

LETICIA HELENA PINTO HERNANDES

**“ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO
RECEPTOR NUCLEAR COUP-TFII EM PÂNCREAS
DE CAMUNDONGOS PRÉ-DIABÉTICOS.”**

Campinas, 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Leticia Helena Pinto Hernandes

**“ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO
RECEPTOR NUCLEAR COUP-TFII EM PÂNCREAS
DE CAMUNDONGOS PRÉ-DIABÉTICOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata

Leticia Helena Pinto Hernandes

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Dr. Henrique Marques-Souza

Coorientadora: Dra. Carla Beatriz Collares Buzato

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

H43a Hernandes, Leticia Helena Pinto, 1986-
Análise do padrão de expressão do receptor nuclear Coup-TFII em pâncreas de camundongos pré-diabéticos / Leticia Helena Pinto Hernandes. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Henrique Marques Barbosa de Souza.
Coorientador: Carla Beatriz Collares Buzato.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Pâncreas. 2. Fator II de transcrição COUP. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Células beta pancreáticas. I. Marques-Souza, Henrique. II. Collares-Buzato, Carla Beatriz, 1965-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Expression pattern of the nuclear receptor Coup-TFII in pancreas of the pre-diabetic mice

Palavras-chave em inglês:

Pancreas

COUP transcription factor II

High fat diet

Pancreatic beta cells

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Henrique Marques Barbosa de Souza [Orientador]

Carla Vermeulen Carvalho Grade

Carolina Prado de França Carvalho

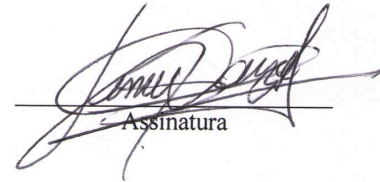
Data de defesa: 31-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 31 de março de 2014.

BANCA EXAMINADORA

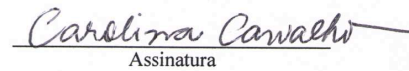
Dr. Henrique Marques Barbosa De Souza (Orientador)


Assinatura

Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade


Assinatura

Dra. Carolina Prado de França Carvalho


Assinatura

Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

Assinatura

Dra. Hozana Andrade Castillo

Assinatura

Resumo

O Diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM) representa uma das principais doenças do mundo moderno, e é caracterizado pelo comprometimento da homeostase glicêmica do organismo, resultante de uma combinação da redução da sensibilidade periférica à insulina e o comprometimento da função das células- β . Estudos recentes sugerem que Coup-TFII possui um papel importante na homeostase glicêmica e no metabolismo energético. Apesar destes trabalhos representarem fortes indícios, ainda é desconhecido se Coup-TFII desempenharia este papel modulador da homeostase glicêmica e do metabolismo energético em indivíduos com T2DM. O objetivo deste trabalho foi investigar o padrão de expressão de *Coup-TFII* em camundongos apresentando um quadro pré-diabético. Para isto, foram utilizados camundongos C57BL/6 tipo selvagem tratados com dieta hiperlipídica (dHL) por 60 dias (animais dHL). A caracterização metabólica revelou que estes animais apresentaram características de quadro pré-diabético, i.e., sobrepeso, resistência periférica à insulina associada à moderada hiperglicemia, significativa hiperinsulinemia (resultante da hiperplasia compensatória de células- β) e distúrbios na secreção de insulina, tanto no estado basal (2,8 mM de glicose), quanto em condição estimulatória (16,8 mM de glicose). A análise da expressão de *Coup-TFII* por qPCR revelou uma redução dos níveis transcricionais deste gene em ilhotas dos animais dHL. Estes resultados indicam que a relação negativa previamente demonstrada entre hiperglicemia, hiperinsulinemia e reduzida secreção de insulina e a expressão de *Coup-TFII* também ocorre no quadro pré-diabético desenvolvido pelos animais dHL. Interessantemente, análise do conteúdo proteico de Coup-TFII revelou um aumento significativo de 33,6% nos animais dHL, resultado que contrasta com a redução da transcrição deste gene nas células- β destes animais. Uma possível explicação seria pelo papel fundamental que Coup-TFII exerce no processo de proliferação das células- β dependente da via Wnt/ β -catenina, observada durante o desenvolvimento e potencialmente atuando na hiperplasia compensatória nos animais dHL. Além disso, trabalhos recentes demonstraram que Coup-TFII atua como um regulador negativo de sua própria transcrição em células- β . Portanto, com 60 dias de tratamento o quadro de hiperplasia nos animais

dHL demandaria maiores níveis da proteína de Coup-TFII em comparação com os animais Ctr. Uma vez elevado, este nível proteico de Coup-TFII, juntamente com os efeitos das alterações metabólicas, teriam um efeito negativo sobre a transcrição de Coup-TFII nos animais dHL.

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is one of the most important diseases in the modern world, and is characterized by the compromise of the glycemic homeostasis and a result of a combination of insulin resistance and impaired β -cell function. Recent studies show that nuclear receptor COUP- TFII (Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II) plays an important role in regulating glycemic homeostasis and energy metabolism. Although these results are a strong hint, it is still unknown whether Coup-TFII would have a role modulating glycemic homeostasis and energy metabolism in individuals suffering from T2DM. The aim of this work was to investigate the expression pattern of the transcription factor Coup-TFII in mice displaying pre-diabetic condition. To this aim, C57BL/6, wildtype mice were treated with high fat diet (dHL, from the Portuguese dieta hiper lipídida) for 60 days (dHL mice). Metabolic characterization confirmed that dHL mice display characteristics of pre-diabetic condition, i.e., overweigh, insulin resistance associated with moderate hyperglycemia, hyperinsulinemia (as a result of hyperplasia of β -cells) and impaired insulin secretion both, in basal and high blood glucose concentrations. Gene expression analysis for Coup-TFII by qPCR revealed a significant reduction of its transcripts in pancreatic islet of dHL animals. These results indicate that the previously described negative relationship between hyperglycemia, hyperinsulinemia and imparted insulin secretion and Coup-TFII expression is also happening in the pre-diabetic condition developed by dHL animals. Interestingly, analysis of the protein expression of Coup-TFII revealed a significant increase of 33,6% in dHL animals, a result that contrasts with the reduction of Coup-TFII transcripts observed in these animals. One possible explanation is the essential role that Coup-TFII plays in the Wnt/ β -catenin-dependent β -cell proliferation, in addition to the negative feedback loop observed in β -cells for Coup-TFII on its own expression. By 60 days of treatment, β -cell proliferation during hyperplasia in dHL animals would require levels of Coup-TFII protein higher than in control animals. Once increased, this higher protein level, in addition to the metabolic alterations, would have a negative effect on Coup-TFII transcription in dHL animals.

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Justificativa	8
3. Objetivos	10
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos	11
4. Materiais e Métodos	12
4.1. Animais e Dieta.....	13
4.2. Caracterização metabólica dos animais	14
4.3. Processamento histológico do pâncreas para IF.....	15
4.3.1. Imunofluorescência.....	15
4.3.2. Imunohistoquímica.....	16
4.4. Isolamento de ilhotas.....	17
4.5. Western Blotting	17
4.6. Extração de RNA total e síntese de cDNA	18
4.7. Desenho de <i>primers</i> específicos para ensaios de qPCR.....	19
4.7.1. Teste dos <i>primers</i> por RT-PCR.....	20
4.8. Análise de expressão gênica relativa por qPCR.....	21
4.8.1. Eficiência de amplificação dos <i>primers</i>	22
4.8.2. Escolha do gene de referência.....	23
4.8.3. Ensaios de expressão gênica relativa por qPCR	23
4.9. Análise Estatística	24
5. Resultados	25
I. Os animais DHL desenvolvem características metabólicas de camundongos pré-diabéticos.....	26
II. Animais pré-diabéticos apresentam uma redução de <i>Coup-TFII</i> e <i>Ctnnb1</i> , e um aumento da expressão de insulina	28
III. Animais pré-diabéticos apresentam um aumento do conteúdo proteico de <i>Coup-TFII</i>	34

6. Discussão	38
7. Conclusões.....	45
8. Referencias Bibliográficas	47
ANEXO - Declaração CEUA.....	52

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Regulação
Gênica Embrionária e no Laboratório de Comunicação e
Adesão Celular do Departamento de Histologia e
Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, pelo programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, com auxílio financeiro do
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico CNPq, bolsa de Mestrado, processo número
130784/2012-5.

“Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei demais. Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe, só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei...”

(Renato Teixeira)

*Dedico esta tese aos meus pais, Cleibe e Dita,
e ao meu namorado Rodrigo, por
acreditarem em mim a cada segundo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda a oportunidade que tem me dado e por me mostrar sempre que sou capaz, e que não preciso ter medo. Por ser o meu melhor amigo e me dar forças todos os dias para continuar a caminhada, me mostrando sempre que basta coloca-Lo no inicio que Ele cuidará do fim.

Em segundo lugar e não menos importante, gostaria de agradecer aos meus pais Cleibe e Dita por todo amor e dedicação. Pai, obrigada por sempre me ensinar o valor do trabalho e do amor por aquilo que faz. Mãe, obrigada por ser meu exemplo de mulher e dedicação à família. Obrigada por sempre apoiarem meus estudos e me oferecerem sempre as melhores condições para que eu pudesse estudar. Somente um parágrafo é muito pouco para expressar toda a minha gratidão e admiração. Pai, ainda não inventei um camundongo que brilha tá...rs...Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo apoio e dedicação.

Ao meu eterno professor Celso Caneri, por ter me apresentado a Biologia com tanto amor e feito com que eu me apaixonasse por essa ciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Henrique Marques-Souza, que me proporcionou a oportunidade de estar aqui. Por me aceitar como primeira aluna de mestrado. Por todo conhecimento, paciência, apoio e por acreditar sempre que eu era capaz. Aqui, deixo meu enorme respeito e admiração pelo profissional que é. ;-)

À minha coorientadora Prof. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato por toda orientação. Por todo apoio ao meu trabalho e por muitas vezes ter ido junto comigo para a bancada para que eu pudesse aprender técnicas que jamais sonhara fazer.

A todos os professores do Departamento de Histologia e Embriologia por quem tenho imensa admiração. Gostaria de agradecer à Prof. Lucia Elvira Alvares, minha orientadora de iniciação científica, a qual me apresentou esse mundo científico. Deixo aqui meus singelos agradecimentos por ter confiado no meu trabalho. À Carla Grade, minha primeira “orientadora” de iniciação científica, que mesmo estando a maior parte na Alemanha em nenhum momento negou sua atenção e carinho.

À todos os alunos e técnicos do Departamento de Histologia e Embriologia da UNICAMP que de alguma forma contribuíram para que meu trabalho fosse mais prazeroso, pelos cafês, risadas e por todo conhecimento compartilhado. Em especial à Dani, por me acompanhar nestes dois anos de incansáveis coletas de ilhotas, obrigada pelo companherismo. À Luana, pela amizade que construímos, tenha certeza que aprendi muito com você, e sinto muito sua falta no laboratório. Às minhas queridas Nara e Marília, por toda a conversa que tivemos nesses anos de DHE, ah se esse aquário falasse...rs...obrigada por sempre estarem prontas para ouvir, dar conselhos e ajudar no que fosse preciso e por me apresentarem a Renata, um anjo que apareceu em nossas vidas. À Viviane que foi de extrema importância pra que a bendita Imunofluorescência desse certo, obrigada de coração pela sua dedicação. À Karina e à Angélica que dedicaram parte de seu tempo em ajudar no que fosse preciso.

À Débora Sobreira, que já faz uma falta imensa na minha vida. Obrigada pela amizade sincera e por tornar meus dias no departamento muito mais alegres e felizes. Por fazer dos almoços, antes solitários, momentos de escape, desabafo e muitas risadas (Vem ni mimmm...). Você será pra sempre a nossa “Mini-teacher”.

À Natalia, que acima de técnica do Departamento e excelente profissional, se tornou uma das pessoas mais importantes nessa caminhada. É impossível demonstrar tamanho agradecimento por tudo que fez por mim nestes anos em apenas algumas linhas. A você deixo todo meu amor e carinho. Você é demais. Não deixando de esquecer do

terceiro integrante do trio, Willians, que foi chegando de mansinho ao laboratório e hoje já senta no meu lugar...rsrs...obrigada pela sua amizade.

Agradeço ao querido amigo Tody, pelo companheirismo e amizade, nos aproximando nestes dois anos através das cansativas, intermináveis, e incontáveis viagens de Atibaia-Campinas-Atibaia e a todos os amigos que me esperavam de braços abertos em Atibaia.

À Liliam Panagio, amiga e secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. Obrigada por toda a dedicação e suporte burocrático. Pelos sorrisos nos corredores do DHE, por sempre estar atenta para que eu não esquecesse nenhum prazo e por estar sempre pronta a atender qualquer dúvida.

Ao INFABIC, nas pessoas da Mariana e do Vitor, pela disponibilidade e disposição a ajudar no que fosse preciso.

À Universidade Estadual de Campinas e ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelas oportunidades oferecidas, possibilitando meu crescimento profissional. Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, cujo apoio financeiro possibilitou a realização deste trabalho.

E para finalizar com chave de ouro, gostaria de agradecer ao meu companheiro, amigo, namorado, Rodrigo Goulart, aquele que escolhe todos os dias estar ao meu lado e me apoiar. Obrigada por ser aquele que aguenta muitas vezes minha ansiedade, meus choros, meus desabafos, mas mesmo assim não desiste de mim. Obrigada por ser a pessoa que escolhi para construir uma família e passar o resto da minha vida. Te amo. Esse trabalho não teria tido sentido sem você na minha vida.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para
que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas
Graças a Deus, não sou o que era antes”.*
(Marthin Luther King)

Lista de Figuras

- Figura 1.** Imunofluorescência em ilhotas de Langerhans demonstrando as diferenças entre sua citoarquitetura em humanos e camundongos.....2
- Figura 2.** Representação esquemática dos variantes de transcritos de *Coup-TFII*.....5
- Figura 3.** Figura representativa de diferentes valores de E de diferentes alvos.....22
- Figura 4.** Alterações metabólicas características de pré-diabetes são observadas em camundongos machos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica por 60 dias.....27
- Figura 5.** Verificação da amplificação dos fragmentos por RT-PCR revelam a presença dos transcritos para os genes em estudo.....28
- Figura 6.** Verificação da especificidade de amplificação dos *primers* revelam a presença de transcritos específicos para os genes em estudo.....30
- Figura 7.** Estudo da expressão gênica em ilhotas de camundongos dHL revelam diminuição de transcritos de *Coup-TFII*, aumento de insulina e nenhuma alteração de *Ctnnb1*.....33
- Figura 8.** Imunofluorescência para Coup-TFII em cortes histológicos de pâncreas de camundongos dHL revelam aumento na expressão de Coup-TFII em relação ao Ctr.....35
- Figura 9.** Expressão de Coup-TFII em pâncreas de camundongos por imunohistoquímica revela aumento nos animais dHL comparados aos Ctr.....36

Figura 10. Quantificação proteica de Coup-TFII por Western blotting revelou aumento significativo na sua expressão em ilhotas de camundongos dHL em relação aos Ctr.....37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição das rações, normal e hiperlipídica, administradas aos animais Ctr e dHL, respectivamente, comparando a quantidade de lipídios administrada nas duas rações.....	13
Tabela 2. Descrição dos anticorpos utilizados para a detecção de Coup-TFII através das técnicas de imunofluorescência e imunohistoquímica.....	16
Tabela 3. <i>Primers</i> específicos utilizados nos experimentos de qPCR, desenhados através do Primer Blast (NCBI).....	19
Tabela 4. Valores de eficiência da reação e <i>slope</i> dos genes utilizados nos ensaios de qPCR.....	29
Tabela 5. Variação da média geométrica, SD e CV dos Cts de cada gene de referencia gerados pelo programa <i>Bestkeeper</i>	31
Tabela 6. Repetidas análises de correlação aos pares dos genes candidatos a controle interno das reações de qPCR evidenciando a alta correlação entre <i>Rps29</i> e <i>CycA</i>	32
Tabela 7. Coeficientes de correlação combinados dos genes candidatos a controle interno das reações de qPCR demonstrando a alta correlação entre os genes <i>Rps29</i> , <i>GapdH</i> e <i>CycA</i>	32

Lista de endereços eletrônicos

Bestkeeper	http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html .
Image J	http://rsbweb.nih.gov/ij/
Invitrogen	http://www.invitrogen.com
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Primer Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

Lista de Abreviaturas

Actb	Gene que codifica a proteína β -actina
ASC	Área sobre a curva
BSA	Soro fetal bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	Molécula de DNA complementar, do inglês <i>Complementary DNA</i>
Coup-TFII	Receptor nuclear <i>Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II</i>
Cq	Ciclo de quantificação, do inglês <i>quantification cycle</i>
Ct	Ciclo <i>threshold</i> , do inglês <i>threshold cycle</i>
Ctnnb1	Gene que codifica a proteína β -catenina
Ctr	Camundongos C57BL/6 controles
CV	Coefficiente de variação, do inglês <i>coeficiente of variation</i>
CycA	Gene que codifica a proteína ciclofilina A
DBD	Domínio de ligação ao DNA, do inglês <i>DNA binding domain</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
dHL	Dieta hiperlipídica
DNA	Acido desoxirribonucleico
E	Eficiência de amplificação
GapdH	Gene que codifica a proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
IF	Imunofluorescência
IHQ	Imunohistoquímica (DAB)
Ins 1	Gene que codifica o transcrito 1 da insulina

Ins 2	Gene que codifica o transcrito 2 da insulina
ITT	Teste de tolerância à insulina
LBD	Domínio de ligação ao ligante, do inglês <i>ligand-binding domain</i>
MG	Média geométrica
NR2F2	Receptor nuclear da subfamília 2, grupo F, membro 2
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
qPCR	PCR quantitativo em Tempo Real
QR	Quantidade relativa
r	Coefficiente de correlação de <i>Pearson</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
Rps29	Gene que codifica a proteína ribossomal 29
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase Transcriptase reversa, do inglês <i>Reverse Transcriptase PCR</i> .
SD	Desvio padrão, do inglês <i>standard deviation</i>
SEM	Erro padrão da média, do inglês <i>standard error of the mean</i>
T1DM	Diabetes mellitus tipo 1
T2DM	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TV1	Transcrito 1 de <i>Coup-TFII</i> , do inglês <i>transcript variant 1</i>)
TV2	Transcrito 2 de <i>Coup-TFII</i> (do inglês <i>transcript variant 2</i>)
WB	Western blotting



1. Introdução

O pâncreas é um órgão essencial nos vertebrados, desempenhando um importante papel no processo de digestão do alimento (particularmente de proteínas e lipídios), bem como na homeostase glicêmica. O pâncreas é uma glândula mista composta por uma porção exócrina, constituída por ácinos serosos e ductos, e por uma porção endócrina, cuja função é regular o equilíbrio nutricional do organismo.

A função endócrina do pâncreas é executada pelas ilhotas de Langerhans, ou ilhotas pancreáticas, que são agrupamentos de células compactos e esféricos imersos no tecido exócrino. As ilhotas são constituídas por cinco tipos celulares: células- β (beta), células- α (alfa), células- δ (delta), células PP e células- γ (épsilon), cuja função principal é regular a homeostase da glicose sistêmica. A organização, ou citoarquitetura, dos tipos celulares dentro da ilhota pode diferir dependendo da espécie animal e das condições fisiopatológicas do organismo (Fig. 1) (Cabrera *et al.*, 2006; Bosco *et al.*, 2010). Em roedores, as células- β se encontram localizadas centralmente, enquanto que as células não- β se arranjam formando um manto na periferia da ilhota (Fig. 1b) (Cabrera *et al.*, 2006; Bosco *et al.*, 2010). A célula- β é o tipo celular predominante, representando cerca de 60-80% do número total de células na ilhota. Essa célula endócrina pancreática secreta o hormônio insulina que atua reduzindo a glicemia, aumentando a absorção de glicose periférica e suprimindo a liberação de glicose pelo fígado (Cerf *et al.*, 2013).

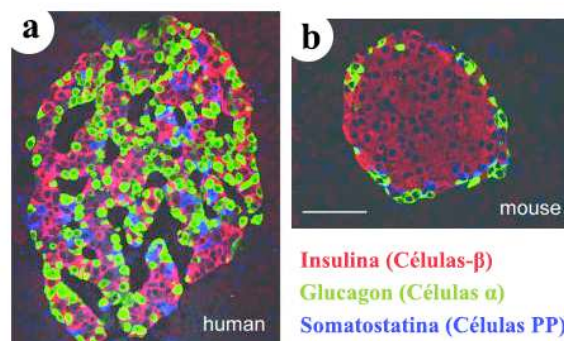


Figura 1. Imunofluorescência em ilhotas de Langerhans demonstrando as diferenças entre sua citoarquitetura em humanos e camundongos. (a-b) Imunofluorescência para insulina (vermelho), glucagon (verde) e somatostatina (azul). (a) Humanos e (b) Camundongos. Barra = 50 μ m. Figura adaptada de Cabrera *et al.* 2006.

O processo de secreção de insulina é relativamente complexo e depende de uma maquinaria intracelular de organelas e estruturas celulares da célula- β , como canais de

membrana e o citoesqueleto (Kahn, 2009). A manutenção da homeostase glicêmica depende principalmente da capacidade funcional/secretora das células- β , e o comprometimento desta função pode resultar em disfunções metabólicas, como o *diabetes mellitus*.

O *diabetes mellitus* configura-se hoje como uma epidemia mundial, traduzindo-se em um grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. Existem duas formas de *diabetes mellitus* que se distinguem quanto à patogênese, a evolução da doença e as estratégias terapêuticas para o seu tratamento. São elas, o *diabetes mellitus* do tipo 1 (T1DM, do inglês *Type 1 Diabetes Mellitus*) e do tipo 2 (T2DM, do inglês *Type 2 Diabetes Mellitus*).

Os dois tipos de diabetes são resultados da perda funcional de células- β resultando em graves distúrbios metabólicos. Entretanto, no T1DM esta perda está associada a um processo de destruição das células- β por uma reação autoimune, envolvendo uma combinação de fatores, como susceptibilidade genética, desregulação imunológica e fatores ambientais (Borowiak *et al.*, 2010; Acharjee *et al.*, 2013). No T2DM, o comprometimento da homeostase glicêmica resulta de uma combinação da redução da sensibilidade periférica à insulina e o comprometimento da função das células- β (Liew & Andrews, 2009).

Tanto fatores genéticos quanto ambientais podem influenciar o desenvolvimento do T2DM. Dentre os fatores ambientais, os mais importantes que acarretam o T2DM são a inatividade física, dietas ricas em gordura e aqueles que influenciam a sensibilidade à insulina, como obesidade (Gerich *et al.*, 1999; Hanley *et al.*, 2010). Estudos demonstram que o risco do desenvolvimento de diabetes aumenta progressivamente com o aumento do índice de massa corpórea (IMC) (Wannamethee *et al.*, 1999). O aumento de massa corpórea pode acarretar um quadro de resistência periférica à insulina, que é caracterizado pela perturbação no reconhecimento de insulina, através de seus receptores, pelos tecidos periféricos, culminando na falha do transporte de glicose para dentro da célula (Kahn *et al.*, 2006).

O acúmulo de glicose sanguínea decorrente do quadro de resistência periférica gera inicialmente um aumento na secreção de insulina (Kahn *et al.*, 2006). Estudos em camundongos têm demonstrado que a hiperglicemia por um curto período de tempo gera

uma resposta compensatória das células- β , induzindo sua proliferação e suprimindo a apoptose celular (Tarabra *et al.*, 2012). Esta fase de hiperglicemia, acompanhada de hiperinsulinemia e um aumento significativo da massa de células- β , de forma a compensar a resistência periférica à insulina, é observada também em camundongos pré-diabéticos (Carvalho *et al.*, 2012).

No entanto, a glicose pode também ter um efeito estimulatório da apoptose das células- β (Tarabra *et al.*, 2012). A hiperglicemia crônica leva à perda progressiva da massa de células- β com prolongado aumento da taxa de apoptose celular (Sone & Kagawa *et al.*, 2005), e conseqüentemente o estabelecimento do quadro de T2DM propriamente dito (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). A identificação de fatores que regulam a função e massa das células- β pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do T2DM e doenças relacionadas (Boutant *et al.*, 2012).

A função das células- β depende de uma rede de fatores de transcrição que controlam a expressão de genes chaves envolvidos na sensibilidade à glicose, biossíntese de insulina e sua exocitose (Boj *et al.*, 2001). O receptor nuclear Coup-TFII (*Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II*), também conhecido como NR2F2, é um receptor nuclear órfão, por não possuir um ligante específico identificado, e está envolvido em vários processos vitais, como a organogênese, angiogênese e homeostase metabólica (Lin *et al.*, 2011). A desregulação de seus níveis durante a embriogênese contribui para o desenvolvimento de várias anomalias congênitas devido à sua participação em diversas funções celulares como a determinação, diferenciação, sobrevivência e migração celular (Lin *et al.*, 2011).

Coup-TFII possui a estrutura de domínio típica de receptores nucleares que abrange (1) uma região N-Terminal com um domínio de ativação independente de ligante (AF-1 – do inglês *activation function 1*), (2) um domínio altamente conservado de ligação ao DNA (DBD - do inglês *DNA binding domain*), permitindo a sua classificação como um fator de transcrição, e (3) um domínio de ligação ao ligante (LBD – do inglês *ligand-binding domain*) (Yamazaki *et al.*, 2013), que possui em sua estrutura uma região dependente de ligante AF-2 (AF-2 – do inglês *activation function 2*). As regiões de DBD e LBD são separadas por uma região de dobra (*ringe*) (Fig. 2).

Como um fator de transcrição, Coup-TFII atua regulando negativa ou positivamente a expressão de genes alvo, ligando-se à região regulatória destes genes através do seu DBD (Pereira *et al.*, 2000). Em camundongos, *Coup-TFII* possui um variante de transcrito (*TV2*, do inglês *transcript variant 2*) onde um evento de *splicing* alternativo resulta na formação de uma isoforma em que o primeiro exon, de 442 pb, que codifica o domínio DBD, é substituído por um exon com 43 pb, sem domínio funcional evidente (Fig. 2). Com isto, além da proteína codificada pelo transcrito completo (*TV1*, do inglês *transcript variant 1*), o gene Coup-TFII codifica uma proteína truncada, desprovida do domínio DBD, perdendo assim sua função como um fator de transcrição. Em células humanas, Yamazaki *et al.*, (2013) demonstraram que a regulação da expressão endógena de genes alvo de Coup-TFII é afetada pelo balanço entre os níveis de expressão dos dois variantes de transcrito. Nestas células, a presença da proteína TV2 inibe a ligação da versão completa de Coup-TFII (TV1) ao DNA alvo, através da interação física entre TV1 e TV2, o que sugere uma ação dominante negativa de TV2 sob a atividade transcricional do gene *Coup-TFII*. Embora ambos transcritos sejam expressos de maneira similar em diferentes tecidos de camundongos, seus níveis de expressão relativa não são uniformes, sugerindo que a atividade transcricional de Coup-TFII, expressa pelo transcrito TV1, pode ser diferencialmente regulada em vários tecidos pelos níveis de expressão de TV2 (Yamazaki *et al.*, 2013).

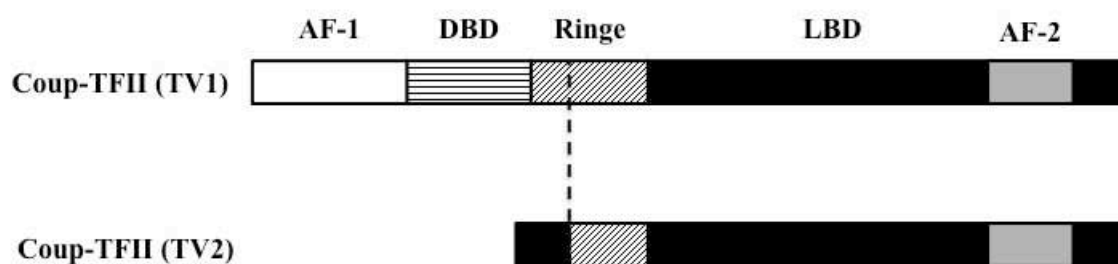


Figura 2. Representação esquemática dos variantes de transcritos de *Coup-TFII*. *TV1* o qual representa a forma completa de *Coup-TFII* e *TV2*, forma incompleta sem o sitio AF-1 e DBD. Figura adaptada de Yamazaki *et al.*, 2013.

No pâncreas, *Coup-TFII* é expresso tanto durante o desenvolvimento embrionário quanto no tecido adulto, sendo detectado nas ilhotas pancreáticas, mais precisamente nas células- β (Zhang *et al.*, 2002). Bardoux *et al.*, (2005) demonstraram que camundongos haplodeficientes para o gene *Coup-TFII* em células- β pancreáticas apresentaram um comprometimento da sensibilidade à glicose e secreção anormal de insulina. Estes camundongos apresentaram hiperinsulinemia, tanto em jejum quanto em estado alimentado, e intolerância à glicose. Esta função de *Coup-TFII* ocorre pela sua capacidade de regular a expressão do gene codificador da insulina, *Ins1* e *Ins2* (Perillou *et al.*, 2008).

Perillou *et al.*, (2008) demonstraram em cultura de células- β que os níveis de expressão dos genes da insulina (*Ins1* e *Ins2*) aumentam quando *Coup-TFII* é silenciado, ao passo que a superexpressão de *Coup-TFII* leva a pronunciada redução na expressão desses genes. Este efeito negativo na produção de insulina por *Coup-TFII* é recíproco, uma vez que a expressão de *Coup-TFII* é reprimida em ilhotas em cultura tratadas com insulina (Perillou *et al.*, 2008). Esta repressão de *Coup-TFII* por insulina se dá indiretamente através de *FOXO1*, o qual atua como um ativador de *Coup-TFII*. (Perillou *et al.*, 2008).

Além deste importante papel na homeostase das células- β , *Coup-TFII* é um fator de transcrição crítico para a proliferação das células- β na vida neonatal, podendo participar na determinação da sobrevivência destas células (Boutant *et al.*, 2012). Boutant *et al.*, (2012) demonstraram que *Coup-TFII* ativa a expressão do gene da β -catenina (*Ctnnb1*), um componente central da via de sinalização Wnt canônica, e seus genes alvo, possibilitando o processo de proliferação celular durante o desenvolvimento pancreático.

A via de sinalização Wnt/ β -catenina (Wnt canônica), conservada em todo o reino animal, é crítica para o desenvolvimento de numerosos tecidos (Murtaugh *et al.* 2008). Estudos recentes têm reportado que esta via desempenha um papel importante em diferentes fases da organogênese pancreática, incluindo a especificação, proliferação e diferenciação das células acinares pancreáticas (Murtaugh *et al.*, 2008; Oliveira, 2011; Maschio, 2014). Ainda, recentemente foi demonstrado que a via Wnt canônica está ativada em ilhotas pancreáticas hiperplásicas de animais pré-diabéticos (Maschio, 2014).

Diante desta ação importante de *Coup-TFII* na regulação da produção de insulina e

regulação da massa de células- β , surge a hipótese se *Coup-TFII* estaria diretamente envolvido nas alterações metabólicas e teciduais comumente observadas em indivíduos pré-diabéticos, como a alteração da expressão de insulina, a hiperplasia compensatória e eventual disfunção das ilhotas pancreáticas (Perilhou *et al.*, 2008; Boutant *et al.*, 2012; Sone & Kagawa *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2012).

Uma forma de se induzir experimentalmente o quadro pré-diabético é através do tratamento de camundongos C57BL/6 tipo selvagem com dieta hiperlipídica (dHL) por 60 dias. Este tratamento resulta em animais que apresentam hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e resistência periférica à insulina, sendo este último associado à uma hiperplasia compensatória da massa de células- β . (Surwit *et al.*, 1988; Winzell *et al.*, 2004; American Diabetes Association, 2011; Oliveira, 2011; Carvalho *et al.*, 2012). O grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Carla Collares-Buzato tem utilizado este modelo para o estudo do papel das interações célula-célula, mediadas pelas junções intercelulares, na patogênese da T2DM (Carvalho *et al.*, 2012; Oliveira, 2011).

Sabendo que camundongos pré-diabéticos apresentam um comprometimento da resposta secretora de insulina e um aumento da massa de células- β (Carvalho *et al.*, 2012; Oliveira, 2011), neste trabalho propusemos analisar a expressão de *Coup-TFII* no pâncreas endócrino destes animais, a fim de estabelecer uma possível relação entre a função de *Coup-TFII*, com a modulação da expressão e secreção de insulina e a proliferação de células- β observada em animais pré-diabéticos.



2. Justificativa

O *Diabetes Mellitus* configura-se hoje como uma epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. Esta doença deve-se a uma disfunção de vários órgãos e células, incluindo as células- β pancreáticas, que sintetizam e secretam insulina. O estudo das vias que regulam a função deste tipo celular pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de T2DM e doenças relacionadas. Sabendo que células- β de camundongos pré-diabéticos apresentam, dentre outros distúrbios, uma disfunção na secreção de insulina e hiperplasia compensatória das células- β (Carvalho *et al.*, 2012; Oliveira, 2011), pretendemos analisar a expressão de *Coup-TFII*, um fator de transcrição que controla a expressão, a secreção e a sensibilidade à insulina (Hwung *et al.*, 1988; Perilhou *et al.*, 2008), a fim de estabelecer uma possível relação entre sua função e as alterações metabólicas observadas nos camundongos pré-diabéticos.



3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar um possível envolvimento do gene *Coup-TFII* na homeostase glicêmica em modelo animal de pré-diabéticos.

3.2. Objetivos Específicos

I. Obtenção e caracterização do quadro pré-diabético em animais tratados com DHL por 60 dias.

II. Caracterização do padrão de expressão de *Coup-TFII* e dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Ctnnb1* em ilhotas pancreáticas de camundongos normais e pré-diabéticos, através da técnica de PCR quantitativo (*qPCR*).

III. Detecção dos níveis proteicos de *Coup-TFII* no pâncreas nos camundongos normais e pré-diabéticos através das técnicas de imunofluorescência (IF), imunohistoquímica (IHQ) e *western blotting* (WB).



4. Materiais e Métodos

4.1. Animais e dieta.

Foram utilizados camundongos C57BL/6 (selvagem), machos, com 4 ou 5 meses de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Estes camundongos foram mantidos em condições controladas de temperatura e ciclo claro:escuro (12h:12h), alimentados com ração normal (Nuvilab CR1 Autoclavável) e água *ad libitum* no “Biotério de Roedores” do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE) do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP, até o momento da experimentação.

Os animais adquiridos foram separados em dois grupos, o grupo experimental tratado com dieta hiperlipídica (dHL) e grupo controle (Ctr), tratado com ração normal. Os camundongos do grupo experimental foram alimentados com uma dieta com alto teor de lipídios (21% em peso; 40,3% em kcal) por 60 dias, cuja composição está listada na tabela 1. Pelo mesmo período, o grupo Ctr recebeu uma ração normal balanceada, com conteúdo normal de lipídios (4,5% em peso, 8,0% em kcal; ração padrão peletizada; Nuvital CR-1, Colombo, PR). O conteúdo de sais minerais e vitaminas na ração hiperlipídica são aproximadamente iguais aos da ração padrão.

Os experimentos deste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA-IB-UNICAMP) sob protocolo n°. 2712-1.

Tabela 1. Composição das rações, normal e hiperlipídica, administradas aos animais Ctr e dHL, respectivamente, comparando a quantidade de lipídios administrada nas duas rações.

Componentes	Ração padrão (%)	Ração Hiperlipídica (%)
<i>Proteínas</i>	22,0	20,0
<i>Carboidratos</i>	53,0	50,0
<i>Lipídios</i>	4,5	21,0
<i>*Outros</i>	20,5	8,0
<i>Kcal/g</i>	2,9	4,7

*Fibras, vitaminas e sais minerais.

4.2. Caracterização metabólica dos animais.

Para diagnosticar o quadro pré-diabético nos animais do grupo experimental (animais dHL), os animais foram submetidos à medidas de caráter metabólico como peso corpóreo, medida de glicemia (jejum e pós-prandial), insulinemia (no estado alimentado) e ITT (teste de tolerância à insulina). Os animais de ambos os grupos foram pesados em dois momentos: quando entraram em dieta e antes de serem sacrificados (Ctr: n=49 e dHL: n=41). No mesmo momento da pesagem, foi realizada também a medida de glicemia nos animais em jejum por 12h (Ctr: n=11 e dHL: n=11), ou pós-prandial (Ctr: n=29 e dHL: n=26), a partir de amostras de sangue da cauda dos animais de ambos os grupos, com o auxílio de um glicosímetro (*Accu-Check Advantage, Roche Diagnostic*).

O ITT, que fornece dados sobre a resistência periférica à insulina, foi realizado através de injeção intraperitoneal de insulina (0,50 U/kg de peso corporal de insulina humana, Biohulin[®]R, Biobrás) em animais alimentados (Pappan *et al.*, 2005). A glicemia, foi medida com o auxílio do glicosímetro antes da injeção de insulina e em diferentes intervalos de tempo (15min, 30min, 60min) após a injeção (n=6/grupo). A pesagem dos animais e coleta de sangue para as análises descritas acima foram feitas no período das 8h às 10h da manhã.

A medida de insulinemia no estado alimentado foi feita por meio de alíquotas de sangue dos vasos cervicais obtido dos animais no momento do sacrifício, após decapitação. As amostras de sangue coletadas foram acondicionadas em microtubos heparinizados (1,5 mL) e centrifugadas (a 4°C na velocidade de 12.000 rpm por 15min), para que houvesse a separação do plasma (sobrenadante). O plasma coletado foi mantido a -20°C até o momento da dosagem da concentração de insulina com o Kit Elisa para insulina (*Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA KIT, Crystal Chem Inc., USA*), segundo protocolo do fabricante. As amostras de sangue foram coletadas no período das 8h às 10h da manhã para evitar a interferência de qualquer fator ambiental sobre o animal.

4.3. Processamento histológico de pâncreas para Imunohistoquímica e Imunofluorescência.

Foram coletados pâncreas de camundongos dos animais dHL e Ctr após completos 60 dias e fixados em paraformaldeído 4% (PFA 4%) durante 16h. Após fixados, os tecidos foram desidratados através de imersão em uma bateria de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes (Álcool 50%, 70%, 85%, 90% e 100%). A graduação nas concentrações é imprescindível para que ocorra a desidratação homogênea, evitando que ocorra danos na estrutura tecidual. Em seguida, os tecidos foram tratados com xilol, agente clarificante que retira todo o álcool presente no tecido permitindo a penetração da parafina. A inclusão foi realizada por imersão do material em parafina líquida a 60°C por 2h. A partir do bloco de parafina, obteve-se secções seriadas de 7 µm, com auxílio do Micrótomo, até esgotamento total do material processado.

4.3.1. Imunofluorescência.

Cortes de pâncreas de camundongo incluídos em parafina foram incubados em Tampão Citrato 100x Dewaxing & Target Retrieval, pH 6,0 (Spring Bioscience®), em panela de pressão por 30s a 125°C, 1min a 90°C, conforme descrito pelo fornecedor, cuja função é desparafinizar, reidratar e realizar a exposição do epítipo (determinante antigênico). Em seguida, os cortes foram lavados em tampão PBS 0,1M (do inglês *phosphate buffered saline*), e submetidos ao tratamento com Triton 0,5% para permeabilizar o material. Após mais algumas lavagens com PBS 0,1M, foi feito o bloqueio de epítipos inespecíficos com solução de Triton (0,2%), Glicina (0,3%) e BSA (3%) (do inglês *Bovine Serum Albumin*) em PBS.

O material foi então incubado com anticorpo primário Anti-NR2F2 por 1h30min à temperatura ambiente (TA), sendo lavado em PBS 0,1M antes e depois da incubação. Depois de lavado, o material foi tratado com o anticorpo secundário Anti-rabbit Alexa 488 por 1h à TA.

Após a finalização das incubações com os devidos anticorpos, as lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem Vectashield (Vector) e fotografadas em

microscópio Confocal LSM780 – NLO (Infabric-Unicamp). As concentrações, bem como os fabricantes dos anticorpos utilizados estão listados na tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos anticorpos utilizados para a detecção de Coup-TFII através das técnicas de imunofluorescência e imunohistoquímica.

Anticorpo	Nº. Catálogo	Fabricante	Diluição	Técnica
Anti-NR2F2	ab64849	Abcam	1:100	IF / IHQ
Alexa Fluor [®] 488 Goat Anti- Rabbit IgG	A11008	Invitrogen	1:300	IF
Anti-NR2F2	LS-C80261	LSBio	1:500	WB
Anti-rabbit IgG HRP Conjugated	A0545	Sigma	1:1000	WB
Anti- β -actina	A2228	Sigma	1:2000	WB
Anti-mouse IgG HRP Conjugated	A9044	Sigma	1:2500	WB

4.3.2. *Imunohistoquímica.*

Cortes de pâncreas de camundongo incluídos em parafina foram incubados em Tampão Citrato 100x Dewaxing & Target Retrieval, pH 6,0 (Spring Bioscience[®]), conforme descrito pelo fornecedor. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS 1X e submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio em solução de metanol (1:100). Após algumas lavagens com PBS 0,1M, foi feito o bloqueio de epítomos inespecíficos com solução de 1% de BSA por 30min.

O material foi então incubado com anticorpo primário anti-NR2F2 listado na tabela 2, por 40min à TA, sendo lavado em PBS 0,1M antes e depois da incubação. Depois de lavado, o material foi tratado com o kit de amplificação de sinal *N-Histofine – Mouse Stain MAX PO (Nichirei)*, conforme descrito pelo fornecedor.

Após algumas lavagens com PBS 0,1M, a revelação foi feita com DAB (*DAB substrate system* (Spring)), incubando o material por 8min à TA.

As lâminas foram montadas permanentemente através da desidratação por uma série alcoólica crescente (70%, 80%, 95%, e 100%), com álcool/xilol (1:1), e duas lavagens seguintes com xilol 100%, finalizando-se a montagem com Entellan[®] New. As

imagens foram capturadas em microscópio óptico *Leica*[®] DM 2500, pela câmera de vídeo digital *Leica* DFC 300FX com auxílio do software *Image Pro-Plus*[®].

4.4. Isolamento de ilhotas.

Para o isolamento de ilhotas, foram injetados no pâncreas 3 mL de solução de Colagenase tipo V (EC 3.4.24.3, Sigma), diluída em solução tampão Hanks pH 7,4 à concentração de 0,8 mg/mL (composição Hanks: NaCl 136 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂.2H₂O 1,2 mM, MgSO₄.7H₂O 0,81 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, Na₂HPO₄ 0,34 mM, NaHCO₃ 4,2 mM pH 7,4, suplementada com 5,6 mM de glicose e 1 mg/mL de albumina). Logo após, o pâncreas foi coletado e incubado a 37°C por 9min. A suspensão de ilhotas foi lavada três vezes com solução de Hanks para remoção da colagenase. Após a separação com Histopaque 1077 (Sigma), as ilhotas pancreáticas foram coletadas individualmente sob lupa para serem utilizadas nos ensaios *Western Blotting* e PCR quantitativo.

4.5. Western Blotting.

A detecção do conteúdo proteico de Coup-TFII em ilhotas pancreáticas foi feito através da técnica de WB, conhecida também como ensaio imunoenzimático, que consiste basicamente na identificação de proteínas específicas em amostras separadas electroforeticamente. Ao final do processo de isolamento por digestão enzimática (descrito no item 4.4.), as ilhotas pancreáticas (n=300 ilhotas obtidas de 2 animais/grupo) foram transferidas para microtubos (1,5 mL) contendo 100 µL de tampão de extração RIPA (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4; EDTA 5 mM; NaCl 150 mM; Triton X-100 1%; deoxicolato de sódio 1%; SDS 0,1%; aprotinina 1% e Na₃VO₄ 0,1 mM), 1 µL de PMSF (do inglês *phenylmethanesulfonyl fluoride*) e 1 µL de coquetel inibidor de protease (Sigma) e sonicadas por 10s. Os homogeneizados foram guardados a -20°C até sua utilização. A identificação proteica foi feita por espectrofotometria, usando-se o kit de ensaio de proteína da Bio-Rad. Alíquotas contendo 50 µg do homogeneizado foram incubadas a 37°C por 1h em 30% do volume de 5X Tampão de Laemmli (1X Tampão: 50

mM Tris-HCl, 2% de SDS, 10% de β -mercaptoetanol, 10% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol) e, então, aplicadas em gel de 8 ou 10% de SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese e transferidas eletroforeticamente para membrana de nitrocelulose.

Após coloração reversível com solução de Ponceau S da Bio-Rad, para verificação do perfil proteico e controle da massa proteica aplicada nas linhas do gel, a membrana foi bloqueada com 5% de BSA por 1h à TA. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário Anti-NR2F2 (Tabela 2) diluído em BSA 1%. Após lavagem do anticorpo primário, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase (Anti-rabbit IgG HRP Conjugated) demonstrado na tabela 2. As bandas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência (kit Super Signal-PIERCE) utilizando filme para auto-radiografia. As membranas foram reincubadas com anticorpo primário anti- β -actina (Tabela 2) utilizado como controle interno da reação e secundário específico (Anti-mouse IgG HRP Conjugated) listado na tabela 2. A densidade das bandas foi analisada pelo software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) e normalizada em relação à densidade da banda de β -actina. Ao todo foram utilizadas 4 membranas de 4 experimentos independentes.

4.6. Extração de RNA total e síntese de cDNA.

As ilhotas pancreáticas foram isoladas como descrito no item 4.4. e o RNA total foi extraído utilizando-se o kit RNAqueous®-Micro Kit (Ambion®), segundo o protocolo do fabricante. Em situações onde houve a necessidade de armazenar ilhotas para posterior extração, armazenou-se as amostras em solução de RNAlater® (Ambion®) a -20°C. Para a determinação da concentração e da pureza do RNA foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 UV-Vis (Nanodrop Technologies), a partir da absorbância a 260 nm, e razões 280/260 nm e 260/230 nm, respectivamente. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5X.

Para comparar a expressão gênica dos genes de interesse em ilhotas de camundongo do grupo dHL com o grupo Ctr, foi realizada a síntese de cDNA utilizando o kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas), a partir de

amostras de RNA total especificadas acima. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 0,5 µg de RNA total, acrescido de 1 µL de Primer Oligo-(dT)₁₈ (100uM) e quantidade suficiente de H₂O tratada com DEPC para um volume final de 12 µL. Tal mistura foi submetida à desnaturação por 5min a 65°C. Após este período de incubação, foram acrescentados à mistura 4 µL de Tampão de Reação (5X), 1 µL de dNTP (10mM), 1 µL de Inibidor de RNase Ribolok (20 U/µL) e 1 µL de RivertAid H Minus Transcriptase Reversa (200 U/µL). As amostras foram incubadas novamente por 1h a 42°C e 5min a 70°C e o cDNA originado foi quantificado por espectrofotometria no Nanodrop, como descrito anteriormente, e sua integridade foi analisada por gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5X.

4.7. Desenho de primers específicos para ensaios de qPCR.

Os *primers* específicos utilizados neste trabalho foram desenhados com o auxílio da ferramenta Primer Blast do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) com base no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e confeccionados comercialmente (Exxtend, Paulínia/SP). Os *primers* foram desenhados de forma a produzirem *amplicons* menores que 200 pb, pois acima deste tamanho a eficiência da reação de qPCR pode ser prejudicada (Cosseau *et al.*, 2009). Os *primers* sintetizados foram selecionados e analisados pela ausência de formação de dímeros, cross-dímeros, *harpins*, com temperatura de anelamento em torno de 60°C, e conteúdo de GC entre 50-55%. Foram desenhados *primers* específicos para *Coup-TFII*, *TV1*, *TV2*, *Ins 1*, *Ins 2*, *Ctnnb1*, *Actb*, *GapdH*, *CycA* e *Rps29*, cujas sequências estão mostradas abaixo na Tabela 3.

Tabela 3. *Primers* específicos utilizados nos experimentos de qPCR, desenhados através do Primer Blast (NCBI).

<i>Gene</i>	<i>Nº. de acesso</i>	<i>Sequência do Primer (5' – 3')</i>	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	<i>Forward</i>	GTGGATCAGCAAGCAGGAGT
		<i>Reverse</i>	AGGGTGTAACACGCAGCTCA

<i>Rps29</i>	NM_009093.2	<i>Forward</i>	GGGCGTCTGAAGGCAAGATGGG
		<i>Reverse</i>	TTGGAGCAGACGCGGCAAGAG
<i>GapdH</i>	NM_008084.2	<i>Forward</i>	AAGGGCTCATGACCACAGTC
		<i>Reverse</i>	CAGGGATGATGTTCTGGGCA
<i>CycA</i>	NM_008907.1	<i>Forward</i>	CCCACCGTGTTCTTCGACAT
		<i>Reverse</i>	CCAGTGCTCAGAGCTCGAAA
<i>Coup-TFII</i>	NM_009697.3	<i>Forward</i>	GTGTGCTTTGGAAGAGTACGTTA
	NM_183261.3	<i>Reverse</i>	CAATTGCTCTATGACTGAGGAGG
<i>Tv1</i>	NM_009697.3	<i>Forward</i>	CACCCTCGCACACACAAAAG
		<i>Reverse</i>	CACGTGCTGACTACCATTGC
<i>Tv2</i>	NM_183261.3	<i>Forward</i>	GCTCCAGCCTCCGACTAAAC
		<i>Reverse</i>	ACCTTGTTTGGGGCTGGAAA
<i>Insulina 1</i>	NM_008386.3	<i>Forward</i>	ATGGGCCAAACAGCAAAGTC
		<i>Reverse</i>	TCACTAAGGGCTGGGGGTTA
<i>Insulina 2</i>	NM_001185083.1	<i>Forward</i>	GCAGAAGCGTGGCATTGTAG
	NM_008387.4	<i>Reverse</i>	TTCATTGCAGAGGGGTAGGC
	NM_001185084.1		
<i>Ctnnb1</i>	NM_007614.3	<i>Forward</i>	CGCGTCAGCTCGTGTCTCTGTG
		<i>Reverse</i>	CTTCAGGTACCCTCAGGCCCGC

4.7.1. Teste dos primers por RT-PCR

Os *primers* confeccionados para os ensaios de qPCR foram primeiramente testados quanto à especificidade de amplificação, através de reações de PCR tradicionais, utilizando cDNA confeccionado a partir de amostras de RNA total extraídas de ilhotas de camundongos do grupo Ctr.

A reação de PCR foi realizada com o kit *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Thermo Scientific) contendo 2 µL de Tampão de Reação (10X), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de MgCl₂ (mM), 0,5 µL de *Primer Forward* (senso) e *Reverse* (antisenso) (10

μM), 1 μL de cDNA (diluído 10x a partir do RNA total), 0,2 μL de Taq DNA polimerase (5U/ μL) e 13,3 μL de H_2O tratada com DEPC. As reações foram incubadas no termociclador para uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5min, após esta etapa, por 40 ciclos de 95°C por 1min, 60°C por 45s e 72°C por 1min, seguido de uma etapa final de extensão a 72°C por 10min. O resultado obtido na reação de PCR foi checado após aplicação das amostras em gel de agarose 2% em tampão de corrida TAE 0,5X.

4.8. Análise de expressão gênica relativa por qPCR

A técnica de *qPCR* ou PCR quantitativo em Tempo Real, que consiste na quantificação absoluta ou relativa de produtos de PCR específicos, foi empregada para comparar o perfil de expressão dos genes de interesse nos diferentes tratamentos analisados. Essa técnica consiste basicamente no monitoramento do aumento da fluorescência ao longo da progressão dos ciclos de PCR, permitindo a quantificação do transcrito alvo presente na amostra no momento em que a fluorescência captada pelo equipamento atinge um limiar de detecção, antigamente chamado de *threshold cycle* (Ct), e mais recentemente nomeado de *quantification cycle* (Cq) (Bustin *et al.*, 2009). Este número de Cq fornecido pelo equipamento é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito de interesse na reação. Portanto, quanto menor o valor de Cq, maior a expressão do gene alvo (Schmittgen & Livak *et al.*, 2008). O método escolhido para a análise da expressão gênica relativa neste trabalho foi o método SYBR Green, que consiste em moléculas de corante fluorescentes que se ligam a toda fita dupla de DNA. Conforme a reação avança nos ciclos da PCR, mais cópias do transcrito alvo são geradas, e conseqüentemente mais moléculas do corante são adicionadas à fita dupla formada até que a fluorescência seja detectada (quantificada) ao atingir o Cq.

A técnica de qPCR gera um resultado relativo a partir da comparação com os níveis de expressão de genes constitutivamente expressos (gene de referência), onde diferentes condições experimentais não alteram sua expressão (Schmittgen & Zakrajsek *et al.*, 2000).

4.8.1. *Eficiência de amplificação dos primers.*

A eficiência de amplificação (E) de cada um dos pares de *primers* foi determinada por meio da confecção de uma curva padrão de cinco pontos, gerada a partir de reações em duplicatas de *qPCR* nas quais foram utilizados diluições seriadas (1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625) de cDNA confeccionados como descrito previamente no item 4.6, de animais Ctr. A eficiência da amplificação (E) para cada gene utilizado neste trabalho foi estimada por quantificação absoluta, obtida pela equação $E = 10^{(-1/slope)}$ (Ramakers *et al.*, 2003), onde o *slope* corresponde ao valor da inclinação da curva em regressão linear (Figura 3). Estes cálculos foram gerados pelo software StepOnePlus™ v2.3 (Applied Biosystems®). Eficiências com valores entre 90% e 110% ($-3.6 > slope > -3.1$) foram consideradas como ideais e utilizadas como 100% para os cálculos de expressão relativa.

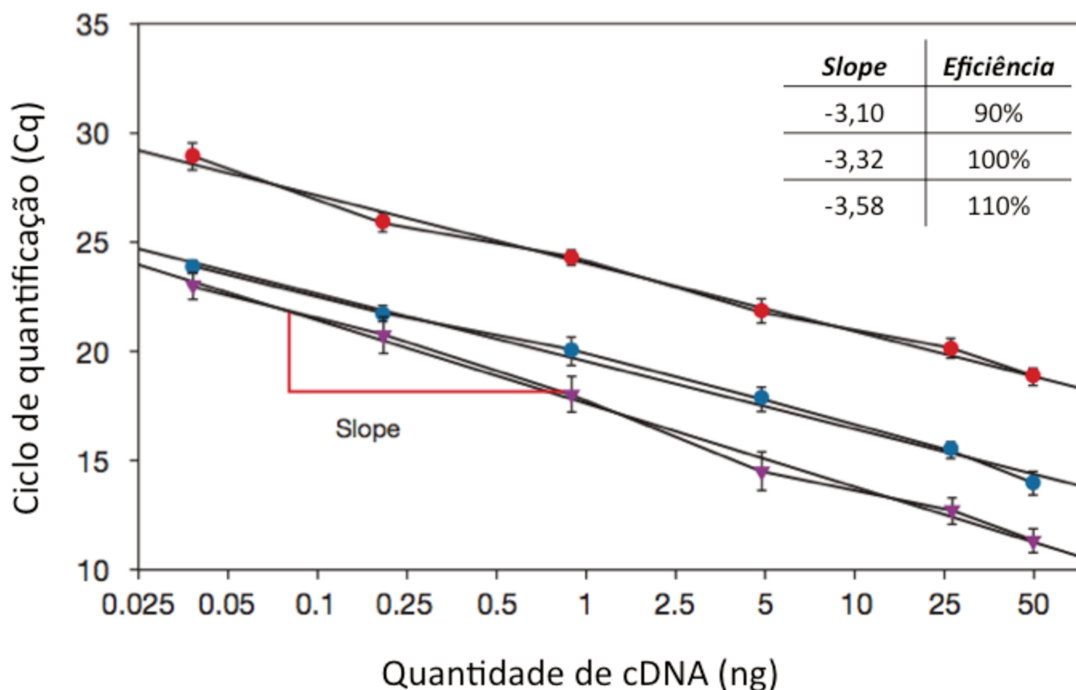


Figura 3. Figura representativa de diferentes valores de E de diferentes alvos. Alvos com eficiências similares, entre 90% e 110%, que podem ser comparados nos ensaios de expressão gênica relativa. Figura adaptada de *Real-Time PCR: From theory to practice*. 2008 © Invitrogen Corporation, disponível em www.invitrogen.com.

4.8.2. Escolha do gene de referência

Para dar início aos ensaios de expressão gênica e eliminar possíveis erros relatados pela comum prática do uso de apenas um gene de referência, foram testados quatro genes de referência comumente utilizados: *Actb*, *Rps29*, *GapdH* e *CycA*. Estes genes foram testados em 4 pools de cDNA de cada grupo (Ctr e dHL), confeccionados a partir de 4 experimentos independentes. Os Cts dos genes candidatos foram analisados pelo programa *BestKeeper*, que consiste em uma planilha de excel que calcula o gene mais estável nos diferentes tratamentos (Pfaffl *et al.*, 2004). O programa *BestKeeper* baseia-se no coeficiente de variação do número Ct (CV [% Ct]) e no desvio padrão (SD) das médias geométricas (MG) do número Ct para estimar a estabilidade de expressão dos genes analisados. Além de calcular a MG, o CV e o SD de cada gene, o programa estima as relações entre todos os genes de referência. Essa relação é feita através de numerosas análises de correlação, criando um coeficiente de correlação de Pearson (r), entre cada par de gene analisado. Em estatística, o valor de r , mede o grau de correlação entre duas variáveis e pode assumir valores entre 1 e -1. Quanto mais próximo de 1 ou -1 for o valor de r , significa que há uma correlação positiva perfeita (próximo de 1) ou negativa perfeita (próximo de -1). Se o valor de r for próximo de 0, significa que as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra. De acordo com o programa *Bestkeeper*, quanto maior o r (mais próximo de 1 ou -1) e menor o desvio padrão do gene, maior a estabilidade de expressão, o que aumenta a chance deste gene ser selecionado como controle endógeno (Pfaffl *et al.*, 2004). O programa também calcula o valor de p , ou seja, a probabilidade deste evento ocorrer ao acaso.

A aplicação do *BestKeeper* e as informações sobre o processamento de dados e manuseio podem ser acessados em <http://www.wzw.tum.de/genequantification/bestkeeper.html>.

4.8.3. Ensaio de expressão gênica relativa por qPCR

As reações de qPCR foram realizadas com 100 ng de cDNA de ilhotas de camundongos Ctr e dHL, sintetizado conforme descrito anteriormente. As reações foram

feitas em triplicatas no equipamento *StepOnePlus™ Real Time PCR System* (Applied Biosystems®) com o kit *KAPA™ SYBR® FAST Universal qPCR 2X (Master Mix)*, contendo *Platinum® Taq DNA Polymerase*, *SYBR® Green I dye*, *Tris-HCl*, *KCl*, *6 mM MgCl₂*, *400 μM dCTP*, *800 μM dUTP*, *uracil DNA glicosilase (UDG)* e estabilizadores. Para um volume final de *10 μL* de reação foram adicionados *5 μL* de *SYBR® Green Master Mix*, *0,25 μL* de *primer forward (10μM)*, *0,25 μL* de *primer reverse (10μM)* e *3,5 μL* de *H₂O* tratada com DEPC. As reações foram então adicionadas em placas ópticas *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0.1 mL)* (Applied Biosystems®). Uma vez preparadas as reações, foram submetidas às seguintes condições de ciclagem: uma etapa inicial de desnaturação a *95°C* por *10min*, *40* ciclos de *95°C* por *1min*, *60°C* por *15s* e *72°C* por *20s*, seguido de uma etapa final para a construção da curva de *melting* de *72°C* por *20s*, *60°C* por *1min* e *95°C* por *15s*. A inclusão da curva de *melting* é essencial para verificar se houve formação de um único produto (único pico gerado no gráfico) ou se produtos inespecíficos também foram formados.

A quantidade relativa (QR) foi calculada utilizando-se o método de Ct comparativo $\Delta\Delta Ct$ (Livak & Schmittgen, 2001), seguindo a seguinte fórmula,

$$QR = E^{-\Delta\Delta Ct}$$

onde E corresponde à eficiência da reação, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratamento}} - \Delta Ct_{\text{referência}}$ (Livak & Schmittgen *et al.*, 2001) e $\Delta Ct = Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{controle endógeno}}$.

Para as análises de expressão gênica relativa valores de Ct maiores que 0,5 ciclo entre as duplicatas foram excluídas das análises.

4.9. Análise Estatística

As análises para determinar a significância estatísticas entre os dois grupos experimentais para a caracterização metabólica, o perfil proteico e transcricional por WB e qPCR, respectivamente, foram realizadas com auxílio do software *GraphPad Prism Version 6.00 for Mac (GraphPad Software, USA)*. A significância foi determinada usando-se o teste t de *Student* bicaudal, todos com um nível de significância $\leq 0,05$.



5. Resultados

I. Os animais dHL desenvolvem características metabólicas de camundongos pré-diabéticos.

Para determinar um possível envolvimento do gene *Coup-TFII* na homeostase glicêmica de animais pré-diabéticos, foi realizada a avaliação metabólica de animais dHL. Estes animais apresentam um aumento significativo ($P < 0,0001$) do ganho de peso corporal em relação ao grupo controle, tratado com ração com teor normal de lipídios (Fig. 4a). A análise do ITT mostrou uma menor redução ($P < 0,001$) da glicose sanguínea em animais alimentados com dHL comparados com animais controles, indicando que a resposta tecidual periférica à insulina injetada foi menor nos animais tratados (Fig. 4b). Isto pode ser visto também na figura 4c, que mostra a área sobre a curva (ASC) calculada a partir do decaimento da glicemia obtida com o ITT. Além disso, os animais tratados mostraram níveis significativamente maiores ($P < 0,0001$) de glicose no sangue, tanto em jejum por 12h (Fig. 4d), quanto no estado alimentado (pós-prandial) (Fig. 4e, $P < 0,0001$), e maiores níveis de insulina plasmática (Fig. 4f, $P < 0,001$), quando comparados ao grupo controle. Juntos, esses resultados mostram que os animais tratados com dHL por 60 dias desenvolveram alterações metabólicas características da fase inicial da T2DM, ou pré-diabetes, como sobrepeso, resistência à insulina, hiperglicemia moderada e hiperinsulinemia.

De agora em diante, para que a leitura se torne mais clara, será denominado “animal dHL” os animais tratados com dHL por 60 dias, que apresentam um quadro pré-diabético, ao passo que os animais tratados pelo mesmo período por ração normal serão denominados “animais Ctr”.

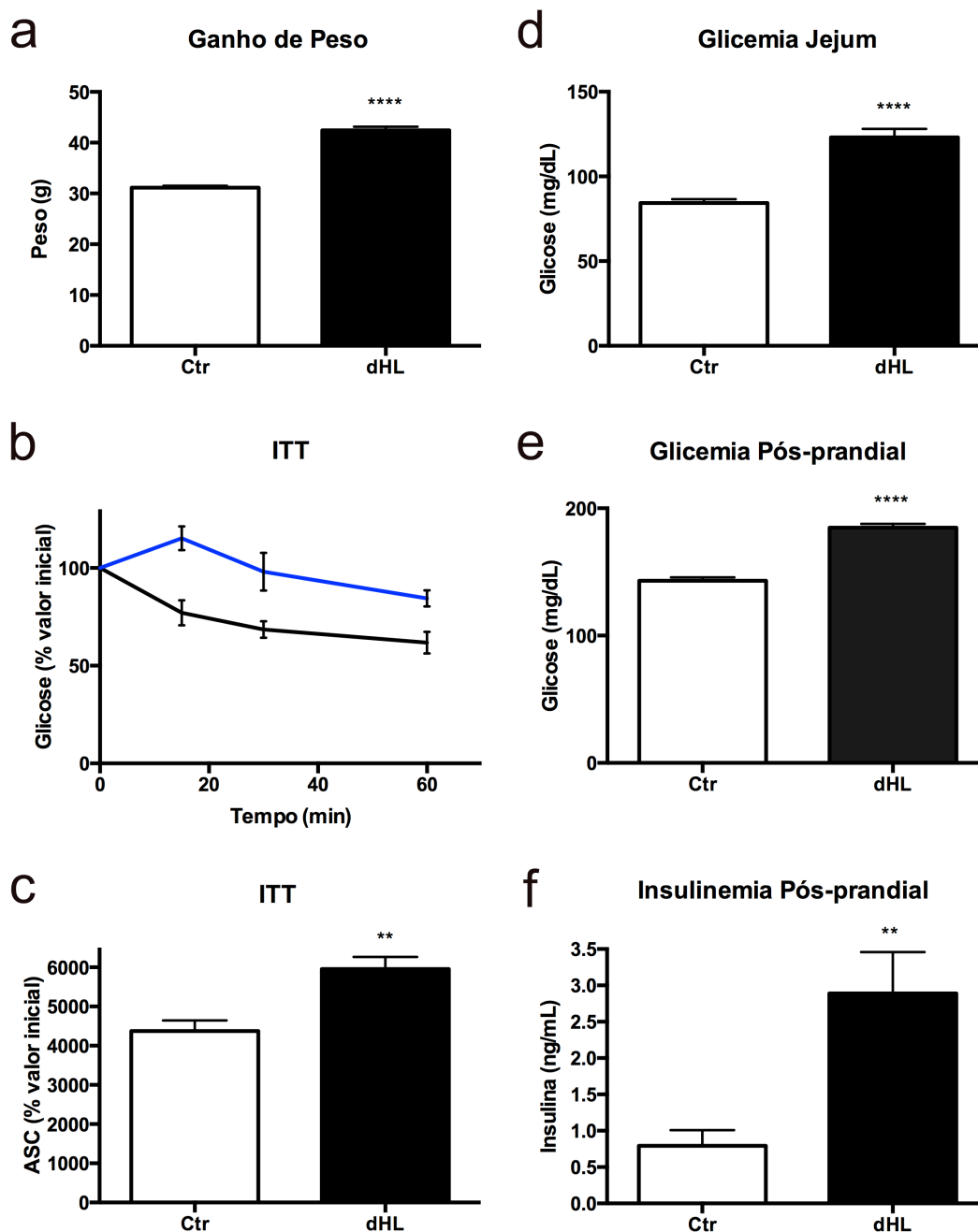


Figura 4. Alterações metabólicas características de pré-diabetes são observadas em camundongos machos C57BL/6 submetidos à dHL por 60 dias. (a) Ganho de peso expresso em gramas dos animais Ctrl e dHL após 60 dias da administração de dieta hiperlipídica. (b) Teste de tolerância à insulina (ITT) realizado através da medida da glicemia ao longo do tempo dos animais Ctrl (preto) e dHL (azul) em jejum por 12h (água *ad libitum*) após a aplicação de insulina (0,50 U/kg). (c) Área sobre a curva da curva glicêmica obtida através do ITT. (d) Aumento da glicemia em jejum dos animais dHL em relação ao Ctrl após tratamento com dHL por 60 dias (e) Aumento da glicemia pós-prandial dos animais dHL em relação ao Ctrl. (f) Hiperinsulinemia observada nos animais dHL comparados com Ctrl. Os valores foram expressos como média \pm SEM. $**P < 0,001$ e $****P < 0,0001$ em relação ao grupo Ctrl (*teste t de Student*).

II. Animais pré-diabéticos apresentam uma redução de Coup-TFII, aumento da expressão de insulina e nenhuma alteração da expressão de b-catenina.

Para se determinar o padrão de expressão dos genes utilizados neste trabalho, foram desenhados *primers* específicos para amplificação de regiões entre diferentes exons. Estes *primers* foram então testados a partir de cDNA de amostras de animais Ctr resultando na amplificação de fragmentos únicos com tamanho molecular similar ao esperado para os genes *GapdH* (90 pb), *Actb* (94 pb), *Rsp29* (96 pb), *CycA* (115 pb), *Coup-TFII* (118 pb), *TV1* (108 pb), *TV2* (118 pb), *Ins1* (90 pb), *Ins2* (111 pb) e *Ctnnb1* (141 pb) (Fig. 5).

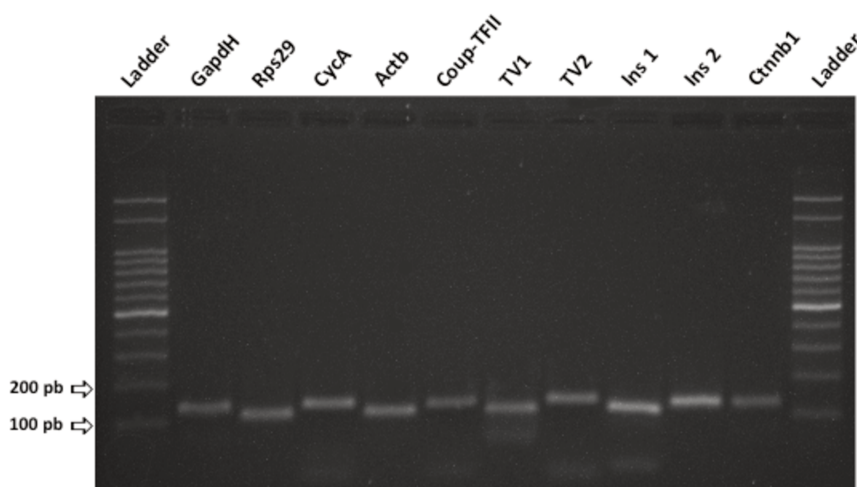


Figura 5. Verificação da amplificação dos fragmentos por RT-PCR revelam a presença dos transcritos para os genes em estudo. Eletroforese em gel de agarose 2% com marcador de peso molecular *Ladder* de 100pb (Fermentas), *GapdH* (90 pb), *Rsp29* (96 pb), *CycA* (115 pb), *Actb* (94 pb), *Coup-TFII* (118 pb), *TV1* (108 pb), *TV2* (118 pb), *Ins 1* (90 pb), *Ins 2* (111 pb) e *Ctnnb1* (141 pb).

Teste de eficiência de amplificação e especificidade dos *primers* por qPCR.

A eficiência global da reação de qPCR depende das eficiências individuais de amplificação de cada gene a ser comparado. Esta eficiência é medida a partir da inclinação da reta dos valores obtidos pela curva padrão (vide Materiais e métodos), onde 100% de eficiência significa a duplicação perfeita do molde de interesse a cada ciclo da PCR. De acordo com a literatura, são consideradas satisfatórias reações com eficiência compreendidas entre 90 e 110% (*Real-Time PCR: From theory to practice*. 2008 ©

Invitrogen). Para os *primers* analisados, foram obtidos valores de E entre 90% e 110% listados abaixo na tabela 4.

Tabela 4. Valores de eficiência da reação e *slope* dos genes utilizados nos ensaios de qPCR.

Gene	Slope	Eficiência
<i>Actb</i>	-3,356	98,6 %
<i>Rps29</i>	-3,378	97,7 %
<i>GapdH</i>	-3,278	101,8 %
<i>CycA</i>	-3,365	98,2 %
<i>Coup-TFII</i>	-3,194	105,6 %
<i>TV1</i>	-3,202	105, 2%
<i>TV2</i>	-3,219	101,5 %
<i>Ins 1</i>	-3,265	102,5 %
<i>Ins 2</i>	-3,39	97,2 %
<i>Ctnnb1</i>	-3,326	99,8 %

Para o teste de especificidade dos *primers*, foi realizada uma etapa adicional de dissociação dos *amplicons* para a geração de uma curva de *melting*, que visa detectar a presença de possíveis bandas inespecíficas e/ou dímeros de *primers*. A curva de *melting* é obtida através de aumentos sucessivos da temperatura na reação de qPCR, até se perder o sinal da fluorescência devido à desnaturação do DNA. O decaimento da fluorescência em função do aumento da temperatura é plotado em um gráfico que fornece subsídios para avaliar a especificidade do par de *primer*.

A figura 6 mostra os gráficos com as curvas de *melting* para cada um dos genes analisados, onde a presença de apenas um pico nas curvas confirma a especificidade de amplificação dos *primers* utilizados no qPCR.

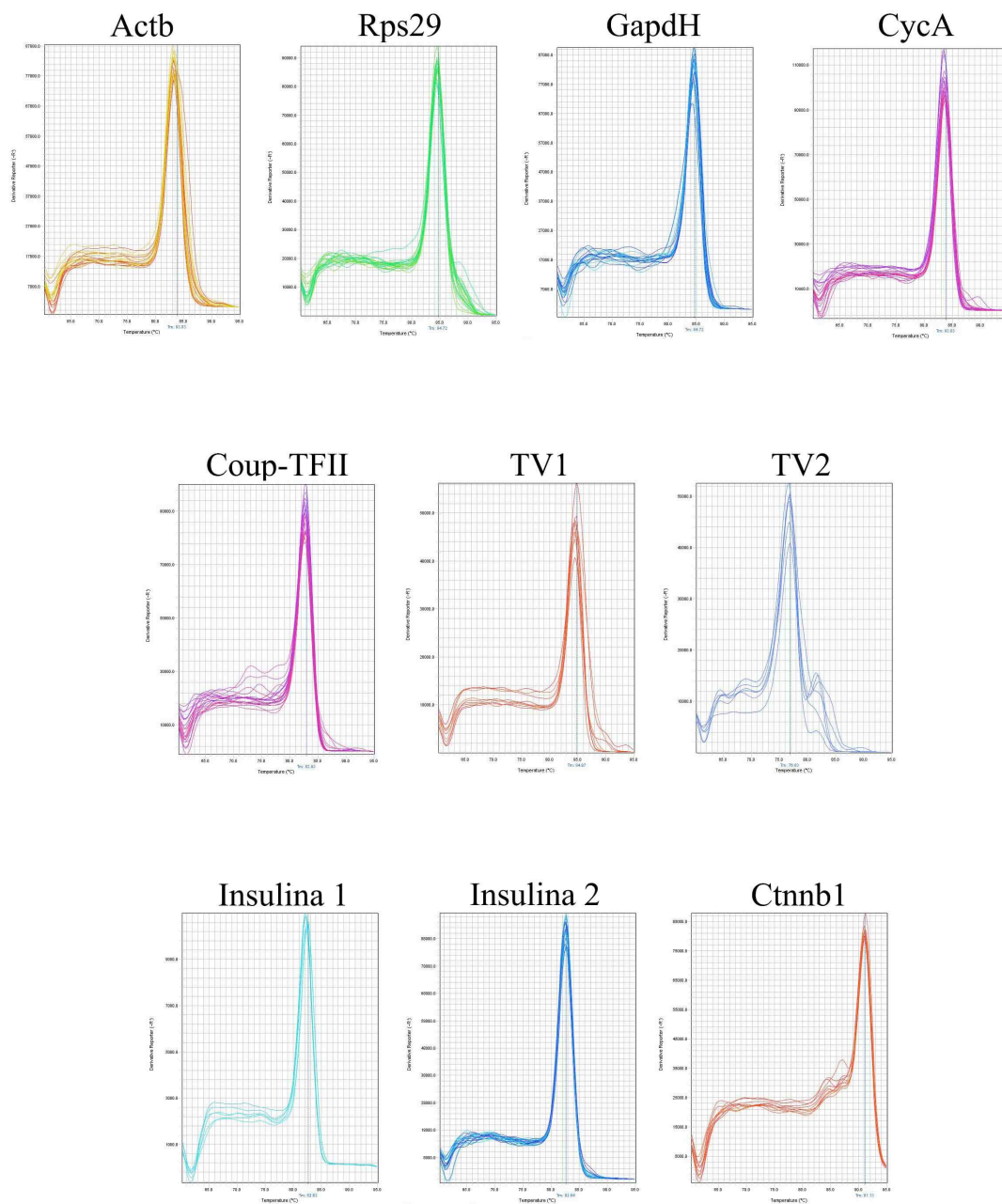


Figura 6. Verificação da especificidade de amplificação dos *primers* revelam a presença de transcritos específicos para os genes em estudo. Curva de *melting* para os genes *Actb*, *Rps29*, *GapdH*, *CycA*, *CoupTF-II*, *TV1*, *TV2*, *Ins 1*, *Ins 2* e *Ctnnb1* gerado a partir do decaimento da fluorescência captada pelo equipamento durante o aumento progressivo da temperatura.

Determinação do gene de referência pelo software *BestKeeper*.

Uma vez validada a eficiência de reação e a especificidade dos *primers* para todos os genes, seguiu-se com a determinação do melhor gene de referência a ser utilizado neste estudo. Para isto, foi utilizado o software *Bestkeeper* que determina a estabilidade da expressão gênica, através do valor de r para todos os genes, baseado em três variáveis: SD, CV e MG (Pfaffl *et al.*, 2004).

Inicialmente, foram obtidos valores de Ct para quatro genes candidatos a genes de referência (*Actb*, *GapdH*, *CycA* e *Rps29*) pelo ensaio de qPCR para os grupos Ctr e dHL. Estes valores foram então inseridos no programa *BestKeeper*, obtendo-se inicialmente os valores de MG, DP e CV (Tabela 5). De acordo com os dados estatísticos gerados pelo *Bestkeeper*, os quatro genes analisados possuem baixo coeficiente de variação ($0,73 > CV < 1,93$) e baixo valor de desvio padrão, sendo todos menores que 1 (Tabela 5).

Tabela 5. Variação da média geométrica, SD e CV dos Cts de cada gene de referência gerados pelo programa *Bestkeeper*.

Gene	Média geométrica (Cts)	Desvio padrão (\pm Ct)	Coefficiente de variação (% Ct)
<i>Actb</i>	22,69	0,17	0,73
<i>Rps29</i>	22,89	0,28	1,21
<i>GapdH</i>	23,05	0,33	1,42
<i>CycA</i>	23,96	0,46	1,93

Além disso, foram obtidas as relações, aos pares, entre todos os genes de referência, onde foi notado que, de todas as análises, apenas a relação entre os genes *Rps29* e *CycA* tem alto valor de r (Tabela 6, $P=0,002$), ou seja há entre eles uma alta capacidade de serem correlacionados.

Tabela 6. Repetidas análises de correlação aos pares dos genes candidatos a controle interno das reações de qPCR evidenciando a alta correlação entre *Rps29* e *CycA*.

vs.	Actb	Rps29	GapdH	CycA
Rps29	-0,187	-	-	-
valor de p	0,685	-	-	-
GapdH	0,304	0,447	-	-
valor de p	0,509	0,314	-	-
CycA	-0,351	0,942	0,439	-
valor de p	0,439	0,002	0,325	-

Após esta análise aos pares, todos os valores de r são combinados em um índice, e a correlação entre cada gene e o índice é calculada, gerando valores absolutos de r , como indicados na tabela 7. Esta análise revelou que o gene *Actb* possui baixo valor de r , enquanto os genes *Rps29*, *GapdH* e *CycA* possuem altos valores de correlação. Embora o gene *Actb* tenha um baixo SD, este resultado de r nos permite excluí-lo das análises como possível controle endógeno para as reações de qPCR. Levando em consideração os valores de r dos genes *Rps29*, *GapdH* e *CycA*, o gene *Rps29* foi o que obteve maior valor de r quando comparado aos outros dois genes. Isso o permitiu ser selecionado para o uso como gene de referência nas análises de expressão gênica relativa.

Tabela 7. Coeficientes de correlação combinados dos genes candidatos a controle interno das reações de qPCR demonstrando a alta correlação entre os genes *Rps29*, *GapdH* e *CycA*.

BestKeeper vs.	Actb	Rps29	GapdH	CycA
Coef. de corr. (r)	0,088	0,882	0,800	0,857
valor de p	0,849	0,009	0,031	0,014

Análise de expressão gênica

A expressão de *Coup-TFII* foi analisada por qPCR em ilhotas pancreáticas de animais dHL e Ctr e os valores obtidos foram comparados entre si. Foi observado que os níveis de RNAm de *Coup-TFII* diminuíram significativamente (Fig. 7, $P < 0,001$), cerca de 41%, nos animais dHL. O mesmo resultado foi visto para os variantes de transcritos

TV1 (Fig. 7, $P < 0,0001$) e *TV2* (Fig. 7, $P < 0,001$), que reduziram cerca de 40% e 46%, respectivamente, nos animais dHL em comparação com os Ctr (Fig. 7). Com o intuito de verificar se os baixos níveis de *Coup-TFII*, observado nos animais dHL, têm algum efeito na expressão de insulina, como verificado por Bardoux *et al.*, (2005) em camundongos heterozigotos para *Coup-TFII*, investigou-se também a expressão de *Ins 1* (Fig. 7, $P < 0,0001$) e *Ins 2* (Fig. 7, $P < 0,01$), notando-se um aumento de 29% e 42%, respectivamente, na expressão destes genes nos camundongos dHL em relação ao Ctr (Fig. 7). Sabendo que *Coup-TFII* é capaz de ativar a expressão de β -catenina (*Ctnnb1*), evento este relatado por Boutant *et al.*, (2012), foi analisada a expressão de *Ctnnb1* nos diferentes tratamentos e não se verificou nenhuma alteração significativa em seus nos animais dHL comparados aos Ctr (Fig. 7).

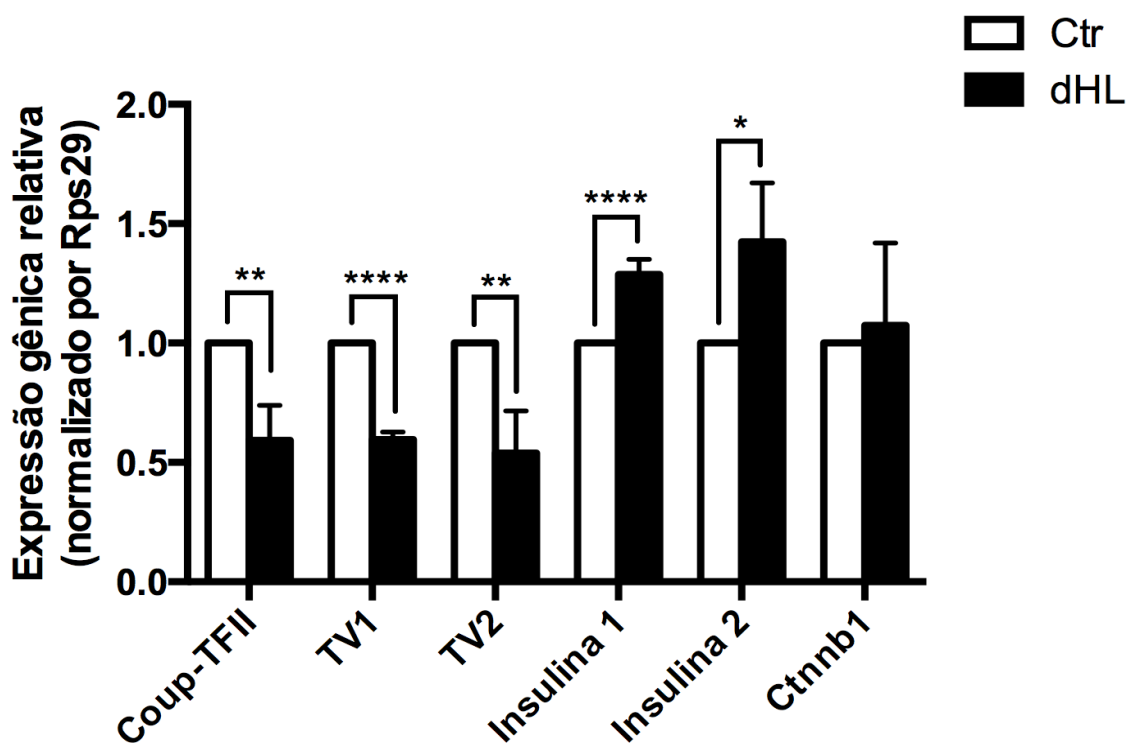


Figura 7. Estudo da expressão gênica em ilhotas de camundongos dHL revelam diminuição de transcritos de *Coup-TFII*, aumento de insulina e nenhuma alteração de *Ctnnb1*. Análise da expressão gênica por qPCR para os genes *CoupTF-II*, *TV1*, *TV2*, *Ins 1*, *Ins 2* e *Ctnnb1*, normalizados por *Rps29*. Os valores foram expressos como média \pm SEM. * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$ em relação ao grupo Ctr (*teste t de Student*).

III. Animais pré-diabéticos apresentam um aumento do conteúdo proteico de Coup-TFII.

Considerando as alterações metabólicas identificadas nos animais dHL, o próximo passo foi analisar a expressão de Coup-TFII em pâncreas destes animais por IF. Os resultados indicam um aumento aparente da intensidade da marcação de Coup-TFII nas ilhotas pancreáticas do grupo dHL em relação ao grupo Ctr (Fig. 8). Tanto no grupo Ctr quanto nos animais dHL, a marcação para Coup-TFII pode ser observada no citoplasma e no núcleo das células (Fig. 8f,1). Entretanto, em animais dHL nota-se uma marcação mais evidente no núcleo da maioria das células presentes na ilhota pancreática (Fig. 8l). Este aumento da expressão de Coup-TFII na ilhota pancreática dos animais dHL em relação ao Ctr foi confirmado através da técnica de imunohistoquímica com marcação com DAB (Fig. 9).

Este aumento de Coup-TFII foi então quantificado através da análise dos extratos proteicos das ilhotas dos dois grupos por WB (Fig. 10). Analisando somente o perfil proteico através das imagens dos géis nota-se um aumento da proteína de Coup-TFII em animais dHL em comparação com os Ctr, aumento este confirmado pela normalização com a proteína β -actina (Fig. 10a). A quantificação do extrato proteico, feita através da medida da densidade óptica das bandas de Coup-TFII, normalizadas pela medida da densidade óptica da β -actina, nos diferentes grupos, revelou um aumento significativo ($P < 0,1593$) de Coup-TFII no grupo dHL em relação ao grupo Ctr (Fig. 10b).

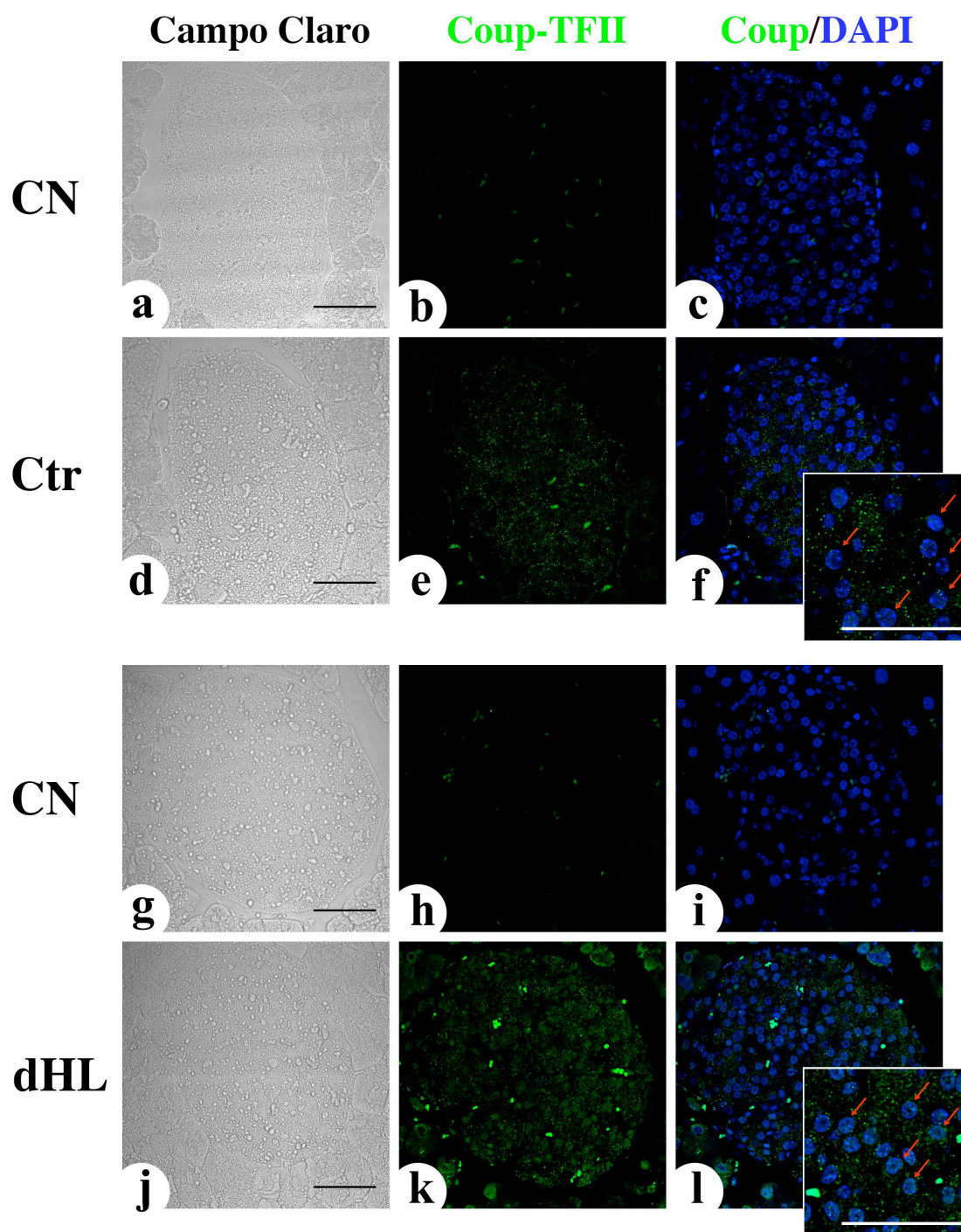


Figura 8. Imunofluorescência para Coup-TFII em pâncreas de camundongos dHL revelam aparente aumento na sua expressão em relação ao Ctr. *a-l*: Imagens obtidas por microscópio confocal de ilhotas de camundongos Ctr (*a-f*) e dHL (*g-l*). (*b, e, h, k*) Imunofluorescência para Coup-TFII (verde). (*c, f, i, l*) Dupla marcação de Coup-TFII (verde) e DAPI (azul). (*a - c, g - i*) Controle negativo da reação (CN). Setas vermelhas nos detalhes das figuras *f* e *l* demonstrando núcleos não expressando Coup-TFII nos animais Ctr e expressando Coup-TFII nos animais dHL. Barra = 50 μ m.

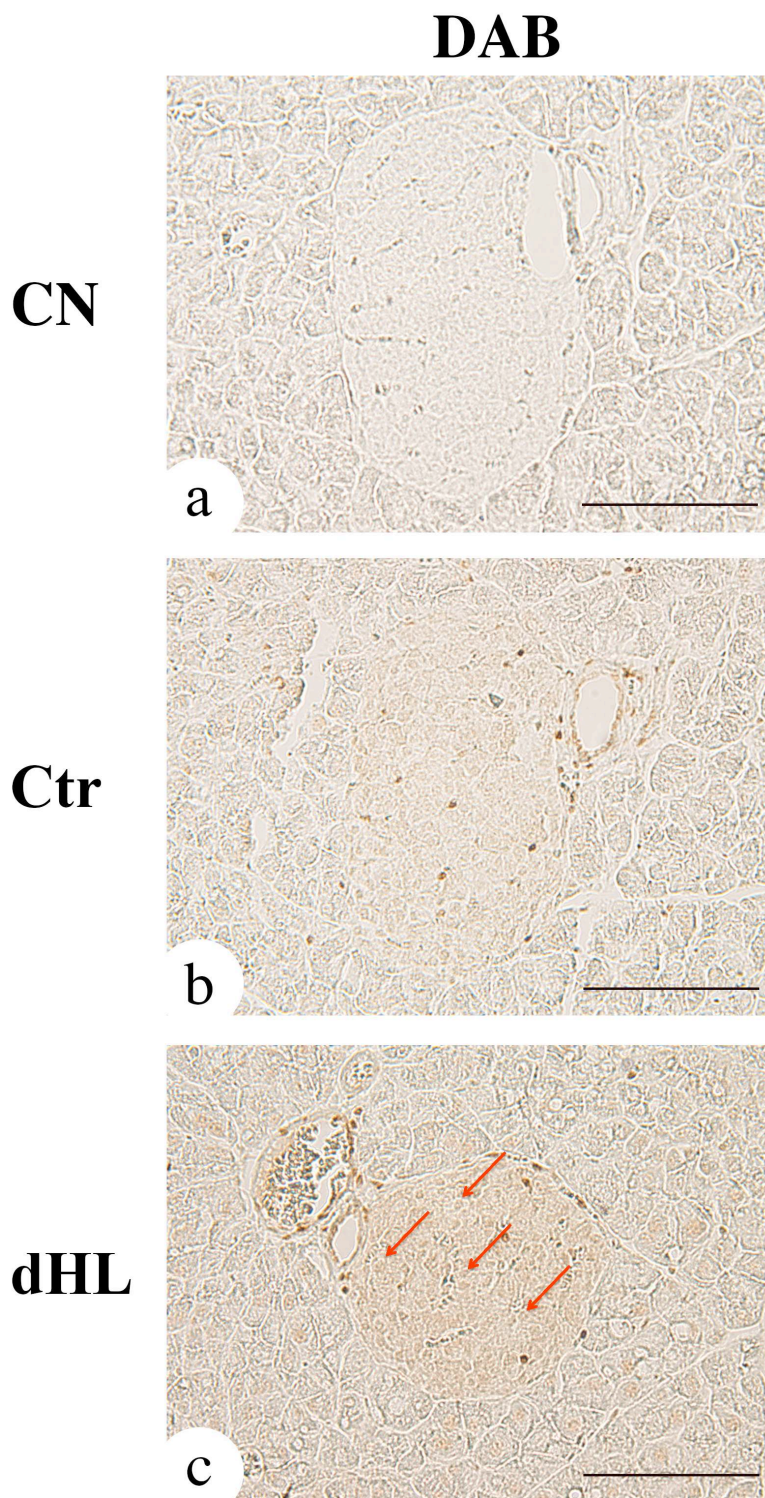


Figura 9. Expressão de Coup-TFII em pâncreas de camundongos por imunohistoquímica revela aparente aumento nos animais dHL comparados aos Ctr. (a) Controle negativo da reação (CN). Imunohistoquímica para Coup-TFII em pâncreas de camundongos Ctr (b) e dHL (c). Setas vermelhas na figura c indicando a presença de Coup-TFII no núcleo das células. Barra = 100 μ m

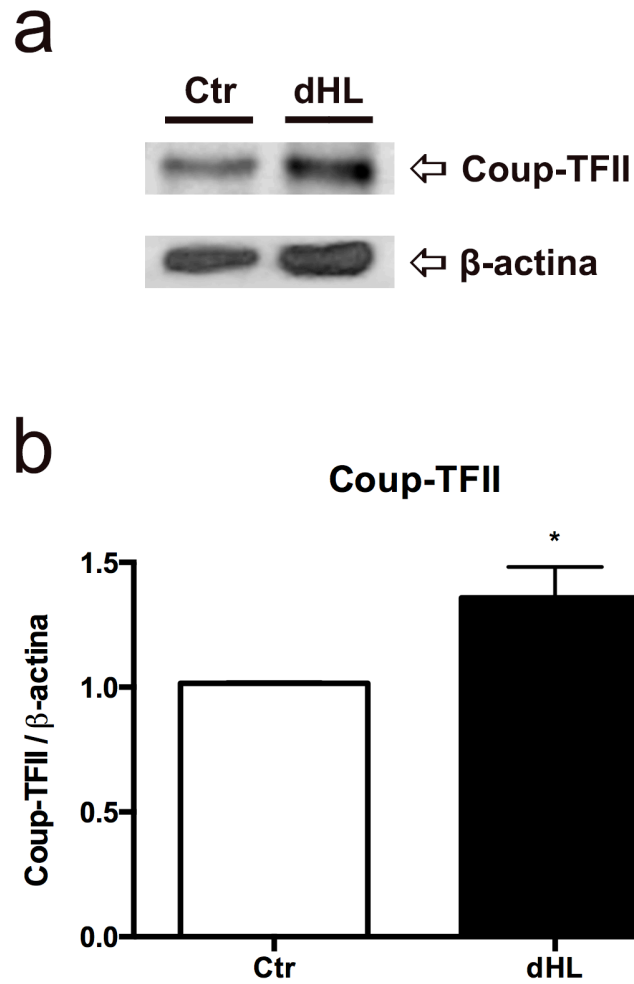


Figura 10. Quantificação proteica de Coup-TFII por WB revelou aumento significativo na sua expressão em ilhotas de camundongos dHL em relação aos Ctr. (a) Perfil proteico de Coup-TFII em gel de poli-acrilamida com β -actina como controle endógeno, nos animais Ctr e dHL. (b) Gráfico demonstrando o aumento significativo de Coup-TFII em ilhotas de camundongos dHL em relação aos Ctr. O gráfico representa os valores de densidade óptica das bandas de Coup-TFII, correspondente a 4 membranas de 4 experimentos independentes, normalizados pelos valores da densidade óptica de β -actina. * $P=0,0327$



6. Discussão

O *Diabetes Mellitus* tipo 2 (T2DM) configura-se como uma das principais doenças do mundo moderno, e é caracterizada pelo comprometimento da homeostase glicêmica do organismo, resultante de uma combinação da redução da sensibilidade periférica à insulina e o comprometimento da função das células- β (Liew & Andrews, 2009). Estudos recentes sugerem que *Coup-TFII* possui um papel importante na homeostase glicêmica e no metabolismo energético (Boutant *et al.*, 2012). Apesar destes estudos apresentarem fortes indícios, ainda é desconhecido se *Coup-TFII* desempenharia este papel modulador da homeostase glicêmica e do metabolismo energético em indivíduos com T2DM. O objetivo deste trabalho foi investigar o padrão de expressão de *Coup-TFII* em camundongos apresentando um quadro característico da fase inicial da T2DM, a pré-diabetes.

Para isto, camundongos C57BL/6 foram expostos à dieta hiperlipídica (dHL) por 60 dias. Estudos demonstram que essa linhagem apresenta maior sensibilidade à dieta, possivelmente devido a uma pré-disposição genética (Surwit *et al.*, 1988). A exposição à dHL por um período de seis meses faz com que esses animais se tornem obesos (Surwit *et al.*, 1988), uma vez que o valor calórico da dHL (Tabela 1) é quase o dobro do valor calórico da ração normal (Tabela 1). A obesidade é uma doença crônica causada pelo desbalanço entre a energia ingerida nos alimentos e a energia gasta pelo organismo (Bray *et al.*, 2005). Além de estar relacionada à progressão de várias doenças, a obesidade tem sido apontada como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de T2DM (Bray *et al.*, 2003).

O primeiro passo desta pesquisa foi confirmar o quadro pré-diabético nos camundongos tratados com dHL por 60 dias. Este passo é fundamental para garantir a reprodutibilidade experimental, considerando que as alterações metabólicas monitoradas nestes animais podem ser influenciadas por fatores adversos, como o estresse, que poderiam acarretar problemas na alimentação inadequada destes animais.

Análises da medida de peso corporal confirmaram que os animais dHL tornaram-se obesos após 60 dias (Fig 4a). Como consequência da obesidade, são esperados níveis séricos aumentados de ácidos graxos livres juntamente com a liberação de determinados hormônios (particularmente de leptina, secretada pelos adipócitos), que perturbam a ação da insulina nos seus locais de ação, caracterizando o quadro de resistência periférica à

insulina (Cnop *et al.*, 2002). Análise de ITT nos animais dHL confirmou o quadro de resistência periférica, onde a injeção intraperitoneal de insulina nestes animais não foi capaz de reduzir os níveis de glicose no sangue, como ocorreu nos animais Ctr (Fig. 4b,c).

Esta alteração periférica torna os tecidos-alvo menos capazes de incorporar glicose, resultando em um acúmulo de glicose no sangue (Cnop *et al.*, 2002; Bray *et al.*, 2003; Kahn *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2011). Este aumento do conteúdo de glicose no sangue foi observado nos animais dHL através da medida de glicemia em jejum e pós prandial (Fig. 4d,e). No quadro pré-diabético, este acúmulo de glicose circulante sinaliza ao pâncreas endócrino para aumentar a secreção de insulina (Cnop *et al.*, 2002; Kahn *et al.*, 2006; Cerf *et al.*, 2013). Este aumento da secreção de insulina é temporário, uma vez que a persistência do quadro hiperglicêmico, o agravamento do quadro de resistência à insulina e o acúmulo de ácidos graxos na circulação em decorrência da obesidade, geram um quadro de glicolipotoxicidade, que afeta negativamente a secreção de insulina pelas células- β em resposta à glicose (Kahn *et al.*, 2006).

Como uma forma de compensar a ineficiência metabólica gerada pelo quadro de resistência periférica, o pâncreas endócrino, mais especificamente as células- β , passa por um processo de hiperplasia compensatória, no qual há um aumento significativo do número de células- β (Tarabra *et al.*, 2012).

Carvalho *et al.* (2012) demonstraram que após 60 dias de dieta dHL, os animais dHL possuem secreção basal (2,8mM de glicose) de insulina aumentada, mas uma baixa secreção de insulina estimulada por glicose (16,8mM de glicose), característica do quadro de secreção de insulina prejudicada pelas alterações metabólicas do quadro pré-diabético.

Uma vez comprovadas as alterações metabólicas características do quadro pré-diabético nos animais dHL, o padrão de expressão de *Coup-TFII* foi então analisado em diferentes técnicas de detecção. Perilhou e colaboradores (2008) demonstraram que animais alimentados agudamente (por 18h) com dieta hipercalórica (72,2% de carboidrato, 1% de lipídio, 26,8% de proteína), com alterações metabólicas similares às descritas para os animais dHL, apresentaram uma alteração na expressão gênica de *Coup-TFII*. Diante do aumento da insulina plasmática, hiperglicemia e baixa secreção de insulina estimulada por glicose, estes camundongos apresentaram baixos níveis de *Coup-*

TFII no pâncreas e no fígado (Perilhó *et al.*, 2008). No presente trabalho, os resultados de expressão gênica por qPCR demonstraram que o nível transcricional de *Coup-TFII* foi 41% menor nos animais dHL comparado aos animais Ctr (Fig. 7). De acordo com Perilhó *et al.* (2008), o gene da insulina é capaz de reprimir a expressão de *Coup-TFII* via repressão direta de *FOXO1*, que é um ativador de *Coup-TFII*. Além da hiperinsulinemia observada nos animais dHL, a análise de expressão gênica por qPCR demonstrou que ambos genes codificantes da insulina, *Ins1* e *Ins2*, mostraram-se elevados (29% e 42% respectivamente) nos animais dHL (Fig. 7).

Interessantemente, embora haja uma queda da expressão de *Coup-TFII* demonstrada nos resultados de qPCR, a análise do conteúdo proteico de *Coup-TFII* revelou um aumento de 33,6% nos animais dHL comparados aos Ctr. Este resultado foi também confirmado pelas técnicas de IF (Fig. 8), IHQ (Fig. 9) e WB (Fig. 10). Uma possível explicação para este fenômeno consiste na recente descoberta de que *Coup-TFII* possui um papel fundamental na proliferação celular das células- β durante o desenvolvimento do pâncreas endócrino, atuando como um fator de transcrição na ativação do gene da β -catenina e demais genes alvo da via Wnt canônica (Boutant *et al.*, 2012). Em experimentos de superexpressão e silenciamento de *Coup-TFII* em cultura de células- β , Boutant e colaboradores (2012) verificaram que a retirada de *Coup-TFII* afetou diretamente a expressão de β -catenina e seus genes alvo, como *Ciclina D1/D2* e *C-myc*, inibindo o processo de proliferação das células- β e afetando, conseqüentemente, o desenvolvimento pancreático.

Assim como na fase proliferativa do pâncreas endócrino ao longo do desenvolvimento embrionário, durante a pré-diabetes, o pâncreas endócrino sofre hiperplasia compensatória, onde células- β se proliferam para suprir a necessidade hormonal de insulina do sistema. Em trabalho recente do grupo da Profa. Dra. Carla Collares-Buzato, demonstrou-se que, assim como no desenvolvimento embrionário, a via Wnt/ β -catenina encontra-se ativa nas ilhotas hiperplásicas, podendo assim estar envolvida no processo de hiperplasia compensatória das células- β observado nos animais dHL (Maschio, 2014). Embora o padrão de expressão de *Ctnnb1* não esteja significativamente alterado nos animais dHL (Fig. 7 e Maschio, 2014), Maschio (2014) demonstrou que a forma ativa de β -catenina e a expressão dos genes alvo da via Wnt canônica, *ciclina*

D1/D2 e *c-Myc*, encontram-se aumentadas nos animais dHL (Maschio, 2014). Este aumento dos genes alvo da via Wnt canônica pode estar relacionado ao aumento da proteína de Coup-TFII observado nos animais dHL (Fig. 10). Se for confirmado o papel essencial de Coup-TFII também durante a hiperplasia compensatória nos animais dHL, o aumento proteico observado nestes animais seria então necessário para este processo. Portanto, enquanto a hiperinsulinemia e as demais alterações metabólicas nos animais dHL resultam na repressão da transcrição de *Coup-TFII*, a sinalização necessária para que a proliferação das células- β ocorra e possibilite a hiperplasia compensatória do pâncreas endócrino nestes animais depende da presença da proteína de Coup-TFII.

Interessantemente, esta relação inversa entre o conteúdo proteico e a taxa transcricional de *Coup-TFII* pode ser parcialmente explicada por um mecanismo de autoregulação negativa, demonstrado em linhagens de células- β por Perilhou *et al.*, (2008), onde a superexpressão de Coup-TFII fez com que os níveis de Coup-TFII endógenos (produzidos pela célula) diminuíssem em cerca de 30%. Além disso, análises por ChIP (do inglês *chromatin immunoprecipitation*), método para identificar interações de proteínas com o DNA, em linhagens de células- β , revelaram que Coup-TFII é capaz de ocupar o sítio promotor do seu próprio gene, reprimindo-o (Perilhou *et al.*, 2008).

Portanto, a hipótese postulada indica que, o aumento proteico observado nos animais dHL seria necessário para a ativação da proliferação das células- β durante a hiperplasia compensatória, mas, uma vez elevado, o nível proteico de Coup-TFII inibiria, juntamente com a insulina, a transcrição do seu próprio gene. Uma forma de testar a hipótese de autoregulação negativa de Coup-TFII em células- β dos animais dHL seria inibir a função proteica sem alterar a expressão gênica, por exemplo através do tratamento das células- β de animais dHL com anticorpos específicos para Coup-TFII, observando-se o efeito da inibição da proteína sobre a taxa transcricional de Coup-TFII. Alternativamente, a expressão do transcrito endógeno de Coup-TFII poderia ser monitorada em células- β de animais dHL induzidas a superexpressarem Coup-TFII.

Um outro fenômeno de controle da expressão de Coup-TFII recentemente revelado é a formação de variantes de transcritos por este gene observada em linhagens celulares humanas (Yamazaki *et al.*, 2013). O variante de transcrito denominado *TV2*, que é codificado sem o domínio de ligação ao DNA (Fig. 2), atua como um dominante negativo

na função do transcrito principal do gene, *TV1*. Portanto, é possível que a redução dos níveis transcricionais de *Coup-TFII* observada nos animais dHL (Fig. 7) seja um resultado do desbalanço entre a transcrição dos variantes de transcrito de *Coup-TFII*. Para endereçar esta pergunta, a expressão dos dois variantes de transcrito (*TV1* e *TV2*) foi analisada por qPCR, e os resultados indicaram que ambos transcritos apresentaram uma redução de 40% e 46%, respectivamente, nos animais dHL quando comparados aos Ctr (Fig. 7). Estes resultados eliminam a hipótese de que a transcrição de *Coup-TFII* esteja sendo inibida pelo aumento da transcrição do *TV2*. Entretanto, ainda é possível que, através de interações com co-reguladores diferencialmente expressos entre os animais dHL e Ctr, a presença da proteína codificada pelo gene *TV2* nos animais dHL, mesmo não estando em maiores níveis do que nos animais Ctr, esteja participando da repressão da transcrição de *Coup-TFII* nestes animais. Como os anticorpos utilizados neste trabalho para identificar a proteína Coup-TFII reconhecem somente a sua versão completa (*TV1*), não foi possível monitorar o conteúdo proteico da proteína *TV2* nestes diferentes contextos celulares. Um próximo passo poderia ser a confecção de um anticorpo que reconheça somente a proteína *TV2*, para avaliar se seu padrão de expressão em ilhotas, varia entre animais dHL e Ctr, e se esta variação poderia explicar as alterações de expressão de Coup-TFII nos animais dHL.

De qualquer modo, ainda é um mistério o mecanismo que possibilite um aumento de cerca de 33% do conteúdo proteico em células com taxa transcricional 41% menor do que nos animais Ctr. O mecanismo de autoregulação negativa de Coup-TFII descrito por Perillou *et al.*, (2008) poderia explicar parcialmente este efeito, caso contrário a expressão de Coup-TFII ocorreria em um ou mais ciclos. Sendo assim, a ativação da expressão de *Coup-TFII*, com consequente produção proteica, reduziriam seu níveis transcricionais, que voltariam a se elevar conforme a proteína fosse sendo degradada.

Diante deste fenômeno, especula-se que haja a participação de regulações pós-transcricionais e/ou pós-traducionais de Coup-TFII, que resultariam neste aumento do conteúdo proteico em situações de redução da transcrição. Um exemplo de regulação pós-transcricional seria um mecanismo ativado pela sinalização de ativação da hiperplasia compensatória, e que permitiria um aumento da taxa de tradução de Coup-TFII durante este processo. Um exemplo de regulação pós-traducional seria uma

modificação proteica, que resultaria na estabilização da proteína de Coup-TFII na célula, aumentando assim sua meia vida mesmo em condições reduzidas de transcrição do seu gene codificante. Um exemplo deste fenômeno foi descrito por Zhao e colaboradores (2011) para o fator de transcrição FOXO1, onde foi observado um aumento significativo da meia vida deste fator como resultado de modificações pós-traducionais, como acetilações, metilações e fosforilações.

Em suma, neste trabalho foi testada a hipótese de que Coup-TFII estaria envolvido na regulação da homeostase glicêmica e do metabolismo energético em camundongos obesos, apresentando alterações metabólicas características do quadro pré-diabético. Os resultados de expressão gênica para *Coup-TFII* obtidos neste trabalho confirmam uma possível relação mutuamente negativa entre a expressão de *Coup-TFII* e a expressão/secreção de insulina pelas células- β , associada ao quadro de resistência periférica. Interessantemente, o quadro pré-diabético conta com uma condição tecidual inexistente nos trabalhos prévios citados acima, i.e., a hiperplasia compensatória através da proliferação celular de células- β . Neste caso, apesar das alterações metabólicas demonstradas na literatura e observadas neste trabalho afetarem negativamente a expressão de *Coup-TFII* nas ilhotas pancreáticas, o processo de hiperplasia compensatória ocorrendo neste tecido demandaria quantidades elevadas da proteína de Coup-TFII como um possível ativador da via Wnt/ β -catenina durante este processo. Corroborando com esta hipótese, a análise do conteúdo proteico de Coup-TFII nas ilhotas dos animais dHL revelou um aumento de 33,6%. Apesar de inesperado, este resultado pode explicar a dualidade funcional de Coup-TFII em indivíduos pré-diabéticos, onde sua expressão é reduzida em consequência da regulação negativa pela insulina, presente em altos níveis nestes animais, mas seu conteúdo proteico mantido, pela sua participação na hiperplasia compensatória. Por fim, esta diferença entre o conteúdo transcricional e proteico de Coup-TFII em animais pré-diabéticos pode estar sendo intensificada pela ação negativa que a proteína de Coup-TFII possui sob sua própria expressão em células- β (Perilhou *et al.*, 2008).



7. Conclusões

I. Os animais tratados com dHL neste trabalho apresentaram alterações metabólicas características de pré-diabetes, apresentando sobrepeso, resistência periférica à insulina, hiperglicemia moderada e hiperinsulinemia.

II. A análise da expressão gênica por qPCR revelou uma redução da quantidade de transcritos de *Coup-TFII* de 41%, em acordo com a relação negativa entre Coup-TFII e as alterações metabólicas observadas nos animais dHL e descrita na literatura. Esta diminuição da transcrição de *Coup-TFII* foi acompanhado por um aumento significativo da expressão dos dois genes da insulina (*Ins 1* e *Ins2*), sem alteração significativa da transcrição de *Ctnnb1*.

III. Em contraste com a redução da quantidade de transcritos, o conteúdo proteico de Coup-TFII apresentou-se 33% maior nos animais dHL. Este aumento do conteúdo proteico de Coup-TFII pode estar relacionado com um provável papel deste fator de transcrição na proliferação das células- β dependente da via Wnt/ β -catenina durante a hiperplasia compensatória, e com a autoregulação negativa de *Coup-TFII* já demonstrada em células- β . Portanto, altos níveis da proteína de Coup-TFII possibilitariam a hiperplasia das células- β , mas resultariam na redução da sua própria transcrição, já afetada pela hiperinsulinemia destes animais.



8. Referências Bibliográficas

- ACHARJEE, S., GHOSH, B., AL-DHUBIAB, B. E., & NAIR, A. B. (2013).** *Understanding type 1 diabetes: etiology and models.* Canadian journal of diabetes, 37(4), 269–76. doi:10.1016/j.jcjd.2013.05.001
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (2011).** *Diagnosis and classification of diabetes mellitus.* Diabetes Care 34 Suppl 1, S62-9.
- BARDOUX, P., ZHANG, P., FLAMEZ, D., PERILHOU, A., LAVIN, T. A., TANTI, J.-F., HELLEMANS, K., ET AL. (2005).** *Essential role of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II in insulin secretion and insulin sensitivity revealed by conditional gene knockout.* Diabetes, 54(5), 1357–63.
- BOJ, S., PARRIZAS, M., MAESTRO, M., FERRER, J. (2001).** *A transcription factor Regulatory circuit in differentiated pancreatic cells.* Proc Natl Acad Sc iUSA 98: 14481–14486.
- BOROWIAK, M., & MELTON, D. A. (2009).** *How to make beta cells? Current opinion in cell biology,* 21(6), 727–32. doi:10.1016/j.ceb.2009.08.006
- BOSCO, D., ARMANET, M., MOREL, P., NICLAUSS, N., SGROI, A., MULLER, Y. D., GIOVANNONI, L., ET AL. (2010).** *Unique Arrangement of alfa- and beta-Cells in Human Islets of Langerhans.* Diabetes 59(May). doi:10.2337/db09-1177.
- BOUTANT, M., RAMOS, O. H. P., TOUREL-CUZIN, C., MOVASSAT, J., ILIAS, A., VALLOIS, D., PLANCHAIS, J., ET AL. (2012).** *COUP-TFII controls mouse pancreatic β -cell mass through GLP-1- β -catenin signaling pathways.* PloS one, 7(1), e30847.
- BRAY, G. A. (2003).** *Risks of obesity.* Endocrinology & Metabolism Clinics of North America, 32(4), 787–804. doi:10.1016/S0889-8529(03)00067-7
- BUSTIN, S. A, BENES, V., GARSON, J. A, HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., ET AL. (2009).** *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.* Clinical chemistry, 55(4), 611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- CABRERA, O., BERMAN, D. M., KENYON, N. S., RICORDI, C., BERGGREN, P.-O., & CAICEDO, A. (2006).** *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(7), 2334–9. doi:10.1073/pnas.0510790103
- CARVALHO, C.P.F.; OLIVEIRA, R.B.; BRITAN, A.; BOSCHERO, A.C.; MEDA P., COLLARES-BUZATO, C.B. (2012)** *Impaired β to β cell coupling mediated by Cx36 gap junctions in pre-diabetic mice.* American Journal Physiology (Endocrinology).

- CERF, M. E. (2013).** *Beta cell dynamics: beta cell replenishment, beta cell compensation and diabetes.* Endocrine. doi:10.1007/s12020-013-9917-y.
- CNOP, M., LANDCHILD, M. J., VIDAL, J., ET AL. (2002).** *The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations distinct metabolic effects of two fat compartments.* DIABETES, VOL. 51, APRIL.
- COSSEAU, C.; AZZI, A.; SMITH, K.; FREITAG, M.; MITTA, G.; GRUNAU, C. (2009)** *Native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of Schistosoma mansoni: Critical experimental parameters.* Molecular and biochemical parasitology, v. 166(1), p. 70-6.
- GERICH, J. E. (1999).** *Is insulin resistance the principal cause of type 2 diabetes?* Diabetes, obesity & metabolism, 1(5), 257–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11225637>
- HANLEY, S. C., AUSTIN, E., ASSOULINE-THOMAS, B., KAPELUTO, J., BLAICHMAN, J., MOOSAVI, M., PETROPAVLOVSKAIA, M., ET AL. (2010).** *{beta}-Cell mass dynamics and islet cell plasticity in human type 2 diabetes.* Endocrinology, 151(4), 1462–72. doi:10.1210/en.2009-1277
- HWUNG, Y., CROWE, D. T., WANG, L., TSAI, S. Y., & TSAI, M. (1988).** *The COUP Transcription Factor Binds to an Upstream Promoter Element of the Rat Insulin II Gene,* 8(5), 2070–2077.
- KAHN, C. R. (2009).** *Diabetes mellitus.* 14^a edição. Artmed. Joslin Diabetes Center.
- KAHN, S. E., HULL, R. L., & UTZSCHNEIDER, K. M. (2006).** *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.* Nature, 444(7121), 840–6. doi:10.1038/nature05482
- LAEMMILI, U. K. (1970).** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227, 680 - 683.
- LIEW, C. G. AND ANDREWS, P. W. (2008).** *Stem cell therapy to treat diabetes mellitus.* Rev Diabet Stud 5, 203-19.
- LIN, F.-J., QIN, J., TANG, K., TSAI, S. Y., & TSAI, M.-J. (2011).** *Coup d'Etat: an orphan takes control.* Endocrine reviews, 32(3), 404–21. doi:10.1210/er.2010-0021
- LIVAK, K. J., & SCHMITTGEN, T. D. (2001).** *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods (San Diego, Calif.), 25(4), 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
- MASCHIO, D. A. (2014).** *"Possível ativação da via de sinalização da wnt/ β -catenina no processo de hiperplasia compensatória da célula beta pancreática em modelo*

animal de resistência periférica à insulina". Tese de mestrado. UNICAMP.

MURTAUGH, L. C. (2008). *The what, where, when and how of Wnt/ β -catenin signaling in pancreas development.* Organogenesis, 4(2), 81–6.

OLIVEIRA, R. B. (2011). “*Proliferação e disfunção da célula- β pancreática em modelo animal de diabetes melito tipo 2. Envolvimento da via de sinalização wnt/beta-catenina*”. Tese de mestrado. UNICAMP.

OLIVEIRA, R. B. (2011). “*Proliferação e disfunção da célula- β pancreática em modelo animal de diabetes melito tipo 2. Envolvimento da via de sinalização wnt/beta-catenina*”. Tese de mestrado. UNICAMP.

PAPPAN, K. L., PAN, Z., KWON, G., MARCHALL, C. A., COLEMAN, T., GOLDBERG, I. J., MCDANIEL, M. L., AND SEMENKOVICH, C. F. (2005). *Pancreatic β -Cell lipoprotein lipase independently regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion.* JBC Papers in Press, January 6, 2005, Vol. 280, n° 10.

PEREIRA, F. A., TSAI, M. J. AND TSAI, S. Y. (2000). *Review: Coup-TFII orphan nuclear receptors in development and differentiation.*

PERILHOU, A., TOURREL-CUZIN, C., KHARROUBI, I., HENIQUE, C., FAUVEAU, V., KITAMURA, T., MAGNAN, C., ET AL. (2008). *The transcription factor COUP-TFII is negatively regulated by insulin and glucose via Foxo1- and ChREBP-controlled pathways.* Molecular and cellular biology, 28(21), 6568–79. doi:10.1128/MCB.02211-07.

PERILHOU, A., TOURREL-CUZIN, C., ZHANG, P., KHARROUBI, I., WANG, H., FAUVEAU, V., SCOTT, D. K., ET AL. (2008). *The MODY1 gene for hepatocyte nuclear factor 4alpha and a feedback loop control COUP-TFII expression in pancreatic beta cells.* Molecular and cellular biology, 28(14), 4588–97. doi:10.1128/MCB.01191-07.

PFAFFL, M.W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C., NEUVIANS, T.P. (2004). *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations.* Biotechnology letters 26:509-515.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H. (2003). *Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data.* Neurosci. Lett., v.339, p.62-66,

SCHMITTGEN, T. E LIVAK, K. (2008). *Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method.* Nature Protocols, v. 3(6), p. 1101-1108.

SCHMITTGEN, T. E ZAKRASEK, B. (2000). *Effect of experimental treatment on*

housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. Journal of biochemical and biophysical methods, v. 46(1-2), p. 69-81, 2000.

- SONE, H. AND KAGAWA, Y. (2005).** *Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice.* Diabetologia 48, 58- 67.
- SURWIT, R. S., KUHN, C. M., COCHRANE, C., MCCBIN, J. A. AND FEINGLOS, M. N. (1988).** *Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice.* Diabetes 37, 1163-7.
- TARABRA, E., PELENGARIS, S., & KHAN, M. (2012).** *A simple matter of life and death-the trials of postnatal Beta-cell mass regulation.* International journal of endocrinology, 516718. doi:10.1155/2012/516718
- THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. (2003).** *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.* Diabetes Care. 26(Suppl.1):s5-20.
- WANNAMETHEE, S. G. & SHAPER, A. G.; (1999).** *Weight change and duration of overweight and obesity in the incidence of type 2 diabetes.* Diabetes Care 22, 1266–1272.
- WINZELL, M. S. AND AHRÉN, B. (2004).** *The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes.* Diabetes 53 Suppl 3, S215-9.
- YAMAZAKI, T., SUEHIRO, J., MIYAZAKI, H., MINAMI, T., KODAMA, T., MIYAZONO, K., & WATABE, T. (2013).** *The COUP-TFII variant lacking a DNA-binding domain inhibits the activation of the Cyp7a1 promoter through physical interaction with COUP-TFII.* The Biochemical journal, 452(2), 345–57. doi:10.1042/BJ20121200
- ZHANG, P., M. BENNOUN, C. GODARD, P. BOSSARD, I, LECLERC, A. KAHAN, AND M. VASSEUR-COGNET. (2002).** *Expression of COUP-TFII in metabolic tissues during development.* Mech Dev 119: 109–11.
- ZHAO, Y., WANG, Y., & ZHU, W.-G. (2011).** *Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions.* Journal of molecular cell biology, 3(5), 276–82. doi:10.1093/jmcb/mjr013

ANEXO 1

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada “Análise do padrão de expressão do receptor nuclear Coup-TFII em pâncreas de camundongos pré-diabéticos”:

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

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

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


(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 2712-1, Instituição: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (IB/UNICAMP).

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

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



Aluna: Leticia Helena Pinto Hernandez




Orientador: Prof. Dr. Henrique Marques-Souza

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de
Animais CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura