UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

GUSTAVO JORGE DOS SANTOS

"A inibição da via da AMPK pelo CNTF promove sobrevivência de células MIN6"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
GUSTAVO JORGE DOS SANTOS
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Sa59i

Santos, Gustavo Jorge dos
A inibição da via da AMPK pelo CNTF promove sobrevivência de células MIN6 / Gustavo Jorge dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Antonio Carlos Boschero.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteína quinase ativada pela AMP. 2. Fator neurotrófico ciliar. 3. Células MIN6. 4. Diabetes. 5. Apoptose. I. Boschero, Antonio Carlos, 1943-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: CNTF-mediated AMPK pathway downregulation promotes MIN6 cells survival.
Palavras-chave em inglês: AMP-activated protein kinase; Ciliary neurotrophic factor; MIN6 cells; Diabetes; Apoptosis.
Área de concentração: Fisiologia.
Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.
Banca examinadora: Antonio Carlos Boschero, Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, Silvana Auxiliadora Bordin da Silva.
Data da defesa: 04/02/2011.
Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 04 de Fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero (Orientador)

Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin Silva

Assinatura

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ortis

Assinatura

RESUMO

INTRODUÇÃO: Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome metabólica, de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crônica, decorrente da falta de insulina, às vezes, associado à resistência dos tecidos periféricos a esse hormônio. O DM1 é caracterizado pela infiltração de macrófagos e linfócitos do tipo T-CD4+ e T-CD8+ no pâncreas, devido a uma falha do reconhecimento no sistema autoimune, que desencadeiam processos inflamatórios com liberação de óxido nítrico (NO), de radicais livres e de citocinas tais como: interleucina-1β (IL-1 β) e Interferon- γ (IFN- γ). Essas citocinas pró-inflamatórias ativam mecanismos que levam a morte celular por apoptose, com perda da massa funcional das células beta. Esses mecanismos podem ser reproduzidos *in-vitro* pela exposição de células beta a essas citocinas ou à Aloxana. O CNTF é uma citocina de sobrevivência neuronal, e em células beta age sobre o controle glicêmico inibindo secreção de insulina e promovendo sobrevivência de ilhotas. A AMPK é uma proteína quinase que em células beta atua como um sensor do estado energético celular e, quando as concentrações intracelulares de ATP diminuem, a AMPK é ativada estimulando geração de ATP e inibindo o consumo desse nucleotídeo. Em ilhotas, a AMPK desempenha função importante na regulação da secreção de insulina sendo que a inibição de AMPK protege as células beta da apoptose mediada por citosinas (IL-1β e IFN-γ) ou induzidas por células T do tipo CD8+ e CD4+.

OBJETIVOS: Diante do exposto, conclui-se que CNTF e AMPK desempenham funções importantes e correlatas nas células beta pancreáticas e, podem ser considerados alvos terapêuticos para o tratamento do DM tipo I. Contudo, a interação entre esses dois fatores (CNTF e AMPK) em células secretoras de insulina permanece desconhecida. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a possível papel da interação entre CNTF e AMPK na morte celular induzida pelos agentes diabetogênicos IL-1β e Aloxana.

RESULTADOS/CONCLUSÕES: Nossos resultados indicaram que: A Aloxana e a IL-1β dependem da via da AMPK para induzir apoptose em células MIN6; O CNTF modula a via da AMPK em células MIN6 e ilhotas de camundongos Swiss neonato. O CNTF foi capaz de impedir a morte celular induzida por Aloxana e por IL-1β através da *downregulation* da via da AMPK em células MIN6.

ABSTRACT

BACKGROUND: Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic syndrome of multiple etiologies, resulting from the lack of insulin sometime associated with an increase in the resistance to the hormone by insulin-target tissues. DM1 is characterized by the infiltration of macrophages and T-type CD4 + and T-CD8 + cells in the pancreas, due to a failure of the autoimmune system, causing inflammation and leading to the release of nitric oxide (NO), free radicals, and cytokines such as interleukin-1β (IL-1β) and interferon-γ (IFN-γ). These pro-inflammatory cytokines activate pro-apoptotic mechanisms, triggering beta cell death apoptosis, leading to a loss in functional beta cell mass. These mechanisms may be reproduced in vitro with exposure of beta cells to pro-inflammatory cytokines such as IL-1β or to Alloxan. The cytokine CNTF is a neuronal survival factor. Besides, CNTF modulates glycemia, inhibiting insulin secretion and promoting islet cells survival. AMPK is a protein kinase that acts on pancreatic beta cells as a sensor of the cellular energy state, and is activated when the cellular ATP concentrations decrease, stimulating ATP generation and inhibiting ATP consumption. In islets, AMPK plays an important role in regulating insulin secretion and inhibition of AMPK protects beta cells from apoptosis mediated by either cytokines (IL-1β and IFN-γ) and/or induced T cell CD8 + and CD4 +.

AIMS: Given that, both CNTF and AMPK play important role in beta cells and may be used as therapeutic targets for the treatment of DM1. However, the interaction between these two factors (CNTF and AMPK) in pancreatic beta cells remains unknown. Thus, the objective of this work was to investigate the relationship between interaction of AMPK and CNTF on pancreatic beta cell death, induced by Alloxan or IL-1β.

RESULTS/CONCLUSIONS: Our results indicated that both Alloxan and IL-1β are dependent of AMPK pathway to induce apoptosis in MIN6 cells; CNTF inhibits AMPK pathway in MIN6 cells as well as in islets of newborn Swiss mice; CNTF prevents beta cell death, induced by Alloxan and IL-1β, through *downregulation* of AMPK pathway in MIN6 cells.

ÍNDICE

RESUMO..... iv

ABSTRACT..... vi

LISTA DE FIGURAS..... xiv

LISTA DE ABREVIATURAS..... xvi

INTRODUÇÃO

Descrição do Diabetes..... 19

Modelos de Morte de célula beta *in-vitro*..... 20

O CNTF..... 21

A AMPK..... 22

Interação entre CNTF, AMPK e células β..... 24

OBJETIVOS..... 27

METODOLOGIA..... 29

RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 38

CONCLUSÃO..... 52

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 54

Dedico, especialmente, a minha namorada Raquel.
Também aos meus pai e avós.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antonio Carlos Boschero, pelo grande apoio intelectual e de infraestrutura durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo e Co-orientador Dr. Luiz Fernando de Rezende, não só pelo apoio intelectual e técnico, mais também pela amizade que foi criada durante esses anos de trabalho.

Ao professor Dr. Everardo Magalhães Carneiro por toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

A minha namorada, Raquel, por me ajudar em tudo o que precisei e, simplesmente, por ser quem ela é. Obrigado por tudo.

Aos meus pais por sempre estarem do meu lado, independente de qualquer coisa. Por sempre, independente de tudo, fazer o possível para me apoiar e me incentivar a seguir nesse caminho. Amo vocês.

Aos meus dois irmãos que eu tanto amo, Paula e Pedro, por sempre estarem comigo e sempre torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus queridos Isidor, Marisa e D. Ilda, por tudo que fizeram por mim, pelo apoio dado no decorrer desse tempo. Sem vocês, acreditem, seria muito mais difícil realizar esse trabalho. Obrigado de verdade. Nunca vou esquecer.

Aos meus queridos Avós (Sérgio, Lourdes, Paulo e Elza) por sempre estarem por pero e torcerem por mim.

A toda minha família, em especial as minhas Tias, Cecília, Cristina, Patrícia e Luciana por, sempre que possível, me ajudar de alguma forma.

Aos colegas do Laboratório do Pâncreas Endócrino e Metabolismo, passados e atuais, em especial aos amigos, Luiz, Marise, Júnia, Sandrinha, Helena B., Rosane, Priscila, Camila, Jane e Fernanda.

Aos professores e funcionários do Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica.

Aos membros da banca do exame de qualificação, pelas sugestões e críticas ao trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por nos honrarem com sua participação e pelas contribuições essenciais ao resultado final deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro.

"*Não se esqueça que todos nós nascemos com asas e, portanto, andar não é destino. É opção. Agora que você descobriu que tem asas, voe e, apesar das quedas, não tenha medo de ser feliz.*"
(Prof. Dr. José A. Garcia Sanches)

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Representação esquemática do desenho experimental realizado em células beta tumorais MIN6.....31

Figura 02: Representação esquemática do ensaio de fosforilação realizado em células MIN6.....32

Figura 03: Representação esquemática do ensaio de fosforilação realizado em camundongos Swiss.....33

Figura 04: Ensaio de fosforilação *in* vitro.....40

Figura 05: Ensaio de fosforilação *in vivo*.....41

Figura 06: Validação de um modelo de inibição da AMPK.....44

Figura 07: Fosforilação da LKB1 e CaMKII.....45

Figura08: Expressão Proteica da AMPK e pAMPK.....46

Figura 09: Fosforilação da ACC.....47

Figura 10: Concentrações de RNA mensageiro da LKB1, CaMKII, AMPK e ACC.....48

Figura 11: Concentrações de RNA mensageiro da iNOS.....49

Figura 12: Clivagem de Caspase-3 e Fragmentação de DNA.....51

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC: Acetil CoA-Carboxilase

ADP: Adenosina difosfato

AICAR: 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside

AMP: Monofosfato de adenosina

AMPK: Proteína quinase ativada por AMP

AMPKK: Quinase da proteína quinase ativada por AMPK

AMPK-kd: Knockdown para AMPK

ATP: Adenosina trifosfato

BCL-2: B-cell lymphoma 2

CaMKII: Proteína quinase ativada por Cálcio-calmodulina

CNTF: Fator Neurotrófico Ciliar

CNTF-R: Receptor do Fator Neurotrófico Ciliar

CX36: Conexina 36

DM: Diabetes Melitus

DNA: Ácido desoxiribonucleico

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

EROs: Espécies Reativas de Oxigênico

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GBD: Domínio de Ligação ao glicogênion

GLUT: Transportador de Glicose

IL-1β: Interleucina 1 beta

IL-11: Interleucina 11

IL-6: Interleucina 6

INF-γ: Interferon gama

iNOS: Óxido Nítrico Sintase

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

LKB1: Quinase Hepática B1

MIN6: Insulinoma de Camundongo

MO25: Mouse Protein 25

NGF's: Fator de Crescimento Nervoso

NO: Óxido Nítrico

pACC: Acetyl CoA Carboxilase fosforilada

pAMPK: Proteína quinase ativada por AMP fosforilada

PAX4: Paired box gene 4

PCaMKII: Proteína quinase ativada por Cálcio-calmodulina fosforilada

pLKB1: Quinase Hepática B1fosforilada

PMSF: phenylmethanesulfonylfluoride

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase

SFB: Soro Fetal Bovino

siRNA: RNA de interferência

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

STRAD: STE20-related adaptor

Thr: Treonina

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral alfa

INTRODUÇÃO

Descrição do Diabetes

A insulina é fundamental no controle da homeostasia da glicose, ácidos graxos e proteínas. Sua secreção de é feita pelas células beta pancreáticas e controlada continuamente, de acordo com as flutuações dos níveis de nutrientes circulantes, e, em especial, da glicose. A secreção é modulada ainda, direta ou indiretamente, por neurônios, neurotransmissores e agentes farmacológicos. Esse controle multifatorial permite que as células beta secretem insulina em quantidade e tempo adequados, regulando perfeitamente os níveis de nutrientes no sangue em diversas condições fisiológicas, tais como jejum, refeição, exercício físico, gravidez, lactação e crescimento (1).

A ausência da insulina (DM1) e/ou a secreção aparentemente normal, mas insuficiente para suplantar a resistência a insulina nos tecidos alvo (DM2), levam ao descontrole da homeostasia de carboidratos, de proteínas e de triglicérides. Esse descontrole na homeostasia dos nutrientes causa diversos problemas ao organismo, como alteração da síntese protéica, e do controle nervoso central (SNC) da ingestão alimentar (2) e do tônus vascular periférico (3). Ocorre ainda acúmulo de nutrientes no plasma e dificuldades no processamento intracelular dos mesmos, levando à redução das funções e posterior degeneração dos sistemas e órgãos (4).

O DM tipo 1 é decorrente de uma destruição total das células beta pancreática, provocada por uma ação autoimune. Esse processo é insidioso e pode levar anos para se completar, culminando, com o passar do tempo, no aparecimento de sintomas clínicos, como hiperglicemia crônica, polidipsia, poliúria e glicosúria. A destruição das células beta é aguda e agressiva, ocorre falha no reconhecimento de proteínas específicas das células beta pelo sistema imune e consequente infiltração de neutrófilos ativados nas ilhotas. Os neutrófilos que invadem as ilhotas liberam peróxido de hidrogênio (H_2O_2) o que culmina no aumento das concentrações locais desse oxidante. Além disso, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias como INF-γ (5), TNF-α (6) e IL-1β (7). A célula beta, por sua vez, possui receptores para estas citocinas inflamatórias, que, quando ligadas ao seu receptor específico, ativam vias de sinalização apoptóticas, de supressão da síntese proteica e expressão de *Fas* na membrana plasmática, um marcador para a ligação de linfócitos do tipo T. Após semanas ou meses (parâmetros humanos), há perda quase total das células beta, sem prejuízo aos demais tipos celulares que compõem a ilhota pancreática.

Ao longo dos últimos anos os estudos de prevenção de DM1 têm explorado mecanismos para prevenir a destruição das células beta, seja impedindo a infiltração de neutrófilos ou a ação das citocinas inflamatórias, a fim de evitar a instalação dessa patologia (7).

Modelos de Morte de célula beta *in-vitro*

O DM1 é caracterizado, principalmente, pela infiltração de linfócitos (do tipo T-CD^{4+} e T-CD^{8+}) e de macrófagos no pâncreas devido a uma falha do reconhecimento no sistema autoimune (8). Essa infiltração, por sua vez, desencadeia processos inflamatórios, levando à liberação de óxido nítrico (NO), radicais livres e de citocinas como Interleucina-1β (IL-1 β), Interferon-γ (IFN-γ) (9). Essas citocinas pró-inflamatórias ativam caspases e outros mecanismos pró-apoptóticos e desencadeia morte das células beta por apoptose, levando a uma perda na massa funcional de célula beta pancreática (8; 10).

Esses mecanismos podem ser reproduzidos *in-vitro* com a exposição de células beta a citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, IFN-γ, ou mesmo uma mistura de ambas. Essas citocinas, em linhagens de células beta, induzem processos apoptóticos e mudanças funcionais semelhantes aos observados em pacientes pré-diabeticos (8). Dessa forma, esses mecanismos de indução de apoptose em células beta por citocinas têm sido amplamente utilizados como modelo experimental de Morte de célula beta *in vitro*, mimetizando a morte dessas células em pacientes com DM1.

Outro modelo largamente utilizado que mimetiza a morte de célula beta observada no desenvolvimento do Diabetes é a exposição das células à Aloxana. A Aloxana é um agente diabetogênico sintético que, por sua alta homologia estrutural com a glicose, penetra as células beta através do transportador GLUT-2, fato que a torna altamente específica para as células secretoras de insulina. Após entrar na célula beta, essa droga aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), os EROs, por suas vezes, irão ativar vias de sinalização de morte celular. (11).

O CNTF

O CNTF é uma citocina pertencente à família das IL-6, que a exemplo das citocinas IL-11, LIF, Cardiotrophin-1 e Oncostatin-M. Essa citocina participa de processos extremamente importantes para o funcionamento da maioria dos organismos complexos que vão desde a manutenção da massa de células nervosas até o controle do balanço energético (13).

O CNTF é produzido, principalmente, nas células da glia localizadas tanto no sistema nervoso periférico como no sistema nervoso central. Descoberto na década de 80, o CNTF foi primeiramente identificado como um fator de sobrevivência de gânglios ciliares de animais pertencentes ao gênero *Galliformes*, justificando o nome dado à essa citocina: Fator Neurotrófico Ciliar. No decorrer do tempo e com sua purificação, o CNTF foi reconhecido como um importante fator de sobrevivência neuronal, mais precisamente, de neurônios ganglionares simpáticos e sensoriais. Além disso, foi descoberto que o CNTF desempenha outros efeitos neurotróficos, tais como: fator de sobrevivência de neurônios parassimpáticos e motores *in-vitro* e *in-vivo* e fator de diferenciação de células progenitoras de astrócitos em astrócitos tipo 2 (13; 14).

A localização do CNTF no Sistema Nervoso Central (SNC) é primariamente nos neurônios e nas células da Glia, enquanto no Sistema Nervoso Periférico (SNP) ele é encontrado em altas concentrações nas células de Schwann. Como não possui domínio sinalizador para exocitose, sugeriu-se que o CNTF é uma proteína citossólica, liberada no meio extracelular em conseqüência a danos celulares (13; 15).

Depois de secretado, o CNTF encontra em sua célula-alvo seu receptor específico localizado na membrana celular e acoplado a uma proteína G (gp130β), assim como todos os membros da família da IL-6. Estudos revelam que o receptor para o CNTF existe em todo o sistema nervoso, em músculos e, em células β pancreáticas. Quando ligado ao receptor o CNTF estimula vias de sinalização que promoverão, principalmente, a sobrevivência e/ou a diferenciação celular (16; 17).

Além dos efeitos sobre a sobrevivência celular, o CNTF modula diversos processos metabólicos no organismo como um todo. O efeito sistêmico mais conhecido do CNTF é a redução do peso corporal (18). Acredita-se que o CNTF, através da diminuição da atividade da

via da AMPK, é capaz de reduzir a ingestão alimentar em ratos controle e ratos com resistência à leptina (19).

Além disso, o CNTF é considerado um importante alvo terapêutico no tratamento do DM, da obesidade e da resistência à insulina induzida por obesidade, pois ele tem a capacidade de: (a) aumentar, em músculo esquelético, a atividade da AMPK promovendo uma maior oxidação de ácidos graxos e, conseqüentemente, maior produção de ATP (20); (b) estimular a captação de glicose através da ativação da via PI3-quinase (21) e; (c) promover a sobrevivência de ilhotas pancreáticas através do aumento de BCL-2 (22) e da ativação da via JAK-STAT3 (23).

A AMPK

A Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é uma proteína do grupo das enzimas energético-sensíveis ativadas pelo estresse celular resultante da depleção de ATP, sendo uma indicadora intracelular de energia-circulante e desempenha um papel fundamental na regulação do status energético da célula (24).

A AMPK é uma proteína quinase serina/treonina que contém uma subunidade catalítica (α), com duas isoformas ($\alpha1$ e $\alpha2$), e duas subunidades regulatórias (β e γ) com as seguintes isoformas: $\beta1$, $\beta2$, $\gamma1$, $\gamma2$, $\gamma3$. (16). Sua subunidade catalítica α é constituída por um domínio quinase NH_2-terminal seguido por uma sequencia de autoinibição (AIS), um domínio de interação com a subunidade β (β-SID) e, possui um sítio de fosforilação em Thr^{172} chave para sua ativação por quinases *upstream*. A subunidade β é formada por dois elementos característicos: (a) um domínio de ligação com o glicogênio (GBD) e, (b) uma sequência de ligação com os domínios α e γ ($\alpha\gamma$-SBS), responsável por estabilizar a conformação espacial da molécula. A subunidade γ compreende quatro domínios iguais chamados de motivos CBS ou domínio *Bateman*. É nesse domínio *Bateman* que se encontra o sítio de ligação para o AMP e para o ATP (25; 26).

O controle na atividade da AMPK envolve tanto um controle alostérico, por parte do AMP, como por fosforilação reversiva em Thr^{172} por quinases *upstream*, como LKB1 e a CaMKII. Quando ocorre ativação mútua desses dois mecanismos, os efeitos fisiológicos da atividade da

AMPK aumentam em 3 ordens de grandeza, possibilitando que pequenas mudanças no *status* energético celular sejam percebidas de maneira eficiente (27).

A ligação do AMP com a subunidade regulatória γ da AMPK promove uma ativação alostérica da enzima, deixando-a mais suscetível a ações de quinases *upstream* e inibindo a desfosforilação do sítio Thr^{172} por fosfatases. Existem duas proteínas capazes de ativar a AMPK por fosforilação do resíduo $Thr^{172,}$ são elas: a Quinase hepática B1 (LKB1) e a Quinase ativada pelo complexo Cálcio-calmodulina (CaMKII) (24; 28).

A LKB1 sempre foi considerada *upstream* à AMPK, pois o seu substrato específico requer ativação em Thr, como a AMPK. Ainda, posteriormente, descobriu-se que linhagens de células MEFs, deficientes de LKB1, não respondiam aos ativadores de AMPK AICAR e H_2O_2. A LKB1 é encontrada na célula em associação com as proteínas MO25 e a STRAD, formando o complexo LKB1-MO25-STRAD. Pouco se sabe sobre a formação, função e regulação desse complexo. Contudo, diversos estudos mostram que a ligação STRAD-LKB1 é responsável pela ativação da LKB1, independente de sua fosforilação, pois a STRAD se liga diretamente ao domínio quinase da LKB1, aumentando em 100 vezes sua atividade, e para que ligação STRAD-LKB1 exista é necessária a presença da proteína MO25, que atua como uma estabilizadora da ligação (28; 29). Essa atividade da LKB1, independente de fosforilação, promove na célula uma atividade basal de AMPK. Quando ocorre algum sinal "de estresse" a LKB1 pode ser ativada por fosforilação em Ser^{428}, aumentando assim a atividade basal da AMPK (25; 29).

Alem da LKB1, a AMPK pode ser ativada por alterações das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+}. Recentemente, designou-se a via estimulada pela CaMKII como via alternativa para ativação da AMPK que, parece ser independente das concentrações do AMP (24; 25).

A ativação da AMPK decorre de um controle fino nos três processos descritos acima (a) concentrações de AMP, (b) complexo LKB1 e, (c) sinalização do Ca^{2+}. A AMPK é ativada pela fosforilação de seu resíduo tirosina 172 da alça de ativação localizado na subunidade catalítica α (30). Essa ativação é causada, principalmente, pelo decréscimo do status energético celular, gerado por algum estresse que diminui os níveis celulares de ATP, ou seja, a AMPK é ativada quando a razão celular de AMP/ATP está aumentada. Esse fato aumenta a probabilidade de ligação do AMP com os domínios *Bateman*, localizados na subunidade γ, promovendo uma mudança conformacional na estrutura da molécula, deixando-a suscetível a fosforilação por quinases *upstream* (LKB1) e diminuindo a taxa de desfosforilação por fosfatases (31). Além de o

AMP promover uma melhora na ação das AMPKK ele ainda ativa alostericamente a AMPK, desempenhando função fundamental no processo de controle da atividade dessa enzima.

Uma vez ativada, a AMPK restaura os níveis citoplasmáticos de ATP, inibindo processos que consomem ATP e estimulando vias que produzem ATP (32). Esses processos aumentam a capacidade da célula de restabelecer a homeostasia energética (33). Quando os níveis de ATP voltam a ser reestabelecidos, diminui a probabilidade da ligação do AMP com os domínios *Bateman*, fazendo com que a AMPK volte a sua conformação original e retorne sua atividade para níveis basais.

Um dos primeiros substratos da AMPK identificado e relacionado com o controle das concentrações intracelulares de ATP foi a ACC, que por sua vez catalisa a produção de Malonil-CoA, a partir do Acetil-CoA, a principal função da Malonil-CoA é diminuir a taxa β-oxidação através da inibição da ação da CPT1. Quando fosforilada pela AMPK em SER^{221} a ACC tem sua atividade inibida, reduzindo a produção de Malonil-CoA e aumentando a atividade de CPT1, promovendo um maior fluxo de substrato para a β-oxidação, aumentando a produção de ATP (34; 35).

A AMPK auxilia na manutenção da normoglicemia, e evidências recentes (36) mostram que a AMPK desempenha função importe na translocação de GLUT 4 para a membrana das células musculares, que são responsáveis pela captação de 70% da glicose disponível (37), além disso, no fígado, essa enzima inibe a gliconeogênese, controlando a liberação da glicose hepática (32). Sabe-se ainda que, no tecido adiposo, a AMPK desenvolve um importante papel no controle do fluxo lipogênico e da síntese de ácidos graxos (38).

Interação entre CNTF, AMPK e células β

Assim como todos os outros membros da família das IL-6, o CNTF usa a via da glicoproteína gp130 como elemento de transdução de sinais (17). O complexo receptor funcional de CNTF (CNTF-R) consiste da gp130, do *Leukemia Inhibitory Factor Receptor* e do receptor específico de CNTF (CNTF-R). Este não possui domínio citoplasmático e permanece ancorado à membrana via ligação a glicosil-phosphatidil-inositóis. É relatado que a IL-6 inibe a secreção de

insulina induzida por glicose em ilhotas de ratos (39; 40), além de potencializar o efeito (inibitória) da IL-1β sobre a secreção de insulina (40).

Além disso, células beta pancreáticas expressam receptores para vários fatores de crescimento nervosos (NGFs) e podem ter uma resposta neurotípica a diversos fatores de diferenciação neuronais (41). As ilhotas de Langerhans são ricamente inervadas e o CNTF, presente nas células de Schwann do SNP, pode ter função parácrina, uma vez que interfere também em células não-neuronais (42).

Entre os efeitos do CNTF sobre o controle glicêmico de animais tratados com o polipeptídeo, destacam-se a menor adiposidade em ratos db/db (deficientes em leptina) e a redução da hiperinsulinemia e da hiperlipidemia associadas. Esses efeitos do CNTF foram atribuídos à menor ingestão de alimentos associados ao aumento da taxa metabólica basal desses animais (43).

Algumas evidências da ação do CNTF sobre as ilhotas pancreáticas têm sido relatadas. O CNTF potencializa o efeito inibitório de IL-1B sobre a secreção de insulina, bem como a síntese de NO estimulada por IL-1B em ilhotas de ratos. Não se conhece os mecanismos envolvidos na mediação desses efeitos (44). Provavelmente, estão associados à via da gp130, uma vez que estes são mimetizados pela administração da IL-6.

O CNTF não altera o metabolismo da glicose, bem como a síntese de mRNA e de proteínas necessárias para o evento secretório. Por outro lado, o CNTF aumenta a sobrevivência de células beta, por meio do aumento considerável das quantidades de mRNA e de proteínas relacionadas com a sobrevivência celular, como a CX36, PAX4 e BCL-2, ativação da via JAK/STAT3, da diminuição da atividade da Caspase-3 e, conseqüentemente, da apoptose (22).

Nas células beta pancreáticas, a glicose aumenta a razão ATP/ADP, o que leva ao fechamento de canais de potássio ATP-sensíveis (K^+_{ATP}), acúmulo intracelular de K^+ e subseqüente despolarização da membrana celular. Essa despolarização promove a abertura canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (Ca^{2+}_V) e com isso um aumento no influxo e concentração citoplasmática de Ca^{2+}. O aumento da [Ca^{2+}] ativa a maquinaria de extrusão de grânulos de insulina presentes no citoplasma, o que promove maior secreção de insulina (22; 23).

Por aumentar a [ATP] e, com isso, a relação ATP/ADP, a AMPK parece ser um regulador importante da secreção de insulina (45). A ativação da AMPK em células beta pancreáticas desencadeia um aumento na beta-oxidação e um declínio no conteúdo intracelular de acyl-CoA,

indicando um aumento nos processos de geração de ATP e redução nos processos de depleção desse nucleotídeo (45; 46).

Além disso, a AMPK parece desempenhar papel importante na apoptose de células beta pancreáticas induzida por citocinas inflamatórias, como IL-1β e TNF-α, (10), hipóxia (47) e apoptose mediada por macrófagos CD^{8+} e CD^{4+} (10). Nesse caso, a inibição da AMPK protege as células beta pancreáticas de apoptose mediada por citocinas como IL-1β e IFN-γ e induzidas por células T do tipo $CD8^{+}$ e $CD4^{+}$. Um dos principais mecanismos propostos para a indução de apoptose pela AMPK é o aumento da expressão de iNOS e conseqüente produção de NO. Assim, a AMPK têm se mostrado um provável alvo terapêutico na prevenção de doenças pancreáticas auto-imunes como o DM1 (10).

OBJETIVOS

Diante do exposto, pode-se concluir que tanto o CNTF quanto o AMPK desempenham funções importantes em diversos tipos celulares, em especial, nas células beta pancreáticas, controlando sua sobrevivência (22) e alterando seu estado metabólico (32). Contudo a interação entre esses dois fatores (CNTF e AMPK) nessas células permanece desconhecida. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da interação CNTF-AMPK em células beta e se essa interação está relacionada com o aumento de sobrevivência promovida pelo CNTF (22). Para isso:

1. Estudamos os efeitos do CNTF sobre a AMPK, em linhagem de células beta MIN6 e ilhotas isoladas de camundongos neonatos, analisando a expressão de proteínas relacionadas com a via da AMPK, como a LKB1, CaMKII, AMPK e ACC;

2. Verificamos se os danos causados pela Aloxana e pela IL-1β em células MIN6 são mediados pela via da AMPK;

3. Verificamos se o CNTF protege células MIN6 contra a morte celular induzida por Aloxana e por IL-1β;

4. Verificamos se os efeitos do CNTF sobre AMPK estão relacionados com a proteção de células MIN6 contra a morte celular desencadeada por Aloxana e por IL-1β.

METODOLOGIA

Cultura Celular

Foram utilizadas linhagens de células permanentes produtoras de insulina MIN6. Essas células foram mantidas em placas de cultura estéril (TPP, Trasadingen, Switzerland) contendo meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), acrescido de glicose 11 mM, com 10% (durante a fase de expansão da colônia) ou 2% (durante o tratamento experimental) de soro fetal bovino (FCS) (Nutricell, Campinas, Brasil), 100 U/ml de Penicilina (Sigma, St Louis, USA) e 100 ug/ml de Estreptomicina (Sigma, St. Louis, USA), em atmosfera umedecida contendo 5% CO_2, à temperatura constante de 37ºC. Posteriormente, as células foram incubadas na ausência (Controle) ou presença (CNTF) de 1 nM de CNTF, com ou sem a adição de Aloxana ou IL-1β.

Inibição do siRNA

Foram semeadas 2.10^5 células em cada poço de uma placa de seis poços. Posteriormente, as células foram incubadas por 24 horas em meio RPMI contendo 10% de SFB. A seguir, as células foram lavadas com 1 ml de meio RPMI sem a adição de antibiótico e SFB. Após a lavagem, adicionou-se 1 ml de meio RPMI contendo 5 µl de *lipofectamina* e 300 nM de siRNA específico para a AMPK (siRNA AMPKα1, Santa Cruz Biotechnology, sc-29674), sem antibiótico e SFB. Após 6 horas foi acrescido 1 ml de meio RPMI sem lipofectamina mas contendo 200 U/ml de Penicilina, e 200 ug/ml de Estreptomicina e 20% de SFB. Depois de 24 horas o meio foi aspirado e as células foram incubadas na ausência (Controle) ou presença (CNTF) de 1 nM de CNTF, com ou sem a adição de Aloxana ou IL-1β. Protocolo desenvolvido segundo as especificações do fabricante.

Animais

Foram utilizados camundongos SWISS neonatos com 1-3 dias de vida, provenientes do biotério central da UNICAMP.

Desenho experimental realizado em células

Células MIN6, proveniente do nosso estoque, mantido em nitrogênio líquido, foram divididas primeiramente em dois grupos: (a) Controle e (b) AMPK-kd. As células do grupo Controle não receberam qualquer tipo de tratamento. As células AMPK-kd foram cultivadas com 200 μM de siRNA específico para a proteína AMPK e o protocolo experimental para tal inibição foi desenvolvido conforme as indicações do fabricante. Depois disso, as células Controle e AMPK-Kd foram cultivadas por 3 dias na presença ou ausência de 1 nM de CNTF, com ou sem a posterior exposição por 24 horas à 50 mM de Aloxana ou 10 ng/ml de IL-1β. Após o período de incubação as células foram retiradas da cultura e processadas.

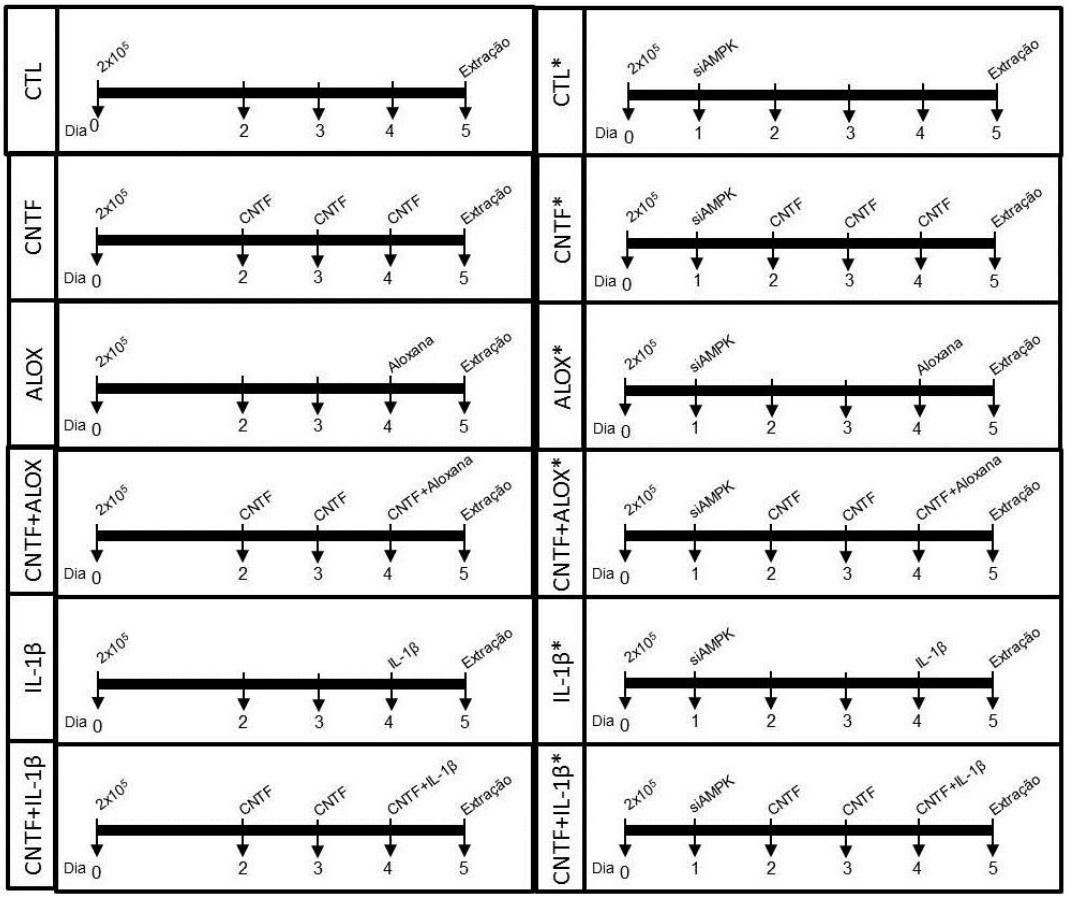

FIG.1 – Representação esquemática do desenho experimental realizado em células beta MIN6. Células Controle e Células AMPK-kd (*) foram tratadas com Aloxana ou Interleucina-1β na presença ou ausência de CNTF.

Ensaio de fosforilação *in-vitro*

Células MIN6 foram submetidas a um ensaio de fosforilação, que constituiu na adição de 1 nM de CNTF no meio de cultura foi adicionado após 5, 15 e 45 min, as proteínas foram extraídas para avaliação os efeitos do CNTF sobre a atividade da via da AMPK. O desenho do ensaio de fosforilação *in-vitro* está representado, de maneira esquemática, na Figura 3.

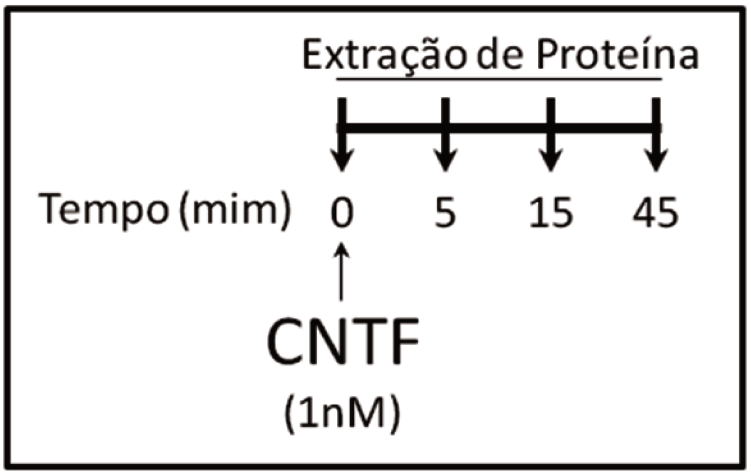

FIG.2 – Representação esquemática do ensaio de fosforilação realizado em células MIN6. Células MIN6 Controle foram expostas a 1 nM de CNTF e, após 0, 5, 15 e 45 min foram retiradas do meio para análise dos níveis de fosforilação das proteínas AMPK, ACC, LKB1 e CaMKII.

Ensaio de fosforilação *in-vivo*

Camundongos Swiss neonatos (1-3 dias de vida) foram submetidos a um ensaio de fosforilação e. para isso, receberam uma dose de 0,1 mg/Kg de CNTF intraperitoneal. Após 5, 15 e 45 min da administração do CNTF foram sacrificados para extração do pâncreas e isolamento das ilhotas. As proteínas insulares foram isoladas por método convencional para avaliação dos efeitos do CNTF sobre a atividade da via da AMPK. O desenho do ensaio de fosforilação *in-vivo* está representado, na Figura 3.

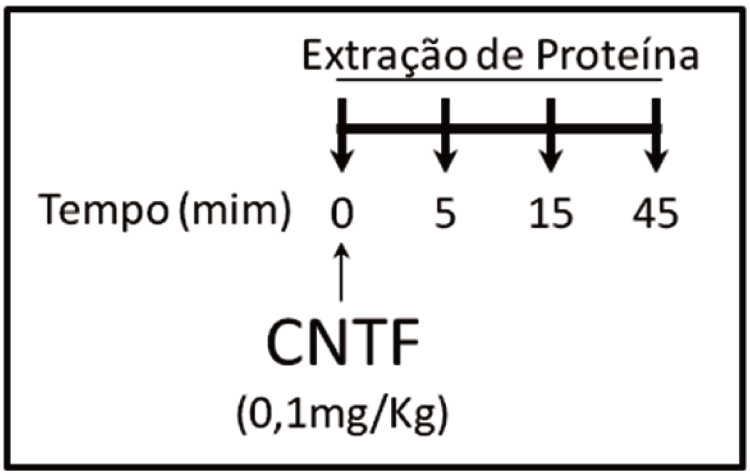

FIG.3 – Representação esquemática do ensaio de fosforilação realizado em Camundongos Swiss. Os animais receberam intraperitonealmente, 0,1mg/kg de CNTF e, após 0, 5, 15 e 45 min tiveram as ilhotas isoladas pelo método de digestão do pâncreas com colagenase. As proteínas insulares foram separadas para análise dos níveis de fosforilação da AMPK, ACC, LKB1 e CaMKII.

Isolamento de Ilhotas Pancreáticas

Camundongos Swiss neonatos foram mortos por decapitação e após incisão abdominal o pâncreas foi retirado e transferido para um tubo de 15 ml contendo solução de Hanks enriquecida com 1 mg/ml de colagenase. O pâncreas na solução de Hanks foi mantido em banho a 37ºC por 17 min. Ao final deste período foi realizada uma leve agitação de 15 segundos para facilitar a desagregação do tecido pancreático. A digestão do tecido foi interrompida mediante a adição de Hanks a 4ºC. O material foi centrifugado em solução de Hanks quatro vezes para a remoção da colagenase e enzimas digestivas liberadas durante a incubação. As ilhotas, completamente separadas do tecido acinar, foram coletadas uma a uma, por aspiração com o auxílio de pipeta Pasteur, previamente estirada e siliconada.

Identificação e quantificação protéica por imunobloting.

Após a extração protéica com tampão de 8M de uréia, com coquetel anti-protease, contendo: 100 mM de Tris pH 7,5; 10 mM de pirofosfato de sódio; 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de

EDTA; 10 mM de Ortovanadato de sódio; 2 mM de PMSF; e 1% de Triton-X 100 as amostras foram sonicadas e centrifugadas a 10.000g por 10 min. A quantificação protéica foi realizada pelo método de Bradford. As amostras foram então incubadas à 100ºC por 3 min em 4 µl de Tampão de Laemmli 5x (Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%) contendo DTT. Para corrida eletroforética foi utilizado gel bifásico: gel de empilhamento (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 750 mM, pH 6.7) e gel de resolução (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 50 mM, pH 8.9). A corrida foi efetuada à 90 V por aproximadamente 1,5 horas com Tampão de Corrida (Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0.4%), diluído 1:4. As amostras foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (BioRad) durante 2 horas à 120 V em gelo, banhada com Tampão de Transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM). Após transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em solução de TBS por 5 horas à 4ºC. As proteínas relacionadas ao estudo foram detectadas na membrana de nitrocelulose por incubação por 5 horas à temperatura ambiente, com anticorpo específico (AMPK: AMPKα, Cell signaling#2532; fosfoAMPK: phosphoAMPKα^{Thr172} Cell Signaling#2535; ACC: Acetyl CoA Carboxylase, Cell Signaling#3662; fosfoACC: phospho-Acetyl CoA Carboxylase Cell Signaling#3661; LKB1: LKB1, Cell Signaling#3050; fosfoLKB1: LKB1^{S428}, ab63473, Abcam; CamKII: CaMKII ab3908, Abcam; fosfo-CaMKII: CaMKII^{T305}, ab63377, Abcam; GAPDH: GAPDH sc-35778, Santa Cruz). Em seguida, a membrana foi incubada por 2 horas com o anticorpo policlonal anti-IgG (diluição 1:1000 em TBS com 2% de leite desnatado). Passado este período, as membranas foram lavadas com TBS, incubadas por 5 min com reagentes de quimiluminescência (Pierce Biotechnology, USA) e expostas em cassetes a filmes de raio-X (Kodak, AM, Brasil). A intensidade e quantificação das bandas foram avaliadas por densitometria (Scion, Image, Frederick, MD, USA), sendo os valores de densitometria das bandas normalizados pelos valores de densitometria do controle interno GAPDH. Para analise da fosforilação protéica, os valores da densitometria das proteínas fosforiladas foram normalizados pela expressão das proteínas totais (Fosforilação proteica = proteína fosforilada/ proteína total).

Extração de mRNA

O RNA total foi extraído de células MIN6 incubadas na ausência (Controle) ou presença (CNTF) de 1 nM de CNTF, com ou sem a adição de Aloxana ou IL-1β, através da adição de 1 ml de

Trizol (GIBCO BRL - Life Technologies). As células foram homogeneizadas em vórtex e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em cada amostra, 300 µL de clorofórmio foram adicionados e as amostras vigorosamente homogeneizadas durante 15 segundos. Após incubação de 3 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000g × 15 min a 4ºC. O volume correspondente à fase aquosa foi transferido para outro tubo e o RNA precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol, seguido de incubação por 10 min à temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12.000 g × 15 min a 4ºC foi realizada e os *pellets* obtidos foram lavados com 1 mL de etanol 75% e centrifugados a 7500g × 10 min a 4ºC e, posteriormente, lavados com 1 mL de etanol 100%. O etanol foi descartado e o *pellet* parcialmente seco em estufa a 37ºC. As amostras foram ressuspedidas em 15 µL de água previamente tratada com DEPC. A integridade do RNA obtido foi verificada por eletroforese em gel de agarose denaturante, para visualização das unidades ribossomais 28S e 18S após coloração com brometo-de-etídeo, e a quantificação realizada através de leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm em aparelho *Genequant* (Pharmacia Biotech).

Obtenção de cDNA a partir de RNA total

A reação da transcriptase reversa foi realizada a 42ºC durante 50 min, em 20 µL de uma mistura contendo 3 µg de RNA total + 10 mM de dNTP mix + 40 U/µl de inibidor de Rnase + 0,1 M de DTT + 5X first-strand buffer + 0,5 µg/ml de oligo dT + 200 U da enzima Super Script II RNase H Reverse Transcriptase (GIBCO BRL – Life Technologies).

Real Time RT-PCR

Foi realizado pelo método Syber Green Master Mix (Applied Biosystem), usando um fluoróforo que se liga somente a DNA dupla-fita. As reações foram realizadas usando o sistema de detecção DNA (StepOne – Real Time PCR Systens, Applied Biosystem). O volume total utilizado nas reações foi de 15 µl. Primeiramente, as amostras foram desnaturadas a 94ºC por 2 min e em

seguida passaram por 45 ciclos de PCR. Cada ciclo compreendeu as seguintes etapas em seqüência: *Melting* a 94ºC por 30 segundos , *annealing* 62-65°C por 30 segundos, e extensão a 72ºC por 30 segundos. Cada amplificação por PCR foi feita em duplicata. Os parâmetros ideais para cada reação foram definidos empiricamente, e a pureza dos produtos de amplificação foi determinada pelas *melting curves*. Foi utilizado o gene β-act como controle interno.

Foram utilizados os seguintes primers:

AMPK:

Sense: 5'-CAAAGCCGACCCAATGAC-3'

Anti-sense: 5'- TCTTCCTTCGCACACGC-3'

ACC:

Sense: 5'-CCGCCTCTTCCTGACAAAC-3'

Anti-sense: 5'-GGTCCCTGCTTGTCTGGATA-3'

LKB1:

Sense: 5'-GCAGAGAAAACCCAGAGCG-3'

Anti-sense: 5'-CTGTGGTTGGTCGTGTTGTC-3'

CaMKII:

Sense: 5'-GTGCCTTGCCTGGTGTTGCT-3'

Anti-sense: 5'-CCTCCGCTCTTCCCTCCTGTGG-3'

iNOS:

Sense: 5'CCACGGACGAGACGGATAGGC-3'

Anti-sense: 5'GCAGGAAGGCAGCGGGCACA-3'

β-ACT:

Sense: 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGACA-3'

Anti-sense: 5'CGATAGTGATGACCTGACCGTCA-3'

Fragmentação de DNA

O DNA foi isolado das células beta MIN6 e separado em fragmentados ou íntegros pelo método Trizol/Triton. A seguir, foram quantificados pelo método Sybr-Green, em ng/ml de DNA. Os resultados foram expressos em DNA fragmentado/DNA total (32).

Analise Estatística

Todos os dados deste trabalho foram analisados pelo teste ANOVA two-way seguido de pós-teste de Bonferroni. As análises foram feitas pela utilização do programa GrapfPad Prism 4 e Origina 4. O nível de significância adotado para as análises foi $p < 0,01$ para RT-PCR e $p<0,05$ para os demais experimentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A AMPK desempenha funções importantes no controle do metabolismo celular (25; 48), e, em particular, é conhecida pela sua ação na apoptose induzida por citocinas inflamatórias, como IL-1β e TNF-α, (10), hipóxia (47) e apoptose mediada por macrófagos CD^{8+} e CD^{4+} (10). Além disso, a AMPK modula a expressão de iNOS e a produção de NO, processos que podem levar à apoptose (49; 50).

O CNTF é uma citocina anti-inflamatória conhecida por promover a sobrevivência celular e, em alguns tecidos, a diferenciação celular (44). Em ilhotas pancreáticas o CNTF diminui a secreção de insulina estimulada por glicose (44) e reduz a morte celular induzida por IL-1β (22). O CNTF modula a atividade da via da AMPK em diversos tecidos. Em músculo, o CNTF ativa a AMPK que, através da inativação por fosforilação da ACC, aumenta a produção de ATP (20). No hipotálamo o CNTF diminui a ingestão alimentar através da diminuição da atividade da via da AMPK (19).

Diante dessas informações, nosso primeiro passo foi avaliar os possíveis efeitos do CNTF sobre a modulação da via da AMPK em células tumorais secretoras de insulina, MIN6. Para isso, analisamos a fosforilação da AMPK e de proteínas *upstream* (LKB1 e CaMKII) e *downstream* (ACC) a ela. Através de um ensaio agudo de fosforilação, observamos que o CNTF reduziu de maneira tempo-dependente a fosforilação das proteínas quinases LKB1 (Fig.4B) e CaMKII (Fig.4C) bem como da própria AMPK (Fig.4D). Além disso, o CNTF reduziu de maneira tempo-dependente a fosforilação do principal substrato da AMPK, a ACC (Fig.4E). Assim, concluímos que o CNTF inibiu a via da AMPK.

O próximo passo foi avaliar se os efeitos do CNTF sobre a AMPK em células MIN6 ocorrem também *in vivo*. Para isso realizamos ensaio de fosforilação aguda em ilhotas de camundongos neonatos Swiss, tratados ou não com CNTF. Os resultados desse ensaio vão ao encontro dos observados *in-vitro*. O CNTF reduziu, de maneira tempo-dependente, a fosforilação da AMPK (Fig.5D) bem como a fosforilação das proteínas LKB1 (Fig.5B), CaMKII (Fig.5C) e ACC (Fig.5E). Esses resultados mostram que, assim como em células MIN6, o CNTF inibiu a via da AMPK em ilhotas de camundongos Swiss.

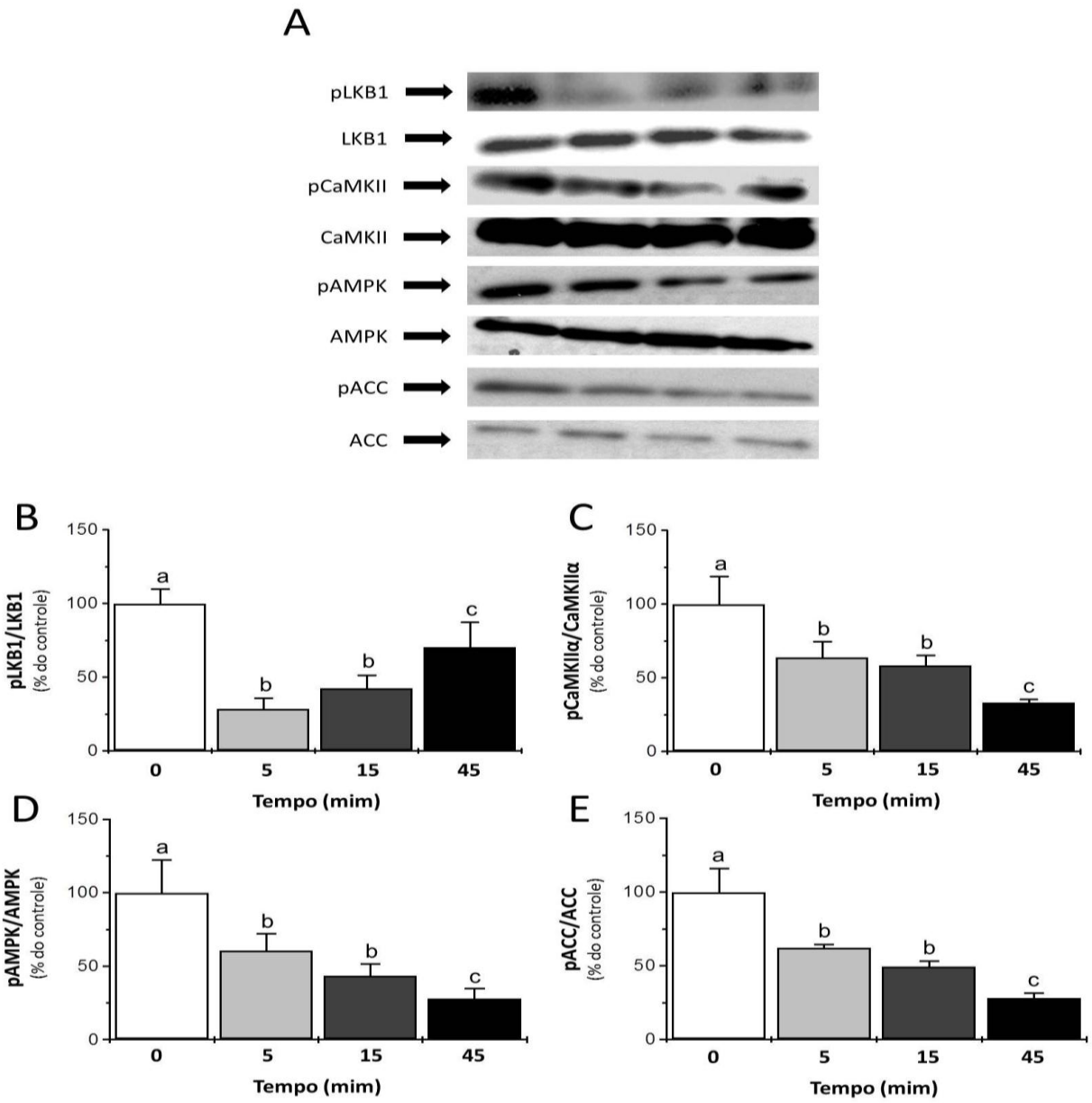

Fig.4 – **Ensaio de fosforilação *in vitro*** – Análise da fosforilação das proteínas envolvidas na via da AMPK em células MIN6 após 0, 5, 15 e 45 min a exposição ao CNTF (1 nM). As proteínas foram avaliadas por Wester blot, com a utilização de anti-corpos específicos (ver métodos). **(A**) Imagem representativa das concentrações protéicas da LKB1, pLKB1, CaMKII, pCaMKII, AMPK, pAMPK, ACC, pACC e GAPDH. **(B)** Fosforilação da LKB1 (pLKB!/LKB1). **(C)** Fosforilação da CaMKII (pCaMKII/CaMKII). **(D)** Fosforilação da AMPK (pAMPK/AMPK). **(E)** Fosforilação da ACC (pACC/ACC). Os resultados são apresentados em % do tempo 0. Letras diferentes representam diferenças estaticamente significativas e $p<0,05$.

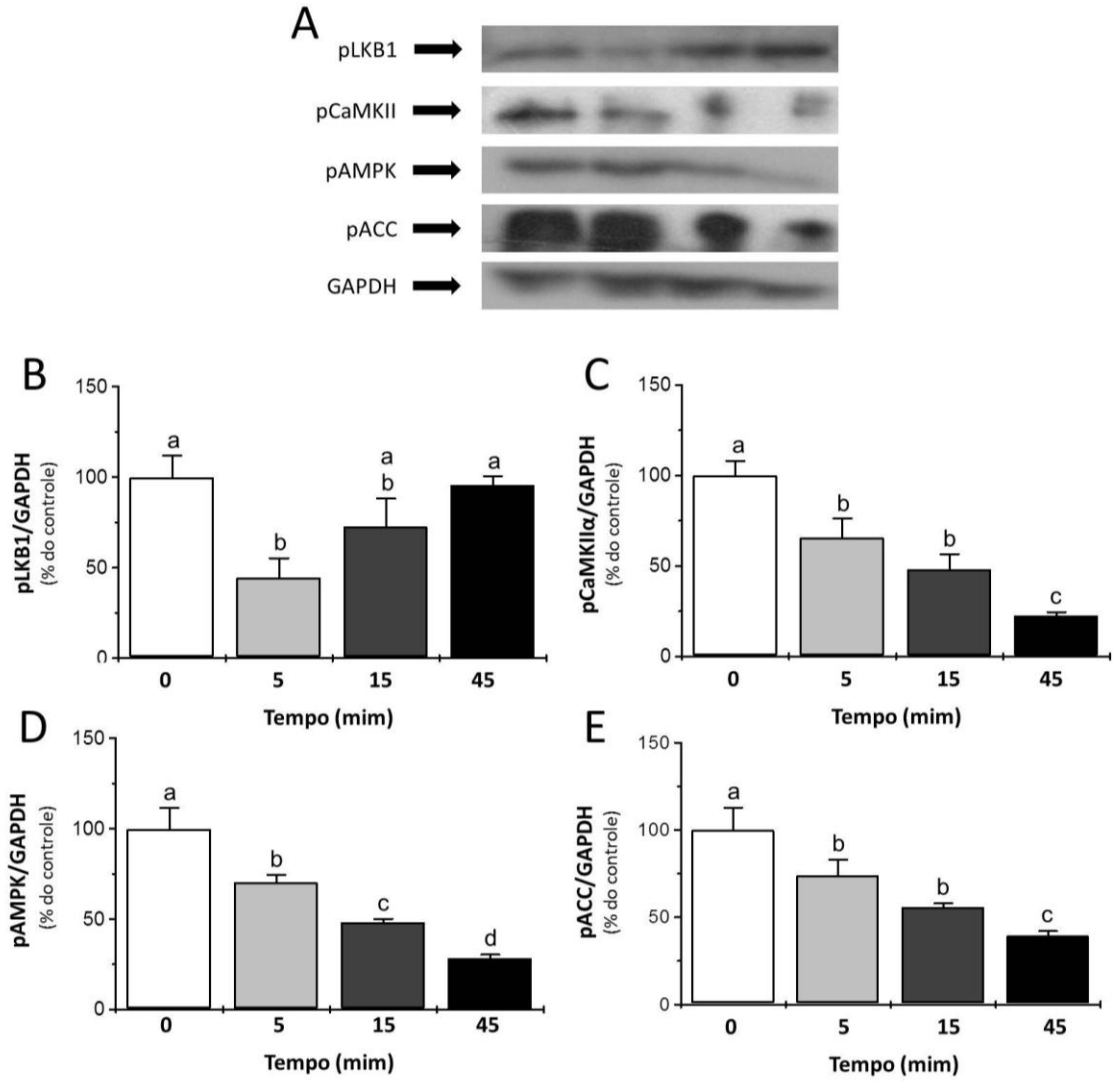

Fig.5 – **Ensaio de fosforilação *in vivo*** – Análise da fosforilação das proteínas envolvidas na via da AMPK em camundongos Swiss neonatos após 0, 5, 15 e 45 min da injeção intraperitoneal de 0,1mg/kg de CNTF. As proteínas foram avaliadas por Wester blot, com a utilização de anti-corpos específicos (ver métodos). **(A)** Imagens representativas dos níveis protéicos das proteínas pLKB1, pCaMKII, pAMPK, pACC, e GAPDH. **(B)** Fosforilação da LKB1 (pLKB1/GAPDH). **(C)** Fosforilação da CaMKII (pCaMKII/GAPDH). **(D)** Fosforilação da AMPK (pAMPK/GAPDH). **(E)** Fosforilação da ACC (pACC/GAPDH). Os resultados são apresentados em % do tempo 0. Letras diferentes representam diferenças estaticamente significativas e $p<0,05$.

A Aloxana e a IL-1β são agentes diabetogênicos que promovem a morte de células beta pancreáticas por mecanismos distintos. A Aloxana, depois de entrar na célula beta via transportador GLUT2, gera espécies reativas de oxigênio (51), aumento da expressão de iNOS e conseqüente produção de NO (52) e, aumento do influxo de cálcio, este último por mecanismos ainda desconhecidos (51; 52). A IL-1β, ao se ligar no seu receptor na membrana celular, induz uma cascata de sinalização que culmina na ativação de NFkB, clivagem de caspases efetoras e, finalmente, fragmentação de DNA (6).

É descrito na literatura que a AMPK desempenha função importante na morte de células beta, induzida por IL-1β, visto que em células beta que tiveram a AMPK inibida a IL-1β falhou em provocar apoptose, sendo que quando a AMPK estava constitutivamente ativa a apoptose, induzida por IL-1β, foi maior em comparação com as células controle. Esses resultados mostram que a AMPK modula alguns processos envolvidos na morte celular induzida por citocinas (10).

Sabe-se que a Aloxana promove um desequilíbrio no estado redox celular especialmente nas células secretoras de insulina. A Aloxana aumenta a produção de iNOS, promovendo uma cascata de sinalização que irá culminar na morte celular (52). Interessante notar que a AMPK também modula a expressão de iNOS nas células de modo geral e que, portanto, pode interferir com a morte celular (50; 53).

Diante dessas informações e sabendo-se que o que o CNTF protege ilhotas pancreáticas contra morte celular induzida por apoptose (22) e, considerando-se que o CNTF reduz a ativação da via da AMPK em células beta MIN6 (Fig.4A-E) e em ilhotas de camundongos (Fig.5A-E), nossa próxima abordagem foi estudar os mecanismos envolvidos nesses processos. Para isso, avaliamos em células MIN6 controle e em MIN6 que tiveram a AMPK reduzida (AMPK-kd) se: (a) a AMPK está envolvida na apoptose de células beta MIN6 induzida por Aloxana e por IL-1β, (b) o CNTF protege as células beta MIN6 da apoptose induzida por Aloxana e por IL-1β e: (c) esses efeitos estão, de alguma forma, relacionados à redução da ativação da via da AMPK pelo CNTF.

Para melhor desenvolvimento dos experimentos, optamos em produzir células MIN6 com uma diminuição na expressão proteica da AMPK. Para obter essas células MIN6 AMPK-kd fizemos uso de um RNA de interferência para a AMPK que se mostrou ser eficiente e específico, pois reduziu em aproximadamente 70% a expressão da AMPK (Fig.06) em comparação com o controle, com o veículo e com o *Scramble*.

Os resultados mostraram que o CNTF diminuiu a fosforilação da AMPK (Figs.7D/H), através da redução da fosforilação da CaMKII (Figs.8C/F) e não por um efeito direto na ativação da LKB1 (Figs.8B/E) em células MIN6 Controle e AMPK-kd. Por outro lado, a Aloxana aumentou a fosforilação da CaMKII (Fig.8C), da LKB1 (Fig.8B) e, conseqüentemente, da AMPK (Fig.7D). A IL-1β, por sua vez, não alterou a atividade da CaMKII (Fig.8F) mas, aumentou a fosforilação da LKB1 (Fig.8E), e da AMPK (Fig.7H). O CNTF, por sua vez, preveniu o aumento da fosforilação da CaMKII (Fig.8F) e da LKB1 (Fig.8E), induzido por Aloxana, bem como o aumento da fosforilação da LKB1 (Fig.8E), induzido por IL-1β, tanto em células controle quanto em células AMPK-kd. Finalmente, o CNTF preveniu o aumento da fosforilação de AMPK, induzido por Aloxana (Fig.7D) e IL-1β (Fig.7H), apenas em células controle.

Com base nos resultados obtidos com as proteínas *upstream* à AMPK (LKB1 e CaMKII) e com a própria AMPK já descritos acima, avaliamos a fosforilação da ACC, um substrato chave na cascata de sinalização da AMPK. Sabe-se que a AMPK inativa, por fosforilação, a ACC promovendo maior fluxo de substrato para a β-oxidação mitocondrial e, com isso, o aumento nas concentrações intracelulares de ATP. Os níveis de fosforilação da ACC foram reduzidos pelo CNTF em células controle (Figs.9B/D). Por outro lado, Aloxana (Fig.9B) e IL-1β (Fig.9D) aumentaram a fosforilação da ACC. Este aumento foi prevenido pelo CNTF (Figs.9B/D). Os níveis da fosforilação da ACC em células AMPK-kd foram semelhantes entre as diferentes condições experimentais, entretanto, menores em comparação com as células controle (Figs.9B/D).

Esses resultados mostram que o CNTF, a exemplo do que ocorreu com exposição aguda, reduziu a atividade de proteínas ativadoras da via da AMPK em um tempo prolongado e impediu o aumento da atividade dessas proteínas pelos agentes diabetogênico Aloxana e IL-1β, sugerindo que: (a) o efeito protetor do CNTF pode ser via AMPK, (b) o fato da IL-1β depender da AMPK para gerar morte celular pode estar relacionado com a LKB1 (10), e (c) a morte celular provocada pela Aloxana pode estar relacionada com o aumento do influxo de Ca^{2+} e conseqüente ativação da via CaMKII-AMPK (51).

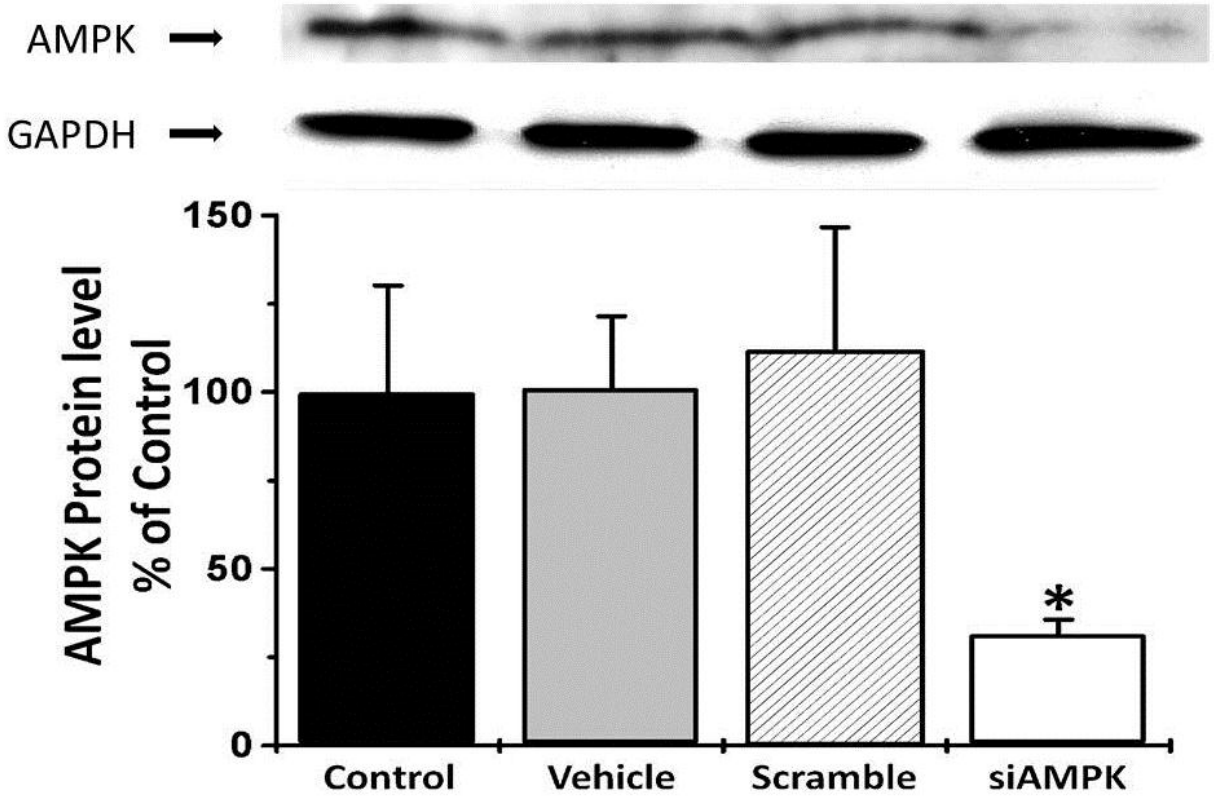

Fig.6 – **Validação de um modelo de inibição da AMPK**. Foram semeadas 2.10^5 células MIN6 em cada poço de uma placa de seis poços. Posteriormente, as células foram incubadas por 24 h em meio RPMI contendo 10% de SFB. A seguir, as células foram lavadas com 1 ml de meio RPMI sem antibiótico e sem SFB. Após a lavagem, foram adicionados 1 ml de meio RPMI sem antibiótico e sem SFB contendo 5µl de *lipofectamina* e 200nM de siRNA específico para a AMPK ou 200nM de siSCRAMBLE e, após 6 horas, foi acrescido 1 ml de meio contendo duas vezes a concentração de antibiótico e 20% de SFB. Depois de 24 horas as células foram incubadas com as condições experimentais. Protocolo desenvolvido segundo as especificações do fabricante. Os resultados estão expressos em % do Controle. As concentrações da AMPK foram avaliadas por Western Blotting. *$p<0,05$

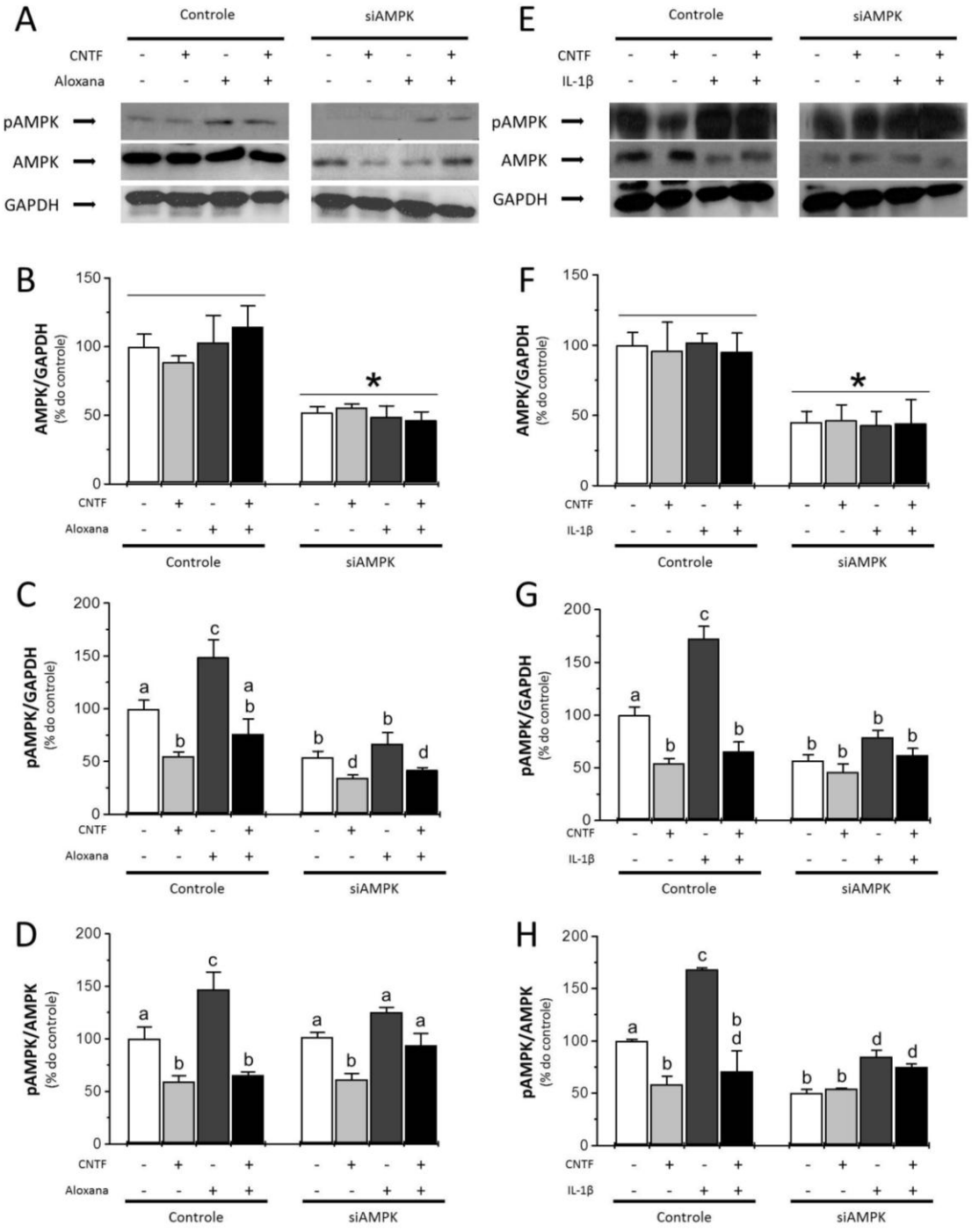

Fig.7 – **Expressão Proteica da AMPK e pAMPK** – Análise da fosforilação da AMPK em Células MIN6 com ou sem a inibição da AMPK, expostas por 24 h a 10 nM de Aloxana ou 10 ng/ml de IL-1β com ou sem pré-tratamento por 3 dias com 1 nM de CNTF. As proteínas foram avaliadas por Wester blot, com a utilização de anti-corpos específicos (ver métodos). **(A)** Imagens representativas das proteínas AMPK, pAMPK e GAPDH. **(B)** Níveis de AMPK total (AMPK/GAPDH). **(C)** Níveis de AMPK fosforilada (pAMPK/GAPDH**). (D)** Fosforilação da AMPK (pAMPK/AMPK). **(E)** Níveis das proteínas AMPK, pAMPK e GAPDH. **(F)** Níveis de AMPK total (AMPK/GAPDH). **(G)** Níveis de AMPK fosforilada (pAMPK/GAPDH). **(H)** Fosforilação da AMPK (pAMPK/AMPK). Os resultados estão apresentados em % do Controle. Letras diferentes representam diferenças estaticamente significativas. *Controle *vs* AMPK-kd. p<0,05.

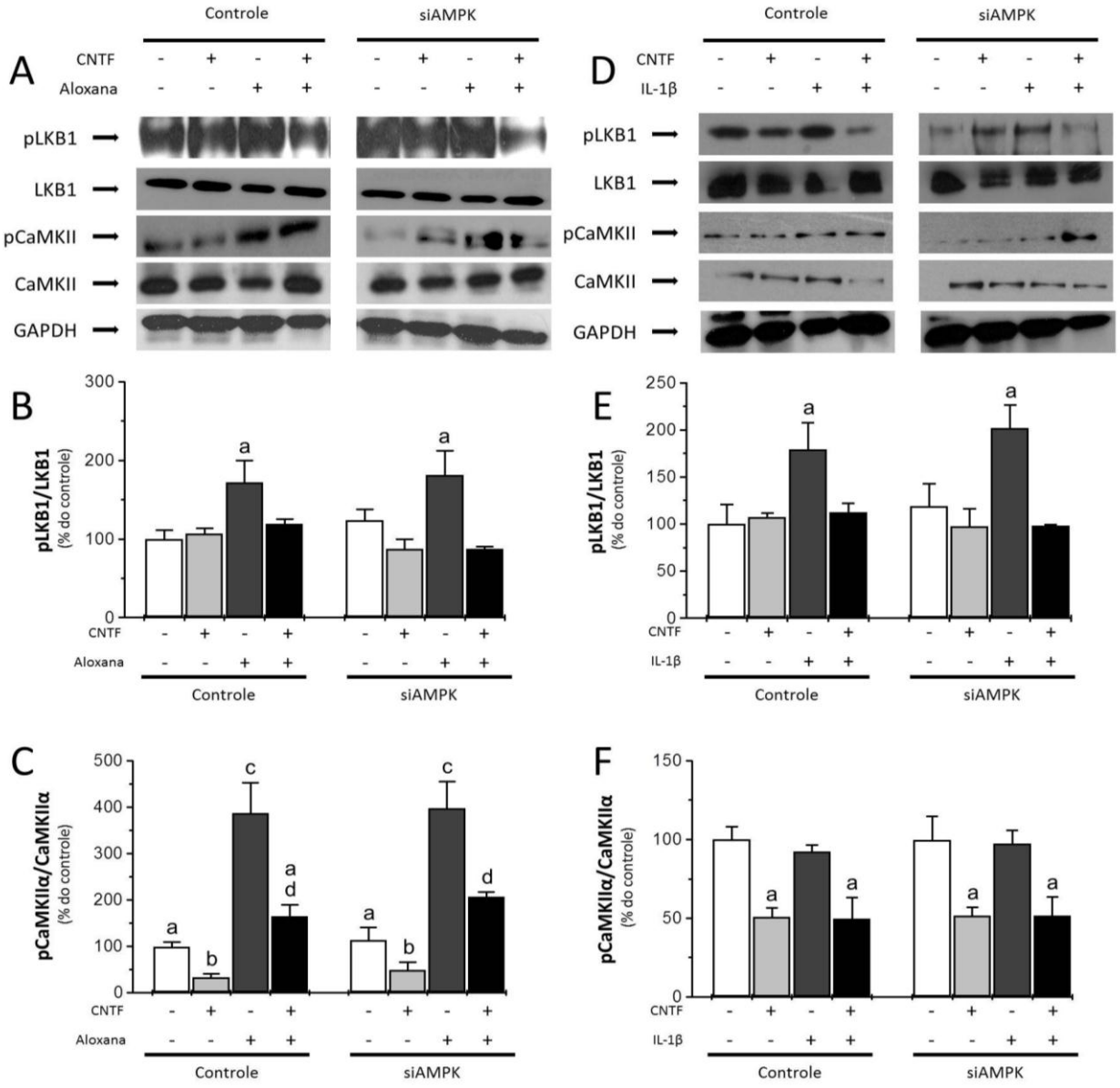

Fig.8 – **Fosforilação da LKB1 e CaMKII** – Análise da fosforilação da LKB1 e CaMKII em Células MIN6 com ou sem a inibição da AMPK, expostas por 24 h a 10 nM de Aloxana ou 10 ng/ml de IL-1β com ou sem pré-tratamento de 3 dias com 1 nM de CNTF. As proteínas foram avaliadas por Wester blot, com a utilização de anti-corpos específicos (ver métodos) **(A)** Imagens representativas das proteínas LKB1, pLKB1, CaMKII, pCaMKII e GAPDH. **(B)** Fosforilação da LKB1 (pLKB1/LKB1). **(C)** Fosforilação da CaMKII (pCaMKII/CaMKII). **(D)** Imagens representativas das proteínas LKB1, pLKB1, CaMKII, pCaMKII e GAPDH. **(E)** Fosforilação da LKB1 (pLKB1/LKB1). **(F)** Fosforilação da CaMKII (pCaMKII/CaMKII). Os resultados estão apresentados em % do Controle. Letras diferentes representam diferenças estaticamente significativas e $p<0,05$.

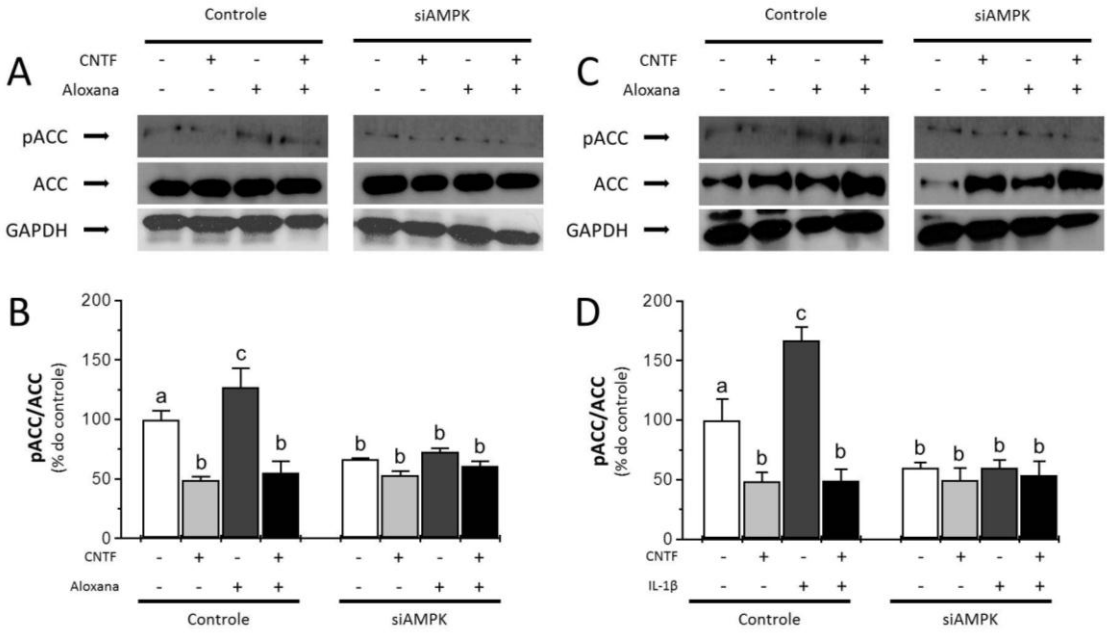

Fig.9 – **Fosforilação da ACC** – Análise da fosforilação da ACC em Células MIN6 com ou sem a inibição da AMPK, expostas por 24 h a 10 nM de Aloxana ou 10ng/ml de IL-1β com ou sem pré-tratamento de 3 dias com 1nM de CNTF. As proteínas foram avaliadas por Wester blot, com a utilização de anti-corpos específicos (ver métodos) **(A)** Imagens representativas das proteínas ACC total e sua forma fosforilada e da GAPDH. **(B)** Fosforilação da ACC (pACC/ACC). **(C)** Imagens representativas das proteínas ACC total e sua forma fosforilada e da GAPDH. **(D)** Fosforilação da ACC (pACC/ACC). Os resultados estão apresentados em % do Controle. Letras diferentes representam diferenças estaticamente significativas e $p<0,05$.

Além de analisar os efeitos do CNTF, da Aloxana e da IL-1β sobre a expressão e fosforilação das proteínas AMPK, LKB1, CaMKII e ACC, investigamos também os efeitos do CNTF, da Aloxana e da combinação de ambos sobre as concentrações do mRNA dessas proteínas, e verificamos que o CNTF e a Aloxana não alteraram os níveis de mRNA das proteínas AMPK (Fig.10C), LKB1 (Fig.10A), ACC (Fig.10D). No entanto, observamos que a Aloxana aumentou os níveis de mRNA da CaMKIIα e que o CNTF preveniu, parcialmente, esse efeito (Fig.10B). Observamos também uma redução nos níveis de mRNA da AMPK nas células AMPK-kd em relação às células controle (Fig.10C).

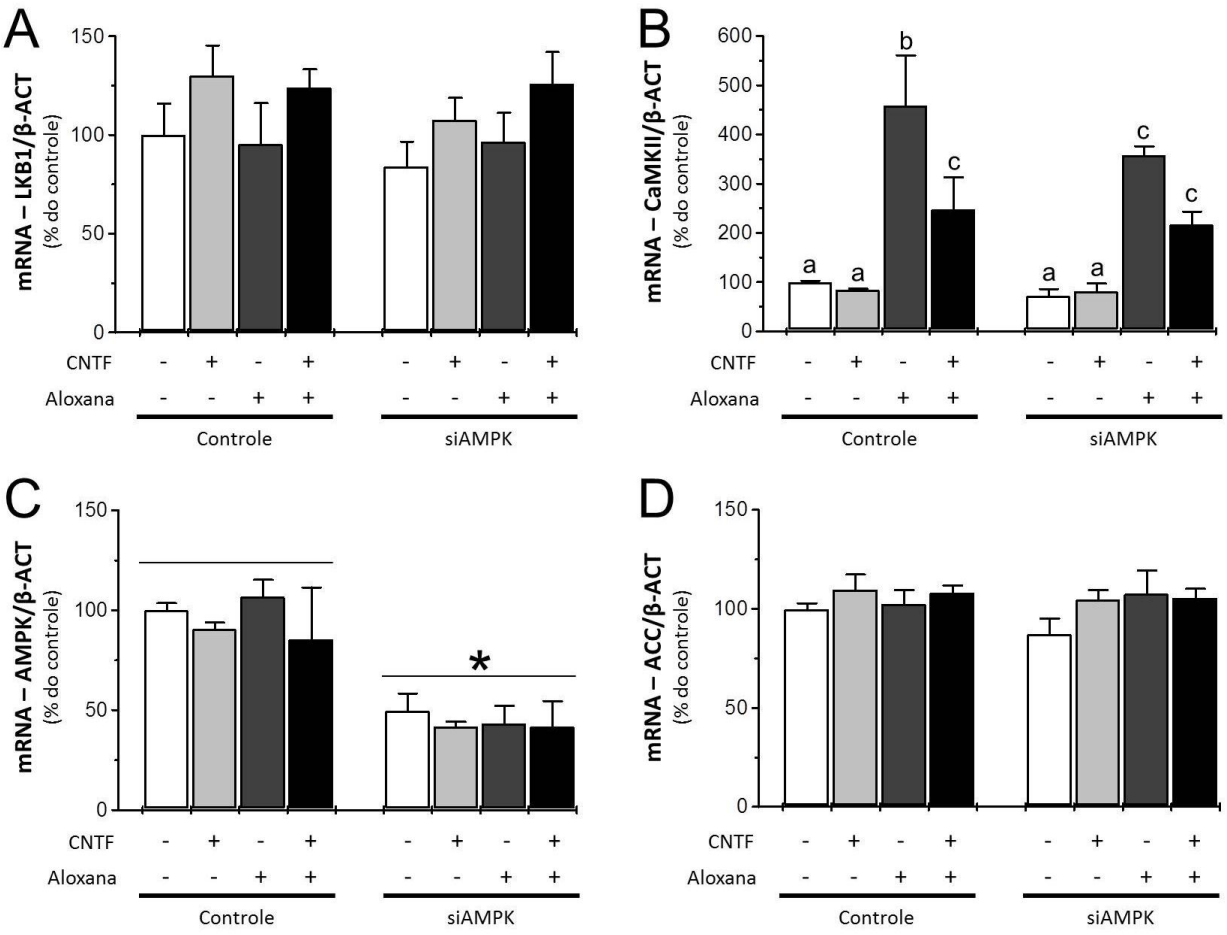

Fig.10 – **Concentração de RNA mensageiro da LKB1, CaMKII, AMPK e ACC**. Níveis de mRNA da LKB1, CaMKII, AMPK e ACC em células MIN6 Controle ou AMPK-kd (200 uM de siRNA para AMPK), expostas por 24 h a 10 nM de Aloxana ou 10 ng/ml de IL-1β com ou sem 1nM de CNTF mensurado através do Real Time RT-PCR. **(A)** Níveis de mRNA da LKB1 (LKB1/β-act). **(B)** Níveis de mRNA da CaMKII (CaMKII/β-act). **(C)** Níveis de mRNA da AMPK (AMPK/β-act). **(D)** Níveis de mRNA da ACC (ACC/β-act). Os valores foram normalizados pelo controle interno β-act e estão expressos em % do Controle. Letras diferentes representam diferenças estaticamente significativas. *Controle *vs* AMPK-kd. p<0,01.

Visto que a Aloxana aumenta a expressão da iNOS e que a AMPK é capaz de modular essa expressão, analisamos também os níveis de iNOS em células MIN6 controle e AMPK-kd tratadas com CNTF e/ou Aloxana. Observamos que o CNTF diminuiu em aproximadamente 40% os níveis de mRNA da iNOS, enquanto a Aloxana aumentou essa expressão em 15 vezes (Fig.11). Ainda, o CNTF preveniu a ação da Aloxana sobre a expressão de iNOS (Fig.11), sugerindo que essa citocina protege as células beta contra o estresse nitrosilativo reduzindo a morte celular por Aloxana. A expressão de iNOS se mostrou menor nas células AMPK-kd para todos as condições experimentais em comparação com as células MIN6 Controle (Fig.11),

evidenciando, mais uma vez, a importância da AMPK no aumento da expressão de iNOS e, possivelmente, na produção de NO e morte celular. Além disso, o aumento na expressão de iNOS induzido por Aloxana foi menor nas células AMPK-kd (Fig.11), indicando a participação da AMPK na indução de expressão de iNOS por Aloxana. Finalmente, em células AMPK-kd o efeito protetor do CNTF contra o aumento da expressão de iNOS foi inibido, confirmando que a ativação de AMPK é importante para seus efeitos anti-apoptóticos em células beta.

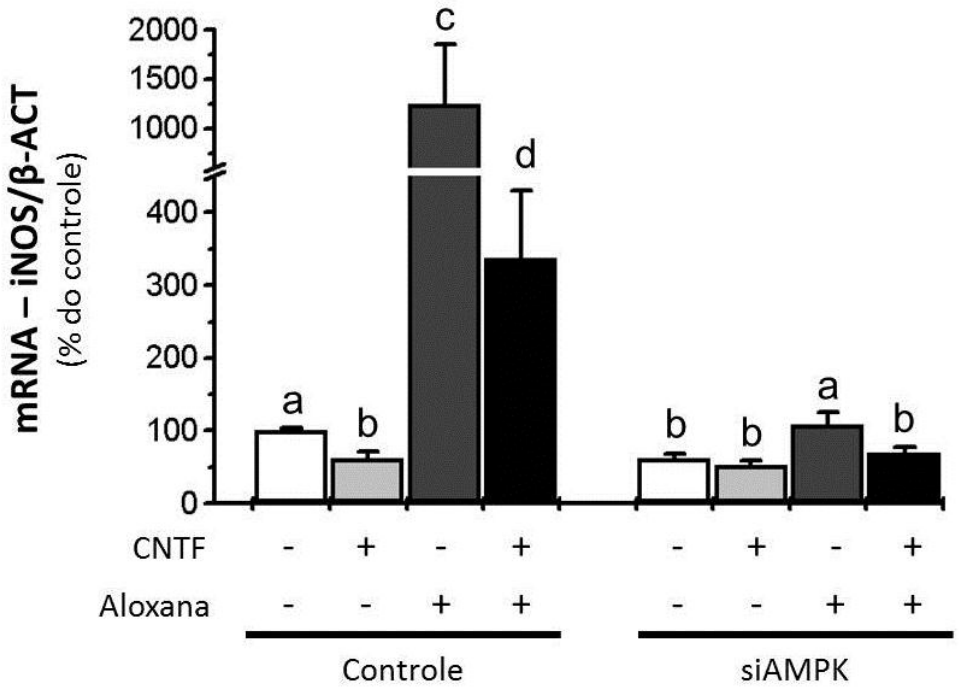

Fig.11 – **Concentração de RNA mensageiro da iNOS**. Níveis de mRNA da iNOS (iNOS/β-act) em células MIN6 Controle ou AMPK-kd (200 uM de siRNA para AMPK), expostas por 24 h a 10 nM de Aloxana ou 10 ng/ml de IL-1β com ou sem 1nM de CNTF mensurados através do Real Time RT-PCR. Os resultados estão apresentados em % do Controle. Letras diferentes representam diferenças estaticamente significativas e $p<0,01$.

Considerando que o CNTF é capaz de: (a) promover *downregulation* na via da AMPK, (b) reverter o aumento da via da AMPK induzido por Aloxana e IL-1β e, (c) prevenir o aumento de iNOS induzido por Aloxana, decidimos verificar parâmetros relacionados à apoptose, como clivagem de caspase-3 e fragmentação de DNA em células MIN6 controle e AMPK-kd expostas à Aloxana a IL-1β, com ou sem um pré-tratamento com CNTF.

Observamos que em células MIN6 controle o CNTF diminuiu, em aproximadamente 60%, a clivagem da caspase-3 (Fig.11B/D). Por outro lado, Aloxana e IL-1β aumentaram a

clivagem da caspase-3 em 150% (Fig.11B) e 100% (Fig.11D), respectivamente. Ainda, o efeito da Aloxana e da IL-1β no aumento de clivagem de caspase-3 em células MIN6 foi anulado pelo CNTF (Fig.11B/D), mostrando que seu efeito protetor, observado em ilhotas pancreáticas (22), também foi presente em células MIN6. Com esses resultados podemos concluir que o CNTF promove, em células MIN6, uma proteção contra a morte celular induzida por Aloxana e por IL-1β, diminuindo a clivagem de caspase-3.

Quando a AMPK foi parcialmente inibida pelo siAMPK o aumento da clivagem de caspase-3, induzida por Aloxana e por IL-1β, foi menor em comparação com o controle (Fig.11B/D). Nessas células, o efeito do CNTF na diminuição da clivagem de caspase-3 e na proteção contra a morte celular, induzidas pelos agentes citados acima, foi significativamente menor em comparação com as células Controle (Fig.B/D). Esses resultados sugerem que a indução da morte celular pela Aloxana e IL-1β bem como o efeito protetor do CNTF dependem da via da AMPK.

Aloxana e IL-1β aumentaram em 17 e 4,5 vezes, respectivamente, a fragmentação de DNA (Figs.11C e 11F) em células MIN6 controle. O CNTF preveniu a ação desses dois agente diabetogênicos (Figs.11C/F) mostrando, mais uma vez, que o CNTF protege essas células contra a morte celular induzida por Aloxana e IL-1β. Em células AMPK-kd, os efeitos da Aloxana e da IL-1β na fragmentação de DNA foi menor quando comparado com células Controle (Figs.11C/F), mostrando que tanto a Aloxana quanto a IL-1β promovem morte celular através da ativação da via da AMPK. Nas células AMPK-kd não observamos o efeito protetor do CNTF contra a morte celular induzida por Aloxana e por IL-1β, o que nos permite concluir que esse efeito protetor é dependente da via AMPK.

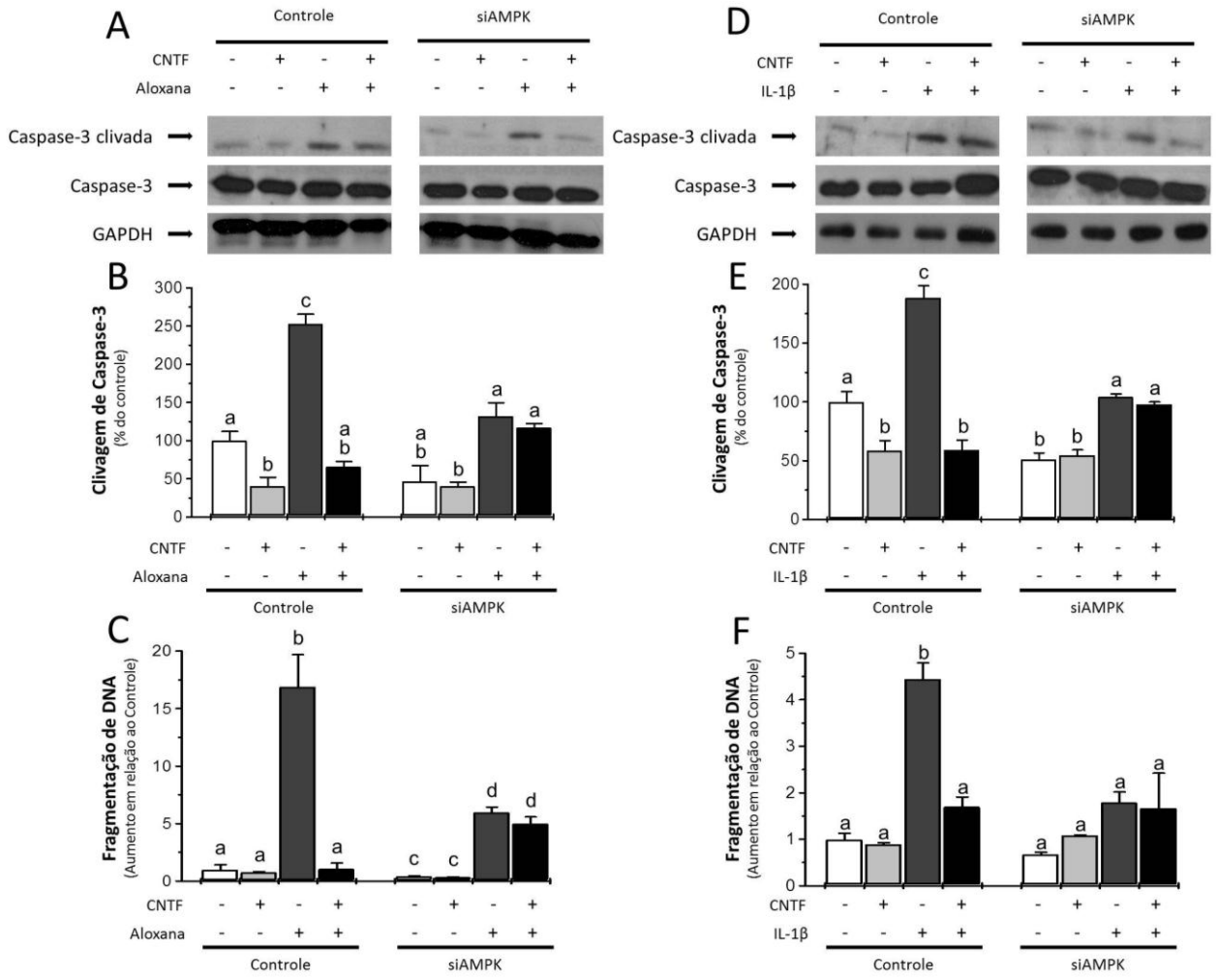

Fig.12 – **Clivagem de Caspase-3 e Fragmentação de DNA.** Níveis de clivagem de Caspase-3 e fragmentação de DNA Células MIN6 com ou sem a inibição da AMPK, expostas por 24 h a 10 nM de Aloxana ou 10ng/ml de IL-1β com ou sem pré-tratamento de 3 dias com 1nM de CNTF. **(A)** Figuras representativas dos níveis proteicos da Caspase-3 total e clivada e GAPDH. **(B)** Clivagem de Caspase-3 (Caspase-3 clivada/total) **(C)** Fragmentação de DNA (DNA fragmentado/total) **(D)** Figuras representativas dos níveis protéicos da Caspase-3 total e clivada e GAPDH **(E)** Clivagem de Caspase-3 (Caspase-3 clivada/total) **(F)** Fragmentação de DNA (DNA fragmentado/total. Resultados da Clivagem de Caspase-3 apresentado em % do Controle. Resultados da Fragmentação de DNA apresentado em aumento do controle. Letras diferentes representam diferenças estaticamente significativas e $p<0,05$.

CONCLUSÕES

Com bases nesses resultados podemos concluir que:

1. O CNTF modula a via da AMPK, visto que em células beta tumorais MIN6 e em ilhotas isoladas de camundongos neonatos, o CNTF reduziu a fosforilação da AMPK e da ACC através, principalmente, da redução da fosforilação da CaMKII;
2. A morte de células MIN6 induzida por Aloxana depende da ativação da via da AMPK pela CaMKII, enquanto a morte de células MIN6 induzidas por IL-1β depende da ativação da AMPK pela LKB1;
3. O CNTF protegeu as células MIN6 contra a morte celular induzida por Aloxana e por IL-1β através da inibição da via CaMKII-AMPK-iNOS;
4. O efeito protetor do CNTF contra a morte celular induzida por Aloxana e IL1β depende da inibição via da AMPK, uma vez que esse efeito não foi observada nas células AMPK-kd. Além disso, esse efeito parece ser independente da relação AMP/ATP, visto que o controle da via da AMPK pela CaMKII independe dessa relação e que o CNTF atua através da redução da CaMKII;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boschero A: Acoplamento da estimulaçã-secreção de insulina pelas células B pancreáticas., Arquivos Brasileiros de Endocrinologia, 1996, p. 149-155

2. Zhao W, Alkon D: Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol* 177:125-134, 2001

3. Baumgartner-Parzer S, Waldhäusl W: The endothelium as a metabolic and endocrine organ: its relation with insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 Suppl 2:S166-179, 2001

4. Gerbitz K, van den Ouweland J, Maassen J, Jaksch M: Mitochondrial diabetes mellitus: a review. *Biochim Biophys Acta* 1271:253-260, 1995

5. Nagata M, Yokono K, Hayakawa M, Kawase Y, Hatamori N, Ogawa W, Yonezawa K, Shii K, Baba S: Destruction of pancreatic islet cells by cytotoxic T lymphocytes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 143:1155-1162, 1989

6. Delaney C, Pavlovic D, Hoorens A, Pipeleers D, Eizirik D: Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* 138:2610-2614, 1997

7. Mauricio D, Mandrup-Poulsen T: Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes* 47:1537-1543, 1998

8. Cnop M, Welsh N, Jonas J, Jörns A, Lenzen S, Eizirik D: Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2:S97-107, 2005

9. Eizirik D, Mandrup-Poulsen T: A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44:2115-2133, 2001

10. Riboulet-Chavey A, Diraison F, Siew L, Wong F, Rutter G: Inhibition of AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from cytokine-mediated apoptosis and CD8+ T-cell-induced cytotoxicity. *Diabetes* 57:415-423, 2008

11. Zhang H, Ollinger K, Brunk U: Insulinoma cells in culture show pronounced sensitivity to alloxan-induced oxidative stress. *Diabetologia* 38:635-641, 1995

12. Callard RE: Cytokine regulation of B-cell growth and differentiation. *Br Med Bull* 45:371-388, 1989

13. Smith G, Rabinovsky E, McManaman J, Shine H: Temporal and spatial expression of ciliary neurotrophic factor after peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 121:239-247, 1993

14. Schulz-Key S, Hofmann H, Beisenherz-Huss C, Barbisch C, Kirsch M: Ciliary neurotrophic factor as a transient negative regulator of rod development in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3099-3108, 2002

15. Kirsch M, Lee M, Meyer V, Wiese A, Hofmann H: Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells. *J Neurochem* 68:979-990, 1997

16. Febbraio M: gp130 receptor ligands as potential therapeutic targets for obesity. *J Clin Invest* 117:841-849, 2007

17. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T: Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86:1243-1254, 1995

18. Fantuzzi G, Benigni F, Sironi M, Conni M, Carelli M, Cantoni L, Shapiro L, Dinarello C, Sipe J, Ghezzi P: Ciliary neurotrophic factor (CNTF) induces serum amyloid A, hypoglycaemia and anorexia, and potentiates IL-1 induced corticosterone and IL-6 production in mice. *Cytokine* 7:150-156, 1995

19. Steinberg G, Watt M, Fam B, Proietto J, Andrikopoulos S, Allen A, Febbraio M, Kemp B: Ciliary neurotrophic factor suppresses hypothalamic AMP-kinase signaling in leptin-resistant obese mice. *Endocrinology* 147:3906-3914, 2006

20. Watt M, Dzamko N, Thomas W, Rose-John S, Ernst M, Carling D, Kemp B, Febbraio M, Steinberg G: CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat Med* 12:541-548, 2006

21. Steinberg G, Watt M, Ernst M, Birnbaum M, Kemp B, Jørgensen S: Ciliary neurotrophic factor stimulates muscle glucose uptake by a PI3-kinase-dependent pathway that is impaired with obesity. *Diabetes* 58:829-839, 2009

22. Rezende L, Stoppiglia L, Souza K, Negro A, Langone F, Boschero A: Ciliary neurotrophic factor promotes survival of neonatal rat islets via the BCL-2 anti-apoptotic pathway. *J Endocrinol* 195:157-165, 2007

23. Rezende L, Vieira A, Negro A, Langone F, Boschero A: Ciliary neurotrophic factor (CNTF) signals through STAT3-SOCS3 pathway and protects rat pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis. *Cytokine* 46:65-71, 2009

24. Hardie D, Carling D: The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246:259-273, 1997

25. Steinberg G, Kemp B: AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 89:1025-1078, 2009

26. Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, Andreelli F: Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci* 14:3380-3400, 2009

27. Viollet B, Athea Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, Bertrand L: AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci* 14:19-44, 2009

28. Hardie D: The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117:5479-5487, 2004

29. Jansen M, Ten Klooster J, Offerhaus G, Clevers H: LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. *Physiol Rev* 89:777-798, 2009

30. Ropelle ER, Pauli JR, Carvalheira JBC: Efeitos Moluculares do exercício físico sobre as vias de ação insulínica., 2005

31. Hardie D, Scott J, Pan D, Hudson E: Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 546:113-120, 2003

32. Misra P, Chakrabarti R: The role of AMP kinase in diabetes. 2007

33. Benatti FB, Júnior AHL: Leptina e exercício físico aeróbio: implicações da adiposidade corporal e insulina., Rev Bras Med Esporte, 2007

34. Thomson DM, Brown JD, Fillmore N, Condon BM, Kim HJ, Barrow JR, Winder WW: LKB1 and the regulation of malonyl-CoA and fatty acid oxidation in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1572-1579, 2007

35. Rubink DS, Winder WW: Effect of phosphorylation by AMP-activated protein kinase on palmitoyl-CoA inhibition of skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase. *J Appl Physiol* 98:1221-1227, 2005

36. Winder W, Hardie D: AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 277:E1-10, 1999

37. Shulman G, Rothman D, Jue T, Stein P, DeFronzo R, Shulman R: Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med* 322:223-228, 1990

38. Daval M, Foufelle F, Ferré P: Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol* 574:55-62, 2006

39. Sandler S, Bendtzen K, Eizirik D, Welsh M: Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 126:1288-1294, 1990

40. Southern C, Schulster D, Green I: Inhibition of insulin secretion from rat islets of Langerhans by interleukin-6. An effect distinct from that of interleukin-1. *Biochem J* 272:243-245, 1990

41. Polak M, Scharfmann R, Seilheimer B, Eisenbarth G, Dressler D, Verma I, Potter H: Nerve growth factor induces neuron-like differentiation of an insulin-secreting pancreatic beta cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5781-5785, 1993

42. Sundler F, Böttcher K, Eizirik DL, Welsh M: Inhibition of insulin secretion from rat islet of Langerhans by interleukin-6 - IN: *The Endocrine Pancreas.*, New York Raven Press, 1991

43. Sleeman M, Garcia K, Liu R, Murray J, Malinova L, Moncrieffe M, Yancopoulos G, Wiegand S: Ciliary neurotrophic factor improves diabetic parameters and hepatic steatosis and increases basal metabolic rate in db/db mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14297-14302, 2003

44. Wadt K, Larsen C, Andersen H, Nielsen K, Karlsen A, Mandrup-Poulsen T: Ciliary neurotrophic factor potentiates the beta-cell inhibitory effect of IL-1beta in rat pancreatic islets associated with increased nitric oxide synthesis and increased expression of inducible nitric oxide synthase. *Diabetes* 47:1602-1608, 1998

45. Rutter G, Da Silva Xavier G, Leclerc I: Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homoeostasis. *Biochem J* 375:1-16, 2003

46. Leclerc I, Rutter G: AMP-activated protein kinase: a new beta-cell glucose sensor?: Regulation by amino acids and calcium ions. *Diabetes* 53 Suppl 3:S67-74, 2004

47. Ryu G, Lee M, Lee E, Ko S, Ahn Y, Kim J, Yoon K, Song K: Activation of AMP-activated protein kinase mediates acute and severe hypoxic injury to pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 386:356-362, 2009

48. Gugliucci A: "Blinding" of AMP-dependent kinase by methylglyoxal: a mechanism that allows perpetuation of hepatic insulin resistance? *Med Hypotheses* 73:921-924, 2009

49. Cai X, Chen L, Li L, Feng M, Li X, Zhang K, Rong Y, Hu X, Zhang M, Zhang Y, Zhang M: Adiponectin inhibits lipopolysaccharide-induced adventitial fibroblast migration and transition to myofibroblasts via AdipoR1-AMPK-iNOS pathway. *Mol Endocrinol* 24:218-228, 2010

50. Łabuzek K, Liber S, Gabryel B, Okopień B: AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside) increases the production of toxic molecules and affects the profile of cytokines release in LPS-stimulated rat primary microglial cultures. *Neurotoxicology* 31:134-146, 2010

51. Lenzen S: The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51:216-226, 2008

52. Szkudelski T: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:537-546, 2001

53. Cai X, Li C, Chen L, Rong Y, Zhang Y, Zhang M: A hypothesis: adiponectin mediates anti-atherosclerosis via adventitia-AMPK-iNOS pathway. *Med Hypotheses* 70:1044-1047, 2008

DECLARAÇÃO

Eu, **Gustavo Jorge dos Santos**, RA 084765 declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado intitulada **"A inibição da via da AMPK pelo CNTF promove sobrevivência de células MIN6"**

( ) 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* :

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp, sob Protocolo nº: **1749-1**

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

Aluno:

Orientador:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
(X) Deferido ( ) Indeferido

Nome:
Função:

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP