# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

# INSTITUTO DE BIOLOGIA

Carolina Prado de França Carvalho

# 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.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) thado de trance arente e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato

Campinas, 2009

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

C253p	Carvalho, Carolina Prado de França Papel da comunicação intercelular mediada pelas junções comunicantes no mecanismo de secreção de insulina em modelos <i>in vivo</i> de maturação e disfunção do pâncreas endócrino / Carolina Prado de França Carvalho Campinas, SP: [s.n.], 2009.				
	Orientadora: Carla Beatriz Collares-Buzato. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.				
	<ol> <li>Pâncreas endócrino.</li> <li>Maturação.</li> <li>Células beta pancreáticas.</li> <li>Junções comunicantes (Biologia celular).</li> <li>Insulina – Secreção.</li> <li>Collares-Buzato, Carla Beatriz.</li> <li>Universidade Estadual de Campinas.</li> <li>Instituto de Biologia.</li> <li>Título.</li> </ol>				
	(rcdt/ib)				

**Título em inglês:** Intercellular communication mediated by gap junctions in *in vivo* models of pancreatic B-cell maturation and dysfunction.

Palavras-chave em inglês: Endocrine pancreas; Maturation; Pancreatic beta cells; Gap junctions (Cell biology); Insulin - Secretion.

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Carla Beatriz Collares-Buzato, Maria Lúcia Zaidan Dagli, Eliana Pereira de Araújo, Paulo Pinto Joazeiro, Kleber Luiz de Araújo e Souza.

Data da defesa: 06/03/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 06 de março de 2009.

#### BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato (Orientadora)

Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli

Profa. Dra. Eliana Pereira de Araújo

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Prof. Dr. Kléber Luiz de Araújo e Souza

Profa. Dra. Maria Esméria Corezola do Amaral

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Profa. Dra. Ivanira José Bechara

ssinatura 2 6 au m De. 41 Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

"Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui. Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes. Assim como em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive."

Fernando Pessoa

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que renova todos os dias as nossas forças e esperanças para que possamos lutar por nossos objetivos.

Agradeço e dedico a meus pais e minha irmã não só essa tese, mas também, todas as minhas conquistas, passadas, presentes e futuras, porque, certamente, sem o amor, o carinho e o apoio que eles me dão tudo teria sido muito mais difícil.

Agradeço também a minha orientadora Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato, pela generosidade em compartilhar ensinamentos e experiências ao longo de todos esses anos de convivência agradável; pela atenção, paciência e consideração a mim dedicadas, mostrando-se presente até mesmo nesse último ano em que, por um período, o oceano nos separava...

Agradeço àquelas que são verdadeiros anjos para mim, me socorrendo nas horas de dificuldade e pela grande amizade, de hoje e sempre: Junia, Marta Leonardo ("Marmi") e Gisele Orlandi.

Agradeço aos meus amigos e "braços" solidários e prestativos no laboratório, Ricardo e Carlinha, que infelizmente não trabalha mais no laboratório.

Agradeço aos amigos do laboratório da professora Maria Alice por todo o tempo de companheirismo e amizade: Catarina, Karina, Thalita, Paulo e Stefânia.

Agradeço às minhas amigas da "velha-guarda": Luciana, Érika, Juliana Minardi, Elisa, Ângela e os amigos queridos da turma de graduação 98N.

Agradeço às inestimáveis colaborações do Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero e da Profa. Dra. Helena Coutinho F. de Oliveira pelo suporte dado a esse trabalho e a todos os alunos e amigos do Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo, em especial a alguns que me ajudaram diretamente, como a Heleninha, o Gabriel, a Emerielle (Leli), a Maria Lúcia, a Priscila, a Marise e o Léscio.

Da mesma forma agradeço a todos os professores do departamento de Histologia e Embriologia, por nunca me negarem qualquer tipo de ajuda e por abrirem as portas de seus laboratórios e permitirem o uso de seus equipamentos. Aos alunos e amigos do Departamento de Histologia e Embriologia, Petra, Patrick, Dedé, Dee Dee, Carla Có, Patrícia, Karina, Júlio, Claudinha, Eliana, Renata, Juares, Marlúcia, Denner, Sílvio, Marília, Mariana, Aline, Bia e Paula pelo coleguismo e convívio respeitoso e amigável.

Agradeço a todos os funcionários do departamento de Histologia e Embriologia (Juvani, D.Raquel, Baltazar e Ritinha), por tudo que sempre fizeram por mim.

Ao Professor Paolo Meda (University of Geneva, Medical School) que tornou real a possibilidade de fazer um estágio de doutoramento no exterior me recebendo em seu laboratório. Agradeço também o pessoal do laboratório de lá pelo apoio e amizade: Anne Charollais, José Cancela, Dorothèe Caille, Aurore Britain, Sabine Bavamian, Eva Tudurí, Daniel Martins e Yang Liu.

Agradeço também aos professores integrantes da banca examinadora dessa tese, pela cuidadosa leitura e análise desse exemplar, bem como, às sugestões e críticas construtivas feitas para o enriquecimento desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, e em especial à querida Liliam, por toda atenção, dedicação e paciência, sempre resolvendo todas as questões com muita eficiência e desenvoltura.

Agradeço a todos que torceram por mim, assim como, a todos aqueles que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho e que porventura eu tenha esquecido de citar o nome.

AGRADEÇO A CAPES, AO CNPq E A FAPESP PELO APOIO FINANCEIRO CONCEDIDO.

#### **Resumo**

O objetivo central dessa tese foi estudar o papel das junções comunicantes (GJs) no processo de maturação da célula B e na patogênese da diabetes tipo 2. Para isso, foram utilizados dois modelos animais. No modelo *in vivo* de maturação da célula B e do processo secretório de insulina foram empregados ratos em vários estágios do desenvolvimento (fetal, neonatal, jovem e adulto). No modelo de diabetes tipo 2 foram utilizados camundongos C57BL/6, *wild-type* e *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLR 7), alimentados com dieta hiperlipídica.

No primeiro modelo de estudo, observamos, por técnicas morfológicas (imunocitoquímica) e de biologia molecular (Western Blot, RT-PCR semi-quantitativo e qPCR) que a expressão gênica e protéica de Cx36 e Cx43, se altera durante o desenvolvimento. Os dados de microinjeção intracelular de traçadores confirmam tais resultados que sugerem que ilhotas de ratos recém-nascidos apresentam menor número de canais intercelulares associados à membrana e, conseqüentemente, um menor acoplamento intercelular mediado pelas junções comunicantes em comparação às ilhotas de adultos. Esses resultados estão de acordo com a observação de que a célula B durante o período perinatal mostra uma menor resposta secretória à glicose e sugerem a participação da comunicação intercelular mediada pelas junções comunicantes no processo de maturação da célula B.

No caso do modelo in vivo de diabetes tipo 2, o estudo iniciou com a caracterização do quadro metabólico e de aspectos da morfologia e morfometria do pâncreas endócrino de animais submetidos ao tratamento com a dieta hiperlipídica. Os dados obtidos demonstram que os animais submetidos a essa dieta por um curto período de tempo já apresentam alterações metabólicas típicas da fase inicial da diabetes (hiperglicemia moderada, hiperinsulinemia, intolerância á glicose e resistência à insulina), bem como modificações de parâmetros da morfometria do pâncreas endócrino. Posteriormente, foi analisada a expressão e localização celular das proteínas juncionais (Cx36, Cx43 e ZO-1) e o aspecto funcional dos canais formados pela GJ, através da microinjeção de marcadores intracelulares. Observamos que os animais tratados com dieta hiperlipídica apresentam tendência de diminuição de expressão de Cx36 acompanhada por alteração no padrão de marcação para essa proteína. Esses dados estão de acordo os de microinjeção que revelam uma pequena diminuição do grau de acoplamento celular após o tratamento com a dieta hiperlipídica. As alterações observadas para Cx36 foram acompanhadas por modificações no grau de expressão e de localização celular de ZO-1, proteína envolvida em processos como a organização dos canais intercelulares da GJ na membrana e no turnover de vários subtipos de conexina. Esses resultados indicam que a comunicação intercelular, particularmente a mediada por canais formados pela Cx36 parecem desempenhar importante papel na patogênese da diabetes tipo 2, desde sua fase inicial.

#### ABSTRACT

Intercellular communication and adhesion among pancreatic B-cells are crucial for a proper insulin biosynthesis and secretion. The aim of this work was to investigate the role of gap junction (GJ) mediated-intercellular communication in the processes of maturation and dysfunction of B-cells.

It is well known that fetal and neonatal rat pancreatic B-cells exhibit a reduced insulin secretory response to glucose and to other secretagogues as compared to adult ones. Based on this finding, we have used Wistar rats at different stages of development (fetal, neonatal, young and adult) as a model of B-cell maturation. As a model of type 2 diabetes, C57BL/6 mice (wild-type) and LDL receptor-deficient mice were fed a high fat diet up to 60 days.

The cellular expression of GJ connexin (Cx) subtypes found in the endocrine pancreas (Cx36, Cx43 and Cx45) was assessed by immunohistochemistry, Western Blot, quantitative and semi-quantitative RT-PCR. Our results indicate that *young* and adult endocrine pancreas express relatively high levels of Cx36 on B-cells in comparison with the other groups. Meanwhile, fetal and neonatal islets express predominantly Cx43 on non B-cells located at the islet periphery. Islet microinjection of GJ tracers revealed that neonatal B-cells display lower intercellular exchange of the cationic molecule Ethidium Bromide (EB) in comparison with the adult ones, which is in accordance with their differences in Cx36 expression. No significant differences were found in expression and localization of Cx45 among all animal groups.

Regarding the animal type 2 diabetic model, a metabolic characterization showed that the high-fat diet for 60 days induces glucose intolerance, insulin resistance, hyperinsulinemia and moderate hyperglycemia in both mice groups (LDLr knockout and wild-type groups). High-fat fed mice showed a subtle decrease in Cx36 islet expression and in the B-cell intercellular exchange of EB in comparison with the chow-fed group (control). We also observed an alteration in the pattern of Cx36 labeling in immunohistochemistry assays. The high-fat diet induced a redistribution of Cx36 within the islets from a disorganized pattern (more commonly seen in control mice) to a sub domain-pattern where Cx36 plaques demarcate groups of B-cells. These changes in Cx36 islet distribution observed in high-fat fed mice were accompanied by a similar pattern of immunolabeling for ZO-1, but an increase in its islet expression, a tight junctional protein that seem to be involved in Cx turnover and membrane organization of Cx-made channels.

Taken all together, these findings suggest that cell-cell coupling mediated by GJ may play an important role in the pancreatic B-cell maturation observed during endocrine pancreas development as well as in the early stages of type 2 diabetes pathogenesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

## Cx: Conexina

- GJ: Gap Junction (Junção Comunicante)
- GTT: Teste de Tolerância à Glicose
- ITT: Teste de Tolerância à Insulina

LDL: Low Density Lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)

LDLR: Receptor de LDL

**R0:** Camundongo C57 *knockout* para o receptor de LDL (camundongo LDLR<sup>7/</sup>)

R0d: Camundongo C57 knockout para o receptor de LDL alimentado com dieta hiperlipídica

R2: Camundongo C57 *wild-type* 

R2d: Camundongo C57 wild-type alimentado com dieta hiperlipídica

**ZO-1:** zonula occludens-1 (proteína associada à junção de oclusão)

## SUMÁRIO

## CAPÍTULO I

I. Introdução ao tema da tese	1
1. Comunicação Intercelular	1
2. Estrutura e Bioquímica das Junções Comunicantes	1
3. Aspectos Fisiopatológicos das Junções Comunicantes	6
4. Junções Comunicantes e Pâncreas Endócrino	7
5. Modelos de Estudo Empregados	10
II. Objetivos	13
III. Estrutura da Tese	14

## CAPÍTULO II

GAP JUNCTION-MEDIATED CELL-CELL COUPLING AND CONNEXIN EXPRESSION	MATURATION OF
RAT PANCREATIC ISLETS	
Abstract	
Introduction	
Material and Methods	
Results	
Discussion	
References	
Figures and Legends	

## CAPÍTULO III

## 

1. Introdução	45
2. Materiais e Métodos	46
3. Resultados e Discussão	49
4. Figuras e Legendas	54

## CAPÍTULO IV

ESTRUTURA	E FUNÇÃO	da Junção	COMUNICANTE	NO	PÂNCREAS	ENDÓCRINO	EM N	MODELO
ANIMAL DE I	DIABETES TI	PO 2		•••••		••••••	•••••	63

1. Introdução	. 63
2. Materiais e Métodos	. 64
3. Resultados	. 70
4. Discussão	. 72
5. Figuras e Legendas	76

## CAPÍTULO V

CONCLUSÕES	97
------------	----

## CAPÍTULO VI

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .	· · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	100	)
-------------------------------------	--	-----	---

## I. INTRODUÇÃO AO TEMA DA TESE

#### 1. COMUNICAÇÃO INTERCELULAR

A comunicação intercelular é um fenômeno de grande importância para todos os organismos multicelulares e visa coordenar várias atividades celulares, tais como o metabolismo, a diferenciação e o crescimento celular. De modo geral, existem duas formas básicas de comunicação intercelular. A primeira delas envolve a liberação de mediadores químicos no meio extracelular, tais como neurotransmissores, hormônios, e outros fatores ativos. Nesta forma de comunicação intercelular, as células contêm receptores específicos que são capazes de reconhecer tais substâncias. A interação da molécula do mediador químico com o receptor específico desencadeia sinal intracelular, que por sua vez culmina com determinado efeito celular.

Quando mediadores químicos são liberados na corrente sanguínea (hormônios), temos uma **comunicação endócrina**. Neste caso, as células alvo se encontram distantes do sítio de liberação dos mediadores químicos. Entretanto, há outro tipo de comunicação, denominada **comunicação parácrina**, em que as células secretoras dos mediadores químicos encontram-se próximas das células alvo. Se a comunicação ocorre entre um neurônio e uma célula alvo (que pode ser outro neurônio ou também outro tipo celular) e envolve a liberação de mediadores químicos (neurotransmissores) na sinapse (química), a comunicação é denominada **neurócrina**.

A segunda forma de comunicação intercelular ocorre em grupos de células que estão acopladas através das junções comunicantes. Nesse caso, o desencadeamento da resposta celular independe da presença de um receptor e também da liberação de um mediador químico para o meio extracelular. Como veremos a seguir, a "transmissão" do sinal de uma célula para outra ocorre de forma direta, através de canais intercelulares que compõem a estrutura da junção comunicante.

#### 2. ESTRUTURA E BIOQUÍMICA DAS JUNÇÕES COMUNICANTES

A junção comunicante ou *gap junction* (GJ) constitui um tipo de junção intercelular, caracterizada por uma região de contato intercelular reconhecida pela aposição singular das membranas de células vizinhas e a presença de canais intercelulares (Musil, 1994). As junções intercelulares correspondem a especializações da membrana plasmática que interconectam todas as células organizadas em tecidos e/ou órgãos. Além da GJ, as junções intercelulares são formadas por outros três tipos de estruturas: (1) a junção

de oclusão ou *tight junction*, que ao microscópio eletrônico aparece como uma série de sítios de aparente fusão das membranas laterais de células adjacentes; (2) a *zonula* ou *fascie adherens*, região da membrana de ancoragem dos microfilamentos de actina do citoesqueleto; e (3) os desmossomos, sítios da membrana de ancoragem dos filamentos intermediários do citoesqueleto (Collares-Buzato, 2001; Farquhar e Palade, 1963). Estas três últimas junções representam essencialmente dispositivos de adesão intercelular, enquanto que as GJs, como já mencionado na seção anterior, são formadas por canais intercelulares envolvidos com a comunicação intercelular (Collares-Buzato, 2001; Farquhar e Palade, 1963).

Ao microscópio eletrônico de transmissão, a junção comunicante é observada como uma região de aproximação, sem fusão, das membranas adjacentes, delimitando uma fenda intercelular de aproximadamente 30Å de largura. Devido ao seu perfil ultra-estrutural, esse tipo de junção foi denominada *gap junction* (do inglês, *gap*: fenda). Em réplicas de criofratura, suas membranas adjacentes apresentam inúmeras partículas protéicas integrais arranjadas em forma de placa ou disco.

No final da década de setenta, foi isolado, a partir de frações enriquecidas de membrana provenientes de fígado de rato, o principal constituinte protéico da GJ denominado **conexina** 32 (Cx32) (Hertzberg e Gilula, 1979). Desde então, têm sido identificados pelo menos outros 20 membros da família das conexinas (como por exemplo, Cx21, Cx26, Cx31, Cx33, Cx36, Cx40, Cx43, Cx45, Cx50, etc), que diferem entre si pela massa molecular e pelas propriedades de permeabilidade dos canais que formam (Mese et al., 2007; Laird, 2006; Sáez et al., 2003; Musil, 1994). Os diferentes subtipos de conexinas são codificados por vários genes e expressos de forma espécie- e célula-específica, isto é, cada tecido ou célula de uma determinada espécie animal expressa um subtipo ou um conjunto de subtipos de conexinas que lhe é característico (Musil, 1994).

Na GJ, seis moléculas de conexina se arranjam num complexo hexagonal, denominado conexon, que delimita um canal central (Musil, 1994). A junção comunicante resulta da interação de dois conexons, cada um inserido na membrana de duas células adjacentes, com a formação de um canal intercelular hidrofílico que conecta os seus citoplasmas (Figura 1).



**Figura 1:** Representação da estrutura da junção comunicante, mostrando o arranjo hexagonal das conexinas e a interação de dois conexons de células adjacentes. Fonte: Collares-Buzato, 2001.

O canal central formado pela interação dos conexons permite a passagem de íons (como Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>) e moléculas com massa molecular inferior a 1 kDa como monossacarídeos, aminoácidos, nucleotídeos e mensageiros intracelulares, tais como, o inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e o 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).

Diferentes subtipos de conexinas podem estar associados entre si formando diferentes combinações e essa característica influencia de modo significativo as propriedades dos canais formados pelas GJs. São denominados **conexons homoméricos** aqueles que apresentam conexinas do mesmo subtipo em um mesmo conexon. Enquanto que, nos **conexons heteroméricos**, observa-se a presença de diferentes subtipos de conexinas no mesmo conexon. Entretanto, com relação aos canais formados, temos: **canais do tipo homotípico**, quando os conexons das duas células apresentam a mesma constituição, formando dois hemicanais idênticos; ou **canais do tipo heterotípico**: quando os conexons das células adjacentes não apresentam a mesma constituição, formando dois hemicanais distintos (Figura 2) (Mese et al., 2007; Rozental et al., 2000).



**Figura 2:** Representação das combinações possíveis para a formação de diferentes tipos de conexons e canais formados das junções comunicantes (Figura modificada a partir da publicada em Mese et al., 2007).

A permeabilidade desses canais intercelulares é modulada por uma série de fatores que atuam promovendo a sua abertura ou o seu fechamento (Spray, 1994). Dentre esses fatores, podemos destacar: a alteração na voltagem transjuncional, a acidificação do pH citoplasmático, o aumento na concentração intracelular de Ca<sup>+2</sup> e a alteração da atividade de quinases que modificam a permeabilidade dos canais através da fosforilação das conexinas (Sáez et al., 2003; Lampe e Lau, 2000; Giaume e Venance, 1998; Kolb e Somogyi, 1991). Entretanto, a sensibilidade da GJ a esses fatores varia conforme o subtipo de conexina e os tecidos envolvidos.

Estudos realizados em diferentes espécies animais e em linhagens celulares demonstram que as conexinas interagem com proteínas em domínios específicos de sua porção citoplasmática (Hervé et al, 2007). Muitas delas são proteínas integrantes ou associadas aos outros tipos de junções intercelulares ou proteínas componentes do citoesqueleto (Prochnow e Dermietzel, 2008; Hervé et al., 2007; Duffy et al., 2002). A Figura 3 é uma representação esquemática das proteínas integrantes e associadas aos outros tipos de junções intercelulares (junção de oclusão, junção aderente e desmossomos).

Com relação às proteínas da junção de oclusão, são reportadas interações entre conexinas e claudinas, ocludina e também a ZO-1 (Prochnow e Dermietzel, 2008; Hervé et al, 2007; Duffy et al 2002). A interação com a ZO-1 é verificada para alguns subtipos de conexinas e a hipótese vigente sugere um papel importante da ZO-1 na organização, *turnover* e recrutamento de moléculas sinalizadoras que regulam a comunicação intercelular (Hervé et al., 2007; Girao e Pereira 2007; Segretain et al., 2004; Barker et al., 2002). Particularmente no caso da Cx43, trabalhos empregando diferentes tipos celulares (fibroblastos,

células de Sertoli e cardiomiócitos) e linhagens celulares verificaram a interação e/ou a co-localização dessa proteína com a ZO-1(Prochnow e Dermietzel, 2008; Hervé et al., 2007; Duffy et al., 2002; Girao e Pereira 2007; Segretain et al., 2004; Barker et al., 2002). Outros estudos demonstraram a co-localização entre a ZO-1 e a Cx36, em neurônios, linhagens celulares como a HeLa e  $\beta$ TC-3, adrenal e inclusive em ilhotas pancreáticas (Li et al., 2004 a, b).

Com relação à junção aderente, tem sido demonstrado que essa junção exerce papel crucial para a adequada formação, manutenção e função das GJs (Meyer et al., 1992; Jongen et al., 1991; Kanno et al., 1984). Tais estudos verificaram que o uso de anticorpos contra proteínas associadas à junção de adesão (Meyer et al., 1992; Kanno et al., 1984), ou a alteração da expressão gênica de algumas dessas moléculas, como por exemplo, a E-caderina (Jongen et al., 1991), afeta a formação/montagem das GJs e o acoplamento celular mediado por essa junção, comprovado pela inibição da passagem do Lucifer Yellow, substância fluorescente impermeável à membrana plasmática mas que passa por difusão pelos canais intercelulares da GJ.

Adicionalmente, tem sido reportada a interação entre membros da família das cateninas como a  $\beta$ catenina e a Cx43, sugerindo que além do papel estrutural desempenhado por essa proteína ela também possa modular a expressão gênica dessa conexina, como verificado em cardiomiócitos (Ai et al., 2000) e na linhagem de células epiteliais renais MDCK (Simcha et al., 1998).



**Figura 3:** Representação esquemática das proteínas integrantes e associadas às junções intercelulares constituintes do complexo unitivo (junção de oclusão, junção aderente e desmossomos) e suas interações com componentes do citoesqueleto. Fonte: Collares-Buzato, 2001.

#### 3. ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DAS JUNÇÕES COMUNICANTES

Evidências têm apontado um importante papel para as GJs em vários processos celulares, como a manutenção da homeostasia celular, controle da proliferação e da diferenciação celular (Musil, 1994). Também tem sido demonstrada a importância dessas junções durante o desenvolvimento embrionário, no qual as GJs constituem canais através dos quais morfógenos são transferidos, contribuindo assim para o processo morfogenético (Leclerc, 1994).

Em tecidos excitáveis, os canais da GJ parecem funcionar como canais de K<sup>+</sup>, mediando tanto a sincronização elétrica quanto a rápida condução do impulso nervoso pela sinapse elétrica no sistema nervoso central, assim como a propagação da onda de contração cardíaca, permitindo o batimento sincrônico e rítmico do coração (Rozental et al., 2000; Spray, 1994). Nesse sentido, a disfunção da junção comunicante no músculo cardíaco, tem sido associada a algumas cardiopatias, tal como a Doença de Chagas (Campos de Carvalho et al., 1992) e arritmias cardíacas (Tribulová et al., 2008).

Nas células do cristalino, as GJs funcionam como canais através dos quais metabólitos são trocados livremente entre as células acopladas. Como o aporte de nutrientes para as células localizadas mais centralmente no cristalino é baixo, o acoplamento metabólico entre as suas células possibilita o fornecimento de nutrientes por toda a sua extensão. Dessa forma, o comprometimento das GJs no cristalino tem sido associado a alguns tipos de catarata congênita (Baruch et al., 2001).

Nas células de Schwann, as GJs formam canais "reflexivos" (que conectam diferentes regiões da mesma célula) que também permitem a passagem de pequenos metabólitos e mensageiros intracelulares, promovendo a troca de nutrientes necessária entre a região perinuclear da célula e seus prolongamentos citoplasmáticos (Collares-Buzato, 2001). A disfunção desses canais, formados pela Cx32, na célula de Schwann está implicada na etiologia da doença de Charcot-Marie-Tooth ligada ao cromossomo X, uma neuropatia periférica humana (Ressot e Bruzzone, 2000; Spray e Dermietzel, 1995).

No músculo liso e células secretoras de glândulas exócrinas e endócrinas, as GJs funcionam primariamente como canais de Ca<sup>+2</sup> e de outros mensageiros intracelulares, colaborando para uma ativação simultânea ou coordenada das células nesses tecidos durante a contração muscular e o processo de secreção, respectivamente (Meda, 1996, 1993; Spray, 1994).

#### 4. JUNÇÕES COMUNICANTES E PÂNCREAS ENDÓCRINO

O pâncreas endócrino é constituído por quatro tipos celulares com função endócrina: as células B ou  $\beta$ , secretoras de insulina; as células A ou  $\alpha$ , secretoras de glucagon, as células D ou  $\delta$ , secretoras de somatostatina e as células PP ou F, que secretam o polipeptídeo pancreático (Orci, 1976; Orci e Unger, 1975). A proporção e distribuição desses tipos celulares nas ilhotas pancreáticas são discretamente diferentes dependendo da espécie animal. No caso de ilhotas de ratos adultos, as proporções aproximadas de cada tipo celular em relação ao volume total da ilhota são: 60-70% de células B, 20-25% de células A, 5-10% de células D e < 1% de células PP (Genuth, 1998).

Os principais produtos de secreção das ilhotas pancreáticas são os hormônios insulina e glucagon, que atuam coordenando o fluxo e o destino metabólico da glicose endógena, bem como, indiretamente, dos ácidos graxos livres, dos aminoácidos e de outros substratos, atendendo assim as necessidades energéticas do organismo. Como a insulina é o único hormônio produzido pelo organismo com ação hipoglicemiante, deficiências na secreção deste hormônio ou na resposta dos tecidos à ação da insulina acarretam no desenvolvimento de uma doença crônica e potencialmente fatal denominada diabetes mellitus.

Fisiologicamente, a secreção da insulina é estimulada ou inibida por uma série de fatores. Os estudos sobre a estimulação da secreção em resposta a glicose recebem destaque, dada a importância dessa molécula no metabolismo e seu efeito agudo e estimulatório sobre a secreção de insulina. Como exemplos de outros fatores estimuladores, temos: aminoácidos, potássio, ácidos graxos livres, gliceraldeído, cetoácidos, glucagon, acetilcolina, entre outros (Genuth, 1998; Mendonça et al., 1998).

O padrão bifásico de secreção de insulina em resposta a glicose, como o apresentado por ilhotas de animais adultos, envolve pelo menos duas vias sinalizadoras, a via dependente de canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e uma via menos estudada, denominada via independente de canais de  $K_{ATP}$  (Straub e Sharp, 2002; Komatsu et al., 1997). De modo resumido, os principais eventos envolvidos com a via dependente de canais de  $K_{ATP}$  são:

- Entrada da glicose no interior da célula através da difusão facilitada pelo transportador específico GLUT-2;
- Aumento da concentração intracelular de ATP, da relação ATP/ADP e das concentrações de NADH, NADPH e H<sup>+</sup> promovido pelo metabolismo ou oxidação da glicose a piruvato;
- Fechamento dos canais de K<sub>ATP</sub> em resposta ao aumento da relação ATP/ADP, causando supressão do efluxo de K<sup>+</sup> proveniente da célula B e conseqüente despolarização da membrana da célula;
- Abertura de canais de Ca<sup>+2</sup> sensíveis à voltagem, que promovem a entrada e o aumento da concentração citoplasmática desse íon na célula;
- Ativação dos mecanismos envolvidos com a exocitose dos grânulos secretórios devido à elevada concentração de Ca<sup>+2</sup> intracelular, [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>.

Nesse contexto, os canais intercelulares das junções comunicantes atuam "transmitindo" o aumento citossólico de Ca<sup>+2</sup>, desencadeado pelo metabolismo intracelular da glicose de uma célula B a outra, contribuindo assim, para sincronizar e otimizar a resposta secretória de insulina em função do tipo e intensidade do estímulo (Calabrese et al., 2003; Jonkers et al., 1999). Além disso, a comunicação

intercelular via GJ também é importante para balancear (diminuir e/ou corrigir) a heterogeneidade das células B, que diferem com relação à biossíntese e resposta secretória de insulina a secretagogos, permitindo que diferentes subpopulações de células B tenham respostas funcionais semelhantes (Nlend Nlend et al., 2006; Meda, 1997).

Várias evidências têm indicado a importância do acoplamento das células B no controle da secreção de insulina. Células B das ilhotas pancreáticas, quando isoladas, mostram comprometimento da resposta secretória estimulada e diminuição na biossíntese de insulina (Halban et al., 1982; Pipeleers et al., 1982). Entretanto, quando os contatos celulares entre as células B são restabelecidos, ocorre pronta recuperação dessas funções (Halban et al., 1982). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a estimulação da liberação da insulina pela glicose e outros secretagogos está associada a um aumento no acoplamento das células B (Meda et al., 1991, 1979). Em contraste, condições experimentais que inibem a secreção de insulina resultam em diminuição ou bloqueio do acoplamento entre células B, enquanto o bloqueio farmacológico das GJs altera a função secretória das células B (Meda et al., 1990, 1983).

Tem sido demonstrada a presença de dois principais subtipos de conexinas em ilhotas pancreáticas de roedores: a conexina 43 e a conexina 36. Dentre elas, a Cx43 tem sido a mais estudada nesse tecido e sua expressão parece estar relacionada com um maior acoplamento intercelular no pâncreas endócrino, como verificado em alguns estudos *in vitro* (Vozzi et al., 1995; Meda et al., 1991).

Entretanto, estudos posteriores revelaram que a Cx36 é a principal proteína formadora dos canais estabelecidos entre as células B das ilhotas (Serre-Beinier et al., 2000). Este subtipo de conexina foi originalmente identificado em neurônios e pode ser expresso por outras células do sistema nervoso central e retina (Sohl et al., 1998). No pâncreas endócrino, um papel central para essa conexina tem sido sugerido pela observação de que o nível de expressão da Cx36 correlaciona-se com o grau da resposta secretora de insulina à glicose das células B *in vitro* (Leite, 2002; Serre-Beinier et al., 2000).

Além das conexinas já citadas (Cx36 e Cx43), a Cx45, outro subtipo de conexina, foi também detectado no pâncreas endócrino (Serre-Beinier et al., 2000; Meda et al., 1993). Entretanto, um recente estudo utilizando animais transgênicos em que se substituiu a região codificadora para Cx45 por um gene repórter, permitiu a localização exata dessa conexina em células musculares lisas de vasos de pequeno calibre dentro da ilhota (Theis et al., 2004).

Trabalhos têm demonstrado nas linhagens de células B, MIN6 e INS-1E, que 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.

Trabalhos preliminares já haviam demonstrado que grupos de células B apresentam oscilações de  $[Ca^{+2}]_i$ mais regulares, de maior amplitude e freqüência, em comparação a células B isoladas (Jonkers et al., 1999; Gilon e Henquin, 1995; Gylfe et al., 1991). Jonkers et al. (1999) realizaram experimentos em que grupos de células B foram expostos ao heptanol, agente amplamente utilizado como bloqueador das GJs. O tratamento com o heptanol resultou em diminuição da amplitude das oscilações de  $[Ca^{+2}]_i$  induzidas pela glicose, o que os levou a sugerir que as junções comunicantes devam desempenhar importante papel na coordenação desse aumento oscilatório de  $[Ca^{+2}]_i$  induzido pela glicose.

Posteriormente, Calabrese et al. (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, entre células B adjacentes.

Além da importância da junção comunicante para a função do pâncreas endócrino, em especial a da célula B, 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). Trabalhos com a linhagem de células B MIN6 mostram uma correlação direta entre o grau a expressão de E-caderina, proteína associada à junção aderente, e a secreção de insulina induzida pela glicose (Lilla et al., 2003; Hauge-Evans et al., 1999). Bernard-Kargar e colaboradores também verificaram essa correlação entre o grau de expressão de outra proteína associada à junção aderente, a N-CAM e a secreção de insulina induzida pela glicose em células B isoladas de ilhotas de ratos adultos.

#### 5. MODELOS DE ESTUDO EMPREGADOS

Apesar de existirem na literatura vários estudos *in vivo* e *in vitro* que investigaram o papel das junções comunicantes na função endócrina do pâncreas, particularmente na da célula B, ainda é limitado o conhecimento sobre a participação do processo de comunicação intercelular, mediado por essas junções, em modelos de maturação do mecanismo de secreção de insulina e de disfunção do pâncreas endócrino que ocorre na diabetes tipo 2.

Nesse contexto, surgiu o interesse em investigar a importância das junções comunicantes em modelos *in vivo* de maturação do processo secretório de insulina sob condições normais e de comprometimento progressivo do processo de secreção de insulina que ocorre durante a patogênese da diabetes tipo 2. No modelo de maturação *in vivo* do processo secretório de insulina foram utilizados ratos Wistar em diferentes estágios do desenvolvimento, enquanto que, no modelo *in vivo* de comprometimento progressivo do processo secretório de insulina objetivou-se induzir um quadro de diabetes tipo 2 através da administração de dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/6 e C57BL/6 LDLR <sup>-/-</sup> (animais *knockout* para receptor de LDL).

Nas seções subseqüentes, apresenta-se uma breve introdução acerca dos modelos de estudo utilizados nessa tese.

#### 5.1 MODELO DE MATURAÇÃO IN VIVO DO PROCESSO SECRETÓRIO DE INSULINA

As ilhotas de fetos e recém-nascidos de roedores exibem uma reduzida resposta secretória de insulina à glicose e a outros secretagogos em comparação com ilhotas de animais adultos (Mendonça et al., 1998; Boschero et al., 1988). Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa deficiência não estão totalmente esclarecidos.

Evidências mostram que, durante a fase fetal e nos estágios iniciais da vida neonatal, a resposta secretória de insulina à glicose e o influxo de Ca<sup>+2</sup> são deficitários em relação aos observados na fase adulta. Ainda, o padrão bifásico de secreção não é encontrado no período perinatal. Essas características só passam a ser observadas a partir do 3º dia após o nascimento (Black et al., 1994; Fletcher e Ways, 1991; Hole et al., 1988). A secreção bifásica de insulina depende do desenvolvimento de sistemas de amplificação como o dependente da isoforma da proteína quinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ), que por sua vez, só é detectada nas células B de ilhotas de ratos recém-nascidos apenas a partir do 3º dia de vida (Fletcher e Ways, 1991).

A resposta secretória de insulina diminuída em ratos recém-nascidos também pode ser atribuída ao comportamento alterado dos canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP ( $K^+_{ATP}$ ); à imaturidade da membrana plasmática, que não se despolariza de modo suficiente e também ao número reduzido de canais de Ca<sup>+2</sup> e/ou a resposta reduzida dos mesmos à estimulação pela glicose, resultando assim, em um influxo e acúmulo de Ca<sup>+2</sup> reduzidos no citoplasma (Mendonça et al., 1998; Boschero et al., 1993, 1992; Black et al., 1994, Hole et al., 1988).

Entretanto, experimentos *in vitro* demonstram que ilhotas de ratos recém-nascidos cultivadas por tempo prolongado apresentam melhora (ou aumento) da secreção de insulina em resposta à estimulação à glicose (Leite et al., 2005; Collares-Buzato et al., 2004, 2001; Crepaldi et al., 1997). Concomitantemente a esse processo de maturação da maquinaria secretória de insulina, observado *in vitro*, ocorre um aumento

na expressão de algumas proteínas associadas às junções, comunicante, aderente e de oclusão nas células das ilhotas pancreáticas (Leite et al., 2005; Collares-Buzato et al., 2004, 2001).

Apesar desses estudos *in vitro* de certa forma mimetizarem a maturação das células B e da secreção de insulina observadas *in vivo*, consideramos relevante a elucidação de possíveis mecanismos, que estejam diretamente relacionados com esse processo *in vivo*. Além disso, é importante salientar que o papel da GJ no processo de maturação *in vivo* não foi ainda investigado.

# 5.2 MODELO *IN VIVO* DO COMPROMETIMENTO PROGRESSIVO DO PROCESSO SECRETÓRIO DE INSULINA

Dados da literatura revelam que camundongos C57BL/6 desenvolvem um estado de diabetes melittus não dependente de insulina (tipo 2) como resultado da ingestão de ração com alto teor de lipídios (Shafrir et al., 1999; Winzell e Ahrén, 2004; Surwitt et al., 1988; De Souza et al., 2005). A administração de dieta hiperlipídica por um período que varia do relativamente curto ao prolongado (de algumas semanas a meses) induz nestes animais uma moderada hiperglicemia (jejum e pós-prandial) e hiperinsulinemia, caracterizando um quadro de intolerância à glicose e resistência periférica à insulina típico da diabetes tipo 2.

Dentre as várias linhagens de camundongos, a linhagem C57BL/6J parece ser a mais sensível à dieta, devido possivelmente a uma pré-disposição genética (Surwitt et al., 1988). Por se tratar de uma linhagem altamente *"inbred"*, os camundongos C57BL/6J parecem possuir uma vulnerabilidade metabólica que quando desafiada por dieta ou outras manipulações resulta em obesidade e severo distúrbio da homeostase glicêmica.

Outra linhagem de animais utilizada em estudos relacionados com administração de dieta hiperlipidica é a de animais *knockout* para receptor de LDL (C57BL/6 LDLR<sup>-</sup>/), animais naturalmente hipercolesterolêmicos devido à manipulação genética (Ishibashi et al., 1993). Entretanto, o intuito desses trabalhos foi o de investigar o processo de ateroesclerose associado à resistência periféria à insulina, à diabetes tipo 2 e à obesidade (Drolet et al., 2006; Merat et al., 1999).

Tendo em vista que estudos voltados para a investigação da repercussão da ingestão de dieta hiperlipídica na função pancreática endócrina de animais LDLR *knockout* são escassos na literatura, nos pareceu interessante utilizá-los em nosso trabalho e também estabelecer comparações da resposta desses animais com a dos animais C57BL/6 (*wild-type*) após a administração de tal dieta. O envolvimento da GJ na patogênese da diabetes tipo 2 empregando tal modelo não tem sido diretamente estudada.

## **II. OBJETIVOS**

O objetivo geral dessa tese foi investigar a importância do acoplamento celular mediado pelas junções comunicantes na função endócrina das células B, utilizando para isso modelos animais que se diferenciam quanto ao grau de secreção de insulina:

- modelo de maturação *in vivo* do processo secretório: utilizou ratos Wistar em vários estágios do desenvolvimento (fetal, neonatal, jovem e adulto);
- modelo de comprometimento progressivo do processo secretório: utilizou-se um modelo de diabetes tipo 2 em camundongos C57BL/6 normais, e animais da mesma linhagem *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLR <sup>7</sup>) alimentados com dieta hiperlipídica por 30 ou 60 dias;

No intuito de solucionar a problemática proposta, investigou-se o grau de expressão protéica e gênica, bem como a distribuição celular dos principais subtipos de conexinas identificados no pâncreas endócrino: Cx36, Cx43 e Cx45. Para isso, foram utilizados métodos morfológicos (histotécnica, imunocitoquímica) e de biologia molecular (*immunoblot*, RT-PCR semi-quantitativo e qPCR). Além disso, avaliamos o aspecto funcional dos canais constituídos por esses subtipos de conexinas através da técnica de microinjeção de traçadores em células de ilhotas isoladas de animais de grupos representativos para os dois modelos animais.

## III. ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está estruturada em seis capítulos. O presente capítulo apresenta uma introdução geral ao tema central da tese que é a junção comunicante, aqui estudada em modelos *in vivo* de maturação e disfunção da secreção de insulina pelo pâncreas endócrino de ratos e camundongos, respectivamente. Os resultados obtidos foram organizados nos três capítulos subseqüentes e os dois últimos capítulos trazem, respectivamente, as conclusões gerais obtidas com o desenvolvimento dessa tese (Capítulo V) e a lista de referências bibliográficas (Capítulo VI) utilizadas nos capítulos I, III e IV.

Os resultados referentes ao modelo de maturação *in vivo* do processo secretório de insulina estão estruturados em forma de artigo científico (Capítulo II). Os dados relacionados com o estudo do papel da junção comunicante na patogênese da diabetes tipo 2 estão reunidos nos Capítulos III e IV.

O Capítulo III apresenta os resultados que caracterizam o modelo de diabetes tipo 2 aqui utilizado. Para tal, foram analisados parâmetros metabólicos, funcionais e morfométricos do pâncreas endócrino de camundongos C57BL/6 (*wild-type*) e LDLR<sup>-/-</sup> (*knockout* para receptor de LDL) alimentados por 30 ou 60 dias com dieta hiperlipídica. Já no Capítulo IV apresentamos os dados referentes à estrutura e função da junção comunicante nesse modelo de diabetes tipo 2.

# GAP JUNCTION-MEDIATED CELL-CELL COUPLING AND CONNEXIN EXPRESSION DURING MATURATION OF RAT PANCREATIC ISLETS.

#### ABSTRACT

Cell coupling mediated by gap junctions (GJ) contributes to an appropriate insulin secretion in the endocrine pancreas. The aim of this work was to investigate the cellular expression and localization of gap junction-associated proteins (Cx36, Cx43 and Cx45) in pancreatic islets from rats of different ages (fetus, newborn, young and adult) that display different degree of maturation of the insulin secretory machinery. By Western Blot and immunohistochemistry, we found no significant differences in expression and localization of Cx45 among all animal groups. The Cx45 immunostaining in endocrine pancreas was restricted to intra-islet capillaries and the exocrine pancreas. For the other subtypes of connexins, we observed that fetal and neonatal islets express predominantly Cx43 on non B-cells located at the islet periphery whereas young and adult endocrine pancreas express high levels of Cx36 on B-cells in comparison with the other groups, as confirmed by immunohistochemistry, immunoblotting and quantitative and semi-quantitative RT-PCR. Islet microinjection of GJ tracers revealed that neonatal islets display lower intercellular exchange of the cationic molecule Ethidium Bromide in comparison with the adult ones, which is in accordance with their differences in Cx36 expression. Taken all together, these findings suggest a putative relationship between degree of maturation of the insulin secretory machinery and a distinct pattern of connexin expression and cellcell coupling in pancreatic islets during animal development.

KEY WORDS: gap junction, connexins, insulin secretion, pancreatic islet, development

**RUNNING TITLE:** Connexins in the pancreatic islet during development.

#### **INTRODUCTION**

Attention has been directed to the similarities between perinatal pattern of insulin secretion and the prediabetic state. Fetal and neonatal islets exhibit a reduced secretory response to glucose and to other secretagogues as compared to adult islets (Mendonça et al., 1998; Boschero et al., 1988). The nature of the relatively poor glucose-dependent insulin release during perinatal period is not fully understood. The maturation of the secretory response is supposed to be influenced by many factors, including fuel metabolites, neurotransmitters signalling pathway leading to release of the insulin secretory granules, hormones (e.g. prolactin, GH) and by islet culturing (Leite et al., 2005; Collares-Buzato et al., 2001; Mendonça et al., 1998; Black et al., 1994; Boschero et al., 1993, 1988; Brelje and Sorenson, 1991; Grill et al., 1981). These agents or experimental conditions may influence or act on several steps of the intracellular signalling pathway leading to release of the insulin secretory series of the insulin secretory series.

Cell-to-cell contacts mediated by gap junctions (GJs) are crucial for a proper secretory response by the endocrine pancreas. The synthesis and release of insulin are markedly altered after dispersion of B-cells *in vitro*, but rapidly recovered after cell reaggregation, indicating that the secretory mechanism depends on intercellular interactions within the pancreatic islet (Halban et al., 1982; Bosco et al., 1989; Pipeleers et al., 1982). Several studies *in vivo* and *in vitro* have demonstrated that insulin secretion stimulated by glucose and other secretagogues is associated with an increased GJ-mediated coupling between B-cells, whereas the pharmacological blockage of GJ channels impairs the secretory function of these islet cells (Ravier et al., 2005; Leite et al., 2005; Meda et al., 1991, 1990, 1983, 1979). Nevertheless, the role of the GJ in the *in vivo* maturation process of the endocrine pancreas has not been evaluated.

In this work, we investigated the cellular expression and localization of gap junction-associated proteins (Cx36, Cx43 and Cx45) in pancreatic islets during animal development. We found that young and adult rat islets show significant higher expression and content of Cx36 when compared to fetal and neonatal ones. Meanwhile, the subtype of connexin predominantly expressed in the pancreatic islets at the early stages of development is Cx43; this subtype was mainly expressed by non B-cells located at the islet periphery, as revealed by immunohistochemistry. In accordance with a relatively low Cx36 expression, fetal/neonatal B-cells displayed a lower intercellular coupling, as assessed by tracer microinjection, in comparison with the adult ones. These findings may indicate a differential pattern of connexin expression during animal development and a relationship between the *in vivo* maturation of the insulin secretory machinery and the cell-cell coupling mediated by gap junctions.

#### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

Chemicals, reagents and all culture media were supplied by Sigma (St. Louis, MO) or Invitrogen Gibco (NY, USA). Culture medium supplements were purchased from Cultilab, Nutricell (Campinas, SP, Brazil) or Gibco. All sterile plastic materials were purchased from Corning (Corning, NY) or Falcon (Becton Dickinson Inc., Oxford England). Primary antibodies and tetramethylfluorescein isothiocyanate (FITC)- or tetramethylrodhamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated secondary antibodies were purchased from Sigma (St. Louis, MO), Zymed (San Francisco, CA), Dako (Carpinteria, CA) or Chemicon International Inc. (Temecula, CA). The GJ tracers, Lucifer Yellow and Ethidium Bromide were supplied by Sigma (St. Louis, MO).

#### Animals

Foetus (F) (in the 20<sup>th</sup> day of embryonic life) and neonatal (N) male and female Wistar rats (1-2 days old), young (Y) (21 day old) and adult (A) (3- 4 months old) male Wistar rats were obtained from the breeding colony at the State University of Campinas (Brazil) or at the University of Geneva (Switzerland). The animals were housed and subsequently killed to obtain the pancreas in accordance with the guidelines of the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (UNICAMP) and University of Geneva).

#### Morphological studies

The cellular location of the gap junctional proteins and insulin was determined by a double indirect immunofluorescence technique in frozen sections of pancreas of foetus (F), newborn (N), young (Y) and adult (A) rats. The pancreas fragments were frozen in n-hexane with liquid nitrogen, and cryostat sections (8  $\mu$ m) of pancreas were picked up on aminopropyltriethoxysilane-coated glass slides. For Cx36 and Cx45 detection, the sections were fixed with acetone at -20°C for 3 min, whereas for Cx43 detection, the sections were then fixed with 2% paraformaldehyde (in phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4) for 8 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 0.05 M Tris-buffered saline (TBS, pH 7.4) for 5 min. Thereafter, sections were incubated for 1 h with 5% of dry skimmed milk in TBS ( pH 7.4) and then with the following primary antibodies at the indicated dilutions: rabbit anti-Cx36 (dilution 1:25) (Zymed, Cat

number 516300), mouse anti-Cx43 (dilution 1:50) (Zymed, Cat number 138300) and mouse anti-Cx45 (dilution 1:50) (Chemicon , Cat. number MAB-3101). The period of incubation in the case of Cx43 and Cx45 was overnight at 4°C and for Cx36 was 2 h at room temperature (RT). Following incubation with the specific secondary antibody conjugated with FITC (Sigma) (dilutions 1:75, 1:150 and 1:100 were used for Cx36, Cx43 and Cx45, respectively), the sections were incubated with guinea pig anti-insulin antibody (Dako) (dilution 1:125) for 1h and 30min. After washing with TBS, the sections were submitted for 2 h incubation at RT with the specific secondary antibody conjugated with Gragent (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). All cell labellings were observed using a confocal laser scanning microscope (CLSM: Bio-Rad MRC 1024 UV; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA; or Zeiss LSM 510 META, Germany). To allow comparison among all animal groups studied, islets from F, N, Y and A animals were analysed at the same microscopic examination session. The specificity of the primary antibodies was tested by omitting the incubation step with these antibodies in pancreas sections and incubating them with a same volume of 3% dry skimmed milk in TBS instead (negative controls, not shown).

#### Western Blot

Immunoblotting for detecting the expression of junctional proteins in pancreatic islet cells was done in isolated islets of F, N, Y and A rats. Islets were isolated by collagenase digestion of the pancreas and cultured overnight as previously described (Leite et al., 2005). A pool of at least 1000 islets from each experimental group was homogenized by sonication in an anti-protease cocktail (10 mM imidazole, pH 8.0, 4 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 µg of pepstatin A/ml, 200 KIU of aprotinin/ml, 2.5 µg of leupeptin/ml, 30 µg of trypsin inhibitor/ml, 200 µM DL-dithiothreitol, DTT, and 200 µM PMSF). The total protein content of this lysate was determined using a DC protein assay kit (Bio-Rad). Samples of each experimental group containing 70 µg of total protein were incubated for 1 h at 37°C with 30% of the total volume with 5X concentrated Laemmli sample buffer (1 M sodium phosphate, pH 7.8, 0.1% bromophenol blue, 50% glycerol, 10% sodium dodecyl sulphate and 2% mercaptoethanol) (Laemmli, 1970). After that, these samples were fractionated by electrophoresis in 10% polyacrylamide gels and, the proteins then electrotransfered to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The membranes were stained with Ponceau S solution (Sigma) to check the efficiency of transfer and only those membranes in which all the lanes had identical color intensity were used for immunoblotting. Then, the membranes were blocked at 4 °C overnight with 0.05 M Tris-buffered saline (TBS, pH 7.4) containing 0.05% Tween 20 (TTBS) plus 5% dry skimmed milk. The membranes were then 2 h incubated at RT with the primary antibody dilution (1:350 for Cx36 and Cx45 or dil. 1:160 for Cx43 (Zymed, Cat number 138300) in TTBS plus 3% dry skimmed milk). After 1 h incubation at RT with the specific secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) dilution (1:2500 for Cx36 or 1:3000 for Cx43 and Cx45) in TTBS plus 1% dry skimmed milk. After membrane washing, the connexin expression was detected using an enhanced chemiluminescence kit (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) and autoradiography film (Amersham, Cleveland, OH). Band intensities were quantified by optical densitometry of the developed autoradiogram using the Scion Image analysis software (Scion Corp., Frederick, MD). The specificity of Cx36 and Cx43 antibodies was confirmed in brain and heart thomogenates; brain and heart tissues were used as positive and negative controls for Cx36 and heart as positive controls for Cx43 (data not shown).

#### RT-PCR

A standard protocol of RT-PCR was used with some modifications for detecting connexin mRNA expression. A pool of approximately 1000 islets was lysed in 1mL of Trizol solution (Invitrogen, USA), followed by 10 s of homogenization in vortex. The total RNA extracted using the Trizol method as described by the manufacturer. RNA concentrations were determined by measuring the optical absorbance at  $A_{260}$ . cDNA was synthesized from 3 µg of islet RNA in a volume of 20 µL using the reverse transcriptase SuperScript II and random hexamer primers (Invitrogen, USA). The cDNA samples were stored at -20°C.

#### **Primers**

The Cx43, Cx36, and RPS29 transcripts from all animal groups were determined by PCR using the following sets of primers: for Cx43, forward 5'-CCGACGACAACCAGAATGCC-3' and reverse 3'-GAACCCTATCGACCCGCTTG-5' that amplified a 322-bp cDNA fragment; for Cx36 forward 5'-AGTGGTGGGAGCAAGCGAGAAG-3' and reverse 3'-CCGAAGTCACAGGGTCCCAACA-5', which amplified a 282-bp cDNA fragment and for RPS29 forward 5'-AGGCAAGATGGGTCACCAGC-3' and reverse 3'-GCTGGACTTACCTACTAAGCTGA-5'.

#### **RT-PCR** analysis

PCR was done in 25  $\mu$ L using 0.5  $\mu$ L of cDNA as template. The PCRs contained 2.5  $\mu$ L of 10X concentration PCR buffer, 0.75  $\mu$ L of 50 mmol MgCl<sub>2</sub>/L, and 0.5  $\mu$ L of 10mmol dNTP mixture/L, 0.5  $\mu$ L of 10 pmol/L of each primer and 0.1  $\mu$ L of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA). An adequate amplification cycle number was determined for each primer pair (for Cx43, Cx36 and RPS29) after titration between 18 and 42 cycles using RNA samples of all animal groups. After a 5 min start at 94°C, amplification of Cx43 and RPS29 was done for 27 cycles, each comprising 30 s at 94°C, 30 s at 57°C, and 45 s at 72°C, using a PCR Thermal Cycler 9600 (PerkinElmer Cetus, Boston, Mass.). After the last cycle, an elongation step of 4 min at 72°C was performed. The amplification of Cx36 was carried out for 27 cycles, comprising 30 s at 94°C, 30 s at 61°C, and 45 s at 72°C, using a PCR Thermal Cycler 9600 (PerkinElmer Cetus). In all cases, negative controls were provided by submitting a sample of water to amplification (not shown). RPS 29 expression was used as an internal control in all PCRs. Aliquots (5  $\mu$ L each) of the amplified DNA fragments were separated on 2% EtBr-agarose gels and the band intensities were determined by digital scanning (GelDoc 2000, BioRad) followed by quantification using Scion Image analysis software (Scion Corp., Frederick, MD). The Cx43 and Cx36 transcript levels were normalized by the RPS29 transcript value (housekeeping gene).

#### Quantitative PCR (qPCR)

Samples containing a pool of approximately 200-400 isolated islets from neonatal and adult pancreas were lysed in a guanidinum-thiocyanate solution and total RNA was extracted using the kit procedure RNAqueous<sup>®</sup>- Micro (Ambion, USA). mRNA (0.5 µg) were reverse-transcribed using ImProm-2 Reverse transcription system (Promega). qPCR was performed in a ABI 7000 Sequence Detection System (Applera Europe) and PCR products were quantified using the SYBR Green Core Reagent kit. cDNA were amplified using the following primers: rat Cx36, 5'-ATCTTGGAGAGGCTGCTGGAA-3' (forward) and 5'-CCACCACAGTCAACAGGATCCT-3' (reverse); rat Cx43, 5'-GCCCAGCCGTTCGATTT-3' (forward) and 5'-AGTTCATGTCCAGCAGCAACTTT-3'(reverse); insulin 1. 5'rat GGCAGAAGCGTGGCATTG-3' (forward) and 5'- CCAGTTGGTAGAGGGAGCAGAT-3' (reverse); insulin 2. 5'-TGGTTCTCACTTGGTGGAAGCT-3' (forward): 5'rat CGGGACATGGGTGTGTAGAAG-3' (reverse). Two independent amplifications of each sample were performed and each transcript evaluated in triplicates. Mean values were normalized to the mean value of the mRNA of three different reference genes: RPS29, 5'-GCTGAACATGTGCCGACAGT-3' (forward); 5'-GGTCGCTTAGTCCAACTTAATGAAG-3 (reverse); GADPH, 5'-CCTGCACCAACTGCTTA-

20

## 3' (forward); 5'-CCACGATGCCAAAGTTGTCA-3'(reverse); EEF-1, 5'-CGCCAACTCGTCCAACTGA-3' (forward); 5'-CCAATGCCGCCAATTTTATAGA-3' (reverse).

#### Tracer microinjection

Pancreatic islets isolated by collagenase digestion from neonatal and adult pancreas were attached to Sylgard- and poly-L-lysine-coated dishes as previously described (Charpantier et al. 2007) and then transferred on to the heated stage (37°C) of a standard Zeiss microscope. The isolated islets were kept in Krebs Ringer bicarbonate HEPES buffer (composition: 117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 0.5% (wt/vol) BSA, and 10 mM glucose, pH 7.3-7.4 equilibrated with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5, vol/vol)) throughout the experiment. Individual cells were impaled using a glass microelectrode filled with one of the following tracers that display distinct size and charge features: Lucifer Yellow (LY, MW 443, 2 negative charges) (4% solution in 150mM LiCl buffered to pH 7.2 with 10 mM HEPES) and Ethidium Bromide (EB, MW 394, 1 positive charge) (4% solution in 150mM LiCl, pH 7.2) (Charpantier et al. 2007). LY and EB are dyes that do not permeate the membrane of living cells and have been used as good tracers of GJ intercellular coupling in B-cells (Serre-Beinier et al., 2009; Wellershaus et al. 2008; Charpantier et al., 2007). After cell insertion of the microelectrode, the tracers were iontophoretically injected for 5 min by applying 0.1 nA square pulses of 900 millisecond duration and 0.5-Hz frequency (Charpantier et al., 2007). Pulses were negative for injection of LY and positive for EB. After the injected field being photographed, the islets were fixed in 4% paraformaldehyde, and some of them were embedded in Epon and, serially sectioned (1µm) for posterior immunostained for insulin and checking the injection site. Tracer fluorescence was visualized and photographed by a M35 Winder Zeiss camera or by using an image capture system (Axiocam camera, Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Germany) coupled to the fluorescence microscope. Appropriated excitation and emission filters were used for each fluorochrome. The extent of coupling was determined by measuring the with Image Tool labeled area by each tracer software (http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html, version 3.0) on photographs of the intact islets.

#### Statistical analysis

All numerical results were expressed as means + standard error of the mean (SEM). For analysis between two experimental groups the statistical significance was assessed by t-Student test. For multiple comparisons, the statistical significance was assessed by ANOVA followed by the Bonferroni test. The significance level was set at P < 0.05.

#### RESULTS

As revealed by Western Blotting, young and adult rat islets express significantly higher amount of Cx36 (Figure 1) in comparison with fetal and neonatal islets. The differential expression of this gap junctional protein was statistically significant when neonatal and adult group are compared (P=0.0001, panel *c*). Regarding the Cx43 protein expression, an inverse pattern was observed. Fetal and neonatal (N) islets displayed a significant increased expression of Cx43 whereas young and adult islets show low levels of this junctional protein (P=0.0061) (Figure 2, panels *b* and *c*). The Figure 3 presents the immunoblot data for Cx45. Despite a tendency to an increased expression of Cx45 in young and adult (A) groups, no statistical significant difference was found between N and A groups.

The morphological studies employing immunohistochemistry confirmed the immunoblot data. Endocrine cells in the young and adult islet core, corresponding to B-cells, showed a higher staining for Cx36, appearing as bright punctate features within the islet (arrowheads in Figure 4), in comparison with that displayed by fetal and neonatal islets (**Figure 4**, compare panels *a*, *b*, *c*, *d*). The **Figure 5** shows that, the immunostaining for Cx43 was mainly observed at capillary wall within the islet (blue arrow in panel *h*) and in cell membrane of non B-cells located at periphery of fetus and neonatal islets (white arrows in panels *b* and *d*). As depicted in **Figure 6**, the immunostaining for Cx45 was detected in capillaries (arrowheads in panels *f* and *h*) and in the exocrine pancreas of young and adult rats (arrows) (**Figure 6**). This Cx45 immunolabelling in the exocrine pancreas was also observed in some regions in the pancreas of neonatal rats (data not shown) but was absent in fetal pancreas.

Before evaluating Cx36 and Cx43 gene expression by RT-PCR, an adequate amplification cycle number was determined for each primer pair after titration between 22 and 34 cycles (for Cx36) and 18 to 42 cycles (for Cx43) using RNA samples of all animal groups (**Figure 7**). The gene expression of Cx36 and Cx43 also confirms this differential expression of connexins in rat endocrine pancreas during animal development. In **Figure 8**, the panel *a* shows the gene expression of Cx36 for all groups studied, whereas the panel *b* presents the Cx43 gene expression results as detected by RT-PCR. A relatively low expression

of Cx36 at the early stages of development and a relatively high expression of this protein in young and adult islets were observed (panels *a* and *c*). Note in panel *c*, P<0.001 when fetal (F) group were compared to young (Y) and adult (A) groups (marked with full lines) or neonatal (N) group were compared to Y and A groups (marked with dotted lines). Conversely, a significant higher expression of Cx43 was observed in fetal and neonatal islets in comparison with young and adult islets (panels *b* and *d*; P<0.05).

The **Figure 9** shows the qPCR results for neonatal and adult islets. The gene expression of Cx36 (panel a), Cx43 (panel b) and insulin 1 (panel c) insulin 2 (panel d) were analyzed in these stages of development. Note that neonatal islets present a significant decreased Cx36 gene expression in comparison with adult ones (P=0.0002). Conversely, opposite results were obtained for Cx43. Newborn pancreatic islets show higher Cx43 mRNA levels as compared to adult ones (P=0.0003). Regarding the insulin gene expression, adult islets show increased mRNA levels of both insulin isoforms, insulin 1 and 2, in comparison with newborn islets (P<0.0001 for panels c and d). When the Cx36 mRNA transcript values obtained by qPCR were plotted against the insulin 1 or 2 transcript values for both adult and neonatal islets, we have found a high correlation between the expression of this Cx subtype and insulin genes (Cx36 vs Insulin 1, r<sup>2</sup>= 0.9232, P<0.0001; Cx36 vs Insulin 2, r<sup>2</sup>= 0.9748, P<0.0001).

To assess the functional aspect of the GJ channels during pancreas development, neonatal and adult islets were microinjected with GJ tracers (LY and EB) and the extension of coupling measured. As shown in **Figure 10**, no significant difference was observed regarding the LY diffusion area after islet injection; meanwhile neonatal islets displayed a significant lower intercellular exchange of EB as compared to the adult ones (\*P< 0.01).

#### DISCUSSION

Since it is well documented that intercellular communication mediated by gap junctions (GJ) is crucial for the islet physiology, the aim of this work was to study the putative role of GJ-associated proteins (Cx36, Cx43 and Cx45) and GJ-mediated cell-cell coupling in the endocrine pancreas maturation process observed during animal development (Mendonça et al., 1998; Boschero et al., 1988; Grill et al., 1981).

Previous works have demonstrated the presence of transcripts of Cx36, Cx43 and Cx45 subtypes in extracts of pancreatic islets (Charollais et al., 1999; Serre-Beinier et al., 2000; Meda et al., 1993). In a recent study using transgenic mice, in which a targeted replacement of these connexin genes by a LacZ reporter gene was done, allowed the exact localization of these three connexin subtypes (Theis et al., 2004). The gene expression of Cx36 was specifically detected in B-cells or insulin-producing cells

whereas the Cx43 and Cx45 were only expressed by endothelial cells and vascular smooth muscle cells, respectively. The two latter transcripts were found in small intra-islet vessels as well as in other types of blood vessels in the exocrine pancreas.

Our results are in accordance with these works since we demonstrated, by immunohistochemistry, the presence of Cx36 within the B-cell islet core, especially in young and adult islet. The significant higher expression of Cx36 in adult islets as compared to that observed in neonatal ones was also confirmed by Western Blot and qPCR. In addition, our data on cell-cell coupling revealed that adult islets display a relatively higher intercellular exchange of EB in comparison with the neonatal islets. Recently, it has been shown that Cx36-made GJ channels in B-cells preferentially exchange cationic molecules, such as EB, over anionic one (e.g. Lucifer Yellow) (Charpantier et al., 2007). This is an interesting finding in face of recent evidences of a requirement of adequate levels of Cx36 for an appropriate insulin secretory response to glucose stimulation (Calabrase et al., 2004, 2003, Le Gurun et al., 2003). These works showed the important role of cell-cell communication mediated by Cx36 channels *in vitro* by using Cx36-sense and anti-sense sequences in insulin-producing cell lines such as INS1E and MIN6. Junctional coupling mediated by GJs has been implicated in the coordination of the glucose-induced oscillatory increase of  $[Ca^{+2}]_i$  in B-cells (Jonkers et al., 1999; Gylfe et al., 1991). Calabrese et al. (2003) showed that the loss of Cx36 affects the electrical coupling, the synchronization of glucose-induced  $[Ca^{+2}]_i$  oscillations and the insulin secretion in response to glucose or other nonmetabolizable secretagogues.

Therefore, the reduced expression of Cx36 by fetal/neonatal islets documented herein may be physiologically relevant. Several works have demonstrated that the decreased insulin secretion exhibited by fetal and neonatal rats may be a result of a sum of different factors such as: a reduced entry of  $Ca^{+2}$  and its cytosolic accumulation, as well as an uncoupling of glucose stimulation and membrane depolarization leading to opening of a reduced number of voltage-sensitive  $Ca^{+2}$  channels (Mendonça et al., 1998; Black et al., 1994; Hole et al., 1988; Fletcher and Ways, 1991). Taken altogether, our work may indicate that the reduced expression of Cx36 and relatively lower GJ-mediated intercellular coupling by fetal and neonatal B-cells may also contribute for the poor insulin secretion response observed in the early stages of development. Low levels of Cx36 and the resultant decreased number of Cx36-made channels may lead to an unsynchronous rise of  $[Ca^{+2}]_i$  in fetal/neonatal B-cells and a consequent decreased entry and insufficient accumulation of  $Ca^{+2}$  in cytosol as already reported for neonatal rats.

Additionally, we have demonstrated here that besides displaying a poor insulin secretory response to glucose, neonatal islets also show a lower insulin gene expression in comparison with the adult ones. Strikingly, we observed that the levels of the Cx36 and insulin transcripts were highly correlated in both neonatal and adult islets. Recently, Serre-Beinier and collaborators (2009) described that the Cx36 mRNA

levels correlated with the expression of the insulin gene in human islets of both normal and type 2 diabetics. These findings strengthen the idea, currently accepted, that control of gene expression may be a relevant mechanism whereby connexins affect cell function, being the insulin gene probably one of the genes whose expression is controlled by Cx36 (Serre-Beinier et al., 2009; Iacobas et al., 2007).

Also our work suggested that other connexin subtype (Cx43) may have a role in islet physiology during the perinatal period. Despite the fact that some works have shown the occurrence of limited levels of this connexin in pancreatic islets of adult rats, as detected by immunohistochemistry (Meda et al., 1993, 1991), we observed relatively high levels of Cx43 expressed by the endocrine pancreas during the early stages of animal development, as revealed by immunohistochemistry, immunoblot and RT-PCR. The Cx43 is the best connexin studied in the endocrine pancreas and its expression has been directly related to cell-cell coupling in this organ at certain *in vitro* experimental conditions (Collares-Buzato et al., 2001; Vozzi et al., 1995; Meda et al., 1991). Although Theis et al. (2004) showed no significant expression of this connexin subtype by B-cells, they did not exclude the possibility that limited amounts of Cx43 might be expressed by a subset of B-cells. Nevertheless, we do not have evidence at the moment that this is the case in neonatal islets since the immunolabelling for Cx43 was not sensitive enough to confirm the expression of Cx43 by B-cells. We have observed though a relatively high immunoreaction for this connexin at the membrane site of cells located at the islet periphery. The peripheric mantle in fetal and neonatal islets has been shown to be composed by cytokeratins (CK) CK19, CK20 stained non B-cells and agranular hormone-negative cells that also showed a increased rate of proliferation (Bouwens et al., 1994; Carvalho et al., 2006). A previous work by others had already suggested that growth of the islets during fetal stage was dependent on the proliferation of undifferentiated agranular cells located at the islet periphery (Conklin et al., 1962). To our knowledge, this is the first work describing that these cells express Cx43, a Cx subtype that has been broadly found in embryos and adult undifferentiated stem cells (Dahl et al., 1996; Todorova et al., 2008). Interestingly, it has recently shown that Cx43 downregulation, by using RNA interfering approach, followed by a profound inhibitory effect on intercellular communication, resulted in loss of the pluripotent and proliferative states of mouse embryonic stem cells (Todorova et al., 2008). It is a matter of future work to understand the role of Cx43 in these cells and for the islet physiology.

In addition, our immunoblot data for Cx43 showed the expression of phosphorylated ( $P_f$ ) and nonphosphorylated ( $NP_f$ ) forms of this connexin on pancreatic islets. A previous work that used the same antibody (Zymed, Cat number 138300) employed in our study also detected these Cx43 forms in fibroblast cell systems (Cruciani and Mikalsen, 1999). Connexin phosphorylation has been implicated in the regulation of intercellular communication through a number of mechanisms that include connexin
biosynthesis, trafficking, assembly, membrane insertion, channel gating, internalization, and degradation (Sáez et al., 2003). Regarding connexin phosphorylation, the Cx43 is one of most subtype studied. This junctional protein has several sites for phosphorylation in the carboxy terminus that have been identified as target sites for specific protein kinases such as for PKC (protein kinase C), MAPK (mitogen-activated protein kinase) and cdc2 kinase (Sáez et al., 2003). Cx43 phosphorylated forms are detected in different tissues and there is a tissue-specific phosphorylation pattern (Kadle et al., 1991). It is a matter of future work to determine the functional importance of these Cx43 forms in the endocrine pancreas biology.

The third subtype of connexin here studied (Cx45) was detected in intra-islet capillaries and no significant difference in islet expression of this connexin was observed among the experimental groups. Since previous works have shown that pancreatic Cx45 is expressed by epithelial ductal cells besides the vessel muscle cells (Theis et al., 2004; Charollais et al., 1999; Chanson et al., 1999), the immunostaining for this junctional protein observed in the exocrine pancreas reported here may be attributed to centroacinar cells.

In conclusion, since the cell coupling mediated by gap junction proteins is crucial for an appropriate insulin secretion, the relatively poor expression of Cx36 and GJ-mediated cell-cell coupling in fetal and neonatal islets, demonstrated here, may play a role in the poor insulin secretory response observed at early stages of the animal development.

### REFERENCES

Black, M.A.; Mealing, G.R.A.; Whitfield, J.F.; Schwartz, J.L.; Bégin-Heick, N. (1994). Insulin secretion and intracellular Ca<sup>+2</sup> rises in monolayer cultures of neonatal rat B-cells. *Cell Signal* **6**: 897-904.

Boschero, A.C.; Tombaccini, D.; Atwater, I. (1988). Effects of glucose on insulin release and <sup>86</sup>Rb permeability in cultured neonatal and adult rat islets. *FEBS Lett* **236**: 375-379.

Boschero, A.C.; Crepaldi, S.C.; Carneiro, E.M.; Delattre, E.; Atwater, I. (1993). Prolactin induces maturation of glucose sensing mechanisms in cultured neonatal rat islets. *Endocrinology* **133**: 515-520.

Bosco, D.; Orci, L.; Meda, P. (1989). Homologous but not heterologous contact increases the insulin secretion of individual pancreatic B-cells. *Exp Cell Biol* **184**: 72-80.

Bouwens, L.; Wang, R-N.; De Blay, E.; Pipeleers, A.G.; Klöppel, G. (1994). Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* **43**: 1279-1283.

Brelje, T.C.; Sorenson, R.L. (1991). Role of prolactin *versus* growth hormone on islets B-cell proliferation *in vitro*: implications for pregnancy. *Endocrinology* **128**: 45-57.

Calabrese, A.; Caton, D.; Meda, P. (2004). Differentiating the effects of Cx36 and E-cadherin for proper insulin secretion of MIN6 cells. *Exp Cell Res* **294**: 379-391.

Calabrese, A.; Zang, M.; Serre-Beinier, V.; Caton, D.; Mas, C.; Satin, L.S.; Meda, P. (2003). Connexin 36 controls sychronization of  $Ca^{2+}$  oscillations and insulin secretion in MIN6 cells. *Diabetes* **52**: 417-424.

Carvalho, C.P.F.; Martins, J.C.R.; Cunha, D.A.; Boschero, A.C.; Collares-Buzato, C.B. (2006). Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islets during *in vivo* maturation of rat pancreas. *Annals of Anatomy* **188**: 221-234.

Chanson, M.; Scerri, I.; Suter, S. (1999). Defective regulation of gap junctional coupling in cystic fibrosis of pancreatic duct cells. *J Clin Invest* **103**: 1677-1684.

Charollais, A.; Serre-Beinier, V.; Mock, C.; Cogne, F.; Bosco, D.; Meda, P. (1999). Loss of alpha 1 connexin does not alter the prenatal differentiation of pancreatic beta cells and leads to the identification of another islet cell connexin. *Dev Genet* 24: 13-26.

Charpantier, E.; Cancela, J.; Meda, P. (2007). Beta cells preferentially exchange cationic molecules via connexin 36 gap junction channels. *Diabetologia* **50**: 2332-2341.

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

Conklin, J.L. (1962). Cytogenesis of the human fetal pancreas. Am J Anat 111: 181-193.

Cruciani, V.; Mikalsen, S.O. (1999). Stimulated phosphorylation of intracellular connexin43. *Exp Cell Res* **251**: 285-298.

Dahl, E.; Winterhager, E.; Reuss, B.; Traub, O.; Butterweck, A.; Willecke, K. (1996). Expression of the gap junction proteins connexin31 and connexin43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo, respectively. *J Cell Sci* **109**: 191-197.

Fletcher, D.J.; Ways, D.K. (1991). Age-dependent expression of protein kinase C isoforms in rat islets. *Diabetes* **40**: 1496-1503.

Grill, V.; Lake, W.; Freinkel, N. (1981). Generalized diminution in the response to nutrients as insulin-releasing agents during the early neonatal period in the rat. *Diabetes* **30**: 56-63.

Gylfe, E.; Grapengiesseer, E.; Hellman, B. (1991). Propagation of cytoplasmic  $Ca^{+2}$  oscillations in clusters of pancreatic beta-cells exposed to glucose. *Cell Calcium* **12**: 229-240.

Halban, P.A.; Wollheim, C.B.; Blondel, B.; Meda, P.; Niesor, E.N.; Mintz, D.H. (1982). The possible importance of contact between pancreatic islet cells for the control of insulin release. *Endocrinology* **111**: 86-94.

Hole, R.L.; Pian-Smith, M.C.M.; Sharp, G.W.G. (1988). Development of the biphasic response to glucose in fetal and neonatal rat pancreas. *Am J Physiol* **254**: E167-E174.

Iacobas, D.A.; Iacobas, S.; Spray, D.C. (2007) Connexin-dependent transcellular transcriptomic networks in mouse brain. *Prog Biophys Mol Biol* **94**: 169-185.

Jonkers, F.C.; Jonas, J.C.; Gilon, P.; Henquin, J.C. (1999). Influence of cell number on the characteristics and synchrony of Ca<sup>+2</sup> oscillations in clusters of mouse pancreatic islet cells. *J Physiol* **520**: 839-849.

Kadle, R.; Zhang, J.T.; Nicholson, B.J. (1991). Tissue-specific distribution of differentially phosphorylated forms of Cx43. *Mol Cell Biol* **11**: 363-369.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Le Gurun, S.; Martin, D.; Formenton, A.; Maechler, P.; Caille, D.; Waeber, G.; Meda, P.; Haefliger, J.A. (2003). Connexin-36 contributes to control function of insulin-producing cells. *J Biol Chem* **278**: 37690-37697

Leite, A.R.; Carvalho, C.P.F.; Furtado, A.G.; Barbosa, H.C.L.; Boschero, A.C.; Collares-Buzato, C.B. (2005). Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets. *Canadian J Physiol Pharmacol* **83**: 142-151.

Meda, P.; Pepper, M.S.; Traub, O.; Willecke, K.; Gros, D.; Beyer, E.; Nicholson, B.; Paul, D.; Orci, L. (1993). Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. *Endocrinology* **133**: 2371-2378.

Meda, P.; Chanson, M.; Pepper, M.S.; Giordano, E.; Bosco, M.D.; Traub, O.; Willecke, K.; Aoumari, A.E.; Gros, D.; Beyer, E.C.; Orci, L.; Spray, D.C. (1991). In vivo modulation of connexin 43 gene expression and junctional coupling of pancreatic B-cell. *Exp Cell Res* **192**: 469-480.

Meda, P.; Bosco, D.; Chanson, M.; Giordano, E.; Vallar, L.; Wollheim, C.; Orci, L. (1990). Rapid and reversible secretion changes during uncoupling of rat insulin-producing cells. *J Clin Invest* **86**: 759-768.

Meda, P.; Michaelis, R.L.; Halban, P.A.; Orci, L.; Sheridan, J.D. (1983). *In vivo* modulation of gap junctions and dye coupling between B-cells of the intact pancreatic islet. *Diabetes* **32**: 858-868.

Meda, P.; Perrelet, A.; Orci, L. (1979). Increase of gap junctions between pancreatic B-cells during stimulation of insulin secretion. *J Cell Biol* **82**: 441-448.

Mendonça, A.C.; Carneiro, E.M.; Bosqueiro, J.R.; Crepaldi-Alves, S.C.; Boschero, A.C. (1998). 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* **31**: 841-846.

Pipeleers, D.; Veld, P.I.; Maes, E.; Van de Winkel, M. (1982). Glucose-induced insulin release depends on functional coperation between islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7322-7325.

Ravier, M.A.; Güldenagel, M.; Charollais, A.; Gjinovci, A.; Caille, D.; Söhl, G.; Wollheim, C.B.; Willecke, K.; Henquin, J.C.; Meda, P. (2005). Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca2+ and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes* **54**: 1798-1807.

Sáez, J.C.; Berthoud, V.M.; Brañes, M.C.; Martínez, A.D.; Beyer, E C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Phys Rev* 83: 1359-1400.

Serre-Beinier, V.; Bosco, D.; Zulianello, L.; Charollais, A.; Caille, D.; Charpantier, E.; Gauthier, B.R.; Diaferia, G.R.; Giapmens, B.N.; Lupi, R.; Marchetti, P.; Deng, S.; Buhler, L.; Berney, T.; Cirulli, V.; Meda, P. (2009). Cx36 makes channels coupling human pancreatic beta cells and correlates with insulin expression. *Hum Mol Genet* **18**: 428-439.

Serre-Beinier, V.; Le Gurun, S.; Belluardo, N.; Trovato-Salinaro, A.; Charollais, A.; Haefliger, J.A.; Condorelli, D.F.; Meda, P. (2000). Cx36 preferentially connects B-cells within pancreatic islets. *Diabetes* **49**: 727-734.

Todorova, M.G.; Soria, B.; Quesada, I. (2008). Gap junctional intercellular communication is required to maintain embryonic stem cells in a non-differentiated and proliferative state. *J Cell Physiol* **214**: 354-362.

Theis, M.; Mas, C.; Döring, B.; Degen, J.; Brink, C.; Caille, D.; Charollais, A.; Krüger, O.; Plum, A.; Nepote, V.; Herrera, P.; Meda, P.; Willecke, K. (2004). Replacement by a LacZ reporter gene assigns mouse connexin36, 45 and 43 to distinct cell types in pancreatic islets. *Exp Cell Res* **29**: 18-29.

Vozzi, C.; Ullrich, S.; Charollais, A.; Philippe, J.; Orci, L.; Meda, P. (1995). Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. *J Cell Biol* **131**: 1561-1572.

Wellershaus, K.; Degen, J.; Deuchars, J.; Theis, M.; Charollais, A.; Caille, D.; Gauthier, B.; Janssen-Bienhold, U.; Sonntag, S.; Herrera, P.; Meda, P.; Willecke, K. (2008). A new conditional mouse mutant reveals specific expression and functions of connexin36 in neurons and pancreatic beta-cells. *Exp Cell Res* **314**: 997-1012.

#### **FIGURES AND LEGENDS**



Figure 1: Expression of Cx36 in rat pancreatic islets during animal development.

The Cx36 expression degree was measured by Western Blotting in F, N, Y and A islet sonicates. The Cx36 was detected in its dimeric (66 kDa) and monomeric (36 kDa) forms (panel *b*). Densitometric analysis of the immunoreactive bands from neonatal and adult group is shown in panel *c* and the results are expressed as means + standard errors of 7 membranes of 4 independent experiments. Note that adult islets showed significantly higher expression of Cx36 as compared to neonatal islets (P=0.0001). The panel *a* shows the same membrane presented in panel *b* stained with Ponceau reagent.

M: marker; F: fetus; N or Neo: neonatal; Y: young; A: adult.



Figure 2: Expression of Cx43 in rat pancreatic islets during animal development.

The Cx43 expression degree was assessed by Western Blotting in F, N, Y and A islet sonicates (panel *b*). The panel *b* shows a relatively high expression of Cx43 within the islets at the early stages of development and both Cx43 phosphorylated ( $P_f$ ) and non-phosphorylated ( $NP_f$ ) forms were recognized by the antibody. Values of densitometry for neonatal and adult groups are shown in panel *c* and expressed as means + standard errors of 5 membranes of 3 independent experiments. Note that neonatal islets show a higher expression degree for Cx43 when compared to the adult group (P=0.0061). The panel *a* shows the same membrane presented in panel b stained with Ponceau dye.

M: marker; F: fetus; N or Neo: neonatal; Y: young; A: adult.



#### Figure 3: Expression of Cx45 in rat pancreatic islets during animal development.

The Cx45 expression degree was measured by Western Blotting in F, N, Y and A islet sonicates (panel b). The panel a shows the same membrane presented in panel b stained with Ponceau reagent. Values of densitometry for neonatal and adult groups are shown in panel c and expressed as means + standard errors of 3 membranes of 3 independent experiments. No statistical differences were found in terms of Cx45 expression degree between neonatal and adult islets (P>0.05).

M: marker; F: fetus; N or Neo: neonatal; Y: young; A: adult.

#### Figure 4: Double immunostaining for Cx36 and insulin in rat pancreatic islets during development.

The panels *a*, *b*, *c*, *d* show the immunolabelling for Cx36 and the panels *e*, *f*, *g*, *h* present the same islets double-stained for Cx36 and insulin. The panels *a*, *e* show a fetus islet; panels *b*, *f*, a neonatal islet; *c*, *g* a young islet; while the panels *d*, *h* show an adult islet. The bright punctate immunoreaction for Cx36 (arrowhead) is higher in young and adult rat islets than in islets from rats at early stages of development (fetal and neonatal). Note that the Cx36 was specifically detected in insulin-producing cells. All panels are confocal "en face" (X-Y) images. Bar, 20 µm.



#### Figure 5: Double immunostaining for Cx43 and insulin in rat pancreatic islets during development.

The panels *a*, *c*, *e*, *g* show the immunolabelling for Cx43 alone and the panels *b*, *d*, *f*, *h* present the same islets double-stained for Cx43 and insulin. The panels *a*, *b* show a fetal islet; panels *c*, *d* a neonatal islet; *e*, *f* a young islet; while the panels *g*, *h* an adult islet. Note the immunostaining for Cx43 of capillaries (blue arrow in panel *h*) and in cell membrane of cells located at periphery of fetal and neonatal islets (white arrows in panels *b* and *d*). All panels are confocal "en face" (X-Y) images. Bar, 50 µm.



#### Figure 6: Double immunostaining for Cx45 and insulin in rat pancreatic islets during development.

The panels *a*, *c*, *e*, *g* show the immunolabelling for Cx45 and the panels *b*, *d*, *f*, *h* present the same islets double-stained for Cx45 and insulin. The panels *a*, *b* show a fetus islet; panels *c*, *d* a neonatal islet; *e*, *f* a young islet; while the panels *g*, *h* an adult islet. Note the immunostaining for Cx45 in intra-islet capillaries (arrowheads in panels *f* and *h*) and in the exocrine pancreas of young and adult rats (arrows). This Cx45 immunolabelling in the exocrine pancreas was also observed in some regions in the pancreas of neonatal rats (data not shown) but absent in fetal pancreas. All panels are confocal "en face" (X-Y) images. Bar, 50  $\mu$ m.







# Figure 7: Cx36 and Cx43 amplification curves for fetal (F), neonatal (N), young (Y) and adult (A) RNA samples.

An adequate amplification cycle number was determined for Cx36 primer pair after titration between 22 and 34 cycles (panel a). Panel b shows the Cx43 amplification curve determined after titration between 18 and 42 cycles. In all cases were chosen a cycle number within the logarithmic phase of amplification (not shown).

### Figure 8: RT-PCR analysis of Cx36 and Cx43 gene expression in rat pancreatic islets during animal development.

The panel *a* shows the gene expression of Cx36 in fetal (F), neonatal (N), young (Y) and adult (A) rat islets. Note the relatively low expression of Cx36 in islets at the early stages of development and a relatively high expression of this GJ protein in Y and A islets. An inverse situation was observed for Cx43 gene expression: F and N islets displayed an increased expression of Cx43 whereas Y and A islets express low amount of this connexin (panel *b*). The results were normalized and expressed in relation to the internal control (RPS29) (panels *c* and *d*). In panel *c*, P<0.001 when comparisons were done among groups marked with full or dotted lines. In panel *d*, P<0.001 when F or N were compared to Y group; P<0.01 when N were compared to A and P<0.05 in case of F were compared to A group. N=3 for each group from independent experiments.





d)

c)



## Figure 9: Quantitative RT-PCR analysis of Cx36, Cx43 and insulin (1 and 2) gene expression in newborn and adult rat pancreatic islets.

Note that newborn pancreatic islets present significant decreased Cx36 gene expression in comparison with adult ones (panel a; P=0.0002). Conversely, opposite results were obtained for Cx43. Newborn pancreatic islets show higher Cx43 mRNA levels as compared to adult ones (panel b; P=0.0003). Regarding the insulin gene expression, adult islets show increased mRNA levels of both insulin isoforms in comparison with newborn islets (P<0.0001 for panels c and d).

#### Figure 10: Gap Junction-mediated cell-cell coupling in neonatal and adult pancreatic islets.

The cell-cell coupling was assessed by microinjection of Lucifer Yellow (panels a and b) or Ethidium Bromide (panels c and d) in isolated neonatal (panels a and c) and adult pancreatic islets (panels b and d). Note that Neonatal (Neo) islets display a lower exchange area of Ethidium Bromide (EB) in comparison with the adult ones. Data are presented as means+SEM in panel (e); the values inside the bars represent the number of microinjected islets. \*P < 0.01, \*\*P<0.001. Bar, 50  $\mu$ m.





e)

### CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA E ANÁLISE FUNCIONAL E MORFOMÉTRICA DO Pâncreas Endócrino de Animais do Modelo de Diabetes Tipo 2.

#### 1. INTRODUÇÃO

Antes de iniciar a investigação do papel da comunicação intercelular mediada pelas junções comunicantes (GJs) na patogênese da diabetes tipo 2, realizamos um estudo de caracterização do modelo animal utilizado para essa finalidade. O modelo de diabetes tipo 2 que utilizamos, empregou camundongos C57, *wild-type* e *knockout* para o receptor de LDL (LDLR <sup>-/-</sup>) submetidos a dieta hiperlipídica (21%) por 30 ou 60 dias. Estudos anteriores já haviam demonstrado que camundongos C57 *wild-type* desenvolvem um estado de diabetes melittus não dependente de insulina (tipo 2) como resultado da ingestão de ração com alto teor de lipídios (De Souza et al., 2005; Winzell e Ahrén, 2004; Shafrir et al., 1999; Surwitt et al., 1988). Os animais LDLR <sup>-/-</sup> também têm sido utilizados no estudo da patogênese da ateroesclerose associada à resistência periférica à insulina, à diabetes melittus não dependente de insulina (tipo 2) e à obesidade (Drolet et al., 2006; Schreyer et al., 2002; Merat et al. 1999).

A repercussão na função pancreática endócrina da ingestão de dieta com alto teor de lipídios tem sido pouco investigada. Adicionalmente, há, entre os trabalhos publicados, uma grande diferença quanto ao tempo de dieta, sexo do animal empregado e composição da ração utilizada neste modelo resultando em discrepâncias nos dados obtidos. Como os animais LDLR -/- mostram uma maior susceptibilidade metabólica à dieta (Drolet et al., 2006; Schreyer et al., 2002), o uso de ambos os animais, *wild-type* e *knockout*, pode fornecer um espectro de diferentes graus de respostas metabólicas e funcionais do pâncreas endócrino, o que nos parece interessante para o presente estudo.

Assim, o objetivo dessa parte da tese foi fazer uma caracterização mais ampla desse modelo, ou seja, estabelecer o quadro metabólico do animal e a resposta pancreática frente à dieta hiperlipídica por um curto período de tempo (30 e 60 dias) para, posteriormente analisar o papel das GJs nesse modelo (resultados apresentados no Capítulo IV). Os dados obtidos indicam que após 60 dias de dieta esses animais já se tornam pré-diabéticos, apresentando hiperglicemia moderada, significativa hiperinsulinemia, intolerância à glicose e resistência à insulina. Quanto à resposta metabólica à dieta, os animais *knockout* e os machos mostraram-se mais susceptíveis em comparação aos *wild-type* e fêmeas, respectivamente. Quanto à resposta pancreática, os animais *wild-type*, em especial os machos, mostraram um aumento na massa estimada de ilhotas e células B, condição indicativa de hiperplasia do pâncreas endócrino. Surpreendentemente, os animais *knockout* não apresentaram alterações morfométricas no pâncreas

endócrino após dieta hiperlipídica. Dessa forma, os dados reunidos nesse capítulo apontam o modelo aqui utilizado, como adequado e promissor em estudos acerca do desenvolvimento da diabetes tipo 2.

#### 2. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1 Modelo de Diabetes tipo 2

Camundongos fêmeas e machos C57BL/6 *wild-type* (grupo controle denominado R2) e LDLR<sup>-/</sup> (grupo denominado *R0*) foram utilizados com 4 a 5 meses de idade antes da dieta. Os animais controle foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas e os animais LDLR<sup>-/</sup> utilizados foram provenientes do CEMIB ou de cruzamentos realizados no biotério de animais transgênicos da Profa. Dra. Helena Oliveira (Departamento de Fisiologia e Biofísica, IB, UNICAMP). Parte dos animais dos dois grupos foi colocada em dieta com alto teor de lipídios (21%), enquanto, outra parte dos animais dos grupos R0 e R2 foi alimentada com dieta normal. Os animais R0 ou R2 foram alimentados com a dieta hiperlipídica ou normal por 30 ou 60 dias (d) e, mantidos em ambiente com temperatura controlada (25°C), ciclo claro-escuro de 12h além de receberem ração e água *ad libitum*. A composição da ração da dieta hiperlipídica (em pó) está mostrada na **Tabela I**. O grupo de animais que recebeu dieta normal (com 4,0% de lipídios, Nuvital CR-1, Colombo, PR) também recebeu a mesma em pó.

Componentes	Gm%	Kcal %		
Proteínas	20,0	17,0		
Carboidratos	50,0	42,7		
Lipídios	21,0	40,3		
Kcal/gm		4,7		

Tabela I – Composição da ração da dieta hiperlipídica.

#### 2.2 Avaliação metabólica do modelo

Foram avaliados os seguintes parâmetros metabólicos nos animais controles e submetidos à dieta: peso inicial (antes da dieta) e final (após dieta), glicemia jejum inicial e final, glicemia pós-prandial final, níveis plasmáticos de colesterol e insulina após a dieta e, os testes de tolerância à glicose (GTT) e de tolerância à insulina (ITT) também após a dieta. A pesagem dos animais e coleta de sangue para as análises descritas acima foram feitas no período das 9:00h às 11:00h. Para as dosagens em jejum, os animais foram deixados sem ração, mas com água *ad libitum* por um período de 12 a 14 h. A glicemia foi determinada com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostic, Suíça) em amostras de sangue da cauda do animal. Colesterol total foi medido em amostras de plasma de animais em jejum usando um kit comercial e seguindo as instruções do fabricante (Boehringer Mannhein, Alemanha). A concentração plasmática de insulina (em jejum) em amostras de sangue coletadas com auxílio de capilares heparinizados a partir da veia caudal dos animais controles e submetidos à dieta hiperlipídica por 60 dias. Após coletas, as amostras de plasma foram mantidas a –20°C até o momento da dosagem do conteúdo de insulina por radioimunoensaio (RIE) (Leite, 2002).

Para o GTT, uma dose de glicose (1,5 g/kg de massa corporal) foi administrada por gavagem nos animais após 12 horas de jejum. A concentração de glicose no sangue foi então determinada com o glicosímetro após 15, 30, 60 e 90 minutos da administração da carga de glicose por via oral (Miles et al., 2000). A dosagem da concentração de glicose em jejum, ou seja, no tempo 0 também foi realizada.

O teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado através de injeção intraperitoneal de insulina regular (0,5 U/kg de massa corporal) em animais alimentados (Pappan et al., 2005). Amostras de sangue da cauda dos animais foram coletadas nos tempos 0, 10, 15, 30 e 60 minutos.

#### 2.3 Avaliação Morfológica do Pâncreas Endócrino

#### 2.3.1 Histologia do pâncreas

A análise do aspecto histológico do pâncreas endócrino dos animais dos diferentes grupos experimentais (n=4-6 animais por grupo experimental) foi feita utilizando-se técnica histológica de rotina. Para tal, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> para retirada dos pâncreas; estes foram pesados e fixados em solução de Bouin (25% de formaldeído, 75% de ácido pícrico saturado e 5% de ácido acético) por 24 h. Após fixação, os pâncreas foram seccionados em 5 fragmentos, sendo que, o fragmento

identificado com o número 1 era correspondente a região da cabeça do pâncreas e, o de número 5, à região da cauda. Em seguida, cada fragmento foi processado pelas técnicas rotineiras de embebição em parafina (Histosec pastilhas, Merck). Três dos fragmentos foram selecionados de uma maneira sistemática (Inuwa e Mardi, 2005) (fragmentos 1, 3 e 5) e, de cada fragmento, foram obtidas secções semi-seriadas de 5 µm de espessura, com espaçamento regular de 100 µm entre cortes, até esgotamento total do bloco. As lâminas obtidas foram processadas para imunohistoquímica para insulina como descrita abaixo.

#### 2.3.2 Imunohistoquímica para Insulina

A localização de insulina foi realizada em cortes de pâncreas incluídos em parafina utilizando-se o método padrão de imunoperoxidase indireta (Carvalho et al., 2006). Resumidamente, os cortes 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 TBS/Tween 20 0.1% (TTBS)), os mesmos foram incubados com anticorpo primário específico (antiinsulina, Dako, diluição 1:50 em TBS com 3% de leite desnatado) *overnight* a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados e incubados com o anticorpo secundário específico (anti-guinea pig HRP conjugated, Zymed, diluição 1:2000 em TBS 1% de leite desnatado). Após lavagem e revelação do complexo antígeno-anticorpo com 10% de diaminobenzidina (Sigma), TBS 0,05M (pH 7,4) e 0,2% de peróxido de hidrogênio (Merck), as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Ehrlich, desidratadas, diafinizadas e montadas em bálsamo sintético.

#### 2.3.3 Morfometria

As lâminas obtidas a partir do processamento dos pâncreas e imunohistoquímica para insulina, descritos anteriormente, foram utilizadas para a análise morfométrica do órgão. Foram analisados os seguintes parâmetros: 1) área absoluta e relativa de célula B/célula não B, 2) área absoluta e relativa da ilhota/pâncreas, 3) massa estimada (mg) do pâncreas endócrino; 4) massa estimada (mg) de célula B por pâncreas e 5) número médio de ilhotas por secção transversal. Para tal, foram utilizados métodos estereológicos descritos na literatura, com pequenas modificações (Inuwa e Mardi, 2005; Sone e Kagawa, 2005). Todas as ilhotas (com mais de 5 células cada) de dois cortes de cada bloco (1, 3 e 5; número total de cortes analisados= 6 por animal) do pâncreas foram fotografadas com uma câmera digital (Nikon FDX-35) acoplada a um microscópio de luz (Nikon Elipse E800) e as imagens capturadas por um sistema de análise de imagens (Image Pro Plus for Windows). As imagens das secções do pâncreas foram

fotografadas com uma câmera digital (Nikon) acoplada a uma lupa (Nikon). Todas as medidas morfométricas foram feitas utilizando software livre ImageTool 0 (http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html). A área relativa de célula B foi expressa como porcentagem, a qual foi determinada pela divisão da área total de células positivas para insulina pela área da ilhota e multiplicando-se por 100. A área relativa das ilhotas por pâncreas foi expressa como porcentagem, a qual foi determinada pela divisão da somatória das áreas totais das ilhotas pela área de secção transversal do pâncreas e multiplicando-se por 100. A estimativa da massa total de ilhotas (mg) foi calculada multiplicando-se o peso do pâncreas pela área relativa das ilhotas. A estimativa da massa total de célula **B** (mg) foi calculada multiplicando-se a massa total de ilhotas pela área relativa das células B. Todas as ilhotas de cada corte foram somadas e divididas pelo número de cortes analisados para expressar o número médio de ilhotas por secção transversal.

#### 2.4 Análise Estatística

A significância estatística entre dois grupos experimentais foi determinada usando-se o teste t-Student. Para múltiplas comparações, foi utilizado o teste ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni para comparar determinados pares de grupos. No caso dos experimentos de GTT e ITT, a análise entre os grupos foi realizada para cada ponto da curva, ou seja, para cada tempo de coleta da amostra de sangue, após administração de glicose ou insulina, respectivamente. O nível de significância adotado foi de P<0,05.

#### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

# Caracterização metabólica e análise morfométrica do pâncreas endócrino de animais submetidos 30 dias de dieta hiperlipídica.

A Tabela I mostra parte dos parâmetros metabólicos analisados nos animais após 30 dias de ingestão de dieta hiperlipídica. Os animais, do grupo fêmea e macho, submetidos à dieta hiperlipídica obtiveram ganho de peso corpóreo de 26,7 % e 24,5% respectivamente. Com relação ao seu grupo controle, as fêmeas tratadas tiveram aumento significativo de 11,7% (P=0,0005) no peso corpóreo após a dieta, enquanto os machos tratados tiveram aumento significativo de 11% (P=0,0007) em relação ao seu grupo controle. Quanto à glicemia em jejum após 30 dias de dieta, não foi observada alteração significativa neste

parâmetro entre os grupos experimentais. Entretanto, os machos apresentaram um aumento significativo de 25,8% (P=0,01) na glicemia pós-prandial após 30 dias de dieta, em relação ao seu grupo controle.

Apesar das diferenças no ganho de peso e de glicemia pós-prandial final, observadas na Tabela I, a administração da dieta hiperlipídica por 30 dias não foi suficiente para induzir alterações na morfologia (Figura 1) e de parâmetros morfométricos do pâncreas endócrino de animais tratados com dieta hiperlipídica por esse período (dados não mostrados).

Esses dados são inéditos já que trabalhos descrevendo alterações metabólicas após curto período de dieta são raros (Reimer e Ahren, 2002).

### Caracterização metabólica e análise morfométrica do pâncreas endócrino de animais submetidos à dieta hiperlipídica por 60 dias.

A avaliação do quadro metabólico dos camundongos dos diferentes grupos experimentais (R0, R0d, R2 e R2d) alimentados por 60 dias, com as respectivas dietas (normal e hiperlipídica), está mostrada nas Figuras 2, 3 e 4. As Figuras 2 e 3 apresentam os resultados dos testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT), respectivamente, para fêmeas e machos dos diferentes grupos experimentais após 60 dias de dieta. Nossos resultados indicam que a exposição à dieta hiperlipídica por 60 dias induz alterações metabólicas mais severas do que as verificadas após 30 dias de dieta. Os camundongos de ambos os sexos alimentados com dieta hiperlipídica por 60 dias apresentam uma significativa intolerância à glicose (Figura 2) e resistência periférica à insulina (Figura 3) em comparação com os animais alimentados com dieta normal. Essa condição foi mais evidente nos animais R0 e nos machos em comparação aos R2 e às fêmeas, respectivamente.

Adicionalmente, os dados de GTT indicam que os animais R0 alimentados com dieta normal já apresentam certa perturbação da homeostase glicêmica, observe na figura 1, que a curva do GTT é muito semelhante a do grupo R2 dieta (R2d). Esses resultados estão de acordo com dados da literatura que mostram que os animais LDLR<sup>-/</sup> apresentam um distúrbio do metabolismo de carboidratos mesmo quando alimentados com dieta normal (Bonfleur et al., 2006).

A Figura 4 resume os resultados obtidos na avaliação metabólica dos animais submetidos à dieta por 60 dias. A administração de dieta hiperlipídica a animais R2 (independente do sexo) causa um aumento do peso corpóreo de aproximamente 3 vezes em comparação ao ganho de peso obtido com a dieta regular (para fêmeas 58,2% X 18,9% e , para machos, 45,5% X 15,7%) (Figura 4a). No caso do ganho de peso em animais R0, as diferenças sexuais foram mais importantes: machos R0d aumentaram cerca de 5,2 vezes o seu peso corpóreo em comparação com os do grupo R0, enquanto que, em fêmeas, esse aumento foi de aproximadamente 3,4 vezes. A exposição à dieta hiperlipídica induziu aumento da glicemia em jejum em

ambos os sexos (Figura 4b). Entretanto, a glicemia de jejum pós-dieta foi mais elevada em animais R0d quando comparada com a dos R2d, para ambos os sexos. A administração de dieta hiperlipídica a animais geneticamente hipercolesterolêmicos promoveu um aumento significativo da taxa de colesterol plasmática em animais R0d, que por sua vez foram os que apresentaram quadro mais grave de intolerância à glicose e resistência periférica à insulina (Figura 2 e 3). Estudos revelam que a ingestão de dieta com alto teor de lipídios está associada a uma baixa capacidade de oxidação mitocondrial e, também ao acúmulo de intermediários da oxidação de ácidos graxos que, por sua vez, interferem com a sinalização insulínica (Schrauwen, 2007). A exposição crônica a níveis excessivos de ácidos graxos inibe a expressão gênica da insulina frente a elevados níveis de glicose e pode induzir morte de células B *in vitro* e *in vivo* (Poitout e Robertson, 2002). Em concordância com essas observações, nossos dados indicam que o aumento na concentração plasmática de insulina verificada após a dieta hiperlipídica de 60 dias foi significativamente maior nos animais R2 em relação aos animais R0 (Figura 4d).

Em uma segunda etapa dessa parte do trabalho, foi estudada a possível repercussão desses distúrbios metabólicos induzidos pela dieta hiperlipídica na histologia (Figura 5) e morfometria do pâncreas endócrino (Tabelas II e III).

Não foram observadas diferenças no aspecto histológico das ilhotas do grupo controle, em comparação com o submetido à dieta hiperlipídica (Figura 5). Observe que a morfologia e a citoarquitetura típicas das ilhotas pancreáticas são mantidas mesmo após a administração dessa dieta. Morfologicamente, as ilhotas pancreáticas são caracterizadas por estruturas de formato poligonal a arredondado, constituídas por cordões de células entremeados por uma rica rede de capilares sanguíneos do tipo fenestrado e delimitadas por delicada cápsula de tecido conjuntivo frouxo rico em fibras reticulares, que a envolve e as separam do tecido pancreático exócrino adjacente.

Com relação aos parâmetros morfométricos analisados após a administração da dieta por 60 dias, temos que, o peso do pâncreas dos animais R2 não se altera significamente (Tabela II) enquanto que no grupo R0, observa-se uma diminuição no peso líquido do órgão em relação ao grupo controle (-11,1% nas fêmeas e -17,3% nos machos) (Tabela III).

Entretanto, a análise morfométrica dos pâncreas dos animais R2, mostrado na Tabela II, indica aumento no número de ilhotas por secção transversal do pâncreas (+14,82 nas fêmeas; +48,37 nos machos), na área absoluta da ilhota (+33,19% nas fêmeas; +57,17% nos machos; P<0,01), na área absoluta das células B (+42,97% nas fêmeas; +62,41% nos machos; P<0,03), e na proporção de célula B/ilhota (+3,7% nas fêmeas; + 2,04% nos machos; P<0,05) (Tabela II). Todas essas alterações resultaram em aumento significativo na massa do pâncreas endócrino e, em especial, na massa estimada de célula B em ambos os sexos, indicando hiperplasia/hipertrofia deste órgão após a administração da dieta hiperlipídica,

em relação ao grupo controle (Tabela II). As alterações morfométricas observadas após dieta hiperlipídica são provavelmente compensatórias ao distúrbio metabólico demonstrado pelo GTT e ITT para esse grupo, como sugerido em outros trabalhos publicados (Terauchi et al., 2007; Sone e Kagawa, 2005). Dessa forma, a administração de dieta com alto teor de lipídios a essa cepa de camundongos parece constituir-se em um interessante modelo *in vivo* de estudo dos mecanismos de histogênese do pâncreas endócrino na fase adulta.

Surpreendentemente, a análise morfométrica revelou que o pâncreas endócrino dos animais R0 alimentados com dieta hiperlipídica não sofreu hiperplasia (Tabela III e Figura 5). Como mostra a Tabela III, os pâncreas dos animais R0d, em relação ao seu respectivo grupo controle (R0), não apresentaram alteração significativa no número de ilhotas por secção transversal do pâncreas. Entretanto, a dieta hiperlipídica induziu uma pequena diminuição, mas significativa, na área total da ilhota (-29,78 % nas fêmeas) e, na área de células B (-26,65% nas fêmeas) após a admimistração da dieta hiperlipídica por 60 dias. A proporção de célula B em relação à área total da ilhota aumentou significativamente no grupo tratado (+5,33% nas fêmeas; + 4,04% nos machos), em comparação ao controle (Tabela III).

No momento, não temos uma explicação plausível para essa diferença entre o animal R2 e R0 quanto à resposta do pâncreas endócrino à dieta hiperlipídica. Entretanto, o fato dos camundongos LDLR<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hiperlipídica não mostrarem alterações morfométricas significativas do pâncreas endócrino está de acordo com os resultados metabólicos indicando uma maior susceptibilidade metabólica desse animal *knockout* a essa dieta, como demonstrado pelo GTT e a medida de concentração plasmática de insulina.

Recente interesse tem surgido sobre o estudo dos processos envolvidos na histogênese do pâncreas em modelos de diabetes tipo 2 devido a possibilidade de utilização deste conhecimento para indução de processo *in vitro* para geração de células B e tratamento da própria diabetes (Liew e Andrews, 2008). Vários fatores de proliferação celular parecem regular o ciclo celular da célula B; dentre eles têm-se: as ciclinas e as proteínas quinases dependentes de ciclina; os fatores que agem através dos receptores de tirosina quinases (RTKs); os fatores que agem através da via JAK/STAT; os fatores que agem através de receptores acoplados à proteina G, etc. (Yesil e Lammert, 2008). Assim, um tema interessante, com relação a perspectivas futuras do nosso trabalho seria determinar quais desses fatores de proliferação celular explicariam a expansão da massa de célula B nos camundongos *wild-type* e sua ausência nos animais *knockout*.

Em conclusão, nossos dados reafirmam a idéia que as ilhotas pancreáticas são estruturas dinâmicas e capazes de sofrer alterações morfo-funcionais na tentativa de reverter algum distúrbio na homeostase glicêmica (Inuwa e Mardi, 2005; Sone e Kagawa, 2005; Ahren et al., 1997). Os resultados apresentados

nesse capítulo revelam que a dieta hiperlipídica, por um período relativamente curto de 60 dias, já induz um quadro definido como pré-diabetes em camundongos C57BL/6; tal quadro é caracterizado por um estado de hiperglicemia, hiperinsulinemia e significativa intolerância à glicose e resistência à insulina. Em adição, as alterações no metabolismo de carboidratos em resposta à dieta foram mais severas nos animais machos e *knockout* para LDLR, sendo neste caso, associadas à hipercolesterolemia. Ainda, mostramos que tais distúrbios no metabolismo de carboidrato nos animais R2 tratados foram acompanhados por aumento da massa de ilhota e de célula B, indicando um processo de hiperplasia do pâncreas endócrino nestes animais. Portanto, este modelo parece-nos apropriado para se investigar os mecanismos envolvidos nos eventos iniciais que resultam na diabetes tipo 2, incluindo o papel da comunicação intercelular mediada pelas junções comunicantes neste processo.

### 4. FIGURAS E LEGENDAS



Figura 1. Aspecto morfológico do pâncreas endócrino de animais alimentados por 30 dias com dieta normal (A,C) e hiperlipídica (B,D).

Esta figura mostra fotomicrografias de ilhotas pancreáticas em cortes histológicos submetidos à reação de insulos para detecção de insulina. Note que não existem alterações significativas no aspecto morfológico das ilhotas do grupo alimentado com dieta hiperlipídica (macho B e fêmea D) em relação ao grupo controle (macho A e fêmea C). Nenhuma alteração morfométrica significativa do pâncreas endócrino foi observada após 30 dias de dieta hiperlipídica, em ambos os sexos (dados não mostrados). Barra, 50µm.





A figura 2 mostra o teste de tolerância à glicose (GTT) em fêmeas (figura 2a) e machos (figura 2b) de camundongos alimentados com dieta regular (grupos R0 e R2) ou, dieta hiperlipídica (grupos R0d e R2d) por 60 dias. Note que os animais alimentados com dieta hiperlipídica desenvolvem um quadro de intolerância à glicose que é mais pronunciado nos machos, do que nas fêmeas. O N para cada grupo experimental encontra-se na legenda de cada gráfico entre parênteses.

A análise estatística entre os diferentes grupos, nos intervalos de tempo estudados, revelou:

**2a**) P<0,05 R2XR0d (T0), R2XR2d (T30 e T90), R2XR0 (T30 e T60), R2dXR0d (T90); P<0,01 R2XR2d (T60), R2XR0 (T90); P<0,001 R2XR0d (T30, T60 e T90), R2dXR0d (T30), R0XR0d (T30); **2b**) P<0,05 R2XR0d (T0 e T15); P<0,01 R2XR0d (T30, T60 e T90).



### Figura 3: Teste de Tolerância à Insulina (ITT) em camundongos R0 e R2 machos e fêmeas (60 dias de dieta).

A figura 3 mostra o teste de tolerância à insulina (ITT) em fêmeas (figura 3a) e machos (figura 3b) de camundongos dos grupos R0, R2, R0d, e R2d submetidos à dieta regular ou hiperlipídica por 60 dias. Note que os animais machos R0d e R2d desenvolvem um quadro de resistência periférica à insulina. O N para cada grupo experimental encontra-se na legenda de cada gráfico entre parênteses.

A análise estatística entre os diferentes grupos, nos intervalos de tempo estudados, revelou diferenças significativas apenas no caso do ITT para machos com 60 dias de dieta (**fig. 3b:** P < 0.05 R0XR2d nos tempos 15 e 30 minutos).

# Figura 4: Alterações metabólicas em camundongos R2 e R0, machos e fêmeas, após dieta hiperlipídica por 60 dias.

Foram avaliados, no grupo controle e nos submetidos à dieta hiperlipídica de 60 dias os seguintes parâmetros relacionados ao metabolismo de carboidratos: ganho de peso (a), glicemia em jejum (b), colesterol (c) e concentração de insulina plasmática (d) (a descrição das metodologias adotadas nessas análises encontra-se na seção de Materiais e Métodos). Os dados mostram que a exposição à dieta hiperlipídica por este período, relativamente curto, já induz obesidade, associada à hiperglicemia moderada, significativa hipercolesteronemia e hiperinsulinemia. Os animais machos e *knockout* para LDLR (R0) mostraram-se mais susceptíveis a tal dieta em relação às fêmeas e aos animais *wild-type* (R2). \*P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle (alimentado com dieta normal); &P<0,05 em relação ao grupo R2; <sup>§</sup>P<0,05 em relação ao grupo R2d.













Secções histológicas do pâncreas foram imunomarcadas para insulina pelo método de imunoperoxidase indireta. As figuras  $\mathbf{a} \in \mathbf{b}$  correspondem, respectivamente, a ilhotas de camundongos R2 (dieta normal) e R2d (dieta hiperlipídica). Enquanto as figuras  $\mathbf{c} \in \mathbf{d}$ , correspondem a ilhotas de camundongos R0 (dieta normal) e R0d (dieta hiperlipídica). Note que não se observam diferenças significativas com relação ao aspecto histológico e de citoarquitetura das ilhotas dos diferentes grupos estudados. Entretanto, as ilhotas mostradas nessa figura retratam o panorama das diferenças nos parâmetros morfométricos, que é apresentado na Tabelas II e III. Observe que a área total da ilhota e a área ocupada pelas células B são visivelmente aumentadas em animais R2d quando comparadas com os demais grupos, especialmente em comparação com o grupo R2. Esse aumento nas áreas totais da ilhota e de células B observado em animais R2d não é percebido no grupo R0d. Barra, 50µm.

Grupo	Peso Inicial (antes da dieta)	Peso Final (depois da dieta)	% Ganho de Peso	Glicemia Jejum inicial (antes da dieta)	Glicemia Jejum final (após a dieta)	Glicemia pós-prandial final	
♀ <b>R2</b>	20.19 ± 0.23 (17)	22.68 ± 0.32 (13) δ ( <b>P&lt;0.01</b> )	12.69 ± 1.45 (13)	76.00 ± 4.48 (13)	74.78 ± 4.87 (9)	126.8 ± 10.54 (5)	
♀ <b>R2d</b>	<b>19.99 ± 0.36 (19)</b>	25.34 ± 0.57 (14) ** (P<0.001)	29.44 ± 2.98 (14)* (P<0.01)	73.13 ± 4.77 (15)	71.70 ± 6.40 (10)	$142.6 \pm 3.67$ (5)	
<b>∂ R2</b>	$27.56 \pm 0.45$ (13)	$30.94 \pm 0.52 (13) \delta$ (P<0.001)	$10.03 \pm 1.96$ (11)	$72.09 \pm 6.00$ (11)	81.00 ± 4.66 (9)	115.5 ± 3.12 (4)	
് <b>R2d</b>	$27.56 \pm 0.58$ (15)	34.33 ± 0.69 (14)* ₩ (P<0.01) (P<0.001)	24.97 ± 4.30 (12)* (P<0.05)	$72.31 \pm 5.31$ (13)	$75.50 \pm 4.82$ (10)	145.3 ± 7.47 (4)*	
♀ <b>R0</b>	$19,08 \pm 0.50$ (15)	$20.98 \pm 0.37$ (12)	$10.54 \pm 4.57$ (12)	$75.4 \pm 5.91$ (10)	$71.6 \pm 4.02$ (9)	$139.6 \pm 20.42$ (5)	
♀ <b>R0d</b>	$18,46 \pm 0.52$ (16)	23.16 ± 0.84 (13) ** (P<0.001)	28.10 ± 2.96 (13)* (P<0.01)	$80.7 \pm 6.42$ (11)	$71.9 \pm 6.42$ (10)	171.8 ± 8.45 (5)	
<b>് R0</b>	25,38 ± 0.64 (14)# (P<0.05)	27.07 ± 0.85 (13)# (P<0.01)	6.14± 2.73 (11)	$105.8 \pm 7.63$ (10)	$79.9 \pm 2.29$ (9)	$147.0 \pm 3.85$ (4)	
് <b>R0d</b>	25,29 ± 0.50 (16)§ (P<0.05)	33.55 ± 1.05 (15)* ** (P<0.001) (P<0.001)	33.82 ± 5.21 (13)* (P<0.001)	103.3 ± 8.80 (11)	$92.9 \pm 7.06$ (10)	$159.3 \pm 7.86$ (4)	

Tabela I. Análise de parâmetros do quadro metabólico de animais submetidos à dieta normal ou hiperlipídica por 30 dias.

Análise do quadro metabólico de animais alimentados por 30 dias com dieta normal (grupos R2 e R0) ou com dieta hiperlipídica (grupos R2d e R0d). Todos os valores apresentados na tabela correspondem à média ± SEM (N), onde (N) refere-se ao número de animais utilizados.

As comparações entre os pesos iniciais (Pi) e finais (Pf) foram realizadas separadamente para as linhagens de animais R2 e R0 e são identificadas em vermelho:

δ expressa diferença significativa entre Pi e Pf dos animais controle e \*\* expressa diferença significativa entre Pi e Pf dos animais tratados com a dieta hiperlipídica. Já as diferenças significativas entre os grupos levando-se em conta apenas os valores iniciais **ou** finais, em separado, estão representadas da seguinte forma: \* expressa diferença significativa entre o grupo tratado com a dieta hiperlipídica e seu respectivo controle, ou seja, R2XR2d ou R0XR0d; # expressa diferença significativa os grupos controles das duas linhagens (R2X R0) e § expressa diferença significativa os grupos das duas linhagens tratados com a dieta hiperlipídica (R2dXR0d). As comparações descritas foram apenas realizadas entre animais do mesmo sexo.

Grupo	Peso animal – gramas (N)	Peso pâncreas - mg (N)	Área ilhota µm² (n)	Área de célula B (n)	Área de célula não B (n)	% Célula B/ ilhota (n)	% Célula não B/ilhota (n)	%Área Ilhota/área pâncreas (N)	Massa ilhota - mg (N)	Massa célula B mg (N)	N ilhotas/secção transversal
$\stackrel{\frown}{\to}$ Controle	$25.95 \pm 1.02$ (6)	169.5 ± 9.11 (6)	7385 ± 610.7 (349)	5711 ± 453.8 (349)	1674 ± 245.4 (349)	79.79 ± 0.81 (349)	20.21 ± 0.81 (349)	0.692 ± 0.127 (6)	1.137 ± 0.168 (6)	0.869 ± 0.100 (6)	9.69 ± 0.895 (6)
ू Tratado	33.05 ± 0.87 (6)* (P=0,0004)	158.7 ± 6.80 (6)	9836 ± 776.4 (401)* (P=0,0153)	8165 ± 656.3 (401)* (P=0,0029)	1671 ± 138.3 (401)	82.72 ± 0.67 (401)* (P=0,0053)	$17.28 \pm 0.67$ (401)* (P=0,0053)	1.008 ± 0.104 (6)	1.570 ± 0.117 (6)	1.299 ± 0.097 (6)* (P=0,0395)	11.13 ± 0.67 (6)
ే Controle	33.80 ± 0.53 (5)	195.0 ± 17.85 (5)	7018 ± 597.2 (269)	5861 ± 507.1 (269)	1157 ± 105.3 (269)	83.97 ± 0.69 (269)	16.03 ± 0.69 (269)	$0.446 \pm 0.050(5)$	0.851 ± 0.089 (5)	0.650 ± 0.094 (5)	8.96 ± 0.603 (5)
ే Tratado	41.62 ± 1.58 (5)* (P= 0,0016)	184.2 ± 18.36 (5)	11030 ± 935.6 (399)* (P= 0,0013)	9519 ± 822.7 (399)* (P= 0,0008)	1507 ± 136.2 (399)	85.68 ± 0.54 (399)* (P= 0,0487)	14.32 ± 0.54 (399)* (P= 0,0487)	1.128 ± 0.088 (5)* (P= 0,0001)	2.100 ± 0.304 (5)* (P= 0,0043)	1.799 ± 0.269 (5)* (P= 0,0038)	13.30 ± 1.44 (5)* (P=0,0241)

Tabela II. Parâmetros morfométricos do pâncreas endócrino de animais R2 submetidos à dieta (regular ou hiperlipídica) por 60 dias.

Os dados apresentados nessa tabela correspondem à média ± SEM (N). \* Expressa diferença significativa entre o grupo tratado com a dieta hiperlipídica e seu respectivo controle, (N) o número de animais e (n) o número de ilhotas analisadas.
Grupo	Peso animal – gramas (N)	Peso pâncreas - mg (N)	Área ilhota µm² (n)	Área de célula B (n)	Área de célula não B (n)	% Célula B/ ilhota (n)	% Célula não B/ilhota (n)	%Área Ilhota/área pâncreas (N)	Massa ilhota - mg (N)	Massa célula B - mg (N)	N ilhotas/secção transversal
$\stackrel{\bigcirc}{\to}$ Controle	21.49 ± 0.21 (4)	179.5 ± 6.513 (4)	9292 ± 850.9 (223)	7115 ± 677.6 (223)	2177 ± 204.8 (223)	74.45 ± 1.090 (223)	$25.55 \pm 1.09$ (223)	$0.714 \pm 0.059$ (4)	1.285 ± 0.131 (4)	0.938 ± 0.093 (4)	9.288 ± 0.794 (4)
ੂ Tratado	$26.63 \pm 2.11$ (4)	159.5 ± 3.227 (4)* P=0,0332	$6524 \pm 660.5$ (215)* P=0,0109	5219 ± 544.8 (215)* P=0,0305	1305 ± 144.2 (215)* P=0,0006	78.42 ± 1.067 (215)* P=0,0096	$21.58 \pm 1.067$ (215)* P=0,0096	$0.5540 \pm 0.118$ (4)	$0.8929 \pm 0.208$ (4)	0.686 ± 0.169 (4)	$8.955 \pm 1.122$ (4)
් Controle	$27.23 \pm 0.30$ (4)	186.3 ± 8.957 (4)	8366 ± 729.1 (231)	6780 ± 623.9 (231)	6780 ± 623.9 (231)	77.68 ± 0.959 (231)	$22.32 \pm 0.959$ (231)	$0.6798 \pm 0.160$ (4)	1.267 ± 0.323 (4)	$1.004 \pm 0.272$ (4)	$9.620 \pm 0.899$ (4)
් Tratado	38.23 ± 1.95 (4)* P=0,0014	153.3 ± 7.598 (4)* P=0,0308	8213 ± 891.0 (235)	6928 ± 777.0 (235)	6928 ± 777.0 (235)	80.82 ± 0.880 (235)* P=0,0162	19.18 ± 0.880 (235)* P=0,0162	0.8298 ± 0.119 (4)	1.289 ± 0.218 (4)	1.045 ± 0.184 (4)	9.788 ± 1.509 (4)

**Tabela III.** Parâmetros morfométricos do pâncreas endócrino de animais R0 submetidos à dieta (regular ou hiperlipídica) por 60 dias.

Os dados apresentados nessa tabela correspondem à média ± SEM (N). \* Expressa diferença significativa entre o grupo tratado com a dieta hiperlipídica e seu respectivo controle, (N) o número de animais e (n) o número de ilhotas analisadas.

# ESTRUTURA E FUNÇÃO DA JUNÇÃO COMUNICANTE NO PÂNCREAS ENDÓCRINO EM MODELO ANIMAL DE DIABETES TIPO 2.

### 1. INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta os resultados referentes à avaliação do acoplamento celular mediado pelas GJs e da expressão e distribuição celular das proteínas associadas à junção comunicante, as conexinas 36 e 43, e da proteína juncional ZO-1 (proteína da junção de oclusão) em ilhotas pancreáticas de camundongos *wild-type* (C57BL/6) ou *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLR<sup>-/-</sup>) que apresentam um quadro de pré-diabetes induzido pela administração de dieta hiperlipídica por curto período de tempo.

Como já abordado no Capítulo I, a junção comunicante desempenha importante papel em vários processos celulares e fisiológicos, como por exemplo, a proliferação e diferenciação celular, o desenvolvimento embrionário, a propagação da onda de contração cardíaca, a secreção glandular exócrina e endócrina, dentre outros. Tendo em vista a importância dessas junções em tantos processos fisiológicos, não é surpreendente que seja crescente o número de doenças que tenham a sua etiologia associada a mutações nos genes que codificam as conexinas e/ou a disfunção dos canais formados por essas proteínas (Laird, 2006; Gerido e White, 2004).

Particularmente interessante é a descoberta feita através do mapeamento genético de portadores de diabetes tipo 2 que revelou alterações em vários *loci* gênicos nestes indivíduos, incluindo o 15q14 (Mori et al., 2004; Cox et al., 1999), região compatível a do gene da Cx36 em humanos (Belluardo et al., 1999).

Embora uma correlação etiológica entre GJ e diabetes ainda não tenha sido diretamente estabelecida, nem experimentalmente nem clinicamente, algumas evidências apontam que essa correlação é plausível. Trabalhos, empregando a linhagem de células B, MIN6, transfectadas com cDNA anti-sense para Cx36, ou camundongos transgênicos, mostram que a perda da expressão de Cx36 pelas células B pancreáticas resulta em comprometimento da sincronização das oscilações intracelulares de cálcio, em secreção basal aumentada de insulina e resposta secretora deficitária de insulina a concentrações fisiológicas de glicose e a outros secretagogos (Wellershaus et al., 2008; Ravier et al., 2005; Calabrese et al., 2003). Adicionalmente, as oscilações do cálcio intracitoplasmático induzidas pela glicose estão desincronizadas em ilhotas de camundongos db/db (Roe et al., 1994) e ob/ob (Ravier et al., 2002). Tais alterações observadas em roedores são compatíveis com as mudanças que precedem o início do desenvolvimento da diabetes tipo 2 em humanos (por exemplo, perda das oscilações na concentração plasmática de insulina) e, mais tarde, caracterizam a doença (secreção basal aumentada de insulina e secreção de insulina deficitária na presença de concentrações pós-prandiais de glicose).

Nesta tese, utilizando um modelo de diabetes tipo 2, buscamos verificar se alterações na expressão/distribuição e/ou propriedade dos canais das GJs na célula B poderiam constituir-se em importantes eventos na fase inicial de desenvolvimento desta disfunção do pâncreas endócrino.

### 2. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1 Modelo de Diabetes tipo 2

O modelo *in vivo* de diabetes tipo 2 utilizado no presente capítulo é o mesmo apresentado no capítulo anterior. Resumidamente, camundongos C57BL/6 (grupo *wild-type* denominado R2) e LDLR*T* (grupo *knockout* denominado R0), fêmeas e machos, foram utilizados com 4 meses de idade. Os animais controle foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas e os animais LDLR*T* utilizados foram provenientes do CEMIB ou de cruzamentos realizados no biotério de animais transgênicos da Profa. Dra. Helena Oliveira (Departamento de Fisiologia e Biofísica, IB, UNICAMP). Parte dos animais dos dois grupos foi colocada em dieta com alto teor de lipídios (21%), enquanto, outra parte dos animais dos grupos R0 e R2 foi alimentada com dieta normal (4% de lipídios) por um período de 30 ou 60 dias. Para a maioria dos experimentos, a dieta hiperlipídica administrada foi preparada no laboratório (vide composição no Capitulo III, seção 2.1), exceto para os animais utilizados nos experimentos de microinjeção, onde utilizou-se uma ração adquirida comercialmente (com 24% de lipídios, D12451, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA). Todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (25°C), ciclo claro-escuro de 12h além de receberem ração e água *ad libitum*.

A grande maioria dos experimentos (a saber, aqueles envolvendo *Western Blot* e microinjeção de marcadores intracelulares) foi feita em animais submetidos a 60d de dieta; isto porque as alterações indicativas de distúrbio no metabolismo de carboidratos (como hiperglicemia) foram verificadas somente após este período, como reportado no Capitulo III desta tese. Somente a análise imunohistoquímica das proteínas estudadas foi feita em animais após 30 e 60 dias em dieta. Nos experimentos de microinjeção foram utilizados apenas camundongos machos e nos de imunohistoquímica foram utilizados preferencialmente machos (salvo em alguns casos específicos, conforme especificado na legenda das

figuras). Entretanto, no caso do *Western Blot*, devido à necessidade de utilizar um número maior de animais para obtenção do *pool* de ilhotas, foram utilizados camundongos de ambos os sexos.

#### 2.2 Imunohistoquímica para Cx36, Cx43 e ZO-1

Para a dupla localização celular de Cx36, Cx43 ou ZO-1 e insulina no pâncreas endócrino de camundongos dos diferentes grupos estudados, foi realizada a técnica de imumofluorescência indireta. Para tal, os pâncreas coletados foram imediatamente congelados em n-hexano resfriado com nitrogênio líquido.

Cortes histológicos de 8µm do material foram obtidos por criostato a -25°C e aderidos em lâminas tratadas com solução de 3-aminopropiltrietoxisilano (Sigma). No caso da Cx43, os cortes foram fixados por 8 minutos com paraformaldeído 2% e, após lavagem, permeabilizados com Triton X-100 em TBS 0,05 M pH 7,4 por 5 minutos. Já no caso da Cx36 os cortes foram apenas fixados com Acetona a -20°C sem a posterior permeabilização com Triton. Após o bloqueio de sítios inespecíficos com 5% de leite desnatado (Molico) em TTBS (TBS/Tween 20 0,1%), os cortes foram incubados por 2h a temperatura ambiente (TA) com o anticorpo primário específico: Rabbit anti-Cx36, Zymed (diluição 1:30) ou, Rabbit anti-Cx43, Sigma (diluição 1:500) ou, Rabbit anti ZO-1, Zymed (diluição 1:75). Após lavagem com TBS, os cortes foram expostos por 2 horas a TA com o anticorpo secundário específico conjugado com fluoresceína (Sigma) diluído em TBS com 1% leite desnatado, (diluição 1:300; 1:500, 1:400 para Cx36, Cx43 e ZO-1, respectivamente. A seguir, a co-imunoreação para insulina foi feita nos mesmos cortes, incubando-os por aproximadamente 1 h e 30 minutos com anticorpo anti-insulina (Dako, diluição 1:100) seguida da incubação por 2 h à TA com o anticorpo secundário específico conjugado com rodamina (Antiguinea pig IgG, Sigma, diluição 1:150).

Após montagem em lamínulas com Vectashield (Vector Laboratories), a localização da fluorescência no espécime foi detectada por um Microscópio de Varredura Confocal a Laser (Bio-Rad MRC 1024 do Instituto de Biologia/Faculdade de Engenharia de Alimentos ou Zeiss LSM 510 META da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP). Para permitir comparações quanto ao grau e o padrão da imunomarcação, os cortes dos pâncreas dos diferentes grupos experimentais foram processados para imunohistoquímica no mesmo dia e observados ao confocal na mesma sessão de microscopia.

Foram utilizados nas reações de imunohistoquímica em pâncreas de animais **tratados por 30 dias com dieta hiperlipídica**: 4 animais machos (de cada grupo: R0, R0d, R2 e R2d) e 2 fêmeas (de cada grupo: R0, R0d, R2 e R2d).

No caso das reações de imunohistoquímica em pâncreas de animais tratados por **60 dias com dieta hiperlipídica**, foram utilizados, no mínimo, 5 animais de cada grupo (R0, R0d, R2 e R2d) para ambos os sexos.

### 2.2.1 Quantificação do grau de fluorescência da imunomarcação para Cx36 e ZO-1

As imagens digitais obtidas das reações de imunohistoquímica para as proteínas Cx36 e ZO-1 foram posteriormente analisadas para a determinação semi-quantitativa da densidade integrada de *pixels* (quantificação da fluorescência). Para tal, foi mensurada, através do *software* ImageJ (National Institute of Health), a densidade integrada de *pixels* de pelo menos duas áreas quadradas de 2500 µm<sup>2</sup> por ilhota. As imagens das reações imunohistoquímicas para Cx36 e ZO-1 (60 dias de dieta) foram também analisadas por outro *software* Metamorph (Zeiss Image Examiner). Nesse caso a da densidade integrada de *pixels* da imunomarcação foi normalizada pela área das ilhotas. Resultados muito semelhantes aos obtidos com o *software* livre ImageJ foram verificados (dados não mostrados).

#### 2.2.2 Classificação do padrão de marcação para Cx36 e ZO-1

Como no caso da Cx36 e também da ZO-1 observamos uma possível tendência de alteração no padrão de marcação com a dieta hiperlipídica, realizamos uma análise semi-quantitativa das imagens obtidas para essas proteínas de modo a incluí-las em uma das três categorias descritas a seguir. Considerávamos que a marcação tinha **padrão aleatório** quando não conseguíamos detectar nenhum tipo de organização no padrão de marcação das proteínas; em contraste, quando o padrão de marcação dessas proteínas permitia a verificação da **tendência** à formação de grupos de células (ou subdomínios celulares) dentro da ilhota, classificávamos as mesmas na categoria de **tendência a formação de subdomínios;** essa categoria, por sua vez, diferencia-se da última, **marcação em subdomínios,** pois nessa os grupamentos celulares não são completamente delimitados ou facilmente identificáveis em comparação com a segunda categoria.

### 2.3 Isolamento de ilhotas pancreáticas

Ilhotas pancreáticas de camundongos dos diferentes grupos experimentais foram obtidas a partir da digestão do pâncreas com colagenase V (Sigma), seguida de separação por gradiente de Ficoll ou Histopack (Sigma) e coleta das mesmas sob lupa e com o auxílio de uma pipeta Pasteur estirada, como descrito previamente (Boschero et al., 1993).

O isolamento e coleta das ilhotas pancreáticas foi realizado com solução Hank's pH 7,4 (NaCl 136mM, KCl 5,4mM, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,26mM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,81mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,34mM, NaHCO<sub>3</sub> 4,2mM), suplementada com 5,6 mM de glicose e 1 mg/mL de albumina. A concentração de colagenase utilizada foi de 1,7 mg/mL e cerca de 2 mL de Hank's com colagenase foram injetados por pâncreas (fora do ducto pancreático).

No caso do isolamento de ilhotas de camundongos para os experimentos de microinjeção a concentração de colagenase utilizada foi de 4,5 mg por pâncreas, sem que a mesma tenha sido injetada no órgão. Para que a digestão com a colagenase fosse eficiente, os pâncreas foram vigorosamente picotados, ou seja, reduzidos a pequenos fragmentos, com o auxílio de três tesouras pequenas utilizadas simultaneamente.

#### 2.4 Western Blot

A metodologia de *Western Blot* foi empregada com a finalidade de detectar o nível de expressão celular das proteínas juncionais Cx36, Cx43 e ZO-1 em ilhotas pancreáticas dos diferentes grupos experimentais estudados e foi realizada segundo descrição de Collares-Buzato e colaboradores (2001).

Grupos de aproximadamente 1000 ilhotas foram homogeneizados em um coquetel anti-protease (10 mM imidazol pH 7,4; 4 mM EDTA; 1 mM EGTA; 200  $\mu$ M DTT; 0,5  $\mu$ g/ml pepstatina; 200 KIU/ml aprotinina; 200  $\mu$ M fenilmetilsufonilfluoreto; 2,5  $\mu$ g/ml leupeptina e 30  $\mu$ g/ml inibidor de tripsina). A determinação do conteúdo total de proteínas foi feita por espectrofotometria, usando-se o kit de ensaio de proteína da Bio-Rad. Alíquotas com 60  $\mu$ g (para Cx36 e Cx43) e de 30  $\mu$ g (para ZO-1) do homogeneizado foram incubadas a 37°C por 1 h em 30% do volume de 5x tampão de Laemmli (1x tampão: 50 mM Tris-HCl, 2% de SDS, 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol) e, então, aplicadas em gel 10% de SDS-PAGE (para Cx36 e Cx43) e gel 6,5% de SDS-PAGE (para ZO-1) (Laemmli, 1970). A eletroforese foi realizada com voltagem fixa de 200V, amperagem variável e solução de corrida (Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%) por aproximadamente 30 min. Posteriormente, as proteínas foram transferidas eletroforeticamente para membrana de nitrocelulose,

com o sistema de transferência ligado à fonte com voltagem fixa de 120 V, amperagem variável e tampão de transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,02%) por aproximadamente 1h (para Cx36 e ZO-1). No caso da Cx43 a transferência foi realizada com voltagem fixa de 30 V, amperagem variável e tampão de transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM) por aproximadamente 1 h. Após coloração reversível com solução de Ponceau S (Bio-Rad), para verificação do perfil protéico e controle da massa protéica aplicada nas linhas do gel, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em tampão Tris-salina (TBS: Trisma base 0,01 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05%, pH 7,4) overnight a 4°C. Então, as membranas foram incubadas por 1 h e à temperatura ambiente com os anticorpos primários específicos (Zymed), Rabbit anti-Cx36 (diluição 1:300 em TBS com 3% de leite desnatado), Mouse anti-Cx43 (diluição 1:160), Rabbit anti-ZO-1 (diluição 1:1500). Após lavagem do anticorpo primário, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários específicos (Zymed) conjugados com peroxidase (Goat anti-rabbit, diluição 1:2500 em TBS com 1% de leite desnatado, para Cx36 e ZO-1 e, Goat anti-mouse, diluição 1:3000, para Cx43). As bandas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência (kit Super Signal-PIERCE) utilizando filme para auto-radiografia. A densidade das bandas foi analisada pelo software Scion Image for Windows (Scion Corporation, USA) e "normalizada" em relação à densidade da banda obtida pela reincubação da membrana com anticorpo antiβ-actina (controle interno da reação). Em algumas membranas incubadas para ZO-1, essa "normalização" foi feita em relação à densidade da linha de corrida observada após coloração com Ponceau S (Bio-Rad).

#### 2.5 Microinjeção de Marcadores Intracelulares

Para determinar o grau de acoplamento celular medido pela GJ em ilhotas pancreáticas de animais R2 machos, controles e os tratados com dieta hiperlipídica por 60 dias, foi empregada a técnica de microinjeção de dois marcadores intracelulares, o Lucifer Yellow (LY) e o Brometo de Etídeo (BE), segundo a técnica descrita por Charpantier e colaboradores (2007), com modificações. O Lucifer Yellow é um marcador que possui duas cargas negativas e peso molecular de 443,2 Da, enquanto o Brometo de Etídeo possui uma carga positiva e peso molecular de 314,1 Da. A utilização de diferentes marcadores é interessante visto que os canais formados por diferentes subtipos de conexinas apresentam propriedades específicas de permeabilidade e seletividade a marcadores que apresentem diferentes cargas e tamanhos (Mills e Massey, 1995; Meda, 2000). Os canais de Cx36, em particular, permitem a difusão preferencial de moléculas carregadas positivamente (EB) em comparação com as negativas (LY) (Charpantier et al., 2007).

Para a microinjeção, ilhotas foram inicialmente isoladas, conforme descrito na seção 2.3, e então aderidas em placas de Petri contendo uma camada de Sylgard (silicone, Dow Corning, Alemanha) e tratadas com poli-L-lisina (Sigma). Para preparação da película de poli-L-lisina, as placas de Petri foram incubadas por pelo menos 2 h, a 37°C com uma solução contendo 1 mg/ml de poli-L-lisina em PBS (pH 7.3). Antes do uso, as placas foram lavadas com água destilada, secas e no centro de cada uma foram colocadas de uma a duas ilhotas para aderir por pelo menos 1 h à temperatura ambiente, em câmara úmida, com 40 μL de solução tamponada de Hank's (composição em mmol/L: NaCl 138, KCl 5, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,25, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,8, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,34, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,35, NaHCO<sub>3</sub> 4,2, glicose 2,8 e HEPES 10, pH7,3). Todas as ilhotas foram utilizadas dentro de no máximo 6 h após adesão; durante este período, o acoplamento intercelular tem sido descrito permanecer estável (Charpantier et al., 2007).

Após adesão da ilhota, foram adicionados, à placa, 2 mL de solução de Krebs. A placa contendo a ilhota aderida foi, então, transferida para a platina, adaptada e aquecida a 37°C, de um microscópio de fluorescência padrão (Zeiss). As células da ilhota foram injetadas com um microeletrodo de vidro contendo na sua extremidade aproximadamente 10 µL de uma solução com 4% de Lucifer Yellow (Sigma) e 4% de Brometo de Etídeo (Sigma) em 150 mmol/L de LiCl tamponada com 10 mmol/L HEPES (pH 7.2). A "ponte" entre a solução de traçadores e o eletrodo foi feita com a adição de uma solução de 3 mol/L LiCl (pH 7.2) na microinjeção. Os traçadores foram injetados simultaneamente por 10 minutos, através da aplicação de pulsos "quadrados" (com amplitude de 0.1 nA, duração de 900 ms, frequência de 0.5 Hz) com polaridade alternada (positiva para EB e negativa para LY). Logo após a injeção, o campo de difusão dos tracadores foi fotografado por uma câmera digital Axiocam (Carl Zeiss SMT, Alemanha) acoplada a um sistema de aquisição de imagens; o tempo de exposição foi constante para cada tracador. A extensão do acoplamento foi determinada medindo-se a área marcada após a injeção dos traçadores (área de difusão) (Lucifer Yellow e Brometo de Etídeo) com o uso do software livre ImageTool (http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html). Também, conforme descrito por Charpantier e colaboradores (2007), algumas ilhotas microinjetadas foram fixadas com 2% de paraformaldeido em 0,1 mol/L tampão fosfato, incluídas em Epon e processadas para imunohistoquímica para insulina para confirmação do sítio da microinjeção.

### 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.** RESULTADOS

A Figura 1 mostra os resultados referentes à localização celular de Cx36 e insulina em pâncreas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou regular pelo período de 30 dias. Em **a**, **e** são apresentadas ilhota de animal R0; em **b**, **f** ilhota de animal R0d; em **c**, **g** ilhota de animal R2; e em **d**, **h** ilhota de animal R2d. Observe que a marcação para Cx36 (Figura 1, seta) é verificada conectando grupo de células, ou seja, formando ou evidenciando uma tendência para a formação de subdomínios nas ilhotas de animais R0 e R2 após a administração de dieta hiperlipídica por 30 dias (asteriscos em f e h, respectivamente). Um padrão de distribuição mais aleatório foi observado em camundongos R0 e R2 alimentados com dieta regular. Realizamos uma análise semi-quantitativa nas imagens obtidas para Cx36 e os resultados sugerem que os grupos tratados com dieta hiperlipídica (R0d e R2d) apresentam um padrão de marcação em subdomínios ou de tendência à formação dos mesmos, em comparação aos respectivos grupos controle (Figura 2b). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas com relação ao grau de fluorescência para Cx36 entre os grupos estudados (Figura 2a).

Resultados semelhantes a esses foram também obtidos para os animais alimentados por 60 dias. Entretanto, nesse caso, o estabelecimento de subdomínios celulares não foi tão evidente como o observado para os animais alimentados por 30 dias. Para tal, compare Figuras 1 e 2 (30 dias de dieta) com 3 e 4 (60 dias de dieta).

Os dados de *Western Blot* para Cx36 demonstram uma tendência à diminuição (de aproximadamente 25% para o grupo *wild-type* e de 30% para o grupo R0) da expressão da Cx36 em ilhotas dos grupos tratados com dieta hiperlipídica por 60 dias (grupos R0d e R2d) em relação aos seus respectivos controles. Essa diminuição não foi estatisticamente significativa quando comparamos todos os grupos pelo teste de análise de variância (*one-way* ANOVA) (Figura 5d); entretanto, quando realizamos a comparação dos grupos tratados com seus respectivos controles, em separado, utilizando o teste *t-Student* verificamos uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos R2 e R2d (P=0,0109). Provavelmente, essa tendência de diminuição não foi estatisticamente significativa para os animais *knockout* por causa do grau de variância mais alto neste grupo. Note também, na figura 5b, que a Cx36 foi detectada em suas formas dimérica (66 kDa) e monomérica (36 kDa) e que a forma monomérica foi apenas detectada nos grupos controle, o que evidencia a diminuição da expressão nos grupos tratados com a dieta hiperlipídica. A Figura 5c apresenta a re-incubação da mesma membrana mostrada em b para β-actina (controle interno da reação).

Com relação ao outro subtipo de conexina estudado nesse trabalho, a Cx43, nossos resultados de imunohistoquímica indicam a presença específica de imunomarcação para essa proteína em capilares

dentro da ilhota (setas nas Figuras 6 e 7). Não foram observadas diferenças com relação à marcação/distribuição de acordo com o tempo de administração da dieta (Figuras 6, para dieta 30 d e, figura 7, dieta 60 d), bem como, no grau de expressão para essa proteína juncional entre os grupos estudados (figura 8). Entretanto, os de *Western Blot* revelam uma tendência de aumento de expressão dessa proteína nos grupos tratados com dieta hiperlipídica (diferença não estaticamente significativa). A figura 8b mostra que foram detectadas duas formas fosforiladas e uma forma não fosforilada dessa proteína nos homogenados de ilhotas dos grupos estudados. Resultados semelhantes a esses foram também obtidos em ilhotas de ratos (vide capítulo II) e em outros tecidos, tais como o músculo estriado cardíaco e algumas linhagens celulares (Solan et al., 2007; Cruciani e Mikalsen, 1999; Kuroki et al., 1998).

Já em relação à proteína associada à junção de oclusão ZO-1, nossos resultados de imunohistoquímica revelam uma tendência ao padrão de marcação em subdomínios em ilhotas de animais alimentados com dieta hiperlipídica, assim como anteriormente descrito para Cx36 nesses animais. Esse padrão de marcação foi especialmente verificado aos 30 dias de dieta (Figuras 9, para 30 dias de dieta e, Figura 10 e 11b, para 60 dias de dieta). O grau de expressão de ZO-1, analisado por *Western Blot*, demonstra uma tendência de aumento (de aproximadamente 2,7 vezes para o grupo *wild-type* e de 1,2 vezes para o grupo R0) na expressão desta proteína em ilhotas dos grupos tratados com dieta hiperlipídica por 60 dias (grupos R0d e R2d) em relação aos seus respectivos controles. As diferenças observadas não se mostraram estatisticamente significativas quando comparamos todos os grupos pelo teste de análise de variância (*one-way* ANOVA) (Figura 12d). Entretanto, quando realizamos a comparação dos grupos tratados com seus respectivos controles, em separado, utilizando o teste t-Student verificamos uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos R2 e R2d (P=0,0056).

Para avaliar o aspecto funcional dos canais da junção comunicante no pâncreas endócrino de camundongos R2 alimentados por 60 dias com dieta regular (R2) ou hiperlipídica (R2d) foi realizada a microinjeção dos marcadores intracelulares: Lucifer Yellow (Figura 13, **a** e **b**) e Brometo de Etídeo (Figura 13, **c** e **d**). Note na **Figura 13e** que, em ambos os grupos (R2 e R2d), os canais das GJs foram significativamente mais permeáveis à passagem de Brometo de Etídeo do que ao Lucifer Yelow (\*\*\*P<0,001 para R2 LY X R2 EB e \*\*P<0,01 para R2d LY X R2d EB). Observe, também, que o tratamento com a dieta hiperlipídica induziu uma diminuição de aproximadamente 30% (não estatisticamente significativa) do acoplamento celular mediado pelas GJs, avaliada através da microinjeção de Brometo de Etídeo.

#### 4. DISCUSSÃO

Várias evidências têm indicado que o acoplamento intercelular mediado pelas GJs, bem como a expressão de sua proteína integrante, a Cx36, *per se* desempenham um papel regulatório importante em várias funções da célula B pancreática, que incluem a biossíntese, estocagem e liberação de insulina (Speier et al., 2007; Ravier et al., 2005; Calabrese et al., 2004, 2003). Adicionalmente, tem sido sugerido que a Cx36 pode estar implicada no balanço crucial entre proliferação e morte da célula B e na regulação da expressão de certos genes neste tipo celular (Nlend Nlend et al., 2006). Portanto, é plausível sugerir que alterações na Cx36, resultando em comprometimento do acoplamento intercelular ou de vias de sinalização importantes para a secreção de insulina, possam estar implicadas na patogênese da diabetes.

Essa tese, pela primeira vez, demonstra que, em modelo animal de diabetes tipo 2, o estado de prédiabetes em camundongos é acompanhado de alterações na expressão e distribuição celular de Cx36 e no acoplamento intercelular mediado pelas GJs, bem como na expressão da Cx43 e ZO-1, em ilhotas pancreáticas.

Como descrito no capitulo III desta tese, a dieta hiperlipídica, por um período relativamente curto de 60 dias, induz um quadro definido como pré-diabetes em camundongos C57BL/6 que constitui a fase inicial da diabetes tipo 2. Tal quadro é caracterizado por obesidade e hipercolesterolemia associadas a um estado de moderada hiperglicemia, hiperinsulinemia e significativa intolerância à glicose e resistência à insulina. Nestes camundongos pré-diabéticos, observamos uma diminuição de aproximadamente 30% na expressão da Cx36 nas ilhotas pancreáticas, acompanhada de redução no acoplamento intercelular como medido pela microinjeção de brometo de etídeo.

Em concordância com os dados publicados por Charpantier e colaboradores (2007), nossos resultados de microinjeção mostram que, em ilhotas de camundongos, tanto controles como tratados com dieta hiperlipídica, os canais de Cx36 das células B são mais permeáveis a molécula catiônica de Brometo de Etídeo do que a de Lucifer Yellow, que é carregada negativamente.

Ainda, embora os animais R0 tratados com dieta hiperlipídica tenham mostrado alterações mais pronunciadas no que se refere à glicemia em jejum e ao teste de GTT quando comparados ao grupo R2 (vide capítulo III desta tese), nós não verificamos aqui diferenças na expressão de Cx36 nas ilhotas entre estes dois grupos experimentais. Isto sugere que a maior susceptibilidade metabólica à dieta, verificada nos animais R0 (*knockout*), provavelmente não está relacionada a modificações na estrutura e função das GJs no pâncreas endócrino.

A análise da localização celular de Cx36, por imunohistoquímica, revelou que ilhotas de animais tratados com dieta hiperlipídica (grupos R0d e R2d) apresentam tendência a uma marcação que delimita

grupos de células dentro da ilhota, ou subdomínios celulares. Esse padrão de marcação se mostrou mais proeminente após a administração dessa dieta por 30 dias. Não existe na literatura nenhum registro a respeito desse padrão diferencial de marcação para Cx36 (em subdomínios) como o observado em nossos animais tratados com dieta hiperlipídica. Trabalhos anteriores reportam que a transferência de marcadores intracelulares parece ser restrita a determinados grupos de células B (Pedersen et al., 2005; Caton et al., 2003; Meda et al., 1983, 1981; Kohen et al., 1979), em contraste com estudos de eletrofisiologia que revelam que o acoplamento iônico entre as células B se estende a grandes regiões dentro da ilhota (Speier et al., 2007; Kanno et al., 2002; Andreu et al., 1997; Mears et al., 1995). No entanto, até o presente momento, não foi esclarecido se a discordância desses estudos nessa questão é atribuída à possível existência de compartimentos celulares com propriedades metabólicas distintas dentro da ilhota ou, apenas se deva a diferencas na sensibilidade e especificidade dos métodos utilizados nesses trabalhos. No que diz respeito a esse trabalho, permanece a ser esclarecido se existe alguma importância funcional no estabelecimento dos subdomínios celulares como os evidenciados pela imunohistoquímica e se eles, de alguma forma, suportam as observações de que a transferência de marcadores intracelulares parece ser restrita a determinados grupos de células B (Pedersen et al., 2005; Caton et al., 2003; Meda et al., 1983, 1981; Kohen et al., 1979).

Auxiliam-nos na interpretação dos dados de *Western Blot* para Cx36, trabalhos recentes com linhagens de células B que verificaram o efeito da exposição crônica à altas concentrações de glicose e a ácidos graxos saturados sobre a expressão de Cx36 (Allagnat et al., 2008, 2005). Esses estudos revelaram que tais tratamentos causam diminuição da expressão desse gene, mediada pela via cAMP/PKA, que promove o aumento da expressão dos níveis de ICER- $\gamma$ , e por sua vez se liga à uma seqüência da região promotora do gene da Cx36, modulando assim a sua expressão (Allagnat et al., 2008, 2005). Esses trabalhos suportam os resultados obtidos com nosso modelo *in vivo*, no qual os camundongos tratados com dieta hiperlipídica, animais hipercolesterolêmicos e ligeiramente hiperglicêmicos apresentaram tendência a diminuição da expressão de Cx36 e redução no acoplamento intercelular, estudado através da microinjeção de brometo de etídeo.

Além da Cx36, foram também estudadas outras proteínas juncionais no nosso modelo, a Cx43 e a ZO-1. A razão de incluirmos a ZO-1 no nosso estudo baseia-se em dados recentes da literatura que mostram que esta proteína juncional co-imunoprecipita com a Cx36 em vários tipos celulares (a saber, em neurônios, células das ilhotas pancreáticas, linhagens de células B e células cromafins da medula da adrenal), sugerindo 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).

Interessantemente, a alteração verificada na expressão de Cx43 e ZO-1 após tratamento com a dieta hiperlipídica foi exatamente oposta à observada para Cx36. Ilhotas pancreáticas de animais submetidos à dieta hiperlipídica por 60 dias mostraram um pequeno aumento na expressão dessas proteínas. Esse dado reforça ainda mais a observação que o estado pré-diabético é associado à repressão da expressão de Cx36 e que este efeito deve ser funcionalmente relevante e específico a esta proteína da GJ.

A Cx43 foi especificamente identificada em capilares nas ilhotas dos animais utilizados em nosso modelo de diabetes tipo 2. Tais resultados confirmam e concordam com trabalhos publicados anteriormente, como o de Theis e colaboradores (2004) que, através de estudos com genes repórter, demonstraram que a expressão de Cx36 e Cx43 são, específica e respectivamente, associadas às células B e células endoteliais de capilares dentro da ilhota.

A tendência de aumento de expressão da Cx43 nos grupos tratados com dieta hiperlipídica observada nos dados de *Western Blot* pode nos levar a uma interessante linha de interpretação. Um estudo com ratos ZDF pré-diabéticos mostrou um aumento da microvascularização das ilhotas desses animais, através de análises morfométricas e de expressão gênica de alguns marcadores endoteliais, como o VEGF (Li et al., 2006). A Cx43 é o subtipo de conexina das células endoteliais da microvasculatura da ilhota e, os dados de *Western Blot* para essa proteína revelam que a mesma é mais expressa exatamente nos grupos tratados com dieta hiperlipídica (animais pré-diabéticos).

Com relação à ZO-1, o aumento verificado na expressão dessa proteína juncional e a possível colocalização da Cx36 e da ZO-1 nos grupos tratados com dieta hiperlipídica pode ser correlacionado com a alteração na distribuição celular e de diminuição da expressão protéica da Cx36 observada nesses grupos. Dados da literatura sugerem que a proteína ZO-1 desempenha importante papel na organização dos canais intercelulares na membrana e no *turnover* de vários subtipos de conexina, incluindo a Cx36 e a Cx43 (Girao e Pereira, 2007; Li et al., 2004 a, b; Segretain et al., 2004; Barker et al., 2002). Estudos com células de Sertoli e cardiomiócitos sugerem a participação da ZO-1 na via endocitose e degradação dos conexons da placa juncional (Segretain et al. 2004; Barker et al. 2002). No contexto do presente trabalho, o aumento da expressão de ZO-1 e sua possível co-localização com a Cx36 pode estar correlacionado com o papel sugerido para essa proteína na via endocitose e degradação dos conexons, visto que observamos uma diminuição da expressão de Cx36 em ilhotas de animais tratados com dieta hiperlipídica.

Adicionalmente, como demonstrado nas Figuras 9, 10 e 11b e, em semelhança aos dados obtidos para Cx36, nossos resultados de imunohistoquímica revelam uma tendência ao padrão de marcação em subdomínios em ilhotas de animais alimentados com dieta hiperlipídica. Estudos em outros tecidos e órgãos, como o muscular estriado cardíaco, a retina e o bulbo olfatório, demonstram a co-localização de ZO-1 com conexinas (36 e 43) e sugerem a importância da ZO-1 no remodelamento dos canais formados

pelas GJs nesses tecidos/órgãos e nas taxas de *turnover* dessas proteínas (Li et al., 2004b; Barker et al. 2002). Em particular, os trabalhos de Li e colaboradores (2004 a, b) demonstram a co-localização de ZO-1 com a Cx36 em vários tecidos, inclusive o pâncreas endócrino.

O fato de não termos obtido profundas alterações na expressão e localização celular das proteínas associadas à junção comunicante e de oclusão aqui estudadas, estão de acordo com o estado metabólico desses animais que se encontram ainda na fase inicial da diabetes tipo 2 (estado de pré-diabetes).

Estudos anteriores já haviam reportado que o bloqueio da expressão de Cx36 em animais *knockout* para esse gene (Speier et al. 2007; Ravier et al., 2005) está associado a perda do padrão oscilatório de secreção de insulina, à secreção basal de insulina aumentada e a resposta secretória de insulina à condições pós-prandiais de glicose deficitária (Klee et al., 2008). Tais características são, por sua vez, associadas ao quadro metabólico apresentado por pacientes com diabetes tipo 2. Sendo assim, a diminuição na expressão da Cx36 observada nesse trabalho por *Western Blot*, somada à redução no acoplamento intercelular avaliado pela microinjeção de brometo de etídeo em animais tratados com dieta hiperlipídica (animais pré-diabéticos) pode ser indicativa de uma possível correlação entre a Cx36 do pâncreas endócrino e a diabetes tipo 2 desde o início do estabelecimento desta disfunção.

### **5. FIGURAS E LEGENDAS**

## Figura 1: Dupla marcação para Cx36 e insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos R0 e R2 machos após 30 dias em dieta.

As fotomicrografias a, b, c, d apresentam a marcação para Cx36 em ilhotas pancreáticas de camundongos dos grupos: R0, R0d R2 e R2d, respectivamente. Enquanto que, as figuras e, f, g, h mostram a dupla marcação para Cx36 e insulina nas mesmas ilhotas citadas anteriormente. Note a presença da marcação para Cx36 (seta) conectando grupamentos de células, ou seja, subdomínios celulares dentro das ilhotas de animais R0 e R2 alimentados com dieta hiperlipídica (R0d e R2d), asteriscos em f e h, respectivamente. Um padrão de distribuição mais aleatório foi observado em camundongos R0 e R2 alimentados com dieta regular. Barra, 50 µm.





### Figura 2: Análise semi-quantitativa do grau de fluorescência e do padrão de distribuição da imunomarcação para Cx36 em ilhotas de camundongos R0 e R2 (30 dias dieta).

O grau de fluorescência emitido pela imunomarcação para Cx36 foi quantificado em áreas quadradas (2500  $\mu$ m<sup>2</sup>) através do software ImageJ (Fig. 2a). Os resultados apresentados nessa figura correspondem a média das medidas de pelo menos 2 áreas diferentes por ilhota. Foram amostradas pelo menos 19 ilhotas por grupo provenientes de 3 experimentos independentes. Não foram observadas diferenças significativas com relação ao grau de fluorescência para Cx36 entre os grupos estudados (P>0,05). Com relação ao padrão de marcação para Cx36, observou-se que ilhotas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (R0d ou R2d) apresentam uma redistribuição (ou tendência a redistribuição) do padrão de marcação para Cx36, quando comparadas com as dos grupos alimentados com dieta controle (Fig. 2b), especialmente quando se compara com as do grupo R0, que exibe padrão preferencialmente aleatório no caso dessa proteína juncional. N=30 ilhotas por grupo de 3 experimentos independentes.

## Figura 3: Dupla marcação para Cx36 e insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos R0 e R2 (60 dias dieta).

As fotomicrografias a, b, c, d apresentam a marcação para Cx36 em ilhotas pancreáticas de camundongos dos grupos: R0, R0d R2 e R2d, respectivamente. Enquanto que, as figuras e, f, g, h mostram a dupla marcação para Cx36 e insulina nas mesmas ilhotas citadas anteriormente. Note que, em comparação com a figura 1 (30 dias dieta), a marcação para Cx36 conectando grupos de células, subdomínios, que é observada em ilhotas dos animais R0d e R2d (R0 e R2 alimentados com dieta hiperlipídica), não é tão evidente para os mesmos grupos quando a dieta é administrada por 60 dias. Barra, 20 µm.





### Figura 4: Análise semi-quantitativa do grau de fluorescência e do padrão de distribuição da imunomarcação para Cx36 em ilhotas de camundongos R0 e R2 machos e fêmeas (60 dias dieta).

O grau de fluorescência emitido pela imunomarcação para Cx36 foi quantificado em áreas quadradas (2500  $\mu$ m<sup>2</sup>) através do software ImageJ (Fig. 4a). Os resultados apresentados nessa figura correspondem a média das medidas de pelo menos 2 áreas diferentes por ilhota. Foram amostradas pelo menos 14 ilhotas por grupo provenientes de 4 experimentos independentes. Não foram observadas diferenças significativas com relação ao grau de fluorescência para Cx36 entre os grupos estudados (P>0,05). Com relação ao padrão de marcação para Cx36, observou-se que ilhotas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (R0d ou R2d) apresentam uma tendência a redistribuição da marcação para Cx36 em subdomínios em comparação com os respectivos grupos alimentados com dieta controle (Fig. 4b). N=14-17 ilhotas por grupo de 4 experimentos independentes.



Figura 5: Expressão de Cx36 em ilhotas pancreáticas de camundongos R0 e R2 após 60 dias de dieta.

O painel **a** mostra o perfil protéico dos homogeneizados de ilhotas de camundongos R0 e R2 alimentados com dieta regular (grupos R0 e R2) ou hiperlipídica (grupos R0d e R2d). A mesma membrana mostrada em **a**, foi submetida à reação para imunodetecção da Cx36 (**figura b**). Essa proteína juncional foi detectada em suas formas dimérica (66 kDa) e monomérica (36 kDa). Após *stripping* da membrana, a mesma foi re-incubada para  $\beta$ -actina (controle interno da reação) (**figura c**). Em **d**, observe a análise dos valores da densidade óptica das bandas da Cx36 normalizados com os valores obtidos para  $\beta$ -actina. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Foram analisadas 9 membranas, provenientes de 5 experimentos independentes.

### Figura 6: Dupla marcação para Cx43 e insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos R0 e R2 (30 dias dieta).

As fotomicrografias a, b, c, d apresentam a marcação para Cx43 em ilhotas pancreáticas de camundongos dos grupos: R0, R0d, R2 e R2d, respectivamente. Enquanto que, as figuras e, f, g, h mostram a dupla marcação para Cx43 e insulina nas mesmas ilhotas citadas anteriormente. Note a fraca marcação para Cx43 (seta) dentro da ilhota e, que, a mesma foi restrita a capilares. Os grupos R0 e R2 foram alimentados por 30 dias com ração regular, enquanto, os grupos R0d e R2d foram alimentados pelo mesmo período de tempo com ração hiperlipídica. Barra, 50 µm.



### Figura 7: Dupla marcação para Cx43 e insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos R0 e R2 fêmeas (60 dias dieta).

As fotomicrografias a, b, c, d apresentam a marcação para Cx43 em ilhotas pancreáticas de camundongos dos grupos: R0, R0d, R2 e R2d, respectivamente. Enquanto que, as figuras e, f, g, h mostram a dupla marcação para Cx43 e insulina nas mesmas ilhotas citadas anteriormente. Note a fraca marcação para Cx43 dentro da ilhota (seta em d) e, que, a mesma foi restrita a capilares. Os grupos R0 e R2 foram alimentados por 60 dias com ração regular, enquanto, os grupos R0 e R2d foram alimentados pelo mesmo período de tempo com ração hiperlipídica. Barra, 50  $\mu$ m.





Figura 8: Expressão de Cx43 em ilhotas pancreáticas de camundongos R0 e R2 (60 dias dieta).

O painel **a** mostra o perfil protéico dos homogeneizados de ilhotas de camundongos R0 e R2 alimentados com dieta regular (grupos R0 e R2) ou hiperlipídica (grupos R0d e R2d). A mesma membrana mostrada em **a**, foi submetida à reação para imunodetecção da Cx43 (**figura b**). O anticorpo para Cx43 detectou a forma não fosforilada (a banda mais inferior) e outras duas formas fosforiladas da proteína (as outras duas bandas superiores). Após *stripping* da membrana, a mesma foi re-incubada para  $\beta$ -actina (controle interno da reação) (**figura c**). Em **d**, observe a análise dos valores da densidade óptica das bandas da Cx43 normalizados com os valores obtidos para  $\beta$ -actina. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Foram analisadas 8 membranas, provenientes de 4 experimentos independentes.

## Figura 9: Dupla marcação para ZO-1 e insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos R0 e R2 (30 dias dieta).

As fotomicrografias a, b, c, d apresentam a marcação para ZO-1 em ilhotas pancreáticas de camundongos dos grupos: R0, R0d R2 e R2d, respectivamente. Enquanto que, as figuras e, f, g, h mostram a dupla marcação para ZO-1 e insulina nas mesmas ilhotas citadas anteriormente. Assim como foi observado para Cx36 (30 dias dieta, figura 1), note que também existe uma tendência da marcação para ZO-1 em delimitar grupos de células B, subdomínios (\*), dentro das ilhotas de animais R0 e R2 alimentados com dieta hiperlipídica (R0d e R2d).

Barra, 50 µm.



### Figura 10: Dupla marcação para ZO-1 e insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos R0 e R2 (60 dias dieta).

As fotomicrografias a, b, c, d apresentam a marcação para ZO-1 em ilhotas pancreáticas de camundongos dos grupos: R0, R0d R2 e R2d, respectivamente. Enquanto que, as figuras e, f, g, h mostram a dupla marcação para ZO-1 e insulina nas mesmas ilhotas citadas anteriormente. Note que, em comparação com a figura 12 (30 dias dieta), a marcação para ZO-1 delimitando subdomínios que é observada em ilhotas dos animais R0d e R2d (R0 e R2 alimentados com dieta hiperlipídica), não é tão evidente para os mesmos grupos quando a dieta é administrada por 60 dias. Barra, 20 µm.



## Figura 11: Análise quantitativa do grau de fluorescência da imunomarcação para ZO-1 em ilhotas de camundongos R0 e R2 (60 dias dieta).

O grau de fluorescência emitido pela imunomarcação para ZO-1 foi quantificado em áreas quadradas  $(2500 \ \mu m^2)$  através do software ImageJ (Fig. 11a). Os resultados apresentados nessa figura correspondem a média das medidas de pelo menos 2 áreas diferentes por ilhota. Foram amostradas pelo menos 15 ilhotas por grupo provenientes de 4 experimentos independentes. Não foram observadas diferenças significativas com relação ao grau de fluorescência para ZO-1 entre os grupos estudados (P>0,05). Com relação ao padrão de marcação para ZO-1, observou-se que ilhotas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (R0d ou R2d) apresentam uma tendência a redistribuição da marcação para essa proteína em subdomínios em comparação com os respectivos grupos alimentados com dieta controle (Fig. 11b). N=15-19 ilhotas por grupo de 4 experimentos independentes.



Padrão de Marcação para ZO-1

b)

a)

93



Figura 12: Expressão de ZO-1 em ilhotas pancreáticas de camundongos R0 e R2 (60 dias dieta).

O painel **a** mostra o perfil protéico dos homogeneizados de ilhotas de camundongos R0 e R2 alimentados com dieta regular (grupos R0 e R2) ou hiperlipídica (grupos R0d e R2d). A mesma membrana mostrada em **a**, foi submetida à reação para imunodetecção da proteína juncional ZO-1 (**figura b**). Em **c**, observe a análise dos valores da densidade óptica das bandas da ZO-1 normalizados com os valores obtidos para  $\beta$ -actina (controle interno). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Foram analisadas 6 membranas, provenientes de 4 experimentos independentes.

### Figura 13: Avaliação do acoplamento celular em ilhotas de camundongos R2 alimentados por 60 dias.

A avaliação do grau de acoplamento celular mediado pelas GJs em ilhotas de camundongos R2 alimentados por 60 dias com dieta regular (R2) ou hiperlipídica (R2d) foi realizada através da microinjeção de marcadores intracelulares. Ilhotas de animais R2 são mostradas em **a** e **c**, enquanto ilhotas de animais tratados com dieta hiperlipídica são apresentadas em **b** e **d**. As ilhotas mostradas em **a** e **b** foram microinjetadas com Lucifer Yellow (LY) e as mostradas em **c** e **d** com Brometo de Etídeo (EB). Em **e** o gráfico representativo das microinjeções para os dois traçadores. O número de ilhotas analisadas encontra-se dentro de cada barra. As ilhotas foram provenientes de 7 animais R2 e 6, R2d. Note que, tanto em animais R2 como para animais R2d, os canais das GJs foram mais permeáveis à passagem de Brometo de Etídeo do que ao Lucifer Yelow (\*\*\*P<0,001 para R2 LY X R2 EB e \*\*P<0,01 para R2d LY X R2d EB). Observe também a tendência de diminuição do acoplamento celular no grupo tratado com dieta hiperlipídica verificada com a microinjeção entre os grupos controle e dieta para os mesmos marcadores (R2 EB X R2d EB, ou, R2 LY X R2d LY) também não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Barra, 50 µm.





Grupos

e)

### **CONCLUSÕES**

### MODELO IN VIVO DE MATURAÇÃO DA CÉLULA B E DO PROCESSO SECRETÓRIO DE INSULINA

- A análise do grau de expressão gênica e proteíca de Cx36 em ilhotas pancreáticas de ratos durante o desenvolvimento revelam que as células B de fetos e recém-nascidos (período perinatal) exibem expressão significativamente baixa dessa conexina em comparação com as de ratos jovens e adultos.
- Os dados de microinjeção apóiam esses resultados, visto que ilhotas de recém-nascidos apresentam área de acoplamento para o traçador Brometo de Etídeo significativamente menor do que a observada par ilhotas de ratos adultos. Canais formados pela Cx36 favorecem a passagem de moléculas catiônicas como o traçador Brometo de Etídeo.
- Inversamente, ilhotas de ratos de estágios iniciais do desenvolvimento têm expressão gênica e protéica significativamente maior de Cx43 do que a observada em ilhotas de ratos jovens e adultos. A expressão deste subtipo de conexina (Cx) foi observada principalmente em células não B localizadas na periferia das ilhotas de fetos e recém-nascidos e em células endoteliais de ilhotas de jovens e adultos. Não foram encontradas diferenças significativas com relação ao grau de expressão e localização celular de Cx45 entre os grupos analisados.
- A reduzida expressão de Cx36 verificada em células B de ilhotas de ratos do estágio perinatal e o conseqüente acoplamento intercelular deficitário parecem contribuir para a baixa resposta secretória induzida pela glicose observada nos estágios iniciais de desenvolvimento. Estudos anteriores já haviam reportado que níveis adequados de Cx36 são requeridos para uma apropriada secreção de insulina estimulada pela glicose ou por secretagogos não metabolizáveis
## MODELO IN VIVO DO COMPROMETIMENTO PROGRESSIVO DO PROCESSO SECRETÓRIO DE INSULINA

- Demonstramos que a dieta hiperlipídica, por um período relativamente curto de 60 dias, já induz um quadro definido como pré-diabetes em camundongos C57BL/6, *wild-type* (R2) e *knockout* para LDLR (R0); o estado de pré-diabetes é caracterizado por hiperglicemia, hiperinsulinemia e significativa intolerância à glicose e resistência à insulina.
- As alterações no metabolismo de carboidratos em resposta à dieta foram mais severas nos animais machos e *knockout* para LDLR, sendo neste caso, associadas à hipercolesterolemia. Os distúrbios no metabolismo de carboidrato nos animais R2 tratados com dieta hiperlipídica foram acompanhados por aumento da massa de ilhota e de célula B, indicativo de processo de hiperplasia do pâncreas endócrino nestes animais.
- Ilhotas dos animais pré-diabéticos, do nosso modelo, mostraram uma alteração significativa na distribuição celular de Cx36, a qual foi acompanhada por uma reorganização da ZO-1, uma proteína juncional que co-imunoprecipita com Cxs em outros tecidos e parece ser importante nos processos de organização dos canais intercelulares da junção comunicante na membrana e no *turnover* de conexinas em outros órgãos.
- Observamos também uma tendência à diminuição no grau de expressão protéica de Cx36 e de aumento na de ZO-1 em ilhotas dos animais tratados com dieta hiperlipídica. Tal aumento da expressão de ZO-1 pode estar correlacionado com a diminuição na expressão de Cx36, visto que, alguns estudos presentes na literatura sugerem que essa proteína participe da via de endocitose e degradação dos conexons.
- Os dados de microinjeção com Brometo de Etídeo suportam os resultados de Western Blot obtidos
  para Cx36, visto que o tratamento com a dieta hiperlipídica induziu diminuição no acoplamento
  celular mediado pelas GJs e avaliado através da microinjeção desse traçador (que tem passagem
  preferencial através de canais formados por esse subtipo de conexina).

- Nossos resultados de imunohistoquímica para Cx43 não revelaram diferenças com relação à marcação/distribuição dessa proteína após tratamento com a dieta hiperlipídica, embora os dados de *Western Blot* revelem uma tendência de aumento de expressão dessa proteína nos grupos tratados com dieta hiperlipídica.
- O pequeno aumento na expressão de Cx43 verificado nas ilhotas dos animais submetidos à dieta hiperlipídica pode estar relacionado com aumento da microvascularização do pâncreas endócrino apresentado no estado pré-diabético, como demonstrado em estudos presentes na literatura.
- Concluindo, a comunicação intercelular mediada pelas junções comunicantes, particularmente a mediada pelos canais formados pela Cx36 parece desempenhar um papel na patogênese da diabetes tipo 2 desde sua fase inicial.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ahren, B.; Simonsson, E.; Scheurink, A.J.; Mulder, H.; Myrsen, U.; Sundler, F. (1997). Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice. *Metabolism* **46**: 97-106.

Ai, Z.; Fischer, A.; Spray, D.C.; Brown, A.M.C.; Fishman, G.I. (2000). Wnt-1 regulation of connexin 43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest* **105**: 161-171.

Allagnat, F.; Alonso, F.; Martin, D.; Abderrahmani, A.; Waeber, G.; Haefliger, J.A. (2008). ICER-1gamma overexpression drives palmitate-mediated connexin36 down-regulation in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* **283**: 5226-5234.

Allagnat, F.; Martin, D.; Condorelli, D.F.; Waeber, G.; Haefliger, J.A. (2005). Glucose represses connexin36 in insulin-secreting cells. *J Cell Sci* **118**: 5335-5344.

Andreu, E.; Soria, B.; Sanchez-Andres, J.V. (1997). Oscillation of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol* **498**: 753-761.

Barker, R.J.; Price, R.L.; Gourdie, R.G. (2002). Increased association of ZO-1 with connexin43 during remodeling of cardiac gap junctions. *Circ Res* **90**:317-324.

Baruch, A.; Greenbaum, D.; Levy, E.T.; Nielsen, P.A.; Gilula, N.B.; Kumar, N.M.; Bogyo, M. (2001). Defining a link between gap junction communication, proteolysis, and cataract formation. *J Biol Chem* **276**: 28999-29006.

Belluardo, N.; Trovato-Salinaro, A.; Mudo, G.; Hurd, Y.L.; Condorelli, D.F. (1999). Chromosomal localization and brain expression of human Cx36 gene. *J Neurosci Res* **57**: 740–752.

Bernard-Kargar, C.; Kassis, N.; Berthault, M-F.; Pralong, W.; Ktorza, A. (2001). Sialylated form of the neural cell adhesion molecule (NCAM): a new tool for the identification and sorting of  $\beta$ -cell subpopulations with different functional activity. *Diabetes* **50**: S125-S130.

Black, M.A.; Mealing, G.R.A.; Whitfield, J.F.; Schwartz, J.L.; Bégin-Heick, N. (1994). Insulin secretion and intracellular Ca<sup>+2</sup> rises in monolayer cultures of neonatal rat B-cells. *Cell Signal* **6**: 897-904.

Bonfleur, M. L.; Vanzela, E.C.; Patrício, P.R. ; Dorighello, G.G. ; Carneiro, E.M.; Boschero, A.C.; Oliveira, H.C.F. (2006). Glucose intolerance and reduced sensivity of islet insulin secretion in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. Anais do 41° Congresso da Sociedade Brasileira de Fisiologia, pp. 238. Ribeirão Preto/SP, Brasil.

Boschero, A.C.; Crepaldi, S.C.; Carneiro, E.M.; Delattre, E.; Atwater, I. (1993). Prolactin induces maturation of glucose sensing machanisms in cultures neonatal rat islets. *Endocrinology* **133**: 515-520.

Boschero, A.C.; Bordin, S.; Plasman, P.; Herchuelz, A. (1992). Effect of glucose and  $K^+$  depolarization on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in cultured neonatal islets. *Horm Metab Res* **24**: 51-52.

Boschero, A.C.; Tombaccini, D.; Atwater, I. (1988). Effects of glucose on insulin release and 86Rb permeability in cultured neonatal and adult rat islets. *FEBS Lett* **236**: 375-379.

Calabrese, A.; Caton, D.; Meda, P. (2004). Differentiating the effects of Cx36 and E-cadherin for proper insulin secretion of MIN6 cells. *Exp Cell Res* **294**: 379-391.

Calabrese, A.; Zang, M.; Serre-Beiner, V.; Caton, D.; Mas, C.; Satin, L.S.; Meda, P. (2003). Connexin 36 controls sychronization of Ca<sup>2+</sup> oscillations and insulin secretion in MIN6 cells. *Diabetes* **52**: 417-424.

Carvalho, C.P.F.; Martins, J.C.R.; Cunha, D.A.; Boschero, A.C.; Collares-Buzato, C.B. (2006). Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islets during *in vivo* maturation of rat pancreas. *Annals of Anatomy* **188**: 221-234.

Caton, D.; Calabrese, A.; Mas, C.; Serre-Beinier, V.; Charollais, A.; Caille, D.; Zufferey, R.; Trono, D.; Meda, P. (2003). Lentivirus-mediated transduction of connexin cDNA shows level- and isoform-specific alterations in insulin secretion of primary pancreatic  $\beta$ -cells. *J Cell Sci* **116**: 2285-2294.

Charpantier, E.; Cancela, J.; Meda, P. (2007). Beta cells preferentially exchange cationic molecules via connexin 36 gap junction channels. *Diabetologia* **50**: 2332-2341.

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

Collares-Buzato, C.B. (2001). Junções Celulares. In: H.F. Carvalho e S.M. Recco-Pimentel (Eds.), A *Célula 2001*, pp. 57-76. S.P., Brazil: Manole Ltda.

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

Cox, N.J.; Frigge, M.; Nicolae, D.L.; Concannon, P.; Hanis, C.L.; Bell, G.I.; Kong, A. (1999). Loci on chromosomes 2 (NIDDM1) and 15 interact to increase susceptibilityto diabetes in Mexican Americans. *Nat Genet* **21**: 213–215.

Crepaldi, S.C.; Carneiro, E.M.; Boschero, A.C. (1997). Long-term effect of prolactin treatment on glucose-induced insulin secretion in cultured neonatal rat islets. *Horm Metab Res* **29**: 220-224.

Cruciani, V.; Mikalsen, S.O. (1999). Stimulated phosphorylation of intracellular connexin43. *Exp Cell Res* **251**: 285-298.

De Souza, C.T.; Araújo, E.P.; Prada, P.O.; Saad, M.J.A.; Boschero, A.C.; Velloso, L.A. (2005). Shortterm inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  expression reverses dietinduced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia* **48**: 1860-1871.

Drolet, M.C.; Roussel, E.; Deshaies, Y.; Couet, J.; Arsenault, M. (2006). A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *J Am Coll Cardiol* **47**: 850-855.

Duffy, H.S.; Delmar, M.; Spray, D.C. (2002). Formation of the gap junction nexus: binding partners for connexins. *J Physiol Paris* **96**: 243-249.

Farquhar, M.G.; Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. J Cell Biol 17: 375-412.

Fletcher, D.J.; Ways, D.K. (1991). Age-dependent expression of protein kinase C isoforms in rat islets. *Diabetes* **40**: 1496-1503.

Gerido, D.A.; White, T.W. (2004). Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Biochim Biophys Acta* 1662: 159-70.

Genuth, S.M. (1998). In: R.M. Berne; N.M. Levy; B.M. Koeppen; B.A Stanton (Eds.), *Fisiologia*, Capítulo 47, pp. 774-798.

Giaume, C.; Venance, L. (1998). Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 24: 50-64.

Gilon, P.; Henquin, J.C. (1995). Distinct effects of glucose on the synchronous oscillations of insulin release and cytoplasmic  $Ca^{+2}$  concentration measured simultaneously in single mouse islets. *Endocrinology* **136**: 5725-5730.

Girao, H.; Pereira, P. (2007). The proteasome regulates the interaction between Cx43 and ZO-1. *J Cell Biochem* **102**:719-728.

Gylfe, E.; Grapengiesseer, E.; Hellman, B. (1991). Propagation of cytoplasmic  $Ca^{+2}$  oscillations in clusters of pancreatic beta-cells exposed to glucose. *Cell Calcium* **12**: 229-240.

Halban, P.A.; Wollheim, C.B.; Blondel, B.; Meda, P.; Niesor, E.N.; Mintz, D.H. (1982). The possible importance of contact between pancreatic islet cells for the control of insulin release. *Endocrinology* **111**: 86-94.

Hauge-Evans, A.C.; Squires, P.E.; Persaud, S.J.; Jones, P.M. (1999). Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced  $Ca^{2+}$  and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. *Diabetes* **48**: 1402-1408.

Hertzberg, E.L.; Gilula, N.B. (1979). Isolation and characterization of gap junctions from rat liver. *J. Cell Biol* **254**: 2138-2147.

Hervé, J.C.; Bourmeyster, N.; Sarrouilhe, D.; Duffy, H.S. (2007). Gap junctional complexes: from partners to functions. *Prog Biophys Mol Biol* **94**: 29-65.

Inuwa, I.M.; El Mardi, A.S. (2005). Correlation between volume fraction and volume-weighted mean volume, and between total number and total mass of islets in post-weaning and young Wistar rats. *J Anat.* **206**: 185-192.

Ishibashi, S.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L.; Gerard, R.D.; Hammer, E.; Herz, J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* **92**: 883-893.

Jonkers, F.C.; Jonas, J.C.; Gilon, P.; Henquin, J.C (1999). Influence of cell number on the carachteristics and synchrony of Ca<sup>+2</sup> oscillations in clusters of mouse pancreatic islet cells. *J Physiol* **520**: 839-849.

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

Klee, P.; Bavamian, S.; Charollais, A.; Caille, D.; Cancela, J.; Peyrou, M.; Meda, P. (2008). Gap junctions and insulin secretion. In: S. Seino and G.I. Bell (Eds.), *Pancreatic Beta Cell in Health and Disesase*, pp. 114-132, Japan: Springer.

Kohen, E.; Kohen, C.; Thorell, B.; Mintz, D.H.; Rabinovitch, A. (1979). Intercellular communication in pancreatic islet monolayer cultures: a microfluorometric study. *Science* **204**: 862-865.

Kolb, H.A.; Somogyi, R. (1991). Biochemical and biophysical analysis of cell-to-cell membrane channels and regulation of gap junctional permeability. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **118**: 1-47.

Komatsu, M.; Schermerhorn, T.; Noda, M.; Straub, S.G.; Aizawa, T.; Sharp, G.W. (1997). Augmentation of insulin release by glucose in the absence of extracellular Ca2+: new insights into stimulus-secretion coupling. *Diabetes* **46**: 1928-1938.

Kuroki, T.; Inoguchi, T.; Umeda, F.; Ueda, F.; Nawata, H. (1998). High glucose induces alteration of gap junction permeability and phosphorylation of connexin-43 in cultured aortic smooth muscle cells. *Diabetes* **47**: 931-936.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Laird, D.W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. Biochem J 394: 527-543.

Lampe, P.D.; Lau, A.F. (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Bioph* **384**: 205-215.

Le Gurun, S.; Martin, D.; Formenton, A.; Maechler, P.; Caille, D.; Waeber, G.; Meda, P.; Haefliger, J.A. (2003). Connexin-36 contributes to control function of insulin-producing cells. *J Biol Chem* **278**: 37690-37697.

Leclerc, C. (1994). 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 Unit, pp. 45-65.Texas, U.S.A.: CRC Press.

Leite, A.R.; Carvalho, C.P.F.; Furtado, A.G.; Barbosa, H.C.L.; Boschero, A.C.; Collares-Buzato, C.B. (2005). Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets. *Canadian J Physiol Pharmacol* **83**: 142-151.

Leite, A.R. (2002). Regulação das junções comunicantes em cultura de ilhotas pancreáticas de ratos recém-nascidos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, pp. 102.

Li, X.; Zhang, L.; Meshinchi, S.; Dias-Leme, C.; Raffin, D.; Johnson, J.D.; Treutelaar, M.K.; Burant, C.F. (2006). Islet microvasculature in islet hyperplasia and failure in a model of type 2 diabetes. *Diabetes* **55**: 2965-2973.

Li, X.; Olson, C.; Lu, S.; Kamasawa, N.; Yasumura, T.; Rash, J.E.; Nagy, J.I. (2004 a). 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* **19**: 2132-2146.

Li, X.; Olson, C.; Lu, S.; Nagy, J.I. (2004 b). Association of connexin36 with zonula occludens-1 in HeLa cells, betaTC-3 cells, pancreas, and adrenal gland. *Histochem Cell Biol* **122**: 485-498.

Liew, C.G.; Andrews, P.W. (2008). Stem Cell Therapy to Treat Diabetes Mellitus. *Rev Diabet Stud* **5**: 203-219.

Lilla, V.; Webb, G.; Rickenbach, K.; Maturana, A.; Steiner, D.F.; Halban, P.A.; Irminger, J.C. (2003). Differential gene expression in well-regulated and dysregulated pancreatic beta-cell (MIN6) sublines. *Endocrinology* **144**: 1368-1379.

Mears, D.; Sheppard, N.F. Jr.; Atwater, I.; Rojas, E. (1995). Magnitude and modulation of pancreatic betacell gap junction electrical conductance in situ. *J Membr Biol* **146**: 163-176.

Meda P. (2000). Probing the function of connexin channels in primary tissues. Methods 20: 232-244.

Meda, P. (1997). Intercellular Communication and Insulin ecretion. In: G.R. Zahnd and C.B. Wollheim (Eds.), *Contribuitions of Physiology to the understading of diabetes*, pp. 24-42. Berlin, Springer.

Meda, P. (1996). Gap junction involvement in secretion: the pancreas experience. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **23**: 1053-1057.

Meda, P.; Pepper, M.S.; Traub, O.; Willecke, K.; Gros, D.; Beyer, E.; Nicholson, B.; Paul, D.; Orci, L. (1993). Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. *Endocrinology* **133**: 2371-2378.

Meda, P.; Chanson, M.; Pepper, M.; Giordano, E.; Bosco, D.; Traub, O.; Willecke, K.; Aoumari, A.E.; Gros, D.; Beyer, E.C.; Orci, L.; Spray, D.C. (1991). In vivo modulation of connexin 43 gene expression and junctional coupling of pancreatic B-cells. *Exp Cell Res* **192**: 469-480.

Meda, P.; Bosco, D.; Chanson, M.; Giordano, E.; Vallar, L.; Wollhein, C.; Orci, L. (1990). Rapid and reversible secretion changes during uncoupling of rat insulin-producing cells. *J Clin Invest* **86**: 759-768.

Meda, P.; Santos, R.M.; Atwater, I. (1986). Direct identification of eletrophysiologically monitored cells within intact mouse islets of Langerhans. *Diabetes* **35**: 232-236.

Meda, P.; Amherdt, M.; Perrelet, A.; Orci, L. (1981). Metabolic coupling between cultured pancreatic B-cells. *Exp Cell Res* **133**: 421-430.

Meda, P.; Michaels, R.L.; Halban, P.A.; Orci, L.; Sheridan, J.D. (1983). *In vivo* modulation of gap junctions and dye coupling between B-cells of the intact pancreatic islets. *Diabetes* **32**: 858-868.

Meda, P.; Perrelet, A.; Orci, L. (1979). Increase of gap junctions between pancreatic B-cells during stimulation of insulin secretion. *J Cell Biol* **82**: 441-448.

Mendonça, A.C.; Carneiro, E.M.; Bosqueiro, J.R.; Crepaldi-Alves, S.C.; Boschero, A.C. (1998). 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* **31**: 841-846.

Merat, S.; Casanada, F.; Sutphin, M.; Palinski, W.; Reaven, P.D. (1999). Wetern- type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor- deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoglicemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 1223-1230.

Mese, G.; Richard, G.; White, T.W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol. 127: 2516-2524.

Meyer, R.A.; Laird, D.W.; Revel, J.P.; Johnson, R.G. (1992). Inhibition of gap junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J Cell Biol* **119**: 179-189.

Miles, P.D.; Barak, Y.; He, W.; Evans, R.M.; Olefsky, J.M. (2000). Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest* **105**: 287-292.

Mills, S.L.; Massey, S.C. (1995). Differential properties of two gap junctional pathways made by AII amacrine cells. *Nature* **377**: 734-737.

Musil, L. S. (1994). 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.

Nlend, R.N.; Michon, L.; Bavamian, S.; Boucard, N.; Caille, D.; Cancela, J.; Charollais, A.; Charpantier, E.; Klee, P.; Peyrou, M.; Populaire, C.; Zulianello, L.; Meda, P. (2006). Connexin36 and pancreatic betacell functions. *Arch Physiol Biochem* **112**: 74-81.

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

Orci, L.; Unger, R. (1975). Functional subdivision of islets of langerhans and possible role of D-cells. *Lancet* 2: 1243-1244.

Pappan, K.L.; Pan, Z.; Kwon, G.; Marshall, C.A.; Coleman, T.; Goldberg, I.J.; McDaniel, M.L.; Semenkovich, C.F. (2005). Pancreatic beta-cell lipoprotein lipase independently regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion. *J Biol Chem* **280**: 9023-9029.

Pedersen, M.G.; Bertram, R.; Sherman, A. (2005). Intra- and inter-islet synchronization of metabolically driven insulin secretion. *Biophys J* **89**: 107-119.

Pipeleers, D.; In't Veld, P.; Maes, E.; De Winkel, M.V. (1982). Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 7322-7325.

Poitout, V.; Robertson, R.P. (2002). Minireview: Secondary  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes - A convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* **143**: 339-342.

Prochnow, N.; Dermietzel, R. (2008). Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochem Cell Biol* **130**:71-77.

Ravier, M.A.; Güldenagel, M.; Charollais, A.; Gjinovci, A.; Caille, D.; Söhl, G.; Wollheim, C.B.; Willecke, K.; Henquin, J.C.; Meda, P. (2005). Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca2+ and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes* **54**: 1798-1807.

Ravier, M.A.; Sehlin, J.; Henquin, J.C. (2002). Disorganization of cytoplasmic Ca(2+) oscillations and pulsatile insulin secretion in islets from ob/ obmice. *Diabetologia* **45**: 1154-1163.

Reimer, M.K.; Ahrén, B. (2002). Altered  $\beta$ -cell distribution of pdx-1 and GLUT-2 after a short-term challenge with a high-fat diet in C57BL/6J mice. *Diabetes* **51** (Suppl. 1): S138-S143.

Ressot, C.; Bruzzone, R. (2000). Connexin channels in Schwann cells and the development of the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res Rev* **32**: 192-202.

Roe, M.W.; Philipson, L.H.; Frangakis, C.J.; Kuznetsov, A.; Mertz, R.J.; Lancaster, M.E.; Spencer, B.; Worley, J.F. 3<sup>rd</sup>; Dukes, I.D. (1994). Defective glucose-dependent endoplasmic reticulum Ca2+ sequestration in diabetic mouse islets of Langerhans. *J Biol Chem* **269**: 18279-18282.

Rozental, R.; Giaume, C.; Spray, C. (2000). Gap junctions in the nervous system. Brain Res Rev 32: 1-15.

Sáez, J.C.; Berthoud, V.M.; Brañes, M.C.; Martínez, A.D.; Beyer, E.C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Phys Rev* 83: 1359-1400.

Schrauwen, P. (2007). High fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. Proc Nutr Soc 66: 33-41.

Schreyer, S.A.; Vick, C.; Lystig, T.C.; Mystkowski, P.; LeBoeuf, R.C. (2002). LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**: E207-E214.

Segretain, D.; Fiorini, C.; Decrouy, X.; Defamie, N.; Prat, J.R.; Pointis, G. (2004). A proposed role for ZO-1 in targeting connexin 43 gap junctions to the endocytic pathway. *Biochimie* **86**: 241-244.

Serre-Beinier, V.; Le Gurun, S.; Belluardo, N.; Trovato-Salinaro, A.; Charollais, A.; Haefliger, J.A.; Condorelli, D.F.; Meda, P. (2000). Cx36 preferentially connects B-cells within pancreatic islets. *Diabetes* **49**: 727-734.

Shafrir, E.; Ziv, E.; Mosthaf, L. (1999). Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models. *Ann N Y Acad Sci* **892**: 223-246.

Simcha, I.; Shtutman, M.; Salomon, D.; Zhurinky, J.; Sadot, E.; Geiger, B.; Bem-Ze'ev, A. (1998). Differential nuclear translocation and transactivation potential of  $\beta$ -catenin and plakoglobin. *J Cell Biol* **141**: 1433-1448.

Sohl, G.; Degen, J.; Teubner, B.; Willecke, K. (1998). The murine gap junction gene connexin 36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS letters* **428**: 27-31.

Solan, J.L.; Marquez-Rosado, L.; Sorgen, P.L.; Thornton, P.J.; Gafken, P.R.; Lampe, P.D. (2007). Phosphorylation at S365 is a gatekeeper event that changes the structure of Cx43 and prevents down-regulation by PKC. *J Cell Biol* **179**:1301-1309.

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

Speier, S.; Gjinovci, A.; Charollais, A.; Meda, P.; Rupnik, M. (2007). Cx36-mediated coupling reduces beta-cell heterogeneity, confines the stimulating glucose concentration range, and affects insulin release kinetics. *Diabetes* **56**:1078-1086.

Spray, D.; Dermietzel, R. (1995). X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease and other potential gap-junction diseases of the nervous system. *Trends Neuro* **18**: 256-262.

Spray, D. (1994). Physiological and pharmacological regulation of gap junction channels. In S. Citi (Ed.), *Molecular mechanisms of epithelial cell junctions: from development to disease, Molecular Biology Intelligence Unit*, pp. 195-215, Texas, U.S.A.: CRC Press.

Straub, S.G.; Sharp, G.W. (2002). Glucose-stimulated signalling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Res Rev* 18: 451-463.

Surwit, R.S.; Kuhn, C.M.; Cochrane, C.; McCubbin, J.A.; Feinglos, M.N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* **37**: 1163-1167.

Terauchi, Y.; Takamoto, I.; Matsui, J.; Suzuki, R.; Komeda, K.; Hara, A.; Toyoda, Y. Miwa, I.; Aizawa, S.; Tsutsumi, S.; Tsubamoto, Y.; Hashimoto, S.; Eto, K.; Nakamura, A.; Noda, M.; Tobe, K.; Aburatani, H.; Nagai, R.; Kadowaki, T. (2007). Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest* **117**: 246-257.

Theis, M.; Mas, C.; Döring, B.; Degen, J.; Brink, C.; Caille, D.; Charollais, A.; Krüger, O.; Plum, A.; Nepote, V.; Herrera, P.; Meda, P.; Willeckea, K. (2004). Replacement by a lacZ reporter gene assigns mouse connexin36, 45 and 43 to distinct cell types in pancreatic islets. *Exp Cell Res* **29**: 18-29.

Tribulová, N.; Knezl, V.; Okruhlicová, L.; Slezák, J. (2008). Myocardial gap junctions: targets for novel approaches in the prevention of life-threatening cardiac arrhythmias. *Physiol Res* **57**: S1-S13.

Vozzi, C.; Ullrich, S.; Charollais, A.; Philippe, J.; Orci, L.; Meda, P. (1995). Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. *J Cell Biol* **131**: 1561-1572.

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

Wellershaus, K.; Degen, J.; Deuchars, J.; Theis, M.; Charollais, A.; Caille, D.; Gauthier, B.; Janssen-Bienhold, U.; Sonntag, S.; Herrera, P.; Meda, P.; Willecke, K. (2008). A new conditional mouse mutant reveals specific expression and functions of connexin36 in neurons and pancreatic beta-cells. *Exp Cell Res* **314**: 997-1012.

Winzell, M.S.; Ahrén, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* **53**: S215-S219.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada "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".

( ) não se enquadra no Artigo 1°, § 3° da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo  $n^{\circ}$  ), intitulado

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 987-1).

( ) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº
 \_\_\_\_\_).

Carolina Carvalho

Aluno(a): Carolina Prado de França Carvalho

Orientador(a): Profa. Dral Carla Beatriz Collares Buzato

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

Jarie Aparide quarddo Nome:

Função:

Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO Presidente Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/IB - UNICAMP