

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Junia Carolina Rebelo dos Santos Silva

“Expressão e distribuição celular de proteínas associadas às junções intercelulares no pâncreas endócrino durante o desenvolvimento animal e na diabetes tipo 2”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Junia Carolina Rebelo dos Santos Silva

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Carla Beatriz Collares Buzato

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Histologia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Silva, Junia Carolina Rebelo dos Santos

Si38e

Expressão e distribuição celular de proteínas associadas às junções intercelulares no pâncreas endócrino durante o desenvolvimento animal e diabetes tipo 2 / Junia Carolina Rebelo dos Santos Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Carla Beatriz Collares Buzato.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Célula beta pancreáticas. 2. Insulina - Secreção. 3. Células - Diferenciação. 4. Diabetes Mellitus Tipo 2. 5. Junções intercelulares I. Collares-Buzato, Carla Beatriz. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Cellular expression and distribution of intercellular junctional proteins in rodent endocrine pancreas during animal development and type 2 diabetes.

Palavras-chave em inglês: Pancreatic cells beta; Insulin – Secretion; Cell differentiation; Type 2 Diabetes Mellitus; Intercellular junctions.

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Carla Beatriz Collares Buzato, Sílvia Cristina Crepaldi Alves, Paulo Pinto Joazeiro.

Data da defesa: 23/03/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 23 de Março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato (Orientadora)



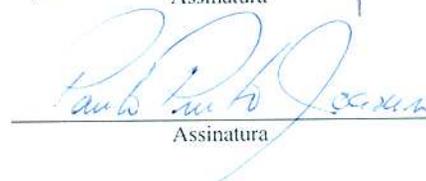
Assinatura

Profª. Dra. Sílvia Cristina Crepaldi Alves



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro



Assinatura

Profª. Dra. Maria Esméria Corezola do Amaral

Assinatura

Profª. Dra. Ivanira José Bechara

Assinatura

*Àqueles que sempre foram
e serão fonte de inspiração:
mamãe e papai*

Agradecimentos

À **Deus**, acima de tudo, que sempre está a frente do meu caminho e que dá forças para que todos os objetivos sejam alcançados.

À minha família, especialmente à minha **mãe**, aos meus irmãos **Jorge** e **Jadson** e suas esposas **Eliana** e **Adriana**, minha prima **Lya**, que sempre apóiam minhas decisões, além de orarem por mim, me indicarem os melhores caminhos a seguir e serem fontes inesgotáveis de carinho.

Ao meu marido **Felipe**, pelo carinho, apoio e ajuda constante. “Carro sem estrada, queijo sem goiabada” eu seria, se você não estivesse comigo!

À minha orientadora, **Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato**, pela atenção, boa vontade, paciência, disponibilidade, dedicação e orientação segura. Os ensinamentos que aprendi com você serão levados para o resto da minha vida.

Às minhas amigas sempre presentes e pacientes **Carolina**, **Marol**, **Débora**, **Carla**, **Catarina**, **Karina** e **Maria Amália**. Vocês fizeram os últimos anos muito mais alegres e coloridos! Com vocês a palavra amizade ganha vida e significado.

Aos amigos **Marta Leonardo**, **Ricardo**, **Juliana**, **Elisa** e **Carlinha** pelo agradável convívio no laboratório e ajuda muitas vezes prestada. Mesmo alguns distantes fisicamente, estão sempre perto do meu coração!

Aos amigos que são e foram do laboratório de Ultra-estrutura Celular, **Érika**, **Ângela**, **Thalita**, **Karina**, **Paulo** e **Stefânia** pelo companheirismo e auxílio sempre prestados.

Aos amigos de graduação, de quem sempre lembro e sinto saudades, **Matheus “Tigrão”**, **Lívia Mendes**, **Carolina “Xoxolinha”**, **Thaís Thalita**, **Amanda Olívia** e **Raquel “Lôra”**.

Aos professores do departamento de Histologia e Embriologia, Profa. **Maria Alice**, Prof. **Paulo**, Prof. **Áureo**, Profa. **Lúcia**, Prof. **Luis**, Profa. **Sarah** e Profa. **Ivanira** por permitirem o uso de seus laboratórios e equipamentos, além do muito que me ensinaram! Vou sentir muita falta de nossas conversas, Prof. Paulo!

Ao **Prof. Boschero** e **Prof. Everardo**, por permitirem o uso irrestrito aos seus laboratórios, equipamentos e reagentes. Agradeço também aos colegas do laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo pela ajuda muitas vezes oferecida, além da amizade e atenção constantes, **Rosane**, **Priscilla**, **Thiago**, **Flávia**, **Heleninha**, **Leli**, **Daniela**, **Gabriel**, **Marise** e **Léscio**.

Aos alunos, funcionários e amigos do Departamento de Histologia e Embriologia, **Sílvio**, **Patrícia**, **Juvani**, **Lucimara**, **Patrick**, **Claudinha**, **Eliana**, **Renata**, **Juares**, **Denner**, **Marília**, **Mariana**, **Aline**, **Bia**, **Paula**, **Ritinha**, **Dona Raquel** e **Baltazar** pelo coleguismo e convívio respeitoso e amigável.

Aos colegas de pós-graduação e aos “visitantes” do laboratório **Stênio, Ana Paula, Manoel, Juliana Godoy, Danilo, Rony e Buja**, pelas risadas no meio do dia, pela companhia na hora do estudo e pelo apoio e ajuda nos pepinos do dia-a-dia.

Às minhas fiéis companhias de madrugada, **Chiara, K-tita** e o sumido **Pipe**, por me alegrarem nas noites de insônia e de trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, representado pela **Profa. Laurecir Gomes**, pela coordenação segura e impecável e à querida **Lilium Panagio**, por toda atenção, carinho e paciência dedicados. Sempre muito solícita e pronta a atender. Você se tornou uma amiga para mim!

À **Universidade Estadual de Campinas** pelas oportunidades de aprendizado, de crescimento profissional e pessoal, além de espaço e condições de trabalho concedidas.

À **CAPES/PROEX, CNPq e Fapesp** pelo apoio financeiro concedidos.

RESUMO

As junções intercelulares são especializações da membrana plasmática através das quais células dentro de um tecido podem interagir e aderirem-se umas às outras. Nas ilhotas pancreáticas, as diferentes células endócrinas se interconectam por meio das junções de oclusão, comunicante, aderente e desmossomos. Tais contatos intercelulares parecem ser cruciais para o perfeito funcionamento deste órgão, porém, pouco se sabe sobre a função fisiopatológica e composição das junções intercelulares no pâncreas endócrino. O objetivo geral desta dissertação foi estudar a importância funcional da adesão e reconhecimento celular mediados pelas junções de oclusão (JO) e de adesão (JA) nos processos de maturação e disfunção da célula beta do pâncreas endócrino, ao longo do desenvolvimento do animal e na patogênese da diabetes tipo 2, respectivamente. Nossos dados mostram que as ilhotas de fetos e recém-nascidos de ratos Wistar, cuja resposta secretora de insulina à glicose é significativamente menor, apresentam uma morfologia menos organizada, caracterizada por um formato menos definido e uma associação mais freqüente com ductos, quando comparadas às ilhotas de jovens e adultos, que são responsivas à esse secretagogo. Na ausência de contato intercelular, quando as células das ilhotas de adultos foram dispersas, a resposta secretora de insulina foi completamente inibida, porém parcialmente restabelecida quando as células foram reagregadas. Quando comparado às ilhotas de adultos, o impacto da ausência de contatos intercelulares sobre a resposta secretora de insulina à glicose foi consideravelmente menor no caso das ilhotas de ratos recém-nascidos. A imunofluorescência para N-CAM e pan-caderina revelou uma distribuição diferencial destas moléculas de adesão somente nas células das ilhotas pancreáticas de jovens e adultos, o que pode estar relacionada com a citoarquitetura típica (células beta, ocupando a região central e os outros tipos celulares na periferia da ilhota) adquirida no período pós-natal. Das proteínas associadas à JA e JO estudadas, α - e β -cateninas e ZO-1 (mas não a ocludina) foram expressas nas células endócrinas das ilhotas de todos os grupos experimentais. De forma geral, a imunofluorescência para tais proteínas revelou uma marcação intercelular menos definida nas células beta de ilhotas de recém-nascidos e fetos em comparação com os animais jovens e adultos. Isto pode indicar uma menor interação/adesão celular, que por sua vez, pode estar relacionada com a resposta secretora deficitária de insulina das ilhotas pancreáticas verificada na fase perinatal. Como modelo de diabetes do tipo 2, utilizamos camundongos C57, machos, alimentados com dieta hiperlipídica por 8 meses desde os 21 dias de idade. Após este período em dieta, os animais tornaram-se obesos e pré-diabéticos, apresentando moderada hiperglicemia e significativa hiperinsulinemia ao final desta dieta. Não observamos diferenças morfológicas marcantes entre os grupos e nem alterações significativas na distribuição intercelular da ZO-1, α - e β -cateninas nas ilhotas do grupo tratado em comparação ao grupo controle. Entretanto, verificou-se uma maior marcação intercelular para E-caderina e uma maior associação de F-actina à membrana na região de contato intercelular nas células endócrinas das ilhotas do grupo pré-diabético em relação ao controle. Em conclusão, os contatos intercelulares mediados pelas proteínas associadas à JA e à JO parecem desempenhar um papel no processo de maturação do pâncreas do endócrino durante o desenvolvimento animal e na patogênese da diabetes do tipo 2.

ABSTRACT

Intercellular junctions are specializations of the plasma membrane that allow cells within a tissue to interact and adhere to each other. In endocrine pancreas, the different endocrine cells are interconnected by tight, gap and adherens-type junctions. Such intercellular contacts seem to be crucial for the function of this organ, however, little is known about the pathophysiological role and biochemistry of intercellular junctions in the endocrine pancreas. The aim of this thesis was to study the importance of cell-cell recognition and adhesion mediated by proteins associated to tight and adherens junctions in pancreatic islets, with emphasis on the process of insulin secretion, along the animal development and in pathogenesis of type 2 diabetes. Pancreatic islets of foetuses (F) and newborn (N) Wistar rats, that display a relatively poor insulin secretory response to glucose, present an immature morphology and a less defined cytoarchitecture when compared to islets from young (Y) and adult (A) rats, that are responsive to glucose. The immunofluorescence for N-CAM and pan-cadherin, adhesion molecules that are important in cell segregation, revealed a differential distribution of these proteins only in cells of the islets from Y and A. A lower junctional content of α - and β -catenins and ZO-1 in islet cells was seen in F and N in comparison with Y and A. In addition, we found that in the absence of intercellular contact, the glucose-stimulated insulin secretion was completely blocked in A islets. In contrast, the impact of the disruption of cell-cell adhesion on insulin secretory response of N islets was relatively small. As a model of type 2 diabetes, we employed male C57 mice, fed on high-fat (HF) diet for 8 months since they were 21 days old. After HF diet, these mice became obese and pre-diabetic (displaying moderate hyperglycemia and marked hyperinsulinaemia). We did not observe marked differences either in morphology either in the intercellular distribution of ZO-1, α - and β -catenins in islets between the HF-treated and control groups. However, there was a stronger immunoreaction for E-cadherin at the cell-cell contact site and an increased association of F-actin to the plasma membrane of islet endocrine cells from pre-diabetic mice as compared to control ones. In conclusion, the intercellular contacts mediated by adherens and tight junction and their constitutive proteins seem to play a role in the developmental maturation of the endocrine pancreas and in the pathogenesis of type 2 diabetes.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO À DISSERTAÇÃO	12
1.1. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	12
1.2. INTRODUÇÃO AO TEMA DA DISSERTAÇÃO	12
1.2.1. <i>Interação Célula-Célula e Célula-Matriz</i>	12
1.2.2. <i>Estrutura e bioquímicas das junções intercelulares</i>	13
1.2.3. <i>Funções fisiopatológicas das junções intercelulares</i>	17
1.2.4. <i>Junções Intercelulares e o pâncreas endócrino</i>	20
1.3. OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO	23
1.4. JUSTIFICATIVA	23
CAPÍTULO 2 – PAPEL DO CONTATO INTERCELULAR MEDIADOS PELAS JUNÇÕES DE OCLUSÃO E ADERENTE NO PROCESSO DE MATURAÇÃO DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA DURANTE O DESENVOLVIMENTO	25
2.1. INTRODUÇÃO	25
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.2.1. <i>Animais</i>	26
2.2.2. <i>Avaliação morfológica do pâncreas endócrino</i>	26
❖ <i>Histologia do pâncreas</i>	26
❖ <i>Imuno-histoquímica para insulina e glucagon</i>	27
2.2.3. <i>Imunolocalização das proteínas juncionais</i>	27
2.2.4. <i>Isolamento e cultivo de ilhotas pancreáticas</i>	29
2.2.5. <i>Western Blot</i>	29
2.2.6. <i>Secreção estática de insulina</i>	30
2.2.7. <i>Radioimunoensaio</i>	32
2.2.8. <i>Análise estatística</i>	32
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
2.3.1. <i>Secreção estática de insulina das ilhotas pancreáticas de ratos durante o desenvolvimento</i>	33
2.3.2. <i>Morfologia e citoarquitetura das ilhotas pancreáticas de ratos durante o desenvolvimento</i>	33
2.3.3. <i>Papel do contato intercelular na maturação in vivo da célula beta</i>	35
2.3.4. <i>Distribuição e conteúdo celular de proteínas associadas à junção de oclusão nas ilhotas pancreáticas de ratos durante o desenvolvimento</i>	37
2.4. FIGURAS DO CAPÍTULO	45

CAPÍTULO 3 – DISTRIBUIÇÃO E CONTEÚDO CELULAR DE PROTEÍNAS JUNCIONAIS EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE CAMUNDONGOS PRÉ-DIABÉTICOS.	57
3.1 INTRODUÇÃO	57
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.2.1. <i>Animais</i>	58
3.2.2. <i>Dieta hiperlipídica</i>	58
3.2.3. AVALIAÇÃO METABÓLICA DO MODELO DE DIABETES TIPO 2	59
❖ <i>Peso e glicemia</i>	59
❖ <i>Concentração plasmática de insulina</i>	59
3.2.4. <i>Avaliação morfológica do pâncreas endócrino</i>	59
❖ <i>Histologia do pâncreas</i>	59
❖ <i>Imunolocalização das proteínas juncionais no pâncreas endócrino</i>	60
3.2.5. <i>Avaliação do grau de marcação por fluorescência</i>	61
3.2.6. <i>Análise Estatística</i>	61
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.3.1. <i>Caracterização metabólica dos animais e análise morfológica das ilhotas pancreáticas</i>	62
3.3.2. <i>Distribuição celular de proteínas associadas às junções intercelulares nas ilhotas pancreáticas dos animais pré-diabéticos.</i>	64
3.5. FIGURAS DO CAPÍTULO	67
 CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES	 80
 CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 82

Lista de Figuras

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PROTEÍNAS INTEGRANTES E ASSOCIADAS ÀS JUNÇÕES INTERCELULARES CONSTITUINTES DO COMPLEXO UNITIVO.....	16
FIGURA 2. SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA EM ILHOTAS DE RATOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	45
FIGURA 3. ASPECTO MORFOLÓGICO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO.....	46
FIGURA 4. PADRÃO DE CITOARQUITETURA DO PÂNCREAS ENDÓCRINO DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	47
FIGURA 5. SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA EM ILHOTAS INTACTAS, CÉLULAS DISPERSAS E CÉLULAS REAGREGADAS DE RATOS ADULTOS.....	48
FIGURA 6. SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA EM ILHOTAS E EM CÉLULAS DISPERSAS E CÉLULAS REAGREGADAS DE RATOS RECÉM-NASCIDOS.....	49
FIGURA 7. SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA EM ILHOTAS E EM CÉLULAS DISPERSAS DE RATOS RECÉM-NASCIDOS MANTIDOS EM CULTURA POR 10 DIAS.....	50
FIGURA 8. EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DE OCLUDINA EM ILHOTAS DE RATOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	51
FIGURA 9. EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DE ZO-1 EM ILHOTAS DE RATOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	52
FIGURA 10. EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DE N-CAM EM ILHOTAS DE RATOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	53
FIGURA 11. EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DE PAN-CADERINA EM ILHOTAS DE RATOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	54
FIGURA 12. EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DE A-CATENINA EM ILHOTAS DE RATOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	55
FIGURA 13. EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DE B-CATENINA EM ILHOTAS DE RATOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	56
FIGURA 14. PESO CORPÓREO DOS CAMUNDONGOS CONTROLE (ALIMENTADOS COM RAÇÃO PADRÃO) E TRATADO (ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA, DHL).....	67
FIGURA 15. GLICEMIA DE JEJUM EM CAMUNDONGOS CONTROLE (ALIMENTADOS COM RAÇÃO PADRÃO) E SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA (DHL).....	68
FIGURA 16. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE INSULINA DE CAMUNDONGOS CONTROLE (ALIMENTADOS COM RAÇÃO PADRÃO) E SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA.....	69
FIGURA 17. ASPECTO MORFOLÓGICO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS DE CAMUNDONGOS CONTROLE (ALIMENTADOS COM RAÇÃO PADRÃO) E SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA.....	70
FIGURA 18. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA ZO-1 E INSULINA EM ILHOTAS DE CAMUNDONGOS CONTROLES E PRÉ-DIABÉTICOS.....	71
FIGURA 19. QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DE ZO-1 NO MODELO DE PRÉ-DIABETES.....	72
FIGURA 20. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA A-CATENINA EM ILHOTAS DE CAMUNDONGOS CONTROLES E PRÉ-DIABÉTICOS.....	73
FIGURA 21. QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DE A-CATENINA NO MODELO DE PRÉ-DIABETES.....	74
FIGURA 22. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA B-CATENINA EM ILHOTAS EM ILHOTAS DE CAMUNDONGOS CONTROLES E PRÉ-DIABÉTICOS.....	75
FIGURA 23. QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DE B-CATENINA NO MODELO DE PRÉ-DIABETES.....	76
FIGURA 24. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA E-CADERINA EM ILHOTAS DE CAMUNDONGOS CONTROLES E PRÉ-DIABÉTICOS.....	77
FIGURA 25. QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DE E-CADERINA NO MODELO DE PRÉ-DIABETES.....	78
FIGURA 26. DISTRIBUIÇÃO DE F-ACTINA EM ILHOTAS DE CAMUNDONGOS CONTROLES E PRÉ-DIABÉTICOS.....	79

Capítulo 1 – Introdução à Dissertação

1.1. Estrutura da dissertação

Esta dissertação está estruturada em cinco capítulos. Este capítulo apresenta uma introdução ao tema central da dissertação: as junções intercelulares e sua importância na fisiologia do pâncreas endócrino, em especial na biologia da célula beta pancreática. Os resultados obtidos estão apresentados nos capítulos 2 e 3. O capítulo 2 descreve os resultados referentes ao estudo do papel do contato intercelular mediado pelas junções de oclusão e aderente no processo de maturação da célula beta ao longo do desenvolvimento do animal. O capítulo 3 mostra os dados de imunolocalização de proteínas juncionais no pâncreas endócrino no modelo animal de diabetes melito tipo 2. As conclusões gerais desta dissertação estão apresentadas no capítulo 4. O capítulo 5 lista as referências bibliográficas citadas nos capítulos 1, 2 e 3.

1.2. Introdução ao tema da dissertação

1.2.1. Interação Célula-Célula e Célula-Matriz

As células de organismos multicelulares comunicam-se, aderem-se e enviam sinais para células que estão próximas, além de interagir com a matriz extracelular. Esta interação é dada através de especializações da membrana plasmática denominadas **junções celulares** que se dividem em duas categorias: as junções intercelulares e junções célula-matriz.

As estruturas responsáveis pela associação da célula com a matriz são os hemidesmossomos e a junção de adesão focal, enquanto as estruturas envolvidas com a associação célula-célula são as junções aderente, comunicante, de oclusão e desmossomos (Gallant e García, 2007; Pokutta e Weis, 2007).

Embora esses diferentes tipos de junções sejam bioquimicamente distintos, eles apresentam uma estrutura molecular análoga: proteínas integrais na membrana plasmática, cujo domínio molecular extracelular medeia a interação com proteínas homólogas nas células adjacentes ou com componentes da matriz extracelular, e o domínio molecular citoplasmático interage com componentes do citoesqueleto através de um complexo protéico (revisado por Ebneth, 2008).

As junções intercelulares, assim como as junções célula-matriz, são estruturas altamente dinâmicas e reguláveis, sofrendo alterações estruturais e funcionais sob condições experimentais e durante a vida da célula, como, por exemplo, durante a divisão e motilidade celular. Em adição à sua reconhecida função como dispositivos de adesão e comunicação, estudos recentes têm indicado que as junções intercelulares e suas proteínas estão associadas a diferentes tipos de vias de transdução de sinais intracelulares (Benmerah *et al.*, 2003; Matter & Balda, 2003; Conacci-Sorrell *et al.*, 2002). A idéia vigente é que as proteínas associadas às junções intercelulares funcionariam como transdutores de sinais extra e intracelulares, transmitindo e convertendo tais sinais no interior da célula e, assim, modulando a expressão gênica e vários processos celulares tais como diferenciação, motilidade, proliferação e morte celular (Luther *et al.* 2005; Li *et al.*, 2009; Luebke-Wheeler *et al.*, 2009).

Como o foco desta dissertação refere-se às junções aderente e de oclusão, as mesmas serão abordadas com mais detalhe nas seções a seguir.

1.2.2. Estrutura e bioquímicas das junções intercelulares

As junções intercelulares são definidas como uma série de especializações das membranas plasmáticas localizadas na região de contato entre duas células vizinhas (Diamond, 1977; Collares-Buzato, 2001).

Ultra-estruturalmente, distinguem-se quatro subtipos de junção intercelular: 1) a junção de oclusão (*zonula occludens* ou *tight junctions*), onde ocorre uma fusão aparente de folhetos externos das membranas plasmáticas de células adjacentes; 2) a junção aderente (*zonula* ou *fasciae adherens*), região especializada da membrana onde as duas membranas adjacentes estão alinhadas e próximas umas das outras, delimitando um espaço intercelular de 15 a 20 nm, e onde, na face citoplasmática, ocorre ancoragem dos microfilamentos do citoesqueleto; 3) o desmossomo (ou *maculae adherens*), junção na qual as membranas adjacentes aparecem como duas placas lineares, paralelas e elétrons-densas às quais se associam os filamentos intermediários do citoesqueleto e 4) a junção comunicante (ou *gap junction*), região de aproximação de membranas adjacentes onde se inserem uma coleção de canais intercelulares, que conectam os citoplasmas de duas células vizinhas (Collares-Buzato, 2001). No tecido

epitelial de revestimento, a junção de oclusão, a junção aderente e o desmossomo formam o chamado Complexo Unitivo, que representa um dispositivo de adesão intercelular (Collares-Buzato, 2001; Perez-Moreno *et al.*, 2003).

Dentre as junções intercelulares, as junções comunicantes são as únicas que não estão relacionadas à adesão, mas sim com a comunicação intercelular. As **junções comunicantes** são observadas, ao microscópio eletrônico, como uma região de aproximação, sem fusão, de membranas adjacentes, delimitando uma fenda intercelular. Devido ao seu perfil ultra-estrutural, esse tipo de junção foi denominada *gap junction* (do inglês, gap: fenda). Em réplicas de criofraturas, as junções comunicantes aparecem como um agrupamento de partículas intramembranas na face P da réplica e pequenas depressões complementares na face E. Essas estruturas correspondem ao conjunto de canais intercelulares reunidas em forma de placa ou disco.

Nesta junção, moléculas de conexina, proteína que compõe este tipo de junção, se arranjam num complexo hexagonal denominado conéxon, que delimita um hemi-canal central (Musil, 1994; Mese *et al.*, 2007). A junção comunicante resulta da interação de dois conéxons, cada um inserido na membrana de duas células adjacentes, com a formação de um canal intercelular hidrofílico que conecta os seus citoplasmas.

O canal central formado pela interação dos conéxons permite a passagem de íons, como Ca^{+2} , K^+ , Na^+ , Cl^- , H^+ e moléculas com massa molecular inferior a 1 kDa como monossacarídeos, aminoácidos, nucleotídeos e mensageiros intracelulares, tais como inositol trifosfato (IP_3) e monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Entretanto, tais canais impedem a passagem de proteínas, DNA, RNA e organelas celulares, de modo que as células conectadas pelas junções comunicantes são acopladas elétrica e metabolicamente, porém mantêm sua individualidade genética e estrutural (Collares-Buzato 2001; Mese *et al.*, 2007).

As **junções oclusão, aderente e desmossomos** estão envolvidas diretamente com a adesão intercelular. Embora bioquimicamente bem distintas entre si, elas apresentam uma estrutura molecular análoga. Cada unidade juncional é formada por proteínas transmembranas específicas que interagem com o citoesqueleto através de um complexo protéico associado à região citoplasmática da junção (Madara *et al.*, 1998).

A intercelular é mediada por uma variedade de proteínas de membrana, incluindo as caderinas clássicas, claudinas, ocludina e proteínas desmossômicas (Takeichi, 1995; Gumbiner, 2005; Takai e Nakanishi, 2003; Yamada e Nelson, 2007). As caderinas clássicas são necessárias para iniciar e manter a interação célula-célula, as proteínas da junção de oclusão controlam a difusão paracelular (Van Itallie e Anderson, 2006) e os desmossomos mantêm a continuidade estrutural do tecido (Getsios *et al.*, 2004).

A **junção aderente** e os desmossomos contêm moléculas de adesão dependentes de cálcio, pertencentes à super-família das caderinas (Geiger & Ayalon, 1992). No caso da junção aderente, em determinados tipos celulares, como no tecido neural, pode haver também a expressão de N-CAM, uma molécula de adesão intercelular pertencente à super-família das imunoglobulinas (Cirulli *et al.*, 1994).

A superfamília das caderinas, composta por mais de uma centena de subtipos, pode ser subdividida em seis subfamílias: as caderinas clássicas do tipo I (E-, N-, P-, R-caderinas), clássicas do tipo II (caderinas 6- a 12), as encontradas nos desmossomos (desmocollinas e desmogleínas), as com curto ou nenhum domínio citoplasmático (LI-, T-caderinas), as protocaderinas, encontradas principalmente no SNC e produtos de genes de supressão de tumores (Takeichi, 1994; Aberle, 1996; Yagi e Takeichi, 2000; Goodwin e Yap, 2004).

As caderinas são glicoproteínas de superfície com um domínio extracelular que difere entre os subtipos e promove o reconhecimento e coesão de células adjacentes, e um domínio citoplasmático conservado, que interage com filamentos do citoesqueleto (α -actina) por intermédio das cateninas (α , β , γ , p120), α -actinina e vinculina, no caso da junção aderente, e do complexo desmoplaquina/placoglobina, nos desmossomos (Knudsen *et al.*, 1995; Rimm *et al.*, 1995; Pokutta e Weis, 2000; Gumbiner, 2000; Huber *et al.*, 2001; Pokutta *et al.*, 2002; Jamora and Fuchs, 2002; Kobiela and Fuchs, 2004; Pokutta e Weis, 2007). Detalhe esquemático da junção aderente é mostrado na figura 1(c) e dos desmossomos na figura 1(d).

As proteínas integrais, denominadas ocludina e claudinas, são os principais constituintes da rede complexa de cordões de vedação que forma a **junção de oclusão**, responsáveis pelo contato íntimo entre células adjacentes (Furuse *et al.*, 1994 e 1998). Já as proteínas citoplasmáticas conhecidas como *zonula occludens* – as ZOs, a saber, ZO-1, ZO-2, ZO-3 -

(Gumbiner *et al.*, 1991), cingulina (Citi *et al.*, 1988), antígeno 7H6 (Zhong *et al.*, 1993) e simplequina formam um complexo protéico que liga as proteínas transmembranas (claudinas e olcludina) com os filamentos de actina do citoesqueleto associados à junção de oclusão (Anderson *et al.*, 2001; Niessen, 2007; Hartsock e Nelson 2008). Sabe-se que, quando as junções de oclusão não estão presentes no epitélio e em células não epiteliais, como células cardíacas e fibroblastos, a ZO-1 liga-se às caderinas da junção aderente (Itoh *et al.*, 1993, 1999; Furuse *et al.*, 1994; Fanning *et al.*, 1998; Bazzoni *et al.*, 2000). A figura 1(b) mostra uma representação esquemática da junção de oclusão.

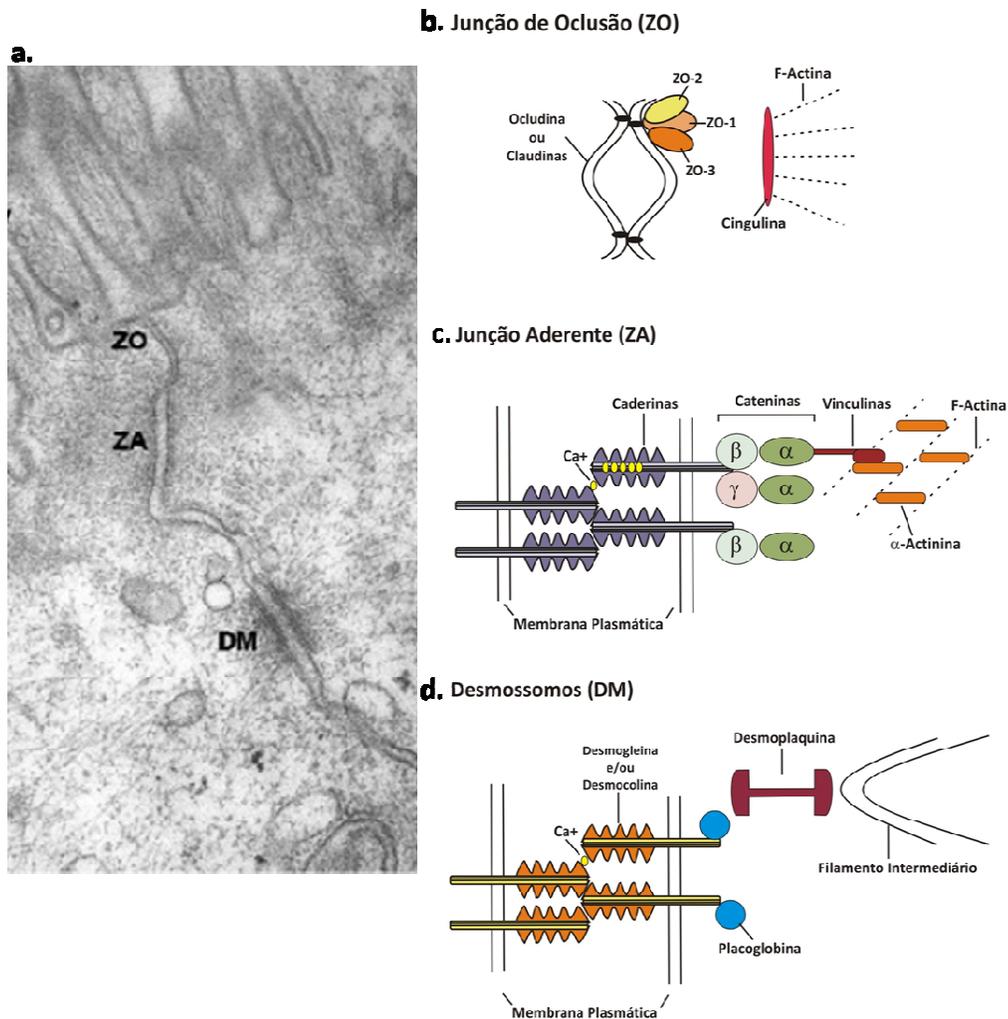


Figura 1. Representação esquemática das proteínas integrantes e associadas às junções intercelulares constituintes do complexo unitivo

Junção de oclusão (b), junção aderente (c) e desmossomos(d) e suas interações com componentes do citoesqueleto. À esquerda uma fotomicrografia ultra-estrutural do complexo unitivo (a). Figura modificada de Niessen e Gottardi, 2008 e de Collares-Buzato, 2001.

1.2.3. Funções fisiopatológicas das junções intercelulares

Evidências têm apontado um importante papel desempenhado pelas **junções comunicantes** em vários processos celulares, como a manutenção da homeostasia celular e controle da proliferação e diferenciação celular (Musil, 1994; Wong *et al.*, 2008; Decrock *et al.*, 2009). Também tem sido demonstrada a importância dessas junções durante o desenvolvimento embrionário, já que as mesmas contêm canais intercelulares através dos quais morfógenos são transferidos de uma célula para outra, contribuindo assim para o processo morfogenético (Leclerc, 1994).

A formação e a manutenção da arquitetura tecidual são conseqüências da firme adesão entre células vizinhas promovida pela **junção aderente** (Geiger e Ayalon, 1992). Adicionalmente, várias outras funções estão associadas a essa junção, como a formação e manutenção das outras junções intercelulares, conservação da polaridade celular e organogênese (Collares-Buzato *et al.*, 1998; Eaton e Simons, 1995; Geiger e Ayalon, 1992; Gumbiner *et al.*, 1988; Nose e Takeichi, 1986). Assim como a junção aderente, os desmossomos promovem a adesão entre as células, porém, sem interferir na constituição e na função dos outros componentes juncionais (Cowin *et al.*, 1984).

Tem sido demonstrado que as cateninas (em especial a β e a p120) da junção aderente interagem com receptores de fatores de crescimento, tais como EGF, FGF e HGF e regulam a ação destes fatores na célula (Conacci-Sorrell *et al.*, 2002). Adicionalmente, várias proteínas juncionais, como as α , β , γ e p120-cateninas e as ZOs (ZO-1 e ZO-2) têm a propriedade de migrarem para o núcleo e ativarem fatores de transcrição gênica (tais como o TCF/LEF-1 e a SAF-B proteína ligante ao DNA) (Benmerah *et al.*, 2003; Matter & Balda, 2003).

A regulação da adesão celular pelas caderinas é essencial para o desenvolvimento embrionário e necessária durante a transição epitélio-mesenquimal das células (D'Souza-Schorey, 2005). A perda da adesão celular mediada pelas caderinas é um marcador clássico de carcinogênese e está relacionada à progressão tumoral. Em muitos tumores derivados de células epiteliais, há uma diminuição da expressão de E-caderina, levando à perda de adesão celular, aumentando a proliferação e a capacidade de invasão destes tumores (Takeichi, 1991; Van Aken *et al.*, 2001; Cowin *et al.*, 2005). O comprometimento da função adesiva da junção

aderente pode envolver mutações do domínio extracelular da E-caderina ou a ruptura da ligação com filamentos de actina como consequência de alterações conformacionais das caderinas e cateninas por fosforilação (Shimoyama *et al.*, 1992).

Tem sido descrito que embriões de camundongos com inativação do gene da E-caderina (*knockout*) morrem, não passando do estágio de 32 células (Larue *et al.*, 1994; Ohsugi *et al.*, 1997). Em camundongos *knockout* condicionais, a inativação gênica dessa glicoproteína em queratinócitos resulta em morte do animal, por causa da desidratação severa e infecção secundária em função da perda da barreira epidermal (Tinkle *et al.*, 2004; Tunggal *et al.*, 2005).

A **junção de oclusão**, por sua vez, exerce um papel fundamental de barreira de difusão pela via paracelular, essencialmente em epitélios de revestimento (Farquhar e Palade, 1963; Gumbiner, 1987; Madara, 1990; Schneeberger e Lynch, 1992; Fasano, 2000; Mitic *et al.*, 2000). Além disto, este tipo de junção é responsável pela manutenção da distribuição assimétrica (polaridade) de proteínas e lipídios entre os domínios apical e basolateral da membrana de células epiteliais e funciona como dispositivo de adesão intercelular em outros tipos celulares (Schneeberger & Lynch, 1992; Gumbiner *et al.*, 1987).

Este tipo de junção está envolvida no processo de absorção intestinal de nutrientes (Madara *et al.*, 1990), na espermiogênese (Pelletier e Byers, 1992) e no trânsito de moléculas através dos capilares cerebrais (Rubbin e Staddon, 1999). A função de barreira desempenhada pela junção de oclusão pode ser modulada em várias condições experimentais (Peixoto e Collares-Buzato, 2005; Collares-Buzato *et al.* 1994, 1998), bem como estar comprometida em alguns estados patológicos como na transmigração de patógenos e/ou células através de epitélio intestinal e endotélio durante infecção bacteriana (Jepson *et al.*, 1995, 2000) e inflamação (Evans *et al.*, 1983).

Alterações da função e estrutura da junção de oclusão em epitélios podem ser induzidas experimentalmente. Tratamentos com determinadas substâncias aumentam a permeabilidade da junção de oclusão, por meio da ruptura das mesmas ou pela internalização/alteração conformacional das suas proteínas estruturais. Como exemplos destas condições experimentais, temos a retirada do cálcio extracelular, o aumento de cálcio intracelular, a diminuição do pH citoplasmático, a ativação de tirosina quinases, a exposição a certos hormônios e citocinas

(Collares-Buzato, 2001; Collares-Buzato *et al.*, 1994a e 1994b). Por outro lado, outras situações podem acarretar em diminuição da permeabilidade da junção de oclusão, como o tratamento com vitamina A, proteases e glicocorticóides (Collares-Buzato, 2001; Polak-Charcon, 1992).

Vários estudos sugerem que junções de oclusão também podem desempenhar um papel na regulação do crescimento e diferenciação celular, pois a clonagem molecular de ZO-1 e ZO-2, proteínas da junção de oclusão, revelou uma homologia dessas proteínas com a proteína DLG A, um supressor de tumor de *Drosophila* associado à junção aderente (Tsukita *et al.*, 1993; Willott *et al.*, 1993; Woods and Bryant, 1993; Jesaitis e Goodenough, 1994).

A ZO-1 possui vários domínios que podem estar envolvidos na interação com proteínas da junção de oclusão, o que parece ser importante no recrutamento dessas proteínas para a região da membrana durante a formação dessas junções (Furuse, 2010). Sabe-se, no entanto, que a ZO-1 pode se associar ao complexo de cateninas na ausência das junções de oclusão (Rajasekaran *et al.*, 1996). Esta interação é mediada pela porção N-terminal da ZO-1 e ocorre, aparentemente, via α -catenina (Itoh *et al.*, 1997).

Uma fração de ZO-1 acumula-se no núcleo durante a proliferação de células epiteliais, sugerindo que esta proteína pode estar diretamente envolvida no processo de divisão celular (Gottardi *et al.*, 1996). Esta dupla localização, tanto nas junções de oclusão como no núcleo, também foi observada para outras proteínas, tais como a simplequina (Keon *et al.*, 1996), o antígeno 2.1, a ZO-2 e a cingulina (Guillemot *et al.*, 2007). Embora as funções desempenhadas por estas proteínas não sejam totalmente conhecidas, essas observações suportam a idéia que componentes da junção de oclusão estão envolvidos na regulação a expressão gênica.

Apesar desses dados sugerirem um papel das junções de oclusão na regulação do crescimento e diferenciação celular, ainda são desconhecidas a(s) via(s) de sinalização em que a ZO-1 ou outras proteínas da junção de oclusão estão envolvidas. Além disso, não se sabe que tipos de estímulos são recebidos por essas junções, quais moléculas funcionam como transdutores desses estímulos e como os sinais intercelulares desencadeados são transferidos da junção para o núcleo.

1.2.4. Junções Intercelulares e o pâncreas endócrino

O pâncreas é uma glândula mista, com função tanto endócrina como exócrina. Imersas no tecido pancreático exócrino, estão as ilhotas pancreáticas, ou ilhotas de Langerhans, que sob microscopia de luz, apresentam-se na forma de aglomerados arredondados de células poligonais, dispostas em cordões entremeados por uma rica rede de capilares sanguíneos, e envolvidos por uma delgada cápsula, rica em fibras reticulares (Findlay e Thomas, 1980; Gomez-Dumm *et al.*, 1987; Ohtani, 1987).

As ilhotas são constituídas por cinco tipos celulares com função endócrina: as células beta, secretoras de insulina; as células alfa, secretoras de glucagon; as células delta, secretoras de somatostatina, as células PP ou F, que secretam o polipeptídeo pancreático e as células épsilon, produtoras de grelina (Orci, 1976; Orci e Unger, 1975; Heller *et al.* 2005; Jain, 2009).

Esses hormônios estão direta ou indiretamente envolvidos na homeostase glicêmica: a insulina tem ação hipoglicemiante, enquanto o glucagon tem ação hiperglicemiante; a somatostatina possui uma ação parácrina, inibindo a secreção de insulina e glucagon (Kanno *et al.*, 2002); o polipeptídeo pancreático pode exercer um papel inibitório na secreção exócrina pancreática (Kojima *et al.*, 2007) e grelina inibe a secreção de insulina (Dezaki *et al.*, 2007). O comprometimento do balanço da secreção destes hormônios pode resultar em disfunções tal como a diabetes melito, doença potencialmente fatal envolvendo uma secreção insuficiente ou ausente de insulina pelas células beta (Ward *et al.*, 1983).

A proporção e distribuição dos tipos celulares são diferentes nas ilhotas pancreáticas. No caso de ilhotas de ratos adultos, as proporções aproximadas de cada tipo celular em relação ao volume total da ilhota são: 70-80% de células beta, 15-20% de células alfa, 5% de células delta e menos de 1% de células PP e épsilon (Brelje *et al.*, 1989; Carvalho *et al.* 2006). Estudos com ilhotas humanas mostraram que esta proporção é diferente da encontrada em roedores, de tal forma que a ilhota é constituída por 55% de células beta, cerca de 35% de células alfa, 6% de células delta e pouquíssimas células PP e épsilon (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006; Heller *et al.*, 2005).

Quanto à organização destes tipos celulares, sabe-se que, em roedores, as células beta localizam-se na região central da ilhota, enquanto as células não-beta organizam-se na periferia,

envolvendo as células beta (Gannon *et al.*, 2000; Brissova *et al.*, 2002; Carvalho *et al.* 2006). As ilhotas humanas também mostram esta citoarquitetura, embora menos definida que em roedores. (Orci, 1976; Brelje *et al.*, 1989; Dubois *et al.* 2000; Brissova *et al.* 2005).

É interessante notar que a perturbação dessa citoarquitetura em ilhotas pancreáticas de pacientes diabéticos, bem como em modelos animais da doença, sugere que a incapacidade de organizar células endócrinas pode explicar, pelo menos em parte, o fenótipo de hiperglicemia (Gepts e Lecompte, 1981; Gomez Dumm *et al.*, 1990; Tokuyama *et al.*, 1995).

Em cada ilhota, as diferentes células endócrinas se conectam, homotipicamente ou heterotipicamente, por meio das junções intercelulares do tipo oclusão, comunicante, aderente e desmossomos, como demonstrado por microscopia eletrônica de transmissão e imunocitoquímica (Collares-Buzato *et al.*, 2004; In't Veld *et al.*, 1984; Orci *et al.*, 1975). Tais contatos intercelulares parecem ser cruciais para o perfeito funcionamento deste órgão. Alterações da citoarquitetura normal das ilhotas são verificadas em animais com quadro estabelecido de diabetes ou em modelos *in vitro* de disfunção secretora de insulina (Cirulli *et al.*, 1993; Hong *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2003).

Dentre as junções intercelulares, as junções comunicantes tem sido as mais estudadas no pâncreas endócrino, sendo documentada a presença de dois principais subtipos de conexinas expressas pelas ilhotas pancreáticas: a conexina 43 (Cx43) e a conexina 36 (Cx36), sendo que a Cx36 parece ser a única conexina expressa pelas células beta (Serre-Beinier *et al.*, 2009; Bavamian *et al.*, 2007; Charpantier *et al.*, 2007; Nlend *et al.*, 2006).

Já se sabe que, nas linhagens de células beta MIN6 e INS-1E, níveis adequados de Cx36 são requeridos para uma apropriada secreção de insulina estimulada pela glicose ou por secretagogos não-metabolizáveis (Calabrese *et al.*, 2004, 2003; Le Gurun *et al.*, 2003). O acoplamento celular mediado pelos canais formados por esse subtipo de conexina parece importante para a sincronização do aumento oscilatório da concentração intracelular de cálcio induzido pela glicose entre células acopladas, pois estas apresentam oscilações de $[Ca^{+2}]_i$ mais regulares, de maior amplitude e freqüência, em comparação a células beta isoladas (Jonkers *et al.*, 1999; Gilon e Henquin, 1995; Gylfe *et al.*, 1991).

Calabrese e colaboradores (2003) demonstraram que uma significativa redução da expressão de Cx36 na linhagem MIN6, obtida através da exposição a um oligonucleotídeo *antisense* desta conexina, induziu um marcante comprometimento na sincronização das oscilações da concentração de cálcio intracelular induzida por glicose, associado com uma diminuição significativa na secreção estimulada de insulina.

Evidências têm indicado a importância da adesão e do acoplamento das células beta no controle da secreção de insulina, pois, quando isoladas, estas células mostram significativo comprometimento da resposta secretória estimulada de insulina, bem como uma secreção basal de insulina aumentada, baixa sensibilidade à glicose, e diminuição na biossíntese de insulina. Entretanto, quando os contatos entre essas células são restabelecidos, há uma rápida reversão destas alterações (Halban *et al.*, 1982; Pipeleers *et al.*, 1982, 1994).

Diversos procedimentos experimentais conhecidos por induzirem significativa secreção pancreática de insulina, como exposição a altas concentrações de glicose, a certas drogas como glibenclamida e o tratamento com o hormônio prolactina induzem significativo aumento na expressão de conexina e no acoplamento das células beta mediado pelas junções comunicantes (Collares-Buzato *et al.*, 2001; Sorenson *et al.*, 1987; Meda *et al.*, 1979).

Além da importância da junção comunicante para a função do pâncreas endócrino, em especial a da célula beta, também tem se estudado o papel de outras junções nesse órgão. Recentes evidências têm indicado a relevância da adesão celular mediada pela junção aderente para adequada secreção de insulina (Lilla *et al.*, 2003; Bernard-Kargar *et al.*, 2001; Hauge-Evans *et al.*, 1999). Dahl e colaboradores (1996) mostraram que E-caderina é essencial para que as células beta se organizem em estruturas, as ilhotas pancreáticas, durante o desenvolvimento do pâncreas de camundongos. A diminuição da expressão da E-caderina resulta em uma citoarquitetura anormal das ilhotas pancreáticas e redução da secreção de insulina (Yamagata *et al.*, 2002).

Trabalhos com a linhagem de células MIN6 mostraram uma correlação direta entre o grau da expressão de E-caderina e a secreção de insulina induzida pela glicose (Lilla *et al.*, 2003; Hauge-Evans *et al.*, 1999). Em adição, uma expressão aumentada de α - e β -cateninas (Collares-

Buzato *et al.* 2004) e de N-CAM (Bernard-Kargar *et al.*, 2001) está associada a uma resposta secretória aumentada de insulina em ilhotas de ratos recém-nascidos em condição *in vitro*.

Camundongos com deficiência na expressão de N-CAM apresentam uma citoarquitetura anormal das ilhotas pancreáticas, com células alfa localizadas no cerne da ilhota, e uma distribuição alterada de marcadores de polaridade celular como caderinas e F-actina (Esni *et al.*, 1999). Além disso, as ilhotas pancreáticas destes animais apresentaram uma secreção basal de insulina aumentada, uma secreção estimulada diminuída e secreção diminuída de glucagon, sob baixas concentrações de glicose (Olofsson *et al.*, 2009).

Portanto, esses estudos sugerem que a comunicação e adesão entre os tipos celulares na ilhota pancreática são importantes para a resposta secretora de insulina (Hauge Evans *et al.* 1999; Luther *et al.*, 2005). Entretanto, o papel das junções intercelulares e vias envolvidas ainda não são completamente conhecidas.

1.3. Objetivos da Dissertação

O objetivo geral desta dissertação foi estudar o possível papel da adesão e do reconhecimento celular mediados pelas junções de oclusão e de adesão nos processos de maturação e disfunção da célula beta do pâncreas endócrino em dois modelos animais:

- ❖ **Modelo de maturação do processo secretório de insulina ao longo do desenvolvimento**, no qual utilizamos ratos em diversas fases do desenvolvimento.
- ❖ **Modelo de diabetes melito do tipo 2**, no qual utilizamos camundongos C57BL6 jovens alimentados com uma dieta hiperlipídica por um período de 8 meses.

1.4. Justificativa

O modelo animal que emprega ratos em diferentes idades tem sido utilizado para se estudar o processo de maturação do pâncreas endócrino, em função da conhecida resposta secretória reduzida de ratos recém-nascidos em comparação as ilhotas de animais adultos (Boschero *et al.*, 1993). Porém, os mecanismos envolvidos nesse processo de maturação da resposta secretória de insulina, desencadeado durante o desenvolvimento, ainda são pouco conhecidos. Ainda, dados morfológicos referentes a alterações sequenciais na histologia da

ilhota no período peri- e pós-natal são escassos e pouco consistentes (Massa *et al.*, 1997; Kaung, 1994; Reddy *et al.*, 1985).

O modelo experimental de disfunção pancreática utiliza camundongos que podem desenvolver um quadro de diabetes melito do tipo 2 como resultado da ingestão de ração com alto teor de lipídeos (Shafir *et al.*, 1999; Winzell and Ahren 2004; Surwitt *et al.*, 1988; de Souza *et al.*, 2005). Dentre as várias linhagens de camundongos, a linhagem C57BL/6J parece possuir uma vulnerabilidade metabólica maior, devido, possivelmente, a uma pré-disposição genética, que, quando desafiada por dieta ou outras manipulações, resulta em obesidade e severo distúrbio da homeostase glicêmica (Surwitt *et al.*, 1988).

Este modelo tem sido bastante utilizado para se estudar a patogênese da aterosclerose associada à resistência periférica à insulina, a diabetes melito não dependente de insulina (tipo 2) e a obesidade (Drolet *et al.*, 2006). Entretanto, a repercussão na função pancreática endócrina da ingestão de dieta com alto teor de lipídeos tem sido pouco investigada, bem como trabalhos descrevendo alterações funcionais e morfológicas do pâncreas endócrino neste modelo são escassos (Ahren *et al.*, 1997; Sone & Kagawa, 2005).

O possível papel das junções de oclusão e aderente na maturação e disfunção da célula beta foi estudado nesta dissertação através da avaliação da expressão e localização celular de algumas proteínas associadas às essas junções nas ilhotas pancreáticas em combinação com a análise de aspectos funcionais e morfológicos do pâncreas endócrino nos modelos animais descritos acima.

Capítulo 2 – Papel do contato intercelular mediados pelas junções de oclusão e aderente no processo de maturação da célula beta pancreática durante o desenvolvimento

2.1. Introdução

A secreção dos hormônios do pâncreas endócrino é altamente regulada e está relacionada com a homeostase glicêmica por meio de ações em muitos tecidos periféricos, tais como fígado, músculos e tecido adiposo (Martyn *et al.*, 2008; Mechanick, 2006). A insulina estimula a captação de glicose pelos tecidos periféricos, enquanto o glucagon mobiliza glicose do fígado para a circulação; já a somatostatina inibe a secreção tanto de células alfa quanto de células beta (Kanno *et al.*, 2002). O polipeptídeo pancreático (PP) pode exercer um papel inibitório na secreção exócrina pancreática (Kojima *et al.*, 2007) e grelina inibe a secreção de insulina, dentre outras funções (Dezaki *et al.*, 2007). Todas as células endócrinas pancreáticas desempenham, direta ou indiretamente, um papel central na manutenção de níveis adequados de glicose no sangue. Comprometimento no balanço da secreção destes hormônios pode resultar em disfunções tal como a diabetes melito, doença potencialmente fatal envolvendo a secreção insuficiente ou ausente de insulina pelas células beta pancreáticas (Ward *et al.*, 1983).

Sabe-se que a interação celular no pâncreas endócrino é importante para a manutenção funcional das ilhotas: essas interações são cruciais para o desenvolvimento e manutenção do fenótipo das células beta. Tem sido demonstrado um aumento da expressão do gene da insulina em células beta aderidas (Beattie *et al.*, 1996) e redução desta expressão ou da secreção quando há bloqueio das integrinas e caderinas, com conseqüente diminuição da interação entre estas células (Cirulli *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2007; Jaques *et al.*, 2008). As interações célula-célula são essenciais para uma adequada resposta secretória de insulina pelas células beta, de tal forma que a secreção de insulina de células beta dispersas é significativamente menor do que em ilhotas intactas ou de células beta reagregadas (Bosco *et al.*, 1989; Halban *et al.*, 1987; Hopcroft *et al.*, 1985; Pipeleers *et al.*, 1985).

Ilhotas de fetos e recém-nascidos de roedores exibem uma reduzida resposta secretória à glicose e a outros secretagogos em comparação com ilhotas de animais adultos (Mendonça *et*

al. 1998; Boschero *et al.*, 1993, 1988). Entretanto, os mecanismos envolvidos nesse processo de maturação da resposta secretória de insulina desencadeado durante o desenvolvimento ainda são pouco conhecidos. Em condições experimentais, entretanto, a maturação da resposta secretória é influenciada por muitos fatores, incluindo metabólitos, como a glicose e aminoácidos, e hormônios como a prolactina e o hormônio de crescimento (Kervran e Randon, 1980; Swenne *et al.*, 1980; Sorenson *et al.*, 1987; Boschero *et al.*, 1993; Crepaldi *et al.*, 1997). Demonstramos, recentemente, que a maturação *in vitro* das células beta de recém-nascidos, induzida pelo cultivo prolongado das mesmas em meio de cultura suplementado, está associada com aumento na expressão de várias proteínas juncionais da junção aderente e de oclusão (Collares-Buzato *et al.*, 2004).

Este capítulo descreve os resultados de avaliação do possível papel dos contatos intercelulares no processo de maturação *in vivo* da célula beta e da expressão e localização de proteínas juncionais (occludina, ZO-1, caderinas, cateninas) nas ilhotas pancreáticas de ratos durante o desenvolvimento.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com diferentes idades: fetos (19-20 dias de gestação), recém-nascidos (1 a 2 dias), jovens (21 dias) e adultos (3-5 meses).

Todos os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (Campinas, SP), mantidos em condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro (de 12h) e alimentados com ração e água *ad libitum* até o momento da experimentação.

Os experimentos deste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimental Animal da instituição (CEEA-IB-UNICAMP), sob protocolo n.º 1885-1.

2.2.2. Avaliação morfológica do pâncreas endócrino

❖ Histologia do pâncreas

A análise do aspecto histológico e da citoarquitetura do pâncreas endócrino dos animais dos diferentes grupos experimentais (n= mínimo 4 animais por grupo experimental) foi feita

utilizando-se técnica histológica de rotina. Para tal, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, decapitados, os pâncreas retirados e pesados e fixados em solução de Bouin (10% de formaldeído, 1% de ácido pícrico saturado e 5% de ácido acético) por 24 h. Após fixação, cada pâncreas foi seccionado em dois fragmentos, que foram processados pelas técnicas rotineiras de embebição em parafina (Histosec pastilhas, Merck). De cada fragmento, foram obtidas secções semi-seriadas de 5 µm, espaçadas em 100 µm entre cortes, até esgotamento total do bloco. As lâminas obtidas e selecionadas foram coradas com Hematoxilina-Eosina ou Hematoxilina Crômica-Floxina, como descrito por Carvalho *et al.*, 2006, ou processadas para imuno-histoquímica como descrita a seguir.

❖ Imuno-histoquímica para insulina e glucagon

A localização de insulina e glucagon foi feita utilizando-se o método padrão de imunoperoxidase indireta. Resumidamente, os cortes de pâncreas foram desparafinizados, hidratados e, após bloqueio da peroxidase endógena (com solução pronta do kit ImmunoCruz - Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e dos sítios inespecíficos com 5% leite desnatado em tampão Tris-salina (TBS; Trisma base 0,01 M, NaCl 0,15 M) contendo 0,1% de Tween 20 (TTBS), foram incubados com anti-insulina ou anti-glucagon (Dako), diluídos 1:150 e 1:450, respectivamente, em TBS com 3% de leite desnatado, durante 12 - 16h à temperatura de 4°C. Após a imunoreação utilizando-se o kit adequado ImmunoCruz, as lâminas foram então contra-coradas com Hematoxilina de Ehrlich, desidratadas, diafinizadas e montadas em bálsamo sintético.

2.2.3. Imunolocalização das proteínas juncionais

Por meio da técnica de imunofluorescência indireta, descrita por Collares-Buzato e colaboradores (2004), foi avaliada a distribuição celular das proteínas associadas à junção de oclusão (occludina e ZO-1) e à junção aderente (Pan-caderina, N-CAM, α -, β -cateninas).

Os pâncreas dos animais foram retirados e congelados em n-hexano com nitrogênio líquido. Os cortes histológicos, obtidos por criostato a -25°C, foram aderidos em lâminas tratadas previamente com solução de 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma) para a adesão dos cortes às lâminas, fixados durante 8 min com paraformaldeído 2 % (em tampão fosfato-salina,

PBS, pH 7,4) e permeabilizados com solução de Triton X-100 (0,1%), no caso da beta-catenina, durante 5-10 min ou fixamos com acetona P.A. a -20°C por três minutos para as demais proteínas.

Posteriormente, os cortes histológicos foram incubados com TBS, pH 7,4, contendo 5% de leite desnatado em pó durante 1h à temperatura ambiente e então, incubados com anticorpo monoclonal específico diluído em 3% de leite desnatado em TBS para a detecção da proteína desejada (Tabela 2.1) durante 12-16h a 4°C, quando fixadas com paraformaldeído ou durante 2h à temperatura ambiente, quando fixadas com acetona.

Foi feita também uma marcação para insulina. Para tal, após a incubação dos anticorpos primários específicos e seus respectivos secundários, conjugados com fluoresceína, foi feita uma incubação adicional durante 1h e 30min com anticorpo policlonal anti-insulina (Dako, diluição 1:100). Após este período, os cortes foram lavados em TBS e incubados durante 2h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário policlonal específico conjugado com rodamina (Sigma, diluição 1:125 em TBS com 1% de leite desnatado).

Por fim, as lâminas foram montadas com meio de montagem (Vectashield, Vector) e a localização da fluorescência no espécime detectada por um microscópio de varredura confocal a laser (Zeiss LSM 510, Alemanha) e/ou por microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E-800, Japão) acoplado a um sistema de captura de imagens.

Tabela 2.1: Procedência e diluição dos anticorpos primários monoclonais utilizados para a detecção das proteínas juncionais por meio da técnica de imunofluorescência indireta

Anticorpo Primário	Fabricante	Animal	Diluição primário	Diluição secundário
Ocludina	Zymed	Camundongo	1:50	1:350
ZO-1	Zymed	Coelho	1:200	1:200
Pan-caderina	Sigma	Camundongo	1:500	1:700
N-CAM	Sigma	Camundongo	1:50	1:400
Alfa-catenina	Sigma	Coelho	1:1000	1:1000
Beta-catenina	Zymed	Camundongo	1:150	1:800

2.2.4 Isolamento e cultivo de ilhotas pancreáticas

Ilhotas pancreáticas isoladas foram obtidas a partir da digestão do pâncreas com colagenase tipo V (EC 3.4.24.3; Sigma) e, em seguida, por uma separação em gradiente de Ficoll, como descrito previamente (Scharp *et al.*, 1973; Boschero *et al.*, 1993).

As ilhotas, especialmente as isoladas de pâncreas de fetos e recém-nascidos, foram cultivadas durante 16-18h em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino, 50 U.I./ml de penicilina e 0,005 mg/ml de estreptomicina para minimizar a contaminação com o tecido exócrino.

Para o desenvolvimento da técnica de *Western Blot*, grupos de no mínimo 600 ilhotas isoladas foram transferidos para microtubos, homogeneizadas em coquetel anti-protease (10 mM imidazol, 4 mM EDTA, 1 mM EGTA, 200 μ M DTT, 0,5 μ g/ml pepstatina, 200 KIU/ml aprotinina, 200 μ M fenilmetilsulfonilfluoreto e 2,5 μ g/ml leupeptina, 30 μ g/ml inibidor de tripsina) e mantidos a -70°C.

Para a secreção estática de insulina, as ilhotas foram colocadas em cultura para processamento posterior, como descrito mais a seguir.

2.2.5 Western Blot

Alíquotas com 70 μ g do homogeneizado de ilhotas foram incubadas a 37°C por 1 h em 20% do volume de 5x tampão de Laemmli (1x tampão: 50 mM Tris-HCl, 2% de SDS, 10% de β -mercaptoetanol, 10% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol) e, então, aplicadas em gel 6,5 ou 8% de SDS-PAGE (Laemmli, 1970). A eletroforese foi realizada com voltagem fixa de 200V e amperagem variável em solução de corrida (Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%) por aproximadamente 30 min.

Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, com o sistema de transferência ligado à fonte com voltagem fixa de 120 V, amperagem variável em tampão de transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,02%) durante aproximadamente 1 h.

Após coloração reversível com solução de Ponceau (Sigma), para verificação do perfil protéico e controle da quantidade de amostra aplicada nas linhas do gel, a membrana foi imersa

em tampão Tris-salina (Trisma base 0,01 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05%, pH 7,4) com 5% de leite desnatado para bloqueio dos sítios inespecíficos, durante 12-16h a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com os anticorpos primários específicos das proteínas juncionais de interesse em TBS com 3% de leite desnatado (Tabela 2.2). Após a retirada do anticorpo primário não-ligado com lavagens em tampão Tris-salina, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários específicos conjugados com peroxidase em TBS com 1% de leite desnatado, durante 1h (diluição dos anticorpos na Tabela 2.2).

As bandas imunoreativas foram detectadas por quimioluminescência (*kit* Super Signal-PIERCE) utilizando filme para auto-radiografia. A densidade das bandas foi analisada pelo *software* livre Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Tabela 2.2: Diluição dos anticorpos primário e secundário utilizados no *Western Blot*

Anticorpo Primário	Fabricante	Animal	Diluição primário	Diluição secundário
Ocludina	Zymed	Coelho	1:1000	1:5000
ZO-1	Zymed	Coelho	1:800	1:2500
E-caderina	Sigma	Camundongo	1:100	1:2500
N-CAM	Sigma	Camundongo	1:100	1:2500
Alfa-catenina	Sigma	Coelho	1:1000	1:1000
Beta-catenina	Zymed	Camundongo	1:800	1:2500

2.2.6 Secreção estática de insulina

A metodologia utilizada foi a mesma descrita por Carvalho, 2009. As ilhotas dos grupos experimentais foram isoladas por digestão com colagenase, como previamente descrito, mantidas em cultura durante 12-18h e selecionado um número de 5 a 15 ilhotas (n=5-7 para os grupos de adulto e jovem; n=10-15 para os grupos de feto e recém-nascido), que foram colocadas em microtubos, perfazendo-se 10-30 microtubos por grupo.

Em seguida, as ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs (composição: 139 mM Na⁺, 5 mM K⁺, 1 mM Ca²⁺, 1mM Mg²⁺, 123,6 mM Cl⁻, 24 mM HCO₃⁻) contendo 5,6 mM de glicose em banho-maria a 37°C durante 30 minutos. Após a pré-incubação, o tampão foi

cuidadosamente aspirado e as ilhotas divididas em dois grupos: as que foram incubadas em Krebs contendo 2.8 mM de glicose e as incubadas com 16.7 mM de glicose.

Após incubação de 1h a 37°C, alíquotas de 500µl do tampão foram retiradas de cada microtubo e armazenadas a -20 °C até a dosagem do conteúdo de insulina, por radioimunoensaio. A concentração de insulina liberada no meio foi determinada por radioimunoensaio e expressa em relação à média de secreção basal de insulina no grupo.

Para o experimento de células isoladas e re-agregadas, utilizamos a metodologia descrita por Halban e colaboradores (1982) com modificações. Resumidamente, selecionou-se um grupo de aproximadamente 2000 ilhotas por grupo experimental (recém-nascidos ou adultos) que foram acondicionadas em tubo Falcon, e lavadas com uma solução de PBS e EDTA (PBS 0,05 mM sem Ca²⁺ ou Mg²⁺ com 0,54 mM de EDTA).

Após a lavagem, as ilhotas foram imersas em solução de Tripsina/EDTA (1 mg/mL e 0,54 mM respectivamente) a 37°C durante 3 min. A seguir foram feitas lavagens, seguidas de centrifugação (150g, 10 min), com meio de cultura para retirada e neutralização da tripsina. A contagem de células foi feita nesta suspensão com o auxílio de hemocitômetro e as células das ilhotas foram separadas em dois grupos: 1) o submetido à centrifugação (150g por 10min), que ficou em cultura por duas horas para a re-agregação das células acondicionadas em microtubo e, 2) o que ficou em cultura por 30 minutos em tubo Falcon, apenas para recuperação do tratamento com tripsina (células isoladas ou dispersas). Tanto no caso das células re-agregadas como a das isoladas, colocou-se o equivalente em volume a 10⁴ células de ilhotas de adulto (5 ilhotas), e 2x10⁴ células de recém-nascidos (10 ilhotas) por microtubo.

Após o período de cultura respectivo de cada grupo, as células passaram pelo mesmo procedimento que as ilhotas íntegras: uma pré-incubação por 30 min com Krebs contendo 5.6 mM de glicose e incubação por 1 h com Krebs 2.8 mM ou 16.7 mM de glicose, sempre com centrifugação entre uma etapa e outra, para assegurar que o *pellet* de células estaria no fundo do tubo, no caso das células reagregadas e fazendo a dispersão com pipeta Pasteur após cada centrifugação no caso das células dispersas.

Assim como nos microtubos de ilhotas íntegras, alíquotas de 500 µl foram retiradas de cada tubo e estocadas a -20°C para posterior dosagem por radioimunoensaio.

2.2.7 Radioimunoensaio

A secreção estática de insulina foi feita utilizando a metodologia descrita por Scott e colaboradores (1981), com modificações. Foram utilizadas duplicatas de alíquotas das amostras contendo insulina, sem diluição prévia, para todas as amostras, em tampão fosfato (200 mM de Na_2HPO_4 e 206 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Para a curva padrão, foram utilizadas amostras em triplicatas de um padrão de insulina de rato nas concentrações de 0,02 ng/ml, 0,039 ng/ml, 0,078 ng/ml, 0,16 ng/ml, 0,31 ng/ml, 0,63 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5ng/ml e 5 ng/ml. Insulina de rato marcada com I^{125} (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e 20 μl de anticorpo monoclonal anti-insulina (diluição 1:3600, humana) foram adicionados às amostras diluídas e aos tubos da curva padrão. Para o ensaio, foram efetuados os seguintes tubos de referência em triplicata: Total (T), contendo 200 μl de solução de insulina marcada (5000 cpm/200 μl solução); *Non-specific binding* (NSB), contendo 100 μl de tampão fosfato e 200 μl da solução de insulina marcada; Referência (REF), contendo 100 μl de tampão fosfato, 200 μl da solução de insulina marcada e anticorpo anti-insulina. Feitas todas as pipetagens, os tubos foram agitados em vortex e mantidos durante 48 horas a 4°C. Após esse período de incubação, os tubos das amostras, da curva e de referência (com exceção do tubo Total) receberam 200 μL de uma solução contendo 2,5% de carvão (Norit A), 5% de albumina e 0,23% de dextran T 70, diluídos em tampão fosfato. Os tubos foram mantidos por 30 min a 4°C e centrifugados por 20 minutos a 1000 g. O sobrenadante foi descartado por aspiração e a radioatividade dos tubos medida por um contador gama (Beckman Gama 5500). Por intermédio dos valores obtidos na curva padrão, nos tubos contendo concentração fixa de insulina, foi possível calcular-se os valores de insulina contida nas amostras utilizando o programa Origin 6.0 (OriginLab).

2.2.8 Análise estatística

A significância estatística entre dois grupos experimentais foi determinada usando-se o teste t-Student. Para múltiplas comparações, foi utilizado ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni para comparar determinados pares de grupos. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Secreção estática de insulina das ilhotas pancreáticas de ratos durante o desenvolvimento.

A figura 2 mostra as diferenças na secreção estática basal e estimulada de insulina em ilhotas de ratos com diferentes idades. As ilhotas pancreáticas de todos os grupos experimentais (fetos, recém-nascidos, jovens e adultos) apresentaram diferentes respostas secretórias de insulina quando estimuladas pela glicose. O grupo de ilhotas de fetos, na presença de 16.7 mM de glicose, exibiu uma resposta secretória 3 vezes superior quando comparada à secreção basal, com 2.8 mM de glicose; recém-nascidos tiveram uma resposta 24 vezes maior; jovens e adultos 115 vezes e 82 vezes maiores, respectivamente. Portanto, comparativamente às ilhotas de ratos jovens e adultos, as de fetos e recém-nascidos mostraram uma secreção estimulada de insulina significativamente menor.

Esses resultados estão de acordo com os dados de literatura que demonstraram que as células beta no período perinatal são pouco responsivas à glicose, quando comparadas às de ratos adultos (Boschero *et al.*, 1993, Mendonça *et al.*, 1998). Nossas observações confirmam a adequação do nosso modelo experimental para o estudo dos mecanismos de maturação a célula beta durante o desenvolvimento do animal.

2.3.2 Morfologia e citoarquitetura das ilhotas pancreáticas de ratos durante o desenvolvimento.

A figura 3 apresenta o aspecto morfológico das ilhotas durante o desenvolvimento do animal. As ilhotas pancreáticas de ratos adultos apresentam-se como estruturas ovaladas ou arredondadas, delimitadas por uma fina cápsula de fibras reticulares, pouco visível à microscopia de luz convencional. As células endócrinas pancreáticas estão dispostas em cordões anastomosantes entremeados por uma rica rede de capilares sanguíneos. Nos primeiros estágios do desenvolvimento (período fetal e neonatal), as ilhotas apresentam um formato menos regular e estão envolvidas por grande quantidade de tecido de natureza mesenquimal. O aspecto morfológico das ilhotas de ratos jovens pode ser considerado intermediário, devido à

presença simultânea de características pertencentes às ilhotas de ratos recém-nascidos e adultos.

Ainda, a figura 3 mostra que nos primeiros estágios do desenvolvimento (períodos fetal e neonatal) as ilhotas encontram-se freqüentemente associadas a ductos, estruturas possivelmente implicadas na histogênese de células do pâncreas endócrino e exócrino durante a embriogênese (Pictet e Rutter, 1972) ou mesmo no estágio adulto mediante certas condições experimentais, como após pancreatômia parcial (Bonne-Weir *et al.*, 1993; Brockenbrough *et al.*, 1988; Peters *et al.*, 2000; Sumi e Tamura, 2000), ligação de ductos (Wang *et al.*, 1995) ou tratamento com streptozotocina (Xu *et al.*, 1999; Thyssen *et al.*, 2006).

A organização celular dentro das ilhotas pancreáticas tem sido apontada como um importante fator na manutenção da função endócrina deste órgão (Cirulli *et al.*, 1993; Cirulli *et al.* 1994; Moller *et al.* 1992). Nos mamíferos, em geral, as ilhotas são formadas por um cerne de células beta, secretoras de insulina, circundadas por células não-beta, que incluem as secretoras de glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático (Beatens *et al.*, 1979; Cirulli *et al.*, 1994; Bennett *et al.*, 1996; Esni *et al.* 1999; Kulkarni *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Gannon *et al.*, 2000; Brissova *et al.*, 2002). A figura 4 mostra as ilhotas coradas por Hematoxilina Crômica-Floxina ou submetidas à reação de imunoperoxidase para insulina ou glucagon. A coloração de Hematoxilina Crômica-Floxina diferencia as células beta, em azul, das não-beta em rosa. Os resultados obtidos tanto com a coloração de Hematoxilina Crômica-Floxina como com a imunohistoquímica demonstram que a citoarquitetura típica, caracterizada pelo arranjo de células beta ocupando o cerne da ilhota e as células não-beta, a periferia, é verificada em ilhotas de ratos já no período perinatal e se mantém até a fase adulta. Entretanto, na fase fetal, embora já se observe um esboço dessa citoarquitetura, ela parece não ser tão evidente como nos outros grupos, pois verificou-se, em algumas ilhotas, a presença de célula alfa em regiões mais centrais na ilhota.

Ainda, constatou-se uma baixa correlação entre o número de células beta identificadas pela coloração de Hematoxilina Crômica-Floxina e as especificamente marcadas após imunohistoquímica para insulina nas ilhotas de fetos, pois um menor número de células beta foi identificada pela técnica histoquímica utilizando Hematoxilina Crômica-Floxina. Uma possível

explicação para este fenômeno é que nas células beta de ilhotas de fetos, os grânulos de insulina ainda estão provavelmente imaturos e a ligação com o corante (hematoxilina crômica) não ocorreu de forma eficiente, tornando difícil a observação das células beta na ilhota. Portanto, para que esta população celular em ilhotas de fetos seja corretamente observada, faz-se necessário o emprego da técnica de imunoperoxidase, já que esta técnica é específica para a determinação da presença de insulina.

Sabe-se que o pâncreas endócrino de ratos passa por uma grande reestruturação durante a vida fetal, principalmente próximo ao nascimento, que envolve a perda de células beta por apoptose e sua substituição por novas células beta que demonstram fenótipo secretor de insulina mais responsivo à glicose (Scaglia *et al.*, 1997; Petrik *et al.*, 1998). Entretanto, nossos resultados evidenciam que após o nascimento há modificações adicionais no que se refere à formação e maturação dos grânulos de insulina, que resultaram na diferença observada entre as ilhotas neonatais e fetais, quando coradas por hematoxilina-crômica e floxina.

Os dados morfológicos mostram, portanto, diferenças no grau de organização morfológica do pâncreas endócrino, que podem estar relacionadas com o processo de maturação das ilhotas e conseqüente maturação do processo secretor de insulina observado durante o desenvolvimento do animal. Como é sabido que a organização tecidual depende das interações célula-célula e célula-matriz, fomos investigar a importância dos contatos intercelulares na resposta secretória de insulina nas fases neonatal e adulta.

2.3.3 Papel do contato intercelular na maturação *in vivo* da célula beta

Avaliamos a resposta secretória de insulina em ilhotas íntegras, em células dispersas e reagregadas de ratos adultos (figura 5), de recém-nascidos (figura 6) e de recém-nascidos mantidas por dez dias em cultura (figura 7).

Em concordância com os dados anteriores (seção 2.3.1), as ilhotas de ratos adultos mostraram-se responsivas à glicose, apresentando um aumento de 82x na secreção de insulina quando estimuladas com uma concentração supraliminar de glicose (16.7 mM) em relação à secreção basal. Entretanto, na ausência de contato intercelular, quando as células das ilhotas de

adultos foram dispersas, essa resposta secretora de insulina foi completamente inibida, porém parcialmente restabelecida quando as células foram reagregadas (Figura 5).

O impacto da ausência de contatos intercelulares sobre a resposta secretora de insulina à glicose foi consideravelmente menor no caso das ilhotas de ratos recém-nascidos. Como observado anteriormente (seção 2.3.1), as ilhotas de recém-nascidos são relativamente pouco responsivas a glicose, mostrando um aumento de apenas 3x na secreção de insulina quando estimulada com uma concentração supraliminar de glicose (16.7 mM) em relação à secreção basal. Ao realizar a dispersão das células das ilhotas, observamos que a diferença entre secreção estimulada e basal diminuiu um pouco e restabelece a níveis semelhantes às ilhotas intactas após a reagregação das células (Figura 6).

Dados prévios do nosso grupo mostraram que as ilhotas de recém-nascidos, quando cultivadas durante um período relativamente longo, sofrem maturação parcial do processo de secreção de insulina (Leite *et al.*, 2005; Collares-Buzato *et al.* 2004) e este fenômeno foi confirmado neste trabalho (Figura 7). Ao manter as ilhotas de ratos recém-nascidos em cultura por 10 dias, a secreção de insulina sob concentração estimulatória de glicose (16.7 mM) foi 18x maior que a de ratos recém-nascidos que não ficaram em cultura (0,061ng/ml N 2.8 mM x 0,102ng/ml N 16.7 mM e 0,17ng/ml N10d 2.8mM x 1,22ng/ml N10d 16.7mM $p < 0,001$). Surpreendentemente, quando fizemos a dispersão das células destas ilhotas de animais recém-nascidos que ficaram em cultura por 10 dias, observamos uma inibição significativa da secreção estimulada de insulina, à semelhança da observada em ilhotas de adultos e, ao restabelecer os contatos intercelulares, houve uma recuperação parcial da secreção de insulina estimulada pela glicose (Figura 7).

Uma redução na resposta secretora de insulina em células da ilhota quando dispersas e o restabelecimento desta resposta após reagregação celular já havia sido descrito anteriormente (Bosco *et al.*, 1989; Hopcroft *et al.*, 1985; Pipeleers *et al.*, 1985), sugerindo que a interação célula-célula é crucial para uma adequada resposta secretória de insulina. Entretanto, nenhum trabalho havia avaliado a importância do contato intercelular na secreção de insulina neste modelo.

Os resultados obtidos confirmam, portanto, a importância do contato celular para uma adequada secreção de insulina em resposta a glicose, particularmente nas ilhotas pancreáticas de ratos adultos, cujas células beta são reconhecidamente responsivas a este secretagogo. Estes resultados reforçam a ideia defendida nesta dissertação que o contato intercelular mediado pelas junções intercelulares deve desempenhar algum papel no processo de maturação da maquinaria secretória da célula beta observada durante o desenvolvimento do animal.

Numa etapa seguinte deste trabalho, fomos investigar a expressão e distribuição celular de proteínas associadas às junções intercelulares nas ilhotas pancreáticas no nosso modelo *in vivo* de maturação funcional da célula beta.

2.3.4 Distribuição e conteúdo celular de proteínas associadas à junção de oclusão nas ilhotas pancreáticas de ratos durante o desenvolvimento.

As figuras 8 e 9 mostram a distribuição celular e expressão de proteínas associadas à junção de oclusão no pâncreas endócrino ao longo do desenvolvimento do animal.

Na figura 8, temos a imunoreação para ocludina, que parece não ser expressa em células endócrinas do pâncreas endócrino de ratos adultos, jovens e fetos, como vemos nos painéis (a), (c) e (g), por imunofluorescência. Entretanto, observou-se uma tênue marcação em células localizadas no interior das ilhotas de ratos recém-nascidos, painel (e). A análise por *Western Blot* confirmou esses resultados, conforme mostrado no painel (j): obteve-se apenas uma banda imunoreativa no homogeneizado de ilhotas de recém-nascidos enquanto que nenhuma expressão desta proteína foi observada nas ilhotas isoladas de pâncreas de ratos de outras idades.

Rahner e colaboradores (2001) mostraram que há a expressão de ocludina em vasos e ductos no pâncreas de ratos Sprague-Dawley adultos, porém não observaram a presença desta proteína nas ilhotas pancreáticas destes animais. Nossos resultados corroboram este estudo, já que os ratos adultos não apresentaram expressão desta proteína no pâncreas endócrino *in situ*. Entretanto, no momento, não temos uma explicação para a imunodeteção de ocludina nas células endócrinas pancreáticas de recém-nascidos, nem tão pouco para o possível significado

funcional deste achado. Estudos futuros serão necessários para nos certificarmos destas questões.

Quando analisamos outra proteína associada à junção de oclusão, a ZO-1 verificou-se que, em ilhotas de adultos e jovens, há uma nítida marcação pontilhada na região de contato intercelular das células endócrinas (Figura 9 a-h). Em ilhotas de recém-nascidos e fetos, esta marcação para ZO-1 na área de contato celular foi significantivamente menor. Entretanto, em ambos os grupos, observou-se uma forte marcação em linhas dentro ou próximo à ilhota, que correspondem, respectivamente, a capilares ou ductos que são freqüentemente vistos associados às ilhotas nesta fase perinatal, como já visto na análise morfológica.

As diferenças de expressão da ZO-1 nas ilhotas pancreáticas ao longo do desenvolvimento, observadas por imuno-histoquímica, foram confirmadas por *Western Blot*. Como mostrado na figura 9 (j), há uma quantidade celular significantivamente maior desta proteína em ilhotas pancreáticas de jovens e adultos em comparação as de recém-nascidos e fetos. Entretanto, vale a pena ressaltar que a diferença de expressão na ZO-1 nas ilhotas dos diferentes grupos experimentais foi mais evidente por *Western Blot* em relação à detectada por imuno-histoquímica.

ZO-1 é uma proteína ubíqua da junção de oclusão e é particularmente desenvolvida nos epitélios de revestimento (Gumbiner, 1987; Tsukita *et al.*, 1997; Schnittler, 1998). Entretanto, na ausência deste tipo de junção, tal proteína pode estar associada com junções do tipo aderente, em células de origem não epitelial tais como astrócitos, fibroblastos e no músculo cardíaco (Howarth *et al.* 1992, Itoh *et al.* 1993, 1997). A junção de oclusão e suas proteínas associadas desempenham uma função importante nos epitélios de revestimento, formando uma barreira de difusão que limita a passagem de íons e moléculas pela via paracelular, mantendo assim um gradiente eletro-químico transepitelial (Diamond, 1977; Fasano, 2000; Anderson *et al.*, 2001). Estudos *in vitro* têm revelado que a modulação da função de barreira epitelial está associada à redistribuição celular e alteração da expressão de proteínas associadas à junção de oclusão, incluindo a ZO-1, em células epiteliais (Collares-Buzato *et al.*, 1994, 1998; Peixoto e Collares-Buzato 2005).

Mais recentemente, foi demonstrado que a inativação dos genes que codificam ZO-1 e ZO-2, em camundongos, resulta em morte embrionária e/ou comprometimento da organogênese, demonstrando que essas proteínas e a junção de oclusão são também importantes na organização tecidual e no desenvolvimento embrionário (Xu *et al.*, 2008; Katsuno *et al.*, 2008).

Tem sido reportado que a regulação *in vivo* dessas junções está associada com vários processos biológicos como no processo de absorção intestinal de nutrientes (Madara, 1990, 1998), na espermiogênese (Pelletier e Byers, 1992; Cheng e Mruk, 2002), no trânsito de moléculas através dos capilares cerebrais (Rubbin e Staddon, 1999) e na transmigração de patógenos e/ou células através de epitélios e endotélios durante infecção bacteriana intestinal (Jepson *et al.*, 1995). O comprometimento da barreira epitelial mediada pelas junções de oclusão, por sua vez, está relacionado com várias disfunções tais como infecção bacteriana (Jepson *et al.*, 2000), inflamação (Evans *et al.*, 1983), no grau de invasividade e metástase de cânceres (Martin e Jiang, 2009), transtornos do SNC devido a quebra da barreira hematoencefálica (Förster, 2008; Roberts *et al.*, 2010) e distúrbios renais resultantes de envenenamento (de Paula Le Sueur *et al.*, 2005; Nascimento *et al.* 2007). Embora o papel das junções de oclusão no caso dos epitélios de revestimento esteja relativamente bem estabelecido, a função destas estruturas de membrana em outras células e tecidos, inclusive no epitélio glandular, ainda permanece pouco conhecida.

Nosso grupo relatou, pela primeira vez, a presença de proteínas associadas às junções de oclusão (incluindo a ZO-1) e aderente em células endócrinas de ilhotas pancreáticas de rato recém-nascido e, ainda, demonstrou que a expressão dessas proteínas aumentava em paralelo ao grau de maturação funcional da célula beta *in vitro* (Collares-Buzato *et al.* 2004). A presença e possível papel das junções de oclusão interconectando as células constituintes do pâncreas endócrino ainda é tema de debate (In't Veld *et al.*, 1984; Yamamoto & Kataoka, 1984, Semino *et al.*, 1987). Entretanto, a observação feita neste trabalho e por outro grupo de pesquisa (Prof. Paolo Meda, Universidade de Genebra, Suíça, *comunicação pessoal*) que a ZO-1 e claudinas, proteínas da junção de oclusão, são expressas em ilhotas pancreáticas de roedores, *in situ*, corrobora a idéia que essa especialização de membrana possa ter alguma função na biologia do

pâncreas endócrino e, em particular, da célula beta (Collares-Buzato *et al.* 2004, Semino *et al.* 1987).

Uma hipótese para explicar o possível envolvimento da ZO-1 no processo de maturação *in vivo* da célula beta é através de sua reconhecida interação estrutural/funcional com a junção comunicante, pois dados recentes da literatura mostram que esta proteína juncional co-precipita com a Cx36, proteína associada à junção comunicante, em vários tipos celulares, incluindo as células endócrinas das ilhotas pancreáticas, o que sugere um papel para a ZO-1 na organização dos canais intercelulares na membrana plasmática e no processo de *turnover* das conexinas (Girao e Pereira, 2007; Li *et al.*, 2004 a,b). Estudos com células de Sertoli e cardiomiócitos sugerem a participação da ZO-1 na via de endocitose e degradação dos conéxons da placa juncional (Segretain *et al.* 2004; Barker *et al.* 2002). Em concordância com essa hipótese, demonstramos, recentemente, que células beta de ilhotas de feto e recém-nascido expressam relativamente baixa quantidade de Cx36, apresentam uma densidade menor de junções comunicantes na membrana e um menor acoplamento intercelular em comparação com as de jovem e adulto (Carvalho, 2009).

2.3.4 Distribuição e conteúdo celular de proteínas associadas à junção aderente nas ilhotas pancreáticas de ratos durante o desenvolvimento

A figura 10 mostra a imunolocalização para a proteína adesiva pertencentes à família das imunoglobulinas, não dependente de cálcio, a N-CAM. Verificamos que há uma distribuição diferencial da molécula de N-CAM nas células das ilhotas pancreáticas: uma expressão aumentada nas células localizadas na periferia da ilhota em comparação a região central formada por células beta, tanto em ratos adultos como em jovens.

Essa expressão diferencial de N-CAM não foi tão evidente nas células endócrinas das ilhotas pancreáticas de ratos recém-nascidos, as quais expressaram uma quantidade relativamente baixa dessa molécula de adesão. A imunomarcagem para esta molécula de adesão foi praticamente insignificante no caso das ilhotas de feto. Este resultado demonstra que essa marcação aumentada na região de células não-beta pode ser responsável pela citoarquitetura característica verificada nas ilhotas de jovens e adultos.

O resultado da análise por *Western Blot* do conteúdo celular da N-CAM (Figura 10, painéis i-j), está de acordo com os dados obtidos por imuno-histoquímica. A expressão dessa molécula de adesão foi significativamente diferente nas ilhotas de ratos nas diferentes idades: observou-se uma produção aumentada em ilhotas de ratos jovens e adultos quando comparada àquela verificada nas ilhotas de fetos e recém-nascidos. Quando analisamos a membrana obtida por *Blotting* (painel j), notamos a presença de mais de uma banda constituinte dessa proteína, que provavelmente correspondem às isoformas reconhecidas desta proteína, com peso molecular de 180, 140 e 120 kDa, geradas por *splicing* alternativo do pré-RNA desta proteína (Cunningham *et al.*, 1987), além de possíveis *breakdown* e metabólitos desta proteína, que são detectados pelo anticorpo utilizado (como descrito pelo fabricante).

Dados semelhantes foram reportados por Cirulli e colaboradores (1994), que sugeriram que a N-CAM deva ser importante na morfogênese das ilhotas, regulando a segregação celular na mesma. Entretanto, não havia relatos anteriores descrevendo a expressão e distribuição celular dessa proteína em ilhotas durante o período perinatal. Rouiller e colaboradores (1990) fizeram o isolamento das células beta e não beta de ilhotas pancreáticas por citometria de fluxo e mostraram que as células não-beta se reagregam independente da presença de Ca^{2+} extracelular, e relataram que a expressão de N-CAM nas células não-beta é maior que a vista nas células beta, em concordância com os nossos dados de imuno-histoquímica.

Foi observado por Esni e colaboradores (1999) que, em camundongos *knockout* para N-CAM, a citoarquitetura normal da ilhota foi afetada consideravelmente, resultando numa distribuição aleatória das células endócrinas na ilhota, como, por exemplo, células alfa ocupando a região central da ilhota. Assim, sabendo que a N-CAM é importante para a segregação celular e manutenção da arquitetura tecidual em pâncreas de animais adultos, a menor produção desta proteína nas ilhotas no período perinatal pode explicar, em parte, a morfologia relativamente menos organizada e a citoarquitetura menos evidente observada nas ilhotas de animais na fase perinatal, especialmente dos fetos, como descrita nesta dissertação.

Além da N-CAM, investigamos também a expressão e distribuição celular de caderinas e cateninas em ilhotas de ratos nos vários estágios de desenvolvimento estudados. Para estudarmos as caderinas, utilizamos um anticorpo anti-pan-caderina, que reconhece um

epítopo comum às caderinas clássicas (N-, P-, E- e R-caderina) na imuno-histoquímica e anti-E-caderina no *Western Blot*.

A análise, por imuno-histoquímica, do padrão de distribuição da pan-caderina mostrou que ela é presente no pâncreas endócrino em todas as idades estudadas (Figura 11), com uma nítida marcação intercelular, na qual pode-se definir, com precisão, os limites celulares das células no interior da ilhota, bem como uma marcação nas células do pâncreas exócrino.

Em ilhotas de ratos jovens e adultos, há uma marcação das células não-beta ligeiramente mais intensa que a das células beta, o que não foi observada em ilhotas de ratos recém-nascidos e fetos. Em contraste, as ilhotas de fetos e recém-nascidos apresentaram uma marcação intercelular das células beta relativamente alta, maior que a verificada nos demais grupos experimentais. As células não-beta nas ilhotas de fetos apresentaram baixa ou nenhuma imunoreação para pan-caderina.

A análise da expressão de E-caderina por *Western Blot* (Figura 11, painéis i-k), mostrou nenhuma diferença significativa na expressão desta proteína nas diversas fases de desenvolvimento estudadas, o que, de certa forma, contrasta com os resultados obtidos por imuno-histoquímica. Acreditamos que esta discrepância se deve aos anticorpos utilizados, já que na imuno-histoquímica foi utilizado um anticorpo que reconhece vários subtipos de caderinas clássicas e no *Western Blot* apenas avaliada a expressão de um destes subtipos (a E-caderina). Isso pode ser indicativo de uma expressão diferencial de outro(s) subtipo(s) de caderina durante o desenvolvimento.

As células beta pancreáticas expressam a molécula de adesão cálcio-dependente E-caderina, que parece ter um papel importante na regulação da agregação das células beta constituintes das ilhotas pancreáticas e conseqüente manutenção da citoarquitetura destas ilhotas (Dahl *et al.*, 1996; Rouiller *et al.*, 1991; Yamagata *et al.*, 2002). Hauge-Evans e colaboradores (1999) mostraram que a formação de pseudo-ilhotas a partir de uma suspensão de células beta da linhagem MIN6 é dependente desta proteína e a exposição *in vitro* ao anticorpo anti-E-caderina bloqueou a formação destas estruturas.

Cirulli e colaboradores (1994) demonstraram, por imuno-histoquímica, a expressão de E-caderina em ilhotas e pseudo-ilhotas de ratos, porém não relataram expressão diferencial dessa

molécula de adesão nos diferentes tipos celulares da ilhotas. Os nossos dados de imunohistoquímica para pan-caderina sugerem que há outra(s) proteína(s) da super-família das caderinas sendo expressa(s) no pâncreas endócrino de ratos, indicando que há necessidade de estudos adicionais para se determinar quais subtipos de caderina são expressos pelos diferentes tipos celulares do pâncreas endócrino, ao longo do desenvolvimento animal.

Em função dos resultados obtidos, acreditamos que as caderinas forneçam uma força de coesão para a manutenção da adesão celular no início da histogênese do pâncreas endócrino e que a expressão diferencial de algum subtipo de caderina nas células beta e nas não-beta contribua para a aquisição e manutenção da citoarquitetura da ilhota no período pós-natal (Collares-Buzato *et al*, 1998, Cirulli *et al*, 1994).

A figura 12 mostra a reação de imunofluorescência indireta para a proteína juncional α -catenina. Em ilhotas de jovens e adultos, há uma marcação em linhas contínuas na região de contato celular; as de fetos e recém-nascidos, há uma marcação descontínua da região de contato celular, bem como uma tênue marcação citoplasmática.

Embora tenhamos observado diferenças quanto à distribuição celular, os resultados de *Western Blot* para a proteína juncional α -catenina mostram que não há uma diferença significativa em termos de conteúdo celular total desta proteína nas ilhotas dos diferentes grupos analisados (Figura 12, painéis i-k).

Quando avaliamos a localização celular da β -catenina, que se associa às caderinas e às outras cateninas (alfa e gama) na junção aderente, verificamos que não há uma diferença significativa no padrão de marcação entre os grupos estudados (Figura 13) e comprovado por *Western Blot*. Entretanto, deve-se ressaltar que se observou uma marcação intercelular mais forte nas células das ilhotas de ratos adultos e jovens em comparação com a verificada nas ilhotas de recém-nascidos e fetos.

Luther e colaboradores (2005) mostraram que há um aumento destas duas proteínas em células MIN6 organizadas em pseudo-ilhotas quando comparadas às células não agregadas, assim como foi observado um aumento da expressão da E-caderina, demonstrando uma relação direta destas proteínas para a manutenção da arquitetura tecidual.

Nosso grupo demonstrou um aumento da expressão de cateninas em ilhotas pancreáticas de ratos recém-nascidos mantidos em cultura ou tratadas com prolactina, assim como um aumento na expressão de conexinas, proteínas das junções comunicantes (Collares-Buzato *et al.*, 2001; 2004). Sabe-se que a perturbação da interação entre cateninas e caderinas ou a diminuição da expressão de algum componente deste complexo leva, invariavelmente, à redução da adesão e comunicação celular (Shimoyama *et al.*, 2002), o que pode refletir diretamente na função da célula beta pancreática.

Os resultados obtidos nessa dissertação sugerem, portanto, que as diferenças na distribuição e conteúdo celular de proteínas associadas às junções aderente e de oclusão no pâncreas endócrino de ratos em diversas fases do desenvolvimento pode estar relacionada com a aquisição e manutenção da estrutura e o grau de diferenciação celular das ilhotas pancreáticas, em particular das células beta.

2.4 Figuras do capítulo

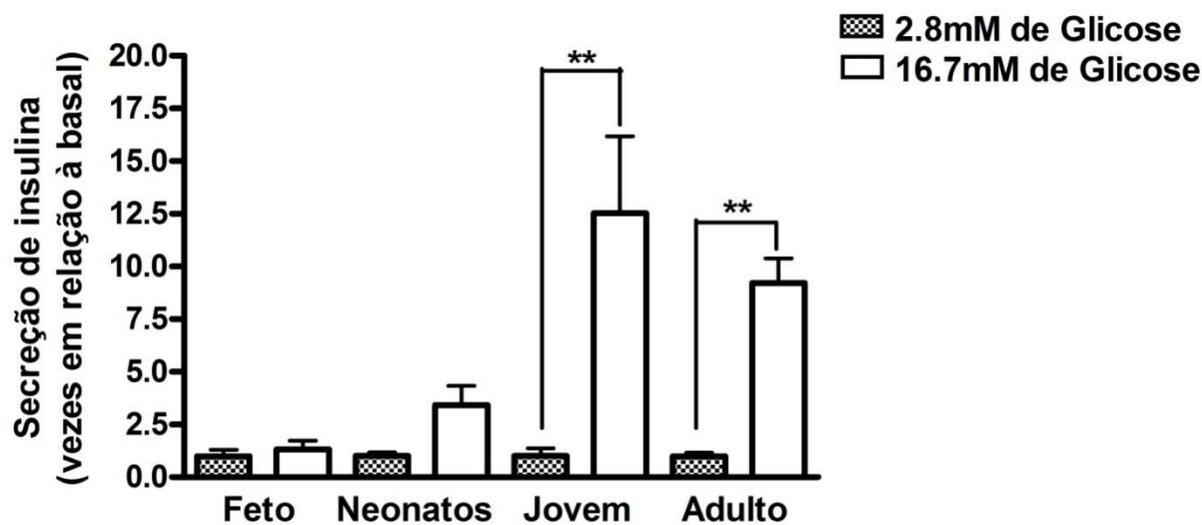


Figura 2. Secreção estática de insulina em ilhotas de ratos durante o desenvolvimento

Comparativamente às ilhotas de ratos jovens e adultos, as de fetos e recém-nascidos mostraram uma secreção estimulada de insulina em relação à basal significativamente menor. Os resultados estão expressos como a quantidade de insulina secretada (ng/ilhota.h) dividida pelo valor médio da concentração de insulina basal (2.8 mM de glicose) no grupo. ** $P < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni). (n= 10; n=24; n=10; n=24 em fetos, neonatos, jovens e adultos, respectivamente).

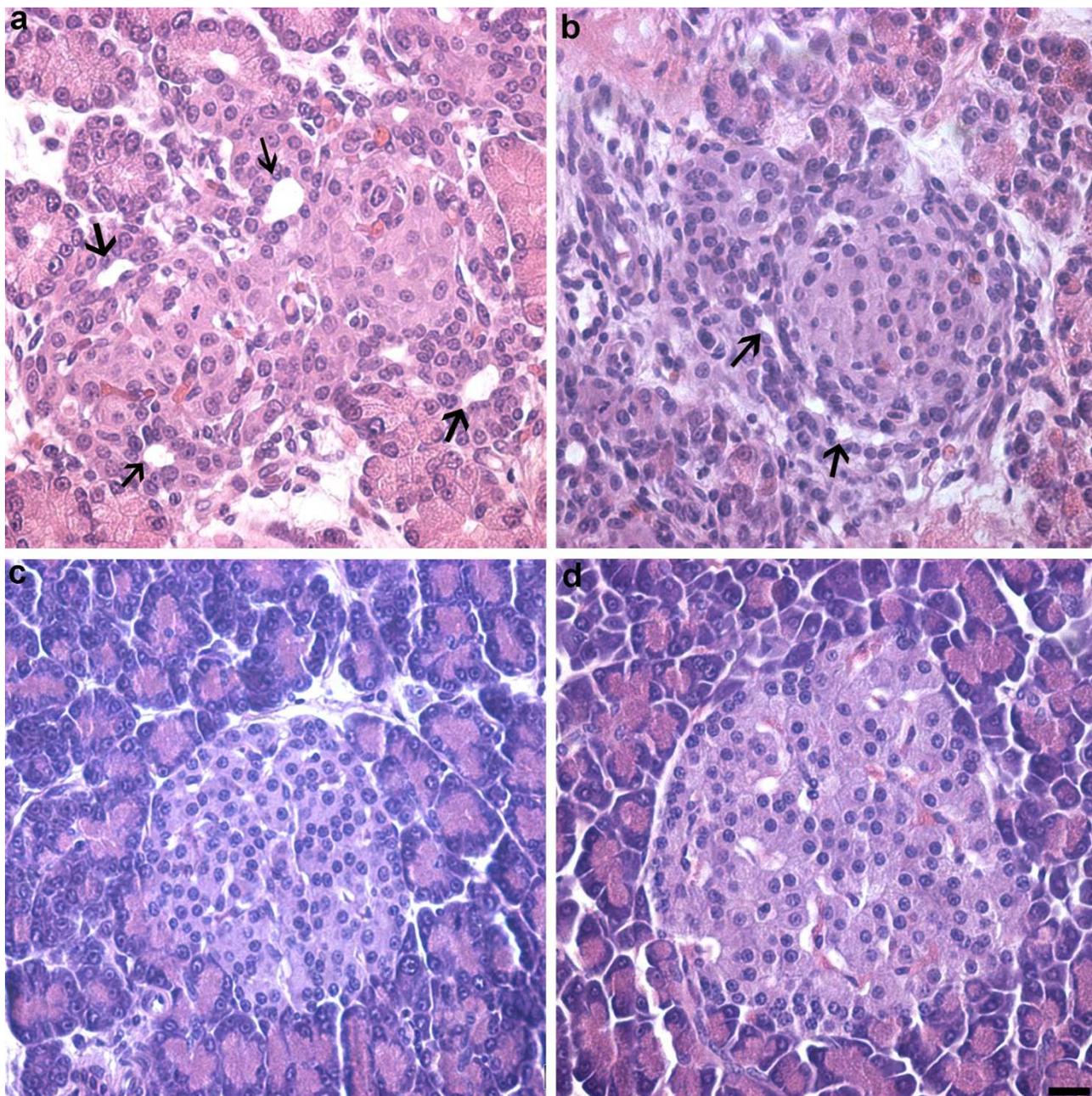


Figura 3. Aspecto morfológico de ilhotas pancreáticas de ratos em diferentes estágios do desenvolvimento.

Ilhotas de fetos (a) e recém-nascidos (b) apresentam morfologia menos organizada, quando comparadas às ilhotas de animais com 21 dias (c) e adultos (d). Nos estágios iniciais do desenvolvimento (períodos fetal e neonatal), as ilhotas encontram-se freqüentemente associadas a ductos (setas), estruturas implicadas com a histogênese de células do pâncreas endócrino e exócrino durante a embriogênese. Barra: 25 μ m.

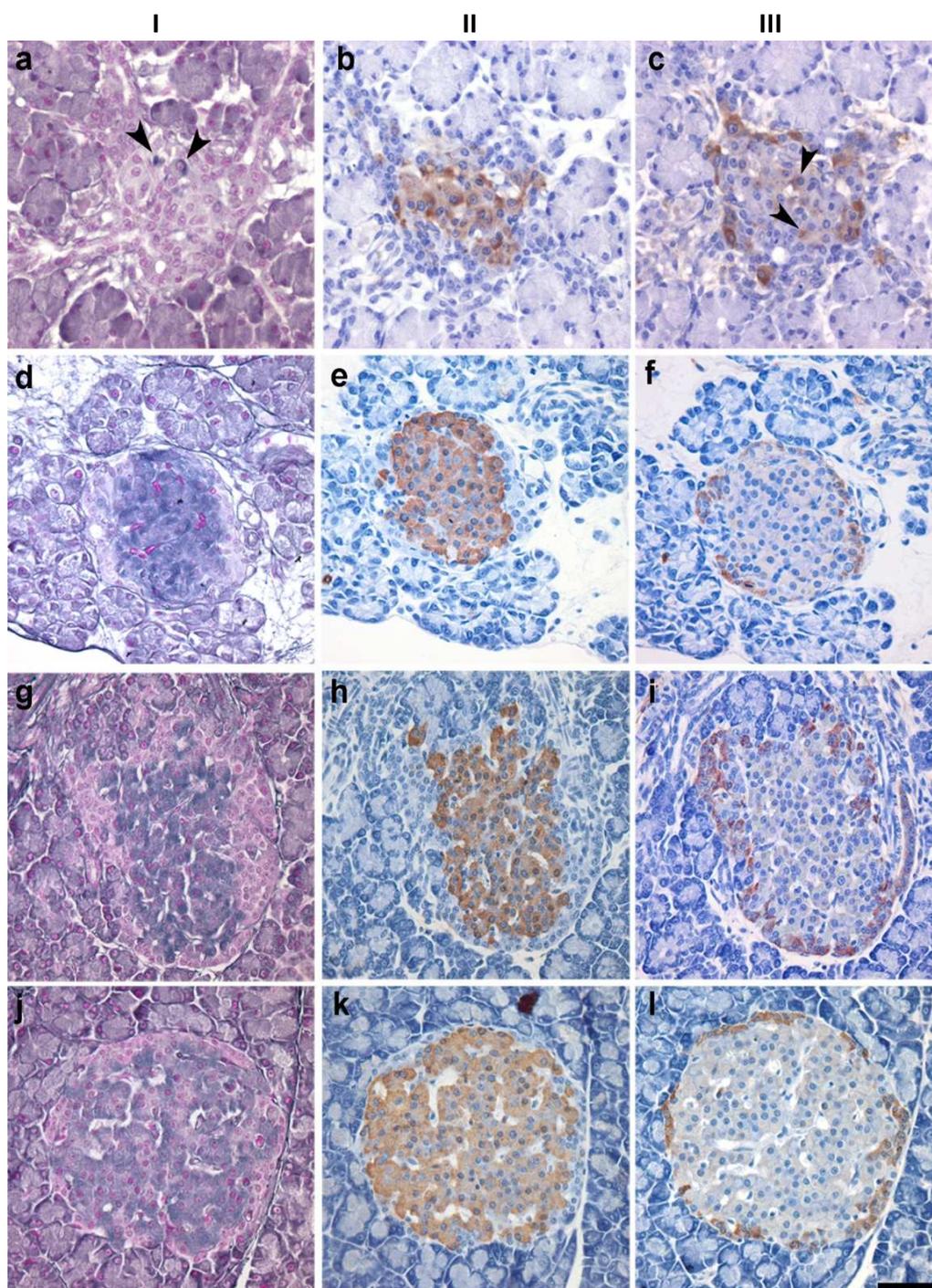


Figura 4. Padrão de citoarquitetura do pâncreas endócrino durante o desenvolvimento.

A coluna I apresenta ilhotas de ratos coradas com Hematoxilina Crômica-Floxina enquanto as colunas II e III mostram, respectivamente, ilhotas submetidas a reação imuno-histoquímica para detecção de insulina e glucagon. Figuras de a-c, correspondem a ilhotas de fetos; de d-f de recém-nascidos; de g-i, ilhotas de jovens e, de j-l de adultos. Os resultados obtidos tanto com a coloração de Hematoxilina Crômica-Floxina como com a imuno-histoquímica demonstram que a citoarquitetura típica da ilhota, com células beta ocupando o cerne da ilhota e não-beta a periferia, é verificada em todas as fases do desenvolvimento, mas esta é menos evidente na fase fetal. Barra: 50 μ m.

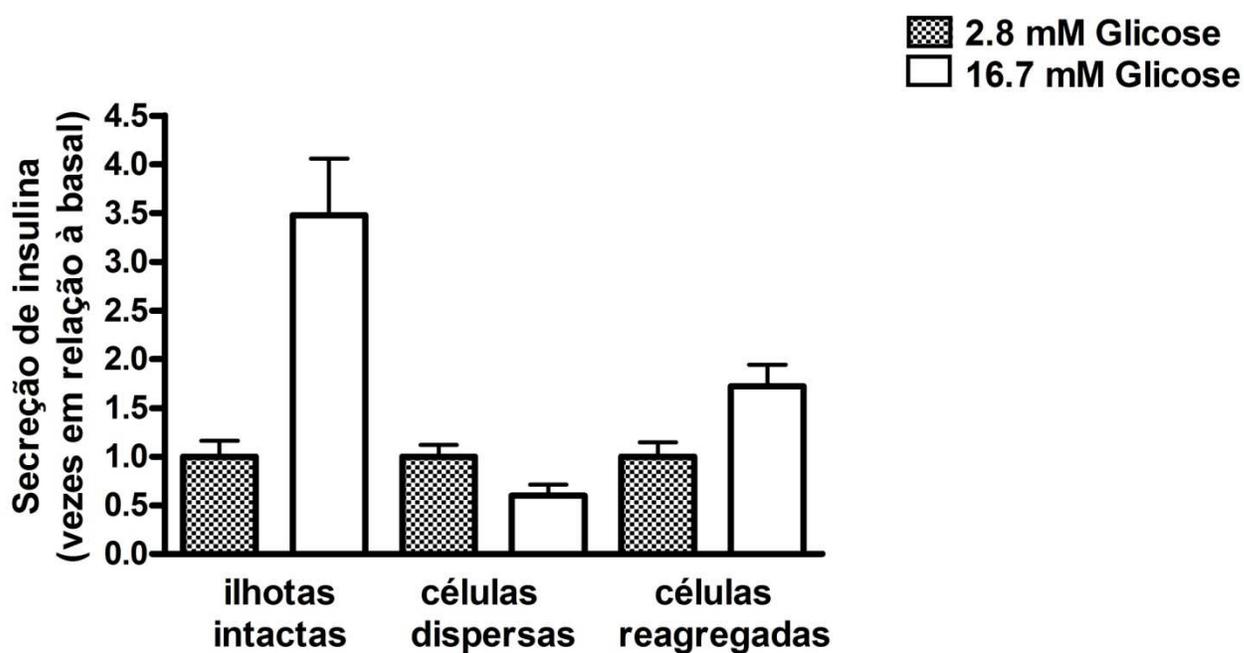


Figura 5. Secreção estática de insulina em ilhotas intactas, células dispersas e células reagregadas de ratos adultos

Observa-se uma diferença significativa na secreção de insulina entre as ilhotas/células estimuladas com 2.8 mM e 16.7 mM de glicose, no caso das ilhotas intactas. Ao realizar a dispersão das células, observa-se que a resposta secretora de insulina diminui significativamente e, ao reagregar as células, a secreção estimulada de insulina volta a aumentar, porém sem retomar os níveis de secreção das ilhotas intactas. $**P < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, com $n=22$ no caso de ilhotas e $n=10$, no caso de células dispersas e reagregadas).

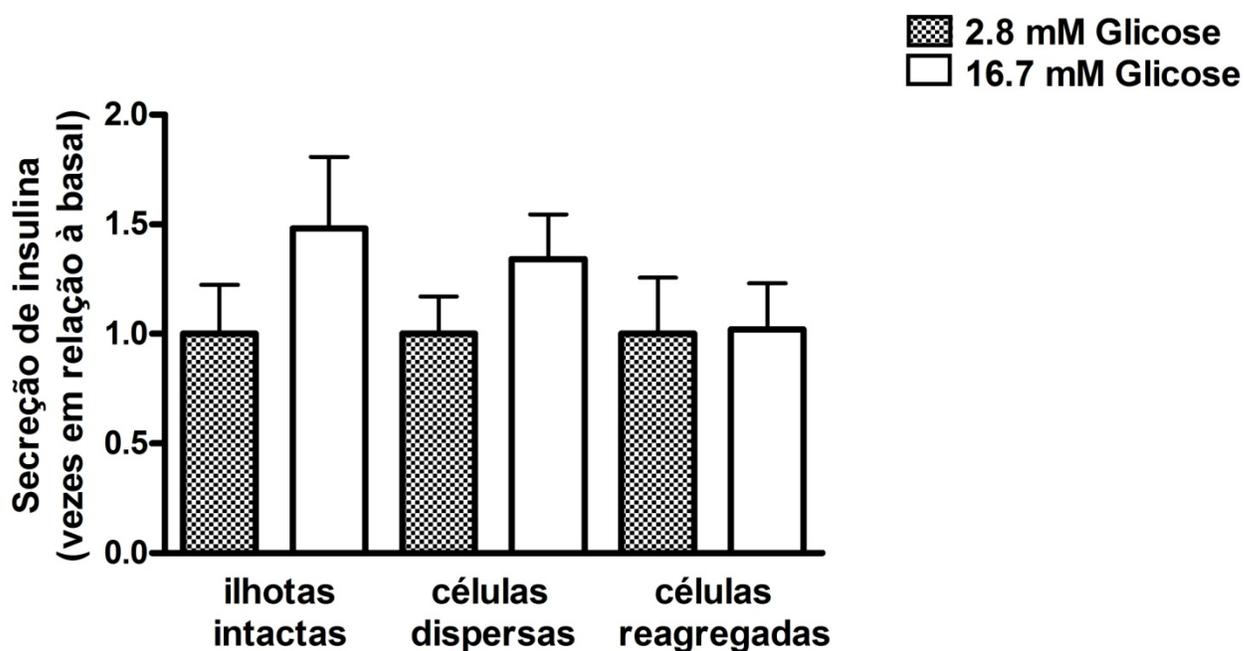


Figura 6. Secreção estática de insulina em ilhotas e em células dispersas e células reagregadas de ratos recém-nascidos.

Não observamos diferença significativa entre a secreção de insulina basal e estimulada nos diferentes grupos experimentais. Contudo, nota-se uma diminuição da secreção de insulina em células dispersas e uma recuperação desta secreção quando as células foram reagregadas. (n=22 no caso de ilhotas íntegras e n=10 no caso de células dispersas e reagregadas).

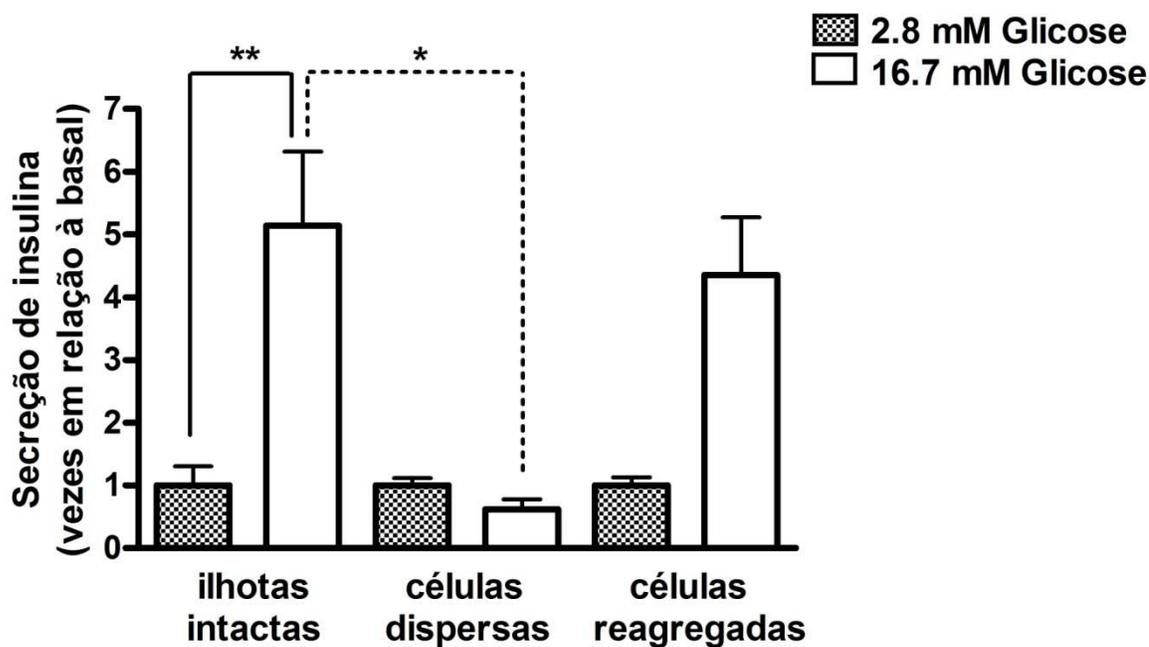


Figura 7. Secreção estática de insulina em ilhotas e em células dispersas de ratos recém-nascidos mantidos em cultura por 10 dias

Observa-se que as ilhotas de recém-nascido após cultivo tornam-se bastante responsivas à glicose e dependentes de contato intercelular. Quando os contatos celulares são restabelecidos, as células voltam a responder à glicose, porém sem retomar os níveis observados nas ilhotas íntegras. ** $P < 0,001$ e * $P < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, com $n=17$, no caso de ilhotas íntegras; $n=8$ no caso de células dispersas e $n=5$ no caso de células reagregadas).

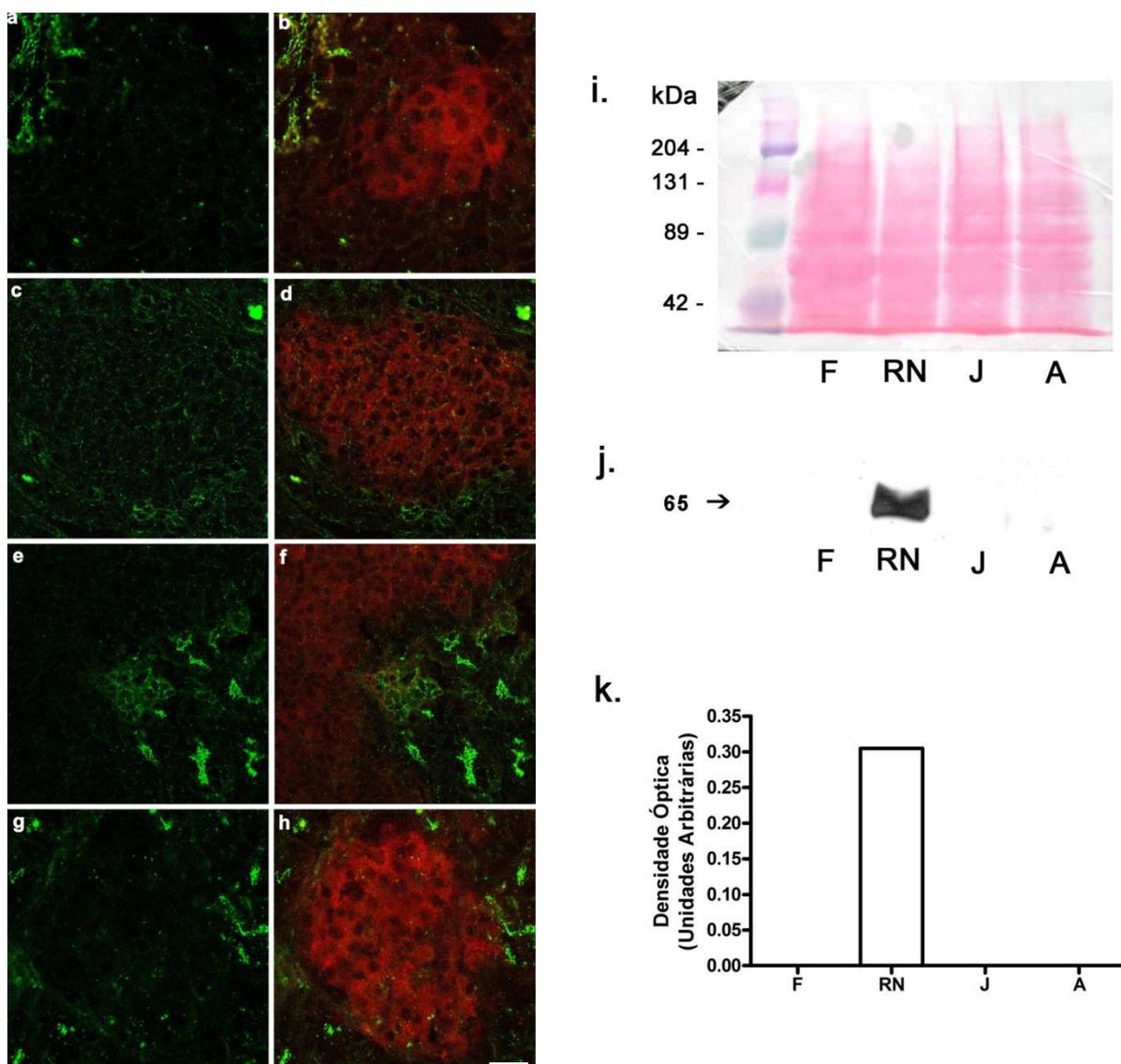


Figura 8. Expressão e localização de ocludina em ilhotas de ratos durante o desenvolvimento.

As figuras a-b correspondem a cortes de pâncreas de fetos, c-d de recém-nascidos, e-f de jovens g-h de adultos. A coluna I mostra a reação de imunofluorescência para a detecção de ocludina, enquanto a coluna II, a co-localização de ocludina e insulina numa ilhota em $n=5$ experimentos, com $n=1$ adulto, $n=1$ jovem, $n=5$ recém-nascidos e $n=5$ fetos por experimento. Barra: $40\ \mu\text{m}$. Após a corrida e transferência eletroforética a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau para averiguar se as densidades das bandas estavam semelhantes (i). O grau de expressão da proteína ocludina (65 kDa) foi avaliado por *Western Blot* em ilhotas de ratos adultos, jovens, recém-nascidos e fetos (j). As médias + SEM da densidade óptica das bandas dos grupos experimentais estão mostradas em (k). Notar que não há expressão detectável desta proteína em ilhotas de ratos adultos, jovens e fetos, conforme já demonstrado por imuno-histoquímica, mas foi detectada uma banda reativa para o anticorpo anti-occludina em homogeneizado de ilhotas de recém-nascidos.

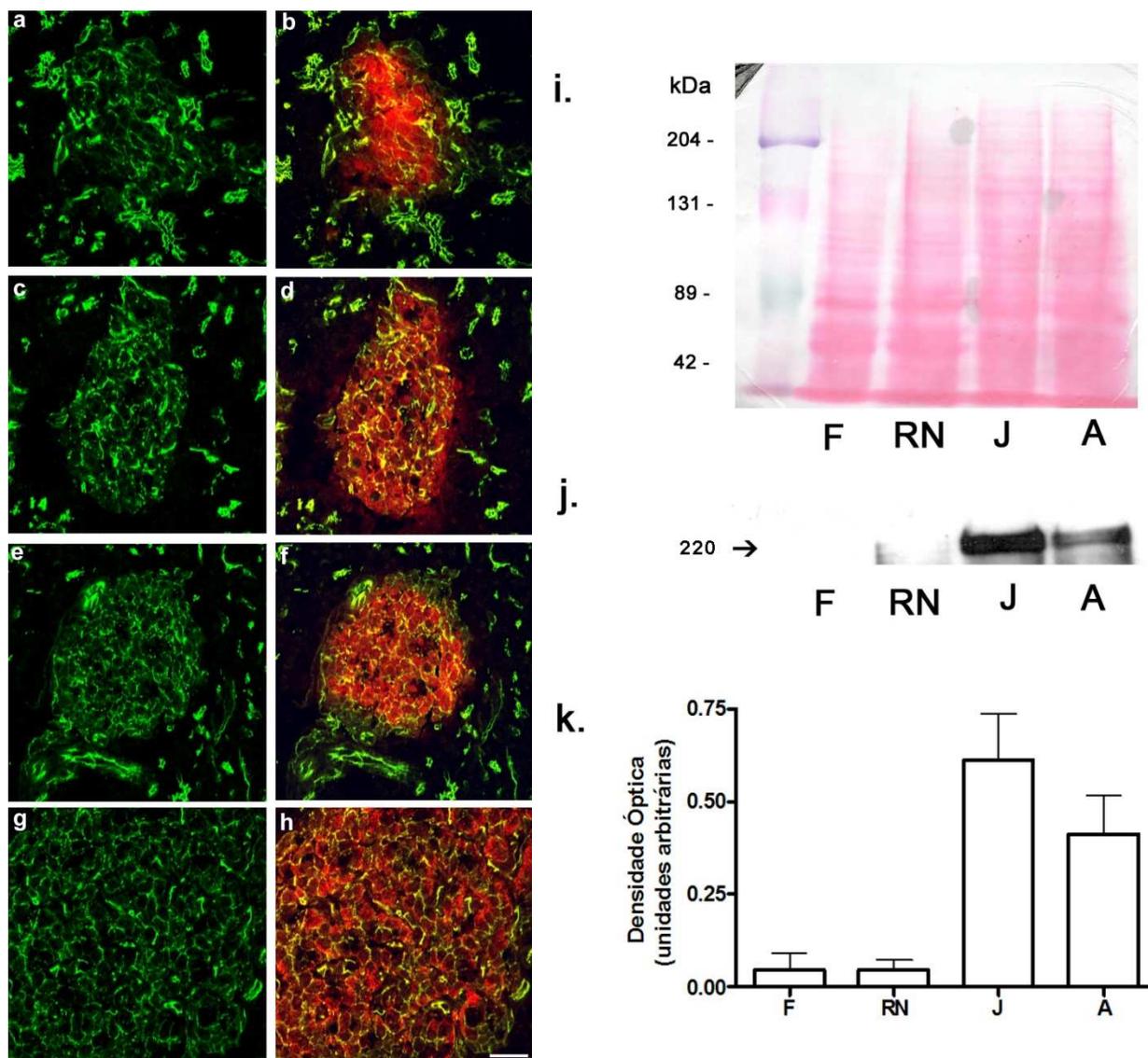


Figura 9. Expressão e localização de ZO-1 em ilhotas de ratos durante o desenvolvimento

As figuras a-h representam o resultado de imunofluorescência para ZO-1, enquanto i-k trazem o resultado de Western Blot desta proteína. As figuras a-b correspondem a cortes de pâncreas de fetos, c-d de recém-nascidos, e-f de jovens g-h de adultos. A coluna I mostra a reação de imunofluorescência para a detecção de ZO-1, enquanto a coluna II, a co-localização de ZO-1 e insulina numa ilhota, em n= 6 experimentos, com n=1 adulto, n=1 jovem, n=5 recém-nascidos e n=5 fetos por experimento. Barra: 40 μ m.

Após a corrida e transferência eletroforética, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau para averiguar se as densidades das bandas estavam semelhantes (i). O grau de expressão da ZO-1 (220 kDa) foi avaliado por Western Blot em ilhotas de ratos adultos, jovens, recém-nascidos e fetos (j). As médias + SEM da densidade óptica das bandas dos grupos experimentais estão mostradas em (k). Notar que há uma maior expressão desta proteína juncional nas fases jovem e adulta da vida animal em relação ao feto e recém-nascidos ($p < 0.05$, entre RN e A e $p < 0,01$ entre F e J e RN e J, ANOVA seguido de Bonferroni, em 5 experimentos com *pool* de ilhotas de 4 ratos adultos, 8 jovens, 20 recém-nascidos e 12 fetos.

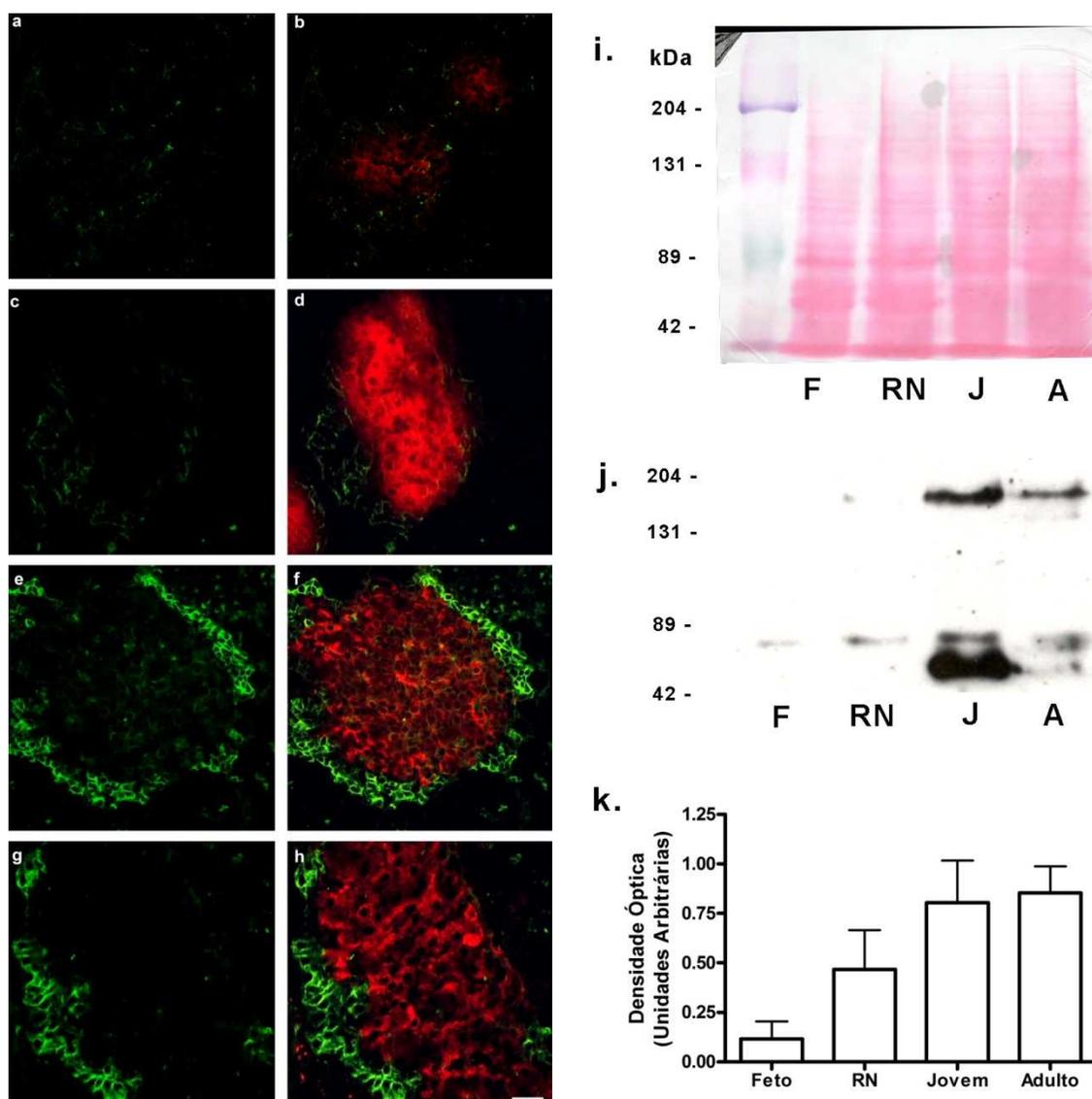


Figura 10. Expressão e localização de N-CAM em ilhotas de ratos durante o desenvolvimento

As figuras a-h representam o resultado de imunofluorescência para N-CAM, enquanto i-k trazem o resultado de Western Blot desta proteína. As figuras a-b correspondem a cortes de pâncreas de fetos, c-d de recém-nascidos, e-f de jovens g-h de adultos. A coluna I mostra a reação de imunofluorescência para a detecção de N-CAM, enquanto a coluna II, a co-localização de N-CAM e insulina numa ilhota, em n=3 experimentos, com n=1 adulto, n=1 jovem, n=5 recém-nascidos e n=5 fetos por experimento. Barra: 40 μ m.

Após a corrida e transferência eletroforética as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau para averiguar se as densidades das bandas estavam semelhantes (i). O grau de expressão da proteína N-CAM foi avaliado por Western Blot em ilhotas de ratos adultos, jovens, recém-nascidos e fetos (j). As médias + SEM da densidade óptica das bandas dos grupos experimentais estão mostradas em (k). Para a análise da quantidade total da proteína foram levadas em consideração todas as bandas presentes no filme, que correspondem a diferentes isoformas de N-CAM. Notar que há uma maior expressão desta proteína em ratos adultos e jovens quando comparados a ratos recém-nascidos e fetos $P < 0.05$ entre F e A, ANOVA seguido de Bonferroni, em 4 experimentos com *pool* de ilhotas com n=4 adultos, n=8 jovens, n=20 recém-nascidos e n=12 fetos.

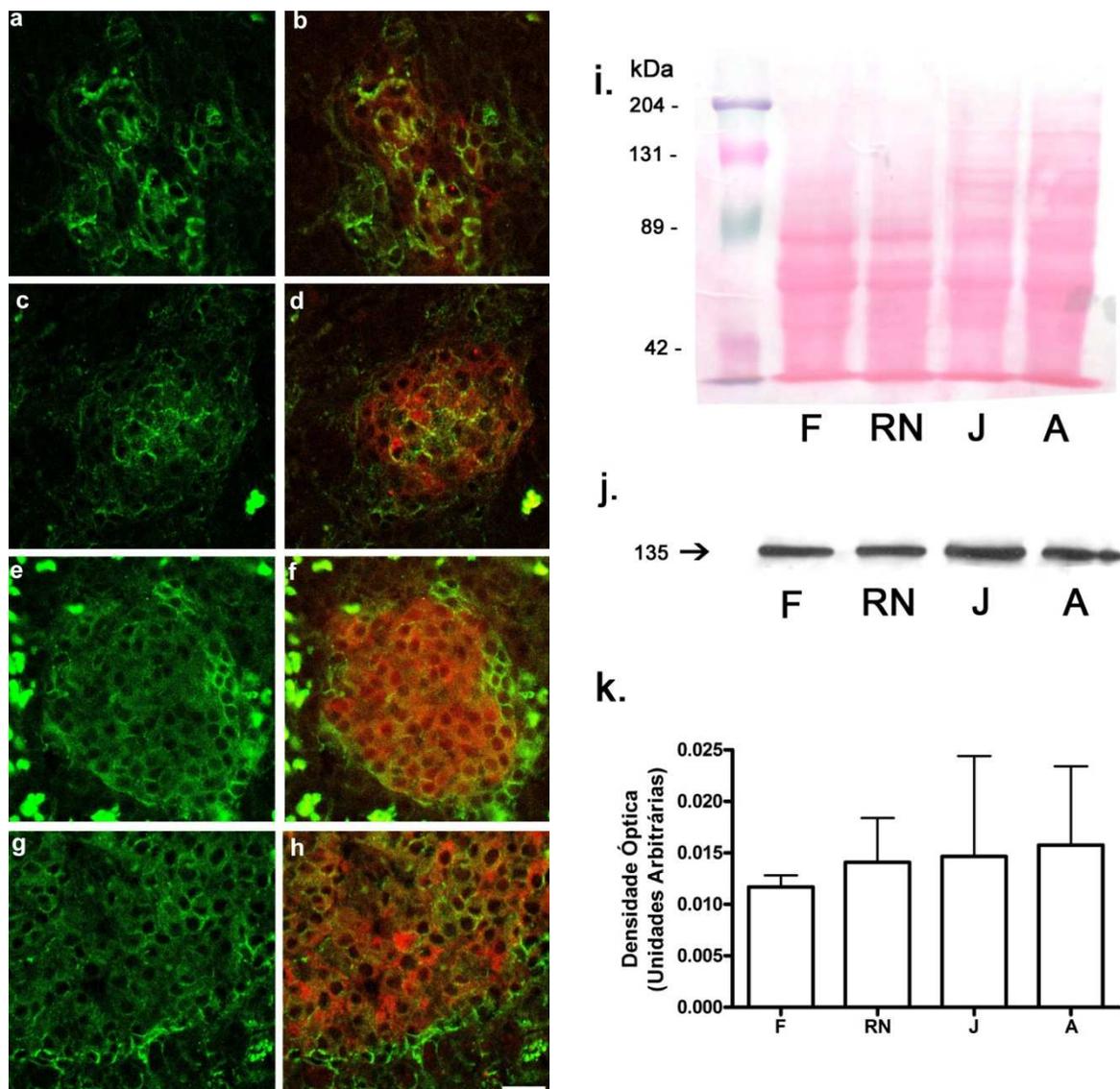


Figura 11. Expressão e localização de pan-caderina em ilhotas de ratos durante o desenvolvimento

As figuras a-h representam o resultado de imunofluorescência para Pan-caderina, enquanto i-k trazem o resultado de *Western Blot* desta proteína. As figuras a-b correspondem a cortes de pâncreas de fetos, c-d de recém-nascidos, e-f de jovens g-h de adultos. A coluna I mostra a reação de imunofluorescência para a detecção de pan-caderina, enquanto a coluna II, a co-localização de pan-caderina e insulina numa ilhota em n=5 experimentos, com n=1 adulto, n=1 jovem, n=5 recém-nascidos e n=5 fetos por experimento. Barra: 40 μ m.

Após a corrida e transferência eletroforética, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau para averiguar se as densidades das bandas estavam semelhantes (i). O grau de expressão da E-caderina foi avaliado por *Western Blot* em ilhotas de ratos adultos, jovens, recém-nascidos e fetos (j). As médias + SEM da densidade óptica das bandas dos grupos experimentais estão mostradas em (k). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos estudados com relação à E-caderina, em 3 experimentos com *pool* de ilhotas de 4 adultos, 8 jovens, 20 recém-nascidos e 12 fetos.

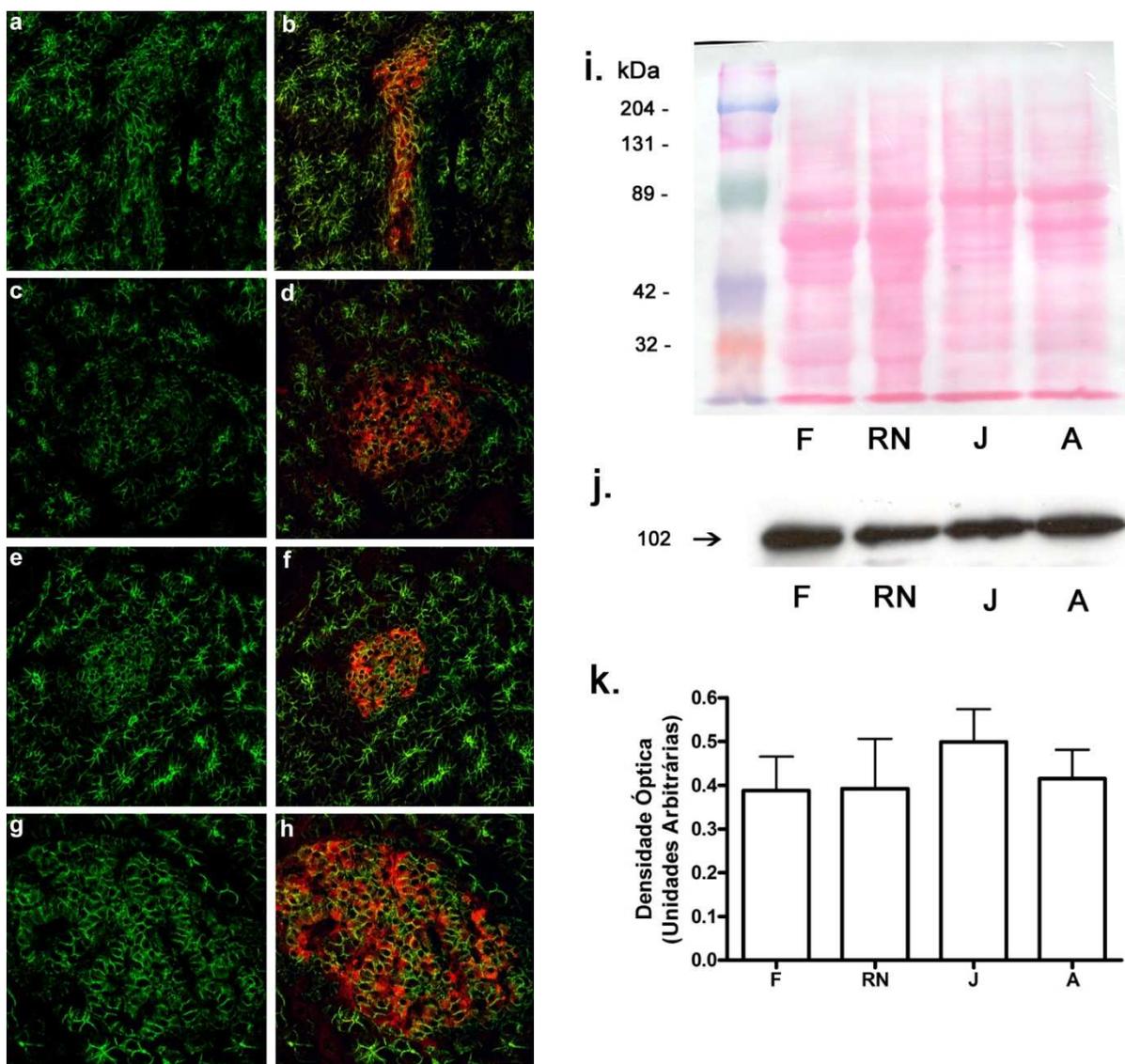


Figura 12. Expressão e localização de α -catenina em ilhotas de ratos durante o desenvolvimento

As figuras a-h representam o resultado de imunofluorescência para α -catenina, enquanto i-k trazem o resultado de Western Blot desta proteína. As figuras a-b correspondem a cortes de pâncreas de fetos, c-d de recém-nascidos, e-f de jovens g-h de adultos. A coluna I mostra a reação de imunofluorescência para a detecção de α -catenina, enquanto a coluna II, a co-localização de α -catenina e insulina numa ilhota em n=5 experimentos, com n=1 adulto, n=1 jovem, n=5 recém-nascidos e n=5 fetos por experimento. Barra: 40 μ m.

Após a corrida e transferência eletroforética, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau para averiguar se as densidades das bandas estavam semelhantes (i). O grau de expressão da α -catenina foi avaliado por Western Blot em ilhotas de ratos adultos, jovens, recém-nascidos e fetos (j). As médias + SEM da densidade óptica das bandas dos grupos experimentais estão mostradas em (k). Nenhuma uma diferença significativa foi observada entre os grupos estudados, em 3 experimentos com *pool* de ilhotas de 4 adultos, 8 jovens, 20 recém-nascidos e 12 fetos.

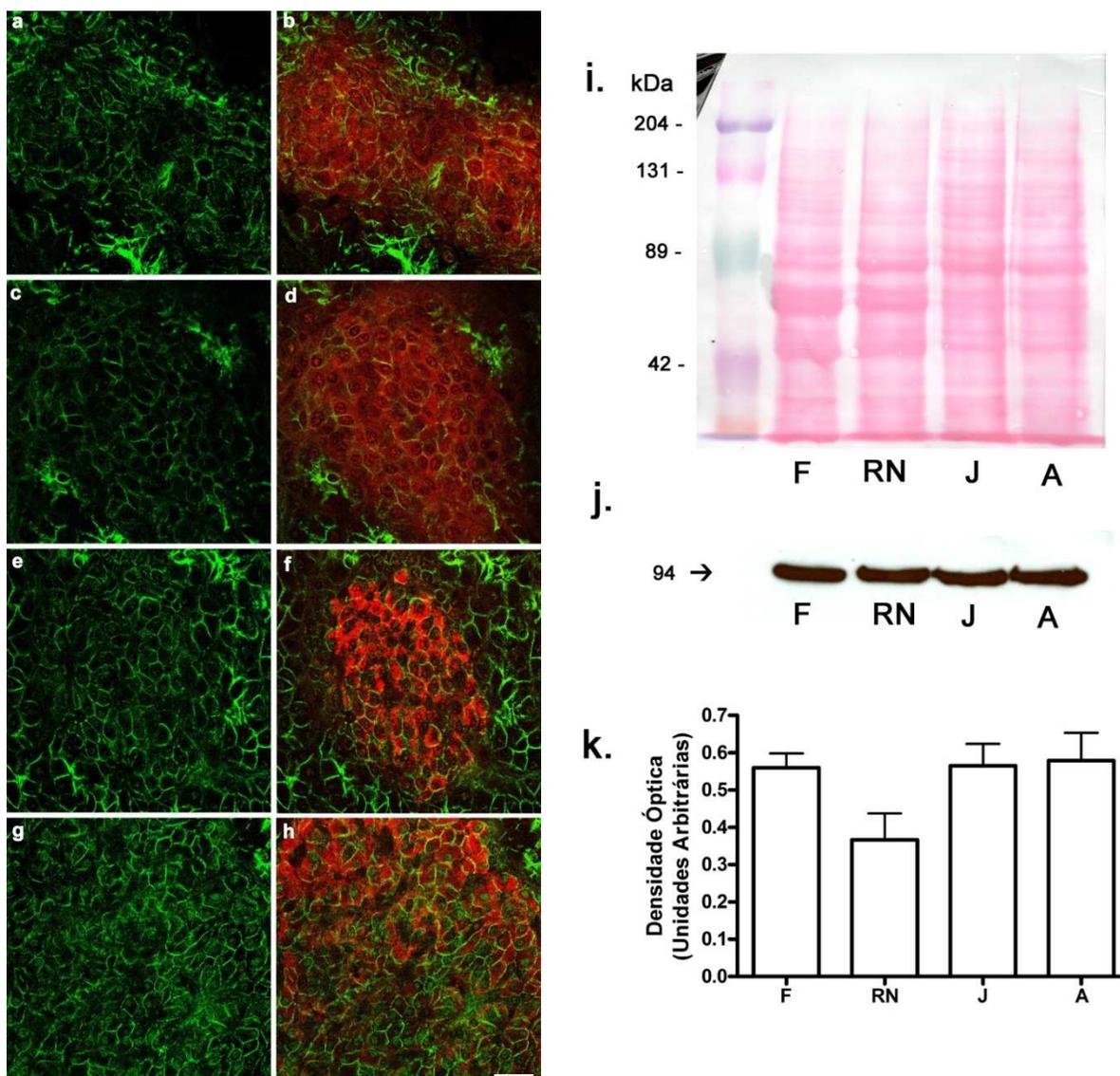


Figura 13. Expressão e localização de β -catenina em ilhotas de ratos durante o desenvolvimento.

As figuras a-h representam o resultado de imunofluorescência para β -catenina, enquanto i-k trazem o resultado de Western Blot desta proteína. As figuras a-b correspondem a cortes de pâncreas de fetos, c-d de recém-nascidos, e-f de jovens g-h de adultos. A coluna I mostra a reação de imunofluorescência para a detecção de β -catenina, enquanto a coluna II, a co-localização de β -catenina e insulina numa ilhota em n=5 experimentos, com n=1 adulto, n=1 jovem, n=5 recém-nascidos e n=5 fetos por experimento. Barra: 40 μ m.

Após a corrida e transferência eletroforética, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau para averiguar se as densidades das bandas estavam semelhantes (i). O grau de expressão da α -catenina foi avaliado por Western Blot em ilhotas de ratos adultos, jovens, recém-nascidos e fetos (j). As médias + SEM da densidade óptica das bandas dos grupos experimentais estão mostradas em (k). Nenhuma uma diferença significativa foi observada entre os grupos estudados, em 6 experimentos com *pool* de ilhotas de 4 adultos, 8 jovens, 20 recém-nascidos e 12 fetos.

Capítulo 3 – Distribuição e conteúdo celular de proteínas juncionais em ilhotas pancreáticas de camundongos pré-diabéticos.

3.1 Introdução

A secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas depende da ação sincronizada das células beta. A biossíntese, assim como a secreção basal e estimulada de insulina, dependem da citoarquitetura da ilhota, que é ditada pela expressão diferencial de moléculas de adesão (De Souza *et al.*, 2005).

As junções celulares estão envolvidas em vários processos celulares tais como diferenciação, proliferação e homeostase celular em diversos órgãos, incluindo o pâncreas endócrino (Halbleib e Nelson, 2006; Carvell *et al.*, 2007). A importância da junção aderente nesta glândula endócrina é evidenciada pela observação que a E-caderina é essencial para que as células beta se organizem em estruturas (ilhotas pancreáticas) durante o desenvolvimento do pâncreas de camundongos (Dahl *et al.*, 1996). A diminuição da expressão da E-caderina resulta em uma citoarquitetura anormal das ilhotas pancreáticas e redução da secreção de insulina (Yamagata *et al.*, 2002). Semelhantemente, observou-se que, em cultura de uma linhagem de célula beta, a MIN6, a regulação da expressão de E-caderina também leva a alterações na secreção insulina (Lilla *et al.*, 2003). Em adição, tem sido observado que o aumento da expressão de α - e β -cateninas, proteínas também associadas à junção aderente, está relacionado com o processo de maturação *in vitro* da maquinaria secretora de insulina observada em cultura de ilhotas pancreáticas de ratos recém-nascidos (Collares-Buzato *et al.* 2004). Esses dados reforçam a idéia da importância do papel da junção aderente no desenvolvimento da ilhota pancreática bem como na resposta das células beta à glicose.

Pouco se conhece, entretanto, a respeito da expressão e localização das proteínas associadas às junções celulares em casos de disfunção do pâncreas endócrino de roedores, como na diabetes melito do tipo 2. Camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com ração com alto teor de lipídios têm sido utilizados como modelo de diabetes melito não dependente de insulina (tipo 2) (Shafrir *et al.*, 1999; Winzell e Ahren, 2004; Surwitt *et al.*, 1988; De Souza *et al.*, 2005). Após a administração de dieta hiperlipídica por um período que varia de

relativamente curto a prolongado (de algumas semanas a meses) estes animais desenvolvem uma moderada hiperglicemia (jejum e pós-prandial) e hiperinsulinemia, associada a um quadro de intolerância à glicose e resistência periférica à insulina o que caracteriza os estágios iniciais diabetes tipo 2 (Bjorntorp, 1988; Surwit *et al.*, 1988).

Esta etapa da dissertação teve como objetivos: 1) fazer uma caracterização metabólica do animal e morfológica do pâncreas endócrino no modelo de diabetes tipo 2, e 2) investigar a distribuição celular e conteúdo juncional de proteínas associadas às junções de oclusão e de adesão no pâncreas endócrino de camundongos C57 submetidos à dieta hiperlipídica por um período prolongado de oito meses.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (Campinas, SP), que foram mantidos em condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro (de 12h) e alimentados com ração e água *ad libitum* até o momento da experimentação.

Os experimentos deste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimental Animal da instituição (CEEA-IB-UNICAMP), sob protocolo n.º 987-1.

3.2.2. Dieta hiperlipídica

Os camundongos com 6 a 8 semanas de vida foram colocados em dieta com uma ração preparada com alto teor de lipídeos (21% em peso) por 240 dias (8 meses). Os camundongos controles receberam uma dieta com conteúdo normal de lipídeo (4.5% em peso; ração padrão em pó: Nuvital CR-1, Colombo, PR) pelo mesmo período de tempo. A composição das rações está mostrada na Tabela 3.1. Na ração hiperlipídica, o conteúdo de sais minerais e vitaminas é, aproximadamente, o mesmo da ração padrão.

Tabela 3.1: Composição das rações.

Componentes g%	Ração Padrão	Ração Hiperlipídica
Proteínas	22,0	20,0
Carboidratos	53,0	50
Lipídeos	4,5	21
Outros*	20,5	8
kcal / Gm	2,9	4,7

* Fibras, vitaminas e sais minerais

3.2.3. Avaliação metabólica do modelo de diabetes tipo 2

❖ **Peso e glicemia**

Foram avaliados os seguintes parâmetros nos animais controles e submetidos à dieta hiperlipídica: peso inicial e final (após dieta) e glicemia em jejum (pré- e pós-dieta). A glicemia foi medida com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostic, Suíça) em amostras de sangue coletadas pela via caudal.

A pesagem dos animais e coleta de sangue para as análises descritas foram feitas no período entre 8 e 10h da manhã.

❖ **Concentração plasmática de insulina**

A função secretora geral de insulina do pâncreas foi avaliada nos camundongos, determinando-se a concentração plasmática de insulina nos animais controle e os alimentados com dieta hiperlipídica. Alíquotas de sangue da veia cervical foram coletadas em capilares heparinizados e, após centrifugação, as amostras de plasma foram estocadas a -20°C até a dosagem da insulina por radioimunoensaio, como descrito no capítulo 2, seção 2.2.7.

3.2.4. Avaliação morfológica do pâncreas endócrino

❖ **Histologia do pâncreas**

A análise do aspecto histológico do pâncreas endócrino dos animais dos diferentes grupos experimentais (n= mínimo 4 animais por grupo experimental) foi feita utilizando-se técnica histológica de rotina. Para tal, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 , seguida de decapitação e retirada dos pâncreas, que foram pesados e fixados em formalina

(formaldeído 3,7% diluído em tampão fosfato-salina) durante 24 h. Após fixação, cada pâncreas foi seccionado em 5 fragmentos (1, correspondendo à cabeça e 5 à região da cauda). Em seguida, cada fragmento foi processado pelas técnicas rotineiras de embebição em parafina (Histosec pastilhas, Merck). Foram obtidas secções semi-seriadas de 5 μm (com espaçamento de 100 μm entre cortes) até esgotamento total do bloco. As lâminas obtidas e selecionadas foram coradas com Hematoxilina-Eosina.

❖ **Imunolocalização das proteínas juncionais no pâncreas endócrino**

A localização celular das proteínas associadas à junção de oclusão (ZO-1) e à junção aderente (E-caderina, α -, β -cateninas) em cortes de ilhotas pancreáticas foi feita por meio de imunofluorescência indireta, como descrita por Collares-Buzato e colaboradores (2004). Resumidamente, os pâncreas retirados dos animais controles e tratados com dieta hiperlipídica foram congelados em n-hexano com nitrogênio líquido. Os cortes histológicos dos materiais, obtidos por criostato a -25°C , foram aderidos em lâminas tratadas previamente com solução de 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma), para a adesão dos cortes às lâminas, fixados durante 8 min com paraformaldeído 8%, em PBS (para avaliar a distribuição de β -catenina) ou durante 3 minutos com acetona a -20°C (para as demais proteínas) e permeabilizados com solução de Triton X-100 (0,1%) durante 5 min (somente quando da fixação com paraformaldeído).

Posteriormente, os cortes histológicos foram incubados com tampão Tris-salina (TBS; Trisma base 0,01 M, NaCl 0,15 M) contendo 5% de leite desnatado em pó durante 1 hora à temperatura ambiente e então, incubados com anticorpo monoclonal específico em 3% de leite desnatado em TBS (diluições na Tabela 3.2) durante 12-16h a 4°C , nas lâminas fixadas com paraformaldeído, ou 2 horas à temperatura ambiente, nas lâminas fixadas com acetona. Em seguida, os cortes foram incubados durante 2 horas com anticorpo secundário específico conjugado com fluoresceína (Tabela 3.2).

Foi feita também uma marcação para insulina. Para tal, após a incubação dos anticorpos primários específicos e seus respectivos secundários, conjugados com fluoresceína, foi feita uma incubação adicional durante 1h e 30min com anticorpo policlonal anti-insulina (Dako, diluição 1:100). Após este período, os cortes foram lavados em TBS e incubados durante 2h à

temperatura ambiente com o anticorpo secundário policlonal específico conjugado com rodamina (Sigma, diluição 1:125 em TBS com 1% de leite desnatado).

Por fim, as lâminas foram montadas com meio de montagem (Vectashield, Vector) e a localização da fluorescência no espécime detectada por um microscópio de varredura confocal a laser (Zeiss LSM 510, UNICAMP) e/ou por microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E-800) acoplado a um sistema de captura de imagens.

Tabela 3.2: Diluições e fabricantes dos anticorpos primários monoclonais utilizados para a detecção das proteínas juncionais por meio da técnica de imunofluorescência indireta.

Anticorpo Primário	Fabricante	Animal Produzido	Diluição primário	Diluição secundário
Ocludina	Zymed	Camundongo	1:50	1:350
ZO-1	Zymed	Coelho	1:200	1:200
E-caderina	Sigma	Rato	1:400	1:150
Alfa-catenina	Sigma	Coelho	1:1000	1:800
Beta-catenina	Zymed	Camundongo	1:200	1:800

3.2.5. Avaliação do grau de marcação por fluorescência

As imagens obtidas de cada reação foram analisadas utilizando o software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) para se determinar o grau de marcação da fluorescência para determinada proteína juncional na ilhota. Para esta análise, a incubação das lâminas dos grupos experimentais foi feita simultaneamente, provenientes da mesma solução. Além disso, a captura das imagens foi realizada na mesma sessão de observação e mantidos os parâmetros utilizados para a captura das imagens em todas as lâminas analisadas. Os valores foram expressos como densidade integrada de pixels em relação à área da ilhota.

3.2.6. Análise Estatística

A significância estatística entre dois grupos experimentais foi determinada usando-se o teste t-Student. Para múltiplas comparações, foi utilizado ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni para comparar determinados pares de grupos. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Caracterização metabólica dos animais e análise morfológica das ilhotas pancreáticas

Como mostrado na figura 14, animais de ambos os grupos aumentaram de peso significativamente até os quatro meses do início da dieta, caracterizando o crescimento do animal; no entanto, o grupo alimentado com a dieta hiperlipídica apresentou um maior ganho no peso corpóreo, ao longo de todo período analisado, em relação ao grupo controle ($P < 0.001$). Ao final do período de dieta (8 meses), os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram um ganho de peso 70% maior ($P < 0.001$) em relação ao grupo controle.

Ao avaliar a glicemia em jejum após a dieta, observou-se que o grupo controle manteve uma glicemia em jejum abaixo de 100 mg/dL, caracterizando um estado normal de concentração de glicose no sangue. Entretanto, o grupo alimentado com dieta hiperlipídica apresentou uma glicemia de 130 mg/dL, em média, caracterizando uma moderada hiperglicemia destes animais. O gráfico comparativo da glicemia dos grupos controle e submetido à dieta é mostrado na figura 15.

A figura 16 mostra os resultados da concentração plasmática de insulina, determinada por radioimunoensaio, em camundongos controle e submetidos à dieta hiperlipídica. No grupo dos animais alimentados com dieta hiperlipídica houve aumento de 212,79% na concentração de insulina plasmática em comparação com o grupo mantido em dieta normal ($P = 0,0042$).

A figura 17 apresenta o aspecto morfológico das ilhotas de camundongos dos grupos controle e submetido à dieta hiperlipídica. Em ambos os grupos de animais, as ilhotas pancreáticas apresentam-se como estruturas ovaladas ou arredondadas. As células endócrinas, que constituem essa ilhota, estão dispostas em cordões anastomosantes entremeados por uma rica rede de capilares sanguíneos. Não se observou diferenças significativas na morfologia das ilhotas do grupo controle em relação ao grupo tratado. Entretanto, notou-se que as ilhotas pancreáticas dos animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentam, em geral, um tamanho maior quando comparadas às ilhotas do grupo controle.

Sabe-se que a patogênese da diabetes melito tipo 2 envolve, inicialmente, um quadro de resistência periférica à insulina, seguida de uma disfunção da secreção de hormônios (particularmente da insulina), e a proliferação de células beta das ilhotas pancreáticas a partir

de células progenitoras oriundas dos ductos e de ilhotas pré-existentes, resultando em hiperglicemia moderada e hiperinsulinemia no período inicial da doença (Bonner-Weir, 2001; Sone e Kagawa, 2005; Okada *et al.*, 2007). Posteriormente, tem-se a exaustão funcional das células beta, levando à morte celular e redução total da secreção de insulina nos estágios mais avançados da doença (Butler *et al.*, 2003; Weir *et al.*, 2001).

Existem vários modelos animais de diabetes tipo 2 envolvendo a administração de drogas, dietas especiais ou mesmo animais transgênicos (revisado por Larsen, 2009). O modelo do presente trabalho, empregando camundongos C57 alimentados com dieta hiperlipídica, tem sido utilizado amplamente para estudar a patogênese da aterosclerose associada à resistência periférica à insulina, à diabetes melito não dependente de insulina (tipo 2) e à obesidade (Schreyer *et al.*, 2002; Winzell e Ahren, 2004; De Souza, 2005; Drolet *et al.*, 2006). Entretanto, a repercussão na função pancreática endócrina da ingestão de ração com alto teor de lipídios tem sido menos investigada e os resultados relatados são inconsistentes (Ahren *et al.*, 1997).

Sone e Kagawa (2004) demonstraram que camundongos machos alimentados com ração hiperlipídica por 4 meses apresentaram hiperinsulinemia e hiperglicemia associados com um aumento da massa relativa de célula beta e da ilhota. Após estabelecimento da diabetes (caracterizada por hiperglicemia não associada com uma hiperinsulinemia) com 12 meses de dieta, os animais apresentaram uma diminuição significativa da massa de célula beta. Ahren *et al.* (1997), por sua vez, observaram nenhuma alteração significativa da morfologia geral e da área da ilhota de camundongos fêmeas submetidos à ração hiperlipídica por 3 meses. Tais discrepâncias podem ser resultantes de diferenças no sexo do animal, composição e tempo de alimentação com a ração.

Neste trabalho, observamos que camundongos C57, machos, alimentados com dieta com alto teor de lipídios (21% em peso) por 8 meses desde a fase juvenil, apresentam alterações metabólicas típicas da primeira fase da diabetes tipo 2 (conhecida como estado de pré-diabetes), como hiperglicemia moderada e hiperinsulinemia. Portanto, este modelo parece-nos apropriado para se investigar os mecanismos envolvidos nos eventos iniciais que resultam na diabetes tipo 2, incluindo o papel das junções intercelulares e de suas proteínas integrantes.

3.3.2. Distribuição celular de proteínas associadas às junções intercelulares nas ilhotas pancreáticas dos animais pré-diabéticos.

Numa segunda etapa desta dissertação, avaliamos neste modelo animal de pré-diabetes a distribuição e conteúdo celular das seguintes proteínas juncionais: ZO-1, associada à junção de oclusão, alfa- e beta- cateninas e E-caderina associadas à junção aderente nas ilhotas pancreáticas.

A dupla imunofluorescência para ZO-1 e insulina mostrou um padrão de marcação em linhas pontilhadas ao redor das células endócrinas, incluindo as células beta, bem como uma marcação em linha que corresponde, provavelmente, à parede de capilares no interior das ilhotas (Figura 18). Não observamos diferenças pronunciadas na distribuição celular da ZO-1 nas ilhotas dos grupos estudados ou no grau de fluorescência desta proteína (Figuras 18 e 19).

A ZO-1 é uma das proteínas associadas à junção de oclusão e tem a função bem estabelecida em epitélios de revestimento, onde participa da organização estrutural e funcional desta junção (Hartsock e Nelson, 2008; Fanning e Anderson 2009). A expressão desta proteína por células endócrinas das ilhotas pancreáticas foi primeiramente descrita por Collares-Buzato e colaboradores (2004). Nesta dissertação sugerimos, com base nos dados de imunocitoquímica e Western Blot, que a ZO-1 participa do processo de maturação do pâncreas endócrino durante o desenvolvimento do animal. Entretanto, o papel desempenhado por esta proteína na fisiologia da célula beta pancreática e sua possível participação na patogênese do diabetes tipo 2 requer futuras investigações.

Numa etapa posterior, fomos investigar a expressão de proteínas associadas à junção aderente e ao citoesqueleto nas ilhotas dos animais pré-diabéticos. Quando avaliamos, por imuno-histoquímica, a distribuição celular da molécula de adesão, E-caderina, notamos um aumento significativo no conteúdo intercelular desta proteína no grupo tratado com a dieta hiperlipídica em relação ao grupo controle, como mostrado na figura 24. Essa observação foi confirmada pela quantificação do grau de fluorescência nas imagens de ilhotas, imunomarcadas para E-caderina, de ambos os grupos experimentais (Figura 25).

Sabe-se que a função adesiva da E-caderina depende da sua associação com microfilamentos de actina mediada por um complexo protéico formado pelas cateninas (alfa-

beta- e gama-catenina, e p120) (Aberle *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 1997; Miravet *et al.*, 2003; Perez-Moreno *et al.*, 2003; Yin e Green, 2004). A imunoreação para as proteínas alfa-catenina (figura 20) e beta-catenina (Figura 21) revelou uma marcação intercelular forte e bem definida nas células endócrinas pancreáticas, com leve marcação citoplasmática em ambos os grupos experimentais. Entretanto, nenhuma diferença com relação à distribuição e ao grau de fluorescência para essas proteínas associadas à junção aderente foi observada nas ilhotas entre o grupo controle e o pré-diabético (Figuras 21 e 23).

Contudo, ao observarmos a distribuição de F-actina, proteína associada ao citoesqueleto, notamos uma marcação intercelular mais definida nas células da ilhota pancreática de camundongos pré-diabéticos em comparação com os animais controles (Figura 27), semelhantemente ao observado com a E-caderina.

Há evidências mostrando que a E-caderina não somente desempenha um papel no desenvolvimento/organização estrutural do pâncreas endócrino, mas também na fisiologia da célula beta regulando a secreção de insulina estimulada pela glicose (Halban *et al.*, 1982; Hopcroft *et al.*, 1985; Pipeleers *et al.*, 1985; Hauge Evans *et al.*, 1999). A inibição da expressão de E-caderina em células beta em condições *in vivo* e *in vitro* resulta em diminuição da secreção estimulada de insulina (Rogers *et al.* 2007, Yamagata *et al.* 2002). Ainda, tem sido demonstrado que a expressão gênica de E-caderina está reduzida nas ilhotas de camundongos heterozigotos com mutação nos genes que codificam Pdx-1 e Hnf (fator nuclear do hepatócito)-3 beta e Hnf-1 alfa, os quais apresentam um comprometimento da citoarquitetura da ilhota pancreática e da secreção estimulada de insulina (Shih *et al.* 2002).

O efeito da E-caderina sobre a secreção de insulina estimulada pela glicose foi mais diretamente investigado por Rogers e colaboradores (2007) que, adicionando anticorpos anti-E-caderina à cultura de linhagem de células beta MIN6, demonstraram que a entrada e saída de Ca^{2+} é prejudicada, com conseqüente prejuízo à secreção de insulina. Neste mesmo trabalho, demonstraram, ainda, que a imuno-neutralização desta caderina impede a transferência do corante *Lucifer yellow* entre as células da ilhota, semelhantemente ao observado no bloqueio das junções comunicantes com heptanol, comprovando a associação das caderinas com as junções comunicantes.

Jaques e colaboradores (2008) mostraram que a inibição da expressão de E-caderina, por meio do uso de RNA de interferência, não alterou a taxa de secreção de insulina de células MIN6 dispersas, mas levou a uma diminuição significativa na secreção estimulada por glicose em células confluentes. No entanto, não puderam afirmar se a E-caderina age de forma direta, promovendo a secreção estimulada de insulina, ou se a perda desta proteína leva à disfunção de outras proteínas envolvidas no processo de secreção.

Potencialmente, a E-caderina pode afetar a secreção de insulina influenciando a adesão intercelular e citoarquitetura na ilhota (Shimoyama *et al.*, 1992; Dahl *et al.*, 1996; Yamagata *et al.*, 2002), o grau de proliferação da célula beta (Carvell *et al.*, 2007), a dinâmica de entrada de cálcio no citoplasma da célula beta (Rouiller *et al.*, 1991; Rogers *et al.*, 2007; Jaques *et al.*, 2008), a função das junções comunicantes (Calabrese *et al.*, 2004; Rogers *et al.* 2007) e os eventos de sinalização intracelular envolvidos no processo de secreção (Hauge Evans *et al.*, 1999; Jaques *et al.*, 2008). No momento, nós não sabemos de que forma a E-caderina participaria da patogênese da diabetes tipo 2 no nosso modelo animal. Levando-se em consideração que a associação com o citoesqueleto é crucial para que a E-caderina desempenhe as suas funções (Yap *et al.*, 1997) e que o citoesqueleto participa diretamente do processo secretório de insulina (Hauge-Evans *et al.* 1999; Jaques *et al.*, 2008), é plausível sugerir que ambos, a E-caderina e os microfilamentos, de algum modo, desempenhem um papel no processo da diabetes tipo 2. Os nossos dados de imuno-histoquímica e marcação com faloidina corroboram essa hipótese.

É sabido que na fase inicial dessa doença, caracterizada por um quadro de resistência periférica à insulina, as ilhotas pancreáticas usualmente respondem aumentando a secreção de insulina para manter uma normoglicemia, um fenômeno conhecido como processo compensatório da célula beta (Nolan *et al.*, 2006a, 2006b; Prentki & Nolan, 2006). Os mecanismos envolvidos não são totalmente conhecidos, mas estudos em roedores apontam que tanto a expansão da massa de células beta (Montanya *et al.* 2000; Rhodes, 2005; Ackermann & Gannon 2007) como o aumento da função secretora deste tipo celular (Unger, 1995) são eventos importantes. Teoricamente, a E-caderina poderia intervir em ambos os

processos, como descrito anteriormente. Estudos futuros, entretanto, são necessários para investigar o papel da E-caderina e do citoesqueleto na patogênese da diabetes tipo 2.

3.5. Figuras do Capítulo

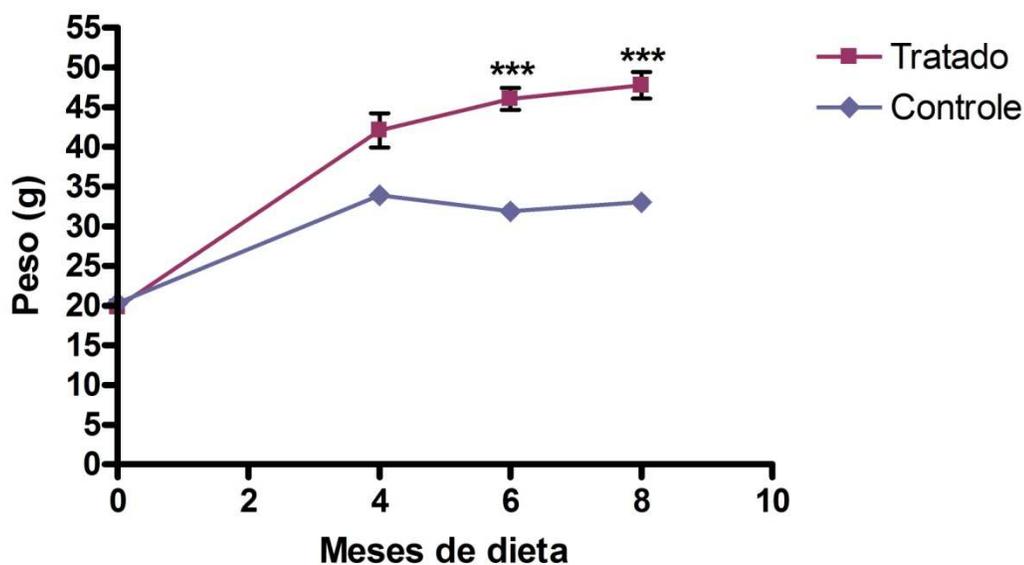


Figura 14. Peso corpóreo dos camundongos controle (alimentados com ração padrão) e tratado (alimentados com dieta hiperlipídica, dHL)

Os animais de ambos os grupos ganharam peso ao longo dos 8 meses de dieta. Ao longo de todo período analisado, o peso do grupo alimentado com a dHL é significativamente maior que o do grupo controle. ANOVA seguido de Bonferroni entre grupo controle e tratado ponto a ponto na escala do tempo, representando *** $P < 0.001$, com $n = 14$ no grupo tratado e $n = 16$ no grupo controle.

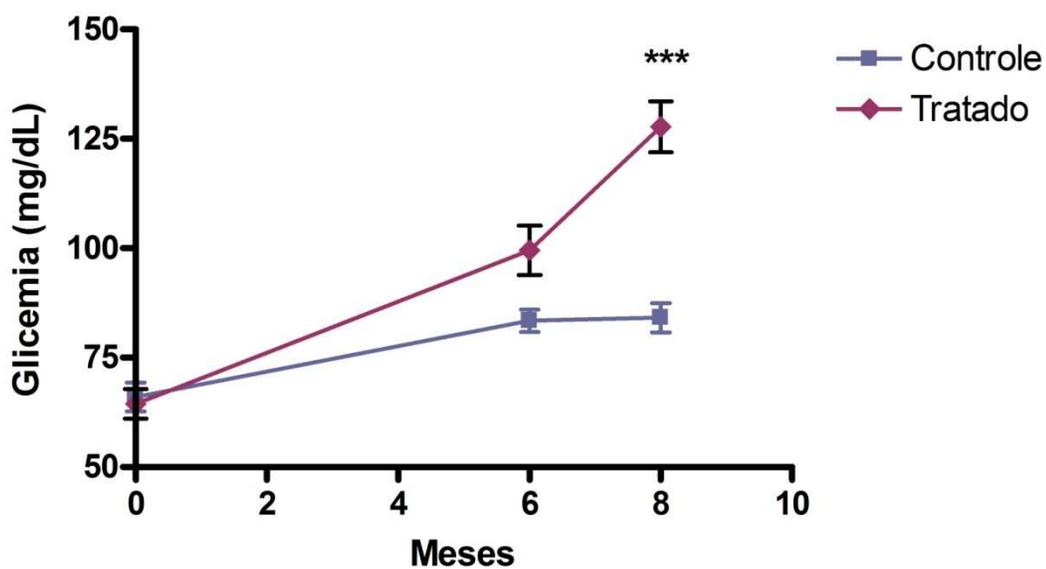


Figura 15. Glicemia de jejum em camundongos controle (alimentados com ração padrão) e submetidos à dieta hiperlipídica (dHL).

Ambos os grupos apresentam a glicemia de jejum em níveis normais no começo do experimento. Após o período de dieta, o grupo controle continua normoglicêmico, enquanto o grupo alimentado com a dieta hiperlipídica apresenta hiperglicemia. ANOVA seguido de Bonferroni entre grupo controle e tratado ponto a ponto na escala do tempo, representando *** $P < 0.001$, com $n = 14$ no grupo tratado e $n = 16$ no grupo controle.

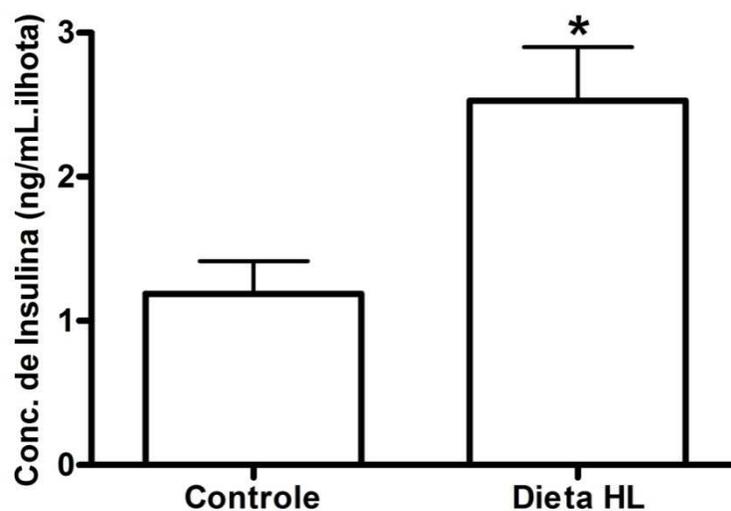


Figura 16. Concentração plasmática de insulina de camundongos controle (alimentados com ração padrão) e submetidos à dieta hiperlipídica.

A concentração plasmática de insulina foi determinada por radioimunoensaio. Após o período de ingestão de dieta hiperlipídica, nota-se que a concentração plasmática de insulina é significativamente maior nos animais submetidos à dieta hiperlipídica em comparação aos animais controle. Teste t com * $p = 0,0483$, com $n = 14$ no grupo tratado e $n = 15$ no grupo controle.

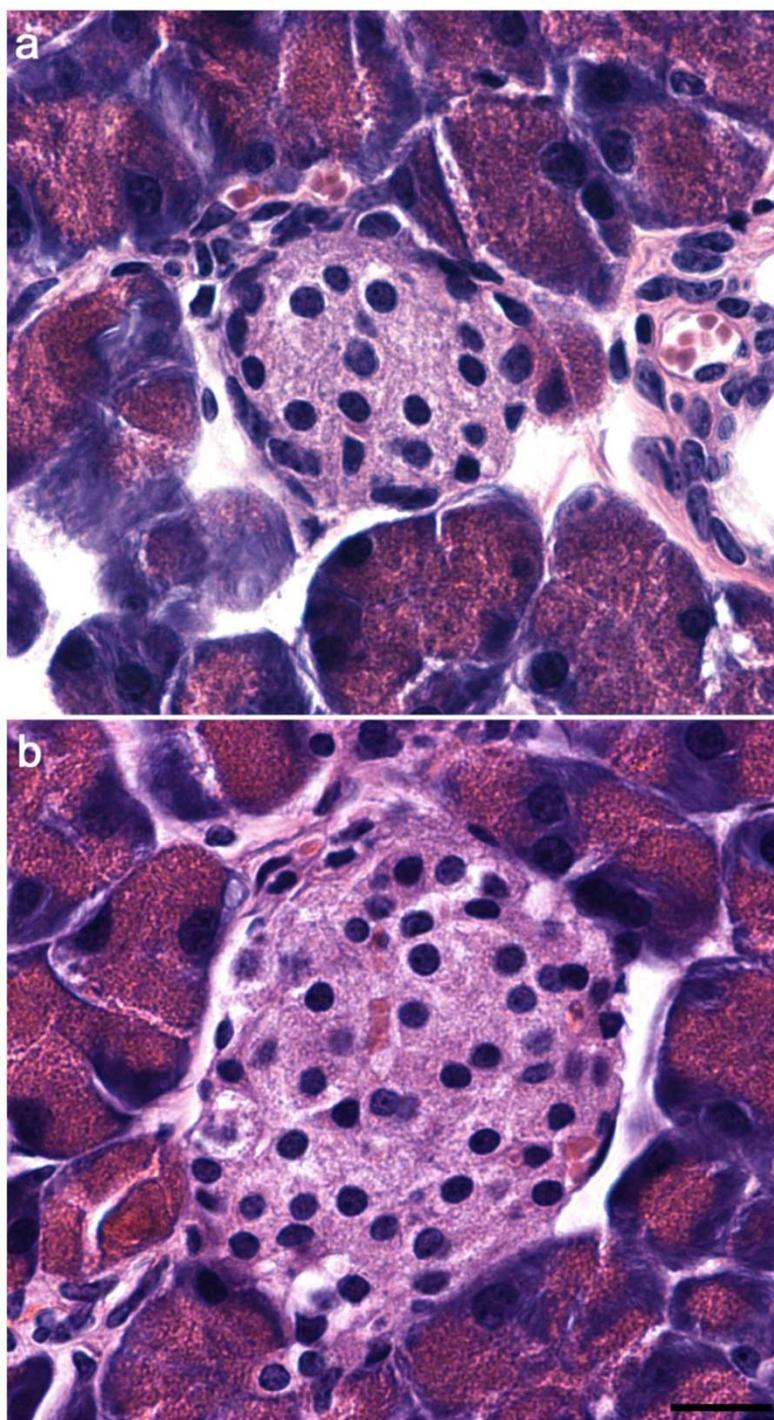


Figura 17. Aspecto morfológico de ilhotas pancreáticas de camundongos controle (alimentados com ração padrão) e submetidos à dieta hiperlipídica.

Em A, tem-se uma ilhota de um animal do grupo controle (alimentado com dieta regular) e em B uma ilhota do grupo alimentado com dieta hiperlipídica por 8 meses. Não se observa diferença morfológica do pâncreas endócrino de animais que ingeriram a dieta hiperlipídica, entretanto, nota-se uma hiperplasia das ilhotas desses animais. Barra: 15 μ m.

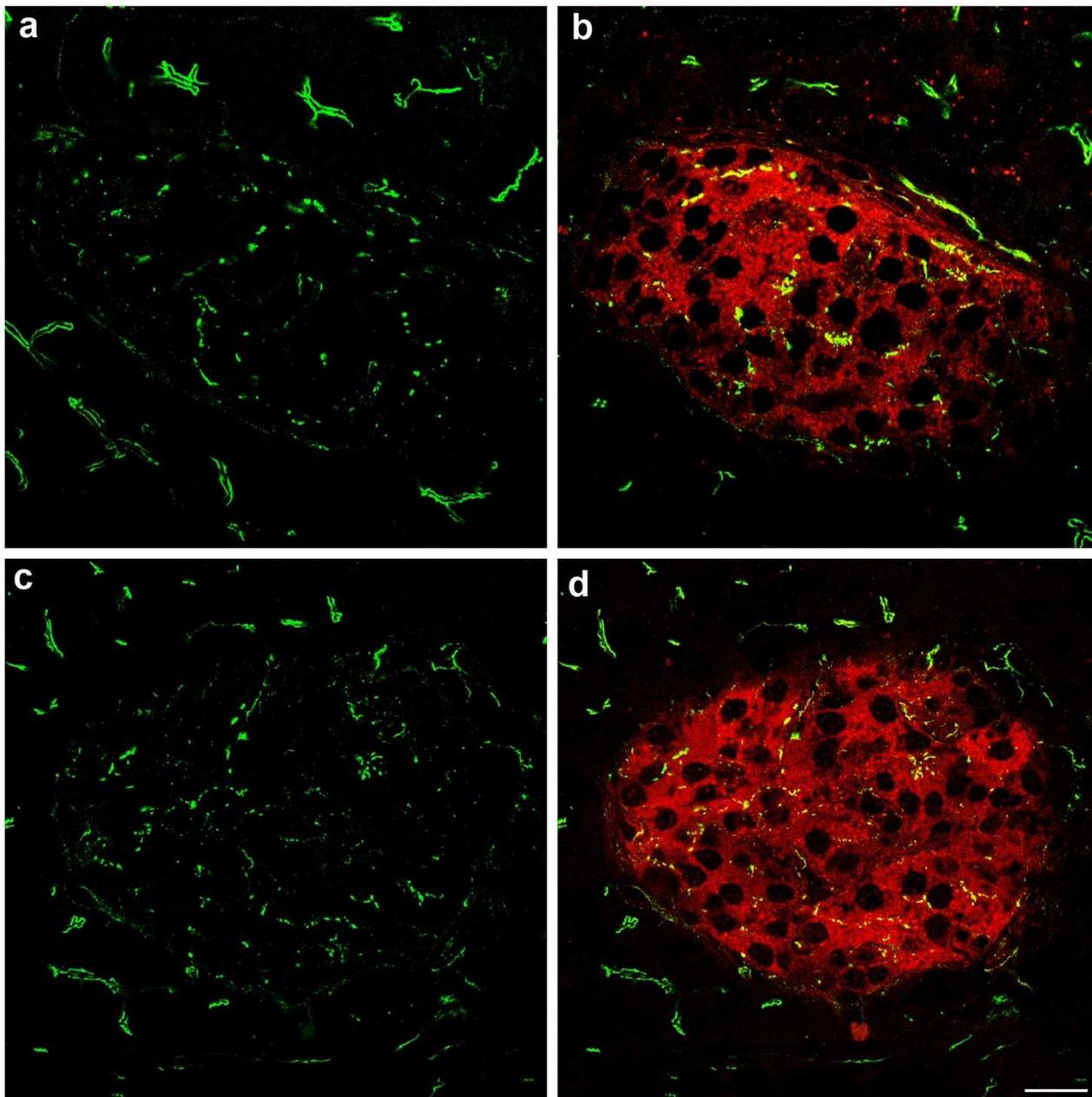


Figura 18. Imunofluorescência para ZO-1 e insulina em ilhotas de camundongos controles e pré-diabéticos

As imagens a-b correspondem a cortes de ilhotas de camundongo controle e c-d a de camundongo pré-diabéticos. Em a e c, temos a reação de imunofluorescência para a detecção de ZO-1, enquanto em b e d a co-localização de ZO-1 e insulina. Nota-se uma marcação em forma de linhas pontilhadas no interior da ilhota, assim como uma marcação de capilares no pâncreas exócrino. N=6 experimentos independentes, com n=9 animais no controle e com n=10 animais no tratado. Barra: 20 μ m.

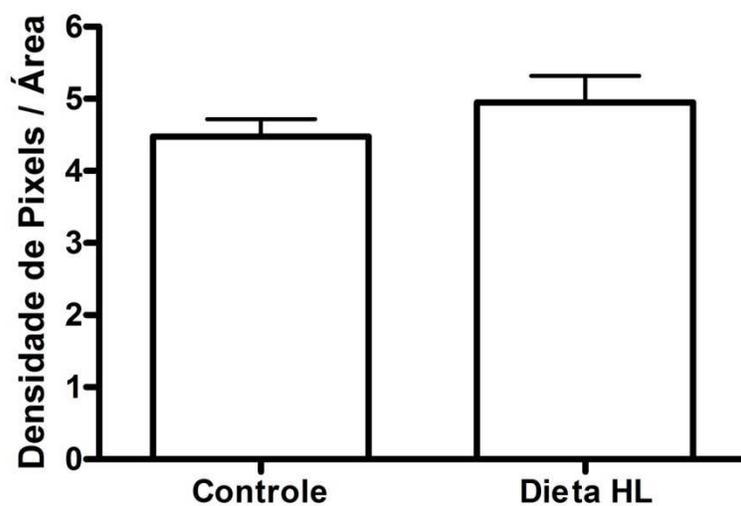


Figura 19. Quantificação da fluorescência de ZO-1 no modelo de pré-diabetes.

A densidade de pixels no interior das ilhotas foi feita levando em relação a área da ilhota. Os valores da densidade de pixels para cada grupo experimental foram plotados em gráfico para melhor comparação entre os grupos. Não observamos diferenças no grau de marcação para ZO-1 entre os grupos estudados. O gráfico apresentado é representativo de n=7 animais no controle e n=8 animais no tratado.

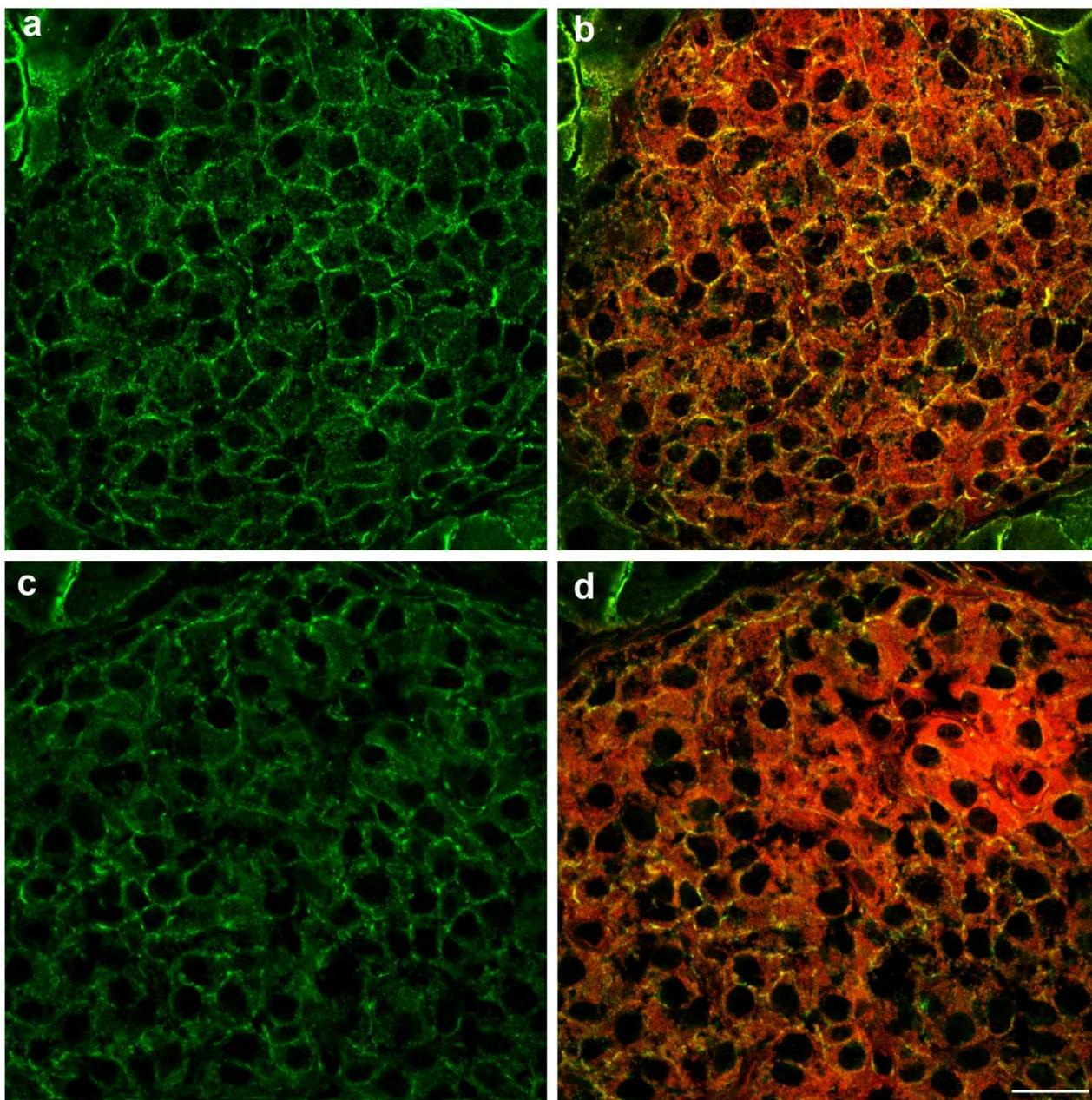


Figura 20. Imunofluorescência para α -catenina em ilhotas de camundongos controles e pré-diabéticos.

As imagens a-b correspondem a cortes de ilhotas de camundongo controle e c-d a de camundongo pré-diabéticos após a dieta hiperlipídica por 8 meses. Em a e c, temos a reação de imunofluorescência para a detecção de α -catenina, enquanto em b e d a co-localização de α -catenina e insulina. Nota-se uma marcação nítida na região de contato celular das células beta de ambos os grupos. N=5 experimentos, com n=5 animais no controle e n=5 animais no tratado. Barra: 20 μ m.

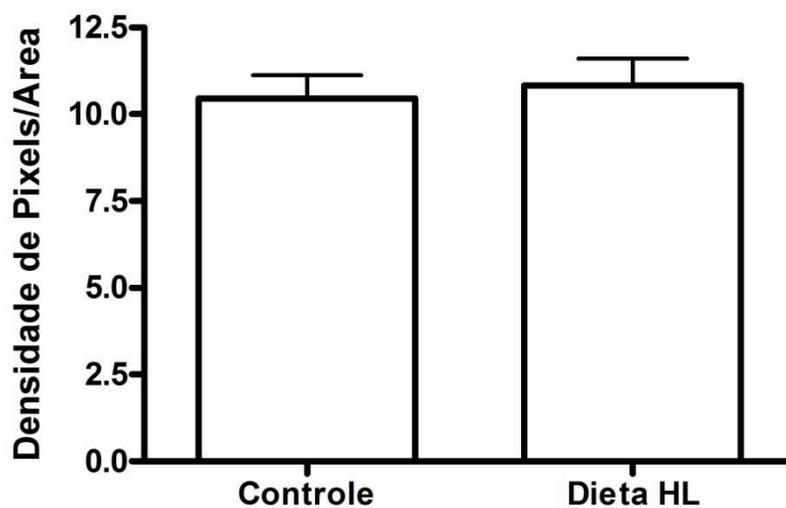


Figura 21. Quantificação da fluorescência de α -catenina no modelo de pré-diabetes.

A densidade de pixels no interior das ilhotas foi feita levando em relação a área da ilhota. Os valores da densidade de pixels para cada grupo experimental foram plotados em gráfico para melhor comparação entre os grupos. Não observamos diferenças no grau de marcação para α -catenina entre os grupos estudados. O gráfico apresentado é representativo de n=5 animais no controle e n=5 animais no tratado.

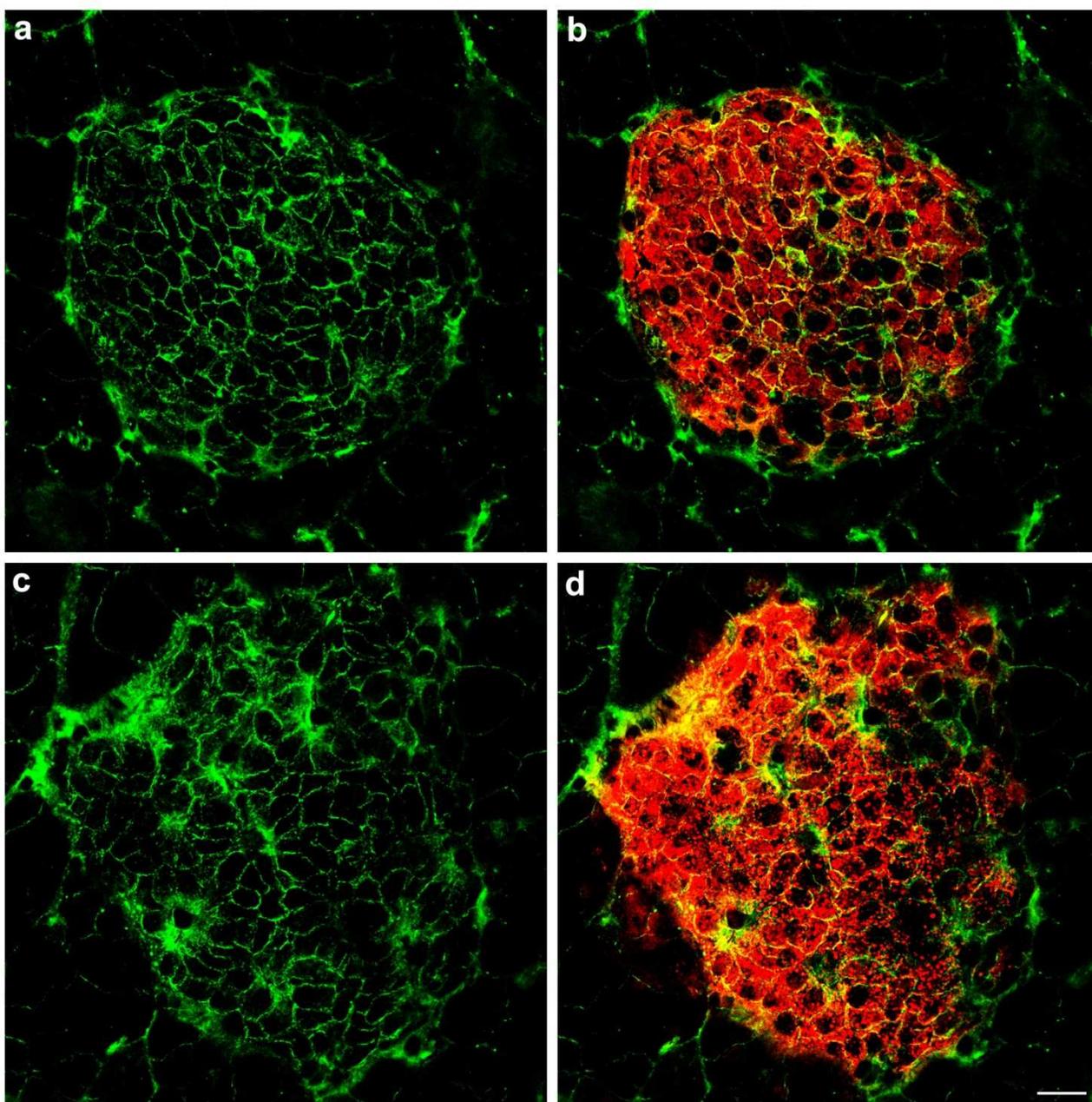


Figura 22. Imunofluorescência para β -catenina em ilhotas em ilhotas de camundongos controles e pré-diabéticos.

As imagens a-b correspondem a cortes de ilhotas de camundongo controle e c-d de camundongo pré-diabéticos após a dieta hiperlipídica por 8 meses. Em a e c, temos a reação de imunofluorescência para a detecção de β -catenina, enquanto em b e d a co-localização de β -catenina e insulina. Nota-se uma marcação precisa na região de contato celular em ambos os grupos. N=6 experimentos, com n=6 animais no grupo controle e n=6 no grupo tratado.

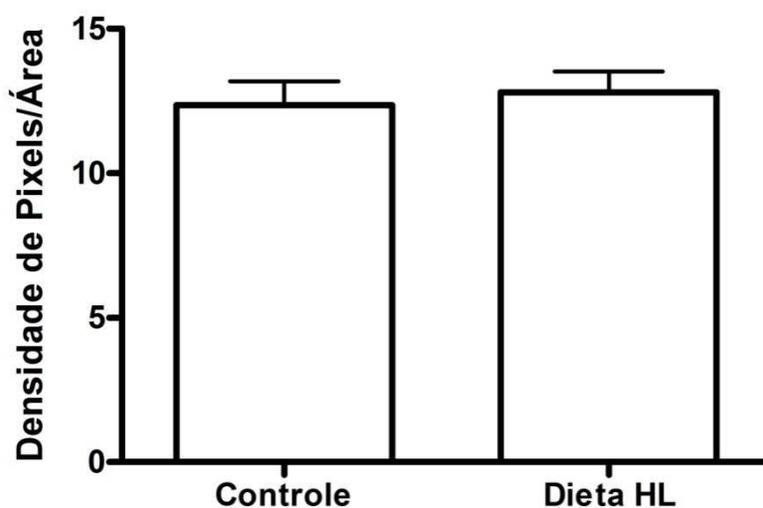


Figura 23. Quantificação da fluorescência de β -catenina no modelo de pré-diabetes.

A densidade de pixels no interior das ilhotas foi feita levando em relação a área da ilhota. Os valores da densidade de pixels para cada grupo experimental foram plotados em gráfico para melhor comparação entre os grupos. Não observamos diferenças no grau de marcação para β -catenina entre os grupos estudados. n=5 animais no controle e n=5 animais no tratado.

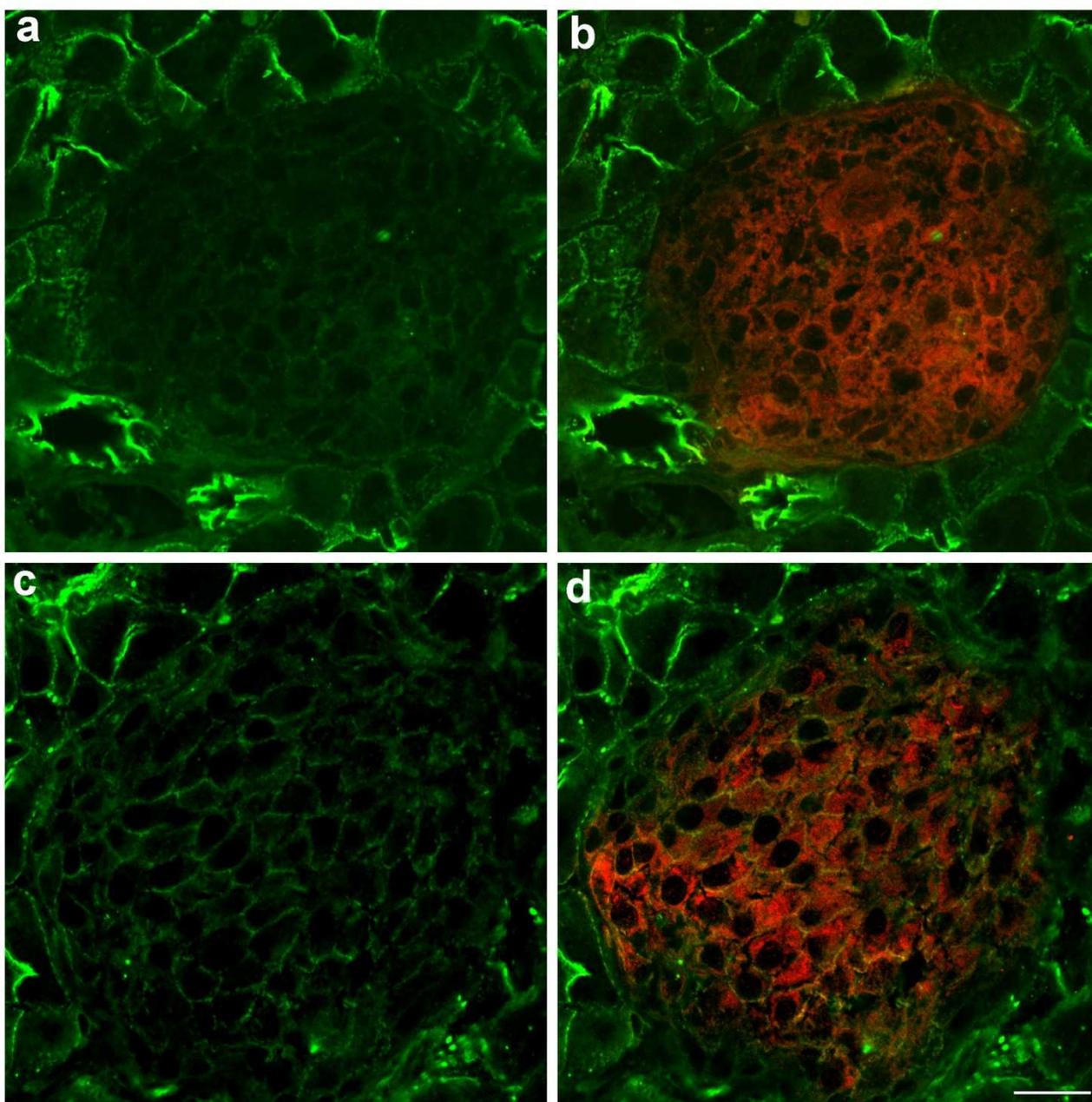


Figura 24. Imunofluorescência para E-caderina em ilhotas de camundongos controles e pré-diabéticos

As imagens a-b correspondem a cortes de ilhotas de camundongo controle e c-d a de camundongo pré-diabéticos após a dieta hiperlipídica por 8 meses. Em a e c, temos a reação de imunofluorescência para a detecção de E-caderina, enquanto em b e d a co-localização de E-caderina e insulina. Nota-se uma marcação precisa na região de contato celular em ambos os grupos. Esta imunoreação revela uma marcação intercelular mais definida nas células endócrinas do grupo tratado que no grupo controle. n=3 experimentos, com n=3 no grupo controle e n=3 no grupo tratado.

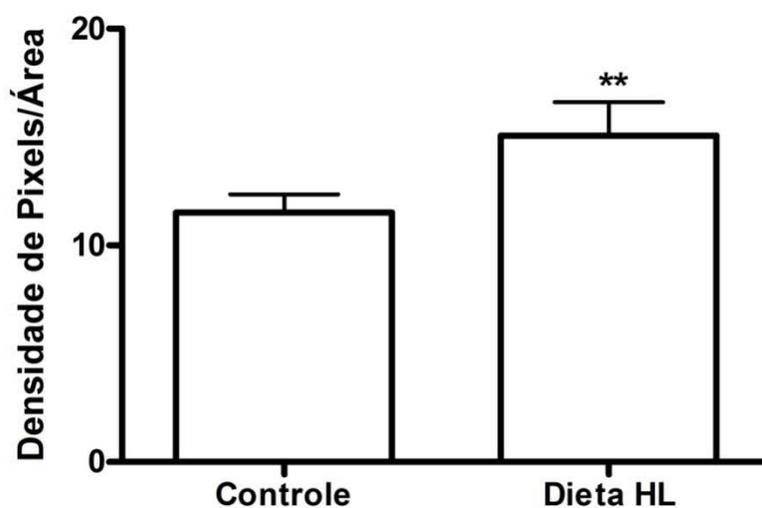


Figura 25. Quantificação da fluorescência de E-Caderina no modelo de pré-diabetes.

A densidade de pixels no interior das ilhotas foi feita levando em relação a área da ilhota. Os valores da densidade de pixels para cada grupo experimental foram plotados em gráfico para melhor comparação entre os grupos. Corroborando o resultado obtido pela imunofluorescência, observamos um aumento da expressão de E-caderina nas ilhotas do grupo alimentado com a dita hiperlipídica, indicando um possível envolvimento desta proteína de adesão celular na manutenção da organização tecidual e. O gráfico apresentado é representativo de n=5 no controle e n=6 no tratado. ** p= 0,0058.

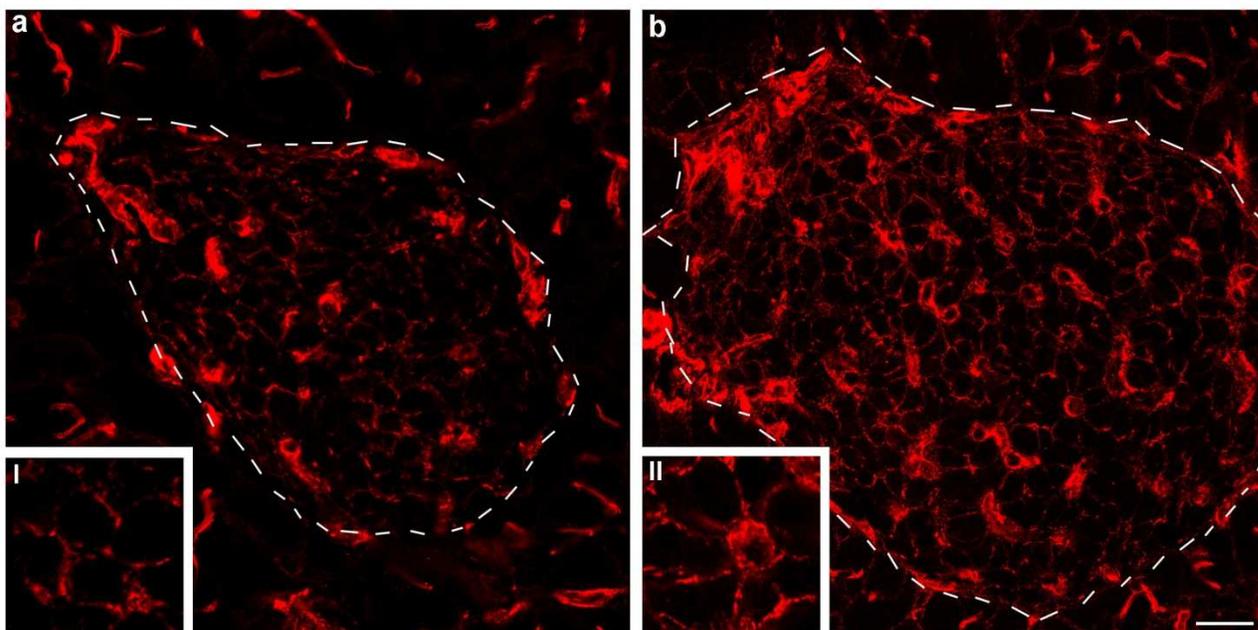


Figura 26. Distribuição de F-actina em ilhotas de camundongos controles e pré-diabéticos.

A imagem a corresponde a corte de ilhota de camundongo controle e b a de camundongo pré-diabéticos, após a dieta hiperlipídica por 8 meses, mostrando a distribuição de F-actina, como revelada por faloidina conjugada com rodamina. Microfilamentos de F-actina se concentram na região de contato intercelular. Essa marcação intercelular parece mais definida das células endócrinas pancreáticas do grupo pré-diabético em relação ao controle. As ilhotas foram circundadas para melhor visualização. Em a (I), detalhe da marcação intercelular no grupo controle e em b (II) no grupo pré-diabético.

Capítulo 4 – Conclusões

Conclusões do capítulo 2 - Papel do contato intercelular mediado pelas junções de oclusão e aderente no processo de maturação da célula beta durante o desenvolvimento

- ❖ Em comparação às ilhotas de ratos jovens e adultos, as de fetos e recém-nascidos mostraram uma secreção estimulada de insulina significativamente menor. As características morfológicas gerais do pâncreas endócrino encontradas nos fetos e recém-nascidos refletem a imaturidade funcional deste órgão nas fases iniciais do desenvolvimento.
- ❖ As interações intercelulares parecem ser importantes na resposta secretória de insulina frente ao estímulo de glicose. Na ausência de contato intercelular, quando as células das ilhotas de adultos foram dispersas, essa resposta secretora de insulina foi completamente inibida, porém parcialmente restabelecida quando as células foram reagregadas. O impacto da ausência de contatos intercelulares sobre a resposta secretora de insulina a glicose foi consideravelmente menor no caso das ilhotas ratos recém-nascidos.
- ❖ A expressão diferencial de N-CAM e de caderinas observada entre as células beta e não beta das ilhotas indicam um envolvimento destas proteínas juncionais na organização e manutenção da arquitetura das ilhotas pancreáticas durante o desenvolvimento animal.
- ❖ O menor conteúdo de ZO-1, alfa e beta-cateninas na região de contato celular das células beta observada nas ilhotas em pâncreas de feto e recém-nascido pode indicar uma menor interação/adesão celular, que por sua vez pode estar relacionada com a resposta secretora deficitária de insulina das ilhotas pancreáticas verificada na fase perinatal.

Conclusões do capítulo 3 - Expressão e distribuição celular de proteínas juncionais em ilhotas pancreáticas de camundongos pré-diabéticos

- ❖ Camundongos C57 alimentados com dieta hiperlipídica por um período prolongado (8 meses) apresentaram alterações metabólicas características da fase de pré-diabetes, como hiperglicemia e hiperinsulinemia;
- ❖ Não observamos diferenças morfológicas significativas nas ilhotas pancreáticas entre os grupos estudados;
- ❖ Com relação à localização das proteínas juncionais, observou-se, no caso da imunohistoquímica para ZO-1, uma marcação pontilhada na região de contato entre as células endócrinas. A imunoreação para E-caderina e cateninas e a reação com faloidina para F-actina revelaram uma marcação contínua na região de contato intercelular. Não foram observadas diferenças marcantes entre os grupos quanto à imunolocalização da ZO-1 e cateninas. Entretanto, a expressão juncional de E-caderina e F-actina foi maior nas células endócrinas das ilhotas do grupo tratado em relação ao controle;
- ❖ Os nossos dados sugerem que os contatos intercelulares mediados pelas junções aderente e de oclusão (e suas proteínas) devem desempenhar um papel importante no processo de maturação do pâncreas do endócrino durante o desenvolvimento e na patogênese da diabetes do tipo 2.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

Aberle, H., H. Schwartz, *et al.* Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. J Cell Biochem, v.61, n.4, Jun 15, p.514-23. 1996.

Ackermann, A. M. e M. Gannon. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. J Mol Endocrinol, v.38, n.1-2, Feb, p.193-206. 2007.

Ahren, B., E. Simonsson, *et al.* Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice. Metabolism, v.46, n.1, Jan, p.97-106. 1997.

Anderson, J. M. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. News Physiol Sci, v.16, Jun, p.126-30. 2001.

Baetens, D., F. Malaisse-Lagae, *et al.* Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of langerhans. Science, v.206, n.4424, Dec 14, p.1323-5. 1979.

Barker, R. J., R. L. Price, *et al.* Increased association of ZO-1 with connexin43 during remodeling of cardiac gap junctions. Circ Res, v.90, n.3, Feb 22, p.317-24. 2002.

Bavamian, S., P. Klee, *et al.* Islet-cell-to-cell communication as basis for normal insulin secretion. Diabetes Obes Metab, v.9 Suppl 2, Nov, p.118-32. 2007.

Bazzoni, G., O. M. Martinez-Estrada, *et al.* Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. J Biol Chem, v.275, n.27, Jul 7, p.20520-6. 2000.

Beattie, G. M., J. S. Rubin, *et al.* Regulation of proliferation and differentiation of human fetal pancreatic islet cells by extracellular matrix, hepatocyte growth factor, and cell-cell contact. Diabetes, v.45, n.9, Sep, p.1223-8. 1996.

Benmerah, A., M. Scott, *et al.* Nuclear functions for plasma membrane-associated proteins? Traffic, v.4, n.8, Aug, p.503-11. 2003.

Bennett, B. D., T. L. Jetton, *et al.* Quantitative subcellular imaging of glucose metabolism within intact pancreatic islets. J Biol Chem, v.271, n.7, Feb 16, p.3647-51. 1996.

Bernard-Kargar, C. e A. Ktorza. Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. Diabetes, v.50 Suppl 1, Feb, p.S30-5. 2001.

Bjorntorp, P. Abdominal obesity and the development of noninsulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Metab Rev, v.4, n.6, Sep, p.615-22. 1988.

Bonner-Weir, S. beta-cell turnover: its assessment and implications. Diabetes, v.50 Suppl 1, Feb, p.S20-4. 2001.

Bonner-Weir, S., L. A. Baxter, *et al.* A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. Diabetes, v.42, n.12, Dec, p.1715-20. 1993.

Boschero, A. C., S. C. Crepaldi, *et al.* Prolactin induces maturation of glucose sensing mechanisms in cultured neonatal rat islets. Endocrinology, v.133, n.2, Aug, p.515-20. 1993.

Boschero, A. C., D. Tombaccini, *et al.* Effects of glucose on insulin release and 86Rb permeability in cultured neonatal and adult rat islets. FEBS Lett, v.236, n.2, Aug 29, p.375-9. 1988.

Bosco, D., L. Orci, *et al.* Homologous but not heterologous contact increases the insulin secretion of individual pancreatic B-cells. Exp Cell Res, v.184, n.1, Sep, p.72-80. 1989.

Brelje, T. C., D. W. Scharp, *et al.* Three-dimensional imaging of intact isolated islets of Langerhans with confocal microscopy. Diabetes, v.38, n.6, Jun, p.808-14. 1989.

Brissova, M., M. J. Fowler, *et al.* Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. J Histochem Cytochem, v.53, n.9, Sep, p.1087-97. 2005.

Brissova, M., M. Shiota, *et al.* Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. J Biol Chem, v.277, n.13, Mar 29, p.11225-32. 2002.

Brockenbrough, J. S., G. C. Weir, *et al.* Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats. Diabetes, v.37, n.2, Feb, p.232-6. 1988.

Butler, A. E., J. Janson, *et al.* Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes, v.52, n.1, Jan, p.102-10. 2003.

Cabrera, O., D. M. Berman, *et al.* The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.7, Feb 14, p.2334-9. 2006.

Calabrese, A., D. Caton, *et al.* Differentiating the effects of Cx36 and E-cadherin for proper insulin secretion of MIN6 cells. Exp Cell Res, v.294, n.2, Apr 1, p.379-91. 2004.

Calabrese, A., M. Zhang, *et al.* Connexin 36 controls synchronization of Ca²⁺ oscillations and insulin secretion in MIN6 cells. Diabetes, v.52, n.2, Feb, p.417-24. 2003.

Carvalho, C. P. F.. Papel da comunicação intercelular mediada pelas junções comunicantes no mecanismo de secreção de insulina em modelos *in vivo* de maturação e disfunção do pâncreas endócrino. 2009. 119p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. CAPES.

Carvalho, C. P., J. C. Martins, *et al.* Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islet tissue during in vivo maturation of rat pancreas. Ann Anat, v.188, n.3, May, p.221-34. 2006.

Carvell, M. J., P. J. Marsh, *et al.* E-cadherin interactions regulate beta-cell proliferation in islet-like structures. Cell Physiol Biochem, v.20, n.5, p.617-26. 2007.

Charpantier, E., J. Cancela, *et al.* Beta cells preferentially exchange cationic molecules via connexin 36 gap junction channels. Diabetologia, v.50, n.11, Nov, p.2332-41. 2007.

Cheng, C. Y. e D. D. Mruk. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. Physiol Rev, v.82, n.4, Oct, p.825-74. 2002.

Cirulli, V., D. Baetens, *et al.* Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation. J Cell Sci, v.107 (Pt 6), Jun, p.1429-36. 1994.

Cirulli, V., G. M. Beattie, *et al.* Expression and function of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in the developing pancreas: roles in the adhesion and migration of putative endocrine progenitor cells. J Cell Biol, v.150, n.6, Sep 18, p.1445-60. 2000.

Cirulli, V., P. A. Halban, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha modifies adhesion properties of rat islet B cells. J Clin Invest, v.91, n.5, May, p.1868-76. 1993.

Citi, S., H. Sabanay, *et al.* Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. Nature, v.333, n.6170, May 19, p.272-6. 1988.

Collares-Buzato, C. B., C. P. Carvalho, *et al.* Upregulation of the expression of tight and adherens junction-associated proteins during maturation of neonatal pancreatic islets in vitro. J Mol Histol, v.35, n.8-9, Nov, p.811-22. 2004.

Collares-Buzato, C. B., M. A. Jepson, *et al.* Co-culture of two MDCK strains with distinct junctional protein expression: a model for intercellular junction rearrangement and cell sorting. Cell Tissue Res, v.291, n.2, Feb, p.267-76. 1998.

Collares-Buzato, C. B., M. A. Jepson, *et al.* Junctional uvomorulin/E-cadherin and phosphotyrosine-modified protein content are correlated with paracellular permeability in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelia. Histochemistry, v.101, n.3, Mar, p.185-94. 1994.

Collares-Buzato, C. B., A. R. Leite, *et al.* Modulation of gap and adherens junctional proteins in cultured neonatal pancreatic islets. Pancreas, v.23, n.2, Aug, p.177-85. 2001.

Collares-Buzato, C. B., G. T. Mcewan, *et al.* Paracellular barrier and junctional protein distribution depend on basolateral extracellular Ca²⁺ in cultured epithelia. Biochim Biophys Acta, v.1222, n.2, Jun 30, p.147-58. 1994.

Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, *et al.* The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. J Clin Invest, v.109, n.8, Apr, p.987-91. 2002.

Cowin, P., D. Matthey, *et al.* Identification of desmosomal surface components (desmocollins) and inhibition of desmosome formation by specific Fab'. J Cell Sci, v.70, Aug, p.41-60. 1984.

Cowin, P., T. M. Rowlands, *et al.* Cadherins and catenins in breast cancer. Curr Opin Cell Biol, v.17, n.5, Oct, p.499-508. 2005.

Crepaldi, S. C., E. M. Carneiro, *et al.* Long-term effect of prolactin treatment on glucose-induced insulin secretion in cultured neonatal rat islets. Horm Metab Res, v.29, n.5, May, p.220-4. 1997.

Cunningham, B. A., J. J. Hemperly, *et al.* Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. Science, v.236, n.4803, May 15, p.799-806. 1987.

Dahl, U., A. Sjodin, *et al.* Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells in vivo. Development, v.122, n.9, Sep, p.2895-902. 1996.

De Paula Le Sueur, L., C. B. Collares-Buzato, *et al.* In vitro effect of the Phoneutria nigriventer spider venom on cell viability, paracellular barrier function and transcellular transport in cultured cell lines. Toxicon, v.46, n.2, Aug, p.130-41. 2005.

De Souza, C. T., E. P. Araujo, *et al.* Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. Diabetologia, v.48, n.9, Sep, p.1860-71. 2005.

Decrock, E., M. Vinken, *et al.* Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? Cell Death Differ, v.16, n.4, Apr, p.524-36. 2009.

Dezaki, K., M. Kakei, *et al.* Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. Diabetes, v.56, n.9, Sep, p.2319-27. 2007.

Diamond, J. M. Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. Physiologist, v.20, n.1, Feb, p.10-8. 1977.

Drolet, M. C., E. Roussel, *et al.* A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. J Am Coll Cardiol, v.47, n.4, Feb 21, p.850-5. 2006.

D'souza-Schorey, C. Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. Trends Cell Biol, v.15, n.1, Jan, p.19-26. 2005.

Dubois, M., F. Pattou, *et al.* Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. Diabetologia, v.43, n.9, Sep, p.1165-9. 2000.

Eaton, S. e K. Simons. Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. Cell, v.82, n.1, Jul 14, p.5-8. 1995.

Ebnet, K. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. Histochem Cell Biol, v.130, n.1, Jul, p.1-20. 2008.

Esni, F., I. B. Taljedal, *et al.* Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. J Cell Biol, v.144, n.2, Jan 25, p.325-37. 1999.

Evans, C. W., J. E. Taylor, *et al.* Transepithelial chemotaxis of rat peritoneal exudate cells. Br J Exp Pathol, v.64, n.6, Dec, p.644-54. 1983.

Fanning, A. S., B. J. Jameson, *et al.* The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. J Biol Chem, v.273, n.45, Nov 6, p.29745-53. 1998.

Fanning, A. S. e J. M. Anderson. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. Ann N Y Acad Sci, v.1165, May, p.113-20. 2009.

Farquhar, M. G. e G. E. Palade. Junctional complexes in various epithelia. J Cell Biol, v.17, May, p.375-412. 1963.

Fasano, A. Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. Ann N Y Acad Sci, v.915, p.214-22. 2000.

Findlay, J. A. e N. W. Thomas. Histology and cytology of the islets of Langerhans in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). Acta Anat (Basel), v.108, n.4, p.446-62. 1980.

Furuse, M., T. Hirase, *et al.* Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. J Cell Biol, v.123, n.6 Pt 2, Dec, p.1777-88. 1993.

Furuse, M., M. Itoh, *et al.* Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. J Cell Biol, v.127, n.6 Pt 1, Dec, p.1617-26. 1994.

Furuse, M., K. Fujita, *et al.* Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. J Cell Biol, v.141, n.7, Jun 29, p.1539-50. 1998.

Furuse, M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. Cold Spring Harb Perspect Biol. v. 2, n. 2(1):a002907. Jan, 2010.

Gallant, N. D. e A. J. Garcia. Model of integrin-mediated cell adhesion strengthening. J Biomech, v.40, n.6, p.1301-9. 2007.

Gannon, M., M. K. Ray, *et al.* Persistent expression of HNF6 in islet endocrine cells causes disrupted islet architecture and loss of beta cell function. Development, v.127, n.13, Jul, p.2883-95. 2000.

Geiger, B. e O. Ayalon. Cadherins. Annu Rev Cell Biol, v.8, p.307-32. 1992.

Gepts, W. e P. M. Lecompte. The pancreatic islets in diabetes. Am J Med, v.70, n.1, Jan, p.105-15. 1981.

Getsios, S., A. C. Huen, *et al.* Working out the strength and flexibility of desmosomes. Nat Rev Mol Cell Biol, v.5, n.4, Apr, p.271-81. 2004.

Gilon, P. e J. C. Henquin. Distinct effects of glucose on the synchronous oscillations of insulin release and cytoplasmic Ca²⁺ concentration measured simultaneously in single mouse islets. Endocrinology, v.136, n.12, Dec, p.5725-30. 1995.

Girao, H. e P. Pereira. The proteasome regulates the interaction between Cx43 and ZO-1. J Cell Biochem, v.102, n.3, Oct 15, p.719-28. 2007.

Gomez Dumm, C. L., A. M. Galeano, *et al.* Appearance of immunoreactive endocrine cells during the development of the rat pancreas, with special reference to polypeptide-secreting cells. Acta Anat (Basel), v.130, n.2, p.158-62. 1987.

Gomez Dumm, C. L., M. C. Semino, *et al.* Sequential morphological changes in pancreatic islets of spontaneously diabetic rats. Pancreas, v.5, n.5, Sep, p.533-9. 1990.

Goodwin, M. e A. S. Yap. Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. J Mol Histol, v.35, n.8-9, Nov, p.839-44. 2004.

Gottardi, C. J., M. Arpin, *et al.* The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.20, Oct 1, p.10779-84. 1996.

Guillemot L, Hammar E, *et al.* Disruption of the cingulin gene does not prevent tight junction formation but alters gene expression. J Cell Sci, v.15, n.117(Pt 22), Oct, p.5245-56, 2004

Gumbiner, B. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. Am J Physiol, v.253, n.6 Pt 1, Dec, p.C749-58. 1987.

Gumbiner, B., T. Lowenkopf, *et al.* Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.8, Apr 15, p.3460-4. 1991.

Gumbiner, B., B. Stevenson, *et al.* The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. J Cell Biol, v.107, n.4, Oct, p.1575-87. 1988.

Gumbiner, B. M. Regulation of cadherin adhesive activity. J Cell Biol, v.148, n.3, Feb 7, p.399-404. 2000.

Gumbiner, B. M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol, v.6, n.8, Aug, p.622-34. 2005.

Gylfe, E., E. Grapengiesser, *et al.* Propagation of cytoplasmic Ca²⁺ oscillations in clusters of pancreatic beta-cells exposed to glucose. Cell Calcium, v.12, n.2-3, Feb-Mar, p.229-40. 1991.

Halban, P. A., S. L. Powers, *et al.* Spontaneous reassociation of dispersed adult rat pancreatic islet cells into aggregates with three-dimensional architecture typical of native islets. Diabetes, v.36, n.7, Jul, p.783-90. 1987.

Halban, P. A., C. B. Wollheim, *et al.* The possible importance of contact between pancreatic islet cells for the control of insulin release. Endocrinology, v.111, n.1, Jul, p.86-94. 1982.

Halbleib, J. M. e W. J. Nelson. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. Genes Dev, v.20, n.23, Dec 1, p.3199-214. 2006.

Hartsock, A. e W. J. Nelson. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. Biochim Biophys Acta, v.1778, n.3, Mar, p.660-9. 2008.

Hauge-Evans, A. C., P. E. Squires, *et al.* Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced Ca²⁺ and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. Diabetes, v.48, n.7, Jul, p.1402-8. 1999.

Heller, R. S., M. Jenny, *et al.* Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. Dev Biol, v.286, n.1, Oct 1, p.217-24. 2005.

Hong, E. G., H. L. Noh, *et al.* Insulin and glucagon secretions, and morphological change of pancreatic islets in OLETF rats, a model of type 2 diabetes mellitus. J Korean Med Sci, v.17, n.1, Feb, p.34-40. 2002.

Hopcroft, D. W., D. R. Mason, *et al.* Structure-function relationships in pancreatic islets: support for intraislet modulation of insulin secretion. Endocrinology, v.117, n.5, Nov, p.2073-80. 1985.

Howarth, A. G., M. R. Hughes, *et al.* Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. Am J Physiol, v.262, n.2 Pt 1, Feb, p.C461-9. 1992.

Huber, A. H., D. B. Stewart, *et al.* The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. J Biol Chem, v.276, n.15, Apr 13, p.12301-9. 2001.

In't Veld, P. A., D. G. Pipeleers, *et al.* Evidence against the presence of tight junctions in normal endocrine pancreas. Diabetes, v.33, n.1, Jan, p.101-4. 1984.

Itoh, M., M. Furuse, *et al.* Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. J Cell Biol, v.147, n.6, Dec 13, p.1351-63. 1999.

Itoh, M., A. Nagafuchi, *et al.* Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. J Cell Biol, v.138, n.1, Jul 14, p.181-92. 1997.

Itoh, M., A. Nagafuchi, *et.* The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. J Cell Biol, v.121, n.3, May, p.491-502. 1993.

Jain, R. e E. Lammert. Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. Diabetes Obes Metab, v.11 Suppl 4, Nov, p.159-67. 2009.

Jamora, C. e E. Fuchs. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. Nat Cell Biol, v.4, n.4, Apr, p.E101-8. 2002.

Jaques, F., H. Jousset, *et al.* Dual effect of cell-cell contact disruption on cytosolic calcium and insulin secretion. Endocrinology, v.149, n.5, May, p.2494-505. 2008.

Jepson, M. A., C. B. Collares-Buzato, *et al.* Rapid disruption of epithelial barrier function by *Salmonella typhimurium* is associated with structural modification of intercellular junctions. Infect Immun, v.63, n.1, Jan, p.356-9. 1995.

Jepson, M. A., H. B. Schlecht, *et al.* Localization of dysfunctional tight junctions in *Salmonella enterica* serovar typhimurium-infected epithelial layers. Infect Immun, v.68, n.12, Dec, p.7202-8. 2000.

Jesaitis, L. A. e D. A. Goodenough. Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. J Cell Biol, v.124, n.6, Mar, p.949-61. 1994.

Jonkers, F. C., J. C. Jonas, *et al.* Influence of cell number on the characteristics and synchrony of Ca²⁺ oscillations in clusters of mouse pancreatic islet cells. J Physiol, v.520 Pt 3, Nov 1, p.839-49. 1999.

- Kanno, T., S. O. Gopel, *et al.* Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on alpha-, beta- and delta-cells of the pancreatic islet. Neurosci Res, v.42, n.2, Feb, p.79-90. 2002.
- Katsuno, T., K. Umeda, *et al.* Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. Mol Biol Cell, v.19, n.6, Jun, p.2465-75. 2008.
- Kaung, H. L. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. Dev Dyn, v.200, n.2, Jun, p.163-75. 1994.
- Keon, B. H., S. Schafer, *et al.* Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. J Cell Biol, v.134, n.4, Aug, p.1003-18. 1996.
- Kervran, A. e J. Randon. Development of insulin release by fetal rat pancreas in vitro: effects of glucose, amino acids, and theophylline. Diabetes, v.29, n.9, Sep, p.673-8. 1980.
- Knudsen, K. A., A. P. Soler, *et al.* Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. J Cell Biol, v.130, n.1, Jul, p.67-77. 1995.
- Kobielak, A. e E. Fuchs. Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol, v.5, n.8, Aug, p.614-25. 2004.
- Kojima, S., N. Ueno, *et al.* A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation. Peptides, v.28, n.2, Feb, p.459-63. 2007.
- Kulkarni, R. N., J. C. Bruning, *et al.* Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. Cell, v.96, n.3, Feb 5, p.329-39. 1999.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.
- Larue, L., M. Ohsugi, *et al.* E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.17, Aug 16, p.8263-7. 1994.
- Leclerc, C. The roles of gap junctions in early development. In S. Citi (Ed.), Molecular mechanisms of epithelial cell junctions: from development to disease. Molecular Biology Intelligence, pp. 45-65. Texas, U.S.A.: CRC Press. 1994
- Le Gurun, S., D. Martin, *et al.* Connexin-36 contributes to control function of insulin-producing cells. J Biol Chem, v.278, n.39, Sep 26, p.37690-7. 2003.

Leite, A. R., C. P. Carvalho, *et al.* Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets. Can J Physiol Pharmacol, v.83, n.2, Feb, p.142-51. 2005.

Lewis, J. E., J. K. Wahl, 3rd, *et al.* Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. J Cell Biol, v.136, n.4, Feb 24, p.919-34. 1997.

Li, Q., Q. Zhang, *et al.* Altered distribution of tight junction proteins after intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. J Cell Mol Med, Nov 19. 2009.

Li, X., C. Olson, *et al.* Neuronal connexin36 association with zonula occludens-1 protein (ZO-1) in mouse brain and interaction with the first PDZ domain of ZO-1. Eur J Neurosci, v.19, n.8, Apr, p.2132-46. 2004.

Li, X., C. Olson, *et al.* Association of connexin36 with zonula occludens-1 in HeLa cells, betaTC-3 cells, pancreas, and adrenal gland. Histochem Cell Biol, v.122, n.5, Nov, p.485-98. 2004.

Lilla, V., G. Webb, *et al.* Differential gene expression in well-regulated and dysregulated pancreatic beta-cell (MIN6) sublines. Endocrinology, v.144, n.4, Apr, p.1368-79. 2003.

Luebke-Wheeler, J. L., G. Nedredal, *et al.* E-cadherin protects primary hepatocyte spheroids from cell death by a caspase-independent mechanism. Cell Transplant, Oct 1. 2009.

Luther, M. J., E. Davies, *et al.* Cell-to-cell contact influences proliferative marker expression and apoptosis in MIN6 cells grown in islet-like structures. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.288, n.3, Mar, p.E502-9. 2005.

Madara, J. L. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. Annu Rev Physiol, v.60, p.143-59. 1998.

Martin, T. A. e W. G. Jiang. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. Biochim Biophys Acta, v.1788, n.4, Apr, p.872-91. 2009.

Martyn, J. A., M. Kaneki, *et al.* Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. Anesthesiology, v.109, n.1, Jul, p.137-48. 2008.

Massa, L., H. Del Zotto, *et al.* Postnatal sequential changes in islet morphology and insulin secretion of normal hamsters. Pancreas, v.14, n.1, Jan, p.58-64. 1997.

Matter, K. e M. S. Balda. Signalling to and from tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol, v.4, n.3, Mar, p.225-36. 2003.

Matter, K. e M. S. Balda. Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. J Cell Sci, v.120, n.Pt 9, May 1, p.1505-11. 2007.

Meda, P., A. Perrelet, *et al.* Increase of gap junctions between pancreatic B-cells during stimulation of insulin secretion. J Cell Biol, v.82, n.2, Aug, p.441-48. 1979.

Mendonca, A. C., E. M. Carneiro, *et al.* Development of the insulin secretion mechanism in fetal and neonatal rat pancreatic B-cells: response to glucose, K⁺, theophylline, and carbamylcholine. Braz J Med Biol Res, v.31, n.6, Jun, p.841-6. 1998.

Mese, G., G. Richard, *et al.* Gap junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol, v.127, n.11, Nov, p.2516-24. 2007.

Miravet, S., J. Piedra, *et al.* Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription. Mol Cell Biol, v.23, n.20, Oct, p.7391-402. 2003.

Mitic, L. L., C. M. Van Itallie, *et al.* Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.279, n.2, Aug, p.G250-4. 2000.

Moller, C. J., S. Christgau, *et al.* Differential expression of neural cell adhesion molecule and cadherins in pancreatic islets, glucagonomas, and insulinomas. Mol Endocrinol, v.6, n.8, Aug, p.1332-42. 1992.

Montanya, E., V. Nacher, *et al.* Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. Diabetes, v.49, n.8, Aug, p.1341-6. 2000.

Musil, L. S. Structure and assembly of gap junctions. In: S. Citi (Ed.), Molecular mechanisms of epithelial cell junctions: from development to disease, Molecular Biology Intelligence Unit, pp. 173-194. Texas, U.S.A.: CRC Press. 1994

Nascimento, J. M., G. C. Franchi, Jr., *et al.* Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by Bothrops alternatus snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. Biochem Cell Biol, v.85, n.5, Oct, p.591-605. 2007.

Niessen, C. M. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol, v.127, n.11, Nov, p.2525-32. 2007.

Niessen, C. M. e C. J. Gottardi. Molecular components of the adherens junction. Biochim Biophys Acta, v.1778, n.3, Mar, p.562-71. 2008.

Nlend, R. N., L. Michon, *et al.* Connexin36 and pancreatic beta-cell functions. Arch Physiol Biochem, v.112, n.2, Apr, p.74-81. 2006.

Nolan, C. J., J. L. Leahy, *et al.* Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. Diabetologia, v.49, n.9, Sep, p.2120-30. 2006.

Nolan, C. J., M. S. Madiraju, *et al.* Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. Diabetes, v.55 Suppl 2, Dec, p.S16-23. 2006.

Nose, A. e M. Takeichi. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. J Cell Biol, v.103, n.6 Pt 2, Dec, p.2649-58. 1986.

Ohsugi, M., L. Larue, *et al.* Cell-junctional and cytoskeletal organization in mouse blastocysts lacking E-cadherin. Dev Biol, v.185, n.2, May 15, p.261-71. 1997.

Ohtani, O. Three-dimensional organization of the connective tissue fibers of the human pancreas: a scanning electron microscopic study of NaOH treated-tissues. Arch Histol Jpn, v.50, n.5, Dec, p.557-66. 1987.

Olofsson, C. S., J. Hakansson, *et al.* Impaired insulin exocytosis in neural cell adhesion molecule-/- mice due to defective reorganization of the submembrane F-actin network. Endocrinology, v.150, n.7, Jul, p.3067-75. 2009.

Orci, L. The microanatomy of the islets of Langerhans. Metabolism, v.25, n.11 Suppl 1, Nov, p.1303-13. 1976.

Orci, L. e R. H. Unger. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. Lancet, v.2, n.7947, Dec 20, p.1243-4. 1975.

Peixoto, E. B. e C. B. Collares-Buzato. Modulation of the epithelial barrier by dexamethasone and prolactin in cultured Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. Cell Biol Int, v.30, n.2, Feb, p.101-13. 2006.

Pelletier, R. M. e S. W. Byers. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. Microsc Res Tech, v.20, n.1, Jan 1, p.3-33. 1992.

Perez-Moreno, M., C. Jamora, *et al.* Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. Cell, v.112, n.4, Feb 21, p.535-48. 2003.

Peters, J., A. Jurgensen, *et al.* Ontogeny, differentiation and growth of the endocrine pancreas. Virchows Arch, v.436, n.6, Jun, p.527-38. 2000.

Petrik, J., E. Arany, *et al.* Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. Endocrinology, v.139, n.6, Jun, p.2994-3004. 1998.

Pipeleers, D., P. I. In't Veld, *et al.* Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.79, n.23, Dec, p.7322-5. 1982.

Pipeleers, D., R. Kiekens, *et al.* Physiologic relevance of heterogeneity in the pancreatic beta-cell population. Diabetologia, v.37 Suppl 2, Sep, p.S57-64. 1994.

Pipeleers, D. G., F. C. Schuit, *et al.* Interplay of nutrients and hormones in the regulation of insulin release. Endocrinology, v.117, n.3, Sep, p.824-33. 1985.

Pokutta, S., F. Drees, *et al.* Biochemical and structural definition of the I-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. J Biol Chem, v.277, n.21, May 24, p.18868-74. 2002.

Pokutta, S. e W. I. Weis. Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. Mol Cell, v.5, n.3, Mar, p.533-43. 2000.

Pokutta, S. e W. I. Weis. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. Annu Rev Cell Dev Biol, v.23, p.237-61. 2007.

Prentki, M. e C. J. Nolan. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. J Clin Invest, v.116, n.7, Jul, p.1802-12. 2006.

Rahner, C., L. L. Mitic, *et al.* Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. Gastroenterology, v.120, n.2, Feb, p.411-22. 2001.

Rajasekaran, A. K., M. Hojo, *et al.* Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. J Cell Biol, v.132, n.3, Feb, p.451-63. 1996.

Reddy, S. N., N. J. Bibby, *et al.* Cellular distribution of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide hormone and somatostatin in the fetal and adult pancreas of the guinea pig: a comparative immunohistochemical study. Eur J Cell Biol, v.38, n.2, Sep, p.301-5. 1985.

Rhodes, C. J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? Science, v.307, n.5708, Jan 21, p.380-4. 2005.

Rimm, D. L., E. R. Koslov, *et al.* Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.19, Sep 12, p.8813-7. 1995.

Roberts, T. K., C. M. Buckner, *et al.* Leukocyte transmigration across the blood-brain barrier: perspectives on neuroAIDS. Front Biosci, v.15, p.478-536.

Rogers, G. J., M. N. Hodgkin, *et al.* E-cadherin and cell adhesion: a role in architecture and function in the pancreatic islet. Cell Physiol Biochem, v.20, n.6, p.987-94. 2007.

Rouiller, D. G., V. Cirulli, *et al.* Differences in aggregation properties and levels of the neural cell adhesion molecule (NCAM) between islet cell types. Exp Cell Res, v.191, n.2, Dec, p.305-12. 1990.

Rouiller, D. G., V. Cirulli, *et al.* Uvomorulin mediates calcium-dependent aggregation of islet cells, whereas calcium-independent cell adhesion molecules distinguish between islet cell types. Dev Biol, v.148, n.1, Nov, p.233-42. 1991.

Rubin, L. L. e J. M. Staddon. The cell biology of the blood-brain barrier. Annu Rev Neurosci, v.22, p.11-28. 1999.

Scaglia, L., C. J. Cahill, *et al.* Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. Endocrinology, v.138, n.4, Apr, p.1736-41. 1997.

Scharp, D. W., KEMP, C. B. *et al.* The Use of Ficoll in the Preparation of Viable Islets of Langerhans From the Rat Pancreas. Transplantation, v. 16, n. 6, Dec, p.686-688. 1973

Schneeberger, E. E. e R. D. Lynch. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. Am J Physiol, v.262, n.6 Pt 1, Jun, p.L647-61. 1992.

Schnittler, H. J. Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. Basic Res Cardiol, v.93 Suppl 3, p.30-9. 1998.

Segretain, D., C. Fiorini, *et al.* A proposed role for ZO-1 in targeting connexin 43 gap junctions to the endocytic pathway. Biochimie, v.86, n.4-5, Apr-May, p.241-4. 2004.

Semino, M. C., E. E. De Gagliardino, *et al.* Islet cells-tight junctions: changes in its number induced by glucose. Acta Physiol Pharmacol Latinoam, v.37, n.4, p.533-9. 1987.

Serre-Beinier, V., D. Bosco, *et al.* Cx36 makes channels coupling human pancreatic beta-cells, and correlates with insulin expression. Hum Mol Genet, v.18, n.3, Feb 1, p.428-39. 2009.

Shafir, E., E. Ziv, *et al.* Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models. Ann N Y Acad Sci, v.892, Nov 18, p.223-46. 1999.

Shih D.Q., Heimesaat M., *et al.* Profound defects in pancreatic beta-cell function in mice with combined heterozygous mutations in Pdx-1, Hnf-1alpha, and Hnf-3beta. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 99, n.6, p.3818-3823. 2002.

Shimoyama, Y., A. Nagafuchi, *et al.* Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of alpha-catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. Cancer Res, v.52, n.20, Oct 15, p.5770-4. 1992.

Sone, H. e Y. Kagawa. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. Diabetologia, v.48, n.1, Jan, p.58-67. 2005.

Sorenson, R. L., T. C. Brelje, *et al.* Prolactin (in vitro) decreases the glucose stimulation threshold, enhances insulin secretion, and increases dye coupling among islet B cells. Endocrinology, v.121, n.4, Oct, p.1447-53. 1987.

Sumi, S. e K. Tamura. Frontiers of pancreas regeneration. J Hepatobiliary Pancreat Surg, v.7, n.3, p.286-94. 2000.

Surwit, R. S., C. M. Kuhn, *et al.* Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. Diabetes, v.37, n.9, Sep, p.1163-7. 1988.

Swenne, I., A. J. Bone, *et al.* Effects of glucose and amino acids on the biosynthesis of DNA and insulin in fetal rat islets maintained in tissue culture. Diabetes, v.29, n.9, Sep, p.686-92. 1980.

Takai, Y. e H. Nakanishi. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. J Cell Sci, v.116, n.Pt 1, Jan 1, p.17-27. 2003.

Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science, v.251, n.5000, Mar 22, p.1451-5. 1991.

Takeichi, M. The cadherin cell adhesion receptor family: roles in multicellular organization and neurogenesis. Prog Clin Biol Res, v.390, p.145-53. 1994.

Takeichi, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. Curr Opin Cell Biol, v.7, n.5, Oct, p.619-27. 1995.

Thyssen, S., E. Arany, *et al.* Ontogeny of regeneration of beta-cells in the neonatal rat after treatment with streptozotocin. Endocrinology, v.147, n.5, May, p.2346-56. 2006.

Tinkle, C. L., T. Lechler, *et al.* Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.2, Jan 13, p.552-7. 2004.

Tokuyama, Y., J. Sturis, *et al.* Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. Diabetes, v.44, n.12, Dec, p.1447-57. 1995.

Tsukita, S., M. Furuse, *et al.* Molecular architecture of tight junctions: occludin and ZO-1. Soc Gen Physiol Ser, v.52, p.69-76. 1997.

Tsukita, S., M. Itoh, *et al.* Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. J Cell Biol, v.123, n.5, Dec, p.1049-53. 1993.

Tunggal, J. A., I. Helfrich, *et al.* E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. EMBO J, v.24, n.6, Mar 23, p.1146-56. 2005.

Unger, R. H. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. Diabetes, v.44, n.8, Aug, p.863-70. 1995.

Van Aken, E., O. De Wever, *et al.* Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. Virchows Arch, v.439, n.6, Dec, p.725-51. 2001.

Van Itallie, C. M. e J. M. Anderson. Claudins and epithelial paracellular transport. Annu Rev Physiol, v.68, p.403-29. 2006.

Wang, R. N., G. Kloppel, *et al.* Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. Diabetologia, v.38, n.12, Dec, p.1405-11. 1995.

Ward, W. K., J. B. Halter, *et al.* Hyperglycemia and beta-cell adaptation during prolonged somatostatin infusion with glucagon replacement in man. Diabetes, v.32, n.10, Oct, p.943-7. 1983.

Willott, E., M. S. Balda, *et al.* The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.16, Aug 15, p.7834-8. 1993.

Winzell, M. S. e B. Ahren. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. Diabetes, v.53 Suppl 3, Dec, p.S215-9. 2004.

Wong, H. Y., B. Ahren, *et al.* Postnatally disturbed pancreatic islet cell distribution in human islet amyloid polypeptide transgenic mice. Regul Pept, v.113, n.1-3, May 15, p.89-94. 2003.

Wong, R. C., M. F. Pera, *et al.* Role of gap junctions in embryonic and somatic stem cells. Stem Cell Rev, v.4, n.4, Dec, p.283-92. 2008.

Woods, D. F. e P. J. Bryant. ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. Mech Dev, v.44, n.2-3, Dec, p.85-9. 1993.

Xu, G., D. A. Stoffers, *et al.* Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. Diabetes, v.48, n.12, Dec, p.2270-6. 1999.

Xu, J., P. J. Kausalya, *et al.* Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. Mol Cell Biol, v.28, n.5, Mar, p.1669-78. 2008.

Yagi, T. e M. Takeichi. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. Genes Dev, v.14, n.10, May 15, p.1169-80. 2000.

Yamada, S. e W. J. Nelson. Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification. Annu Rev Biochem, v.76, p.267-94. 2007.

Yamagata, K., T. Nampo, *et al.* Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. Diabetes, v.51, n.1, Jan, p.114-23. 2002.

Yamamoto, M. e K. Kataoka. A comparative study on the intercellular canalicular system and intercellular junctions in the pancreatic islets of some rodents. Arch Histol Jpn, v.47, n.5, Nov, p.485-93. 1984.

Yin, T. e K. J. Green. Regulation of desmosome assembly and adhesion. Semin Cell Dev Biol, v.15, n.6, Dec, p.665-77. 2004.

Zhong, Y., T. Saitoh, *et al.* Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. J Cell Biol, v.120, n.2, Jan, p.477-83. 1993.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada "Expressão e distribuição celular de proteínas associadas às junções intercelulares no pâncreas endócrino durante o desenvolvimento animal e na diabetes tipo 2":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(x) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*: Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA – Unicamp), sob Protocolo(s) nº 1885-1.

** Caso a Comissão seja externa à 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.*


Aluno(a): Junia Carolina Rebelo dos Santos Silva


Orientador(a): Profa. Dra. Carla B. Collares Buzato

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido


Nome: Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Função: Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP