

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO PANCREÁTICA DE ANIMAIS SUBMETIDOS À DIETA
HIPERLIPÍDICA

GRAZIÉLE F. DERIGGI PISANI

São Carlos

2012

**AVALIAÇÃO PANCREÁTICA DE ANIMAIS SUBMETIDOS À DIETA
HIPERLIPÍDICA**

GRAZIÉLE F. DERIGGI PISANI

Orientadora: Prof^a Dr^a Ângela Merice de Oliveira Leal

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas

São Carlos

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

D433ap

Deriggi-Pisani, Graziéle Fernanda.

Avaliação pancreática de animais submetidos à dieta hiperlipídica / Graziéle Fernanda Deriggi Pisani.. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
64 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Diabetes. 2. Diabetes tipo 2. 3. Camundongos. 4. Pâncreas - doenças. I. Título.

CDD: 616.462 (20ª)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

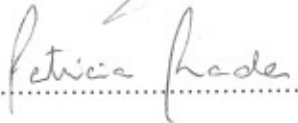
Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Graziéle Fernanda Deriggi Pisani

Dia 04/09/2012

Profª. Drª. Ângela Merice de Oliveira Leal.....

Profª. Drª. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte.....

Profª. Drª. Patrícia de Oliveira Prada.....

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela abdicação em prol dos meus estudos, ao meu irmão, confiança de amparo eterno e ao meu marido, parceiro pra toda vida, dedico este trabalho. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, guias dos meus passos, luz sem a qual minha vida não teria sentido.

Aos animais, olhos humildes, vidas sacrificadas que, sem escolha ou relutância, se submeteram à realização deste.

À Dr^a Ângela Leal pela oportunidade de crescimento e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos comigo. Sua dedicação me serve de exemplo.

À Prof^a Dr^a Heloísa por ter aberto as portas de seu laboratório e à toda equipe do LBBM por terem me recebido tão bem e por tornarem o trabalho mais leve e divertido. Dri e João obrigada por me ajudarem a desvendar os mistérios do Image Pro e Uli, obrigada pelos artigos e discussões. Bete Irene muito obrigada querida!

À Prof^a Keico por disponibilizar o biotério para que meus animais fossem alocados e ao Seo Sérgio.

Ao Prof^o Dr^o Julio C. Voltarelli (*in memoriam*) por abrir seu espaço na USP Ribeirão Preto, pelo apoio material e de sua equipe (Ju, Mari, Kellen – muito obrigada meninas, não tenho como agradecer a gentileza).

À Prof^a Dr^a Marisa e à sua equipe, Nayara, obrigada pelas chaves e Vini pela ajuda com estatística e amizade!

À Prof^a Lucimar de Avó pela ajuda com as lâminas, disponibilidade, gentileza e simpatia de sempre!

Ào Prof^o Dr^o Mario Saad, por abrir seu laboratório e à Dioze pela ajuda com as imunos!

Ao Prof^o José Carlos Fogo pela disponibilidade em sanar minhas dúvidas de estatística de última hora!

Aos colegas que me ajudaram com os experimentos: Rafa, Diego, Dani, Charles, Zezinho, Leo.

Aos colegas de equipe pela amizade e apoio, em especial à Pati, pelo seu suporte físico e psicológico. À Natália, nossa super técnica e à Carol, apoio técnico!

Ao Pedrinho, o rei das lâminas!

Às meninas da limpeza!

Ao Alexandre da secretaria pela paciência com minhas dúvidas (e não foram poucas!).

À minha amiga-irmã Kellinha, pela amizade de tantos anos! Te adoro Fror! E ao Tirsão pela amizade e apoio!

Aos meus amigos pela compreensão quando não pude estar presente (Manos Foca, Ju e Tchos, Mari e Du).

Aos meus pais e irmão, meu porto seguro. Obrigada por compartilharem todos os momentos da minha vida. Aos meus sogros, cunhados, tios e primos (principalmente o Netto). Obrigada pela paciência, torcida, compreensão, conselhos, risadas e apoio de sempre! Amo vocês! Ah, Vô, agora acabou!!!

Ao meu marido, Gustavo, o homem da minha vida, melhor amigo, companheiro e namorado! Não tenho palavras para agradecer seu amor, compreensão, apoio e paciência! Te amo muito! E à Pitucha, nossa cachorrinha, que pacientemente dormiu ao meu lado enquanto eu trabalhava neste!

Enfim, se eu me esqueci de alguém não foi menos importante, mas o cansaço na reta final foi extremo e pode ter causado isso! Obrigada pela ajuda e compreensão!

RESUMO

A patogênese do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está associada, basicamente, a dois mecanismos, resistência à ação da insulina (RI) e disfunção das células β pancreáticas. O tecido adiposo modula o metabolismo pela liberação de ácidos graxos livres (AGL), glicerol, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e hormônios. O aumento da produção da maioria desses fatores compromete a ação da insulina nos órgãos-alvo, levando à RI. A falta de adaptação das células β à RI leva à hiperglicemia e DM2. Os mecanismos da adaptação das células β não estão bem estabelecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os padrões morfológicos e funcionais da progressão da RI e desenvolvimento do DM2 em modelo animal de obesidade e DM2. Camundongos Swiss foram divididos em dois grupos: controle (C), recebeu dieta padrão e DH (dieta hiperlipídica) que recebeu dieta rica em gordura. Testes de tolerância à glicose (TTG) e insulina (TTI) foram feitos com 3, 7, 11 e 15 semanas de experimento. Animais de ambos os grupos foram sacrificados por decaptação após 4, 8 e 16 semanas de experimento e o tecido pancreático foi analisado. Glicemia de jejum e respostas do TTG e TTI foram significativamente diferentes entre o grupo DH e o C. Análises imunohistoquímicas mostraram que a área das ilhotas aumentou e a expressão de insulina diminuiu nas ilhotas do grupo DH comparado com o grupo C com 16 semanas de experimento. A expressão do fator anti-apoptótico Bcl-2, e a concentração de citocinas, TNF- α (Fator de Necrose tumoral - α) e IL-1 β (Interleucina - 1 β) determinadas em homogeneizado pancreático por ELISA não foram diferentes entre os grupos. Os resultados indicaram que a ingestão de dieta hiperlipídica induz no pâncreas desarranjos morfológicos e funcionais associados com o desenvolvimento do DM2 em camundongos Swiss. O estudo também sugere que TNF- α , IL-1 β e Bcl-2 não estão envolvidos na patogênese do DM2 neste modelo.

Palavras-Chave: Diabetes tipo 2, dieta hiperlipídica, camundongos Swiss, pâncreas.

Apoio financeiro: FAPESP e CAPES.

ABSTRACT

The pathogenesis of type 2 diabetes mellitus (DM2) is associated with insulin resistance (IR) and pancreatic β cells (β cells) defect. Adipose tissue modulates metabolism by releasing free fatty acids (FFA), glycerol, pro-inflammatory cytokines, chemokines and hormones. The increased production of most of these factors compromises insulin action in target organs, leading to IR. The lack of β cell adaptation to IR leads to hyperglycemia and DM2. The mechanisms of β cell adaptation are not well established. The objective of the present study was to evaluate the morphological and functional patterns of the progression of IR and DM2 development in an animal model of obesity and DM2. Swiss mice were divided into two groups: control (C), received standard diet; HFD group, received high-fat diet. Glucose (GTT) and insulin (ITT) tolerance tests were performed tests at 3, 7, 11 and 15 weeks of diet regimen. Animals of both groups were sacrificed by decapitation at 4, 8 and 16 weeks of diet regimen and pancreatic tissue was analysed. Fasting glycemia and GTT and ITT responses were significantly different in HFD from C group. Immunohistochemical analysis showed that islets area increased and insulin expression decreased in islets of HFD group compared with C group. The expression of the anti-apoptotic factor, Bcl-2, and the concentration of the cytokines, TNF- α (factor tumor necrosis factor- α) and IL-1 β (interleukin-1 β) determined in pancreatic homogenate by ELISA were not different in the groups. The results indicate that high-fat diet regimen induces pancreatic morphological and functional derangements associated with the development of DM2 in swiss mice. The study also suggests that TNF- α , IL-1 β and Bcl-2 are not involved in the pathogenesis of DM2 in this model.

Key Words: Type 2 Diabetes, high-fat diet, Swiss mice, pancreas.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Organograma representativo do desenho experimental utilizado-----23
- Figura 2. Corte seccional do pâncreas. O traço vertical indica o local de corte para divisão do pâncreas em cabeça e cauda-----25
- Figura 3. Massa corporal (g). Os valores estão representados em média \pm EPM. Grupo C, n=4-11; Grupo DH, n=5-14. * P < 0,05, C vs DH-----30
- Figura 4. Ingestão calórica (Kcal/dia). Os valores estão representados como média \pm EPM. Grupo C, n=4-11; Grupo DH, n=5-14. * P < 0,05, C vs DH-----31
- Figura 5. Glicemia (mg/dL). Os valores estão representados como média \pm EPM. Grupo C, n=4-11; Grupo DH, n=5-14. * P < 0,05, C vs DH-----32
- Figura 6. TTG. Os valores estão representados como média \pm EPM. A, teste após 3 semanas de tratamento, B, após 7 semanas, C, após 11 semanas e D, após 15 semanas. Grupo C, n= 4-11; Grupo DH, n=5-14. * P < 0,05, C vs DH-----33
- Figura 7. AUC TTG. Os valores estão representados como média \pm EPM. Grupo C, n= 4-11; Grupo DH, n=5-14. * P < 0,05, C vs DH-----34
- Figura 8. TTI. Os valores estão representados como média \pm EPM. A, teste após 3 semanas de tratamento, B, após 7 semanas, C, após 11 semanas e D, após 15 semanas. Grupo C, n= 4-11; Grupo DH, n=5-14. * P < 0,05, C vs DH-----35
- Figura 9. AUC TTI. Os valores estão representados como média \pm EPM. Grupo C, n= 4-11; Grupo DH, n=5-14. * P < 0,05, C vs DH; # P < 0,05, DH vs DH 3 semanas; & P < 0,05, DH vs DH 7 semanas-----36
- Figura 10. Ilhotas representativas dos grupos analisados. Coloração HE. A, grupo C 4 semanas; B, grupo DH 4 semanas; C, grupo C 8 semanas; D, grupo DH 8 semanas; E, grupo C 16 semanas; F, grupo DH 16 semanas-----37
- Figura 11. Ilhotas representativas dos grupos analisados marcadas com insulina. A, grupo C 4 semanas; B, grupo DH 4 semanas; C, grupo C 8 semanas; D, grupo DH 8 semanas; E, grupo C 16 semanas; F, grupo DH 16 semanas-----39
- Figura 12. Área média das ilhotas pancreáticas. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5. * P < 0,05, C vs DH; # P < 0,05, DH vs DH 3 semanas; & P < 0,05, DH vs DH 7 semanas-----40
- Figura 13. Área fracional de insulina (expressão de insulina nas ilhotas). Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5. * P < 0,05, C vs DH; # P < 0,05, DH vs DH 3 semanas; & P < 0,05, DH vs DH 7 semanas-----40
- Figura 14. Número de células por ilhota. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5-----41

Figura 15. Número de células beta por ilhota. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5-----	41
Figura 16. Número fracional de células beta. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5-----	42
Figura 17. Concentração de TNF- α em homogeneizado pancreático. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5-----	43
Figura 18. Concentração de IL-1 β em homogeneizado pancreático. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5-----	44
Figura 19. Imagens representativas de ilhotas marcadas com Bcl-2. A, grupo C 8 semanas; B, grupo DH 8 semanas; C, grupo C 16 semanas; D, grupo DH 16 semanas-----	45
Figura 20. Área fracional Bcl-2 (expressão de Bcl-2 nas ilhotas). Grupo C, n=3; Grupo DH, n=3-5-----	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise semi-quantitativa da intensidade de marcação para insulina. C – grupo controle, DH – grupo dieta hiperlipídica. ++++ = forte reatividade em > 75% da ilhota; +++ = forte marcação em \leq 75% da ilhota----- 39

Tabela 2. Análise semi-quantitativa da intensidade de marcação para Bcl-2. C – grupo controle, DH – grupo dieta hiperlipídica. ++++ = forte reatividade em > 75% da ilhota; +++ = forte marcação em \leq 75% da ilhota-----45

LISTA DE ABREVIATURAS

DM – Diabetes Mellitus

DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

RI – Resistência à ação da insulina

IR – Receptor de insulina

IRS – Substratos do receptor de insulina

PI3K – Quinase fosfatidilinositol 3

MAPK – Proteína quinase mitógena ativada

AGL – Ácidos graxos livres

ON – Óxido nítrico

kDA – quilodáltons

TNF- α – Fator de necrose tumoral – α

IL-1 β – Interleucina - 1 β

RE – Retículo endoplasmático

IL-6 – Interleucina-6

Kcal/g – Quilocalorias/grama

g – Grama

μm – Micrômetro

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

rpm – Rotações por minuto

dL – Decilitro

HE – Eosina/Hematoxilina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	1
1.1 Relevância do estudo do Diabetes Mellitus tipo 2 -----	1
1.2 Fisiopatologia do DM2 -----	2
1.2.1 RI e DM2 -----	2
1.2.2 Obesidade, Glicolipotoxicidade e DM2 -----	6
1.2.3 Falência das células β e DM2 -----	9
1.2.3.1 Inflamação -----	10
1.2.3.2 Apoptose -----	14
1.3 Modelos animais e DM2 -----	18
2. OBJETIVOS -----	21
2.1 Objetivo Geral -----	21
2.2 Objetivos Específicos -----	21
2.2.1 Avaliação morfométrica das ilhotas pancreáticas -----	21
2.2.2 Verificação da presença de células e mediadores inflamatórios em homogeneizado pancreático -----	21
2.2.3 Verificação da expressão de marcador anti-apoptótico Bcl-2 ilhotas pancreáticas -----	21
3. MATERIAL E MÉTODOS -----	22
3.1 Animais e Condições experimentais -----	22
3.1.1 Desenho experimental -----	22
3.1.2 Composição das Dietas -----	23
3.1.3 Controle da Ingestão Alimentar e Massa Corporal -----	23
3.1.4 Monitoramento da glicemia -----	24
3.1.5 Teste de tolerância à glicose (TTG) -----	24

3.1.6	Teste de tolerância à insulina (TTI)	24
3.2	Coleta do pâncreas	25
3.3	Análises morfométricas do Pâncreas Endócrino	25
3.3.1	Coloração com hematoxilina e eosina (HE)	26
3.3.2	Reações de Imunohistoquímica	26
3.4	Quantificação de citocinas no pâncreas	28
3.5	Análise Estatística	29
4.	RESULTADOS	30
4.1	Massa corporal	30
4.2	Ingestão calórica	30
4.3	Controle Glicêmico (Jejum)	31
4.4	Teste de tolerância à glicose (TTG)	32
4.5	Teste de tolerância à insulina (TTI)	34
4.6	Análise morfológica do pâncreas endócrino – coloração HE	36
4.7	Imunohistoquímica – marcador insulina	37
4.8	Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)	42
4.9	Interleucina-1 β (IL-1 β)	43
4.10	Fator anti-apoptótico Bcl-2	44
5.	DISCUSSÃO	47
6.	CONCLUSÃO	55
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Relevância do estudo do Diabetes Mellitus tipo 2

O Diabetes mellitus (DM) pode ser encontrado em todos os países do mundo e, na ausência de programas eficazes de gerenciamento e prevenção, os índices continuarão crescendo globalmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994). Estimou-se aproximadamente 366 milhões de pessoas no mundo portadores do diabetes em 2011 e, se a tendência crescente continuar, em 2030 serão em torno de 522 milhões de diabéticos mundialmente, sendo 85% a 95% destes, portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994, INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012).

No Brasil, no final da década de 80, a prevalência de DM na população adulta era em torno de 7,6%. Dados mais recentes apontam para taxas mais elevadas (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Atualmente, estima-se que haja 12,4 milhões de indivíduos diabéticos no Brasil e a previsão para 2030 é de 19,6 milhões (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012).

Sendo a forma mais prevalente, o DM2 está associado basicamente a dois fatores, resistência à ação da insulina e disfunção secretória das células beta pancreáticas (células β) (BUENO, 2009; CHENTOUF *et al.*, 2011).

Geneticamente, o DM2 apresenta formas monogênicas e poligênicas, sendo a última mais frequente e a que sofre maior influência ambiental. Porém, embora haja um componente genético, fatores ambientais desempenham claramente um papel relevante no aumento exponencial da doença e outras anormalidades metabólicas (HULL *et al.*, 2005). Mudanças no

estilo de vida, como o aumento no consumo de dietas com alta caloria e sedentarismo tem aumentado a prevalência de obesidade e DM (SCHMID *et al.*, 2004).

Indivíduos saudáveis respondem ao balanço positivo de energia estocando o excesso na forma de triglicerídeos no tecido adiposo. Embora esta resposta permita aos seres humanos lidar de maneira eficiente com as flutuações no suprimento energético, também predispõe ao ganho de peso àqueles indivíduos que ingerem grandes quantidades de alimentos de forma constante (balanço energético positivo cronicamente), ocorrendo por fim a instalação do quadro de obesidade, o que também induz o acúmulo de lipídios em locais “ectópicos”, como no fígado, no músculo esquelético, e possivelmente nas células pancreáticas e renais (SAVAGE *et al.*, 2007).

Aproximadamente 60% a 90% dos casos de DM2 estão relacionados à obesidade, considerada o maior contribuinte para doenças humanas atualmente, com forte correlação entre obesidade, particularmente o acúmulo de gordura visceral, e resistência à ação da insulina (RI) tanto para indivíduos diabéticos como não diabéticos (CERF, 2010; KAHN *et al.*, 2006).

1.2 Fisiopatologia do DM2

1.2.1 RI e DM2

A insulina é um hormônio anabólico produzido pelas células β presentes nas Ilhotas de Langerhans do pâncreas (ilhotas pancreáticas). Existem aproximadamente um milhão de ilhotas no pâncreas e elas constituem 1% a 1,5% da massa pancreática humana. Cada ilhota contém, em média, 2.500 células subdivididas em quatro tipos: as células β , fonte única de insulina, respondem por 60% a 70%; as células α (células alfa), fonte de glucagon, 20% a

25%; as células δ (células delta), fonte de somatostatina, 10% e células PP, fonte de polipeptídeo pancreático (BERNE *et al.*, 2004). A estrutura microscópica, o suprimento vascular e a distribuição das células nas ilhotas são importantes para a sua função. Cada ilhota consiste de um núcleo de células β com uma capa de células α e/ou δ e/ou PP (BERNE *et al.*, 2004).

A secreção de insulina é estimulada por diversos fatores como glicose (mais potente estimulador), hormônios liberados pelo intestino após a alimentação e que aumentam a sensibilidade das células β à glicose, além de aminoácidos como a leucina, arginina e lisina (KAHN *et al.*, 2005). Este hormônio exerce diversas funções biológicas, incluindo a regulação do metabolismo energético através de sua ligação e ativação do receptor de insulina (IR) (DICKSON & RHODES, 2004; WANG & JIM, 2009).

O IR é o protótipo de uma família de proteínas homólogas integrais de membrana composto por duas cadeias α idênticas projetando-se para a face externa da membrana plasmática, que contem o domínio de ligação com a insulina e controlam a atividade de duas subunidades β transmembrana com sua porção carboxiterminal projetando-se dentro do citosol contendo a atividade de tirosina quinase. A insulina se liga a regiões específicas da subunidade α , e a rápida alteração conformacional no receptor leva à autofosforilação de resíduos tirosina das subunidades β por mecanismo de transfosforilação, o que resulta na ativação da atividade tirosina quinase do IR (LYRA *et al.*, 2009; KIDO *et al.*, 2001).

A ativação do IR inicia eventos de sinalização através do recrutamento de moléculas, incluindo a família IRS (Substratos do receptor de insulina) e proteína homóloga similar a colágeno (SHC) (WANG & JIM, 2009; KAIFU *et al.*, 2009; TANIGUCHI *et al.*, 2006). Atualmente, dez substratos do IR já foram identificados, sendo quatro deles pertencentes à família dos IRS (LYRA *et al.*, 2009). Como consequência à fosforilação em tirosina, estas proteínas interagem com moléculas sinalizadoras através de seus domínios SH2 (domínios

com homologia a Src2), resultando na ativação de uma variedade de vias de sinalização, incluindo a da ativação da quinase fosfatidilinositol 3 (PI3K) que posteriormente ativa a quinase serina/treonina (Akt) e da proteína quinase mitógena ativada (MAPK). Estas vias atuam de maneira coordenada na regulação do transporte de glicose, via translocação do transportador de glicose (GLUT) para a membrana celular, síntese de proteínas e lipídios e respostas mitógenas. A sinalização PI3K/Akt é bem caracterizada também como uma via pró-proliferativa/anti-apoptótica em vários tipos celulares (DICKSON & RHODES, 2004; WANG & JIM, 2009; KAIFU *et al.*, 2009; TANIGUCHI *et al.*, 2006).

No músculo e tecido adiposo, a captação de glicose é regulada pela ação da insulina (via translocação do GLUT4). Ela também promove estoque de substratos através da lipogênese, glicogênese e síntese proteica; inibe a produção de glicose hepática (gliconeogênese) tanto basal quanto estimulada pela ação do glucagon, inibe a lipólise, glicogenólise e degradação de proteínas, além de estimular o crescimento e diferenciação celular (KAHN *et al.*, 2005).

A RI é caracterizada por alterações em diversos pontos da via de transmissão do sinal da insulina, alterando suas ações. Isso ocorre com redução da concentração e da atividade quinase do IR, da concentração e da fosforilação dos IRS-1 e 2, ocorrendo também redução da fosforilação em resíduos tirosina induzida por insulina nos IR e IRS, redução da atividade da PI3K, da translocação do GLUT-4 e da atividade de enzimas intracelulares (LYRA *et al.*, 2009; SALTIEL & KAHN, 2001). Isso está associado também ao aumento da ação de fosfatases, à redução da expressão de proteínas fosforiláveis ou ainda à ativação de serina-quinases que, agindo sobre substratos da via de sinalização da insulina, induzem a sua fosforilação em serina, o que compromete sua ativação através da fosforilação em tirosina (SALTIEL & KAHN, 2001).

A fosforilação em tirosina do IRS-1 é necessária para a sinalização insulínica, enquanto a fosforilação de IRS-1 em serina tem sido apontada como inibidor da transdução do sinal da insulina. Por exemplo, o fator de transcrição NF- κ B é mantido inativo no citosol pelo inibidor de κ B α (I κ B α). Quando este fator é ativado em processos inflamatórios, uma enzima quinase, o inibidor da quinase κ B (IKK β), fosforila I κ B α levando a sua rápida degradação e liberação do NF- κ B para induzir a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. O IKK β funciona como uma serina quinase que promove a fosforilação de IRS-1 em serina e, portanto, causa deficiência na transdução do sinal da insulina. Além disso, IKK β é ativada por metabólitos de ácidos graxos, que promovem resistência à insulina na obesidade (Bikman *et al.*, 2009).

A principal marca de RI no fígado é o aumento da produção hepática de glicose devido à inabilidade da insulina em suprimir a gliconeogênese (SHAFRIR *et al.*, 1999), o que acarreta em aumento na concentração de glicose plasmática. Já no músculo esquelético, a sinalização para a translocação de GLUT4, síntese de glicogênio e oxidação de glicose estão diminuídas (BUENO, 2009), prejudicando o metabolismo da glicose nestes órgãos.

Apesar de muitos fatores genéticos e ambientais contribuírem para o desenvolvimento do DM2, um dos componentes-chave é a falência das células β em secretar insulina apropriadamente face à RI. Em indivíduos saudáveis, as células β respondem à glicose de maneira bem definida. Quando há aumento nos níveis plasmáticos de glicose, esta entra nas células β por transportadores já alocados na membrana plasmática (GLUT-2) e é metabolizada através da glicólise e respiração aeróbia, levando ao aumento na fração trifosfato de adenosina/difosfato de adenosina (ATP/ADP). Este aumento resulta em fechamento dos canais de potássio sensíveis a ATP desencadeando o influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem e resultando em secreção de insulina (NUNEMAKER *et al.*, 2009). Quando há falência destas células em secretar insulina,

juntamente com a prevalente RI, desenvolve-se um quadro de hiperglicemia caracterizando o diabetes mellitus tipo 2.

Flutuações na sensibilidade à ação da insulina ocorrem normalmente durante o ciclo de vida, com RI sendo observada durante a puberdade, gravidez e com o envelhecimento. Reciprocamente, variações no estilo de vida, como aumento na atividade física e na ingestão de carboidratos, está associada com maior sensibilidade à insulina (KAHN *et al.*, 2006).

As células β são capazes de adaptar a secreção de insulina, o tempo todo, em resposta à modificações na demanda metabólica com notável grau de plasticidade para manter a homeostase glicolítica. Isto inclui expansão e involução da massa funcional de células beta, isto é, tanto modificações na produção/secreção de insulina como no tamanho e quantidade das células β (BERNARD-KARGAR & KTORZA, 2001; AHRÉN *et al.*, 2010). Ou seja, em condições normais, a massa de células β não é constante, sendo continuamente remodelada em um processo dinâmico rigidamente controlado.

O aumento da massa de células β ocorre por replicação de células beta pré-existentes (proliferação resultando em hiperplasia), neogênese (diferenciação de células precursoras) e hipertrofia das células β (aumento do tamanho celular). Já a redução da massa ocorre através da morte celular, principalmente por apoptose, e também via hipotrofia (redução do tamanho das células β). Quando estes mecanismos de compensação falham desenvolve-se a hiperglicemia e o DM2 se manifesta (KARGAR & KTORZA, 2008; AHRÉN *et al.*, 2010; CERF, 2010).

1.2.2 Obesidade, Glicolipotoxicidade e DM2

O tecido adiposo modula o metabolismo pela liberação de ácidos graxos livres (AGL), glicerol, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e hormônios, incluindo a leptina e a

adiponectina. O aumento da produção da maioria desses fatores, na obesidade, compromete a ação da insulina nos órgãos-alvo, atuando, principalmente, na sua cascata de sinalização e levando à resistência insulínica. Estudos *in vitro* tem encontrado que citocinas pró-inflamatórias prejudicam a função das células β e induzem apoptose destas células (KAHN *et al.*, 2006; SAUTER *et al.*, 2008; ZOU & SHAO, 2008).

Em condições fisiológicas, os AGL sustentam a secreção basal de insulina no jejum e potencializam a liberação deste hormônio na presença de glicose. Entretanto, há evidências crescentes de que a exposição crônica a elevadas concentrações de AGL possui efeitos prejudiciais nas células beta pancreáticas, um fenômeno conhecido como lipotoxicidade (LUPI *et al.*, 2002; BODEN, 1996; WIESENTHAL *et al.*, 1999; FRAYN, 2000). A elevação simultânea das taxas de glicose e lipídios resulta em glicolipotoxicidade, ou seja, em acúmulo intracelular de lipídios e seus metabólitos, que são prejudiciais para a função e sobrevivência das células β (CERF, 2010; SAUTER *et al.*, 2008).

Em circunstâncias em que tanto o suprimento de ácidos graxos quanto os níveis de AGL no plasma estão aumentados, o transporte de glicose para o interior das células e seu metabolismo subsequente é diminuído pelo aumento na oxidação dos ácidos graxos e cetoácidos (ciclo do ácido graxo-glicose de Randle). A oxidação dos ácidos graxos aumenta a relação do acetil coenzima A (acetil-CoA)/Coenzima A (CoA) e o nível de citrato celular. Estes, por sua vez, inibem três enzimas-chave no metabolismo da glicose pela glicólise e ciclo de Krebs, a hexoquinase, a fosfofrutoquinase e a piruvato desidrogenase. O transporte de glicose para dentro das células, portanto, fica diminuído (contribuindo para um quadro de hiperglicemia). Além disso, os intermediários da oxidação dos ácidos graxos retardam a glicólise e promovem gliconeogênese (agravando ainda mais a hiperglicemia) (BERNE *et al.*, 2004).

Devido ao ciclo do ácido graxo-glicose, o uso majorado de ácidos graxos como substrato energético (no caso de uma dieta hiperlipídica) desvia o metabolismo da glicose para longe da oxidação no fígado e no músculo. No fígado, o uso aumentado de ácidos graxos desvia o metabolismo da glicose do armazenamento como glicogênio para liberação desta na corrente sanguínea (BERNE *et al.*, 2004). Além disso, o aumento intracelular do conteúdo dos metabólitos dos ácidos graxos como diacilglicerol, Acil-CoA (cadeia longa) e ceramida, ativam a cascata da quinase serina/treonina levando à fosforilação em serina/treonina dos substratos IRS-1 e 2, causando reduzida capacidade dessas moléculas em ativar a PI3K, o que diminui a sinalização intracelular da insulina levando à RI (SHAFRIR *et al.*, 1999; KELLEY & MANDARINO, 2000; AKIYAMA *et al.*, 1996).

Trabalhos mostraram que o cultivo de ilhotas de roedores na presença de elevados níveis de AGL causa redução na secreção de insulina em resposta à elevação nas taxas glicêmicas, supressão da biossíntese de pró-insulina e queda nos estoques deste hormônio. Estudos com o rato obeso Zucker diabetic fatty (ZDF) encontraram que a elevada concentração de AGL circulantes nestes animais contribuiu para causar dano à função das células β e perda dessas células por apoptose, levando ao desenvolvimento do DM (LUPI *et al.*, 2002; ZHOU & GRILL, 1994; BOLLHEIMER *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1997).

Segundo Shimabukuro e colaboradores (1998), os altos conteúdos de lipídios nas células β causam aumento na síntese de ceramida *de novo*, como por exemplo, o excesso de palmitoil-CoA condensa com serina para formar ceramida em quantidades excessivas. As ceramidas aumentam a expressão de óxido nítrico sintetase induzível e resulta na superprodução de óxido nítrico (ON) desencadeando estresse oxidativo.

Os mecanismos moleculares que ligam a obesidade à RI e à falência das células β em compensar essa resistência não estão completamente desvendados e entendidos. Crescentes evidências sugerem que a obesidade está associada com RI e um estado de inflamação crônica

de baixo grau com progressiva infiltração de células do sistema imune no tecido adiposo. As citocinas derivadas das células imunitárias e as adipocinas derivadas do tecido adiposo aumentam a inflamação do tecido adiposo e conseqüentemente induzem a diminuição da sensibilidade à insulina (HARFORD *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2003; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; CHENTOUF *et al.*, 2011; SOLINAS & KARIN, 2010).

A maioria dos indivíduos, porém, é capaz de adaptar-se à obesidade e à RI através do aumento adequado de secreção de insulina, ou seja, quando há RI, tem-se um quadro de hiperinsulinemia. Os mecanismos adaptativos das células β à RI parecem envolver o aumento do metabolismo da glicose, a sinalização por ácidos graxos não-esterificados, o aumento da sinalização pela insulina/IGF-1 (fator de crescimento de insulina 1) e a ação secretagoga e mitógena da incretina GLP-1 (peptídeo semelhante a glucagon 1) (BUENO, 2009; DRUCKER, 2006; BERNAL-MIZRACHI *et al.*, 2001; CERF, 2010). Entretanto, naqueles que não são capazes de se adaptar ocorre um desbalanço havendo maior falência das células β do que reposição, com isso o metabolismo glicolítico decai, levando ao DM2 (HULL *et al.*, 2005; MASIELLO, 2006).

As conseqüências do DM2 em longo prazo (se não houver controle adequado da hiperglicemia) decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam a disfunção, dano ou falência de vários órgãos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010). Dentre as complicações mais prevalentes do DM tem-se neuropatia diabética, nefropatia diabética, retinopatia diabética, maior susceptibilidade a infecções dermatológicas e complicações de problemas cardíacos bem como hipertensão (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

1.2.3 Falência das células β e DM2

1.2.3.1 Inflamação

No DM 2, embora a causa primária da falência das células β não esteja clara, glicose, ácidos graxos saturados, acúmulo de polipeptídeo amilóide da ilhota e as citocinas IL-1 β (interleucina-1 β) e TNF- α (fator de necrose tumoral- α) tem sido sugeridos como desencadeadores, já que são tóxicos para linhagens de células β in vitro. Estes estímulos são susceptíveis de induzir tanto estresse oxidativo como do retículo endoplasmático (RE) levando à apoptose nas células beta, já que as células beta são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo devido sua baixa expressão de moléculas antioxidantes. (THOMAS, 2009, SAUTER *et al.*, 2008).

Inflamação é definida como uma resposta local a uma injúria tecidual. É caracterizada pela invasão de células imunitárias e liberação local de citocinas e quimiocinas. Não é por si só uma doença e sim a manifestação de uma doença e possui efeitos benéficos como prevenção de infecções e regeneração do tecido lesado. Igualmente pode piorar a doença com destruição tecidual devido mediadores inflamatórios (DONATH *et al.*, 2008).

Atualmente, já há inúmeras evidências experimentais, clínicas e epidemiológicas, da participação do sistema imune e de mediadores inflamatórios nos dois mecanismos básicos do DM2, RI e falência da célula β (KOLB & MANDRUP-POULSEN, 2005; HOTAMISLIGIL, 2006; DONATH *et al.*, 2008; HERDER *et al.*, 2005; THORAND *et al.*, 2005; PICKUP, 2004).

A manutenção por longo período de elevadas concentrações de nutrientes circulantes, como glicose ou AGL pode exercer um papel na patogênese do DM2 e contribuir com a indução de processos inflamatórios em vários tecidos incluindo as ilhotas pancreáticas. Tanto níveis elevados de glicose como de AGL estimulam IL-1 β e fatores pró-inflamatórios dependentes de IL-1 β em cultura de ilhotas humanas e de modelos animais (DONATH *et al.*,

2010). Algumas evidências sugerem que o sistema imune local pode estar envolvido no mecanismo de apoptose das células β que acompanha os distúrbios metabólicos prévios e culmina no DM2.

Indivíduos com excesso de tecido adiposo visceral apresentam concentrações elevadas de biomarcadores da inflamação, que predizem o desenvolvimento do DM2, como contagem de leucócitos, proteína C-reativa acompanhada de elevadas concentrações de citocinas IL-6 (interleucina-6), TNF- α e IL-1 β , além de reduzidas concentrações de adiponectina, que possui ação protetora aumentando a sensibilidade à insulina periférica em modelos animais (CHENTOUF *et al.*, 2011; JAGANNATHAN-BOGDAN *et al.*, 2011; DESPRÉS & LEMIEUX, 2006; SHKLYAEV *et al.*, 2003; ZOU & SHAO, 2008).

Citocinas são proteínas secretadas pelas células do sistema imunológico que participam dos processos de imunidade inata e adquirida. São moléculas sinalizadoras utilizadas na comunicação celular pelo sistema imune, porém, estudos recentes tem relatado que virtualmente todas as células, incluindo as células endócrinas das ilhotas pancreáticas, são produtoras potenciais de citocinas. Conseqüentemente, uma resposta inflamatória pode ser iniciada por qualquer tecido e, portanto, não é limitada a um mecanismo de defesa, estando presente também na base da tentativa de adaptação e de reparo em respostas que desencadeiam, por exemplo, o estresse metabólico. Se a resposta fisiológica inicial for de curta duração, será benéfica, entretanto, se esta resposta é mantida por um tempo prolongado, pode tornar-se deletéria à função do órgão. Evidências crescentes apontam o papel das citocinas como mediadores-chave nas mudanças adaptativas observadas nas ilhotas submetidas a altas demandas metabólicas (ABBAS *et al.*, 2003; DONATH *et al.*, 2010; DONATH *et al.*, 2008). Além disso, dados clínicos e experimentais, *in vivo* e *in vitro*, indicam que no DM2, assim como no diabetes mellitus tipo 1 (DM1), a inflamação na ilhota

de pancreática (insulite) é uma característica predominante (DONATH *et al.*, 2008; EHSES *et al.*, 2007).

Neste contexto, uma citocina particular pode exercer uma ação muito específica levando à proliferação de células β e aumento na produção de insulina, enquanto que outra citocina irá regular a massa de células α e a liberação hormonal. Entretanto, se o estressor for desproporcional ao potencial adaptativo da ilhota, esta reação inflamatória rigidamente orquestrada e benéfica pode falhar e se tornar deletéria (DONATH *et al.*, 2010).

O TNF- α é expresso como uma proteína transmembrana da superfície celular de 26 kDa que, após clivagem, produz uma forma de 17 kDa solúvel e biologicamente ativa. Esta molécula foi originalmente identificada como uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e linfócitos. Foi reconhecida como a primeira citocina que poderia induzir RI e foi proposta como um representante molecular de ligação entre obesidade e RI. A expressão de RNA (ácido ribonucléico) mensageiro de TNF- α é maior em obesos e fortemente correlacionada com o grau de obesidade e o nível de RI em animais obesos e humanos. O TNF- α diminui a sinalização do IR através do decréscimo da atividade da tirosina quinase do receptor, podendo também induzir a RI de outras maneiras como estimulando a lipólise, o que aumenta os níveis de AGL circulantes, alterando desta forma a ação da insulina, entretanto o papel do TNF- α na duração e progressão do DM2 não está totalmente claro (SWAROOP *et al.*, 2012; ZOU & SHAO, 2008).

IL-1 β é uma proteína pertencente à família de citocinas interleucina-1 (IL-1). Esta citocina é produzida como uma pró-proteína (31-34 kDa), e é proteoliticamente processada à sua forma ativa pela caspase 1. Esta citocina é um importante mediador da resposta inflamatória, e está envolvido em várias atividades celulares, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose (RUBARTELLI *et al.*, 1990). O sinal de transdução de IL-1 β é iniciado pela ligação do ligante ao receptor de IL-1 β tipo 1 (IL-1R), seguido pelo encaixe da

proteína acessória ao IL-1R. Isto ativa os efeitos subsequentes, com regulação da sobrevivência e função das células β (SAUTER *et al.*, 2008).

A IL-1 β produzida localmente pelas células das ilhotas pancreáticas, incluindo as células β , possui um importante papel na manutenção diária da massa de células β e sua respectiva função, entretanto a exposição crônica e patológica a níveis elevados de IL-1 β está associada com inflamação da ilhota levando à queda de função e massa das células β no DM. Isto afeta a secreção de insulina, induz a produção de ON, inibe a proliferação e promove a apoptose. (DONATH *et al.*, 2010).

O bloqueio sistêmico da produção local de IL-1 β por células β , sob estímulo de glicose, através de injeção de antagonista recombinante do receptor de IL-1 β em 70 pacientes com DM2 levou ao aumento da secreção de insulina (MAEDLER *et al.*, 2002; LARSEN *et al.*, 2007; BONI-SCHNETZLER *et al.*, 2008). A hipótese defendida pelo grupo de pesquisadores que produziu esses resultados é que o estresse metabólico (hiperglicemia, dislipidemia e adipocinas) levaria à produção de IL-1 β pelas ilhotas, a qual controlaria a sua própria produção e a de outros mediadores inflamatórios e atrairia macrófagos, perpetuando o processo inflamatório. Este processo culminaria na falência secretória e morte das células β (EHSES *et al.*, 2008). Adicionalmente, há mais de uma década foi demonstrado que a IL-1 β pode induzir a expressão de Fas, receptor de superfície celular envolvido na apoptose de células β (LOWETH *et al.*, 1998).

Citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β , bem como AGL, ativam reguladores-chave da inflamação como a quinase c-Jun N-terminal (JNK), inibidor da quinase KB β (IKK β) nas células de atuação da insulina. O aumento destes reguladores em estados de resistência à insulina ativa fatores de transcrição pró-inflamatórios incluindo a proteína ativadora 1 (c-Jun/Fos) e NF- κ B. Isto leva à fosforilação em serina dos IRS o que interfere na ação da insulina (KARIN & DELHASE, 2000; HARFORD *et al.*, 2011). As vias que

envolvem a inibição de proteínas sinalizadoras supressoras de citocinas (*suppressor of cytokine signalling*, SOCS) e indução da sintase do óxido nítrico (iNOS) podem estar envolvidas no mecanismo de RI mediada por citocinas. (WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005; MOONEY *et al.*, 2001; PERREAULT & MARETTE, 2001; ARKAN *et al.*, 2005).

Embora por diferentes mecanismos, a maioria dos fatores inflamatórios age negativamente nas vias de sinalização da insulina, modificando os seus substratos intracelulares, principalmente a fosforilação da família protéica dos IRS, com a ajuda de diferentes fatores de transcrição, dentre eles, a família do receptor ativado por proliferação de peroxissomo (PPAR). Assim, as vias metabólicas, inflamatórias e da imunidade inata parecem interagir, levando à RI de maneira complexa e ainda pouco clara, apesar dos inúmeros avanços nessa área na última década. O chamado estresse do RE e a disfunção mitocondrial, causados, entre outros, por aumento de demanda metabólica, tem sido considerados importantes elos entre as vias metabólicas e inflamatórias envolvidas na RI associada à obesidade e ao DM2 (HOTAMISLIGIL, 2006; TANIGUCHI *et al.*, 2006; SCHENK *et al.*, 2008).

Devido à suas características pró-inflamatórias, as citocinas TNF- α e IL-1 β são bons preditores da falência das células beta e com isso a instalação do DM, sendo sua expressão de grande importância no processo de instalação da doença ao longo do tempo.

1.2.3.2 Apoptose

A diminuição na massa de células β pode desempenhar um papel central na patogênese do DM tanto em humanos como em roedores (CNOP *et al.*, 2005). Evidências tanto para doença humana como para modelos animais indicam que a morte de células β em

ambos os tipos de DM (tipo 1 e tipo 2) ocorre por apoptose (THOMAS, 2009; SAUTER *et al.*, 2008).

Apoptose, ou morte celular programada, é uma maneira fisiológica de remodelação de tecidos durante a organogênese, mas também está presente em outras fases da vida, por exemplo, na involução do timo. Está claro que o pâncreas endócrino é ativamente remodelado após o nascimento e a apoptose é um importante mecanismo envolvido nisso. A apoptose é caracterizada por mudanças morfológicas, como condensação da cromatina nuclear, contração celular, membrana bulosa e formação de corpos apoptóticos envolvidos por membrana e constituintes celulares que sofrem fagocitose antes do extravasamento dos conteúdos intracelulares, evitando assim o desencadeamento de uma resposta autoimune (MANDRUP-POULSEN, 2001).

Apesar de ser um evento biológico, em muitas doenças crônicas degenerativas, porém, a apoptose leva à inapropriada deleção de células. A cascata apoptótica pode ser eliciada por variados estímulos, incluindo eventos intracelulares, como desbalanço metabólico, perturbação do ciclo celular, ou dano ao DNA, e fatores extracelulares, como a ativação de receptores de morte (receptores de Fas e de TNF- fator de necrose tumoral) e diminuição de fatores de crescimento, fatores metabólicos, certos hormônios, além de mediadores inflamatórios como as citocinas. Altas concentrações de glicose tem sido relatadas também como o gatilho para a apoptose em vários tipos celulares, incluindo as células β em modelos animais (KAIFU *et al.*, 2009; MANDRUP-POULSEN, 2001).

Duas vias apoptóticas distintas, mas interconectadas foram caracterizadas – a via extrínseca (induzida por receptores de morte na superfície celular) e a via intrínseca (regulada por Bcl-2 ou mitocondrial). Ambas as vias terminam na ativação de efetores, as caspases, que são proteases cisteinil aspartato específicas as quais medeiam os eventos proteolíticos que caracterizam a apoptose. Há também uma via adicional que envolve citotoxicidade mediada

por células-T e morte celular dependente de perforina-granzima (ZEISS, 2003; CHOI & WOO, 2010; THOMAS, 2009; ELMORE, 2007).

As caspases e todos os componentes da maquinaria apoptótica, geralmente pré-existem em células saudáveis em formas inativas. A ativação das caspases efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7) ocorre pelas caspases iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e definem as duas vias apoptóticas amplamente estudadas (MORAES, 2009). O acúmulo de proteínas deformadas e alterações na homeostase do cálcio no RE causam estresse do RE e levam à morte celular (ZEISS, 2003; CHOI & WOO, 2010; THOMAS, 2009).

A via extrínseca envolve receptores de morte que são membros da superfamília do receptor do TNF. A união de ligantes específicos a estes receptores promove o recrutamento e oligomerização de proteínas citoplasmáticas adaptadoras, como a ligação do ligante Fas resulta na ativação da molécula adaptadora FADD e a ligação do ligante TNF resulta em TRADD. FADD se associa a procaspase-8, formando o complexo de indução de morte (DISC), resultando em ativação auto-catalítica da procaspase-8 que, uma vez ativada, desencadeia os eventos subsequentes da apoptose. Os receptores de morte podem ser inibidos, sendo desta forma a via controlada, por uma proteína chamada c-FLIP (ELMORE, 2007; CHOI & WOO, 2010; THOMAS, 2009).

O estímulo que inicia a via intrínseca pode produzir sinais de forma positiva ou negativa. Os sinais negativos envolvem a ausência de certos fatores de crescimento, hormônios e citocinas que podem levar à falência da supressão de programas de morte desencadeando a apoptose. Outros estímulos que atuam de maneira positiva, ou seja, induzindo a apoptose, incluem radiação, toxinas, hipóxia, radicais livres entre outros. Estes estímulos podem causar mudanças na membrana mitocondrial, levando à liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo c. Estas proteínas se ligam e ativam Apaf-1 e

pró-caspase-9, ocorrendo a ativação da caspase-9 desencadeando o restante da via apoptótica (ELMORE, 2007; CHOI & WOO, 2010; THOMAS, 2009).

O controle e regulação dos eventos da via intrínseca acima descritos ocorrem por membros da família de proteínas Bcl-2, pois estas controlam a permeabilidade da membrana mitocondrial e podem ser pró-apoptóticas (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, and Blk) ou antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xl, Bcl-XS, Bcl-w, BAG) (ELMORE, 2007). O início das fases iniciais da apoptose é dependente de interações entre as proteínas da família Bcl, ou seja, quando há um desbalanço aumentando as proteínas pró-apoptóticas ocorre o disparo da cascata que leva à morte celular (FEDERICI *et al.*, 2001).

O aumento na expressão de Bcl-2, proteína anti-apoptótica, é um evento crítico através do qual fatores de crescimento promovem a sobrevivência celular. A região promotora do gene de Bcl-2 contém local para o fator de transcrição CREB, que é um regulador positivo da expressão de Bcl-2 e pode ser ativado pela Akt. A importância da PI3K e Akt para modificações na transcrição e pós-tradução de Bcl-2 na maquinaria apoptótica tem sido relatada por diversos estudos (PUGAZHENTHI *et al.*, 2000). Na resistência à insulina, em que as funções de PI3K e Akt estão prejudicadas, pode ocorrer menor expressão de Bcl-2, levando ao desencadeamento/aumento da apoptose.

A Bcl-2, em particular, tem habilidade em modular a liberação de fatores apoptogênicos (citocromo c), bem como inibir a despolarização da membrana mitocondrial. A superexpressão de Bcl-2 tem sido relatada como preventor da morte celular tanto por apoptose quanto por necrose em muitos tipos de células incluindo as produtoras de insulina, sob uma ampla variedade de estímulos e injúrias (BARBU *et al.*, 2002; MIZUNO *et al.*, 1998; CONTRERAS *et al.*, 2002).

A expressão de Bcl-2 em ilhotas parece ser inversamente relacionada à quantidade de gordura na ilhota, que por outro lado é controlada pela ação do hormônio leptina. A taxa de

apoptose é mínima em ilhotas com teores normais de gordura devido à alta expressão de Bcl-2 (ação protetiva). Porém, quando as ilhotas são expostas a maior quantidade de gordura os níveis de Bcl-2 decaem. Enquanto as células são sensíveis à ação da leptina, há altas quantidades de Bcl-2 e as células estão protegidas; porém, se a célula torna-se insensível à leptina, o que é o caso em muitos modelos de obesidade induzida por dieta, o acúmulo de gordura e o declínio de Bcl-2 leva à eliminação destas células (SHIMABUKURO *et al.*, 1998).

A expressão de Bcl-2, portanto, está relacionada à taxa de apoptose, sendo menor sua expressão quando a taxa de apoptose é mais elevada (MEÇA, 2010). Devido a isso, a expressão da proteína Bcl-2 pode ser utilizada como um possível indicador da presença de apoptose nas células.

1.3 Modelos animais e DM2

Os fatores envolvidos na disfunção das células β não estão totalmente estabelecidos, mas elas deixam de responder aos estímulos secretagogos. Dentre as possibilidades, a falta de expansão adequada da massa de células β frente à RI pode levar à disfunção destas células (WESTERMARK, 1972; BUTLER *et al.*, 2003; HULL *et al.*, 2005). Em contrapartida, a massa de células β pode expandir apropriadamente, mas um defeito puramente funcional pode ser a base da má adaptação das células ao aumento de gordura na dieta e RI (BUTLER *et al.*, 2003). Ou seja, no DM2, a contribuição da diminuição da massa de células β na deficiência insulínica é controversa (KARGAR & KTORZA, 2008).

Métodos não invasivos de estudos da massa de células β *in vivo* em humanos não estão disponíveis, devido a isso os dados são escassos e não há nenhuma diferenciação detalhada entre os vários estágios de progressão do DM2. Neste aspecto, modelos animais de DM2 têm

sido muito úteis. Particularmente, tornam possível o estudo em paralelo das mudanças ao longo do tempo na massa e função das células β . Eles também permitem a exploração dos mecanismos subjacentes às modificações anatômicas e funcionais (KARGAR & KTORZA, 2008).

O aumento no teor de gordura da dieta (dieta hiperlipídica) tem sido utilizado para produzir obesidade em várias espécies de camundongos e ratos induzindo com isso a manifestação de RI e DM2 (PAREKH *et al.*, 1998; HULL *et al.*, 2005). Em alguns estudos, o tratamento com dieta hiperlipídica em ratos é acompanhado de hiperinsulinemia basal em conjunto com níveis de glicose basais inalterados (IWANISHI & KOBAYASHI, 1993; MAEGAWA *et al.*, 1986; PASCOE & STORLIEN, 1990; WATARAI *et al.*, 1988).

Estudos com roedores tem encontrado aumento na área total da ilhota em resposta à RI, mas muitos destes estudos tem utilizado camundongos ou ratos manipulados geneticamente (BERNAL-MIZRACHI *et al.*, 2001; BUTLER *et al.*, 2003; BOCK *et al.*, 2003), tornando os resultados mais difíceis de interpretar, e talvez confundindo a interpretação dos processos subjacentes à adaptação da ilhota à obesidade e RI, daí a necessidade de um modelo não modificado geneticamente que possa simular com mais fidelidade o que ocorre em humanos.

O camundongo Swiss Webster está relacionado com o camundongo AKR propenso ao diabetes e, após 6 – 8 semanas de exposição experimental à dieta hiperlipídica é relatado desenvolvimento de obesidade, hiperglicemia e esteatose hepática. Este modelo desenvolve, através da combinação de fatores ambientais e genéticos, um fenótipo que se assemelha à síndrome metabólica humana e DM2 sendo, portanto é uma ferramenta interessante para estudos relacionados à fisiopatologia e terapias relacionadas a esta condição (DE SOUZA *et al.*, 2007).

Devido aos fatores envolvidos na disfunção das células β não estarem bem estabelecidos e serem de fundamental importância para o desenvolvimento de novas terapias, como transplante de células tronco, além de estudos relatarem que uma parte dos indivíduos obesos não desenvolvem DM é imprescindível estudos que investiguem a situação morfológica e fisiológica do pâncreas caracterizando a evolução da doença ao longo do tempo em modelos animais expostos à dieta hiperlipídica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar morfológica e funcionalmente a progressão da RI e desenvolvimento de DM2 em modelo animal de obesidade Swiss Webster (SW) exposto à dieta hiperlipídica.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliação morfométrica das ilhotas pancreáticas.

2.2.2 Verificação da presença de células e mediadores inflamatórios em homogeneizado pancreático.

2.2.3 Verificação da expressão de marcador anti-apoptótico Bcl-2 ilhotas pancreáticas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Condições experimentais

Camundongos Swiss Webster machos, adultos, pesando $28,2 \pm 0,5$ g (média \pm erro padrão da média), com 4 semanas de idade, foram obtidos do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório) da Unicamp.

Durante o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais, no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia, do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da UFSCar sob condições de temperatura ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), umidade e iluminação (6 – 18h: claro, 18 – 6h: escuro) controladas. A oferta de água e alimento foi *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Protocolo n. 066/2010).

3.1.1 Desenho experimental

Os animais ficaram durante uma semana em aclimatação, recebendo dieta padrão. Após este período, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos:

-Grupo controle (C) recebeu dieta padrão.

-Grupo dieta hiperlipídica (DH) recebeu dieta com 60% do valor calórico representado por gordura.

Após 4, 8 e 16 semanas, os animais de ambos os grupos foram sacrificados por decapitação e o pâncreas foi coletado para posterior análise. O organograma abaixo (Figura 1) mostra o desenho experimental utilizado.

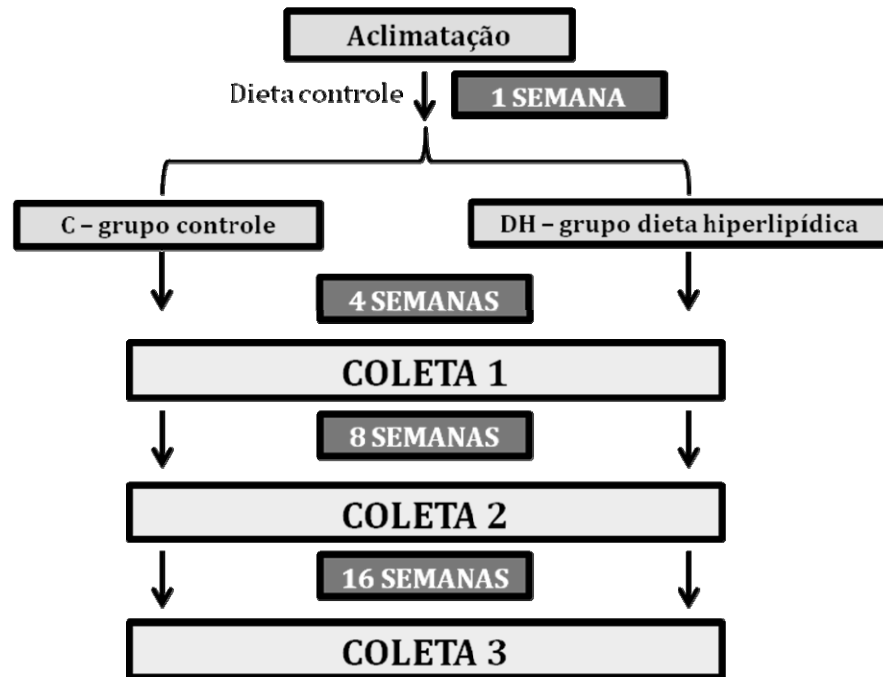


Figura 1. Organograma representativo do desenho experimental utilizado.

3.1.2 Composição das Dietas

As dietas utilizadas foram obtidas da PragSoluções Comércio e Serviços Ltda (Jaú – SP) e continham a seguinte composição:

Dieta padrão purificada: 13,1% de proteínas, 73,8% de carboidratos, 4,0% de lipídios e densidade calórica de 3,8 Kcal/g, conforme informações fornecidas pelo fabricante.

Dieta hiperlipídica purificada: 20,0% de proteínas, 20,0% de carboidratos, 60,0% de lipídios e densidade calórica de 5,2 Kcal/g, conforme informações fornecidas pelo fabricante.

3.1.3 Controle da Ingestão Alimentar e Massa Corporal

A ingestão alimentar foi mensurada diariamente (subtração da ração oferecida pela ração restante) e o peso dos animais foi aferido semanalmente durante o período experimental.

3.1.4 Monitoramento da glicemia

A glicemia dos animais foi aferida periodicamente, sendo para isso coletadas amostras de sangue da cauda dos animais e a glicemia determinada por glicosímetro portátil (Accu-Chek[®] Active, Roche), pela manhã, com os animais em jejum de 12 horas.

3.1.5 Teste de tolerância à glicose (TTG)

O TTG foi realizado após 3, 7, 11 e 15 semanas de experimento. Os animais foram mantidos em jejum por 12h (período noturno) e o teste foi realizado pela manhã após o jejum. Foi coletado sangue da cauda para avaliação glicêmica no jejum e então os animais receberam uma injeção intraperitonal de glicose em solução salina (NaCl 0,9%) na concentração de 1,5g por quilograma de peso do animal. A glicemia foi monitorada após 30, 60, 90 e 120 minutos da aplicação da solução de glicose.

3.1.6 Teste de tolerância à insulina (TTI)

O TTI foi realizado após 3, 7, 11 e 15 semanas de experimento, com intervalo de dois dias após o TTG. Os animais foram mantidos em jejum por 12h (período noturno) e o teste foi realizado pela manhã após o jejum. Foi coletado sangue da cauda para avaliação glicêmica no jejum e então os animais receberam uma injeção intraperitonal de insulina de ação regular

humana (Novolin[®] R) em solução salina (NaCl 0,9%) na concentração de 0,75U por quilograma de peso do animal. A glicemia foi monitorada após 30, 60, 90 e 120 minutos da aplicação da solução de insulina.

3.2 Coleta do pâncreas

O pâncreas foi coletado, pesado e seccionado em duas partes, conforme mostrado na Figura 2.

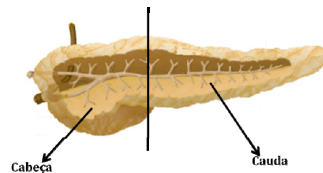


Figura 2. Corte seccional do pâncreas. O traço vertical indica o local de corte para divisão do pâncreas em cabeça e cauda.

A região da cabeça pancreática foi armazenada em tubos plásticos do tipo falcon contendo formalina tamponada (10%) para posterior análise histológica e a região da cauda foi armazenada em tubos plásticos (Eppendorf[®]) contendo 700µL de inibidor de protease *Complete* (Roche) em freezer -20°C para posterior análise do material.

3.3 Análises morfométricas do Pâncreas Endócrino

As alíquotas de tecido pancreático fixadas em formalina tamponada (10%) passaram por processo de desidratação em sequência crescente de concentração de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), foram diafanizadas em xilol, impregnadas em paraplast e, incluídas em blocos de paraplast (Histosec[®] - Merck). Foram feitos cortes histológicos de 5µm de

espessura em micrótomo (Micron[®] HM360) e os cortes foram estendidos e montados em lâminas tratadas com polilisina para melhor fixação do corte.

3.3.1 Coloração com hematoxilina e eosina (HE)

Após o procedimento descrito acima, duas lâminas de cada animal passaram pelo processo de desparafinização em xilol, seguida por alcoolização em álcool etílico e hidratação em água destilada, sendo finalmente os cortes corados por HE. Após a coloração, os cortes foram desidratados em álcool e diafanizados em xilol, sendo posteriormente feita a montagem das lâminas utilizando Bálsamo do Canadá para fixação de lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus[®] modelo BX 51). Uma secção de cada animal foi escolhida e todas as ilhotas deste corte foram fotografadas por uma câmera acoplada ao microscópio (Olympus[®] DP72) com a ajuda de um programa de computador (DP2-BSW), para posterior análise morfológica e verificação da presença/ausência de processo inflamatório. A análise das lâminas teve a colaboração da Profa. Dra. Lucimar de Avó, patologista do Departamento de Medicina da UFSCar.

3.3.2 Reações de Imunohistoquímica

Para as reações de imunohistoquímica, quatro lâminas de cada animal foram mantidas em estufa a 60°C pelo período de 12h para desparafinização. As lâminas então passaram por processamento para hidratação por imersão em xilol, álcool etílico (em concentrações decrescentes de 100%, 80% e 70%) e água destilada. Os cortes foram, em seguida, lavados com PBS 1X (contendo Tween 20; 0,05%). A recuperação antigênica, quando aplicada, foi feita através de aquecimento dos cortes, em tampão citrato, pH 6.0, por 7 minutos em

aparelho microondas. Após esta etapa ou sequencialmente à lavagem, foi feito o isolamento dos cortes com caneta hidrofóbica e então o bloqueio da peroxidase endógena por 10 min com o reagente *Peroxidase and Alkaline Phosphatase Blocking Reagent (Dual Endogenous Enzyme-Blocking Reagent, S200389-2)* (DAKO). Após lavagem, foi utilizado PBS+BSA 1% (contendo Tween 20; 0,05%) por 20 minutos para bloqueio das ligações inespecíficas e em seguida foi adicionado anticorpo primário *Insulin (H-86)*, rabbit policlonal (Santa Cruz Biotechnology, sc: 9168; 1:100), seguida por incubação de 1h ou *Bcl-2 (N-19)*, rabbit policlonal (Santa Cruz Biotechnology, sc:492; 1:200), seguida por incubação de 2h. Após lavagem, o kit Universal *LSAB™+ Kit/HRP, Rabbit/Mouse/Goat* (DAKO) foi utilizado como fonte do anticorpo secundário e estreptavidina. A reação foi revelada com *DAB+* (DAKO) e contra-corada com hematoxilina. Foram feitas duas lâminas por animal de cada marcador, e estas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus[®], modelo BX 51) acoplado à câmera fotográfica (Olympus[®] DP72) com ajuda de um programa de computador (DP2-BSW). As ilhotas foram fotografadas e as imagens armazenadas para posterior análise morfométrica.

Para análise morfométrica, cinco ilhotas (a menor quantidade de ilhotas encontradas em uma secção pancreática) de cada animal foram selecionadas e fotografadas, sendo a primeira ilhota da esquerda para direita no corte e as quatro diretamente adjacentes a esta (BUTLER *et al.*, 2003), para posterior análise da área total da ilhota, área imunomarcada para insulina, contagem do número de células beta e número total de células em cada ilhota. Para as análises das áreas foi utilizado o programa Image-Pro[®] Plus (Media Cybernetics) e para a contagem de células foi utilizado o programa Image J.

A partir das análises descritas foram feitos os cálculos para obtenção do número de células beta por μm^2 da ilhota, número total de células por μm^2 da ilhota, área fracional de insulina (fração da área imunomarcada com insulina pela área total da ilhota), e o número fracional de células beta (fração do número de células beta pelo número total de células em

cada ilhota). Foi feita ainda a análise semi-quantitativa para intensidade de marcação de insulina de acordo com a proposta de Simsek e colaboradores (2012) da seguinte maneira: i) A= não reatividade, ii) B= fraca, reatividade celular individualizada em $\leq 25\%$ da ilhota, iii) C= média a moderada reatividade em $\leq 50\%$ da ilhota, iv) D= forte reatividade em $\leq 50\%$ da ilhota, e v) E= reatividade muito forte em $> 75\%$ da ilhota. A intensidade média de marcação foi calculada pela seguinte fórmula: $[(Ax1)+(Bx2)+(Cx3)+(Dx4)+(Ex5)]/(A+B+C+D+E)$ e relatada como a seguir: i) - = 0,00; ii) + = 0,01-1,00; iii) ++ = 1,01-2,00; iv) +++ = 2,01-3,00 e v) ++++ = 3,01-4,00.

A análise imunohistoquímica do marcador de apoptose Bcl-2 foi feita de maneira semelhante à descrita acima, sendo selecionadas cinco ilhotas de cada animal e calculada a área fracional de Bcl-2, e também a análise semi-quantitativa para avaliação da intensidade de marcação de acordo com a proposta de Simsek e colaboradores (2012) acima descrita.

3.4 Quantificação de citocinas no pâncreas

As alíquotas pancreáticas armazenadas em inibidor de protease foram homogeneizadas e centrifugadas a 2000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos plásticos (eppendorf[®]) para posterior análise.

As concentrações das citocinas TNF- α e IL-1 β foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), com kits da eBioscience[®] [TNF- α , kit *Ready-Set-Go!*[®] *Mouse Tumor Necrosis Factor-alpha* (cat. 88-7324-88); IL-1 β o kit *Ready-Set-Go!*[®] *Mouse Interleukin-1beta* (cat. 88-7013-88)], seguindo as instruções do fabricante.

3.5 Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizado o programa STATISTICA[®] 7.0 (Stat Soft). Inicialmente foi testada a distribuição normal dos dados. Para comparação entre grupos C e DH, foi utilizado o teste One-Way ANOVA, com pós-teste de Dunnett. Para comparação das diferenças de cada grupo nos tempos 4, 8 e 16 semanas, foi utilizado teste Two-Way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Para comparação entre os grupos C e DH nos tempos 4, 8 e 16 semanas foi utilizado o teste Two-Way ANOVA e pós-teste Dunnett. O nível de significância estatística adotado foi de $P < 0,05$. Os resultados estão apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM).

4. RESULTADOS

4.1 Massa corporal

A Figura 3 apresenta a evolução da massa corporal (gramas, g) dos animais do grupo C e do grupo DH ao longo do período experimental. Os animais de ambos os grupos apresentaram aumento de massa corporal ao longo do período experimental, porém observa-se diferença significativa da massa corporal do grupo DH em relação ao C, a partir da quinta semana, diferença esta mantida nas semanas 6-8 e 12-16.

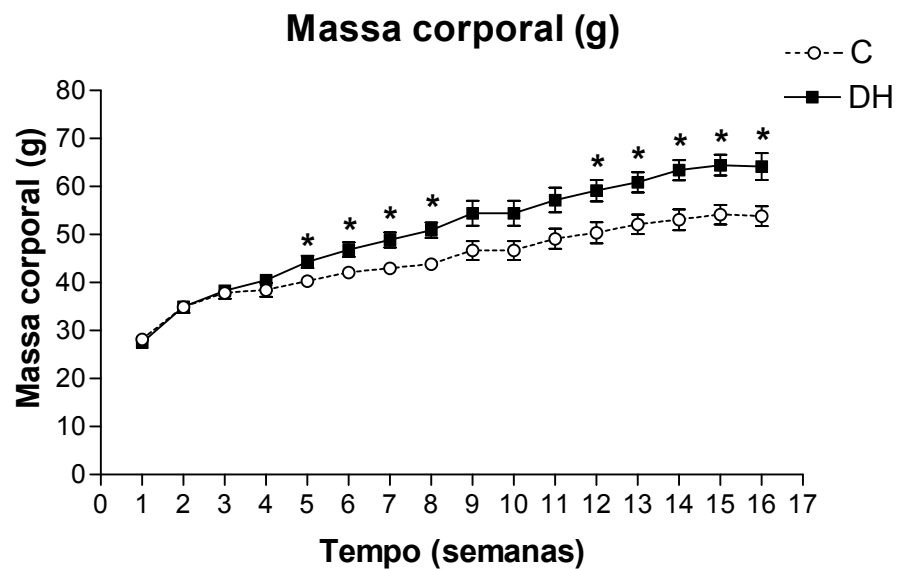


Figura 3. Massa corporal (g). Os valores estão representados em média \pm EPM. Grupo C, n=4-11; Grupo DH, n=5-14. * $P < 0,05$, C vs DH.

4.2 Ingestão calórica

A Figura 4 apresenta a evolução da ingestão calórica diária (quilocalorias, Kcal) dos animais ao longo do período experimental. Observa-se aumento significativo da ingestão

calórica do grupo DH comparado com o grupo C a partir da 4^a semana, que se mantém até o término do experimento, com exceção das 13^a e 15^a semanas.

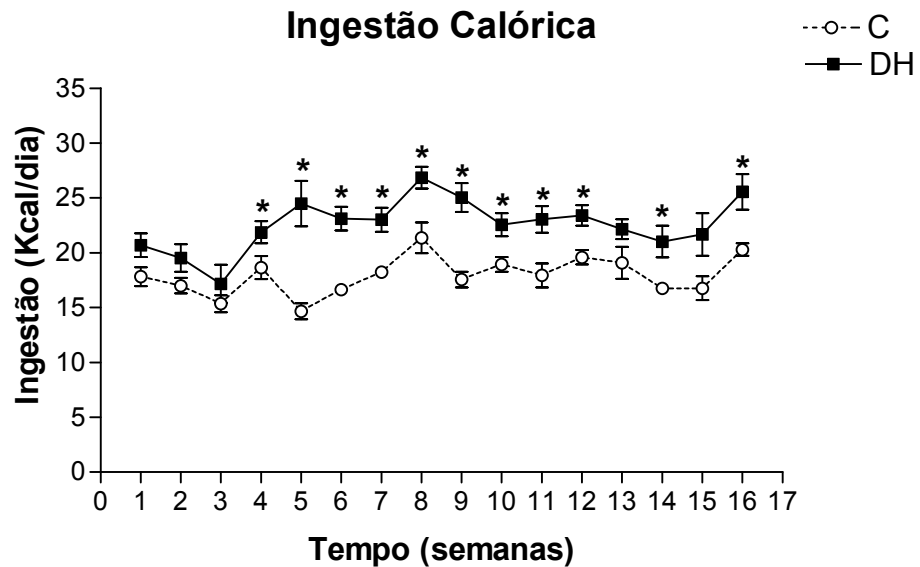


Figura 4. Ingestão calórica (Kcal/dia). Os valores estão representados como média \pm EPM. Grupo C, n=4-11; Grupo DH, n=5-14. * $P < 0,05$, C vs DH.

4.3 Controle Glicêmico (Jejum)

A Figura 5 apresenta o gráfico do controle glicêmico dos animais, em jejum, durante o período experimental. As medidas foram feitas nas semanas 3, 7, 11 e 15. A glicemia inicial dos animais não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Porém, os animais do grupo DH apresentaram glicemia significativamente maior em relação ao grupo C a partir da 3^a semana.

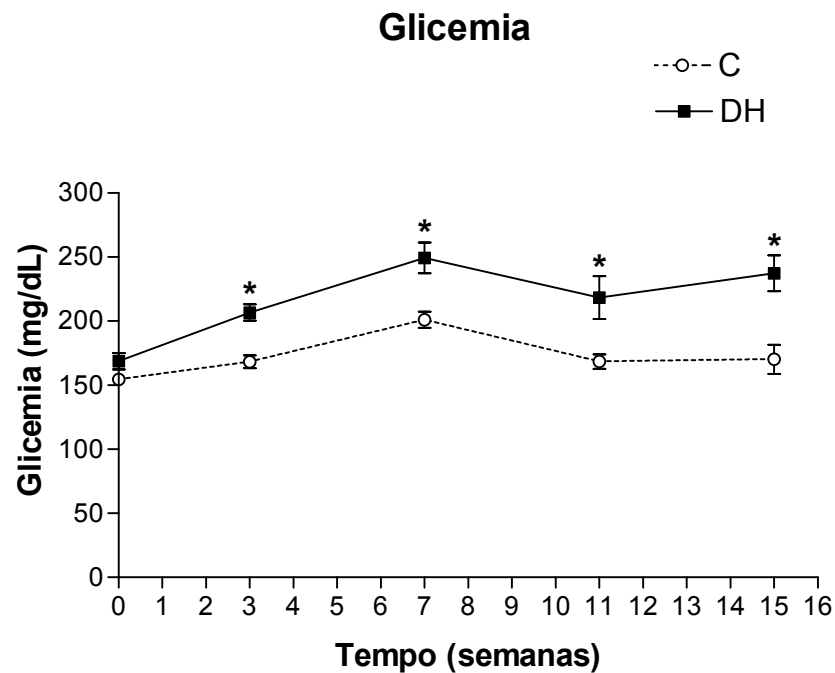


Figura 5. Glicemia (mg/dL). Os valores estão representados como média \pm EPM. Grupo C, n= 4-11; Grupo DH, n=5-14. * P < 0,05, C vs DH.

4.4 Teste de tolerância à glicose (TTG)

As Figuras 6 e 7 apresentam os resultados obtidos nos TTGs realizados nas 3^a, 7^a, 11^a e 15^a semanas experimentais. O grupo DH apresentou valores, tanto de concentração glicêmica plasmática como de área sob a curva (AUC), significativamente maiores do que o grupo C a partir da 3^a semana. Não foi observada diferença significativa entre as AUC, de ambos os grupos ao longo do período experimental.

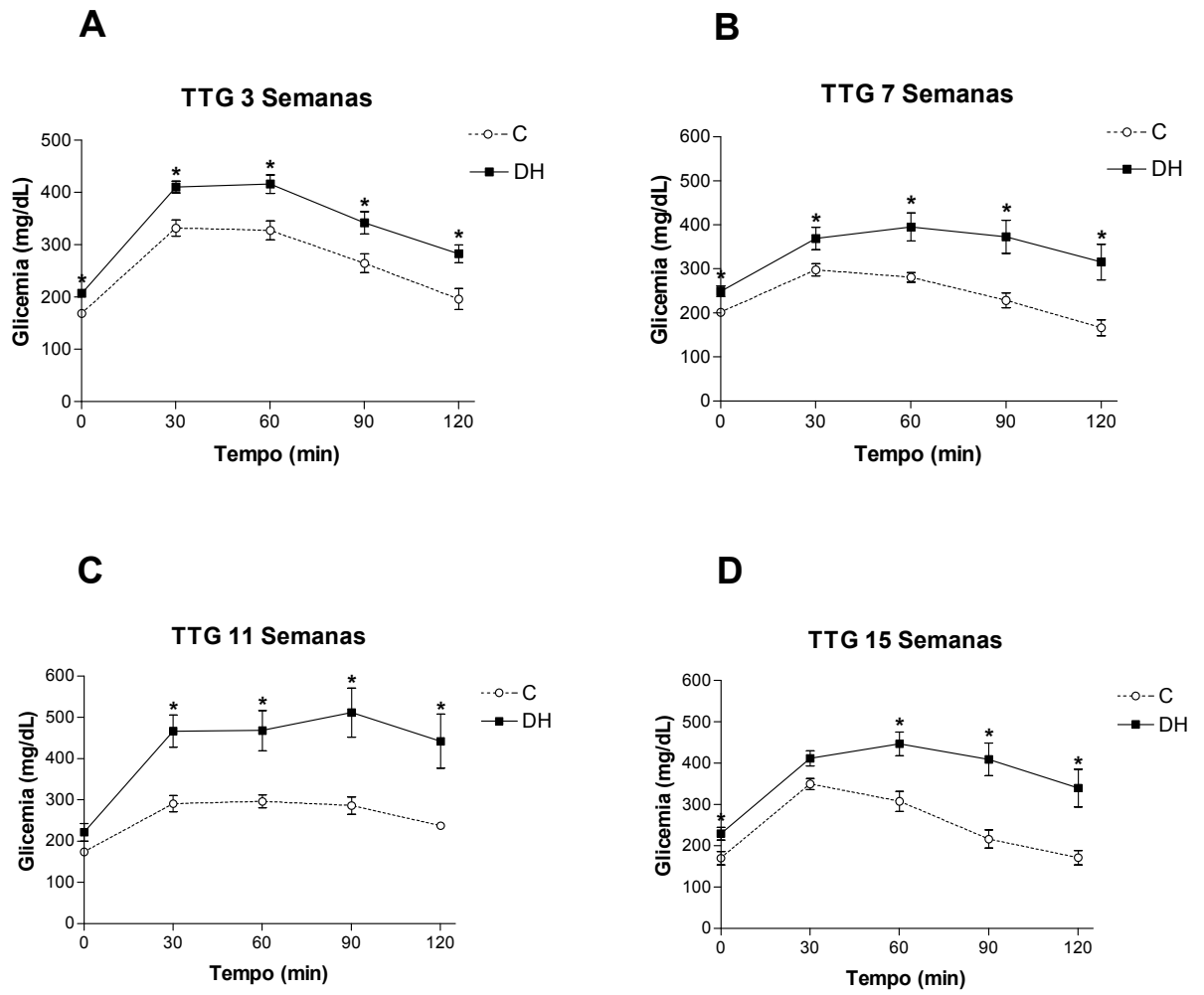


Figura 6. TTG. Os valores estão representados como média \pm EPM. A, teste após 3 semanas de tratamento, B, após 7 semanas, C, após 11 semanas e D, após 15 semanas. Grupo C, n= 4-11; Grupo DH, n=5-14. * $P < 0,05$, C vs DH.

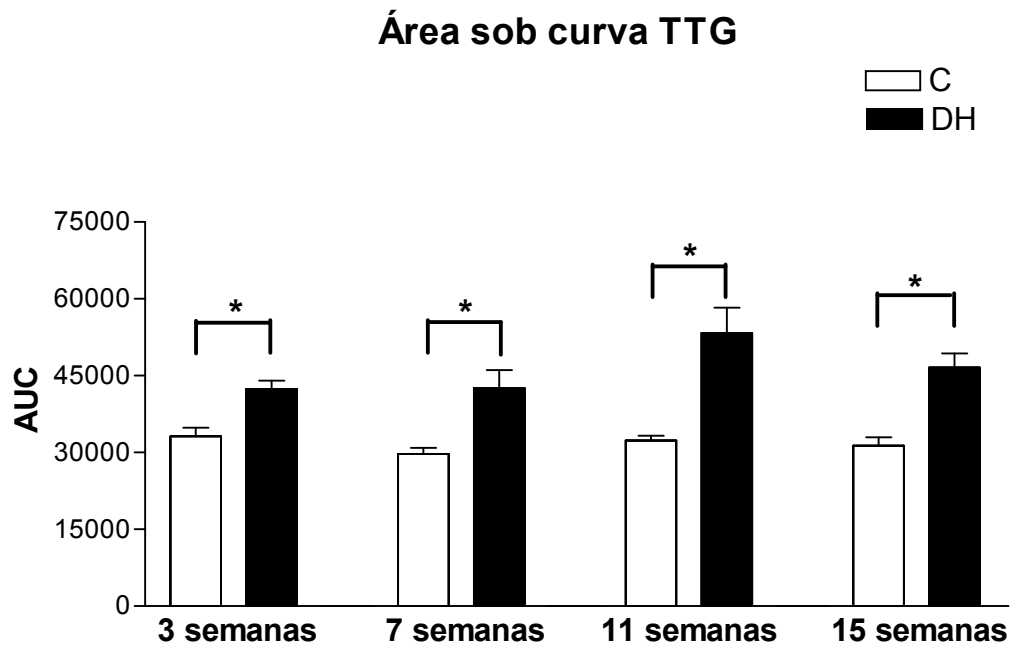


Figura 7. AUC TTG. Os valores estão representados como média \pm EPM. Grupo C, n= 4-11; Grupo DH, n=5-14. * P < 0,05, C vs DH.

4.5 Teste de tolerância à insulina (TTI)

As Figuras 8 e 9 apresentam os resultados obtidos nos TTIs realizados nas 3^a, 7^a, 11^a e 15^a semanas experimentais. O grupo DH apresentou valores, tanto de concentração glicêmica plasmática como de área sob a curva (AUC), significativamente maiores do que o grupo C a partir da 3^a semana. Não foi observada diferença significativa entre as AUC do grupo C ao longo do período de experimento. Houve diferenças significativas entre as AUC do grupo DH ao longo do período experimental.

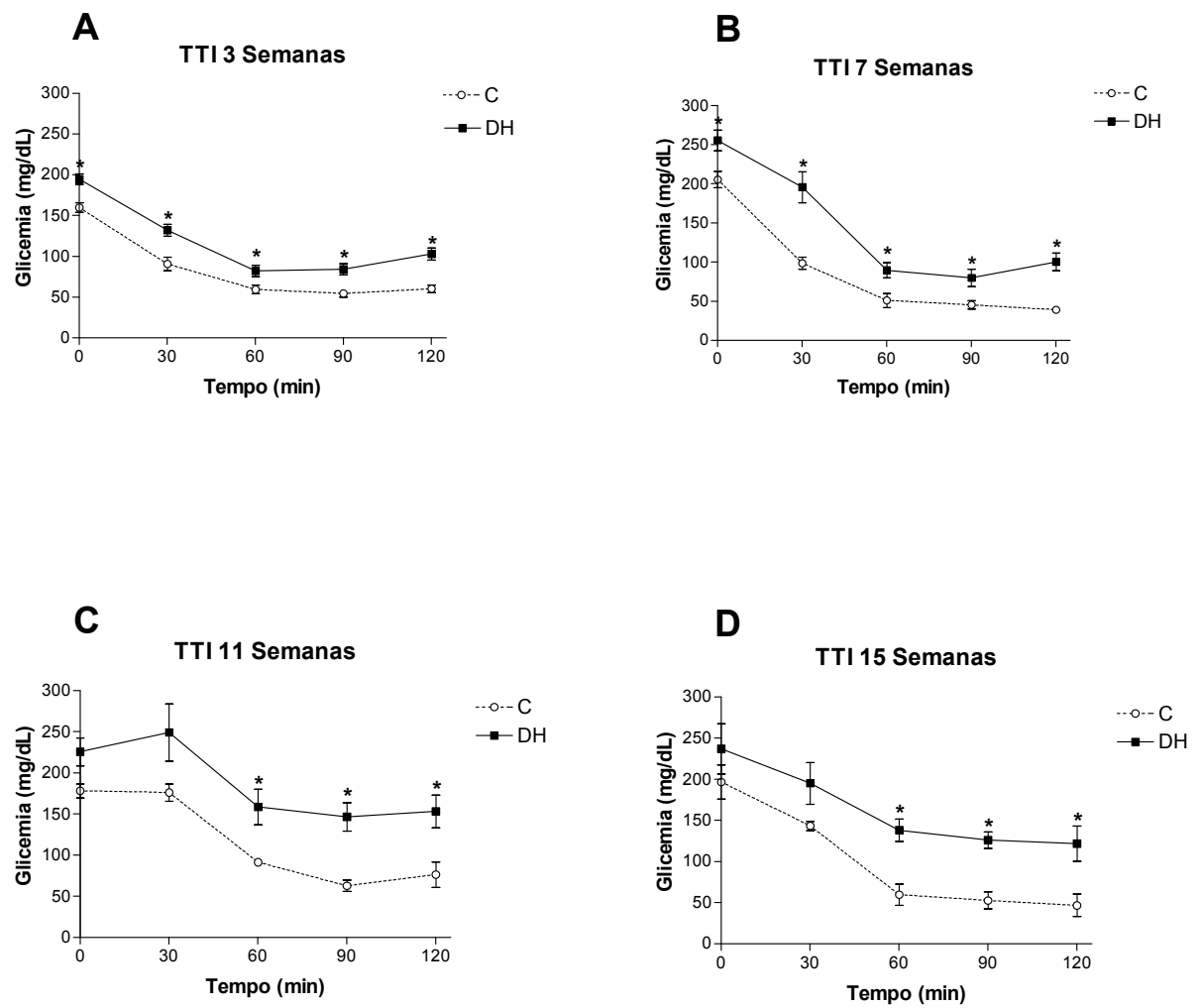


Figura 8. TTI. Os valores estão representados como média \pm EPM. A, teste após 3 semanas de tratamento, B, após 7 semanas, C, após 11 semanas e D, após 15 semanas. Grupo C, n= 4-11; Grupo DH, n=5-14. * $P < 0,05$, C vs DH.

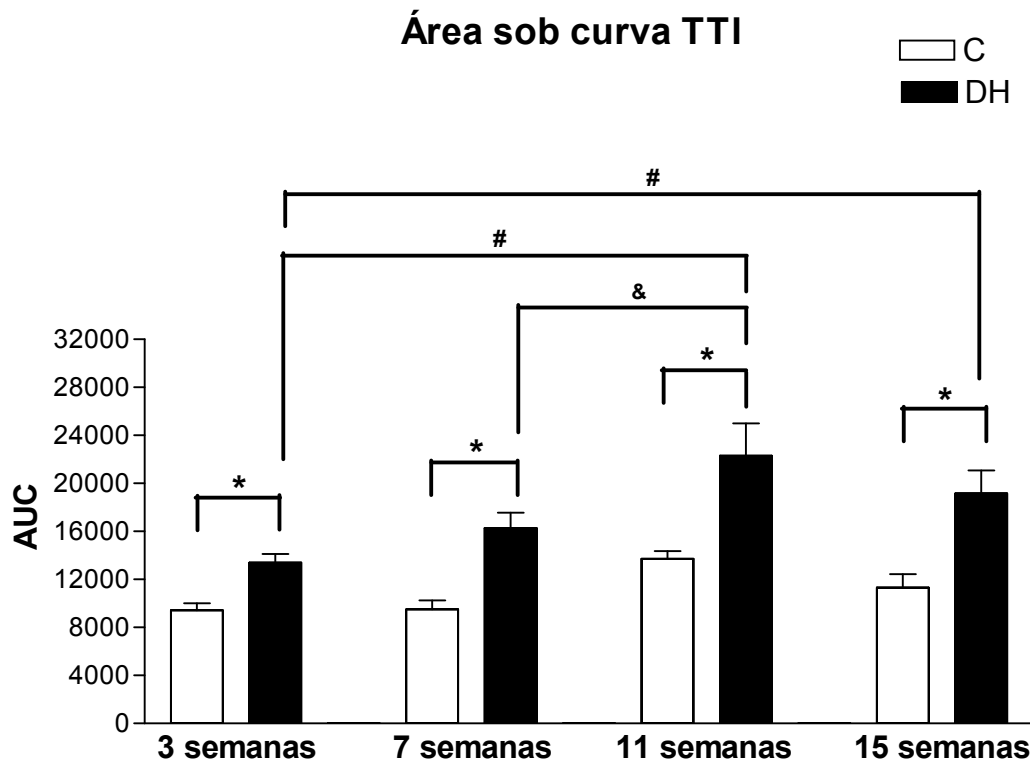


Figura 9. AUC TTI. Os valores estão representados como média \pm EPM. Grupo C, n= 4-11; Grupo DH, n=5-14. * P < 0,05, C vs DH; # P < 0,05, DH vs DH 3 semanas; & P < 0,05, DH vs DH 7 semanas.

4.6 Análise morfológica do pâncreas endócrino – coloração HE

As ilhotas das secções coradas com HE foram analisadas para verificação das características morfológicas e presença de células inflamatórias. A Figura 10 apresenta ilhotas pancreáticas representativas dos grupos C e DH coradas com HE nos diferentes tempos experimentais analisados.

Na maioria das ilhotas analisadas, àquelas do grupo DH apresentaram aparente aumento de tamanho em relação ao grupo C nas 8^a e 16^a semanas experimentais, ocorrendo também alteração da morfologia típica da ilhota (arredondada). Não foi identificada a presença de células inflamatórias nem internamente (insulite) nem na periferia das ilhotas (perinsulite) em nenhum dos grupos.

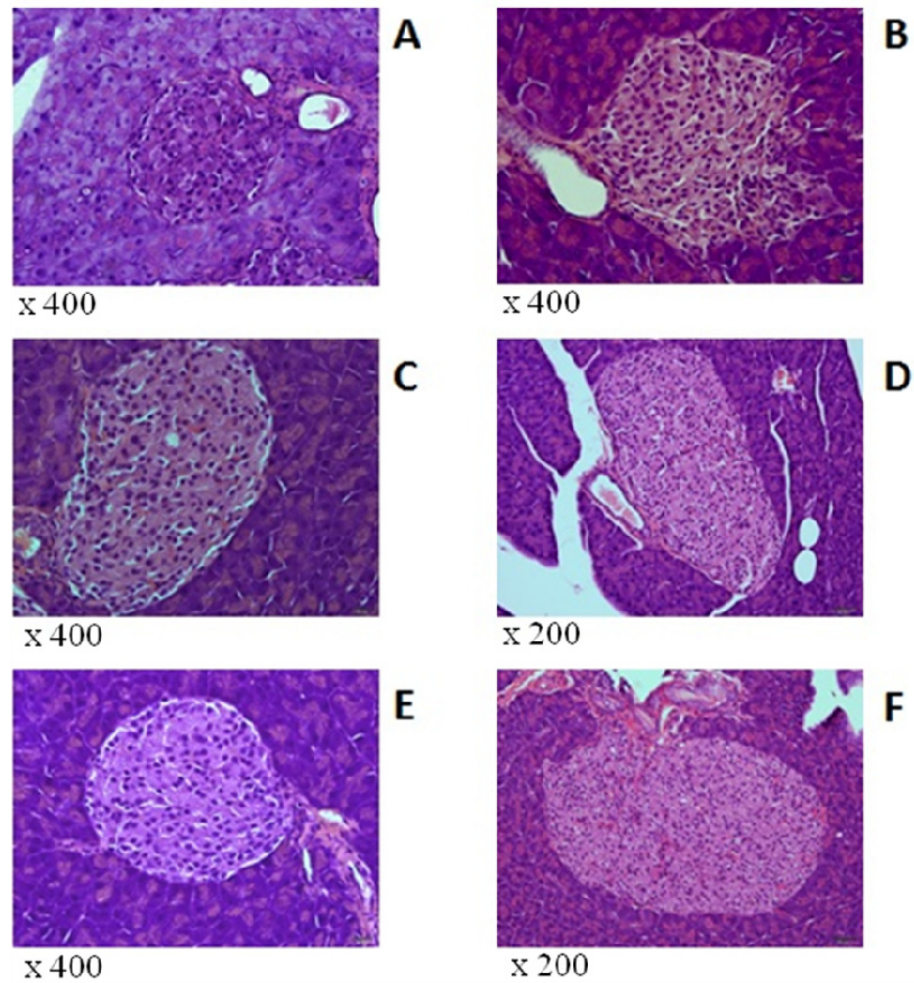


Figura 10. Ilhotas representativas dos grupos analisados. Coloração HE. A, grupo C 4 semanas; B, grupo DH 4 semanas; C, grupo C 8 semanas; D, grupo DH 8 semanas; E, grupo C 16 semanas; F, grupo DH 16 semanas.

4.7 Imunohistoquímica – marcador insulina

A Figura 11 mostra imagens representativas das ilhotas pancreáticas dos animais dos grupos C e DH nos tempos estudados. A coloração marrom caracteriza insulina. Pode-se observar nesta figura que no grupo C, em todos os tempos analisados, há forte marcação caracterizando alta expressão de insulina nas ilhotas destes animais. No grupo DH na 16^a semana houve aumento aparente da ilhota, com grande número de núcleos e menor expressão de insulina.

A Tabela 1 apresenta os dados de análise semi-quantitativa das ilhotas dos animais de ambos os grupos. Através desta análise observa-se diferença na intensidade de marcação para insulina no grupo DH na 16^a semana em relação ao mesmo grupo na 4^a e 8^a semanas e em relação ao grupo C.

A Figura 12 apresenta o gráfico da área média das ilhotas analisadas. Houve aumento da área das ilhotas do grupo DH na 16^a semana em relação ao mesmo grupo na 4^a e 8^a semanas e em relação ao grupo C.

A Figura 13 apresenta o gráfico da área fracional de insulina, ou seja, a área marcada para insulina em relação à área total da ilhota, caracterizando a expressão de insulina nas ilhotas analisadas. Ocorreu diminuição da expressão de insulina no grupo DH na 16^a semana em relação ao mesmo grupo na 4^a e 8^a semanas e em relação ao grupo C.

O número total de células/área da ilhota (Figura 14), o número de células beta/área da ilhota (Figura 15) e o número fracional de células beta (proporção de células beta em relação ao número total de células da ilhota) (Figura 16) não foram significativamente diferentes entre os grupos.

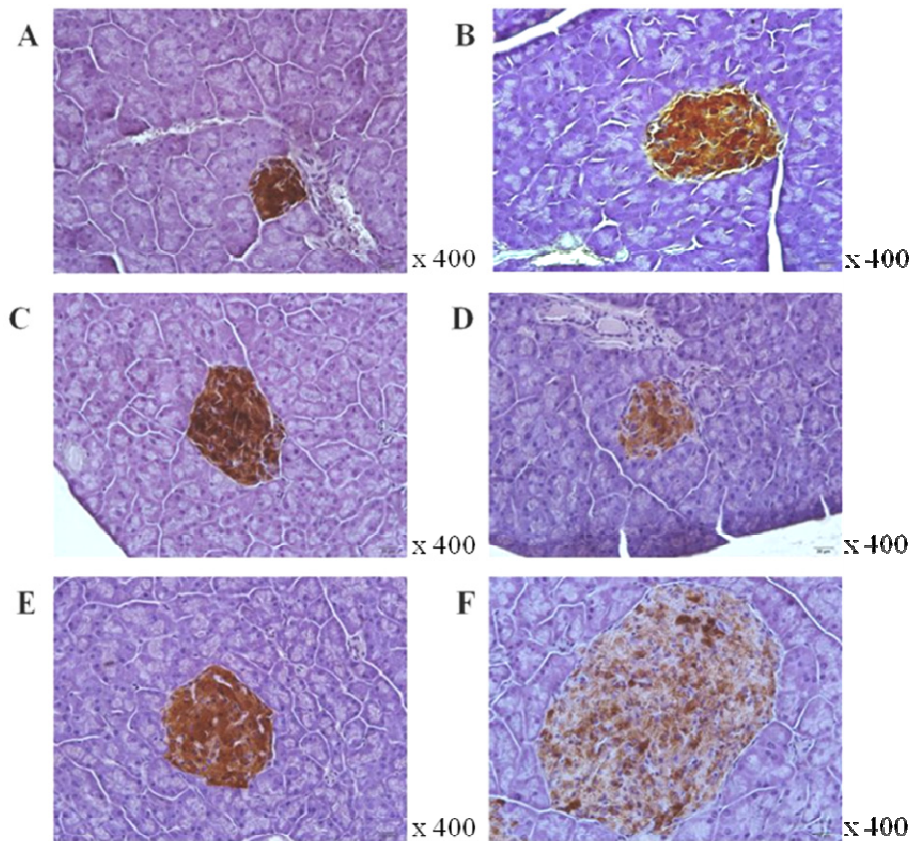


Figura 11. Ilhotas representativas dos grupos analisados marcadas com insulina. A, grupo C 4 semanas; **B,** grupo DH 4 semanas; **C,** grupo C 8 semanas; **D,** grupo DH 8 semanas; **E,** grupo C 16 semanas; **F,** grupo DH 16 semanas.

Tabela 1. Análise semi-quantitativa da intensidade de marcação para insulina. C – grupo controle, DH – grupo dieta hiperlipídica. ++++ = forte reatividade em > 75% da ilhota; +++ = forte marcação em \leq 75% da ilhota

Grupo	Intensidade marcação insulina
C 4^a semana	++++
C 8^a semana	++++
C 16^a semana	++++
DH 4^a semana	++++
DH 8^a semana	++++
DH 16^a semana	+++

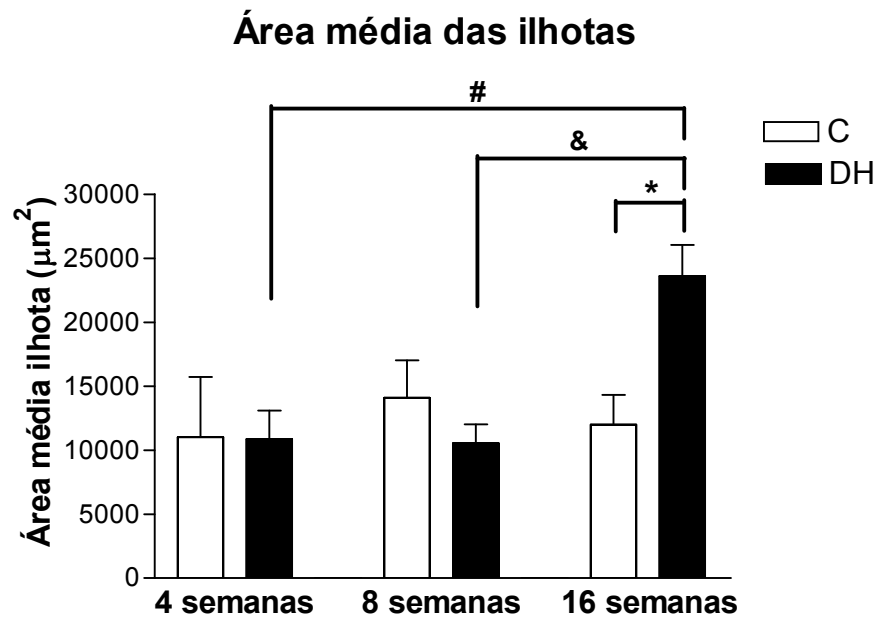


Figura 12. Área média das ilhotas pancreáticas. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5. * P < 0,05, C vs DH; # P < 0,05, DH vs DH 3 semanas; & P < 0,05, DH vs DH 7 semanas.

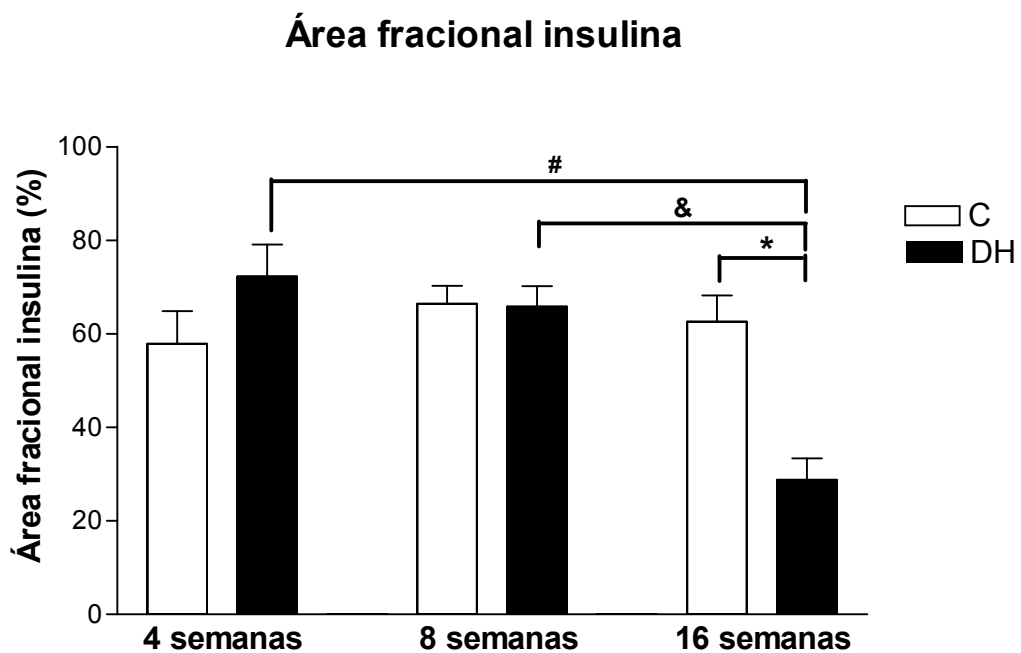


Figura 13. Área fracional de insulina (expressão de insulina nas ilhotas). Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5. * P < 0,05, C vs DH; # P < 0,05, DH vs DH 3 semanas; & P < 0,05, DH vs DH 7 semanas.

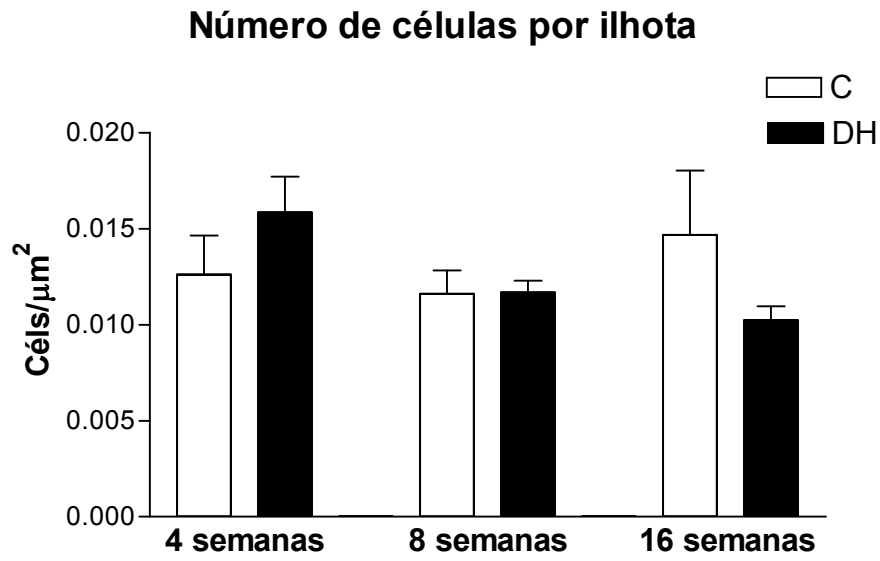


Figura 14. Número de células por ilhota. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5.

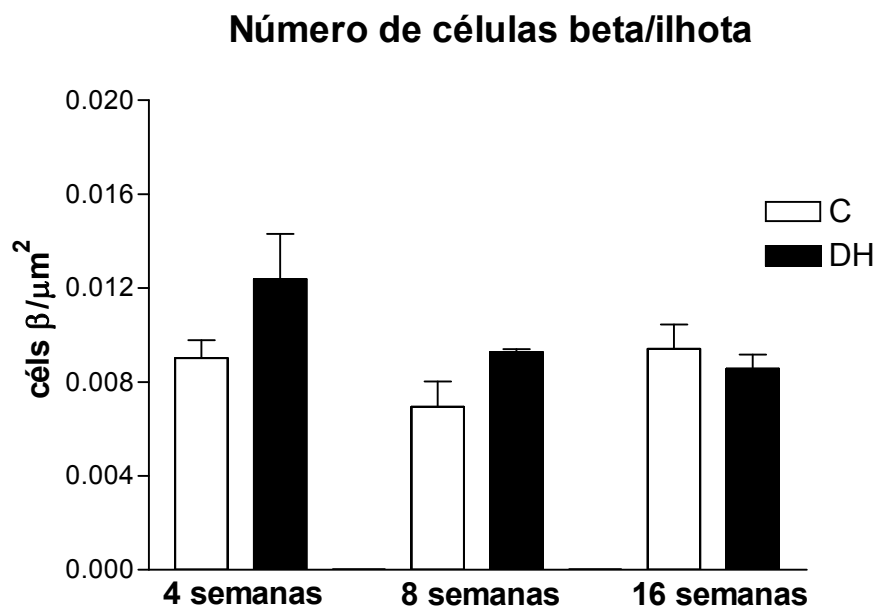


Figura 15. Número de células beta por ilhota. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5.

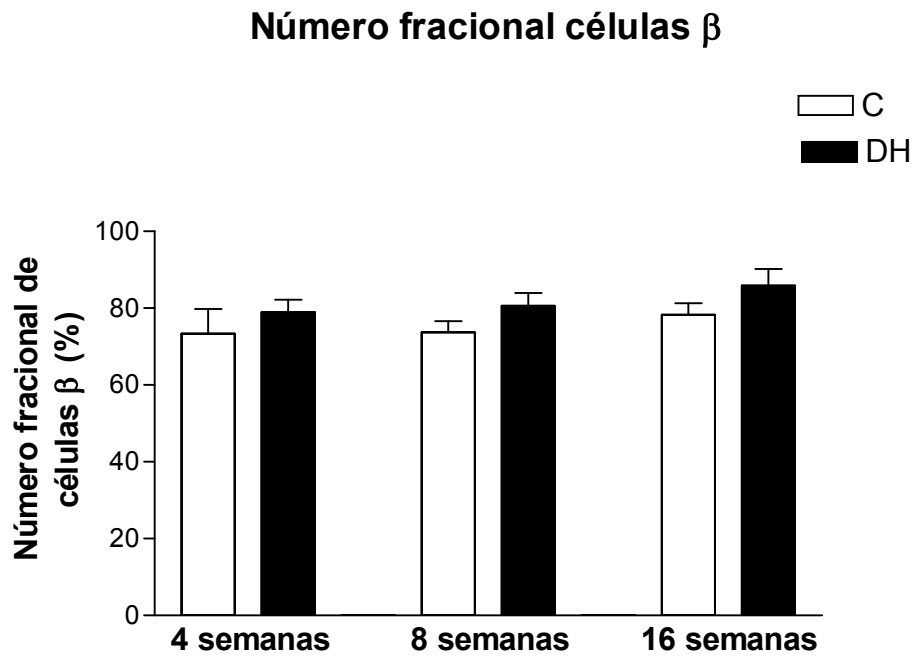


Figura 16. Número fracional de células beta. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5.

4.8 Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)

A concentração de TNF- α em homogeneizado pancreático não foi diferente entre os grupos (Figura 17).

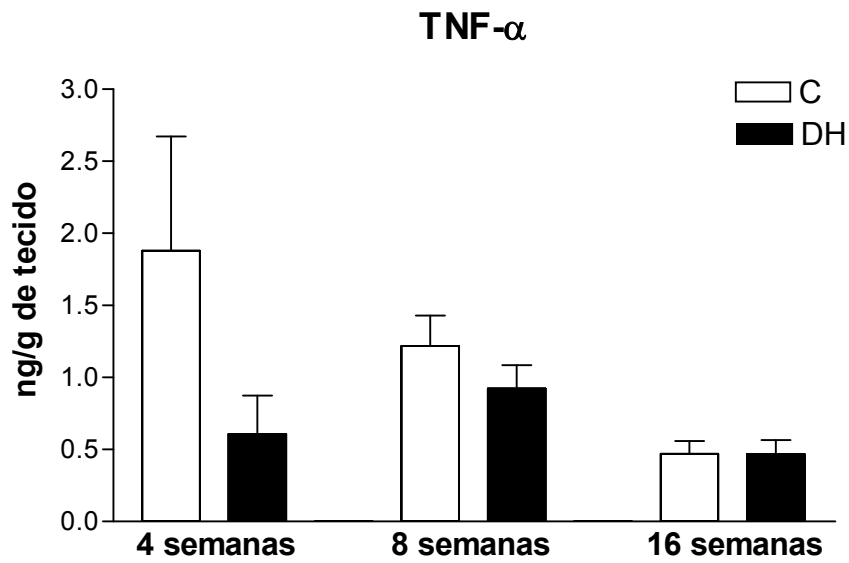


Figura 17. Concentração de TNF- α em homogeneizado pancreático. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5.

4.9 Interleucina-1 β (IL-1 β)

A Figura 18 apresenta a concentração de IL-1 β em homogeneizado pancreático. Não ocorreu diferença significativa entre os grupos.

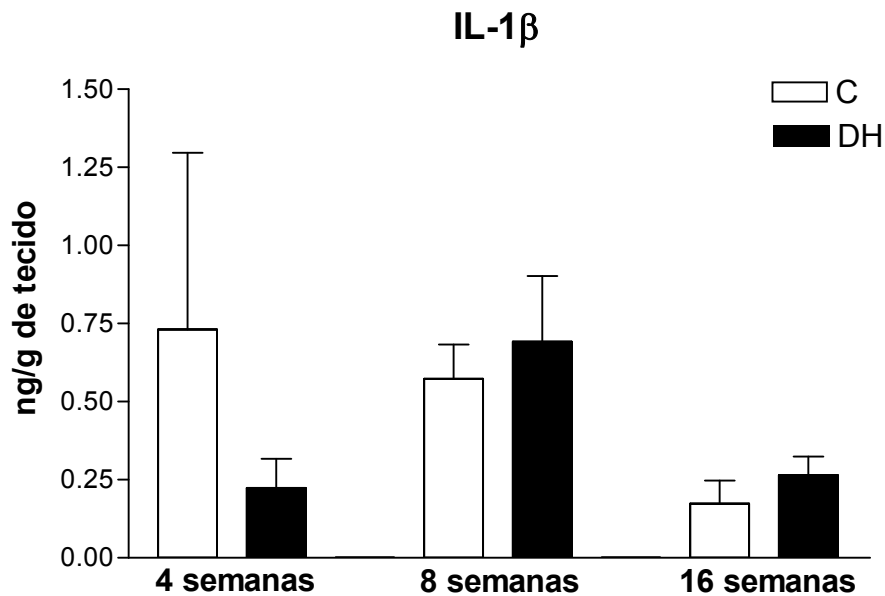


Figura 18. Concentração de IL-1 β em homogeneizado pancreático. Grupo C, n= 3-4; Grupo DH, n=4-5.

4.10 Fator anti-apoptótico Bcl-2

A Figura 19 apresenta as imagens representativas das ilhotas dos grupos. Observa-se diminuição da expressão do Bcl-2 nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica, sendo esta, porém mais acentuada na 16^a semana.

A análise semi-quantitativa da expressão da proteína Bcl-2 está apresentada na Tabela 2. Foi possível verificar redução na expressão desta proteína nos grupos DH na 8^a e 16^a semanas além do C na 16^a semana.

A Figura 20 mostra a área fracional de Bcl-2 caracterizando a sua expressão nas ilhotas. Observa-se uma tendência à redução nas concentrações de Bcl-2 não havendo, porém diferenças significativas entre os grupos.

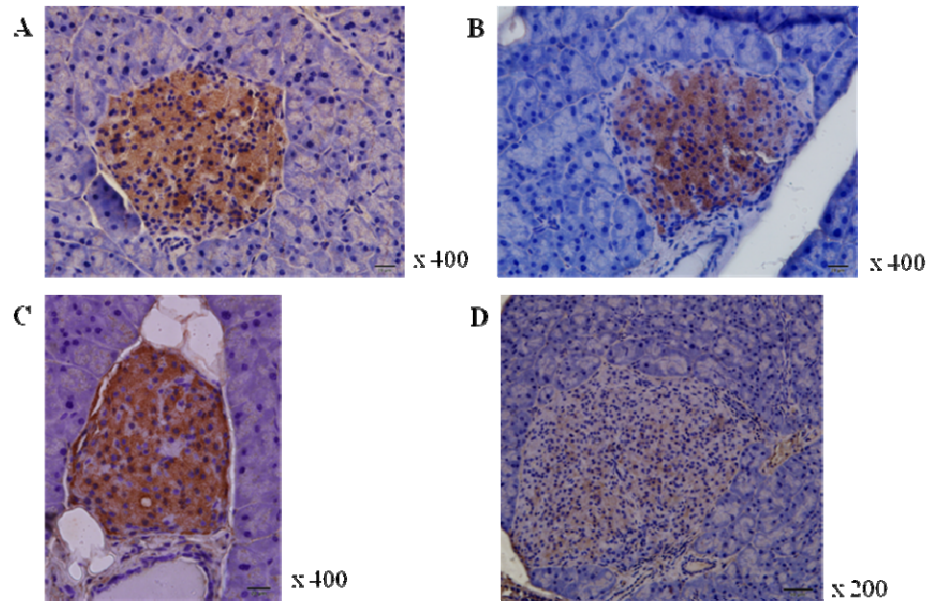


Figura 19. Imagens representativas de ilhotas marcadas com Bcl-2. A, grupo C 8 semanas; B, grupo DH 8 semanas; C, grupo C 16 semanas; D, grupo DH 16 semanas.

Tabela 2. Análise semi-quantitativa da intensidade de marcação para Bcl-2. C – grupo controle, DH – grupo dieta hiperlipídica. ++++ = forte reatividade em > 75% da ilhota; +++ = forte marcação em \leq 75% da ilhota

Grupo	Intensidade marcação Bcl-2
C 8 semanas	++++
C 16 semanas	+++
DH 8 semanas	+++
DH 16 semanas	+++

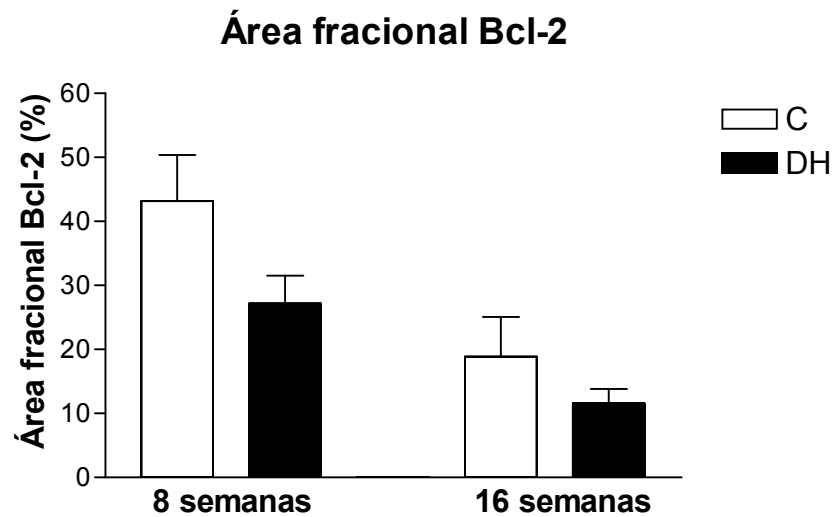


Figura 20. Área fracional Bcl-2 (expressão de Bcl-2 nas ilhotas). Grupo C, n=3; Grupo DH, n=3-5.

Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos na análise pancreática de animais alimentados com dieta hiperlipídica por 4, 8 e 16 semanas, em comparação com animais alimentados com dieta padrão. IHQ – imunohistoquímica.

	4 semanas	8 semanas	16 semanas
Área das ilhotas (μm^2)	—	—	↑
Área fracional insulina (μm^2)	—	—	↓
Número fracional de céls β	—	—	—
Número céls/ μm^2 ilhota	—	—	—
Número céls β / μm^2 ilhota	—	—	—
Expressão de IL-1 β	—	—	—
Expressão de TNF- α	—	—	—
Expressão de Bcl-2		—	—
Área das ilhotas (análise qualitativa, HE)	—	↑	↑
Expressão de insulina (análise qualitativa, IHQ)	—	↓	↓
Expressão de Bcl-2 (análise qualitativa, IHQ)		↓	↓

5. DISCUSSÃO

O excesso de depósito de gordura é consequência de um desequilíbrio entre energia ingerida e energia despendida; a ingestão calórica é alta quando, por exemplo, alimentos ricos em gorduras (hiperlipídicos) são consumidos em altas quantidades (ASTRUP *et al.*, 2000). A obesidade dos animais observada neste trabalho (Figura 3) foi desencadeada pela maior ingestão de quilocalorias do grupo DH em relação ao grupo C (Figura 4).

O excesso de tecido adiposo pode afetar direta ou indiretamente a sensibilidade à insulina, causando RI, o que precede o DM2 (PARK *et al.*, 2006; TAKAMOTO *et al.*, 2008; KADOWAKI *et al.*, 2003; PARKER *et al.*, 1993). Estudos relatam que a alimentação de camundongos com dieta rica em gordura, tanto por curtos como por longos períodos de tempo resulta em obesidade e RI (CARICILLI *et al.*, 2008; MATVEYENKO *et al.*, 2009; BUTLER *et al.*, 2003; AHRÉN *et al.*, 2010). Os TTGs (Figuras 6 e 7) mostram intolerância à glicose nos quatro tempos em que foram realizados (3, 7, 11 e 15 semanas) e os TTIs (Figuras 8 e 9), RI estabelecida, corroborando os dados acima citados.

Em muitos indivíduos, a RI é compensada pelo aumento da massa funcional de células beta e, com isso, acréscimo na secreção de insulina, mantendo a normoglicemia. Diversos autores relatam hipertrofia da ilhota devido ao aumento na massa de células β (CARICILLI *et al.*, 2008; MATVEYENKO *et al.*, 2009; BUTLER *et al.*, 2003; AHRÉN *et al.*, 2010). A conversão de pré-diabetes à hiperglicemia em pacientes com DM2 é associada ao declínio na capacidade secretória das células β em compensar a RI (SRINIVASAN *et al.*, 2007). Na análise em primeira instância das ilhotas com coloração HE pode-se observar uma tendência ao aumento na área das ilhotas nos grupos DH nas 8^a e 16^a semanas. Observa-se ainda que a morfologia típica das ilhotas está modificada (Figura 10). Através dos dados da imunohistoquímica para insulina pode-se calcular a área média das ilhotas. No grupo DH na

16^a semana houve aumento significativo da área média das ilhotas em relação ao seu controle e aos demais grupos DH analisados (Figura 12). Este aumento possivelmente foi devido em sua grande parte à hiperplasia celular já que o número total de células nas ilhotas é proporcional à sua respectiva área (Figura 14).

Pode-se inferir que houve tentativa, ainda que falha, na adaptação frente à alta demanda insulínica nos animais submetidos à dieta hiperlipídica por 16 semanas, pois, como apresenta a Figura 15, houve um aumento proporcional também no número de células β de acordo com a área da ilhota, ou seja, aumentou a área média das ilhotas e também o número de células β no grupo DH na 16^a semana, já que não houve diferença significativa do número de células beta por μm^2 de área da ilhota entre os grupos. Resultados semelhantes de aumento na área da ilhota devido à hiperplasia de células β também foram encontrados por Hull e colaboradores (2005) em um trabalho com camundongos alimentados com dietas hiperlipídicas que apresentavam diferentes concentrações de gordura em sua composição e também em trabalhos mais atuais (ZHANG *et al.*, 2012). Ahrén e colaboradores (2010) desenvolveram um estudo com camundongos submetidos à dieta hiperlipídica por 3, 6 ou 12 meses e seus resultados mostram que o aumento na massa de células β nos animais que receberam dieta hiperlipídica por 3 e 6 meses foi principalmente devido à hiperplasia, porém, com 12 meses houve contribuição também de hipertrofia das células β , resultado igualmente encontrado por Shafir e colaboradores (1999) com camundongos expostos a três meses de dieta rica em gordura. Ainda não há um consenso se o aumento observado na área média das ilhotas de animais submetidos à dieta hiperlipídica é devido à hiperplasia ou hipertrofia de células β ou ambas.

Somente uma parte da compensação das células β à RI é devido ao aumento na massa de células β . Animais expostos à dieta rica em gordura por longo tempo ou curtos períodos de infusão lipídica podem apresentar aumento na massa de células β sem aumento na secreção de

insulina estimulada por glicose, indicando que a função das células β e a massa não estão necessariamente simultaneamente relacionadas. A relação entre função das células β e diminuição da massa das mesmas como causa da falência das células β na progressão do DM é debatido, com maior ênfase na relevância da “massa de células β funcional” do que na massa total de células β (PEYOT *et al.*, 2010).

No presente trabalho, possivelmente ocorreu uma falha na adaptação da massa funcional de células β , pois, na 4^a e 8^a semanas de experimento pode ser observada uma grande expressão de insulina nas células das ilhotas nos animais do grupo DH, semelhante à encontrada no grupo C, porém os animais destes grupos estão hiperglicêmicos (Figura 11, 13, 5 e Tabela 1). Já no grupo DH na 16^a semana, observou-se aumento no número de células β , pois como explanado anteriormente houve hipertrofia das ilhotas com hiperplasia de células β , o que leva a crer que a falha pode ter sido na funcionalidade das células β já que este grupo apresentou menor expressão de insulina nas ilhotas e, mesmo com um maior número de células β , o quadro de hiperglicemia foi mantido (Figuras 11, 13, 5 e Tabela 1). Resultado semelhante também foi encontrado em ratos Zucker Diabetic Fat com 14 semanas de idade (JONES *et al.*, 2010). Como estes roedores tornam-se extremamente obesos devido à uma mutação genética no receptor de leptina, estes resultados podem indicar o papel essencial dos AGL na disfunção das células β , alterando com isso a anatomia das ilhotas, havendo grande quantidade de células, porém com baixa expressão de insulina. Já, Karasawa e colaboradores (2009) em seu trabalho com camundongos expostos à dieta hiperlipídica relatam o desenvolvimento inicial de obesidade com posterior desenvolvimento de DM que presumem ter sido causada pela disfunção das ilhotas pancreáticas, já que os resultados para marcação de insulina por imunohistoquímica nas ilhotas pancreáticas mostra densidade de coloração reduzida para insulina nos animais diabéticos.

Até o momento, não está clara a dinâmica existente entre os fatores que conduzem ao aumento da massa de células β e sua função e àqueles que levam à sua redução nos vários estágios do desenvolvimento do DM2, particularmente os AGL podem participar de ambos. Susceptibilidade genética pode ser um determinante crítico dessa dinâmica, tanto em humanos como em modelos animais (PEYOT *et al.*, 2010).

Falhas na adaptação das células β em secretar quantidades adequadas de insulina de acordo com a demanda também são encontradas em alguns estudos com camundongos que, por serem vulneráveis ao DM2, desencadeiam um quadro de hiperglicemia com características patológicas nas ilhotas incluindo déficit na massa de células β , acúmulo de depósito amilóide e apoptose induzida por estresse do RE (MATVEYENKO *et al.*, 2009), porém os motivos que desencadeiam o quadro hiperglicêmico ainda não estão totalmente esclarecidos (ZHANG *et al.*, 2012), mas estudos têm sugerido que a dieta hiperlipídica pode ter um efeito direto, adverso na função secretória das células β (AHRÉN *et al.*, 2002; HULL *et al.*, 2005).

O camundongo Swiss, utilizado neste trabalho, tem sido descrito como um modelo que, quando alimentado com dieta rica em gordura, torna-se rapidamente obeso e diabético, sendo considerado um bom modelo experimental para síndrome metabólica e DM2 (ARAÚJO *et al.*, 2007; De SOUZA *et al.*, 2007; CARICILLI *et al.*, 2008). Segundo a literatura, após oito semanas de tratamento com dieta hiperlipídica este animal desenvolve obesidade, hiperglicemia e DM2 (De SOUZA *et al.*, 2007; CARICILLI *et al.*, 2008). Porém, a maioria dos autores leva em consideração apenas a glicemia de jejum alterada, intolerância à glicose e RI para caracterizar o DM nestes animais. Não há estudos que caracterizem a morfologia pancreática destes animais na progressão da doença, o que é extremamente importante para o desenvolvimento de novas terapias regenerativas, como transplante de células tronco. Portanto, ainda há um conhecimento limitado de como e quando o desarranjo

que leva à instalação do DM2 ocorre nestes animais e qual pode ser a estratégia terapêutica mais eficiente para preservar a função e massa de células β (MASIELLO, 2006).

Weir e colaboradores (2001) hipotetizaram que diabéticos originados a partir da falência em aumentar suficientemente a massa funcional de células β para suprir a demanda resultam em um meio plasmático pré-diabético ou diabético levando à crítica perda de diferenciação das células β . A exposição destas células a qualquer meio hiperglicêmico, como é o caso dos resultados encontrados (Figura 5), pode causar mudança (ou perda) da diferenciação celular, com diminuição na expressão de genes que são usualmente superexpressos e estímulo na expressão de genes normalmente suprimidos, resultando em sério comprometimento na função e estrutura celular, o que pode ter ocorrido nas ilhotas dos animais expostos à dieta hiperlipídica por 16 semanas, já que estes animais encontram-se hiperglicêmicos, intolerantes à glicose, RI e a morfologia de suas ilhotas encontra-se modificada com uma menor expressão de insulina apesar do aumento na área total das ilhotas (Figuras 5, 6, 7, 11, 12, 13 e Tabela 1). Porém, mais estudos são necessários para comprovar alteração na expressão de genes envolvidos.

Os mecanismos moleculares delineando a disfunção e morte prematura das células β são multilaterais e muitos fatores podem contribuir, como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, estresse do RE, disfunção no ciclo dos triglicerídeos/AGL e inflamação das ilhotas entre outros (WANG & JIN, 2009; CNOP *et al.*, 2008; MAEDLER *et al.*, 2002). Porém, estados de hiperglicemia, como encontrado nos animais deste estudo, por si só possuem efeitos adversos secundários nas células β (MAEDLER *et al.*, 2002).

Dados da literatura indicam que tanto os níveis elevados de glicose como a alta quantidade de AGL circulantes estimulam a produção de IL-1 β e fatores pró-inflamatórios dependentes de IL-1 β em cultura de ilhotas tanto humanas como de roedores (ESHES *et al.*, 2007; DONATH *et al.*, 2010). Além disso, a ingestão de macronutrientes em excesso causa

estresse oxidativo e mudanças no padrão inflamatório. A obesidade pode ser então descrita como um estado pró-inflamatório em que há estresse oxidativo. O aumento da taxa de citocinas pró-inflamatórias pode interferir na ação e produção de insulina além da sobrevivência das células β (DANDONA *et al.*, 2004). O tratamento de ilhotas de roedores com IL-1 β resultou em inibição da secreção de insulina seguida pela destruição da ilhota de acordo com o trabalho desenvolvido por Maedler e colaboradores (2002), indicando alta influência desta citocina na função das células beta e desencadeando sua morte. Apesar de acreditar-se, anteriormente, que somente macrófagos e adipócitos eram os primeiros locais de produção de TNF- α , foi demonstrado por Tobin e colaboradores (2001) que esta citocina pode ser produzida pelas ilhotas pancreáticas em cultura, sendo sua produção associada à diminuição da secreção de insulina.

Com o intuito de avaliar se houve influência de citocinas pró-inflamatórias no desencadeamento da disfunção secretória das células β e como resultado o quadro hiperglicêmico dos animais, foram avaliadas duas citocinas frequentemente relacionadas com obesidade e DM2 em homogeneizado pancreático, IL-1 β e TNF- α . Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para ambas as citocinas analisadas (Figuras 17 e 18), porém observa-se o mesmo padrão de tendência ao aumento das mesmas nos animais do grupo DH na 8^a semana. Como justamente na 16^a semana foi encontrada diminuição na expressão de insulina, pode ser que elevações significativas na produção de citocinas tenham ocorrido no período entre 8 e 16 semanas (não avaliado) desencadeando a falha na adaptação das ilhotas frente à RI. Além disso, a maioria dos trabalhos demonstra alterações nos índices destas citocinas no tecido adiposo e/ou plasma sanguíneo (BLÜHER *et al.*, 2001; DANDONA *et al.* 2004; MOLLER, 2000) e aqueles que avaliam a produção pelas ilhotas utilizam cultura celular ou animais transgênicos (MAEDLER *et al.*, 2002; BUTLER *et al.*,

2004), o que permite uma amplificação dos resultados, o que não foi o caso neste trabalho já que as citocinas foram avaliadas em homogeneizado pancreático.

A proteína Bcl-2 tem sido encontrada em ilhotas e ácinos pancreáticos e é conhecida como um fator intrínseco para apoptose, já que sua superexpressão em linhagens de células beta pancreáticas foi descrita como protetiva da apoptose induzida por citocinas (MIZUNO *et al.*, 1998). Shimabukuro e colaboradores (1998) relataram que a expressão de Bcl-2 é inversamente proporcional ao conteúdo de gordura nas ilhotas, ou seja, quanto maior o conteúdo de gordura, menor a expressão de Bcl-2 e maior a susceptibilidade de ocorrência de apoptose. Um artigo recente relatou que a secreção de IL-1 β pode ser regulada pela expressão de Bcl-2, havendo maior liberação de IL-1 β quando a expressão de Bcl-2 estava inibida (ESCANDELL *et al.*, 2010). Portanto, quando ocorre inibição de Bcl-2 um quadro apoptótico pode ser desencadeado. Frente a isso, foi analisada a expressão da proteína Bcl-2 nas ilhotas pancreáticas dos animais neste estudo.

As imagens da Figura 19 e o gráfico da Figura 20 apresentam uma tendência à queda na expressão de Bcl-2 na 8^a e 16^a semanas nos animais que receberam dieta rica em gordura, corroborando os resultados apresentados acima e indicando que possivelmente uma cascata apoptótica pode estar sendo desencadeada nestes grupos. A tendência à queda na expressão também é vista nos animais do grupo controle na 16^a semana de tratamento (Figura 20 e Tabela 2). Isso pode ter ocorrido devido a idade já avançada destes animais. Os dados para 4 semanas de tratamento não foram apresentados devido a problemas metodológicos encontrados nas lâminas deste grupo de animais.

Muitos estudos relatam que a elevação crônica das concentrações plasmáticas de glicose tanto em humanos como em modelos animais leva à disfunção das células β em relação à secreção e síntese de insulina, fenômeno denominado glicotoxicidade. Tanto estudos *in vivo* como *in vitro* com ilhotas de roedores sugerem que a hiperglicemia está associada com

elevação de marcadores apoptóticos mesmo quando há manutenção da arquitetura da ilhota (PICK *et al.*, 1998; DONATH *et al.*, 1999). Os resultados encontrados por Federici e colaboradores (2001) sugerem que a apoptose induzida por glicose está associada com a modulação de muitos genes da família Bcl. Neste trabalho houve uma tendência à diminuição na expressão de Bcl-2 nos grupos DH na 8^a e 16^a semana e grupo C na 16^a semana como pode ser observado na Figura 19 e Tabela 2, porém não houve diferenças significativas entre os grupos quando feita a análise quantitativa (Figura 20). Isso sugere que, neste modelo animal, nas condições estudadas, não ocorreu perda celular por apoptose de maneira significativa porém há uma tendência à diminuição na proteção contra o desencadeamento dos eventos apoptóticos.

Em resumo, os resultados sugerem que a hiperglicemia encontrada nos animais do grupo DH durante as 4^a e 8^a semanas experimentais pode ter sido devido à falência na adaptação das ilhotas com relação à massa de células β , já que a expressão de insulina nestes tempos foi semelhante à encontrada no grupo C. Já na 16^a semana, a hiperglicemia desenvolvida pelos animais do grupo DH pode ter ocorrido, possivelmente, devido à falência funcional das células β , já que apesar do aumento no número destas células houve diminuição da expressão de insulina nas ilhotas destes animais. Possíveis eventos apoptóticos não ocorreram de maneira expressiva nas ilhotas dos animais do grupo DH, já que observamos hipertrofia da ilhota e também ausência de diferenças significativas na expressão do marcador Bcl-2.

6. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que a ingestão de dieta hiperlipídica induz alterações morfológicas e funcionais no pâncreas endócrino, associadas ao desenvolvimento de DM2 em camundongos Swiss. O estudo sugere que TNF- α , IL-1 β e Bcl-2 não estão envolvidos na patogênese do DM2 neste modelo experimental.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. Revinter 2003.
- AHRÉN, B.; PACINI, G. Insufficient islet compensation to insulin resistance vs reduced glucose effectiveness in glucose-intolerant mice. **Am. J. Physiol.**, v.283, p.738-744, 2002.
- AHRÉN, J.; AHRÉN, B.; WIERUP, N. Increased β -cell volume in mice fed a high-fat diet. A dynamic study over 12 months. **Islets**, v.2, n.6, p.353-356, 2010.
- AKIYAMA, T. *et al.* High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. **Diabetes research and Clinical Practice**, v.31, p.27-35, 1996.
- ARAÚJO, E.P. *et al.* Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinology**, v.148, n.12, p.5991-5997, 2007.
- ARKAN, M.C.; HEVENER, A.L.; GRETEN, F.R.; MAEDA, S.; LI, Z.; LONG, J.M.; WYNshaw-BORIS, A.; POLI, G.; OLEFSKY, J.; KARIN, M. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nature Med.**, v.11, p.191-198, 2005.
- ASTRUP, A. *et al.* The role of dietary fat in body fatness: evidence from a preliminary meta-analysis of ad libitum low-fat dietary intervention. **British Journal of Nutrition**, v.83, p.25-32, 2000.
- BARBU, A.R.; AKUSJÄRVI, G.; WELSH, N. Adenoviral-Induced Islet Cell Cytotoxicity Is Not Counteracted by Bcl-2 Overexpression. **Molecular Medicine**, v.8, n.11, p.733-741, 2002.
- BERNAL-MIZRACHI, E.; WEN, W.; STAHLHUT, S.; WELLING, C.M.; PERMUTT, A. Islet β cell expression of constitutively active Akt1/PKB α induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. **The Journal Clinical Investigation**, v.108, p.1631-1638, 2001.
- BERNARD-KARGAR, C.; KTORZA, A. Endocrine pâncreas plasticity under physiological and pathological conditions. **Diabetes**, v.50, s.1, p.30-35, 2001.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.. Stanton BA. **Fisiologia**. Elsevier 2004.
- BIKMAN, B.T. *et al.* High-Fat Diet Induces IKK β and Reduces Insulin Sensitivity in Rats with Low Running Capacity. **Int. J. Sports Med.**, v.30, n.9, p.631-635, 2009.
- BLÜHER, M.D.; KRATZSCH, J.; PASCHKE, M.D. Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor- α , Angiotensin II, Growth Hormone, and IGF-I Are Not Elevated in Insulin-Resistant Obese Individuals With Impaired Glucose Tolerance. **Diabetes Care**, v.24, p.328-334, 2001.
- BOCK, T.; PAKKENBERG, B.; BUSCHARD, K. Increased islet volume but unchanged islet number in *ob/ob* mice. **Diabetes**, v.52, p.1716-1722, 2003.

BODEN, G. Fatty acids and insulin resistance. **Diabetes Care**, v.19, p.394-395, 1996.

BOLHEIMER, C.L. *et al.* Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic β cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. **J. Clin. Invest.**, v.101, p.1094-1101, 1998.

BONI-SCHNETZLER, M.; THORNE, J.; PARNAUD, G.; MARSELLI, L.; EHSES, J.A.; KERR-CONTE, J.; PATTOU, F.; HALBAN, P.A.; WEIR, G.C.; DONATH, M.Y. Increased interleukin (IL)-1 β messenger ribonucleic acid expression in β -cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1 β in human islets by glucose and autostimulation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.93, p.4065-4074, 2008.

BUENO, P.G. **Expressão da Miostatina e ACTRIIB em ratos submetidos a dieta hiperlipídica e exercício.** 2009. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

BUTLER, A.E. *et al.* Diabetes due to a progressive defect in β -cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP rat): a new model for type 2 diabetes. **Diabetes**, v.53, p.1509-1516, 2004.

BUTLER, A.E. *et al.* B-Cell Deficit and Increased β -cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v.52, p.102-110, 2003.

CARICILLI, A.M. *et al.* Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. **Journal of Endocrinology**, v.199, p.399-406, 2008.

CERF, M.E. High Fat Programming of β -Cell Failure. In: **The Islets of Langerhans: Advances in Experimental Medicine and Biology.** South Africa: M.S. Islam, 2010. P. 77-89.

CHENTOUF, M.; DUBOIS, G.; JAHANNAUT, C.; CASTEX, F.; LAJOIX, A.D.; GROSS, R.; PERALDI-ROUX, S. Excessive Food Intake, Obesity and Inflammation Process in Zucker fa/fa Rat Pancreatic Islets. **PlosOne**, v.6, n.8, p.1-9, 2011.

CHOI, D.; WOO, M. Executioners of apoptosis in pancreatic β -cells: not just for cell death. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.298, p.E735-E741, 2010.

CNOP, M. *et al.* Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes**, v.54, s.2, p.97-107, 2008.

CNOP, M.; WELSH, N.; JONAS, J.C.; JÖRNS, A.; LENZEN, S.; EIZIRIK, D.L. Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v.54, s.2, p.97-107, 2005.

CONTRERAS, J.L. *et al.* Cytoprotection of pancreatic islets before and early after transplantation using gene therapy. **Kidney International**, v.61, simp.1, p.S79-S84, 2002.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between

insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in Immunology**, v.25, n.1, p.4-7, 2004.

DE SOUZA *et al.* Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. **The FASEB Journal**, v.21, p.1153-1163, 2007.

DESPRÉS, J.P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v.444, n.7121, p.881-887, 2006.

DICKSON, L.M. & RHODES, C.J. Pancreatic β -cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.287, p.192-198, 2004.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. 3.ed. Itapevi, SP: Editora AC Farmacêutica, 2009. p.9.

DONATH, M.Y. *et al.* Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. **Diabetes**, v.48, p.738-744, 1999.

DONATH, M.Y.; BÖNI-SCHNETZLER, M.; ELLINGSGAARD, H.; HALBAN, P.A.; EHSES, J.A. Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.21, n.5, p.261-267, 2010.

DONATH, M.Y.; SCHUMANN, D.M.; FAULENBACH, M.; ELLINGSGAARD, H.; PERREN, A.; EHSES, J.A. Islet Inflammation in Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v.31, s.2, p.161-164, 2008.

DRUCKER, D. The biology of incretin hormones. **Cell Metabolism**, v.3, p.153-165, 2006.

EHSES JA, PERREN A, EPPLER E, RIBAUX P, POSPISILIK JA, MAOR-CAHN R.; GUERPEL, X.; ELLINGSGAARD, H.; SCHNEIDER, M.K.J.; BIOLLAZ, G.; FONTANA, A.; REINECKE, M.; HORNO-DELARCHE, F.; DONATH, M.Y. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetes**, v.56, p.2356-2370, 2007.

EHSES, J.A.; BONI-SCHNETZLER, M.; FAULENBACH, M.; DONATH, M.Y. Macrophages, cytokines and β -cell death in type 2 diabetes. **Biochem. Soc. Trans.**, v.36, p.340-342, 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol. Pathol.**, v.35, n.4, p.495-516, 2007.

ESCANDELL, J.M. Bcl-2 is a negative regulator of interleukin-1 β secretion in murine macrophages in pharmacological-induced apoptosis. **British Journal of Pharmacology**, v.160, p.1844-1856, 2010.

FEDERICI, M. *et al.* High Glucose Causes Apoptosis in Cultured Human Pancreatic Islets of Langerhans. **Diabetes**, v.50, p.1290-1301, 2001.

FRAYN, K.N. Visceral fat and insulin resistance – causative or correlative? **Br. J. Nutr.**, v.83, v.1, p.71-77, 2000.

HARFORD, K.A.; REYNOLDS, C.M.; MCGILLICUDDY, C. & ROCHE, H.M. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.70, p.408-417, 2011.

HERDER, C.; HAASSTERT, B.; MÜLLER-SCHOLZE, S.; KOENIG, W.; THORAND, B.; HOLLE, R.; WICHMANN, H.E.; SCHERBAUM, W.A.; MARTIN, S.; KOLB, H. Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4). *Diabetes*; n.54, s.12, p.11-17, 2005.

HOTAMISLIGIL, C.S.; SHARGILL, N.S. & SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: Direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v.259, p.87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v.444, p.860-86, 2006.

<http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/complications/>. American Diabetes Association, 30/04/2012.

<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/diabetes> (16/04/2012) .International Diabetes Federation, 2012.

HULL, R.L.; KODAMA, K.; UTZSCHNEIDER, K.M.; CARR, D.B.; PRIGEON, R.L.; IWANISHI, M. & KOBAYASHI, M. Effect of pioglitazone on insulin receptors of skeletal muscles from high-fat-fed rats. **Metabolism**, v.42, p.1017-1021, 1993.

HULL, R.L.; KODAMA, K.; UTZSCHNEIDER, K.M.; CARR, D.B.; PRIGEON, R.L.; KAHN, S.E. Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. **Diabetologia**, v.48, p.1350-1358, 2005.

JAGANNATHAN-BOGDAN, M.; McDONNELL, M.E.; SHIN, H.; REHMAN, Q.; HASTURK, H.; APOVIAN, C.M.; NIKOLAJCZYK, B.S. Elevated Proinflammatory Cytokine Production by a Skewed T Cell Compartment Requires Monocytes and Promotes Inflammation in Type 2 Diabetes. **The Journal of Immunology**, p.1162-1172, 2011.

JONES, H.B.; NUGENT, D.; JENKINS, R. Variation in characteristics of islets of Langerhans in insulin-resistant, diabetic and non-diabetic-rat strains. **Int. J. Exp. Path.**, v.91, p.288-301, 2010.

KADOWAKI, T. *et al.* Molecular Mechanism of Insulin Resistance and Obesity. **Biol. Med.**, v.228, p.1111-1117, 2003.

KAHN, C.H. *et al.* Jolin's Diabetes Mellitus. 14a ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

KAHN, S.E. Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not

increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. **Diabetologia**, v.48, p.1350-1358, 2005.

KAHN, S.E.; HULL, R.L.; UTZSCHNEIDER, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v.444, p.840-846, 2006.

KAIFU, K.; KIYOMOTO, H.; HITOMI, H.; MATSUBARA, K. *et al.* Insulin attenuates apoptosis induced by high glucose via the PI3-kinase/Akt pathway in rat peritoneal mesothelial cells. **Nephrol Dial Transplant**, v.24, p.809-815, 2009.

KARASAWA, H. *et al.* A novel model of type 2 diabetes mellitus based on obesity induced by high-fat diet in BDF1 mice. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 58, p.296-303, 2009.

KARGAR, C.; KTORZA, A. Anatomical *versus* functional β -cell mass in experimental diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.10, s.4, p.43-53, 2008.

KARIN, M. DELHASE, M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. **Semin. Immunol.**, v.12, p.85-98, 2000.

KELLEY, D.E. & MANDARINO, L.J. Fuel Selection in Human Skeletal Muscle in Insulin Resistance. A Reexamination. **Diabetes**, v.49, p.677-683, 2000.

KIDO, Y.; NAKAE, J.; ACCILI, D. The Insulin Receptor and Its Cellular Targets. Clinical Review. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, n.3, p.972-979, 2001.

KOLB, H.; MANDRUP-POULSEN, T. An immune origin of type 2 diabetes? **Diabetologia**, v.48, p.1038-1050, 2005.

LARSEN, C.M.; FAULENBACH, M.; VAAG, A.; VOLUND, A.; EHSES, J.A.; SEIFERT, B.; MANDRUP-POULSEN, M.; DONATH, M.Y. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v.356, p.1517-1526, 2007.

LEE, Y. *et al.* Increased lipogenic capacity of the islets of obese rats: a role in the pathogenesis of NIDDM. **Diabetes**, v.46, p.408-413, 1997.

LOWETH, A.C.; WILLIAMS, G.T.; JAMES, R.F.; SCARPELLO, J.H.; MORGAN, N.G. Human islets of langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1beta and Fas ligation. **Diabetes**, v.47, p.727-732, 1998.

LUPI, R. *et al.* Prolonged Exposure to Free Fatty Acids Has Cytostatic and Pro-Apoptotic Effects on Human Pancreatic Islets. **Diabetes**, v.51, p.1437-1442, 2002.

LYRA, R.; CAVALCANTI, N.; MAZZA, F. **Diabetes mellitus: perguntas e respostas**. 1^a ed. São Paulo: Ac, 2009. 536 p.

MAEDLER, K. *et al.* Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **The Journal of Clinical Investigation**, v.110, n.6, p.851-860, 2002.

- MAEGAWA, H. *et al.* Effect of diet change on insulin action: difference between muscles and adipocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p.616-623, 1986.
- MANDRUP-POULSEN, T. β -cell Apoptosis. Stimuli and Signaling. **Diabetes**, v.50, s.1, 2001.
- MASIELLO, P. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic β -cell mass. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.38, p.873-893, 2006.
- MATVEYENKO, A.V. & BUTLER, P.C. Relationship between β -cell mass and diabetes onset. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.10, s.4, p.23-31, 2008.
- MATVEYENKO, A.V. *et al.* Successful Versus Failed Adaptation to High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance. The Role of IAPP-Induced β -cell Endoplasmic Reticulum Stress. **Diabetes**, v.58, p.906-916, 2009.
- MEÇA, K.K.O.L.; MARTINS, A.S.; DEL PUERTO, H.L.; VASCONCELOS, A.C. Apoptose e expressão de Bcl-2 e das caspases 3 e 8 em placenta bovina, em diferentes estádios de gestação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.2, p.258-264, 2010.
- MIZUNO, N. *et al.* Altered *bcl-2* and *bax* Expression and Intracellular Ca^{2+} Signaling in Apoptosis of Pancreatic Cells and the Impairment of Glucose-Induced Insulin Secretion. **Endocrinology**, v.139, n.3, p.1429-1439, 1998.
- MOLLER, D.E. Potential Role of TNF- α in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **TEM**, v.11, n.6, p.212-217, 2000.
- MOONEY, R.A.; SENN, J.; CAMERONS, S.; INAMDAR, N.; BOIVIN, L.M.; SHANGI, Y.; FURLANETTO, R.W. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.25889-25893, 2001.
- MORAES, J.C. **Apoptose de Neurônios hipotalâmicos em Ratos Alimentados com Dieta Hiperlipídica**. 2009. 104f. Tese de Doutorado (Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- NUNEMAKER, C.S.; DISHINGER, J.F.; DULA, S.B. *et al.* Glucose Metabolism, Islet Architecture, and Genetic Homogeneity in Imprinting of $[Ca^{2+}]_i$ and Insulin Rhythms in Mouse Islets. **PlosOne**, v.4, ed.12, p.1-11, 2009.
- PAREKH, P.I.; PETRO, A.E.; TILLER, J.M.; FEINGLOS, M.N.; SURWIT, R.S. Reversal of Diet-Induced Obesity and Diabetes in C57BL/6J Mice. **Metabolism**, v.47, n.9, p.1089-1096, 1998.
- PARK, J.J. *et al.* GRB14, GPD1, and GDF8 as potential network collaborators in weight loss-induced improvements in insulin action in human skeletal muscle. **Physiol. Genomics**, v.27, p. 114-121, 2006.

- PARKER, D.R. *et al.* Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations, the normative aging study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.58, p.129-136, 1993.
- PASCOE, W.S. & STORLIEN, L.H. Inducement by fat feeding of basal hyperglycemia in rats with abnormal β -cell function: model for study of etiology and pathogenesis of NIDDM. **Diabetes**, v.39, p.226-233, 1990.
- PERREAULT, M.; MARETTE, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. **Nature Med.**, v.7, p.1138-1143, 2001.
- PEYOT, M-L. *et al.* β -Cell Failure in Diet-Induced Obese Mice Stratified According to Body Weight Gain: Secretory Dysfunction and Altered Lipid Metabolism Without Steatosis or Reduced β -cell Mass. **Diabetes**, v.59, p.2178-2187, 2010.
- PICK, A. *et al.* Role of apoptosis in failure of β -cell mass compensation for insulin resistance and β -cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. **Diabetes**, v.47, p.358-364, 1998.
- PICKUP, J.C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.27, p.813-823, 2004.
- RUBARTELLI, A.; COZZOLINO, F.; TALIO, M.; SITIA, R. A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence. **The EMBO Journal**, v.9, n.5, p.1503-1510, 1990.
- SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, n.6865, p.799-806, 2001.
- SAUTER, N.S.; SCHULTHESS, F.T.; GALASSO, CASTELLANI, L.W.; MAEDLER, K. The Antiinflammatory Cytokine Interleukin-1 Receptor Antagonist Protects from High-Fat Diet-Induced Hyperglycemia. **Endocrinology**, v.149, n.5, p.2208-2218, 2008.
- SAVAGE, D.B.; PETERSEN, K.F.; SHULMAN, G.I. Disordered Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Insulin Resistance. **Physiol. Rev.**, v.87, p.507-520, 2007.
- SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **J. Clin. Invest.**, v.118, p.2992-3002, 2008.
- SCHIMID, G.M.; CONVERSE, V.; WALTER, N. *et al.* Effect of high-fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissue, and liver of C57BL/6 mice. **Proteomics**, v.4, p.2270-2282, 2004.
- SHAFRIR, E.; ZIV, E.; MOSTHAF, L. Nutritionally Induced Insulin Resistance and Receptor Defect Leading to β -Cell Failure in Animal Models. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.18, n.892, p.223-246, 1999.
- SHIMABUKURO, M.; WANG, M-Y.; ZHOU, Y-T.; NEWGARD, C.B.; UNGER, R.H. Protection against lipoapoptosis of β cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.9558-9561, 1998.

SHKLYAEV, S.; ASLANIDI, G.; TENNANT, M.; PRIMA, V.; KOHLBRENNER, E.; KROUTOV, V.; CAMPBELL-THOMPSON, M.; CRAWFORD, J.; SHEK, E.W.; SCARPACE, P.J.; ZOLOTUKHIN, S. Sustained peripheral expression of transgene adiponectina offsets the development of diet-induced obesity in rats. **PNAS**, v.100, p. 14217-14222, 2003.

SIMSEK, N. *et al.* Effects of Melatonin on islet neogenesis and beta cell apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats: an immunohistochemical study. **Domestic Animal Endocrinology**, v.43, p.47-57, 2012.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. Rio de Janeiro: Diagraphic (2003). Disponível em: http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/Consenso_atual_2002.pdf. Acesso em: 28/07/2010.

SOLINAS, G.; KARIN, M. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction (Review article). **The FASEB Journal**, v.24, p.2596-2611, 2010.

SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. **Indian J. Med. Res.**, v.125, p.451-472, 2007.

SWAROOP, J.J.; RAJARAJESWARI, D.; NAIDU, J.N. Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **Indian J. Med. Res.**, v.135, p.127-130, 2012.

TAKAMOTO, I. *et al.* Crucial role of insulin receptor substrate-2 in compensatory b-cell hyperplasia in response to high fat diet-induced insulin resistance. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.10, p.147-156, 2008.

TANIGUCHI, C.M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C.R. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. **Mol. Cell. Biol.**, v.7, p.85-96, 2006.

THOMAS, H.E.; MCKENZIE, M.D.; ANGSTETRA, E.; CAMPBELL, P.D.; KAY, T.W. Beta cell apoptosis in diabetes. **Apoptosis**, v.14, p.1389-1404, 2009.

THORAND B, KOLB H, BAUMERT J, KOENIG W, CHAMBLESS L, MEISINGER C.; ILLIG, T.; MARTIN, S.; HERDER, C. Elevated levels of interleukin-18 predict the development of type 2 diabetes. Results from the MONICA/KORA Augsburg Study, 1984-2002. **Diabetes**. v.54, p.2932-2938, 2005.

TOBIN, B.W. *et al.* Altered TNF- α , glucose, insulin, and amino acids in islets of Langerhans cultured in a microgravity model system. **American Journal of Physiol Endocrinol and Metabolism**, v.208, p.92-102, 2001.

WANG, Q.; JIN, T. The role of insulin signaling in the development of β -cell dysfunction and diabetes. **Islets**, v.1:2, p.95-101, 2009.

WATARAI, T. *et al.* Alteration of insulin-receptor kinase activity by high-fat feeding. **Diabetes**, v.37, p.1397-1404, 1988.

WEIR, G.C. *et al.* β -Cell Adaptation and Decompensation During the Progression of Diabetes. **Diabetes**, v.50, s.1, p.154-159, 2001.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. **J. Clin. Invest.**, v.115, p.1111-1119, 2005.

WESTERMARK, P. Quantitative studies on amyloid in the islets of Langerhans. **Ups J. Med. Sci.**, v.77, p.91-94, 1972.

WIESENTHAL, S.R.; SANDHU, H.; MCCALI, R.H.; TCHIPASHVILI, V.; POLONSKY, K.; SHI, Z.Q.; LEWIS, G.F.; MARI, A.; GIACCA, A. Free fatty acids impair hepatic insulin extraction in vivo. **Diabetes**, v.48, p.766-774, 1999.

World Health Organization. *Prevention of diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group.* Geneva: World Health Organization; 1994. No. 844.

XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v.112, p.1821-1830, 2003.

ZEISS, C.J. The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice (Review Article). **Vet. Pathol.**, v.40, p.481-495, 2003.

ZHANG, J. *et al.* The protective effect of resveratrol on islet insulin secretion and morphology in mice on a high-fat diet. **Diab. Res. Clin. Pract.**, p.1-9, 2012.

ZHOU, Y.P. & GRILL, V.E. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acid inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. **J. Clin. Invest.**, v.93, p.870-876, 1994.

ZOU, C. & SHAO, J. Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.19, p.277-286, 2008.