

DANIELA APARECIDA MASCHIO

"POSSÍVEL ATIVAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA WNT/β-CATENINA NO PROCESSO DE HIPERPLASIA COMPENSATÓRIA DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA EM MODELO ANIMAL DE RESISTÊNCIA PERIFÉRICA À INSULINA"

Campinas 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANIELA APARECIDA MASCHIO

"POSSÍVEL ATIVAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA WNT/β-CATENINA NO PROCESSO DE HIPERPLASIA COMPENSATÓRIA DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA EM MODELO ANIMAL DE RESISTÊNCIA PERIFÉRICA À INSULINA"

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida pela candidata

Daniela Aparecida Maschio

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Orientadora: Dra. Carla Beatriz Collares Buzato

Campinas 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

М375р	Maschio, Daniela Aparecida, 1983- Possível ativação da via de sinalização Wnt/β - catenina no processo de hiperplasia compensatória da célula beta pancreática em modelo animal de resistência periférica à insulina / Daniela Aparecida Maschio. – Campinas, SP: [s.n.], 2014.
	Orientador: Carla Beatriz Collares Buzato. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Pré-diabetes. Células beta pancreática. Via Wnt/beta-catenina. Proliferação celular. Collares-Buzato, Carla Beatriz, 1965 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.

Título em outro idioma: Possible activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway in the compensatory hyperplasia of pancreatic beta cell in animal model of peripheral insulin resistance Palavras-chave em Inglês: Prediabetes Pancreatic beta cell Wnt/Beta-catenin pathway Cell proliferation Área de concentração: Biologia Celular Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural Banca examinadora: Carla Beatriz Collares Buzato [Orientador] Eliana Pereira Araújo Lúcia Elvira Álvares Data da defesa: 24-02-2014 Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Banca Examinadora

Campinas, 24 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Carla Beatriz Collares Buzato (Orientadora)

Dra. Eliana Pereira Araújo

Assinatura

Assinatura

Dra. Lúcia Elvira Alvares

Levic Elever Olevan, Assinatura

Dra. Claudia Regina Cavaglieri

Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

Assinatura

Assinatura

RESUMO

Tem havido um grande interesse na determinação das vias envolvidas na proliferação das células beta pancreáticas e a aplicação deste conhecimento em terapias moleculares e celulares da diabetes. Em especial, a via de sinalização da Wnt/β-catenina (ou via Wnt canônica) tem sido pouco investigada no pâncreas endócrino. Em determinados tecidos/órgãos, é sabido que a proteína βcatenina constitui não somente um componente estrutural das junções de adesão, mas também é uma molécula sinalizadora juntamente com a Wnt, participando de vários processos celulares, tais como diferenciação e proliferação. Hiperplasia da célula beta parece ocorrer em certas condições experimentais e *in vivo*, como no estado de resistência periférica à insulina. Entretanto, as vias intracelulares envolvidas nesse processo ainda permanecem desconhecidas. Os objetivos desta Dissertação de Mestrado foram: 1) verificar se as alterações metabólicas induzidas pela exposição à dieta hiperlipídica (DHL) por um curto período de tempo (60 dias) são acompanhadas por alterações morfométricas compensatórias do pâncreas endócrino de camundongos C57BL/6; 2) investigar o possível envolvimento da via de sinalização da Wnt/β-catenina no processo de proliferação da célula beta neste modelo, analisando-se a localização celular (por imunofluorescência indireta), o conteúdo proteico (por immunoblotting) e a expressão gênica (por PCR de Tempo Real ou qPCR) de proteínas associadas à via Wnt/ β -catenina (a saber, β -catenina, Ciclina D1/2, c-Myc, GSK-3 β e Axina2 e, 3) analisar a expressão da proteína β -catenina não fosforilada (forma ativa da via) em ilhotas não hiperplásicas de animais tratados com a DHL por apenas 30 dias. Nossos resultados demonstraram que, após 60 dias de tratamento com DHL, os animais se tornaram obesos e apresentaram acentuadas alterações metabólicas, tais como hiperglicemia em jejum e pós prandial, hiperinsulinemia em jejum e pós-prandial e, ainda, uma significativa resistência periférica à insulina (administrada intraperitonealmente), sendo esses animais, portanto, caracterizados como pré-diabéticos. Este quadro foi acompanhado por um aumento significativo da massa relativa de células beta e do seu número por ilhota, o que indica hiperplasia deste tipo celular no pâncreas endócrino, provavelmente compensatória ao quadro de resistência periférica à insulina apresentado pelos animais do grupo tratado. Como mostrado por *immunoblotting*, houve um aumento significativo na expressão de proteínas ativadoras ou alvo da via, como β -catenina ativada (não fosforilada) e Ciclina D1/2 em ilhotas dos animais pré-diabéticos. Quanto às proteínas Axina2 e GSK-3ß (inibidoras da via), não foi observada alteração significativa na expressão de Axina2, mas supreendemente houve aumento do conteúdo celular de GSK-3β nas ilhotas do grupo pré-diabético. A imunofluorescência para β-catenina ativada mostrou a presença desta proteína tanto na região de contato intercelular como no citoplasma e núcleo das células beta para ambos os grupos. As outras três proteínas relacionadas à via, Ciclina D1/2, GSK-3β e Axina2, por sua vez, apresentaram uma distribuição exclusivamente citoplasmática nas células endócrinas das ilhotas pancreáticas, o que está de acordo com as suas respectivas funções. A análise por qPCR não revelou alteração significativa no conteúdo celular de RNAm de β-catenina, mas uma tendência de aumento na expressão gênica de Ciclina D1 e c-Myc, genes alvo da via, em ilhotas hiperplásicas dos animais pré-diabéticos. Ainda, por *immunoblotting* para β -catenina ativada, não observamos aumento significativo da expressão proteica dessa proteína em ilhotas do grupo tratado com DHL por apenas 30 dias, os quais não desenvolveram hiperplasia do pâncreas endócrino. Em conclusão, nossos dados sugerem que a via Wnt/β-catenina parece estar ativada na pré-diabetes experimental, e provavelmente participa do processo de hiperplasia compensatória das células beta pancreática neste estado metabólico.

ABSTRACT

The role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (as known as the canonical Wnt pathway) in the endocrine pancreas physiology has not been thoroughly explored. In certain tissues/organs, it is known that β -catenin, besides being a structural component of adhesion junctions, participates as a key protein in the Wnt signaling pathway, therefore being involved in crucial cellular processes such as differentiation and proliferation. Beta cell hyperplasia appears to occur under certain experimental conditions, and *in vivo* during the peripheral insulin resistance state. However, the intracellular pathways involved in this process are still unknown. The objectives of this Master's Dissertation were as follows: 1) to investigate whether the metabolic changes induced by exposure of adult male C57BL/6 mice to a high-fat diet (HFD) for a relatively short period of time (30 or 60 days) are accompanied by compensatory morphometric changes of the endocrine pancreas indicative of beta cell hyperplasia; and 2) to study the possible involvement of the pathway Wnt/βcatenin signaling in the process of beta cell proliferation in this animal model. For this, we carried out the analysis of the cellular localization (by indirect immunofluorescence), the protein cell content (by immunoblotting) and the gene expression (by PCR or Real-Time qPCR) of proteins associated to the Wnt/ β -catenin pathway (i.e., β -catenin, Cyclin D1/2, c-Myc, Axin2 and GSK-3 β). Our results showed that, after 60 days of treatment with HFD, the animals became obese, as well as, hyperglycemic, hyperinsulinemic (both at fast and fed states) and resistant to intraperitoneally injected insulin, being therefore characterized as prediabetic. This metabolic condition was accompanied by a significant increase in the relative mass of beta cells and the number of beta cells per islet, which indicates hyperplasia of this pancreatic endocrine cell, probably compensatory to the relatively higher insulin demand presented by the HFD-treated animals. As shown by immunoblotting, there was a significant increase in islet expression of the activator and target proteins, such as the active (unphosphorylated) β -catenin and Cyclin D1/2 in prediabetic animals. Regarding Axina2 and GSK- 3^β proteins (antagonists of the pathway), no changes were observed concerning Axin2 islet content between the experimental groups, but surprisingly there was a significant increase in cellular content of GSK-3 β in islet homogenates from the prediabetic group. The immunofluorescence for active β -catenin showed the presence of this protein at the intercellular contact region as well as within the cytoplasm and nucleus of beta cells in both groups. Meanwhile, Cyclin D1/2, GSK-3β and Axin2 displayed an exclusively cytoplasmic distribution in pancreatic endocrine cells, which is in accordance with their respective functions. The qPCR analysis revealed no significant change in mRNA expression of β -catenin, but a tendency of increase in gene expression of Cyclin D1 and c-Myc, target genes of the pathway, in hyperplastic islets of the prediabetic animals. Additionally, the immunoblotting of active β -catenin in homogenates of nonhyperplastic islets, isolated from mice fed a HFD for only 30 days, showed no significant change in expression this protein as compared to the control group. In conclusion, our data suggest that the Wnt/ β -catenin pathway may be activated during the process of compensatory hyperplasia of the beta cells seen in our animal model of obesity-associated prediabetes.

х

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. O PÂNCREAS ENDÓCRINO	23
1.2. DIABETES E DISFUNÇÃO DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA	25
1.3. VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/β-CATENINA	28
2. OBJETIVOS E RELEVÂNCIA	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. ANIMAIS	34
3.2. DIETA	34
3.3. AVALIAÇÃO METABÓLICA DOS ANIMAIS	35
3.4. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO PÂNCE ENDÓCRINO	EAS 36
3.4.1. Histologia do Pâncreas	36
3.4.2. Morfometria	37
3.5. AVALIAÇÃO DA VIA WNT/β-CATENINA NO PÂNCREAS	38
3.5.1. Imunofluorescência Indireta	38
3.5.2. Western Blot	40
3.5.3. PCR quantitativo (qPCR) em ilhotas pancreáticas isoladas	41
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43

. RESULTADOS	4
4.1. CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DO ANIMAL E MORFOMÉTRICA DO PÂNCREAS ENDÓCRINO) 4
4.2. DISTRIBUIÇÃO E CONTEÚDO CELULAR DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À VIA WNT/β-CATENINA NAS ILHOTAS HIPERPLÁSICAS DOS ANIMAIS PRI DIABÉTICOS	4 É 8
4.3. EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS AGONISTAS DA VIA WNT/β CATENINA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS POR PCR QUANTITATIVO (qPCR) 54	- 6
4.4. MORFOMETRIA E EXPRESSÃO DE β-CATENINA ATIVADA EM ILHOTA PANCREÁTICAS, NÃO HIPERPLÁSICAS, DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A DIETA HIPERLIPÍDICA POR 30 DIAS	S À 9
. DISCUSSÃO6	2
. CONCLUSÕES7	0
. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS7	2
NEXOS	0

"Aprendi que Amores eternos podem acabar em uma noite. Que grandes amigos podem se tornar grandes inimigos. Que o amor sozinho não tem a força que imaginei. Que ouvir os outros é o melhor remédio e o pior veneno. Que a gente nunca conhece uma pessoa de verdade, afinal, gastamos uma vida inteira para conhecer a nós mesmos. Que os poucos amigos que te apoiam na queda, são muito mais fortes do que os muitos que te empurram. Que o "nunca mais" nunca se cumpre, que o "para sempre" sempre acaba. Que minha família com suas mil diferenças, está sempre aqui quando eu preciso. Que ainda não inventaram nada melhor do que colo de Mãe desde que o mundo é mundo. Que vou sempre me surpreender, seja com os outros ou comígo. Que vou cair e levantar milhões de vezes, e aínda não vou ter aprendido TUDO."

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que renova nossas esperanças e nos dá forças para lutar por nossos objetivos.

Aos meus pais, Maria e Osvaldo e minhas irmãs Célia, Rose, Leila e a irmã de coração Karina, dedico e agradeço não só esta dissertação, mas todas as minhas conquistas, sem toda dedicação, amor e carinho, deles recebido, certamente eu não teria chegado até aqui.

À minha orientadora Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato, a quem sou muito grata pela confiança, dedicação e, principalmente, por todos os ensinamentos.

Aos amigos do laboratório, Ricardo, Mariane, Vanessa, Vivi, Carol, Letícia e Mariana (é claro!), agradeço por toda ajuda na bancada, pelo companheirismo e pela amizade.

Aos amigos recém chegados, Leandro, Bárbara, Valquíria e Ricardo2, agradeço todo o apoio nesta reta final e por completarem e divertirem mais o nosso laboratório.

Aos amigos da graduação (Bionot2004), agradeço pela eterna amizade, apesar da distância nunca nos separamos, e por fazer parte desta família. "Amigos são a família que escolhemos".

Aos técnicos do departamento de Histologia e Embriologia, Cintia, D. Raquel, Natália, Stephanie e especialmente à Célia pela imensa ajuda prestada a este trabalho.

Aos Profs., alunos e funcionários do departamento de Histologia e Embriologia, pelo companheirismo ajuda e disponibilidade prestada, especialmente aos colegas do laboratório da Profa. Maria Alice.

Aos Profs., membros da banca avaliadora, que prontamente aceitaram fazer parte da mesma.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade concedida, especialmente à Líliam pela dedicação e ajuda burocrática.

Agradeço às agências de fomento Capes, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. Exposição à DHL por 60 dias induz em camundongos machos C57 alterações metabólicas significativas no grupo tratado (DHL) em relação ao grupo controle (Ct)......46

Figura 4. Imunofluorescência para a proteína β -catenina ativada em cortes histológicos de pâncreas endócrino de camundongos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica (DHL)......50

Figura 6. Imunofluorescência para a proteína GSK- 3β em cortes histológicos de pâncreas endócrino de camundongos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica (DHL)......52

Figura 7. Imunofluorescência para a proteína Axina2 em cortes histológicos de pâncreas endócrino de camundongos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica (DHL)......53

Figura 12. Expressão gênica de β -catenina, Ciclina D1 e c-Myc em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos submetidos à dieta normal (Ct) ou hiperlipídica (DHL)......58

Figura 14. Expressão proteica de β -catenina ativada em ilhotas pancreáticas de camundongos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica (DHL) por apenas 30 dias......61

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Composição das rações	35
Tabela II. Diluições e fabricantes dos anticorpos primários monoclonais e a secundários policlonais utilizados para a detecção das proteínas por meio da te imunofluorescência indireta.	inticorpos écnica de 39
Tabela III. Diluições e fabricantes dos anticorpos primários monoclonais e a secundários policlonais utilizados para a detecção das proteínas da via Wnt/β -cat meio da técnica de <i>Western Blot</i>	inticorpos cenina por 41

Tabela IV.	Primers	Específicos	para qPCl	{		43
------------	---------	-------------	-----------	----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - Proteína da Adenoma Polipose do Cólon (do inglês, Adenomatous Polyposis Coli).

Ct - Controle (grupo alimentado com dieta padrão)

CK1 - Proteína Caseína-Cinase 1 (do inglês, Casein Kinase 1).

Dvl - Proteína Dishevelled (do inglês, Dishevelled Protein).

JA - Junção de adesão

Fz - Proteína transmembrana 7 passos (Frizzled)

GSK-3 β - Glicogênio-Sintase-Cinase 3 β (*Glycogen Synthase Kinase-3* β).

DHL - Dieta hiperlipídica.

ITT - Teste de Tolerância à Insulina (do inglês, Insulin Tolerance Test).

LRP5/6 - Proteína 5 e 6 relacionada ao receptor de LDL (do inglês, *Low-density lipoprotein receptor Related Protein 5 and 6*).

TA - Temperatura Ambiente

T1DM - Diabetes Melito tipo 1 (do inglês, Type 1 Diabetes Mellitus).

T2DM - Diabetes Melito tipo 2 (do inglês, Type 2 Diabetes Mellitus).

TCF/LEF - Fator específico da Célula T/Fator Ligante ao Estimulador Linfóide (do inglês, *T Cell specific Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor*).

TCF2L7 - Fator de Transcrição 2 Semelhante ao 7 (do inglês, *Transcription Factor 2-Like* 7).

Wnt - refere-se a uma família de glicolipoproteínas. É um nome "hibrido", proveniente da junção de dois nomes dado ao mesmo gene descoberto independentemente, o gene *Wingless* (*Wg*) de Drosophila e o gene *Int1* de camundongos.

β-TRCP - Proteínas contendo repetições beta-transducina (do inglês, *Beta-transducin repeat-containing proteins*).

1. INTRODUÇÃO

1.1. O PÂNCREAS ENDÓCRINO

O pâncreas é uma glândula mista, com função tanto endócrina como exócrina. A porção endócrina é composta por unidades morfofuncionais denominadas ilhotas de Langerhans, as quais são constituídas por cinco tipos celulares secretores de diferentes hormônios envolvidos, direta e indiretamente, na homeostase glicêmica. As células pancreáticas endócrinas incluem: 1) as células β , beta, ou B, responsáveis pela secreção de insulina, importante hormônio de ação hipoglicemiante, que induz a captação de glicose da corrente sanguínea pelos tecidos/órgãos para sua metabolização intracelular; 2) as células α , alfa, ou A, responsáveis pela secreção do hormônio glucagon de função hiperglicemiante; 3) as células δ , delta, ou D, responsáveis pela secreção de somatostatina, hormônio de ação parácrina, que regula a liberação de insulina e glucagon; 4) as células PP, que parecem exercer uma função inibidora na secreção do pâncreas exócrino; e 5) as células ε , épsilon, ou E, produtoras de grelina, a função da grelina no pâncreas não é bem conhecida, mas atualmente tem sido relacionada à inibição da secreção de insulina no homem e à proliferação das células beta durante desenvolvimento fetal em roedores (Orci, 1976; Ekblad & Sundler, 2002; Kanno *et al.*, 2002; Andralojc *et al.*, 2009).

Histologicamente, a ilhota apresenta um formato arredondado ou ovalado, revestida por uma delicada cápsula de tecido conjuntivo frouxo rico em fibras reticulares, e seu parênquima é constituído por cordões das células endócrinas entremeados por uma rica rede de capilares sanguíneos do tipo fenestrado. Com relação à disposição ou arranjo das células endócrinas na ilhota, em roedores, as células beta ocupam a região central perfazendo aproximadamente 80% do volume total da ilhota; as células alfa, delta e épsilon localizamse na periferia da ilhota. As células PP também estão, preferencialmente, dispostas na periferia da ilhota (Orci, 1976; Andralojc *et al.*, 2009).

Em humanos, as ilhotas contém proporcionalmente menos células beta (aproximadamente 60% do total de células) e a segregação celular é menos evidente quando comparada às ilhotas de roedores (Cabrera *et al.*, 2006; Bosco *et al.*, 2010). As ilhotas humanas apresentam uma organização cordonal trilaminar, onde cada cordão

23

apresenta uma camada de células beta entre duas camadas de células alfa; nessa organização, as células alfa são encontradas na região central da ilhota (Bosco *et al.*, 2010). Os capilares ficam dispostos ao longo de ambos os lados dos cordões celulares, adjacentes às camadas de células alfa. As células beta exibem extensões citoplasmáticas entre as células alfa que podem alcançar a superfície do vaso. Os outros tipos celulares parecem ficar entremeados às células beta e alfa (Cabrera *et al.*, 2006; Bosco *et al.*, 2010). Essa citoarquitetura da ilhota humana permite uma interação heterotípica maior entre os tipos celulares da ilhota quando comparada às ilhotas de roedores e de outras espécies animais (Bosco *et al.*, 2010); a repercussão funcional dessas diferenças estruturais da ilhota ainda é desconhecida.

Tanto a histologia como a citoarquitetura, ou arranjo preferencial dos tipos celulares dentro da ilhota de várias espécies, incluindo a humana, parecem ser fundamentais para o seu funcionamento. A organização histológica e arranjos celulares das ilhotas modificam-se ao longo do desenvolvimento animal, paralelamente à maturação funcional do pâncreas endócrino (Cabrera *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2006; Santos-Silva, 2012). Alterações na morfologia e citoarquitetura normal das ilhotas são observadas em animais com quadro estabelecido de diabetes ou em modelos *in vitro* de disfunção secretora de insulina (Cirulli *et al.*, 1993; Janssen *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2002;Wong *et al.*, 2003).

Em cada ilhota, as diferentes células endócrinas se conectam, de forma homotípica ou heterotípica, por meio das junções intercelulares do tipo oclusão, comunicante, aderente e desmossomos, como demonstrado por microscopia eletrônica (Orci, 1975; Orci *et al.* 1976). Tais contatos intercelulares parecem ser cruciais para o perfeito funcionamento deste órgão, em especial para a secreção de insulina pela célula beta. Há evidências que as junções celulares e suas proteínas constitutivas participem de processos tais como a adesão e homeostase celular, comunicação intercelular, bem como da organização e citoarquitetura das ilhotas (Orci *et al.*, 1975; Orci, 1976; Cirulli *et al.*, 1993; Collares-Buzato *et al.*, 2001 e 2004; Carvalho *et al.*, 2012).

Tem sido reportado que as células endócrinas pancreáticas expressam proteínas reconhecidamente associadas às junções comunicantes, como conexinas (Cx) 36, 43 e 30.2 (Collares-Buzato *et al.* 2001, 2004; Carvalho *et al.*, 2010, 2012; Coronel-Cruz *et al.*, 2013), de adesão, como N-CAM, caderinas, α e β -cateninas (Santos-Silva *et al.*, 2012) e de

oclusão, como ZO-1 (Collares-Buzato *et al.*, 2004) e que tal expressão pode ser regulada tanto *in vitro* como *in vivo*.

Demonstramos que ilhotas de ratos recém nascidos sofrem maturação parcial do processo de secreção de insulina em cultura, na presença e ausência de prolactina e, paralelamente, expressam quantidade aumentada de proteínas associadas à junção comunicante (Cx36 e Cx43), aderente (incluindo a β -catenina) e de oclusão (ZO-1), mas não do citoesqueleto (vinculina e β -actinina) (Collares-Buzato *et al.* 2001, 2004; Leite *et al.*, 2005). Ainda, a expressão juncional dessas proteínas nas ilhotas pancreáticas parece aumentar ao longo do desenvolvimento do pâncreas endócrino em ratos, correlacionando-se com a aquisição de uma citoarquitetura típica e de uma resposta secretora de insulina induzida pela glicose das ilhotas pancreáticas nestes animais (Carvalho *et al.*, 2010; Santos-Silva *et al.*, 2012). Mais recentemente, foi sugerida a participação dessas estruturas de membrana, particularmente da junção comunicante e de sua proteína Cx36, no processo de disfunção secretora da célula beta que ocorre durante a pré-diabetes experimental (Carvalho *et al.*, 2012).

Apesar do exposto anteriormente, que claramente indica um papel importante das junções intercelulares e de suas proteínas constitutivas no processo de comunicação/adesão intercelular no pâncreas endócrino, ainda não está estabelecido se tais estruturas participam, direta ou indiretamente, de eventos celulares como proliferação e diferenciação da célula beta (Collares-Buzato, 2013).

1.2. DIABETES E DISFUNÇÃO DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA

Existem duas formas de diabetes: a diabetes melito tipo 1 (T1DM - do inglês, *Type 1 Diabetes Mellitus*), insulino dependente; e a tipo 2 (T2DM - do inglês, *Type 2 Diabetes Mellitus*) insulino não dependente. A T1DM é classificada como uma doença auto imune que resulta de uma combinação de susceptibilidade genética, desregulação imunológica e exposição a causas ambientais (como, por exemplo, infecções virais), que levam à morte das células beta e consequente deficiência na produção de insulina (Pharm *et al.*, 2013). A T2DM tem uma patogênese complexa que tem sido extensivamente estudada. Está

estabelecido que o sedentarismo e a obesidade são os principais fatores que contribuem para o desencadeamento da doença, embora possa haver fatores genéticos de predisposição e ambientais que contribuem para o desencadeamento da doença (Kahn *et al.*, 2006; Tripathy & Chaves, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente, essa forma da doença acomete 90% das pessoas com diabetes em todo o mundo (American Diabetes Association, 2013).

Uma das primeira etapas do desenvolvimento da T2DM é a ocorrência de um quadro de resistência à insulina, ou seja, a ação da insulina está prejudicada nos tecidos/órgãos periféricos, particularmente no músculo esquelético, no fígado e nos adipócitos (Tripathy & Chaves, 2010). Há controversa entre os pesquisadores sobre os fatores que podem levar à resistência à insulina inicial (Jonietz, 2012). Alguns pesquisadores acreditam que apenas o excesso de lipídios livres (não acumulados nos adipócitos) pode ser a causa (Kahn *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2010). Outros sugerem que o excesso e a consequente inflamação do tecido adiposo é responsável por lançar na corrente sanguínea citocinas e outros fatores inflamatórios que podem promover a inflamação em outros tecidos, incluindo as ilhotas pancreáticas (Shoelson *et al.*, 2006; Lackey *et al.*, 2013).

A célula beta pancreática desempenha um papel fundamental na patogênese da T2DM, sendo capaz de uma resposta adaptativa, que envolve alterações de função secretora e da massa relativa no pâncreas endócrino (Sone & Kagawa, 2005; Liew & Andrews, 2008). Essa resposta é tão eficiente que a taxa de glicose normal no sangue é mantida, inicialmente, mesmo com a resistência à insulina. Em um primeiro momento, as células beta aumentam a biossíntese e secreção de insulina e, posteriormente, devido à contínua resistência à insulina, há um incremento na massa de células beta que promove um aumento adicional na secreção de insulina necessária para a manutenção da normoglicemia (Kahn *et al.*, 2006; Prentki & Nolan, 2006).

O aumento da produção de insulina e sua liberação continua por tempo prolongado, gradualmente "esgota" funcionalmente as células beta pancreáticas, resultando no comprometimento da função secretora (Hollingdal, 2000; Conget, 2001). Há um contínuo declínio na função secretora das células beta e, consequente, aumento dos níveis de glicose. O aumento da glicose no sangue tem efeitos tóxicos sobre a célula beta e efeitos nocivos

26

sobre a sensibilidade à insulina dos tecidos periféricos, principalmente no músculo esquelético, no fígado e nos adipócitos; isso aumenta ainda mais resistência à insulina (Liu, *et al.*, 2010).

Parece haver um sinergismo entre exposição crônica à ácidos graxos não esterificados, cuja concentração plasmática normalmente está aumentada na obesidade, e hiperglicemia, levando a um quadro comumente referido como "glicolipotoxicidade" da célula beta (Kahn *et al.*, 2006; Del Prato, 2009). A exaustão secretora e a glicolipotoxicidade levam à apoptose de célula beta e, consequente, declínio na sua massa relativa, resultando na progressão da T2DM para um estado insulino dependente (Conget, 2001; Hollingdal, 2000; Guyton, 2006; Liu, 2013).

Como mencionado anteriormente, a célula beta tem uma capacidade adaptativa surpreendente frente a uma demanda aumentada de insulina, particularmente na fase inicial da T2DM, ou também conhecida como pré-diabetes (Liew & Andrews, 2008; Kahn *et al.*, 2006; Sone & Kagawa, 2005). Em camundongos pré-diabéticos, o quadro inicial de hiperglicemia moderada é acompanhado por hiperinsulinemia e por um incremento significativo na massa de célula beta como forma de compensar metabolicamente a resistência periférica à insulina (Carvalho *et al.*, 2012). Os mecanismos intracelulares envolvidos no processo de proliferação e diferenciação da célula beta *in vivo* têm sido alvos de investigação por parte de grupos interessados na terapia celular para tratamento da diabetes (Liew & Andrews, 2008; Figeac *et al.*, 2009).

Vários fatores de proliferação celular parecem regular o ciclo celular da célula beta tais como: as Ciclinas e as proteínas cinases dependentes de Ciclina; os fatores que agem através dos receptores de tirosina cinases (RTKs); os fatores que agem através da via JAK/STAT; os fatores que agem através de receptores acoplados à proteina G, etc. (Yesil & Lammert, 2008). Entretanto, em particular, a via de sinalização da Wnt/β-catenina tem sido pouco investigada no pâncreas endócrino. Foi demonstrado que a β-catenina participa não somente como um componente estrutural das junções de adesão, mas também é uma molécula sinalizadora juntamente com as Wnts, as quais são importantes em vários processos celulares, tais como diferenciação e proliferação em outros tecidos/células (Jin, 2008; Murtaugh, 2008).

1.3. VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/β-CATENINA

A sinalização pela família de proteínas Wnts é um dos mecanismos fundamentais que direciona à proliferação celular, polaridade celular e morte celular, determinantes durante o desenvolvimento embrionário e para a homeostase dos tecidos (Logan & Nusse, 2004). No organismo adultos, as proteínas da via de sinalização Wnt agem na manutenção da homeostase tecidual, modulando a proliferação, diferenciação, morfologia e migração celular. Um controle adequado dessa sinalização é essencial para a atividade fisiológica normal (Aberle *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 2004). Várias mutações na via Wnt estão invariavelmente ligadas a defeitos congênitos humanos e a doenças como o câncer (Clevers, 2006).

As proteínas Wnts podem ativar pelo menos três tipos de vias de sinalização intracelular. Uma destas vias é chamada de *via de polaridade celular planar*, que coordena a polarização das células durante o desenvolvimento do epitélio; esta via depende de GTPases da família Rho (Alberts, 2005). Uma outra, denominada *via Wnt/Ca²⁺*, tem papel importante no desenvolvimento e na manutenção da homeostase do organismo e está envolvida na ativação de proteínas heterotriméricas G, as quais ativam a fosfolipase C, que por sua vez, estimula um aumento intracelular de Ca²⁺ (Langenbacher & Chen, 2008; Kühl, 2004). E finalmente, a *via Wnt canônica* ou *Wnt/β-catenina* que é regulada pela quantidade de um co-ativador transcricional, a β-catenina, que por sua vez, controla os principais programas de expressão gênica do desenvolvimento embrionário, dentre outros processos celulares (Alberts, 2005; revisado por MacDonald, 2009).

As Wnts fazem parte de uma família de glicolipoproteínas, muito conservadas filogeneticamente nos metazoários. Nos mamíferos, existem 19 membros/tipos descritos e esta diversidade permite complexidade e especificidade na sinalização Wnt (revisado por MacDonald, 2009). Essas proteínas, após serem secretadas, desempenham suas funções sinalizadoras através de mecanismos autócrinos e parácrinos. As Wnts interagem com um receptor, denominado *Frizzled*, e um co-receptor chamado LRP5/6 (*low-density lipoprotein receptor related proteins 5 and 6*) e, no caso da via Wnt/ β -catenina, desencadeiam uma reação em cascata resultando no acúmulo de β -catenina no citoplasma (revisado por Murtaugh, 2008; Welters & Kulkarni, 2008).

Na ausência do estímulo Wnt, o nível citoplasmático de β -catenina é mantido baixo através da sua interação com a molécula caderina nos sítios de adesão intercelular da membrana plasmática e/ou por degradação desencadeada pela fosforilação da β -catenina pelo complexo APC/Axina/CK1/GSK-3 β (revisado por Murtaugh, 2008; Mac-Donald, 2009) (**Figura 1**). Denominado complexo APC/Axina, esse complexo proteico é constituído por um esqueleto de Axina, pelo produto do gene supressor de tumor, *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), pela *Casein Kinase 1* (CK1), e pela *Glycogen Synthase Kinase-3\beta* (GSK-3 β) (He *et al.*, 2004; revisado por MacDonald, 2009).

A proteína GSK-3 β fosforila as proteínas Axina e APC; isto auxilia na estabilização da Axina e aumenta a afinidade das duas proteínas à β -catenina (Doble & Woodgett, 2003). Posteriormente, a proteína CK1 faz uma primeira fosforilação e GSK-3 β , outras três fosforilações, sequencialmente, na região amino terminal da β -catenina, o que resulta em seu reconhecimento pela β -Trcp, uma subunidade da ubiquitina ligase E3. Dessa forma, ocorre a ubiquitinação da β -catenina e sua subsequente degradação proteossômica (He *et al.*, 2004; revisão por MacDonald, 2009).

A sinalização Wnt/ β -catenina leva à inibição da GSK-3 β mediada pela proteína citoplasmática Dvl (*Disheveled Protein*) e consequente acúmulo de β -catenina no citoplasma. Esse *pool* de β -catenina é deslocado até o núcleo onde ocorre interação com fatores de transcrição, como o TCF/LEF (*T* Cell *Specific Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor*); esse complexo proteico ativa a expressão de genes alvo como c-Myc e Ciclina D, que, por sua vez, desencadeiam o processo de proliferação (**Figura1**) (Murtaugh, 2008; Welters & Kulkarni, 2008).

Na ausência dessa sinalização, nos promotores dos genes alvos da via Wnt, os fatores transcricionais TCF/LEF estão ligados aos co-repressores da família *TLE/Groucho* mantendo assim a transcrição dos genes alvo das Wnts inativos (Arce *et al.*, 2006). Com a sinalização Wnt, a β -catenina interage com TCF/LEF e desloca ou favorece a liberação de *TLE/Groucho*. Há, então, o recrutamento de complexos ativadores e de remodelação da cromatina, e segue-se o processo de proliferação celular (Mao & Byers, 2011).



Figura 1. Via de sinalização Wnt/β-catenina, explicação no texto; adaptado de Logan & Nusse (2004). *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **20**, 781–810) e revisado por MacDonald *et al.* (2009). *Annu. Rev. Dev Cell* **17**, 9–26.

Como já foi dito anteriormente, a via Wnt/ β -catenina influencia múltiplos processos no desenvolvimento animal. Li e colaboradores (2005) relataram que esta via de sinalização desempenha funções no desenvolvimento do cérebro, espinha dorsal e em diversas sub-populações de neurônios motores e sensoriais. Ainda, no sistema nervoso central, a Wnt/ β -catenina está relacionada com a vascularização do tecido neural (Daneman *et al.*, 2009). Outro órgão no qual a via Wnt tem sido investigada é o fígado; sabe-se que a mesma interfere em diversas funções como desenvolvimento, crescimento, regeneração e metabolismo deste órgão (Thompson & Monga, 2007).

O interesse pelo estudo da via da Wnt/ β -catenina no pâncreas surgiu quando foi demonstrado que a inibição desta via é essencial para o processo de especificação do tecido pancreático durante o desenvolvimento do endoderma, enquanto que o crescimento e diferenciação do pâncreas exócrino no feto dependem da via estar ativa (revisado por Murtaugh, 2008). Foi demonstrado que a ativação pré-natal da β -catenina nas células beta resulta em aumento da proliferação deste tipo celular enquanto que a expressão aumentada, induzida, de Axina tem um efeito oposto (Rulifson *et al.*, 2007).

Adicionalmente, a via Wnt/ β -catenina tem sido considerada uma via de sinalização com possível repercussão na biologia da célula beta quando foi evidenciada uma estreita ligação entre o grau de expressão de variantes do fator TCF7L2 e T2DM em humanos (Lyssenko *et al.*, 2007). Polimorfismos de TCF7L2 estão associados com deficiência na secreção de insulina, sugerindo um papel importante da via de Wnt/ β -catenina na função secretora da célula beta pancreática (Krützfeldt & Stoffel, 2010).

Além disso, estudos mais recentes demonstraram, em ratos neonatos, que a inibição de TCF7L2 resulta na alteração do crescimento pré-natal normal de células beta, principalmente através da inibição da proliferação celular. Inversamente, em ratos neonatos com T1DM, induzida pela administração de estreptozotocina, a ativação da via Wnt/ β -catenina através da inibição de GSK-3 β teve um efeito estimulatório significativo na regeneração de célula beta nesses animais. Ainda, em condiçoes *in vitro*, em células beta da linhagem INS-1, a inativação de GSK-3 β resultou na estimulação da proliferação celular que foi mediada pela estabilização de β -catenina e indução de Ciclina D (Figeac *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS E RELEVÂNCIA

Nesta Dissertação de Mestrado, visamos investigar: 1) se as alterações metabólicas induzidas pela exposição à dieta hiperlipídica (contendo 21g % lipídios), por um curto período de tempo (60 dias), são acompanhadas por alterações compensatórias do pâncreas endócrino, como hiperplasia da célula beta, em camundongos C57, e 2) a possível ativação da via de sinalização da Wnt/β-catenina durante o processo de proliferação da célula beta neste modelo.

Para tal, foram desenvolvidas as seguintes etapas: 1) avaliação metabólica deste modelo animal de diabetes tipo 2, analisando-se os parâmetros peso corpóreo do animal, glicemia, insulinemia e resposta ao Teste de Tolerância à Insulina (ITT), 2) avaliação dos aspectos histológicos (estrutura e citoarquitetura) e morfométricos (número de células beta por ilhota e massa relativa de células beta) do pâncreas endócrino nestes animais submetidos à dieta hiperlipídica de 60 dias, 3) investigação da possível ativação da via da Wnt/β-catenina no pâncreas endócrino nestes animais, analisando-se a localização celular (por imunoistoquímica), o conteúdo proteico (por Western Blot) e a expressão gênica (por PCR quantitativo (qPCR)) de proteínas associadas a esta via (a saber: β-catenina (ativada ou total), GSK-3β, Axina2, Ciclina D1/2, c-Myc) em ilhotas de animais normais e prédiabéticos e, por fim, 4) avaliação dos aspectos histológicos (estrutura e citoarquitetura) e morfométricos (número de células beta por ilhota e massa relativa de células beta) do pâncreas endócrino e análise do conteúdo proteico por Western Blot, da proteína βcatenina ativada, em ilhotas de animais submetidos à dieta hiperlipídica por apenas 30 dias.

A hipótese inicial dessa Dissertação é que a via de sinalização Wnt/β-catenina está ativada em células beta durante o processo de hiperplasia compensatória à resistência periférica, que ocorre na fase de pré-diabetes em modelo animal de T2DM. Várias evidências experimentais, citadas anteriormente, demonstram que essa via participa no desenvolvimento do pâncreas e induz proliferação de células beta *in vitro*. A relevância da presente Dissertação reside no fato que investigamos a possível ativação dessa via na célula beta *in vivo* numa condição fisiopatológica como a diabetes. Trabalhos como este e os

resultados obtidos, através do seu desenvolvimento, podem fornecer subsídios à investigação sobre terapia celular e genética da diabetes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6J/Uni, machos, com 16 a 20 semanas (4 –5 meses) de idade. Todos os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (Campinas, SP) e mantidos em condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro (de 12h), alimentados com ração e água *ad libitum* durante o período de adaptação e estudo. Os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA/UNICAMP (Protocolos n°. 1884-1 e n°. 2815-1).

3.2. DIETA

Os camundongos do grupo tratado (com dieta hiperlipídica - DHL) foram colocados em dieta com uma ração preparada no laboratório com alto teor de lipídios (21% em peso; 40,3% em kcal) por 60 dias. Um segundo grupo de animais foi introduzido no estudo, porém tratado com a DHL por apenas 30 dias. A composição desta ração (em pó) está apresentada na **Tabela I**. Os camundongos controles (ração padrão - Ct) receberam uma ração com conteúdo normal de lipídios (4,5% em peso, 8,0 % em kcal; ração padrão peletizada; Nuvital CR-1, Colombo, PR) pelo mesmo período de tempo. Na ração hiperlipídica, o conteúdo de sais minerais e vitaminas é, aproximadamente, o mesmo da ração padrão.

Componentes	Ração Normal (Ct)%	Ração Hiperlípidica (DHL)%
Proteínas	22,0	20,0
Carboidrato	53,0	50,0
Lípídios	4,5	21,0
*Outros	20,5	8,0
Kcal/g	2,9	4,7

Tabela I. Composição das rações.

*Fibras, vitaminas e sais minerais.

3.3. AVALIAÇÃO METABÓLICA DOS ANIMAIS

Foram avaliados os seguintes parâmetros nos animais controles e nos submetidos à dieta por 60 dias: peso corpóreo inicial e final (após dieta), n=53 (Ct) e n=63 (DLH); glicemia em jejum (12h) (após dieta), n=22 (Ct) e n=26 (DLH); glicemia pós-prandial (estado alimentado) (após dieta), n=35 (Ct) e n=32 (DLH) e resposta ao Teste de Tolerância à Insulina (ITT), (n=6)/grupo.

A glicemia em jejum e pós-prandial foram determinadas com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Check Advantage, Roche Diagnostic) em amostras de sangue da veia caudal do animal. O ITT foi realizado através de injeção intraperitoneal (i.p.) de insulina (0,50 U/kg de peso corporal de insulina humana, Biohulin®R, Biobrás) em animais alimentados (Pappan *et al.*, 2005). Antes e após administração da insulina, a glicemia nesses animais foi determinada com o auxílio do glicosímetro. Todos os procedimentos foram feitos no período das 8:00 h às 10:00 h.

Foi feita uma análise da concentração plasmática de insulina (insulinemia), por meio de alíquotas de sangue coletadas das veias cervicais no momento do sacrifício após decapitação, em microtubos de 1,5mL heparinizados. As amostras de sangue, em jejum (12h) (após dieta), n=21 (Ct) e n=18 (DHL) e pós-prandial n=17 (Ct) e n=13 (DLH), passaram por centrifugação a 4°C, por 15 min à velocidade de 12000 r.p.m., e as amostras de plasma coletadas foram estocadas a -20°C até a dosagem da insulina por radioimunoensaio (RIE) (Carvalho et al., 2010) ou com Kit Elisa para insulina (Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA KIT, Crystal Chem Inc., USA), segundo orientações do fabricante. A dosagem do conteúdo de insulina nas amostras por ambos os métodos forneceram valores similares. As amostras de sangue em jejum (12 h) e pós-prandial foram coletadas sempre no período das 8:00 h às 10:00 h.

3.4. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO PÂNCREAS ENDÓCRINO

3.4.1. Histologia do Pâncreas

A análise do aspecto histológico e da citoarquitetura do pâncreas endócrino dos animais dos grupos experimentais (n= 4-6 animais por grupo experimental) foi feita utilizando-se técnica histológica de rotina. Para tal, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ para retirada dos pâncreas; estes foram pesados e fixados em solução de Bouin (25% de formaldeído, 75% de ácido pícrico saturado e 5% de ácido acético) por 24 h. Após fixação, os pâncreas foram seccionados em 5 fragmentos (1, correspondendo à região da cabeça, e 5, correspondendo à região da cauda). Em seguida, cada fragmento foi processado pelas técnicas rotineiras de embebição em parafina (Histosec pastilhas, Merck).

Três dos fragmentos foram selecionados de uma maneira aleatória sistemática (Inuwa & Mardi, 2005) (fragmentos 1, 3 e 5) e, de cada fragmento, foram obtidas secções semi-seriadas de 5 μ m (com espaçamento de 100 μ m entre cortes) até esgotamento total do bloco. Posteriormente, foi utilizado o método padrão de imunoperoxidase indireta para insulina (Carvalho *et al.*, 2006).

Resumidamente, os cortes de pâncreas foram desparafinizados, hidratados e, em seguida foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução pronta do kit
ImmunoCruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), e dos sítios inespecíficos com 5% leite desnatado em pó em TBS/Tween 20 (TTBS) 0,1% por 1 h. Os cortes foram, então, incubados com anti-insulina (Dako) (diluição 1:50 em TBS contendo 3% de leite em pó desnatado) *overnight* à temperatura de 4°C e, posteriormente, foram incubados com o anticorpo IgG secundário específico conjugado com HRP (Zymed, dilution 1:1500), por 1h e 30 min. Após lavagem com TBS (3x de 5min), os cortes foram tratados com solução 10% de 3,3 diaminobenzidina (DAB - Sigma) em tampão Tris HCl 0,1M, pH 7,4 contendo 0,2% de H₂O₂. Finalmente as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Ehrlich, desidratadas, diafinizadas e montadas em lamínula com bálsamo sintético.

3.4.2. Morfometria

As lâminas, obtidas a partir do processamento dos pâncreas e imunoistoquímica para insulina, descritos acima, foram utilizadas para a análise morfométrica do órgão. Foram analisados os seguintes parâmetros: 1) número de células beta/ilhota e 2) massa relativa de células beta por pâncreas (mg). Para tal, foram utilizados métodos estereológicos descritos na literatura, com pequenas modificações (Sone & Kagawa, 2004; Inuwa & Mardi, 2005). Todas as ilhotas (com mais de 5 células cada) de todos os cortes de cada bloco (1, 3 e 5) do pâncreas foram fotografadas com uma câmera digital (Nikon FDX-35) acoplada a um microscópio de luz (Nikon Elipse E800) e as imagens capturadas por um sistema de análise de imagens (Image Pro Plus for Windows).

As medidas de área absoluta das ilhotas, das células beta/ilhota e do corte de foram feitas utilizando software pâncreas livre *ImageTool* 0 (http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html). A área relativa de célula beta foi determinada pela divisão da somatória das áreas totais das células insulino-positivas (células beta) pela área total da secção do pâncreas. A massa relativa de célula beta por pâncreas (mg) foi calculada multiplicando-se o peso do pâncreas (mg) pela média da área relativa de célula beta. A estimativa do número médio de células beta por ilhota foi feita pela contagem de todos os núcleos de células beta de todas as ilhotas de cada secção transversal, e dividida pelo número de ilhotas amostradas para cada pâncreas. Para o grupo alimentado por 60 dias, foi utilizado n=6 animais/grupo e para tais análises foram avaliadas um total de n=267 (Ct) ilhotas e n=399 (DHL) ilhotas. Para o grupo alimentado por 30 dias, foi utilizado n=4 animais/grupo e para as análises foram avaliadas um total de n=263 (Ct) e n=241 (DLH).Os cortes foram fotografados com câmara digital (Nikon FDX-35) acoplada ao microscópio de luz (Nikon Elipse E800) e as imagens foram capturadas por um sistema de captura de imagem (Image Pro Plus for Windows).

3.5. AVALIAÇÃO DA VIA WNT/β-CATENINA NO PÂNCREAS

A possível ativação desta via de sinalização na célula beta pancreática foi avaliada por: 1) imunoistoquímica das seguintes proteínas, relacionadas à ativação da via, a β catenina ativada (não fosforilada) e a Ciclina D1/2 (o anticorpo reconhece as duas formas), e as relacionadas à inibição da via, a Axina2 e a GSK-3 β ; 2) *Western Blot* das proteínas β catenina (total) (o anticorpo reconhece as formas fosforilada e não fosforilada), β -catenina ativada, Ciclina D1/2, Axina2 e GSK-3 β e 3) *qPCR* dos genes da β -catenina, Ciclina D1/2 e c-Myc.

3.5.1. Imunofluorescência Indireta

Para avaliar a distribuição celular de proteínas associadas à via da Wnt/β-catenina em cortes de congelamento de pâncreas foi empregado um protocolo padrão de imunofluorescência indireta (Carvalho *et al.*, 2012; Collares-Buzato *et al.*, 2004). Os pâncreas retirados dos animais foram congelados em n-hexano resfriado a -60 °C com auxílio de nitrogênio líquido. Os cortes histológicos dos pâncreas, obtidos por criotomia a -25°C, foram aderidos em lâminas silanizadas (tratadas previamente com solução de 3aminopropiltrietoxisilano, Sigma), fixados com acetona -20°C, por 3 min, em seguida foram secos à temperatura ambiente (TA) e mantidos a -20°C até o momento da utilização.

Para a imunoreação para GSK-3 β , os cortes foram refixados com paraformaldeído 2% (em PBS, pH 7,4) por 8 min. Duas secções de pâncreas/lâmina foram incubadas por 1h à TA com solução de TTBS contendo 5% de leite em pó desnatado, atuando no bloqueio dos sítios inespecíficos e, em seguida incubadas *overnight* a 4°C em solução de TBS contendo 3% de leite em pó desnatado com o anticorpo primário específico para a detecção da proteína desejada. No dia seguinte, após lavagem com TBS, foi realizada a incubação dos cortes, por 2 h à TA, com anticorpo secundário apropriado e conjugado com fluoresceína (FITC - verde) diluído em TBS contendo 1% leite em pó desnatado (diluições dos anticorpos primários de secundários mostradas na **Tabela II**). Em seguida, para a dupla marcação com insulina, as secções foram incubadas por 1 h e 30 min com anti-insulina (Dako) (diluição 1:75 em TBS contendo 1% de leite em pó desnatado) e, posteriormente, incubadas com anticorpo secundário específico conjugado com rodamina (TRITC - vermelho) (Sigma, diluição 1:100 em TBS contendo 1% de leite em pó desnatado) por 1 h e 30 min.

Ainda, foi feita incubação DAPI (que marca núcleo em azul), na diluição 1:1000 adicionado à solução do anticorpo secundário para insulina. Por fim, todas as lâminas foram montadas com lamínula com Vectashield (Vector Laboratories, USA) e as secções observadas através de microscópio de fluorescência (Observer.Z1; Zeiss - Axio Cam MRC, Hamburg – Alemanha).

Tabela II. Diluições e fabricantes dos anticorpos primários monoclonais e anticorpos secundários policlonais utilizados para a detecção das proteínas por meio da técnica de imunofluorêscencia indireta.

Anticorpo Primário (Fabricante)	Diluição	Anticorpos secundários (Fabricante)	Diluição
Anti- β -catenina ativada	1:300	Anti-Mouse IgG FITC	1:350
(Millipore)		Conjugate (Sigma)	
Anti-Ciclina D1/2	1:50	Anti-Rabbit IgG FITC	1:125
(Millipore)		Conjugate (Sigma)	
Anti-Axina2	1:50	Anti-Rabbit IgG FITC	1:75
(Abcam)		Conjugate (Sigma)	
Anti-GSK-3β	1:100	Anti-Rabbit IgG FITC	1:125
(Millipore)		Conjugate (Sigma)	

3.5.2. Western Blot

A metodologia de *Western Blot* foi empregada com a finalidade de detectar o nível de conteúdo celular das proteínas em estudo em ilhotas pancreáticas. Para tal, foi empregado o protocolo similar ao descrito anteriormente por Carvalho e colaboradores (2010). Resumidamente, as ilhotas foram isoladas por tratamento enzimático com colagenase tipo V (EC 3.4.24.3, Sigma) dos pâncreas dos camundongos dos grupos experimentais, seguido de separação em gradiente de Histopaque (Sigma). Grupos de aproximadamente 300 a 400 ilhotas foram homogeneizados em coquetel antiprotease (composição: 10 mM imidazol pH 7,4; 4 mM EDTA; 1mM EGTA; 200µM DTT; 0,5µg/mL pepstatina; 200 KIU/mL aprotinina; 200µM fenilmetilsufonil fluoreto; 2,5µg/mL leupeptina e 30µg/mL inibidor de tripsina).

A determinação do conteúdo total de proteínas foi feita por espectrofotometria, usando-se o kit de ensaio de proteína da Bio-Rad. Alíquotas contendo 50µg de proteínas foram incubadas a 37°C por 1 h em 30% do volume de 5x tampão de Laemmli (1x tampão: 50mM Tris-HCl, 2% de SDS, 20% de β-mercaptoetanol, 10% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol) e, então, aplicadas em gel de 8 ou 10% de SDS-PAGE. Em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese e transferidas eletroforeticamente para membrana de nitrocelulose. Após coloração reversível com solução de Ponceau S da Bio-Rad, para verificação do perfil protéico e controle da massa protéica aplicada nas linhas do gel, as membranas foram incubadas com 5% de leite desnatado em tampão Tris-salina (TBS: Trisma base 0,01M, NaCl 0,15M, Tween 20 0,05%, pH 7,4) *overnight* a 4°C, e posteriormente incubadas por 1 h e 30 min e à TA com os anticorpos primários específicos das proteínas de interesse (diluídos em TBS com 3% de leite desnatado) (**Tabela III**).

Após lavagem com TBS, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários específicos conjugados com peroxidase (diluídos em TBS com 1% de leite desnatado), nas diluições mostradas na **Tabela III**. As bandas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência (kit Super Signal-PIERCE) utilizando filme para autoradiografia. A densidade óptica das bandas foi analisada pelo software ImageJ (<u>http://rsbweb.nih.gov/ij/</u>) e "normalizada" em relação à densidade da banda obtida pela reincubação da membrana com anticorpo anti-β-actina, usado como controle interno da

reação. A especificidade dos anticorpos foi confirmada em amostras de células da linhagem celular prostática cancerosa *LNCaP*.

Tabela III. Diluições e fabricantes dos anticorpos primários monoclonais e anticorpos secundários policionais utilizados para a detecção das proteínas da via Wnt/β -catenina por meio da técnica de *Western Blot*.

Anticorpo Primário (Fabricante)	Diluição	Anticorpos secundários (Fabricante)	Diluição
Anti-β-catenina (total)	1:500	Anti-mouse IgG HRP	1:1500
(Zymed/Invitrogen)		Conjugate (Sigma)	
Anti-β-catenina ativada	1:500	Anti-mouse IgG HRP	1:1500
(Millipore)		Conjugate (Sigma)	
Anti-Ciclina D1/2	1:200	Anti-rabbit IgG HRP	1:1000
(Millipore)		Conjugate (Sigma)	
Anti-Axina2	1:500	Anti-rabbit IgG HRP	1:1000
(Abcam)		Conjugate (Sigma)	
Anti-GSK-3β	1:500	Anti-rabbit IgG HRP	1:1000
(Millipore)		Conjugate (Sigma)	
Anti-β-actina	1:2000	Anti-mouse IgG HRP	1:2500
(Sigma)		Conjugate (Sigma)	

3.5.3. PCR quantitativo (qPCR) em ilhotas pancreáticas isoladas

Amostras com cerca de 200 a 400 ilhotas isoladas, como descrito anteriormente, foram usadas para a extração do RNA Total. Após o isolamento, quando necessário, as ilhotas foram mantidas em *RNALATER*[®] *Soln*. (Ambion) até o momento da extração de RNA Total. A extração do RNA Total foi feita utilizando-se o kit RNAqueous – MicroKit (Ambion) e tratado com DNA-*free* (Ambion), seguindo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). Para a determinação de sua concentração e pureza foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 UV-Vis (Nanodrop Technologies), a partir da absorbância a 260 nm, e a razão 280/260 nm. Os RNAs foram estocados em freezer -80°C até o momento do uso.

O cDNA utilizado nos ensaios de PCR em Tempo Real foi sintetizado a partir 0,5µg de RNA Total, usando o kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) segundo instruções do fabricante. A amostra de RNA Total foi incubada por 5

min a 65°C, contendo 1µL de Primer Oligo-(dT)₁₈ (100uM) e quantidade suficiente de H₂O tratada com DEPC para um volume final de 12µL. Após este período de incubação, foram incubadas novamente por 1 h a 42°C e 5 min a 70°C, acrescidos de 4µL de Tampão de Reação (5X), 1µL de dNTP (10mM), 1µL de Inibidor de RNAse Ribolok (20 u/ul) e 1µL de RivertAid H Minus Transcriptase Reversa (200 u/ul). O cDNA originado foi checado por espectofotometria e gel de agarose 1% como descrito anteriormente.

Os primers para os genes de interesse e de referência (housekeeping genes) foram desenhados utilizando ferramenta Primer-BLAST (disponível a em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), baseado no banco de dados do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Para o desenho foram aplicados os seguintes critérios: primers com extensão entre 19 e 22 pb, Temperatura de Melting (TM) de aproximadamente 60°C, amplicon entre 90 e 150 pb, conteúdo de guanina-citosina entre 50-55%. Os primers foram confeccionados comercialmente e estão apresentados na Tabela IV. Tais primers foram testados por reações de PCR convencional, onde verificou-se por gel de agarose 2% a amplificação do amplicon. Este ensaio prévio foi importante para a validação dos primers, bem como o ajuste de sua temperatura de anelamento, para só a partir de então podermos utilizá-los para os ensaios de PCR em Tempo Real.

O *qPCR* foi executado no equipamento *StepOnePlus*[™] *Real Time PCR System*, da Applied Biosystems[®] com o kit SYBR Green PCR Master Mix da Applied Biosystems. O método de detecção como especificado acima foi pelo corante *SYBR*[®] *Green*, padronizado um volume total de reação de 10µL, contendo 5µL de SYBR; 0,25 µL *primer foward*; 0,25µL *primer reverse*; 3,5µL H₂O_{DEPC} e 1µL de cDNA (na concentração de 200ng/µL). As condições para as reações foram as seguintes: passo inicial de desnaturação de 95°C por 10min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 63°C por 1 min, 72°C por 20 s para o anelamento do *primer* e extensão do *amplicon*, e finalizado em 72°C por 20 s, 63°C por 1 min e 95°C por 15 s, para a confecção da curva de *Melting*, que demonstra a especificidade do *primer*. O ciclo (Ct) no qual a fluorescência atinge o limiar (*threshold*) foi utilizado para as análises de expressão relativa.

Para cada (gene ou *primer*) foram confeccionados experimentos de curvas padrões para o cálculo da eficiência da reação de qPCR, compostas por uma série crescente de diluições seriadas de cDNA (1:5) de 5 pontos (correspondente às concentrações aproximadas de 2000ng, 400ng, 80ng, 18ng e 3,6 ng). Dessa forma, pudemos otimizar a concentração de cDNA que seria utilizada nos ensaios de expressão relativa. Os níveis de RNAm das proteínas analisadas foram normalizados em relação à média dos níveis de RNAm do gene de referência.

A determinação da eficiência é um pré-requisito para a utilização do método de quantificação $\Delta\Delta$ Ct, devendo apresentar valores entre 90% e 110%. O nível de expressão de cada gene foi quantificado em relação ao controle não tratado, utilizando como padronização o gene controle endógeno (β -actina - *Actb*) e a equação 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}, onde $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct tratamento - Δ Ct referência e Δ Ct = Ct gene de interesse - Ct controle endógeno. (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela IV. Primers Específicos para qPCR

Gene	Proteina	Forward (5'- 3')	Reverse (5'-3')
Ctnnb1	β-catenina	CGCGTCAGCTCGTGTCCTGTG	CTTCAGGTACCCTCAGGCCCGC
CcnD1	Ciclina D1	TCAAGTGTGACCCGGACTGCCT	GTGGCCTTGGGGTCGACGTT
Мус	c-Myc	TCTCTGCCTCTGCCCGCGAT	TCGTGGCTGTCTGCGGGGTT
Actb	β-actina	GTGGATCAGCAAGCAGGAGT	AGGGTGTAAAACGCAGCTCA

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística entre os dois grupos experimentais foi determinada usandose o teste t-Student. Para múltiplas comparações, foi utilizado o teste ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni para comparar determinados pares de grupos, com auxílio do Software GraphPad *Prism* versão 5.00. Sendo P < 0,05 o nível de significância adotado.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DO ANIMAL E MORFOMÉTRICA DO PÂNCREAS ENDÓCRINO

Com o objetivo de se estudar a possível ativação da via de sinalização Wnt/ β catenina em ilhotas pancreáticas de animais pré-diabéticos, foi realizada inicialmente uma avaliação metabólica de camundongos C57 expostos à dieta hiperlipídica (21% lipídios *vs* 4,5% na ração padrão) por um período de 60 dias, bem como uma análise funcional e morfométrica do pâncreas endócrino desses animais. Essa primeira parte do trabalho teve como meta avaliar a adequação do modelo animal T2DM para o estudo posterior da via Wnt/ β -catenina no pâncreas endócrino.

Como parâmetros metabólicos, avaliou-se nesses animais o ganho de peso, a glicemia em jejum e a pós-prandial, a insulinemia em jejum e a pós-prandial, e foi realizado o Teste de Intolerância a Insulina. Os animais submetidos à dieta hiperlipídica por 60 dias (grupo DHL) apresentaram um ganho de peso 3,7 vezes maior em relação aos animais do grupo controle (Ct) (**Figura 2**, a). Além disso, os animais DHL apresentaram, com relação ao grupo Ct, aumento de 49% na glicemia em jejum (**Figura 2**, b), de 31% na glicemia pós-prandial (**Figura 2**, c), bem como aumento de 5,6 vezes (**Figura 2**, d) e de 3,3 vezes (**Figura 2**, e) na insulinemia em jejum e pós prandial, respectivamente. Todos os aumentos acima descritos foram estatisticamente significativos (P < 0,0001).

Por meio do teste de ITT, feito através da medida de glicemia em diferentes intervalos de tempo após injeção i.p. de insulina, foi possível observar que, nos animais DHL, a concentração sanguínea de glicose foi maior ao longo do tempo em relação ao grupo Ct, indicando que a resposta tecidual periférica à insulina injetada foi menor neste último grupo, o que sugere uma resistência periférica à insulina, como pode ser visto na **Figura 2**, f. O gráfico (f) apresenta a área sobre a curva glicêmica (AUC) (P=0,001) calculada a partir da curva de decaimento da glicemia obtida com o ITT (vide Anexo1).

Adicionalmente aos estudos metabólicos, foi feito um estudo histológico e morfométrico do pâncreas endócrino para verificar se os distúrbios metabólicos eram associados com alterações morfométricas das ilhotas pancreáticas. Não foram observadas diferenças histológicas e nem na citoarquitetura das ilhotas entre os grupos Ct e DHL, como mostrado na **Figura 3** (a e b). As ilhotas pancreáticas de ambos os grupos experimentais apresentaram uma morfologia normal com sua forma variando entre arredondada a ovalada, cujo parênquima é constituído por cordões de células endócrinas entremeados por capilares. Ainda, independentemente do grupo experimental, as ilhotas apresentaram uma citoarquitetura típica caracterizada pela presença de células beta localizadas na região central, identificadas por imunoperoxidase para insulina (citoplasma em marrom), e de células não beta na periferia (células não marcadas) (**Figura 3**).

Quanto à análise morfométrica das ilhotas, observamos um aumento significativo na massa de células beta (aumento de 43%, P=0,007) e no número de células beta por ilhota (aumento de 55%, P<0,0001) nos animais do grupo DHL em relação ao grupo Ct, (**Figura 3**, c e d, respectivamente). Esses dados demonstram o desenvolvimento de uma hiperplasia do pâncreas endócrino nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, provavelmente compensatória ao quadro de resistência periférica à insulina apresentados por esses animais.

Nesta parte da Dissertação, concluímos que, em camundongos machos expostos à dieta hiperlipídica por um período curto de tempo de 60 dias, há indução de alterações metabólicas características da fase inicial da T2DM, como hiperglicemia moderada, hiperinsulinemia e resistência periférica a insulina significativa, além de tornarem-se obesos. Ainda, essas alterações, que são características da pré-diabetes, são acompanhadas por modificações morfométricas que indicam uma hiperplasia compensatória de células beta, que ocorre em parte por replicação dessa célula endócrina pancreática.



Figura 2. Exposição à DHL por 60 dias induz em camundongos machos C57 alterações metabólicas significativas no grupo tratado (DHL) em relação ao grupo controle (Ct). Essas alterações incluem: aumento do peso corpóreo (a), da glicemia em jejum (b) e pós prandial (c), da insulinemia em jejum (d) e pós prandial (e) e da resistência periférica à insulina (f) (AUC = *area under curve*). Os valores foram expressos como média \pm SEM.***P*<0,001 e ****P*<0,001 em relação ao grupo Ct (*teste de t Student*).





Figura 3. Aspecto morfológico de ilhotas pancreáticas, em cortes histológicos de pâncreas, marcadas para insulina (em marrom) por imunoperoxidase, dos grupos controle (Ct) (a) e tratado (DHL) (b).

Exposição à dieta hiperlipídica por 60 dias induz nos camundongos do grupo DHL aumento na massa de células beta das ilhotas (c) e do número de células beta por ilhota (d), em relação ao grupo Ct. Os valores numéricos foram expressos como média \pm SEM (n° de animais, n=6/grupo; n° de ilhotas analisadas por grupo, n=267 (Ct) e n=399 (DHL)). ***P*<0,007 e *** *P*<0,0001 em relação ao grupo Ct (*teste de t Student*).

4.2. DISTRIBUIÇÃO E CONTEÚDO CELULAR DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À VIA WNT/β-CATENINA NAS ILHOTAS HIPERPLÁSICAS DOS ANIMAIS PRÉ DIABÉTICOS.

Considerando a hiperplasia compensatória das células beta verificada no nosso modelo animal de pré-diabetes, a segunda etapa deste trabalho teve como objetivo identificar uma possível ativação da via Wnt/ β -catenina nessas células endócrinas. Para tal, utilizamos como estratégias de estudo: 1) a análise da distribuição celular da β -catenina, cuja presença no citoplasma e núcleo indica ativação da via, e 2) a análise da expressão protéica de proteínas associadas à via Wnt/ β -catenina em ilhotas isoladas de animais dos grupos Ct e DHL. Esses parâmetros são frequentemente utilizados para estudos visando identificar um possível envolvimento dessa via em processos fisiopatológicos ou experimentais que resultem em sua ativação (Ghaisas *et al.*, 2009; Winzell & Ahrén 2004).

Através do método de imunoistoquímica em criosecções histológicas de pâncreas, foi realizada a imunomarcação das seguintes proteínas: β -catenina ativada (co-ativadora desta via - também denominada forma ativa da proteína), Ciclina D1/2 (genes alvo), GSK- 3β e Axina2 (antagonistas da via). A reação por imunofluorescência indireta com tripla marcação, que marca a proteína específica estudada em verde (FITC), insulina em vermelho (TRITC) e núcleo em azul (DAPI), revelou que a β -catenina ativada aparece na região da membrana plasmática, no sítio de contato intercelular, no citoplasma e núcleo das células beta pancreáticas de camundongos de ambos os grupos (**Figura 4**, a e d). A marcação citoplasmática e nuclear parecem ser mais intensas e/ou mais frequentes nas células beta das ilhotas do grupo DHL (**Figura 4** d, vide detalhe em a e d) do que no grupo Ct (**Figura 4**, d e e). Entretanto, a análise quantitativa do grau de fluorescência total (de toda a ilhota), nessas fotomicrografias, não revelou alterações significativas entre os dois grupos estudados (**Figura 4**, g).

Adicionalmente, por meio da imunofluorescência indireta, foi possível observar a distribuição celular (marcação) das proteínas Ciclina D1/2, GSK-3 β e Axina2 analisadas no presente estudo em ilhotas dos dois grupos experimentais. A imunoreação mostrou que as três proteínas, Ciclina D1/2 (**Figura 5**), GSK-3 β (**Figura 6**) e Axina2 (**Figura 7**), apresentam uma distribuição exclusivamente citoplasmática nas células endócrinas das ilhotas pancreáticas. Esses resultados estão de acordo com a localização prevista para essas proteínas considerando as suas funções em outras células/tecidos, como descrito na

48

literatura (Li *et al.*, 2005; Murtaugh et al., 2008; Schohl & Fagotto, 2002; Thompson & Monga, 2007).

Como mostra a **Figura 8** (B), a expressão protéica de β -catenina ativada (forma desfosforilada) em homogeneizados de ilhotas por *immunoblotting* revelou um aumento significativo (*P*<0,006) de cerca de 42% no grupo DHL em relação ao grupo Ct. Também foi observado um aumento significativo de cerca de 70% na expressão de Ciclina D1/2 (anticorpo reconhece ambas as formas de Ciclina D, 1 e 2) nas ilhotas do grupo DHL em relação às do grupo Ct (*P*<0,03) (**Figura 8**, C). No entanto, a análise da expressão protéica em homogeneizados de ilhotas revelou um pequeno aumento, porém não significativo, no conteúdo celular de β -catenina total (utilizando-se um anticorpo que reconhece as duas formas dessa proteína, a fosforilada e a desfosforilada) no grupo DHL em comparação ao grupo Ct (**Figura 8**, A).

Com relação a uma das proteínas antagonistas estudadas da via, a Axina2, nossos resultados não demonstraram diferenças significativas entre os dois grupos experimentais para essa proteína, que apresentou uma pequena diminuição, não significativa, em cerca de 15% nas ilhotas pancreáticas do grupo DHL (**Figura 9**, A). Quanto à expressão de GSK-3 β , outra proteína antagonista da via, nossos resultados surpreendentemente mostraram um aumento significativo de cerca de 60% em homogeneizados de ilhotas do grupo DHL em relação ao grupo Ct (*P*<0,012) (**Figura 9**, B).



Figura 4. Imunofluorescência para a proteína β -catenina ativada em cortes histológicos de pâncreas endócrino de camundongos submetidos à dieta normal ou à hiperlipídica (DHL).

Foi realizada tripla marcação com FITC (β -catenina ativada - verde) (a) e (d), TRITC (insulina - vermelho) (b) e (e), para identificação das células beta das ilhotas, e DAPI (azul - núcleo). Tripla marcação (c) e (f). É possível observar a localização intercelular, citoplasmática e nuclear da proteína β -catenina ativada nas células beta em ilhotas pancreáticas de camundongos do grupo controle (Ct) (a) e do grupo tratado (DHL) (d). Em d, detalhe da marcação nuclear mais evidente na célula beta do grupo DHL em relação ao grupo Ct (a). Em g, tem-se a quantificação da fluorescência total para β -catenina ativada nas imagens digitalizadas das ilhotas dos grupos Ct e DHL. A densidade de pixels no interior das ilhotas foi normalizada em relação a área da ilhota. Os valores da densidade de pixels (fluorescência) para cada grupo experimental foram plotados em gráfico para melhor comparação entre os grupos. Não houve diferenças significativas no grau de marcação para β -catenina ativada entre os grupos estudados (n=13 animais/grupo de 12 experimentos independentes; n° de ilhotas/grupo para análise de densidade de pixels, n=45 (Ct) e n=57(DHL). (Barra=50µm).



Figura 5. Imunofluorescência para a proteína Ciclina D1/2 em cortes histológicos de pâncreas endócrino de camundongos submetidos à dieta normal ou à hiperlipídica (DHL).

Foi realizada tripla marcação com FITC (Ciclina D1/2 - verde) (a) e (d), TRITC (insulina - vermelho) (b) e (e), para identificação das células beta das ilhotas, e DAPI (azul - núcleo). Tripla marcação (c) e (f). É possível observar a localização citoplasmática da proteína Ciclina D1/2 nas células beta em ilhotas pancreáticas de camundongos do grupo controle (Ct) (a) e nos do grupo tratado (DHL) (d) (n=6 animais/grupo de 6 experimentos independentes). (Barra=50µm).



Figura 6. Imunofluorescência para a proteína GSK-3β em cortes histológicos de pâncreas endócrino de camundongos submetidos à dieta normal ou à hiperlipídica (DHL).

Foi realizada tripla marcação com FITC (GSK-3 β - verde) (a) e (d), TRITC (insulina - vermelho) (b) e (e), para identificação das células beta das ilhotas, e DAPI (azul - núcleo). Tripla marcação (c) e (f). É possível observar a localização citoplasmática da proteína GSK-3 β nas células beta em ilhotas pancreáticas de camundongos do grupo controle (Ct) (a) e nos do grupo tratado (DHL) (d) (n=6 animais/grupo de 4 experimentos independentes) (Barra=50µm).



Figura 7. Imunofluorescência para a proteína Axina2 em cortes histológicos de pâncreas endócrino de camundongos submetidos à dieta normal ou à hiperlipídica (DHL).

Foi realizada tripla marcação com FITC (Axina2 - verde) (a) e (d), TRITC (insulina - vermelho) (b) e (e), para identificação das células beta das ilhotas, e DAPI (azul - núcleo). Tripla marcação (c) e (f). É possível observar a localização citoplasmática da proteína Axina2 nas células beta em ilhotas pancreáticas de camundongos do grupo controle (Ct) (a) e nos do grupo tratado (DHL) (d) (n=6 animais/grupo de 6 experimentos independentes) (Barra=50µm)



Figura 8. Expressão protéica de β -catenina total (A), β -catenina ativada (B) e Ciclina D1/2 (C) em ilhotas pancreáticas de camundongos submetidos à dieta normal ou à hiperlipídica (DHL).

A análise da expressão protéica de β -catenina total (A, a), β -catenina ativada (não fosforilada) (B, a) e Ciclina D1/2 (C, a), revelado por *Western Blot*, não demonstrou alterações significativas para β -catenina total (A, d) entre os grupos experimentais, mas mostrou um aumento significativo para β -catenina ativada (B, d) e Ciclina D1/2 (C, d) em homogeneizados de ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos tratados (DHL) em relação aos seus respectivos controles. A reação de controle interno membrana foi realizada por re-incubação da membrana com o anticorpo anti- β -actina (b). Homogeneizado de células da linhagem LNCaP derivadas do câncer prostático foi utilizado como controle positivo para o *immunoblotting* das proteínas analisadas (c). Os gráficos representam os valores (média ± SEM) de densidade óptica da banda correspondente a cada proteína que foram normalizados considerando os valores da β -actina obtidos. Os resultados são representativos de pelo menos 5 membranas e de 4 experimentos independentes. * P < 0,03, ** P < 0,006 em relação aos seus respectivos controles (*teste t de Student*).



Figura 9. Expressão protéica de GSK-3β (A) e Axina2 (B) em ilhotas pancreáticas de camundongos submetidos à dieta normal ou à hiperlipídica (DHL).

A análise da expressão protéica de GSK-3 β (A, a) e Axina2 (B, a), revelado por *Western Blot*, demonstrou um aumento significativo de GSK-3 β (A, d) em homogeneizados de ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos tratados (DHL), mas nenhuma alteração significativa da Axina2 (B, d) em relação ao grupo controle (Ct). A reação de controle interno membrana foi realizada por re-incubação da membrana com o anticorpo anti- β -actina (b). Homogeneizado de células da linhagem *LNCaP* derivadas do câncer prostático foi utilizado como controle positivo para o *immunoblotting* das proteínas analisadas (c).Os gráficos representam os valores (média ± SEM) de densidade óptica da banda correspondente a cada proteína que foram normalizados considerando os valores da β -actina obtidos. Os resultados são representativos de pelo menos 5 membranas de 5 experimentos independentes. **P*<0,01, quando comparado aos respectivos controles (*teste t de Student*).

4.3. EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ALVO DA VIA WNT/ β -CATENINA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS POR PCR QUANTITATIVO (qPCR)

Todas as amostras utilizadas após a extração de RNA dos *pools* de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais dos diferentes grupos experimentais tiveram sua integridade verificada por meio da análise em gel de agarose 1% (**Figura 10**). Apenas as amostras com esse perfil foram inclusas nos experimentos e foi feita a quantificação do RNA Total. A seguir, foi executado *RT-PCR* para certificar a adequação da construção dos *primers* para amplificação dos genes de interesse (a saber, β -catenina, Ciclina D1 e c-Myc). Como mostra a **Figura 11**, foram obtidas bandas específicas com todos os *primers* testados, demonstrando assim a especificidade dos mesmos. Ainda, os produtos da amplificação dos *primers* para os genes *Ctnnb1* (β -catenina), *CcnD*1 (Ciclina D1) e *Actb* (β -actina - *housekeeping*) foram sequenciados (dados não mostrados) e, assim, confirmamos a especificidade. Foi estabelecida a concentração de 200ng de cDNA para cada reação de qPCR para cada um dos genes estudados. (vide Anexo2- Gráfico de Amplificação, Curva de *Melting* e Curva Padrão de todos os genes)

A **Figura 12**, mostra os resultados obtidos pelo método de *qPCR*. Não observamos diferença na expressão gênica de β -catenina em ilhotas pancreáticas entre os grupos experimentais. Entretanto, verificamos uma tendência de aumento na expressão gênica de Ciclina D1 (aumento de 53%) e c-Myc (aumento de 72%), genes alvos da via Wnt/ β -catenina, em ilhotas do grupo tratado DHL em relação ao controle.



Figura 10. Imagem do gel de agarose 1% demonstrando a integridade do RNAs ribossômicos em lisados de ilhotas de camundongos C57 macho.

Bandas correspondem aos RNAs ribossômicos. *Ladder*=100pb, 1 e 2=bandas dos RNAs dos grupos Ct e DHL, respectivamente.



Figura 11. Verificação da amplificação dos fragmentos por RT-PCR em gel de agarose 2%.

Na imagem: *Ladder*=100pb (primeira banda 1000pb e ultima banda 100pb); 1=*Actb* (96 pb); 2=*Ctnnb1* (141 pb); 3=*CcnD*1 (103 pb) e 4 =*c*-*Myc* (101 pb).

Controle (Ct)



Figura 12. Expressão gênica de β-catenina, Ciclina D1e c-Myc em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos submetidos à dieta normal (Ct) ou hiperlipídica (DHL). A expressão gênica dos genes de interesse foi analisada por *qPCR*. Verificou-se uma tendência de aumento da expressão de Ciclina D1e c-Myc, genes alvo da via Wnt/β-catenina, nas ilhotas do grupo DHL em relação ao grupo Ct (*One-Way* ANOVA seguido de Bonferroni; *P*=0,1565), mas nenhuma alteração da expressão de β-catenina entre os grupos experimentais. Os dados são representativos de três *pools* de ilhotas (cada *pool* correspondente a 2-4 animais por grupo), coletados de forma independente.

4.4. MORFOMETRIA E EXPRESSÃO DE β-CATENINA ATIVADA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS, NÃO HIPERPLÁSICAS, DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA POR 30 DIAS.

Com o intuito de verificar se a expressão protéica aumentada de β -catenina ativada (um parâmetro positivo de ativação da via Wnt/ β -catenina) está relacionada diretamente com a fase de hiperplasia da célula beta, foi analisada também a expressão desta proteína em ilhotas pancreáticas de animais tratados com DHL por somente 30 dias, cujas ilhotas se mostraram não hiperplásicas como demonstrado anteriormente pelo nosso grupo (Carvalho, 2009). Em acordo com essa observação prévia, na análise morfométrica das ilhotas de animais tratados durante 30 dias com dieta hiperlipídica, não observamos aumento significativo na massa relativa de células beta e nem no número de células beta por ilhota nos animais do grupo DHL em relação ao grupo Ct, (**Figura 13**, c e d, respectivamente). Esses dados revelam que, após 30 dias de tratamento, esses animais, diferentemente dos tratados durante 60 dias com DHL, não apresentam a hiperplasia do pâncreas endócrino em relação ao grupo Ct.

A análise por *immunoblotting* da expressão protéica de β -catenina ativada em homogeneizados de ilhotas desses animais não revelou aumento no grupo DHL em relação ao grupo Ct, como mostra a **Figura 14**.



Figura 13. Aspecto morfológico de ilhotas pancreáticas, em cortes histológicos de pâncreas, marcadas para insulina (em marrom) por imunoperoxidase, dos grupos controle (Ct) (a) e tratado (DHL) (b).

Exposição à dieta hiperlipídica por 30 dias não induz nos camundongos do grupo DHL aumento significativo na massa de células beta das ilhotas (c) e do número de células beta por ilhota (d), em relação ao grupo Ct. Os valores numéricos foram expressos como média \pm SEM (n° de animais, n=4/grupo; n° de ilhotas analisadas por grupo, n=263 (Ct) e n=241 (DHL) (*teste t de Student*).





A análise da expressão proteica de β -catenina ativada (A, a) não demonstrou alteração significativa no grupo DHL em relação ao grupo controle (Ct). A reação de controle interno membrana foi realizada por reincubação da membrana com o anticorpo anti- β -actina (b). Homogeneizado de células da linhagem *LNCaP* derivadas do câncer prostático foi utilizado como controle positivo para o *immunoblotting* da proteína analisada (c). O gráfico representa os valores (média ± SEM) de densidade óptica da banda correspondente à β -catenina ativada que foram normalizados considerando os respectivos valores da β -actina obtidos. Os resultados são representativos de 3 membranas de experimentos independentes (*teste t de Student*).

5. DISCUSSÃO

Com o aumento na incidência da T2DM, tem crescido o interesse nos estudos de novas metodologias que possam ser aplicadas na terapia celular e molecular dessa disfunção (Tahara *et al.*, 2011). Existem vários modelos animais de diabetes, envolvendo a administração de drogas, dietas especiais ou mesmo animais transgênicos. A linhagem de camundongo C57BL/6J/Uni tem sido amplamente empregada no estudo da T2DM, pois se apresenta como uma linhagem susceptível à indução de distúrbios metabólicos característicos desta doença por meio da administração de dieta hipercalórica e/ou glicocorticóides como dexametasona (Ghaisas *et al.*, 2009; Winzell & Ahrén 2004).

Considerando a associação da T2DM com a obesidade, nosso grupo de pesquisa tem empregado um modelo experimental de disfunção pancreática que utiliza camundongos C57BL/6J/Uni alimentados com ração com alto teor de lipídios. Como foi visto nos resultados dessa Dissertação, após 60 dias de exposição à dieta hiperlipídica, esses animais se tornam obesos, hiperglicêmicos, hiperinsulinêmicos e resistentes à insulina, Ainda, segundo Carvalho e colaboradores (2012), animais alimentados com DHL pelo mesmo período também se tornam hipercolesterolêmicos, intolerantes à glicose e apresentam uma disfunção significativa na secreção basal de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas, sendo caracterizados como pré-diabéticos.

Concomitante às alterações metabólicas, os animais tratados com DHL, após 60 dias, apresentam significativa hiperplasia compensatória de células beta no pâncreas endócrino, ou seja, há um incremento no número/massa de células beta, devido provavelmente a maior demanda de insulina exigida pelo organismo neste estado. Esta resposta do pâncreas endócrino é uma tentativa de normalizar o quadro de hiperglicemia e contrabalancear a resistência à insulina dos tecidos periféricos, principalmente do músculo esquelético, tecido adiposo e fígado (Kahn *et al.*, 2006; Prentki & Nolan, 2006). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Oliveira (2011), o qual mostrou também que as células beta do grupo DHL apresentam maior taxa de replicação, como revelada pela imunomarcação da proteína Ki67 (um marcador da divisão celular), quando comparada aos animais do grupo Ct. Essa proliferação celular aumentada ocorreu sem alteração no

índice de morte celular, como atestado pelo método de TUNEL e morfologia do núcleo (Oliveira, 2011).

A massa de célula beta no pâncreas, em qualquer dado momento ou condição, é determinada pelo balanço de três eventos celulares. Por um lado, tem-se a proliferação/replicação celular e a neogênese (replicação de células fonte e posterior diferenciação em célula beta), e por outro lado, a morte celular programada (apoptose) (Levine & Itkin-Ansari, 2007; Rhodes, 2005). Na fase adulta e em diferentes espécies animais (incluindo o homem), é conhecido que a célula beta apresenta uma taxa de replicação relativamente baixa, o que está em concordância com o alto grau de especialização e diferenciação deste tipo celular. Entretanto, alterações na massa de células beta tem sido documentadas em determinadas condições fisiológicas e patológicas. Por exemplo, uma expansão da massa de célula beta pode ocorrer sob condições que envolvem aumento da demanda insulina pelo organismo, ou seja, durante o período perinatal, na obesidade, na T2DM (como já foi mencionado) e na gravidez (Rhodes, 2005; Bouwens & Rooman, 2005; revisado por Lee &Nielsen, 2009)

No homem, a capacidade de replicação das células beta é maior na infância, ocorrendo uma maior expansão da sua massa no período perinatal. Entretanto, a capacidade de regeneração de células beta declina logo após a infância (Meier et al., 2008). Estudos, em roedores, também documentaram um declínio idade-dependente na proliferação de células beta (McEvoy, 1981; Hellerström *et al.*, 1988; Finegood *et al.*, 1995; Teta *et al.*, 2005). Ainda, diminuição da massa de célula beta, resultado de apoptose induzida por autoimunidade, está diretamente associada à patogênese da T1DM (Pharm *et al.*, 2013). Embora, na gravidez, a população de células beta pancreáticas normalmente sofra expansão, curiosamente, a sua massa é drasticamente reduzida, por apoptose, logo após o parto (Bouwens & Rooman, 2005; revisado por Lee & Nielsen, 2009).

Recentemente, o interesse no estudo sobre fatores de sinalização e vias implicadas na regulação do ciclo celular e da proliferação da célula beta pancreática tem-se ampliado. O objetivo principal da maioria desses trabalhos é encontrar formas e protocolos que permitam a regeneração/reposição da população da célula beta para fins terapêutico no tratamento da diabetes. Algumas dessas vias tem sido documentadas por participarem do processo de divisão/replicação deste tipo celular, a saber: 1) a sinalização via Ras/ERK

63

(Huang, *et al.*, 2004; 2) a via JAK2/STAT5 (Dalgaard *et al.*, 2008; Yesil & Lammert, 2008), e 3) a sinalização via PI3K/Akt (Doble & Woogget, 2003; Kim *et al.*, 2010)

Neste contexto, surgiu o nosso interesse em se estudar a via de sinalização Wnt/ β catenina, via esta ainda pouco estudada no pâncreas, em particular no processo de hiperplasia compensatória das células beta pancreáticas na fase da pré-diabetes. Em estudos anteriores, foi demonstrado que a exposição à proteína purificada Wnt3a leva a um aumento da proliferação celular em cultura de células MIN-6 (células beta originárias de camundongos) e, em cultura de ilhotas de camundongos recém nascidos, resulta no aumento da expressão da proteína β -catenina ativada (Rulifson *et al.*, 2007; Figeac, *et al.*, 2010).

A proteína β -catenina foi inicialmente descrita como um componente estrutural das junções de adesão (JA) (Ozawa *et al*, 1989). Essa proteína está ligada à porção citoplasmática de moléculas de adesão inseridas na membrana plasmática, e pertencentes à super-família das caderinas (Peifer *et al.*, 1992; Zaidel-Bar, 2013). Nas células, existem dois *pools* distintos de β -catenina: o juncional e o citoplasmático. A proteína recém sintetizada primeiro satura o *pool* (altamente estável) que faz parte da JA, enquanto que o "excesso" de β -catenina livre é, então, degradado pelo complexo APC/Axina/GSK-3 β /CK1 no interior do citoplasma. Esse *pool* citoplasmático (instável) está sujeito à regulação por sinais dos Wnts (Stamos & Weis, 2012).

A sinalização Wnt/ β -catenina leva à inibição da GSK-3 β (antagonista da via) mediada pela proteína citoplasmática Dvl, e consequente acúmulo de β -catenina no citoplasma. Esse *pool* de β -catenina é deslocado até o núcleo onde ocorre interação com fatores de transcrição, como o TCF/LEF. Esse complexo proteico, por sua vez, ativa a expressão de genes alvo como c-Myc e Ciclina D1/2, cujas proteinas desencadeiam o processo de proliferação celular (revisão por Murtaugh, 2008; Welters & Kulkarni, 2008).

Em trabalhos anteriores, demonstramos que as células endócrinas pancreáticas, incluindo a célula beta, expressam β -catenina, além de outras proteínas juncionais, na região de contato intercelular (Collares-Buzato *et al.*, 2001, 2004; Santos-Silva *et al.*, 2012), e que sua expressão pode ser regulada em determinadas condições experimentais. Por exemplo, a expressão juncional de β -catenina, e de outras proteínas associadas às junções intercelulares, parece aumentar ao longo do desenvolvimento do pâncreas

endócrino em ratos, correlacionando-se com a aquisição de uma citoarquitetura típica e de uma resposta secretora de insulina à glicose adequada em ilhotas pancreáticas nestes animais (Carvalho *et al.*, 2010; Santos-Silva *et al.*, 2012). Ainda, observamos, em condições *in* vitro, uma correlação entre o grau de maturação do processo de secreção de insulina de ilhotas de ratos recém nascidos e o conteúdo juncional de β -catenina e de outras proteínas associadas às junções intercelulares (Collares-Buzato *et al.*, 2001, 2004; Leite *et al.*, 2005).

Na presente Dissertação, empregando um anticorpo que reconhece a forma não fosforilada ou ativa da β -catenina, observamos um aumento significativo no conteúdo celular de β -catenina ativada em ilhotas isoladas de camundongos pré-diabéticos, o que pode estar relacionado com a ativação da via canônica da Wnt nessas condições. Esse aumento não foi acompanhado por um incremento na expressão gênica de β -catenina, o que está de acordo com os dados de *Western Blot*, onde utilizou-se um anticorpo que reconhece o *pool* total de β -catenina (ou seja, tanto a forma fosforilada como a não fosforilada). Como já foi dito anteriormente, essa proteína é constitutivamente fosforilada quando a via Wnt canônica não está ativa (revisão por Murtaugh, 2008; MacDonald, 2009). Esta fosforilação é um mecanismo de regulação (pós-transcricional) da β -catenina nas células, que pode ser acompanhado ou não por uma regulação gênica desta proteína (Kim, *et al.*, 2013).

Em adição, observamos, por imunofluorescência, que, além da localização intercelular e citoplasmática, a β -catenina ativada foi detectada no núcleo de algumas células beta. A localização nuclear dessa proteína foi aparantemente mais frequente nas células beta pancreáticas do grupo DHL quando comparado às do grupo Ct, o que pode indicar uma translocação da β -catenina para o núcleo, situação comum quando a via está ativa (Leung *et al.*, 2002). No entanto, a análise do grau de fluorescência da imunoreação total para esta proteína em cortes de congelamento de ilhotas pancreáticas não revelou diferenças entre os grupos Ct e DHL. Isto pode ser explicado pelo fato do aumento observado de cerca de 42% na expressão proteica da β -catenina ativada (como demonstrado por Western Blot) ser relativamente baixo para ser detectado por imunoistoquímica, que reconhecidamente não é uma técnica adequada para demonstrar diferenças sutis no grau de expressão proteica entre grupos experimentais.

Ainda, nossos dados revelam um aumento da expressão proteica de Ciclina D1/2 (proteínas produto da via) nas ilhotas do grupo DHL em comparação às do grupo Ct. Por imunoistoquímica, foi possível observar a marcação citoplasmática dessa proteína nas células endócrinas pancreáticas de ambos os grupos experimentais. O aumento observado na expressão proteica foi acompanhado por uma tendência de aumento na sua expressão gênica, bem como na expressão de outro gene alvo da via Wnt/ β -catenina, o c-Myc. Esses resultados reforçam a hipótese da ativação da via.

Segundo Kushner e colaboradores (2005), as Ciclinas D1 e D2 são essenciais para a proliferação pós-natal das células beta em camundongos. Eles relataram que a Ciclina D2 constitui no principal subtipo expresso por essas células em camundongos adultos C57BL/6, e que está envolvida na expansão das células beta imediatamente após o nascimento. A Ciclina D1 desempenha um papel acessório, mas fundamental para promover a inicial replicação pós-natal. Esses autores relataram, ainda, que a Ciclina D1 tem a capacidade de compensar parcialmente a ausência da Ciclina D2, suportando o crescimento da massa de células beta e retardando a progressão da diabetes. Além das Ciclinas D, o fator nuclear c-Myc foi identificado como essencial para a regulação da proliferação pós-natal das células beta das ilhotas pancreáticas de vários animais (Cozar-Castellano *et. al.*, 2006; Rulifson *et al.*, 2007). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que controlam a expressão ou atividade desse fator na célula beta

Quanto à proteína Axina2, nossos resultados não revelaram diferenças significativas na sua expressão proteica na ilhotas isoladas entre os dois grupos estudados. A proteína Axina, além de estabilizar o complexo de fosforilação da β -catenina no citoplasma, também forma um outro complexo associado à membrana celular. Com a ativação da sinalização Wnt/ β -catenina, ocorrem alterações conformacionais nos receptores Fz e co-receptores LRP5/6. Isto faz com que Axina seja recrutada para a região onde está localizado o co-receptor LRP5/6, e com o requerimento de Dvl, associa-se ao Fz. Forma-se, a partir daí, o complexo LRP5/6/Axina/GSK-3 β , e, consequentemente, o complexo de degradação da β -catenina é desfeito (Ding *et al.*, 2008; Metcalfe & Bienz, 2011).

A proteína Axina2 também tem seu gene expresso como produto da ativação da via Wnt/β-catenina, sendo um regulador de *feedback* negativo desta via (Rulifson *et al.*, 2007; Leung, *et al.*, 2002). A Axina2 regula negativamente a via através da APC e, é pouco

provável que sozinha tenha grande efeito inibitório sobre a β -catenina e, portanto, sobre a via propriamente dita. Evidência para isto é o fato que, embora uma expressão elevada dessa proteína tenha sido observada em certos tipos de câncer associados com defeitos na via Wnt/ β -catenina, isso não parecer ser suficiente para regular negativamente os níveis de β -catenina e inibir o processo de proliferação celular desordenada (Leung, *et al.*, 2002).

Com relação à GSK-3 β , principal proteína responsável pela fosforilação da β catenina e assim pela sua degradação proteossômica, observamos curiosamente um aumento significativo no conteúdo celular dessa proteína, por *Western Blot*, em ilhotas dos animais pré-diabéticos quando comparado ao grupo controle. A regulação de GSK-3 β na via Wnt parece ser feita principalmente pela inibição de sua atividade durante formação do complexo LRP5/6/Axina/GSK-3 β e não por fosforilação/degradação e nem por alteração da sua expressão gênica (onde uma diminuição poderia ser cogitada) (Doble & Woodgett, 2003).

Ainda, parece que apenas uma fração do conteúdo total de GSK-3 β presente nas células participa como antagonista da sinalização Wnt/ β -catenina (Ding *et al.*, 2000). Embora não tenhamos uma explicação para essa discrepância, é plausível sugerir que a expressão proteica aumentada de GSK-3 β nas ilhotas pancreáticas hiperplásicas possa estar relacionada a outras funções celulares conhecidas desta proteína, não relacionadas à sua atuação junto à via Wnt/ β -catenina, pois trata-se de uma cinase multifuncional.

Tem sido descrito que a GSK-3 β participa de vários processos fisiológicos e fisiopatológicos como no metabolismo de carboidratos, na embriogênese, na neuroproteção, bem como na oncogênese (revisado por Rayasam *et al.*, 2009). Essa amplitude de ações é explicada em parte pelo fato dessa cinase possuir vários substratos, como a glicogênio sintase, a proteína τ (Tau) e a β -catenina, que são fosforiladas e inativadas por GSK-3 β . Em razão de suas múltiplas funções, tem sido proposto que a GSK-3 β poderia constituir-se em uma mólecula alvo no tratamento de doenças como o câncer, de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, e de doenças metabólicas, incluindo a diabetes (revisado por Rayasam *et al.*, 2009).

No que se refere à sinalização de insulina e à homeostase glicêmica, a proteína GSK-3 β tem ação direta sobre os receptores de insulina IRS1 e IRS2, que são fosforilados por essa proteína e degradados nos proteossomos (Liu *et al.*, 2010). Quando ocorre a

sinalização de insulina, GSK-3 β é regulada (inibida) por meio de fosforilação por PI3K/Akt (Kim *et al.*, 2010). Uma atividade aumentada de GSK-3 β foi observada no músculo esquelético de pacientes com T2DM e relacionada com a diminuição da atividade da glicogênio sintase e de disponibilidade de glicose estimulada pela insulina neste órgão (Nikoulina *et al.*, 2000). O aumento na atividade de GSK-3 β também foi visto no tecido adiposo de camundogos C57 diabéticos tratados com dieta hiperlipídica (Eldar-Finkelman *et al.*, 1999), sugerindo que a desregulação de GSK-3 β pode resultar em prejudicada sinalização da insulina e consequente resistência à insulina.

Em cultura primária de células MIN6, a exposição a ácidos graxos leva ao estresse do retículo e redução da sinalização PI3K/Akt com consequente diminuição dos receptores de insulina. Em contra partida, neste mesmo modelo *in vitro*, a ablação de GSK-3 β preserva os receptores IRS1 e IRS2, sugerindo que a atividade de GSK-3 β controla os níveis dessas proteínas também nas células beta (Liu *et al.*, 2010). Como comentado acima, no momento não sabemos ao certo qual o motivo do aumento do conteúdo de GSK-3 β em homogenizados de ilhotas do nosso modelo experimental, podendo estar relacionado, em parte, às funções acima descritas ou a outras que esta proteína exerce no contexto da célula beta. Trabalhos futuros serão necessários para melhor entender esta questão.

Finalmente, como uma contra-prova dos nossos dados que sugerem ativação da via canônica da Wnt em ilhotas hiperplásicas de animais pré-diabéticos, fomos investigar a expressão proteica de β -catenina ativada em ilhotas pancreáticas de animais expostos à DHL por somente 30 dias. Mesmo após um período curto de administração da dieta, esses animais já mostram ganho de peso significativo e uma hiperglicemia no estado pós-prandial (Carvalho, 2010). Entretanto, como relatado nessa Dissertação, e confirmando dados anteriores do grupo (Carvalho, 2010), esses camundongos tratados com DHL por 30 dias apresentam uma massa de célula beta semelhante ao do grupo controle. Como esperado, não observamos alteração no conteúdo celular de β -catenina ativada em ilhotas isoladas dos camundongos do grupo tratado (DHL) em relação ao grupo controle. Esse dado reforça nossa hipótese de ativação da via Wnt/ β -catenina durante a fase de hiperplasia compensatória das células beta no nosso modelo experimental de pré-diabetes.

Em suma, a via Wnt/β-catenina tem sido considerada como uma via de sinalização com possível função na biologia da célula beta, evidenciada recentemente pela descoberta

de uma correlação entre o aumento no grau de expressão de variantes do fator TCF7L2 (fator de transcrição da via Wnt/ β -catenina) e o desenvolvimento de T2DM em humanos (Lyssenko *et al.*, 2007). Além disso, estudos mais recentes demonstraram que, em ratos recém nascidos, a inibição de TCF7L2 resulta em comprometimento do crescimento da massa de células beta (normal ou compensatório após tratamento com estreptozotocina), principalmente através da inibição da proliferação celular (Figeac *et al.*, 2009). No presente trabalho, demonstramos que a via Wnt/ β -catenina pode ser a responsável pela proliferação das células beta durante uma fase específica da pré-diabetes, onde ocorre a hiperplasia das células beta associada ao quadro de resistência à insulina.

6. CONCLUSÕES

- A dieta hiperlipídica pelo período de 60 dias induziu aumento do peso corpóreo, da glicemia e da concentração plasmática de insulina em jejum e pós-prandial. Além disso, os animais ficaram resistentes à insulina injetável, caracterizando-os como pré-diabéticos.
- A alterações metabólicas acima descritas foram acompanhadas por hiperplasia das células betas pancreáticas, comprovada por um aumento significativo no número/massa relativa deste tipo celular no pâncreas dos animais no grupo DHL em relação ao Ct.
- A análise das proteínas envolvidas na via de sinalização Wnt/β-catenina nas ilhotas dos animais pré-diabéticos revelou um aumento significativo no conteúdo celular das proteínas associadas à ativação da via, a saber a β-catenina ativada (desfosforilada) e a Ciclina D1/2. Entretanto, não houve alteração na expressão proteica de Axina2, uma proteína reguladora de *feedback* negativo da via. Surpreendentemente, houve um aumento da GSK-3β, principal proteína inibidora da via, o que pode estar relacionado a outras funções que essa proteína possa exercer na célula beta.
- A análise por qPCR não revelou alteração da expressão gênica de β-catenina em ilhotas dos animais pré-diabéticos em comparação ao grupo controle. Entretanto, observou-se uma tendência de aumento na expressão gênica da Ciclina D1 e c-Myc, genes alvo da via.
- Em adição, não verificamos aumento do conteúdo celular de β-catenina ativada em ilhotas pancreáticas não hiperplásicas, de animais tratados por apenas 30 dias com DHL.

 Esse resultado, em conjunto com os demais acima relatados, confirma hipótese dessa Dissertação de ativação e possível envolvimento da via Wnt/β-catenina no processo de hiperplasia compensatória das células beta no modelo animal de prédiabetes associado à obesidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R. 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo. J* 16, 3797-804.

Ahrén, J., Ahrén, B. and Wierup, N. (2010). Increased β -cell volume in mice fed a high-fat diet: A dynamic study over 12 months. *Islets* **2**, 12-15.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008) Mechanisms of Cell Communication. *In:* Molecular Biology of the Cell. Eds: Alberts, B Garland, NY, pp. 948-49.

American Diabetes Association. (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **36 Suppl 1**, S67-13.

Andralojc, K. M., Mercalli, A., Nowak, K. W., Albarello, L., Calcagno, R., Luzi, L., Bonifacio, E., Doglioni, C. and Piemonti, L. (2009). Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia* **52**, 486-93.

Arce, L., Yokoyama, N. N., Waterman, M. L. (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* 25, 7492-7504.

Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y. D., Giovannoni, L., Parnaud, G. and Berney, T. (2010). Unique Arrangement of α - and β -Cells in Human Islets of Langerhans. *Diabetes* **59**,1202-10.

Bouwens, L. and Rooman, I. (2005). Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass. *Physiol Rev* 85, 1255-70.

Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P., and Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 2334-9.

Carvalho, C. P., Oliveira, R. B., Britan, A., Santos-Silva, J. C., Boschero, A. C., Meda, P., Collares-Buzato, C. B. (2012). Impaired β -cell- β -cell coupling mediated by Cx36 gap junctions in prediabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**, 144-5

Carvalho, C. P., Barbosa, H. C., Britan, A., Santos-Silva, J. C., Boschero, A. C., Meda, P. and Collares-Buzato, C. B. (2010). Beta cell coupling and connexin expression change during the functional maturation of rat pancreatic islets. *Diabetologia* 53, 1428-37.

Carvalho, C. P. (2009). Perda da comunicação intercelular mediada pelas junções comunicantes no mecanismo de secreção de insulina em modelo in vivo de maturação e disfunção do pâncreas endócrino. *Tese de Doutorado*. UNICAMP.
Carvalho, C. P., Martins. J. C., Da Cunha, D. A., Boschero, A. C. and Collares-Buzato C. B. (2006). Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islet tissue during in vivo maturation of rat pancreas. *Ann. Anat* 188, 221-234.

Cirulli, V., Halban, P. A., Roiller, D. G. (1993). Tumor Necrosis Factor-alpha modifies adhesion properties of rat islets B-cells. *J. Clin. Invest* **91**, 1868-1876.

Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-80.

Collares-Buzato, C.B. (2013). Junções Celulares. *In:* A Célula. Eds: Carvalho, H.F. & Recco-Pimentel, S.M. Editora Manole, Barueri, pp. 92-112.

Collares-Buzato, C. B., Carvalho, C. P., Furtado, A. G., Boschero, A. C. (2004). Upregulation of the expression of tight and adherens junction-associated proteins during maturation of neonatal pancreatic islet in vitro. *J Mol Histol* **35**, 811-822.

Collares-Buzato, C. B., Leite, A. & Boschero, A. C. (2001). Modulation of gap and adherens junctional proteins in cultured pancreatic islets. *Pancreas* 23, 177-185.

Conget, I., Fernandez, Real. J. M., Costa, A., Casamitjana, R., Ricart, W. (2001) Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance in a group of subjects at a high risk for type 2 diabetes mellitus. *Med Clin (Barc)* **116**, 491-92.

Coronel-Cruz, C., Hernández-Tellez, B., López-Vancell, R., López-Vidal, Y., Berumen, J., Castell, A., Pérez-Armendariz, E. M. 2013. Connexin 30.2 is expressed in mouse pancreatic bet cells. *Biochem Biophys Res Commun* 6, 772-7.

Cozar-Castellano, I., Fiaschi-Taesch, N., Bigatel, T. A., Takane, K. K., Garcia-Ocaña, A., Vasavada, R., Stewart, A. F. (2006) Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic beta-cell. *Endocr Rev* 27, 375-70

Dalgaard, L. T., Billestrup, N., Nielsen, J. H. (2008). STAT5 activity in pancreatic β cells. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* **3**, 423-39.

Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C. J., Barres, B. A. (2009). Wnt/B-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiosenesis. *PNAS*. **106**, 641-46.

Del Prato, S. (2009). Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabet Med* **26**, 1185-92.

Ding, V. W., Chen, R. H., McCormick, F. (2000). Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling. *J Biol Chem* **275**, 32475-81.

Ding, Y., Xi. Y., Chen, T., Wang, J. Y., Tao, D. L., Wu, Z. L., Li, Y. P., Li, C., Zeng, R., Li, L. (2008). Caprin-2 enhances canonical Wnt signaling through regulating LRP5/6 phosphorylation. *The Journal of cell biology* **182**, 865-72.

Ding, Y. L., Wang, Y. H., Huang, W., Liu, G., Ross, C., Hayden, M. R. and Yang, J. K. (2010). Glucose intolerance and decreased early insulin response in mice with severe hypertriglyceridemia. *Exp Biol Med (Maywood)* **235**, 40-6.

Doble, B. W., and Woodgett, J. R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science* **116**, 1175-86.

Ekblad, E. and Sundler, F. (2002). Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. *Peptides* **23**, 251-61.

Eldar-Finkelman, H., Schreyer, S. A., Shinohara, M. M., LeBoeuf, R. C., Krebs, E. G. (1999). Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes* **48**, 1662-6.

Figeac, F. B. U., Faro, M., Chelali, N., Portha, B., Movassat, J. (2009) Neonatal growth and regeneration of β -cells are regulated by the Wnt/ β -catenin signaling in normal and diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**, 245-56.

Finegood, D. T., Scaglia, L., Bonner-Weir, S. (1995). Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44, 249-56.

Ghaisas, M., Navghare, V., Takawale, A., Zope, V., Tanwar, M. and Deshpande, A. (2009). Effect of Tectona grandis Linn. on dexamethasone-induced insulin resistance in mice. *J Ethnopharmacol* **122**, 304-7.

Guyton, A. C. (2006). Textbook of medical physiology. Elsevier Saunders, pp. 960-70.

He, X., Semenov, M., Tamai, K., Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131, 1663-77.

Hellerström, C., Andersson, A., Groth, C. G., Sandler, S., Jansson, L., Korsgren, O., Swenne, I., Petersson, B., Tollemar, J., Tydén, G. (1988). Experimental pancreatic transplantation in diabetes. *Diabetes Care* 11, 45-53.

Hollingdal, M., Juhl, C. B., Pincus, S. M., Sturis, J., Veldhuis, J. D., Polonsky, K. S., Pørksen, N. and Schmitz, O. (2000). Failure of Physiological Plasma Glucose Excursions to Entrain High-Frequency Pulsatile Insulin Secretion in Type 2 Diabetes. *Diabetes* **49**, 1334-40.

Hong, E. G., Noh, H. L., Lee, S. K., Chung, Y. S., Lee, K. W. and Kim, H. M. (2002). Insulin and glucagon secretions, and morphological change of pancreatic islets in OLETF rats, a model of type 2 diabetes mellitus. *J Korean Med Sci* **17**, 34-40.

Huang, Y., Kim, S. O., Yang, N., Jiang, J., Frank, S. J. (2004). Physical and functional interaction of growth hormone and insulin-like growth factor-1 signaling elements. *Mol Endocrinol* **18**, 1471-85.

Inuwa, I. M. and El Mardi, A. S. (2005). Correlation between volume fraction and volume-weighted mean volume, and between total number and total mass of islets in post-weaning and young Wistar rats. *J. Anat* 206, 185-92.

Janssen, S. W., Hermus, A. R., Lange, W. P., Knijnenburg, Q., van der Laak, J. A., Sweep, C. G., Martens, G. J. and Verhofstad, A. A. (2001). Progressive histopathological changes in pancreatic islets of Zucker Diabetic Fatty rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109, 273-82.

Jin, T. (2008). The WNT signallig pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* **51**, 1771-80.

Jonietz, E. (2012). Cause and effect: Decades of study into the causes of diabetes have produced no definitive answers. *Nature* **485**, 10-11.

Kahn, S. E., Hull, R. L. and Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 14, 840-6.

Kanno, T., Gopel, S. O., Rorsman, P. and Wakui, M. (2002). Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on alpha-, beta- and delta-cells of the pancreatic islet. *Neurosci Res* **42**, 79-90.

Kim, J. Y., Lim, D. M., Moon, C. I., Jo K. J., Lee, S. K., Baik, H. W., Lee, K. H., Lee, K. W., Park, K. Y., Kim, B, J. (2010). Exendin-4 Protects Oxidative Stress-Induced β-Cell Apoptosis through Reduced JNK and GSK3β Activity. *J Korean Med Sci* **25**, 1626-32.

Kim, W., Kim, M. and Eek-Hoon J. H. O. (2013). Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J* **15**, 9-21.

Kühl, M. 2004. The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front. Biosci* **9**,967-74.

Kushner, J. A., Ciemerych. M. A., Sicinska, E., Wartschow, L. M., Teta, M., Long, S. Y., Sicinski, P., White, M. F. (2005). Cyclins D2 and D1 Are Essential for Postnatal Pancreatic β-Cell Growth. *Mol Cell Biol* **25**, 3752-62.

Krützfeldt, J., and Stoffel, M. (2010). Regulation of wingless-type MMTV integration site family (WNT) signalling in pancreatic islets from wild-type and obese mice. *Diabetologia* 53, 123-27.

Lackey, D. E., Burk, D. H., Ali, M. R., Mostaedi, R., Smith, W. H., Park, J., Scherer, P. E., Seay, S. A., McCoin, C. S., Bonaldo, P., Adams, S. H. (2013). Contributions of adipose tissue architectural and tensile properties toward defining healthy and unhealthy obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (Vol. no. DOI: 10.1152/ajpendo. 00476.2013.

Langenbacher, A., and Chen, J. 2008. Calcium Signaling: A Common Thread in Vertebrate Left–Right Axis Development. *Developmental Dynamics* 237, 3491-96.

Lee, Y. C. and Nielsen, J. H. (2009). Regulation of beta cell replication. *Molecular and Cellular Endocrinology* 29, 18-27.

Leite, A. R., Carvalho, C. P., Furtado, A. G., Barbosa, H. C., Boschero, A. C. and Collares-Buzato, C. B. (2005). Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets. *Can J Physiol Pharmacol* 83, 142-51.

Leung, J. Y., Kolligs, F.T., Wu, R., Zhai, Y., Kuick, R., Hanash, S., Cho, K. R., Fearon, E. R. (2002) Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *J Biol Chem* 277, 21657-65.

Levine, F. and Itkin-Ansari. P. (2008). β -cell regeneration: Neogenesis, replication or both? *J Mol Med* **86**, 247-58.

Li, F., Chong, Z. Z., Maiese, K. (2005). Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Curr Neurovasc Res.* **2**, 331-40.

Liew, C. G. & Andrews, P. W. (2008). Stem cell therapy to treat Diabetes Mellitus. *The Review of Diabetic Studies* 5, 203-19.

Liu, Y., Tanabe, K., Baronnier, D., Patel, S., Woodgett, J., Cras-Méneur, C., Permutt, M. A. (2010). Conditional ablation of GSL- 3β in islet beta cells results in expanded mass an resistance to fat feeding induced diabetes in mine. *Diabetologia* **53**, 2600-10.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402-8.

Logan, C. Y. and Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20, 781-810.

Lyssenko, V., Lupi, R., Marchetti, P., Del Guerra, S., Orho-Melander, M., Almagren, P., Sjögren, M., Limg, C., Tuomi, T., Nilsson, P., Del Prato, S., Groop, L. (2007). Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest* **117**, 2155-63.

MacDonald, B. T., Tamai, K., He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* **17**, 9-26.

Mao, C. D. and Byers, S. W. (2011). Cell-Context Dependent TCF/LEF Expression and Function: Alternative Tales of Repression, De-Repression and Activation *Potentials. Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **21**, 207-36.

McEvoy, R. C., Leung, P. E., Goggins, J. A. (1981). Tissue culture of fetal rat islets: corticosterone promotes D cell maintenance and function. *Endocrinology* **108**, 2277-82.

Metcalfe, C. and Bienz, M. (2011). Inhibition of GSK3 by Wnt signaling – two contrasting models. *Journal of Cell Science* **124**, 3537-44.

Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V., Kaykas, A. 2004. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5, 691-701.

Murtaugh, L. C. (2008). The what, where, when and how of Wnt/beta-catenin signaling in pancreas development. *Organogenesis* **4**, 81-6.

Nikoulina, S. E., Ciaraldi, T. P., Mudaliar, S., Mohideen, P., Carter, L., Henry, R. R. (2000). Potential Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in Skeletal Muscle Insulin Resistance of Type 2 Diabetes. *Diabetes* **49**, 263-71.

Oliveira, R. B. (2011). Proliferação e disfunção da célula beta pancreática em modelo animal de diabetes melito tipo 2. Envolvimento da via de sinalização Wnt/beta-catenina. *Dissertação de Mestrado*. UNICAMP.

Orci, L. (1976). The microanatomy of the islets of Langerhans. *Metabolism* 25, 1303-13.

Orci, L.; Malisse-Lagae, F.; Amherdt, M. (1975). Cell contacts in human islets of Langerhans. J. Clin. Endocrinol. Metab 41, 841-4.

Ozawa, M., Baribault, H., Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO* **8**, 1711-7

Pappan, K. L., Pan, Z., Kwon, G., Marshall, C.A., Coleman, T., Goldberg, I. J., McDaniel, M. L., and Semenkovich, C. F. (2005). Pancreatic β -Cell Lipoprotein Lipase Independently Regulates Islet Glucose Metabolism and Normal Insulin Secretion. *J. Biol. Chem* **280**, 9023-29.

Peifer, M., McCrea, P. D., Green, K. J., Wieschaus, E., Gumbiner, B. M. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol* **118**, 681-91.

Pharm, S. A. M, Ghosh, B., Al-Dhubiab, B. E., Nair, A. B. (2013) Understanding type 1 diabetes: etiology and models. *Can J Diabete* **37**, 269-76

Prentki, M. and Nolan, C. J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. J Clin Invest

116, 1802-12.

Rayasam, G. V., Tulasi, V. K., Sodhi, R., Davis, J. A., Ray, A. (2009). Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol* **15**, 885-98.

Rhodes, C. J. (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307, 380-4.

Rulifson, I. C., Karnik, S. K., Heiser, P. W., et al. (2007). Wnt signaling regulated pancreatic beta cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 104, 6247-52.

Santos-Silva, J. C., Carvalho, C. P., de Oliveira, R. B., Boschero, A. C., Collares-Buzato, C. B. (2012). Cell-to-cell contact dependence and junctional protein content are correlated with in vivo maturation of pancreatic beta cells. *Can J Physiol Pharmacol* **90**, 837-50.

Shoelson, S. E., Lee, J. and Goldfine, A. B. (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* **116**, 1793-801.

Sone, H. and Kagawa, Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* **48**, 58-67.

Stamos, J. L. and Weis, W. I. (2013). The b-Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a007898.

Tahara, A., Matsuyama-Yokono, A. and Shibasaki, M. (2011). Effects of antidiabetic drugs in high-fat diet and streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol* **655**, 108-16.

Tanabe, K., Liu, Y., Hasan, S. D., Martinez, S. C., Cras-Méneur, C., Welling, C. M., Bernal-Mizrachi, E., Tanizawa, Y., Rhodes, C. J., Zmuda, E., Hai, T., Abumrad, N. A., Permutt, M. A. (2011). Glucose and fatty acids synergize to promote β -cell apoptosis through activation of glycogen synthase kinase 3β independent of JNK activation. *PLoS One* **26**, e18146.

Teta, M., Long, S. Y., Wartschow, L. M., Rankin, M. M., Kushner, J. A. (2005). Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* 54, 2557-67.

Thompson, D. M. and Monga, S. P. S. (2007). Wnt/ β -catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* **45**, 1298-1305.

Tripathy, D. and Chavez, A. O. (2010). Defects in insulin secretion and action in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* **10**, 184-91.

Zaidel-Bar, R. (2013). Cadherin adhesome at a glance. *Journal of Cell Science* **126**, 373-78.

Yesil, P. and Lammert, E. (2008). Islet dynamics: A glimpse at beta cell proliferation. *Histol Histopathol.* **23**,883-895.

Wells, J. M., Esni, F., Boivin, G. P., Aronow, B. J., Stuart, W., Combs, C., Sklenka, A., Leach, S. D. and Lowy, A. M. (2007). Wnt/beta-catenin signaling is required for development of the exocrine pancreas. *BMC Dev Biol* 7, 4.

Welters, H. J. and Kulkarni, R. N. (2008). Wnt signalling: relevance to β -cell biology and diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **19**, 349-355.

Winzell, M. S. and Ahrén, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3, S215-9.

Wong, H. Y., Ahrén, B., Lips, C. J., Höppener, J. W. and Sundler, F. (2003). Postnatally disturbed pancreatic islet cell distribution in human islet amyloid polypeptide transgenic mice. *Regul Pept* **113**, 89-94.

ANEXOS

Anexo 1 - Gráfico de Teste de Tolerância à Insulina (ITT). No gráfico, a curva preta corresponde ao grupo (Ct) e a curva azul ao grupo (DHL).



Anexo 2 - Gráficos de Amplificação, Curva Padrão e Curva de *Melting* para cada um dos genes (proteínas) estudados: *Ctnnb1* (β -Catenina), *CcnD1* (Ciclina D1), *Myc* (c-Myc) e *Actb* (β -actina), respectivamente.



Ctnnb1 (β-Catenina)

CcnD1 (Ciclina D1)



Myc (c-Myc)



Actb (β-actina) Melt Curve 16000 14000.0 12000. Reporter 8000.1 Derivative 6000 4000 2000.0 N. 75.0 80.0 Temperature (*C) 90.0 85.0 Tm: 84.87 95.0 65 0

Anexo 3 - Protocolo de Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA/UNICAMP (Protocolo no. 2815-1).

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado "Possível ativação da via de sinalização da Wnt/β-catenina no processo de hiperplasia compensatória da célula beta pancreática em modelo animal de resistência periférica à insulina"

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição:

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. <u>2815-1</u>, Instituição: <u>Instituto de</u> <u>Biologia da Universidade Estadual de Campinas</u> (IB/UNICAMP)

(

) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

-	Aluna: Daniela Aparecida Maschio	-
	(El ally Say 6	_
Or	ientadora: Carla Beatriz Collares Buzat Prota. Dra. Carla 8. Collares Buzato	to
	Depto. de Histologia e Embriologi Instituto de Biologia	8
Para uso da Comissão ou Com (X) Deferido () Indeferido	nitê pertinente:	
Carimbo e assinatura	Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODINGUES DE OLIVEIRA Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP	
Para uso da Comissão ou Com () Deferido () Indeferido	hitê pertinente:	A second se
Carimbo e assinatura		