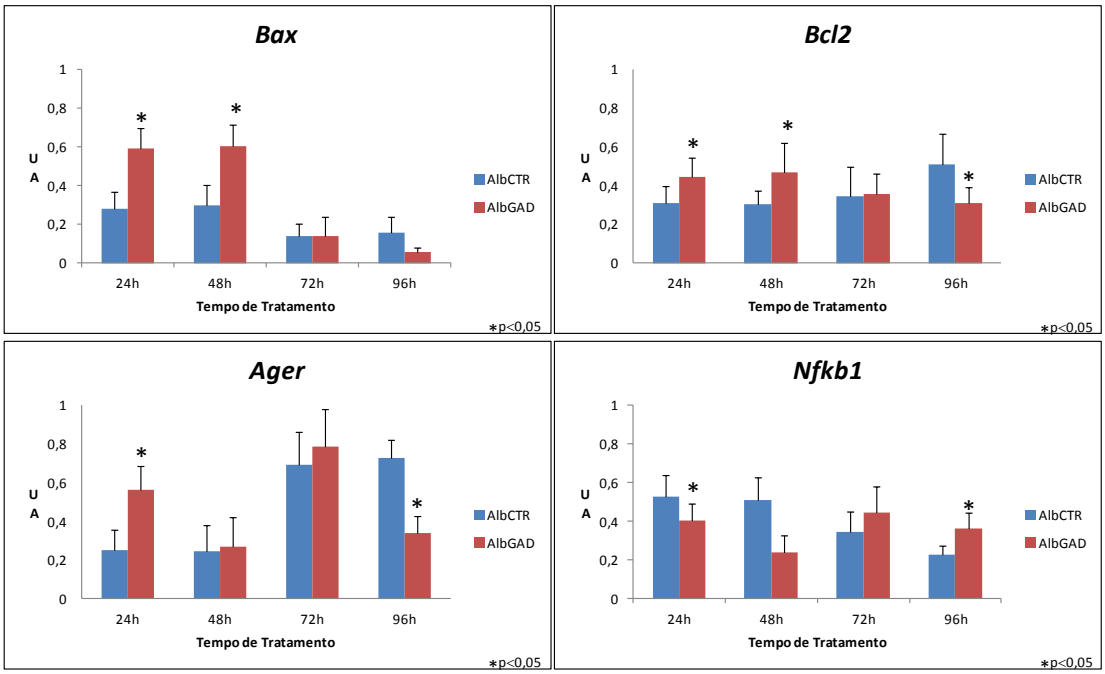


Figura 32: Gráficos representativos da expressão do mRNA do gene pró-apoptótico *Bax*,do gene anti-apoptótico *Bcl2*, do gene *Ager* (codifica o RAGE)e do gene *Nfkb1*em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD) ou de albumina controle (AlbCTR) durante 24, 48, 72 e 96 horas. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05.

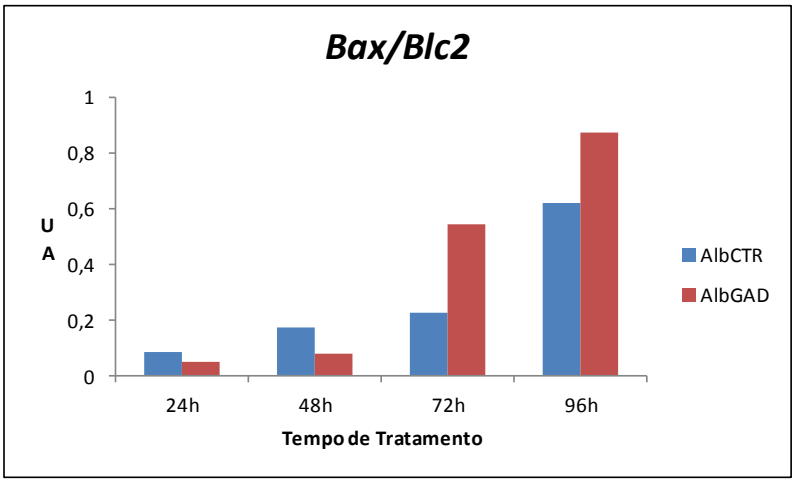


Figura 33: Gráficos representativos da relação do mRNA dos genes *Bax*/*Bcl2* em ilhotas expostas a albumina GAD (AlbGAD) ou a albumina controle (AlbCTR) durante 24, 48, 72 e 96 horas.

4.7 Ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD tratadas com 350 µM de benfotiamina por 72horas

4.7.1 Avaliação do índice de apoptose

Observou-se uma diminuição no índice de apoptose das ilhotas expostas a AlbGAD tratadas com benfotiamina em relação às ilhotas não tratadas no período de 72 h (Figuras 34 e 35) nas duas metodologias avaliadas.

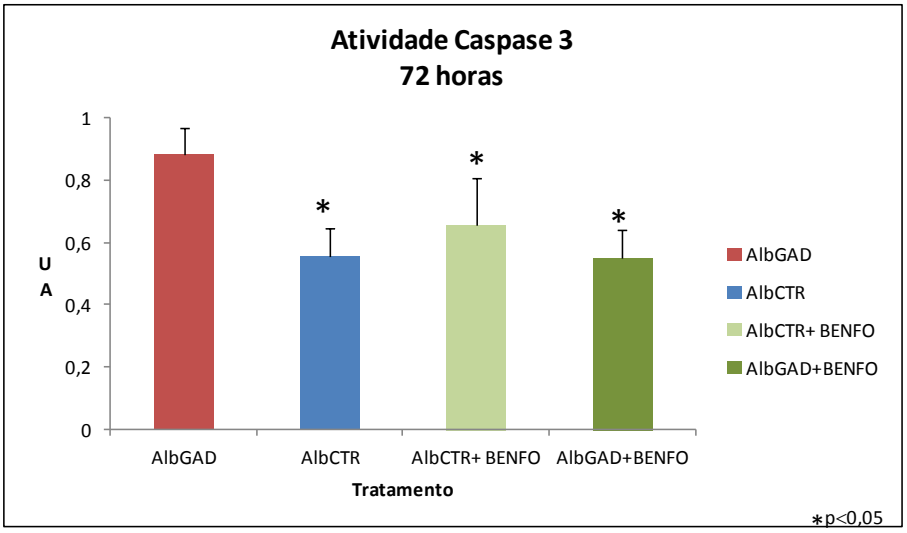


Figura 34: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5mg/mL de albumina GAD (AlbGAD), de albumina controle (AlbCTR), de albumina controle mais 350 µM de benfotiamina (AlbCTR+BENFO) ou de albumina GAD mais 350 µM de benfotiamina (AlbGAD+BENFO) por 72 horas. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05 em relação a AlbGAD.

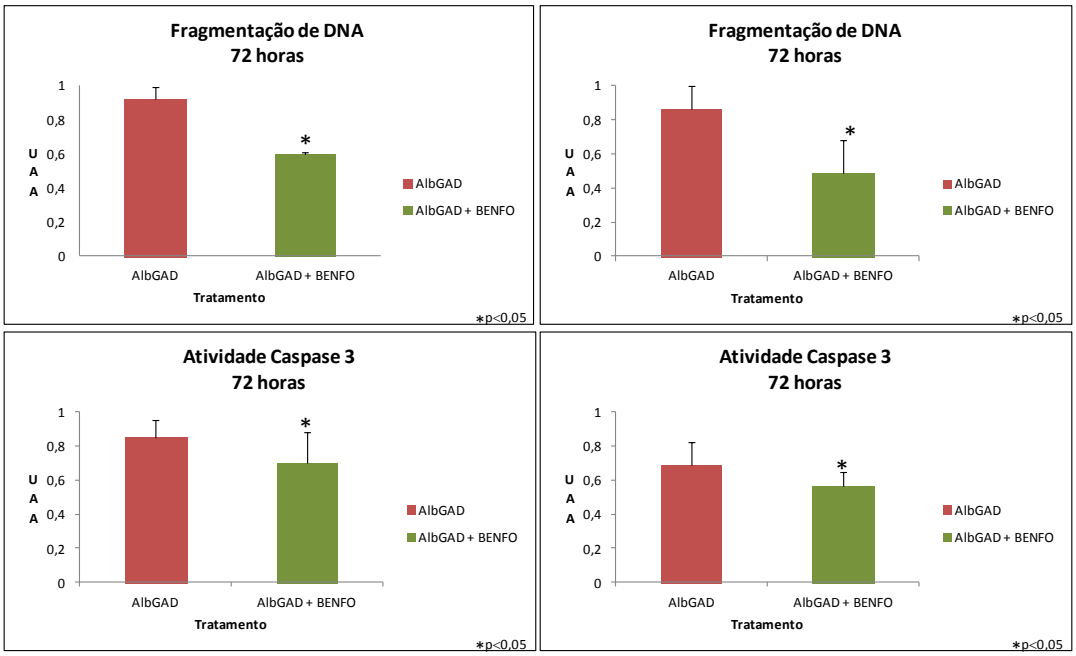


Figura 35: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5mg/mL de albumina GAD tratadas com benfotiamina 350 μM (AlbGAD+BENFO) em comparação a ilhotas não tratadas (AlbGAD) por 72 horas. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05.

4.7.2 Avaliação da geração de ROS

Observou-se uma diminuição na geração de ROS em ilhotas expostas a AlbGAD tratadas com benfotiamina em relação às ilhotas não tratadas no período de 72 h. (Figuras 36 e 37)

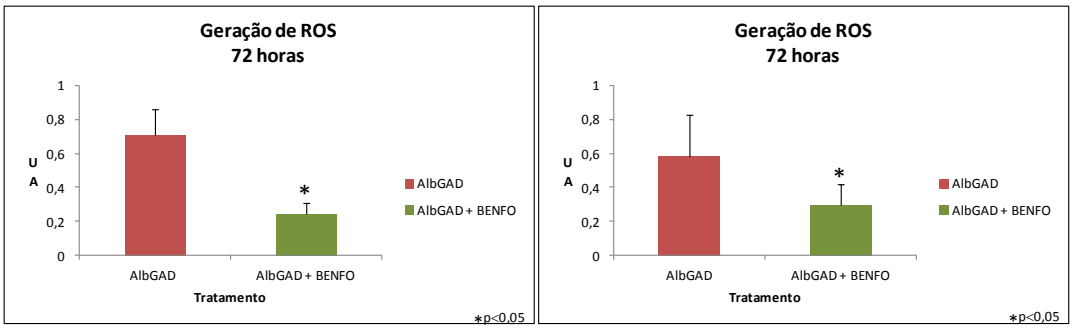


Figura 36: Gráficos representativos da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) e expostas a 5mg/mL de albumina GAD tratadas com benfotiamina 350 μM (AlbGAD+BENFO) em comparação a ilhotas não tratadas (AlbGAD) por 72 horas. Aproximadamente 100 ilhotas, *p<0,05.

As ilhotas tratadas com benfotiamina por 72 h apresentaram uma redução na produção local de ROS, conforme evidenciado pela menor intensidade de fluorescência verde em comparação às ilhotas expostas apenas a AlbGAD (Figuras 37 e 38).

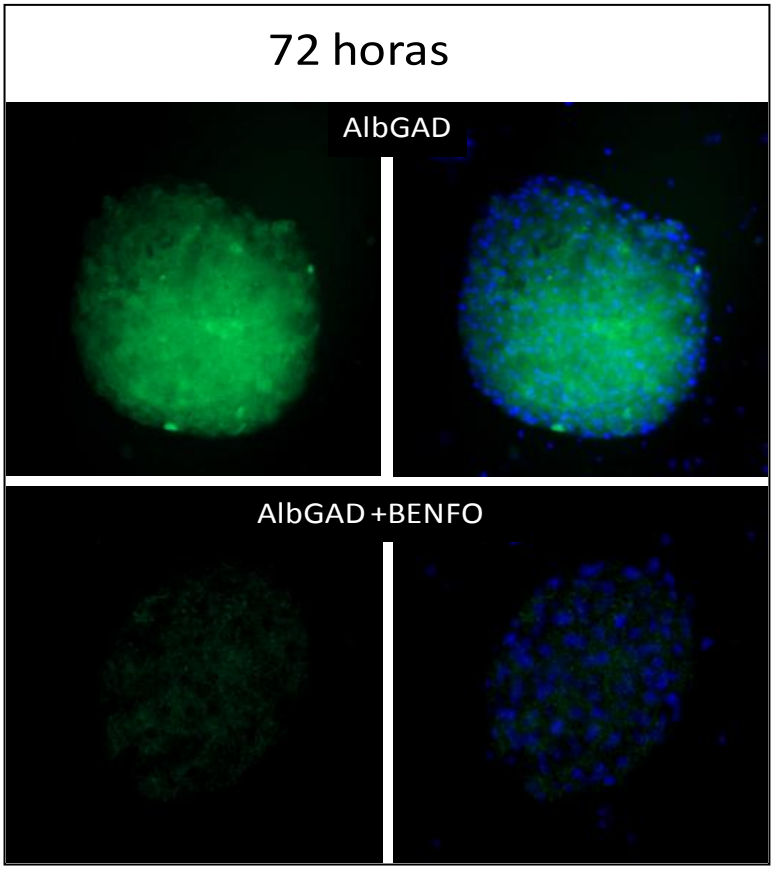


Figura 37: Imagem representativa da produção de espécies reativas de oxigênio em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) e expostas a 5mg/mL de albumina GAD tratadas com benfotiamina 350 μM (AlbGAD+BENFO) em comparação a ilhotas não tratadas (AlbGAD) por 72 horas.

4.7.3 Avaliação da atividade da NADPH oxidase

Observou-se uma diminuição na atividade da NADPH oxidase de ilhotas expostas a AlbGAD tratadas com benfotiamina em relação às ilhotas não tratadas (AlbGAD+BENFO) no período de 72 h e um aumento na atividade da NADPH oxidase de ilhotas expostas a AlbGAD em relação a albumina controle (AlbCTR) (Figuras 38).

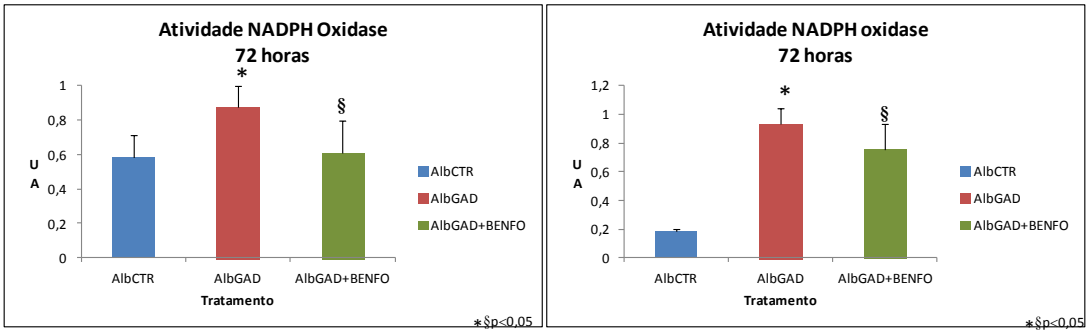
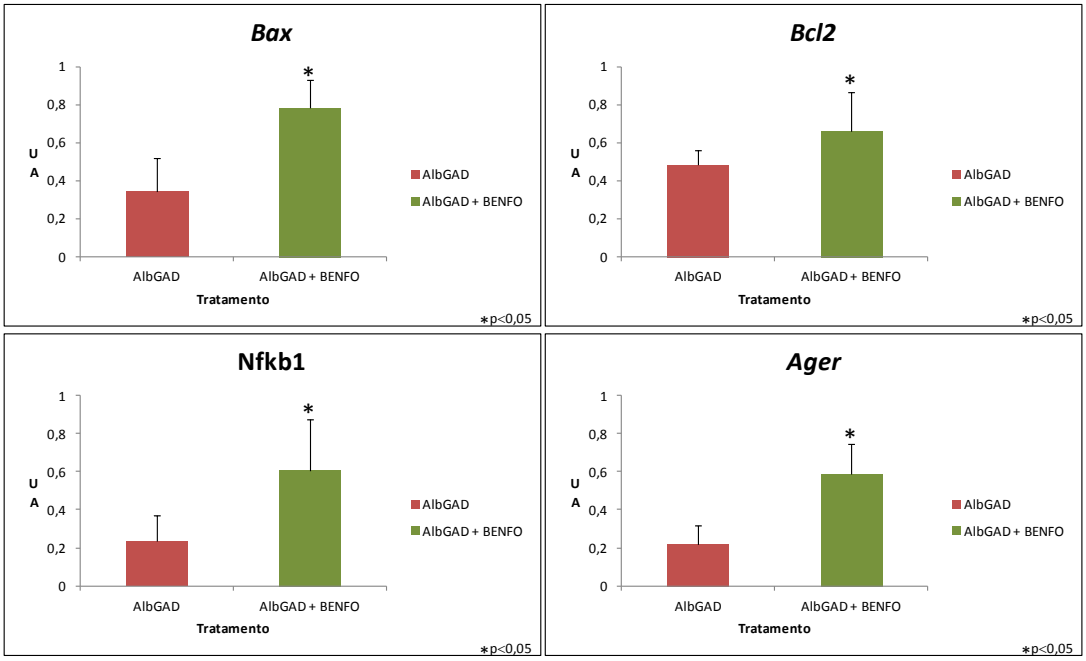


Figura 31: Gráficos representativos da atividade da NADPH oxidase de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD), de albumina controle (AlbCTR) ou de albumina GAD mais 350 μM de benfotiamina (AlbGAD+BENFO) por 72 horas. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05 em relação a AlbCTR; §<0,05 em relação a AlbGAD.

4.7.4 Avaliação da expressão dos genes *Bax, Bcl2, Ager* e *Nfkb1*

Os resultados de dois experimentos independentes que avaliaram a expressão dos genes *Bax*, *Bcl2*, *Ager* e *Nfkb1*em ilhotas expostas a AlbGAD tratadas ou não com benfotiamina durante 72 h estão demonstrados na Figura 39 e 40. Houve um aumento da expressão dos genes *Bax*, *Bcl2*, *Ager* e *Nfkb1* nas ilhotas tratadas com AlbGAD+BENFO em relação a AlbGAD.

A



B

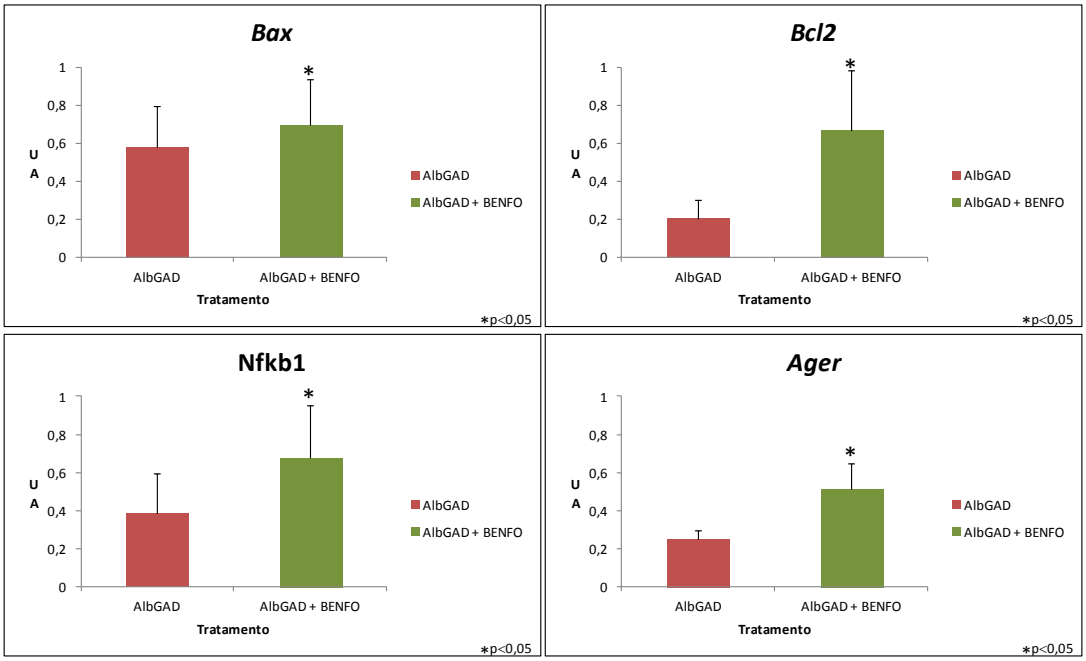


Figura 39: Gráficos representativos da expressão do mRNA do gene pró-apoptótico *Bax*, do gene anti-apoptótico *Bcl2*, do gene *Ager* (codifica o RAGE)e do gene *Nfkb1*em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) e expostas a 5mg/mL de albumina GAD tratadas com benfotiamina 350 μM (AlbGAD+BENFO) em comparação a ilhotas não tratadas (AlbGAD) por 72 horas. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05.

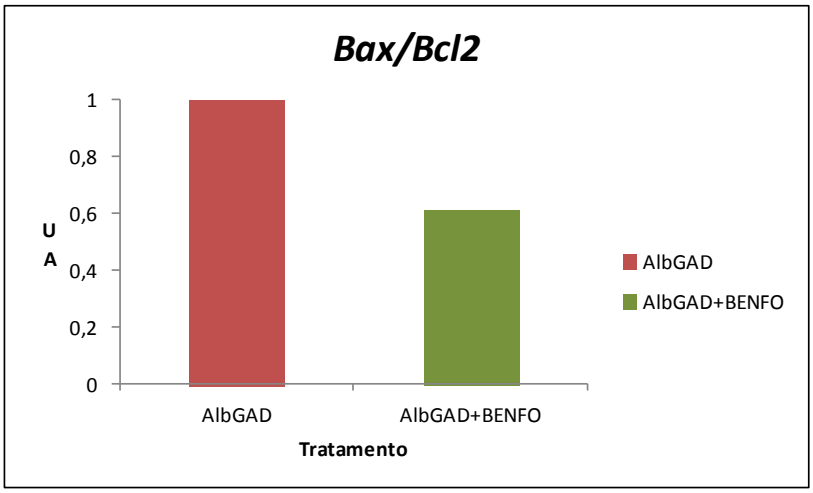


Figura 40: Gráficos representativos da relação do mRNA dos genes *Bax*/*Bcl2* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) e expostas a 5mg/mL de albumina GAD tratadas com benfotiamina 350 μM (AlbGAD+BENFO) em comparação a ilhotas não tratadas (AlbGAD) por 72 horas.

4.8 Ilhotas pancreáticas expostas a AlbGAD tratadas com 1 µM de Mito Q por 72horas

4.8.1 Avaliação do índice de apoptose

Observou-se uma diminuição no índice de apoptose celular em ilhotas expostas a AlbGAD tratadas com Mito Q em relação às ilhotas não tratadas no período de 72 h (Figuras 41 e 42) nas duas metodologias avaliadas.

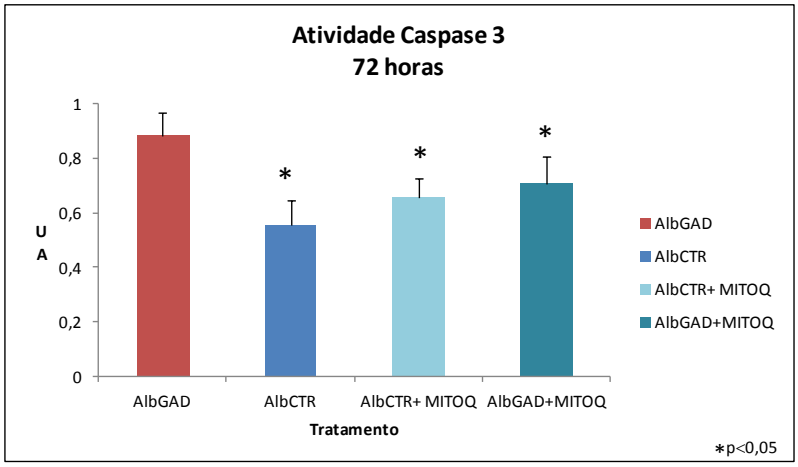


Figura 41: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5mg/mL de albumina GAD (AlbGAD), de albumina controle (AlbCTR), de albumina controle mais Mito Q 1µM) (AlbCTR+MITOQ) ou de albumina GAD mais Mito Q 1µM (AlbGAD+MITOQ) por 72 horas. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05 em relação a AlbGAD.

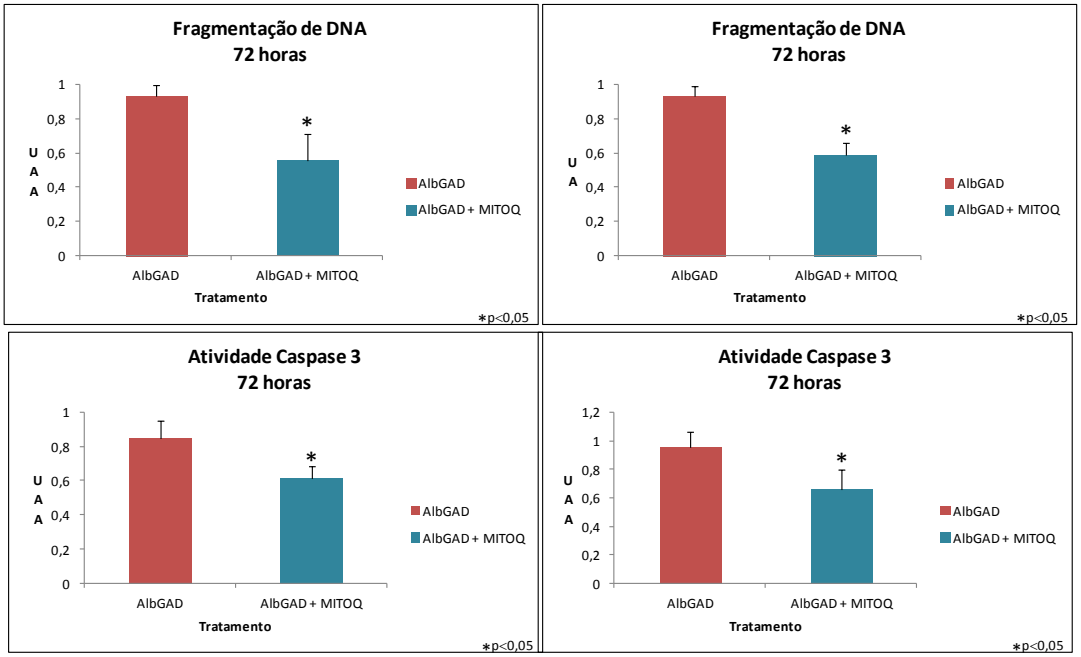


Figura 42: Gráficos representativos do índice de apoptose de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) e expostas a 5mg/mL de albumina GAD tratadas com Mito Q 1μM (AlbGAD+MITOQ) em comparação a ilhotas não tratadas (AlbGAD) por 72 horas. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05.

4.8.2 Avaliação da geração de ROS

Observou-se uma diminuição na produção de ROS em ilhotas expostas a AlbGAD tratadas com Mito Q em relação às ilhotas não tratadas no período de 72 h. (Figuras 43 e 44)

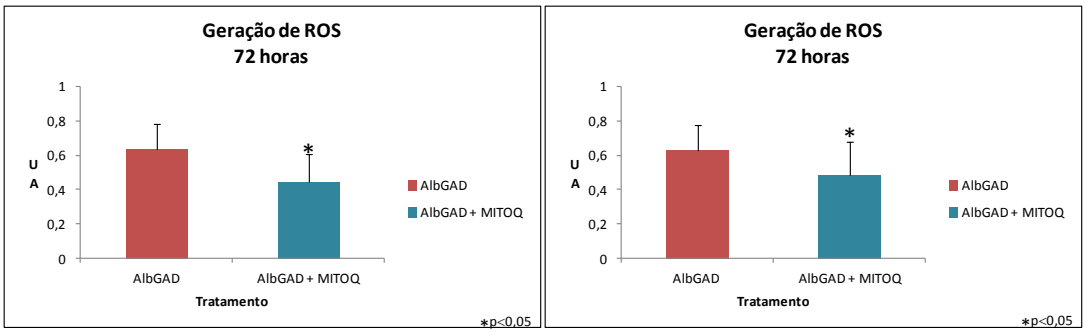


Figura 43: Gráficos representativos da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) e expostas a 5 mg/mL de albumina GAD tratadas com Mito Q 1µM (AlbGAD+MITOQ) em comparação a ilhotas não tratadas (AlbGAD) por 72 horas. Aproximadamente 100 ilhotas, *p<0,05.

As ilhotas tratadas com MitoQ por 72 h apresentaram uma redução na produção local de ROS, conforme evidenciado pela menor intensidade de fluorescência verde em comparação à ilhota exposta apenas a AlbGAD (Figuras 43).

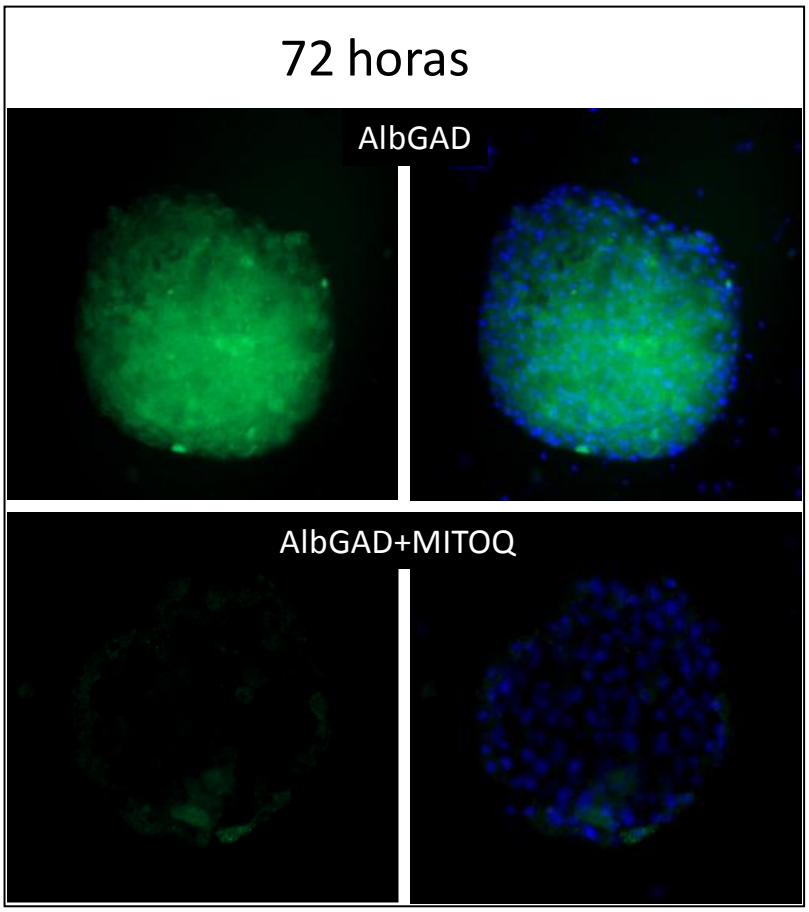


Figura 44: Imagem representativa da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) e expostas a 5mg/mL de albumina GAD tratadas com Mito Q 1 μM (AlbGAD+MITOQ) em comparação a ilhotas não tratadas (AlbGAD) por 72 horas.

4.8.3 Avaliação da atividade da NADPH oxidase

Observou-se uma diminuição na atividade da NADPH oxidase de ilhotas expostas a AlbGAD tratadas com Mito Q em relação às ilhotas não tratadas (AlbGAD+MITOQ) no período de 72 h e um aumento na atividade da NADPH oxidase de ilhotas expostas a AlbGAD em relação a albumina controle (AlbCTR) (Figuras 45).

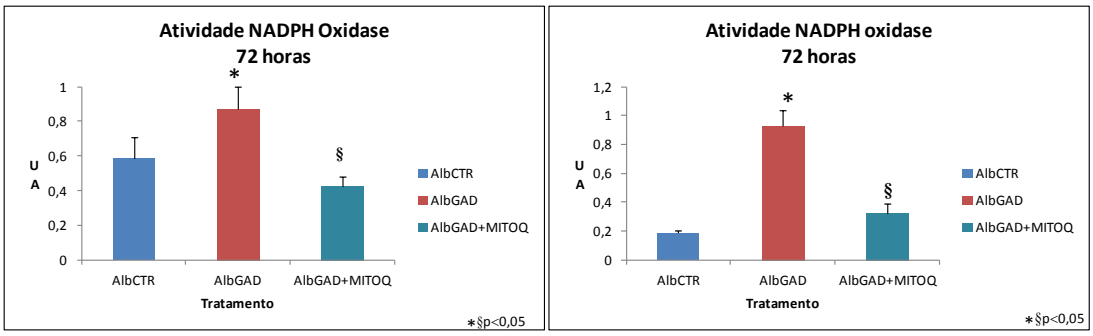
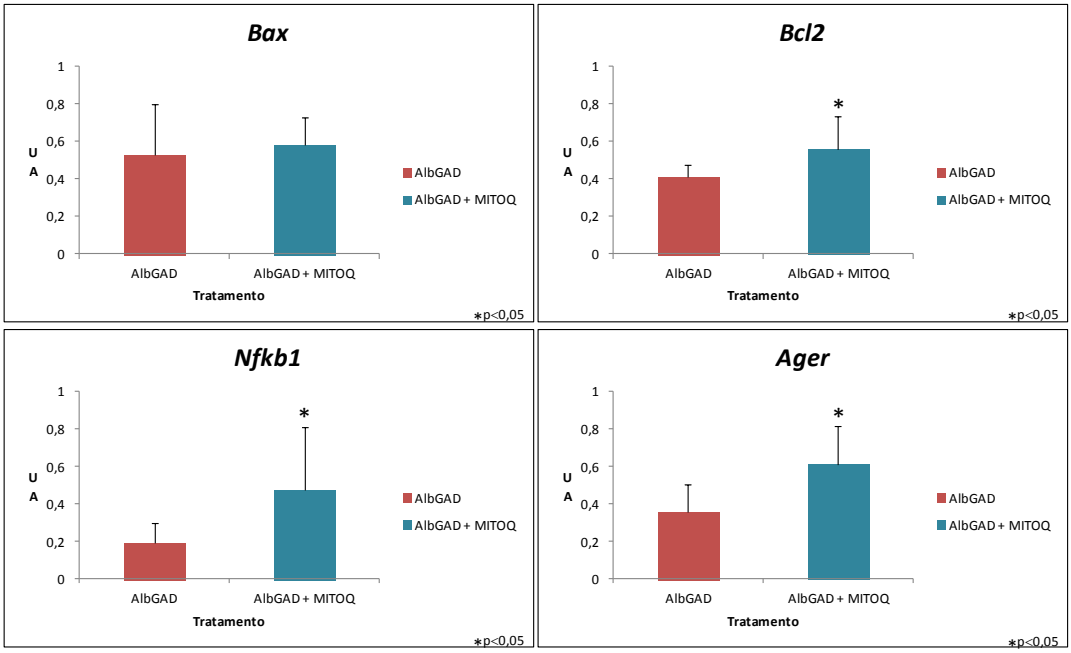


Figura 45: Gráficos representativos da atividade da NADPH oxidase de ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) expostas a 5 mg/mL de albumina GAD (AlbGAD), de albumina controle (AlbCTR) ou de albumina GAD mais 1 μM de Mito Q (AlbGAD+MITOQ) por 72 horas. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05 em relação a AlbCTR; §<0,05 em relação a AlbGAD.

4.8.4 Avaliação da expressão dos genes *Bax, Bcl2, Ager* e *Nfkb1*

Os resultados de dois experimentos independentes para a avaliação da expressão dos genes *Bax*, *Bcl2*, *Ager* e *Nfkb1* estão demonstrados na Figuras 46 e 47. Houve um aumento da expressão dos genes *Bcl2*, *Ager* e *Nfkb1* nas ilhotas tratadas com AlbGAD+MITOQ em relação a AlbGAD.

A



B

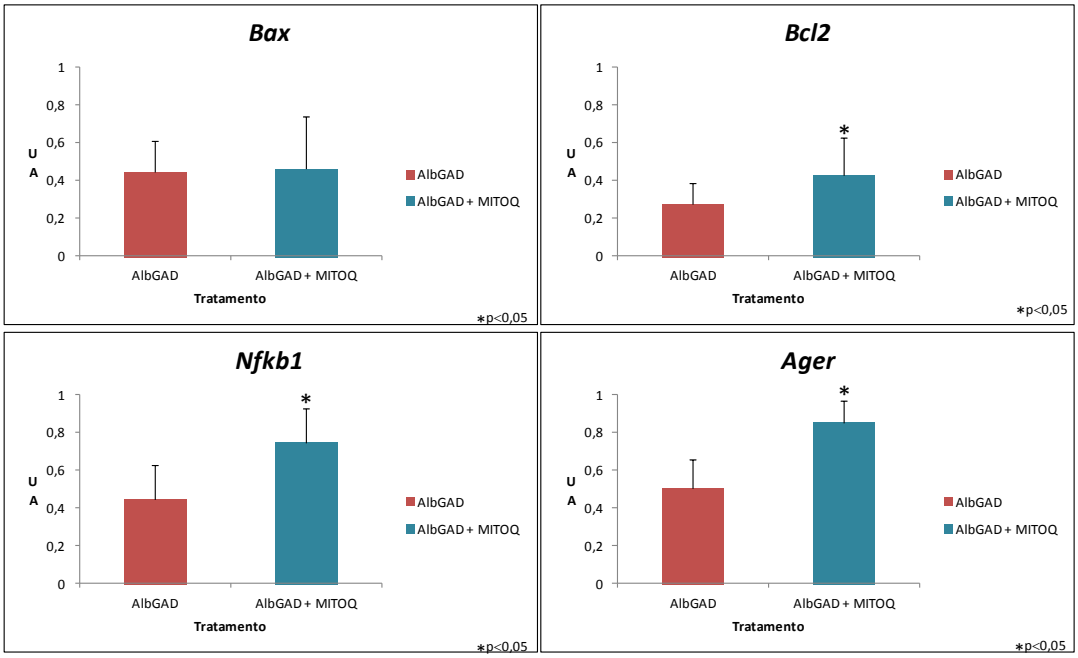


Figura 46: Gráficos representativos da expressão do mRNA do gene pró-apoptótico *Bax*,do gene anti-apoptótico *Bcl2*, do gene *Ager* (codifica o RAGE) e do gene *Nfkb1*em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) e expostas a 5mg/mL de albumina GAD tratadas com Mito Q1µM (AlbGAD+MITOQ) em comparação a ilhotas não tratadas (AlbGAD) por 72 horas. Triplicatas biológicas realizadas em duplicata (n=6), *p<0,05.

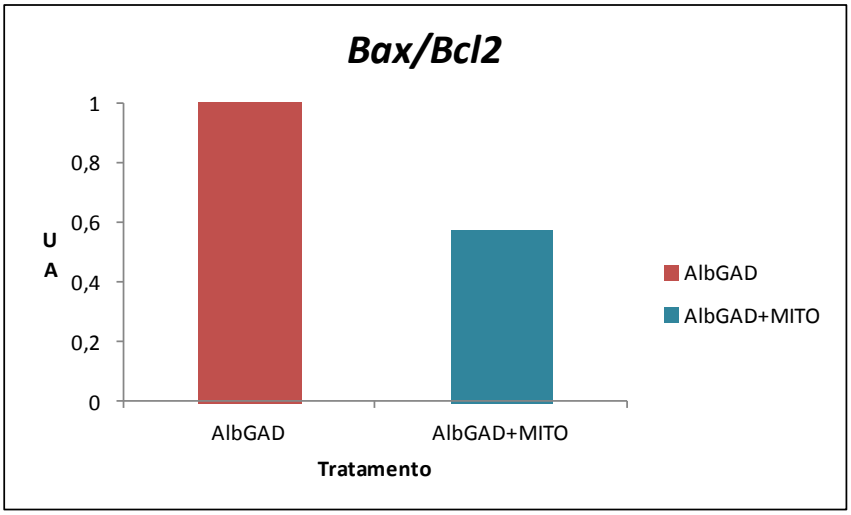


Figura 47: Gráficos representativos da relação do mRNA dos genes *Bax*/*Bcl2* em ilhotas pancreáticas mantidas em concentrações suprafisiológicas de glicose (23 mM) e expostas a 5mg/mL de albumina GAD tratadas com Mito Q 1 μM (AlbGAD+MITOQ) em comparação a ilhotas não tratadas (AlbGAD) por 72 horas.

5. Discussão

Além de interagirem com seu receptor específico RAGE, codificado pelo gene *Ager*, os AGEs interagem com vários outros receptores celulares, tais como lactoferrina, Scarb tipo I e II, oligossacaril transferase - 48 (OST-48), 80K-H fosfoproteina, Galectina-3 e Cd36.[9,10] A ligação dos AGEs com os RAGE desencadeia uma sinalização intracelular que induz a ativação do estresse oxidativo, aumenta a liberação de citocinas inflamatórias e promove um aumento na transcrição do NF-kB, que leva a um quadro de inflamação crônica e consequente aumento de danos celulares e teciduais.[5-7] Estudos em linhagens de células β e em ilhotas pancreáticas demonstraram que os AGEs podem causar diminuição da biossíntese da insulina e estresse oxidativo capaz de desencadear apoptose, contudo, os efeitos dos AGEs sobre a viabilidade de ilhotas pancreáticas não foram extensivamente investigados.

Antes do início dos experimentos com os AGEs, confirmamos a expressão de alguns receptores nas ilhotas pancreáticas de rato, pois até o início de 2008, havíamos encontrado na literatura que o *Cd36* é expresso em ilhotas humanas e na linhagem de células β derivada de camundongos MIN6[65], mas não havíamos encontrado estudos que avaliassem a expressão dos genes *Scarb1*e *Ager* em ilhotas, embora alguns trabalhos contivessem evidências indiretas da expressão de RAGE em ilhotas pancreáticas.[13] A análise por RT-PCR demonstrou a expressão dos genes *Ager*, *Cd36* e *Scarb1* em ilhotas pancreáticas de rato. Um estudo publicado em dezembro de 2008 também confirmou a expressão de RAGE em ilhotas pancreáticas de rato.[66]

Os primeiros experimentos para avaliar a indução de apoptose pelos AGEs foram realizados com o intuito de determinar se haveria diferença na magnitude de indução de apoptose por algum dos compostos disponíveis, quais sejam, AlbGAD, AlbGO ou AlbMGO. Nesta etapa, utilizamos a concentração de 5 mg/mL. Esses experimentos foram realizados nos tempos de cultivo de 48, 72 e 96 horas, com o intuito de mimetizar *in vitro* a cronicidade do estímulo que ocorre nos pacientes diabéticos descompensados *in vivo*. Uma vez que a magnitude de indução de apoptose não diferiu de forma importante entre os compostos testados, optamos por continuar trabalhando apenas com o AlbGAD, ao qual nos referimos como AGE.

Nos primeiros experimentos, nos chamou atenção os resultados obtidos após 48 horas de tratamento com todos os compostos testados, pois, diferentemente do esperado, o tratamento com AGEs determinou uma diminuição do índice de apoptose em relação às ilhotas não tratadas. Como este resultado foi inesperado, repetimos os experimentos com diferentes concentrações de AGEs nos tempos de 24 e 48 h e também utilizamos uma segunda técnica de detecção de apoptose para confirmação dos resultados.

A utilização de 2, 5 e 10 mg/mL de AGEs nas ilhotas tratadas por 48 horas e 5 mg/mL por 24 horas demonstrou que todas as concentrações promoviam proteção contra a apoptose. Não podemos concluir por um efeito dose-dependente, pois não realizamos testes estatísticos entre os diferentes tempos, já que os experimentos para detecção de apoptose foram realizados em dias diferentes. A segunda técnica para detecção de apoptose, que avalia a permeabilidade da membrana mitocondrial, também confirmou o efeito protetor de 5 mg/mL de AGE após 24 e 48 horas de tratamento.

A utilização de 2 e 5 mg/mL de AGE em períodos mais prolongados de exposição demonstraram que a menor dose de AGE somente foi capaz de induzir apoptose após 120 horas de tratamento, enquanto a concentração de 5 mg/mL induziu apoptose após exposição por 72, 96 e 120 horas. O efeito indutor de apoptose de 5 mg/mL de AGE foi confirmado para os tempos 72, 96 e 120 horas com a segunda técnica de detecção de apoptose.

O aumento do índice de apoptose de ilhotas em cultura expostas aos AGEs por períodos prolongados está de acordo com os dados disponíveis na literatura para outros tipos celulares, entretanto, o achado de redução do índice de apoptose observado em ilhotas expostas aos AGEs por 24 e 48 horas foi inesperado. Sabe-se que a interação dos AGEs com o RAGE ativa o NF-kB, um grupo de fatores de transcrição que inclui sete membros, p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50/p105(NF-κB1) e p52/p100 (NF-κB2), que podem formar hetero ou homodímerose estão envolvidos na proliferação, diferenciação celular e apoptose. Em células não estimuladas, os dímeros de NF-kB ficam sequestrados no citoplasma e ligados a proteínas IkB, que impede que os dímeros sejam translocados para o núcleo, mantendo-os, assim, em um estado inativo. Após ativação por diversos estímulos, o NF-kB é liberado, transloca-se para o núcleo e modula a expressão de genes-alvo, dentre os quais genes anti-apoptóticos e pró-apoptóticos, o que sugere que a ação do NF-kB no crescimento celular e na apoptose dependa do tempo de exposição, do tipo celular, da cronicidade e da natureza do estímulo extracelular.[10,67]

Uma função anti-apoptótica do NF-kB já havia sido descrita com base em estudos que demonstraram que células defectivas para NF-kB eram mais sensíveis a sinais pró-apoptóticos que células que expressavam NF-kB.[67-69] Wu e cols.

demonstraram que o NF-kB induz o crescimento ósseo estimulando a condrogênese e prevenindo a apoptose de condrócitos.[67] Levantamos, assim, a hipótese de que em 24 e 48 horas os AGEs poderiam favorecer um perfil anti-apoptótico da ilhota, talvez por meio da ativação do NF-kB. A cronicidade do estímulo, entretanto, favoreceria um perfil pró-apoptótico, explicando os achados em 72, 96 e 120 horas.

Este efeito de proteção contra a apoptose observado em 24 e 48 horas poderia se constituir em uma tentativa de melhorar a viabilidade da ilhota exposta a um ambiente hiperglicêmico, para que essa ilhota seja capaz de melhorar sua capacidade secretória e corrigir a hiperglicemia. Essa compensação, no entanto, não se mantém e a cronicidade do estímulo com AGEs acaba por comprometer a viabilidade da ilhota. Um estudo recentemente publicado tratou células β da linhagem INS-1 com AGEs e demonstrou que o tratamento dessas células por 24 horas induziu apoptose simultaneamente a proliferação. Os autores especularam que a resposta proliferativa poderia ser um mecanismo compensatório contra a toxicidade dos AGEs que, ao final, causariam deterioração das células β, pela sua maior habilidade de induzir apoptose que proliferação.[66]

Os AGEs se ligam ao seu receptor específico RAGE, codificado pelo gene *Ager*. Os RAGEs fazem parte da família de receptores das imunoglobulinas e estes receptores já foram caracterizados em ilhotas pancreáticas de rato. Em 2008, um estudo demonstrou um aumento na expressão do gene *Ager* em ilhotas pancreáticas tratadas com AGE.[66] Nossos resultados estão de acordo com o achado do estudo anteriormente citado, pois houve um aumento na expressão do gene *Ager* nas ilhotas tratadas com AGEs após 24 horas de exposição.

Os genes *Bcl2* e *Bax* estão entre os mais bem caracterizados reguladores da apoptose, 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 índice de expressão de seu mRNA e o índice de expressão deste gene pode ser utilizado como indicador de apoptose, sendo que os níveis relativos de *Bax* e *Bcl2* determinam a susceptibilidade da célula entrar em apoptose.[64,70-72] Nossos resultados evidenciam que o próprio cultivo das ilhotas (na situação controle) modula a expressão do mRNA do gene pró-apoptótico *Bax* ao longo do tempo, já que sua expressão é significantemente maior nos tempos 72 e 96 horas em relação aos tempos 24 e 48 horas (dados não demonstrados). O aumento da expressão do gene anti-apoptótico *Bcl2* nas ilhotas tratadas com AGE nos tempos de 24 e 48 h, a diminuição da expressão nas ilhotas tratadas com AGE por 72 e 96 h e o aumento da expressão do gene pró-apoptótico *Bax* nas ilhotas tratadas com AGE por 96 h vão ao encontro dos resultados obtidos na avaliação do índice de apoptose, sugerindo que nos tempos mais curtos de exposição, os AGEs poderiam favorecer um perfil anti-apoptótico da ilhota e a cronicidade do estímulo, entretanto, favoreceria um perfil pró-apoptótico. Nos tempos de exposição de 24 e 48 horas, também houve um aumento na expressão do gene pró-apoptótico *Bax*, mas a relação *Bax*/*Bcl-2* foi menor nas ilhotas tratadas com AGEs em relação às ilhotas mantidas na condição controle nos tempos 24 e 48 horas, o que também sugere um perfil anti-apoptótico. A expressão do gene *Nfkb1* diminuiu nas ilhotas tratadas com AGEs em 48 h (menor índice de apoptose) e aumentou nas ilhotas tratadas com AGEs em 96 horas(maior índice de apoptose), no entanto, mais importante que avaliar a expressão do mRNA é determinar o que acontece com as proteínas que participam desse sistema, bem como

o que acontece com as proteínas pró- e anti-apoptóticas, o que será realizado oportunamente.

Uma das vias relacionada com a formação de ROS é a Via da NADPH oxidase. A presença de NOX2, o protótipo das NADPH oxidase, já foi caracterizada em ilhotas pancreáticas e, em situações fisiológicas, está associada ao controle da síntese de insulina. A super estimulação da NOX2 em vigência de hiperglicemia desencadeia um aumento da produção de ROS por esse sistema, causando o estresse oxidativo. [24-26]

Após exposição aos AGEs, observamos uma redução na geração de ROS em ilhotas tratadas com AGE por 24 horas e um aumento na geração de ROS e na atividade da NADPH oxidase nas ilhotas tratadas com AGE por 48 e 72 horas em relação às ilhotas controle. Assim, o aumento do estresse oxidativo nas ilhotas tratadas com AGE se inicia em 48 h e a apoptose em 72 h.

A benfotiamina, um derivado lipossolúvel da tiamina, já é utilizada no tratamento sintomático da neuropatia diabética. Sua biodisponibilidade é muito superior à da tiamina e não há questões de segurança relacionadas a sua utilização, pois a partir do momento em que é absorvida, ela se torna hidrossolúvel e seu excesso pode ser excretado.[37] Alguns estudos demonstraram que a benfotiamina possui propriedades anti-oxidantes e é capaz de bloquear as quatro vias implicadas nas complicações crônicas do DM.[2,34,45] Também foi demonstrado que a suplementação com benfotiamina pode restaurar a função fisiológica da transcetolase em diferentes tecidos de animais diabéticos [73] e que ela previne a expressão do NF-kB induzida pela hiperglicemia na retina de ratos diabéticos.[2,3] Estudos recentes

demonstraram, ainda, que a benfotiamina protege contra a disfunção contrátil de células cardíacas de ratos diabéticos.[54]

O desenvolvimento das complicações vasculares e neurológicas no DM está intimamente ligado ao estresse oxidativo. A utilização de um agente que reduza os danos oxidativos na mitocôndria é uma boa estratégia terapêutica na prevenção da morte celular, entretanto, a maior limitação consiste na inabilidade de se aumentar as concentrações de anti-oxidantes na mitocôndria. [56]A cadeia respiratória apresenta um componente anti-oxidante que se localiza dentro do núcleo lipídico da membrana mitocondrial conhecido como co-enzima Q ou ubiquinona. O MitoQ é um análogo da ubiquinona com alvo seletivo para a mitocôndria[57,59] O Mito Q parece possuir efeito protetor em alguns tipos celulares e a sua ação principal pode estar relacionada com a diminuição da peroxidação lipídica. Já se demonstrou um papel protetor do Mito Q sobre células endoteliais, hepatócitos, células nervosas e fibroblastos na Ataxia de Friedrerih.[56,57,60] Não encontramos na literatura estudos que tivessem avaliado o efeito do Mito Q ou da benfotiamina em ilhotas pancreáticas.

A diminuição do índice de apoptose, da geração de ROS e da atividade da NADPH oxidase em ilhotas expostas aos AGEs tratadas com benfotiamina e Mito Q estão de acordo com os resultados encontrados com esses compostos em outros tipos celulares, sugerindo uma ação anti-oxidante destas drogas também em ilhotas pancreáticas de rato tratadas por AGEs.

O aumento da expressão do gene anti-apoptótico *Bcl2* e a redução da relação *Bax/Bcl2* nas ilhotas tratadas com benfotiamina e Mito Q vão ao encontro dos resultados obtidos na avaliação do índice de apoptose. Entretanto, a expressão do gene *Nfkb1* aumentou nas ilhotas tratadas com benfotiamina e Mito Q. Como a

alteração na expressão do mRNA de um gene nem sempre se reflete na alteração da expressão da proteína codificada por ele, não podemos realizar uma análise mais conclusiva em relação ao papel desta proteína sobre o efeito dos compostos estudados sem avaliar a expressão proteica.

A concentração de benfotiamina utilizada de 350 μM é equivalente àquela que seria obtida após a ingestão de uma dose de 780 mg em um indivíduo de 70 kg. Estudos em roedores diabéticos tratados com benfotiamina demonstraram diminuição do aparecimento de nefropatia e retinopatia diabética.[40,42] Os resultados do presente estudo sugerem que a benfotiamina também poderia diminuir a velocidade de perda da massa de células β relacionada à hiperglicemia crônica em pacientes com DM tipo 2 e corrobora a necessidade de realização de estudos clínicos em seres humanos para avaliar o papel da benfotiamina na prevenção das complicações crônicas do DM.

O Mito Q também tem sido usado em estudos em animais para avaliação de seus efeitos sistêmicos após administração prolongada, uma vez que este composto está sendo investigado como uma potencial terapia para seres humanos em doenças nas quais existe a participação de dano oxidativo mitocondrial, tais como doenças neurodegenerativas, lesão de isquemia-reperfusão, síndrome metabólica e DM. [74]Os efeitos anti-apoptóticos sobre as ilhotas podem vir a ser relevantes se realmente se demonstrar a segurança e eficácia antioxidante do Mito Q após administração oral, ou ainda, em situações nas quais o estresse oxidativo colabora para a perda de ilhotas pancreáticas, como no transplante de ilhotas.

6. Conclusão

1. A exposição de ilhotas pancreáticas de rato a albumina modificada por glicação:

- Diminuiu o índice de apoptose e a produção de espécies reativas de oxigênio em 24 e 48 horas,

- Aumenta o índice de apoptose e a produção de espécies reativas de oxigênio em 72 e 96 horas,

2. As espécies reativas de oxigênio geradas após exposição prolongada das ilhotas à albumina modificada por glicação parecem decorrer da ativação da via NADPH oxidase,

3. A benfotiamina e o Mito Q reduzem o índice de apoptose, a geração de espécies reativas de oxigênio e a atividade da NADPH oxidase em ilhotas pancreáticas expostas a albumina modificada por glicação por 72 e 96 horas

7. Referências bibliográficas

1. **Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care.* Jul 1998;21(7):1167-1172.**

2. **Hammes H, Du X, Edelstein D, et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med.* Mar 2003;9(3):294-299.**

3. **Valerio G, Franzese A, Poggi V, Patrini C, Laforenza U, Tenore A. Lipophilic thiamine treatment in long-standing insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* Jun 1999;36(1-2):73-76.**

4. **Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* Dec 2001;414(6865):813-820.**

5. **Lin L. RAGE on the Toll Road? *Cell Mol Immunol.* Oct 2006;3(5):351-358.**

6. **Huebschmann A, Regensteiner J, Vlassara H, Reusch J. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care.* Jun 2006;29(6):1420-1432.**

7. **Wautier JL, Guillausseau PJ. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab.* Nov 2001;27(5 Pt 1):535-542.**

8. **Brownlee M, Aiello L, Friedman E, Vinik A, Nesto R, Boulton A. *Complications of Diabetes Mellitus.* 10 Ed ed. Philadelphia: Saunders2003.**

9. **Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 1994;91(24):11704-11708.**

10. **Ramasamy R, Vannucci S, Yan S, Herold K, Yan S, Schmidt A. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology.* Jul 2005;15(7):16R-28R.**

11. **Chen Y, Yan SS, Colgan J, et al. Blockade of late stages of autoimmune diabetes by inhibition of the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol.* Jul 2004;173(2):1399-1405.**

12. **Kooptiwut S, Kebede M, Zraika S, et al. High glucose-induced impairment in insulin secretion is associated with reduction in islet glucokinase in a mouse model of susceptibility to islet dysfunction. *J Mol Endocrinol.* Aug 2005;35(1):39-48.**

13. **Shanmugam N, Todorov I, Nair I, Omori K, Reddy M, Natarajan R. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic islets treated with high glucose or ligands of the advanced glycation endproduct-specific receptor (AGER), and in islets from diabetic mice. *Diabetologia.* Jan 2006;49(1):100-107.**

14. **Kaneto H, Fujii J, Myint T, et al. Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J.* Dec 1996;320 (Pt 3):855-863.**

15. **Hoidal JR. Reactive oxygen species and cell signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Dec 2001;25(6):661-663.**

16. **Robertson R. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem.* Oct 2004;279(41):42351-42354.**

17. **Bottino R, Balamurugan A, Tse H, et al. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes.* Oct 2004;53(10):2559-2568.**

18. **Donath MY, Størling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T. Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med.* Aug 2003;81(8):455-470.**

19. **Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol.* Oct 2003;66(8):1433-1440.**

20. Fridlyand LE, Philipson LH. Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta-cells? *Diabetes.* Aug 2004;53(8):1942-1948.

21. Tran PO, Parker SM, LeRoy E, et al. Adenoviral overexpression of the glutamylcysteine ligase catalytic subunit protects pancreatic islets against oxidative stress. *J Biol Chem.* Dec 2004;279(52):53988-53993.

22. Kubisch HM, Wang J, Luche R, et al. Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 1994;91(21):9956-9959.

23. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* Jan 2007;87(1):245-313.

24. Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, et al. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. *Diabetologia.* Dec 2009;52(12):2489-2498.

25. Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR, Britto LR, Curi R, Carpinelli AR. Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. *Diabetes.* Jun 2003;52(6):1457-1463.

26. Morgan D, Rebelato E, Abdulkader F, et al. Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Endocrinology.* May 2009;150(5):2197-2201.

27. Warboys CM, Toh HB, Fraser PA. Role of NADPH oxidase in retinal microvascular permeability increase by RAGE activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Mar 2009;50(3):1319-1328.

28. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, et al. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia.* Feb 2007;50(2):359-369.

29. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* Nov 1997;91(4):443-446.

30. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull.* 1997;53(3):491-508.

31. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* Nov 2005;37(11):719-727.

32. Leonardi O, Mints G, Hussain MA. Beta-cell apoptosis in the pathogenesis of human type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* Aug 2003;149(2):99-102.

33. Federici M, Hribal M, Perego L, et al. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes.* Jun 2001;50(6):1290-1301.

34. Thomson, D A, Pratt OE, Watson RR, Watzl B. Interactionof nutrients and alcohol absorption, transport, utilization and metabolism.: Nutritionand Alcohol; 1992:75-99.

35. Loew D. Pharmacokinetics of thiamine derivatives especially of benfotiamine. *Int J Clin Pharmacol Ther.* Feb 1996;34(2):47-50.

36. Bitsch R, Wolf M, Möller J, Heuzeroth L, Grüneklee D. Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamin derivative. *Ann Nutr Metab.* 1991;35(5):292-296.

37. Fujiwara, M, Watanabe H, Matsui K. Allithiamine a newly found derivative of vitamin B1. Discovery of allithiamine. Vol 41: J Biochem; 1954:29-39.

38. Stracke H, Lindemann A, Federlin K. A benfotiamine-vitamin B combination in treatment of diabetic polyneuropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1996;104(4):311-316.

39. Simeonov S, Pavlova M, Mitkov M, Mincheva L, Troev D. Therapeutic efficacy of "Milgamma" in patients with painful diabetic neuropathy. *Folia Med (Plovdiv).* 1997;39(4):5-10.

40. Winkler G, Pál B, Nagybéganyi E, Ory I, Porochnavec M, Kempler P. Effectiveness of different benfotiamine dosage regimens in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Arzneimittelforschung.* Mar 1999;49(3):220-224.

41. Haupt E, Ledermann H, Köpcke W. Benfotiamine in the treatment of diabetic polyneuropathy--a three-week randomized, controlled pilot study (BEDIP study). *Int J Clin Pharmacol Ther.* Feb 2005;43(2):71-77.

42. Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N, Battah S, Thornalley P. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes.* Aug 2003;52(8):2110-2120.

43. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* Jan 2001;15(2):188-200.

44. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* Apr 2000;404(6779):787-790.

45. Berrone E, Beltramo E, Solimine C, Ape A, Porta M. Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *J Biol Chem.* Apr 2006;281(14):9307-9313.

46. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.* Sep 1993;329(14):977-986.

47. Gerber H, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-

kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* Nov 1998;273(46):30336-30343.

48. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher A. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* Jun 1999;399(6736):601-605.

49. Kim I, Kim H, Moon S, et al. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res.* May 2000;86(9):952-959.

50. Ohashi H, Takagi H, Oh H, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity. *Circ Res.* Apr 2004;94(6):785-793.

51. Schmid U, Stopper H, Heidland A, Schupp N. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. *Diabetes Metab Res Rev.*24(5):371-377.

52. Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Different apoptotic responses of human and bovine pericytes to fluctuating glucose levels and protective role of thiamine. *Diabetes Metab Res Rev.* Sep 2009;25(6):566-576.

53. Beltramo E, Nizheradze K, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent apoptosis induced by high glucose-conditioned extracellular matrix in human retinal pericytes. *Diabetes Metab Res Rev.* Oct 2009;25(7):647-656.

54. Ma H, Li S, Xu P, et al. Advanced glycation endproduct (AGE) accumulation and AGE receptor (RAGE) upregulation contribute to the onset of diabetic cardiomyopathy. *J Cell Mol Med.* Oct 2008.

55. Park L, Raman KG, Lee KJ, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med.* Sep 1998;4(9):1025-1031.

56. O'Malley Y, Fink B, Ross N, Prisinzano T, Sivitz W. Reactive oxygen and targeted antioxidant administration in endothelial cell mitochondria. *J Biol Chem.* Dec 2006;281(52):39766-39775.

57. Dhanasekaran A, Kotamraju S, Kalivendi S, et al. Supplementation of endothelial cells with mitochondria-targeted antioxidants inhibit peroxide-induced mitochondrial iron uptake, oxidative damage, and apoptosis. *J Biol Chem.* Sep 2004;279(36):37575-37587.

58. Kalivendi S, Konorev E, Cunningham S, et al. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium. *Biochem J.* Jul 2005;389(Pt 2):527-539.

59. Kelso G, Porteous C, Coulter C, et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem.* Feb 2001;276(7):4588-4596.

60. González-Rubio S, Hidalgo A, Ferrín G, et al. Mitochondrial-driven ubiquinone enhances extracellular calcium-dependent nitric oxide production and reduces glycochenodeoxycholic acid-induced cell death in hepatocytes. *Chem Res Toxicol.* Dec 2009;22(12):1984-1991.

61. Machado AP, Pinto RS, Moysés ZP, Nakandakare ER, Quintão EC, Passarelli M. Aminoguanidine and metformin prevent the reduced rate of HDL-mediated cell cholesterol efflux induced by formation of advanced glycation end products. *Int J Biochem Cell Biol.* Mar 2006;38(3):392-403.

62. Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* May 2001;29(9):e45.

63. Peixoto EB, Pessoa BS, Biswas SK, Lopes de Faria JB. Antioxidant SOD mimetic prevents NADPH oxidase-induced oxidative stress and renal damage in the early stage of experimental diabetes and hypertension. *Am J Nephrol.* 2009;29(4):309-318.

64. Yin X, Oltvai Z, Veis-Novack D, Linette G, Korsmeyer S. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1994;59:387-393.

65. Noushmehr H, D'Amico E, Farilla L, et al. Fatty acid translocase (FAT/CD36) is localized on insulin-containing granules in human pancreatic beta-cells and mediates fatty acid effects on insulin secretion. *Diabetes.* Feb 2005;54(2):472-481.

66. Lim M, Park L, Shin G, Hong H, Kang I, Park Y. Induction of apoptosis of Beta cells of the pancreas by advanced glycation end-products, important mediators of chronic complications of diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* Dec 2008;1150:311-315.

67. Wu S, Flint J, Rezvani G, De Luca F. Nuclear factor-kappaB p65 facilitates longitudinal bone growth by inducing growth plate chondrocyte proliferation and differentiation and by preventing apoptosis. *J Biol Chem.* Nov 2007;282(46):33698-33706.

68. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science.* Nov 1996;274(5288):787-789.

69. Wang C, Mayo M, Baldwin AJ. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science.* Nov 1996;274(5288):784-787.

70. Yin X, Oltvai Z, Korsmeyer S. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature.* May 1994;369(6478):321-323.

71. Zhong L, Sarafian T, Kane D, et al. bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 1993;90(10):4533-4537.

72. Hockenbery D, Oltvai Z, Yin X, Milliman C, Korsmeyer S. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* Oct 1993;75(2):241-251.

73. Beltramo E, Berrone E, Buttiglieri S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. *Diabetes Metab Res Rev.*20(4):330-336.

74. Rodriguez-Cuenca S, Cochemé H, Logan A, et al. Consequences of long-term oral administration of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ to wild-type mice. *Free Radic Biol Med.* Jan 2010;48(1):161-172.