

# PROLIFERAÇÃO DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA EM MODELO ANIMAL DE RESISTÊNCIA PERIFÉRICA À INSULINA: ESTUDO DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/BETA-CATENINA

SANTOS, M. R.<sup>1</sup>; MASCHIO, D. A.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, R. B.<sup>1</sup>; CARVALHO, C. P. F.<sup>2</sup>; COLLARES-BUZATO, C. B.<sup>1</sup>

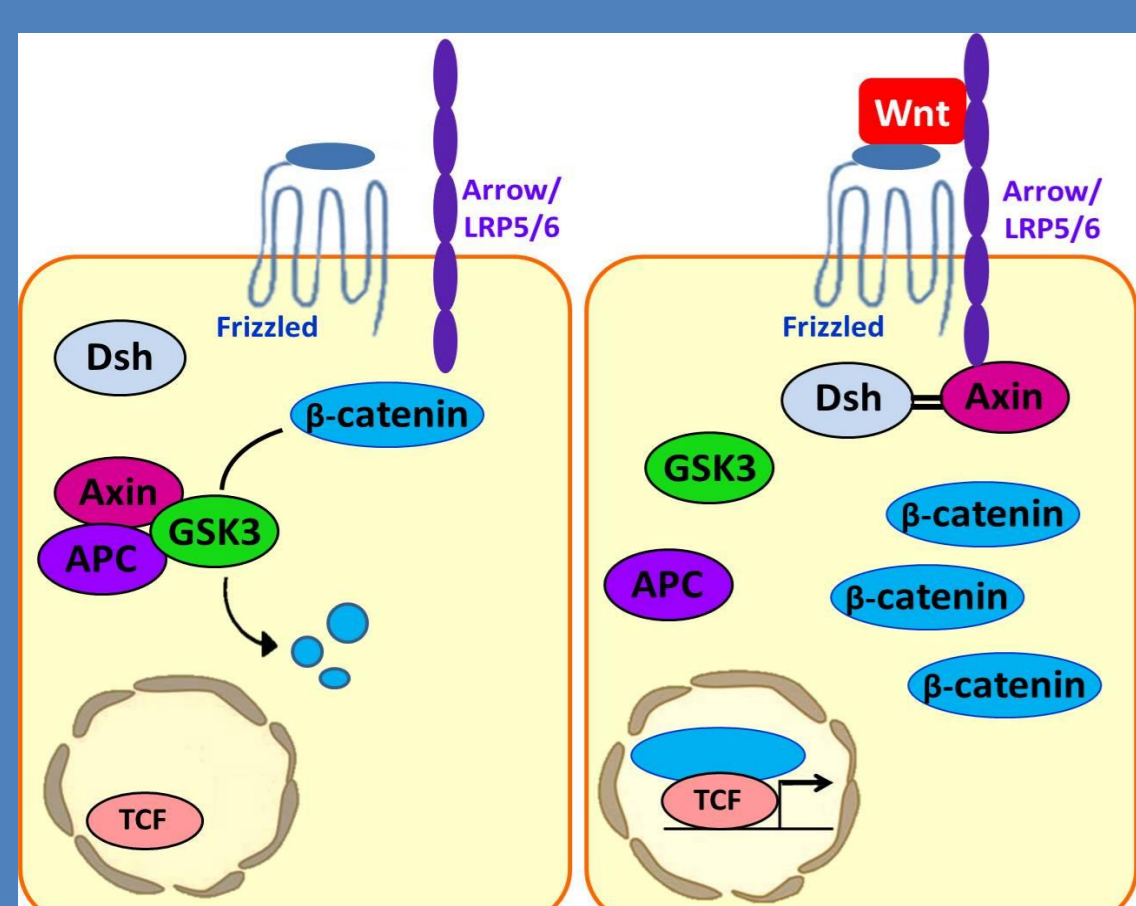
INSTITUTO DE BIOLOGIA, Departamento de Histologia e Embriologia, UNICAMP, Campinas, SP<sup>1</sup>

Instituto de Biociências, Unifesp, Santos, SP<sup>2</sup>

Palavras-Chave: Wnt/beta-catenina - Célula beta-pancreática - Proliferação celular

Apoio: PIBIC/CNPq e FAPESP

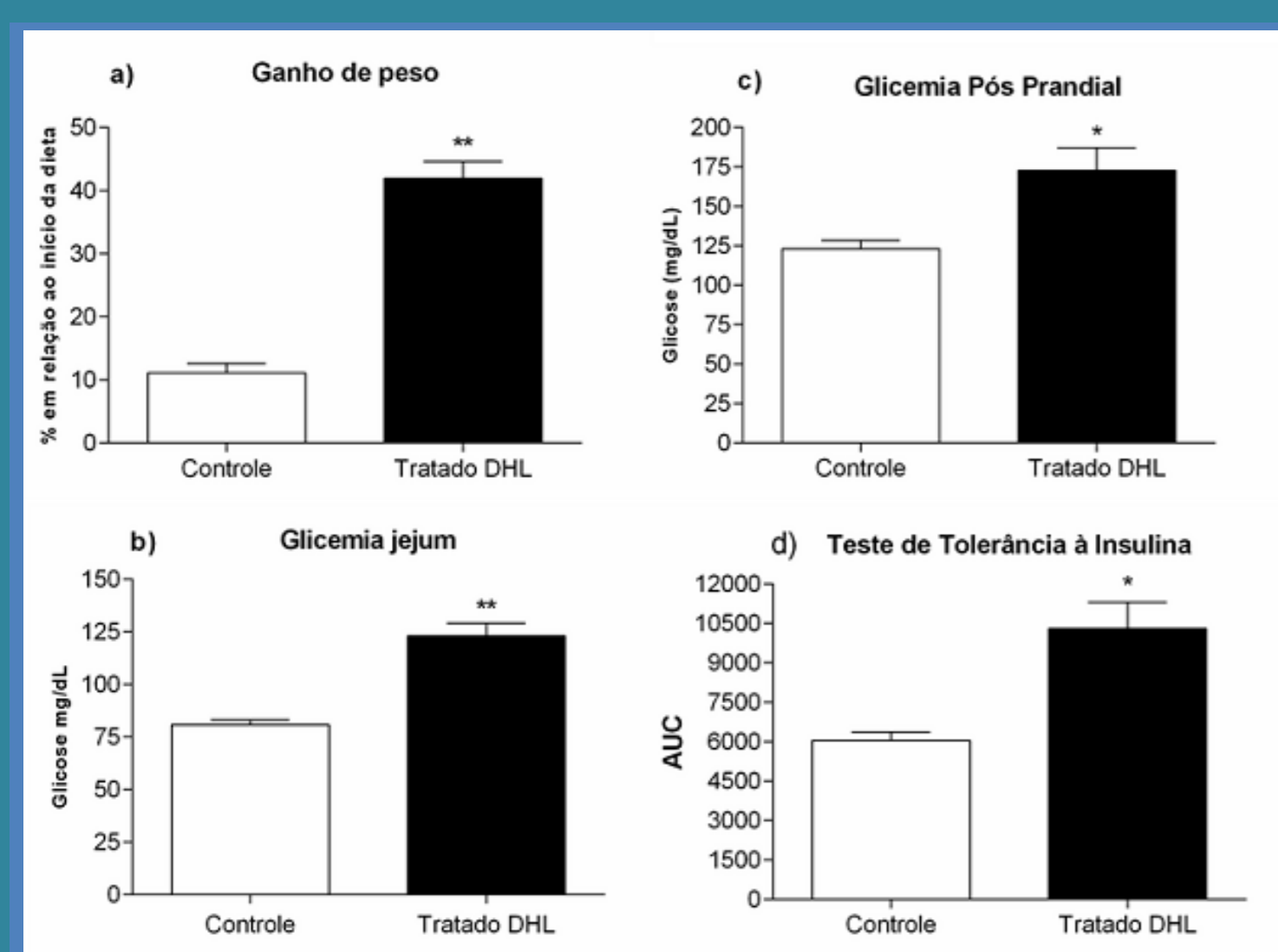
**Introdução/Objetivos:** A diabetes melito tipo 2 (T2DM) caracteriza-se por um quadro de hiperglicemia, intolerância à glicose e resistência à insulina, que é parcialmente compensado por hiperinsulinemia e hiperplasia das células beta do pâncreas no estágio inicial da doença. Os mecanismos envolvidos na interrelação entre obesidade/hipercolesterolemia e resistência à insulina e hiperplasia das células beta não são totalmente conhecidos. Tem sido demonstrado que a via de sinalização Wnt/beta-catenina está envolvida na proliferação e diferenciação celular em vários tecidos/órgãos, mas o seu papel na plasticidade do pâncreas endócrino ainda é incerto. O objetivo deste trabalho foi investigar o possível envolvimento da via de sinalização Wnt/beta-catenina na hiperplasia das células beta em um modelo experimental de T2DM utilizando camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta hiperlipídica (DHL) por 60 dias. Para tal, fez-se inicialmente uma caracterização metabólica dos animais e, posteriormente, investigou-se a distribuição tecidual e o conteúdo celular de algumas proteínas associadas com a via Wnt/beta-catenina ( $\beta$ -catenina total e ativada, c-myc, ciclina D, GSK-3 $\beta$  e axina 2) (Figura 1) em ilhotas pancreáticas destes animais.



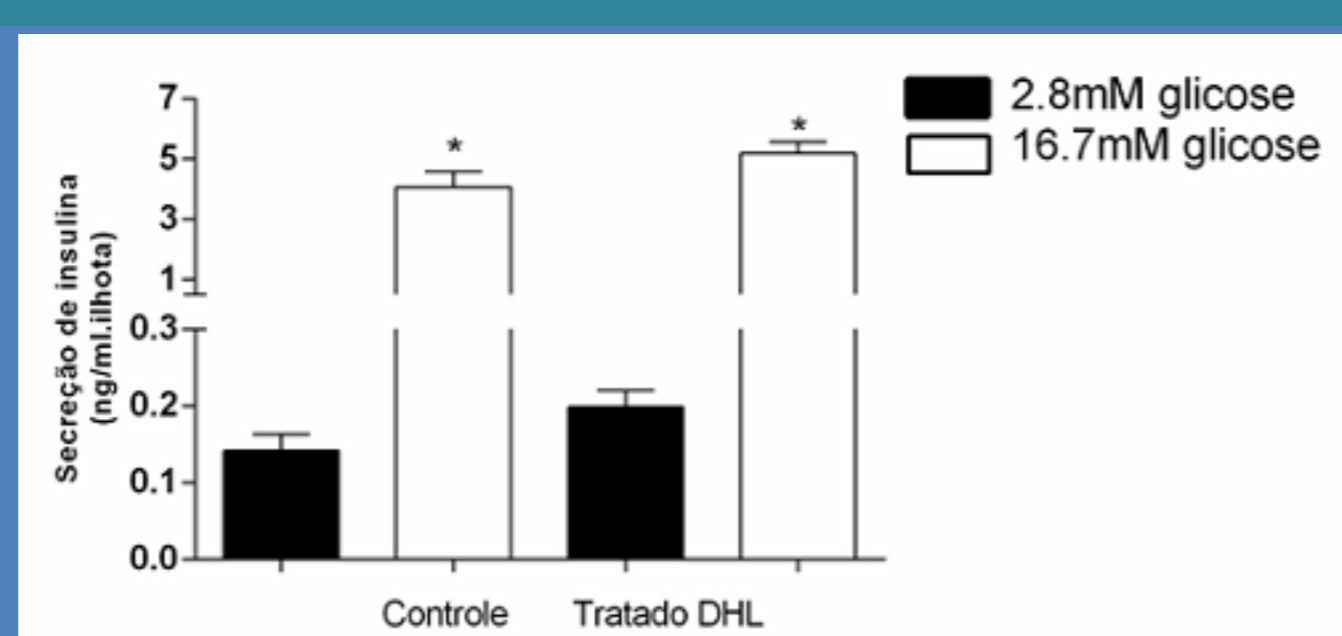
**Figura 1. Via de sinalização Wnt/beta catenina.** Em células não expostas a um sinal de Wnt (ver figura, célula da esquerda), a beta-catenina é degradada através de interações com Axina, APC, e GSK-3. Quando a via é ativada, proteínas Wnt (ver figura, célula da direita) se ligam aos receptores *Frizzled*/LRP na superfície da célula. Estes receptores sinalizam *Dishevelled* (Dsh) e Axina. Como consequência o complexo de degradação de beta-catenina é inibido, e esta proteína acumula-se no citoplasma, e no núcleo interage com TCF para controlar a transcrição das proteínas relacionadas à proliferação celular. Adaptado de Logan & Nusse (Annu. Dev Rev. Cell. Biol. 2004, 20:781-810).

## Metodologias e Resultados:

### I. Análise de Parâmetros Metabólicos nos Animais

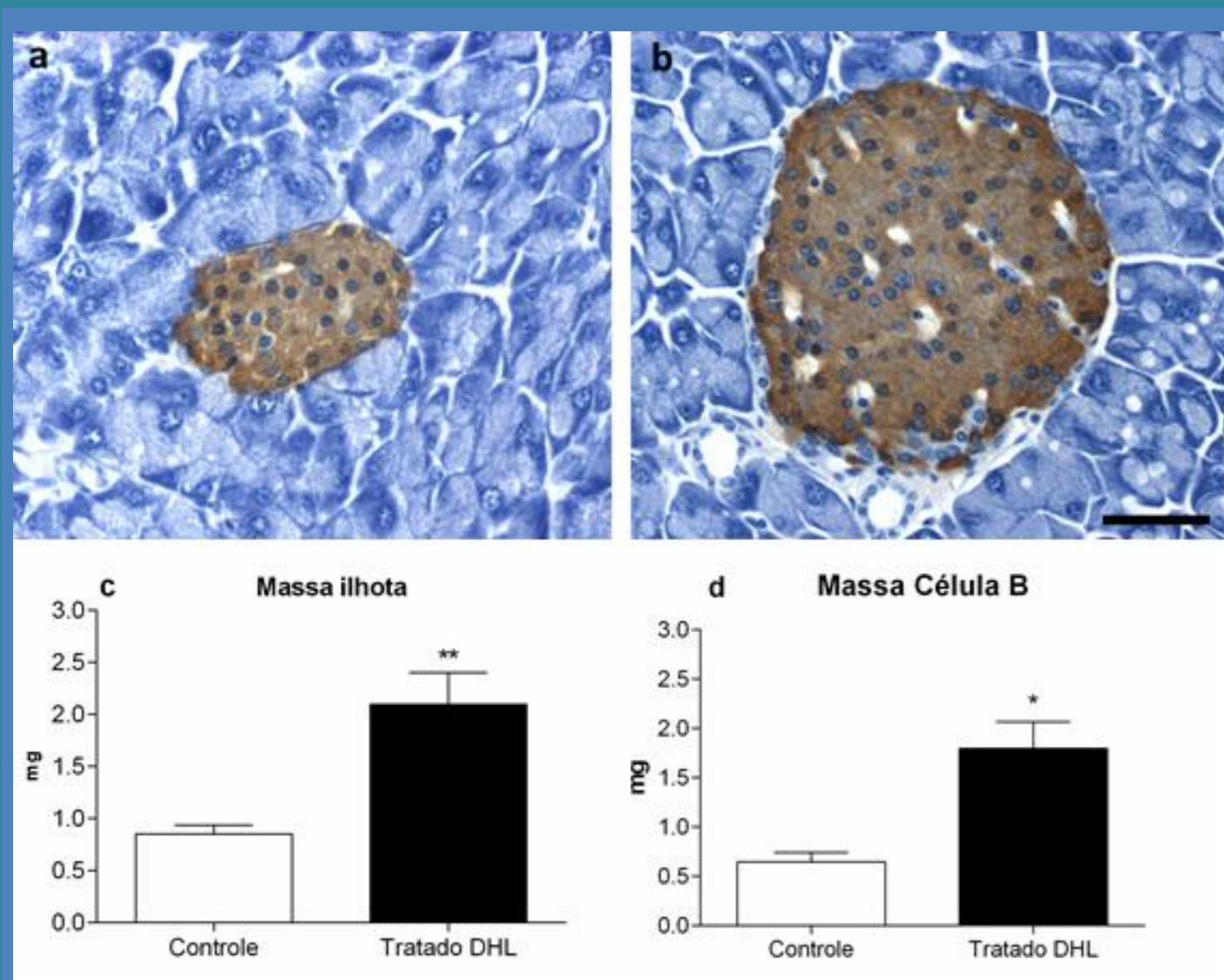


**Figura 2. Exposição à dieta hiperlipídica (DHL) por 60 dias induz aumento do peso corpóreo (a), hiperglicemia jejum (b) e pós-prandial (c) e resistência periférica à insulina (d) em camundongos machos C57.** Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM (número de animais, pelo menos 6 animais/grupo). \* $P < 0,01$  e \*\* $P < 0,0001$  em relação ao grupo controle (teste de t Student).



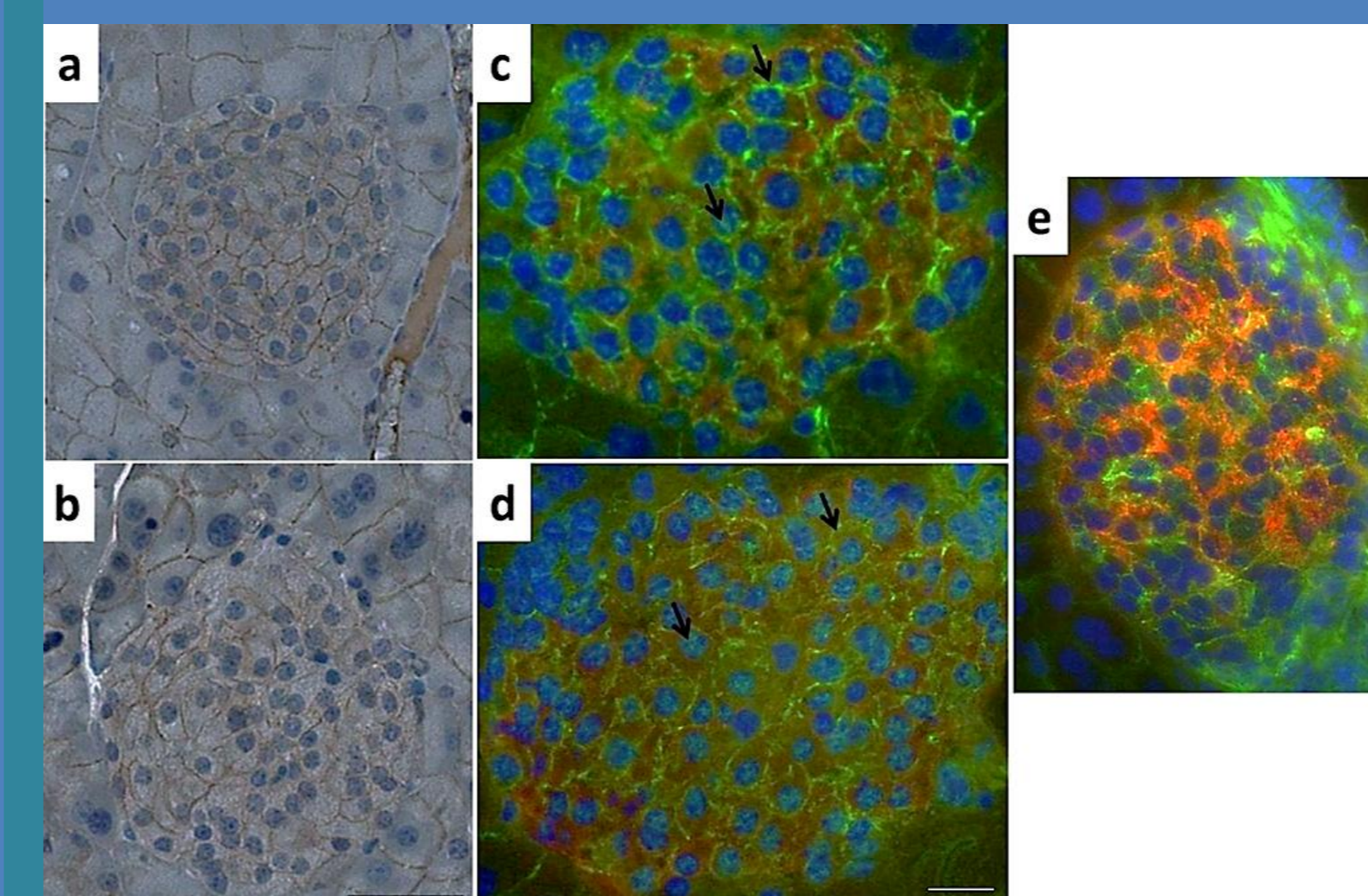
**Figura 3. Secreção estática de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos do grupo controle (alimentado com ração padrão) e tratado com DHL.** Os animais tratados com DHL mostram uma tendência ( $P=0,066$ ) a uma secreção basal de insulina aumentada em relação ao grupo controle, o que aponta para um possível comprometimento na resposta secretora deste hormônio após tratamento com dieta hiperlipídica por 60d. Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM (número de pools: = 25-30 tubos/grupo cada um com 5 ilhotas). \* $P < 0,0001$  em relação à secreção basal (teste de t Student).

### II. Análise de Parâmetros Morfológicos e Morfométricos no Pâncreas

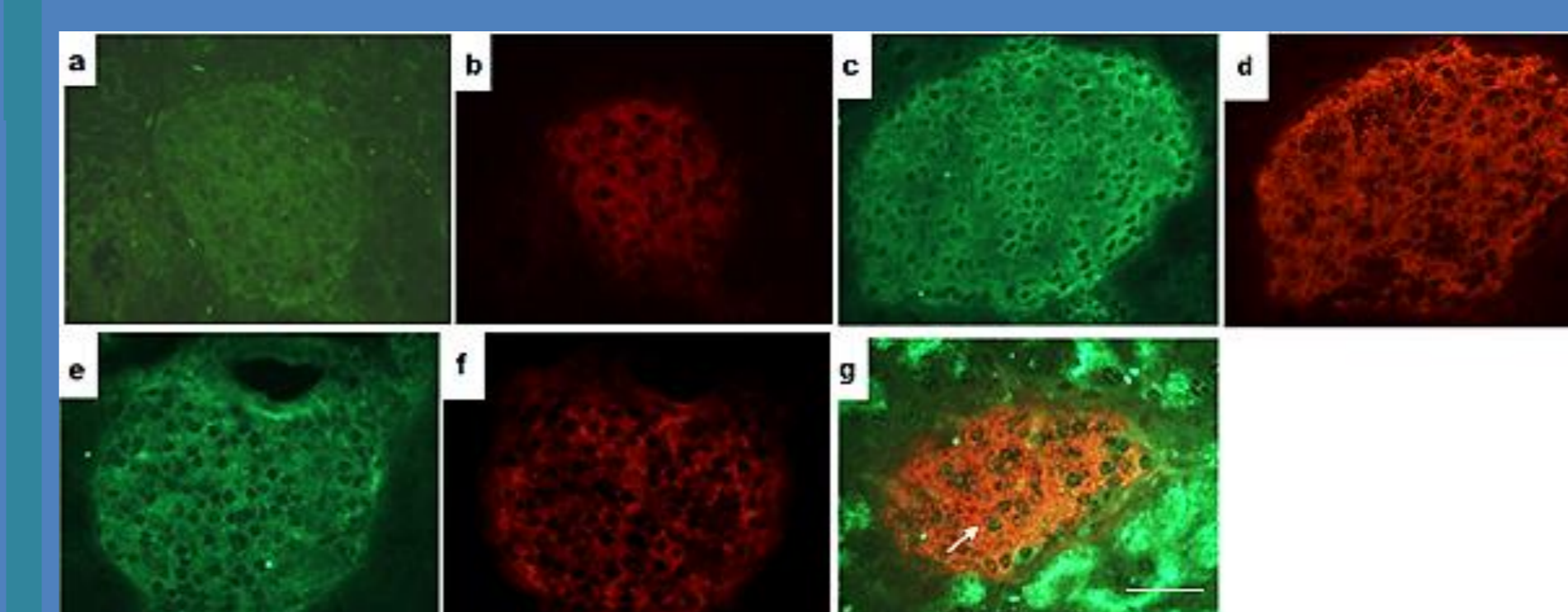


**Figura 4. Aspecto morfológico de ilhotas pancreáticas, em cortes histológicos de pâncreas, marcadas para insulina (em marrom) por imunoperoxidase, mostrando a citoarquitetura e arranjo celular no animal controle (a) e animal tratado com DHL (b).** Exposição à DHL por 60 dias induz aumento na massa das ilhotas (c) e das células beta (d) no pâncreas endócrino de camundongos. Os valores numéricos foram expressos como média  $\pm$  SEM (número de animais, n=5/grupo). \*\* $P < 0,01$  (teste de t Student). Barra = 50  $\mu$ m.

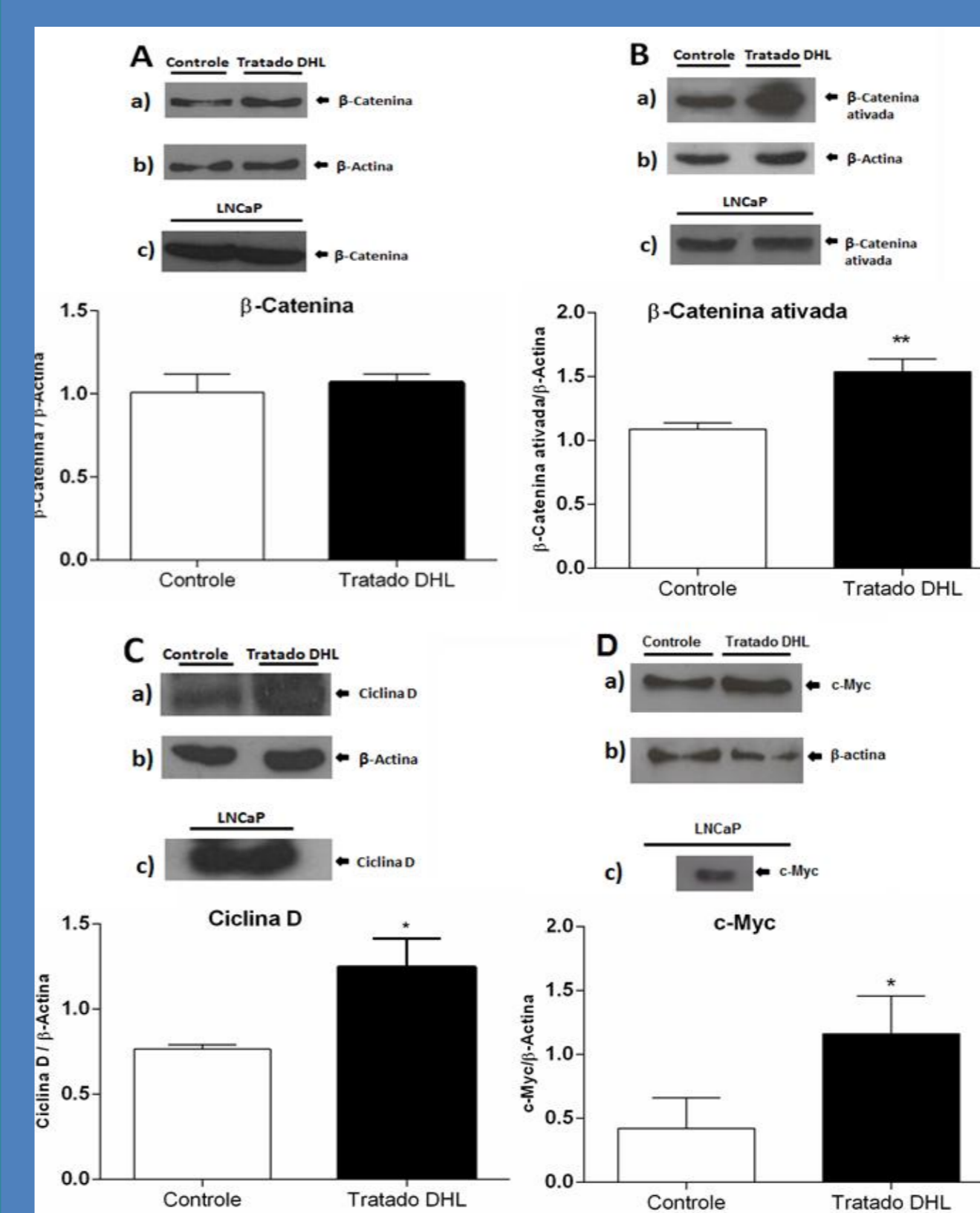
### III. Análise da via Wnt/beta-catenina - Localização e expressão celular de proteínas



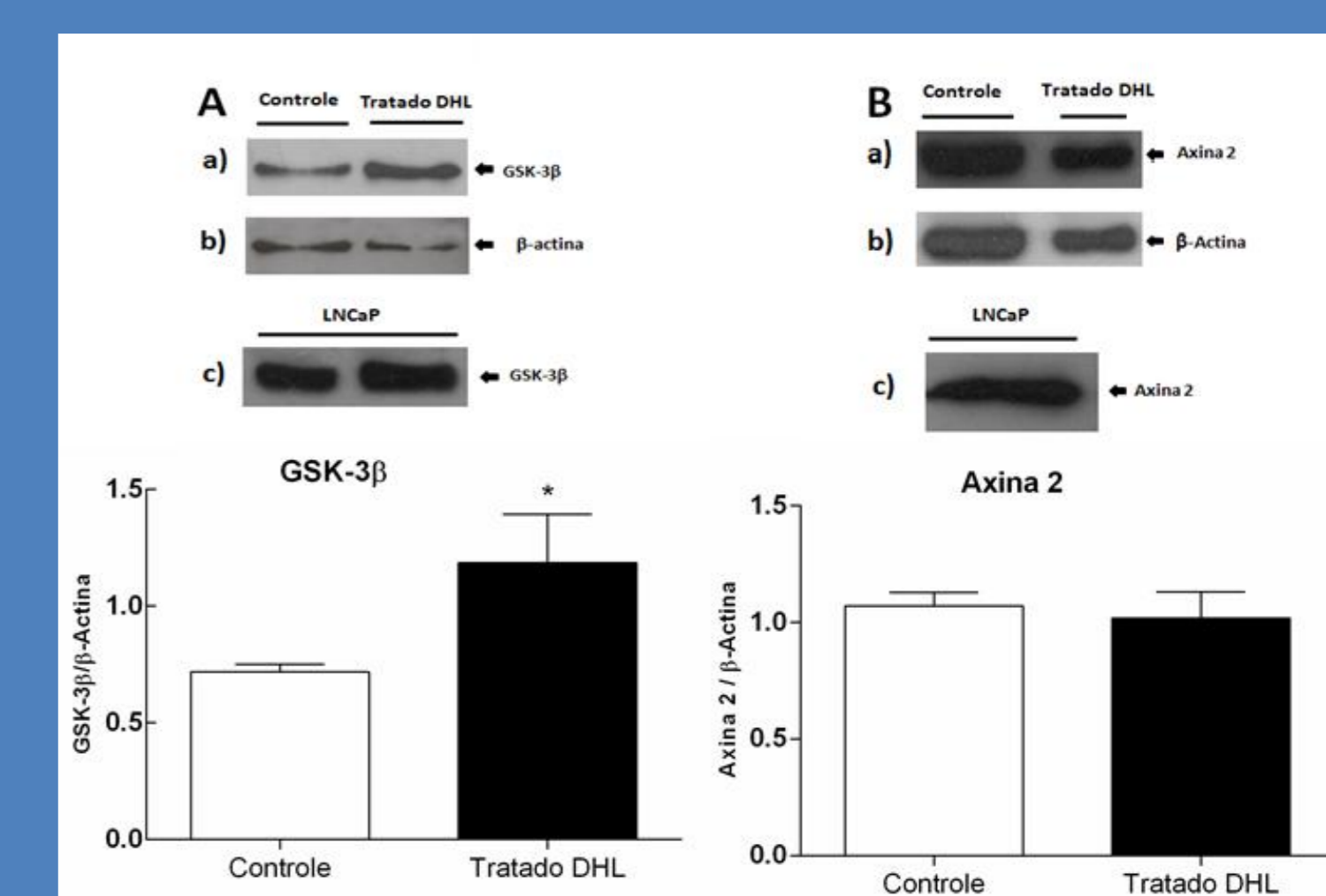
**Figura 5. Localização celular de beta-catenina total (a,b,e) e beta-catenina ativada (c,d) por imunoperoxidase (a, b) ou imunofluorescência (c-e) em ilhotas pancreáticas de camundongos do grupo controle (alimentados com ração padrão) (a,c,e) ou tratados com DHL (b,d).** Nas imagens (c) a (e) beta-catenina (verde - FITC), insulina (vermelho - TRITC) e DAPI (azul). Setas em (c) e (d) indicam marcação intercelular e nuclear para beta-catenina ativada. Em (a) e (b), Barra = 50  $\mu$ m; em (c), (d) e (e), Barra = 20  $\mu$ m.



**Figura 6. Localização celular por imunofluorescência de proteínas da via Wnt/beta-catenina em ilhotas pancreáticas de camundongos do grupo controle.** A imagem (a) corresponde a marcação da ciclina-D, (c) axina-2, (e) GSK-3 $\beta$  e (g) c-myc. Foi realizada colocalização das proteínas em estudo (verde-FITC) e insulina (vermelho-TRITC) (b,d,f,g) para identificação das células beta das ilhotas. Seta em (g) aponta marcação nuclear para c-myc em células beta. (Barra = 50 $\mu$ m).



**Figura 7. Imunoblotting para proteínas da via em homogeneizados de ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos controle e tratados DHL.** Observou-se aumento na expressão protéica de beta-catenina ativada (B, a), ciclina D (C, a) e c-myc (D, a) nas ilhotas hiperplásicas dos animais tratados. Anti- $\beta$ -actina (b) foi usado como controle interno e homogeneizado de células da linhagem de câncer prostático (LNCaP) como controle positivo (c). Os gráficos representam os valores (média  $\pm$  SEM de 6 membranas/3 experimentos) de densidade óptica das bandas normalizados em relação aos da  $\beta$ -actina. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,007$  em relação aos seus respectivos controles (teste t de Student).



**Figura 8. Imunoblotting para proteínas inibidoras da via em homogeneizados de ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos controle e tratados com DHL.** Observou-se aumento na expressão protéica do GSK-3 $\beta$  (A, a), mas não de axina 2 (B, a) nas ilhotas dos animais tratados em comparação ao grupo controle. Anti- $\beta$ -actina (b) foi usado como controle interno e homogeneizado de células derivadas da linhagem de câncer prostático (LNCaP) como controle positivo (c). Os gráficos representam os valores (média  $\pm$  SEM de 4 membranas/3 experimentos) de densidade óptica das bandas normalizados em relação aos da  $\beta$ -actina. \* $P < 0,05$ , quando comparado aos respectivos controles (teste t de Student).

**Conclusão:** 1) Os camundongos C57BL/6 submetidos à DHL por 60 dias tornaram-se obesos, hiperglicêmicos e resistentes à insulina, caracterizando-os como pré-diabéticos; 2) Esses animais pré-diabéticos mostram alterações morfométricas do pâncreas indicativas de hiperplasia compensatória das células beta (aumento da massa das células beta); 3) A análise da distribuição e conteúdo celular de proteínas envolvidas na via de sinalização Wnt/beta-catenina sugere uma possível ativação dessa via durante o processo de hiperplasia compensatória da célula beta nesses animais; 4) Estudos futuros sobre o papel dessa via na biologia da célula beta poderão dar subsídios às investigações sobre Terapia Celular/Gênica da diabetes melito.