

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Expressão do mRNA do gene *Capn 2* e índice de apoptose de ilhotas pancreáticas de rato tratadas com fibrilas de amilina e com oligômeros de amilina de tamanho intermediário**

Erika Rodrigues de Oliveira

**Prof. Maria Lúcia Corrêa-Giannella**

2008

Erika Rodrigues de Oliveira

Expressão do mRNA do gene *Capn 2* e índice de apoptose de ilhotas pancreáticas de rato tratadas com fibrilas de amilina e com oligômeros de amilina de tamanho intermediário

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, apresentado junto ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas- Modalidade Médica.

Orientadora: Dra. Maria Lúcia C. Corrêa Giannella

Botucatu

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
**BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS**

Oliveira, Érika Rodrigues de.

Expressão do mRNA do gene *Capn 2* e índice de apoptose de ilhotas pancreáticas de rato tratadas com fibrilas de amilina e com oligômeros de amilina de tamanho intermediário / Érika Rodrigues de Oliveira. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Maria Lúcia C. Corrêa Giannella

1. Diabetes Mellitus - Aspectos genéticos - Estudos experimentais

Palavras-chave: Amilina; Apoptose; Calpaína 2; Diabetes Mellitus; Ilhotas pancreáticas

## RESUMO

O depósito de amilina é um achado histopatológico freqüente em pacientes portadores de diabetes melito tipo 2 (DM 2) e parece estar relacionado à disfunção da célula beta pancreática característica desta doença. Apenas as moléculas de amilina que sofrem agregação *in vivo*, tal como a amilina humana, são citotóxicas para as células beta, enquanto as variedades não agregantes, como a amilina de rato, não apresentam efeito deletério. Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos de toxicidade associados à forma agregante da amilina, um projeto em andamento em nosso laboratório estudou, por micro-arranjos de cDNA, o perfil de genes modulados pela amilina humana em ilhotas pancreáticas muríneas, comparando duas situações específicas: ilhotas tratadas com fibrilas de amilina (“amilina madura”) e ilhotas tratadas com oligômeros de tamanho intermediário (“amilina fresca”), já que evidências recentes apontam para um efeito deletério apenas de oligômeros de amilina. As ilhotas foram isoladas a partir de ratos Wistar, mantidas em cultura por 24 horas e a seguir tratadas com 10  $\mu$ M de oligômeros ou de fibrilas maduras de amilina por 24 horas adicionais em concentração fisiológica (5,6 mM) ou suprafisiológica (23 mM) de glicose. O RNA total foi extraído e dentre os genes modulados pelos oligômeros de amilina, selecionamos o gene *Capn 2*, que codifica a Calpaína 2 para validação por RT-qPCR. Este gene foi escolhido por seu envolvimento no processo de apoptose, que parece ser um dos mecanismos pelos quais a amilina pode ser deletéria. Entretanto, os resultados sugeriram que o aumento da expressão do RNA mensageiro da calpaína 2 não ocorre no processo de apoptose induzido pelos oligômeros de amilina. Para complementar a avaliação dos efeitos das duas formas de amilina sobre as ilhotas pancreáticas, também procedemos à análise comparativa do índice de apoptose de ilhotas tratadas pelas fibrilas maduras e pelos oligômeros de tamanho intermediário por 24 e 48 horas em concentração fisiológica ou suprafisiológica de glicose através da análise da permeabilidade da membrana mitocondrial. Foi observado um aumento do índice de apoptose das ilhotas após ambos os tratamentos em todas as condições estudadas, porém este aumento foi mais expressivo nas ilhotas submetidas ao tratamento com oligômeros de amilina de tamanho intermediário quando comparado ao tratamento com fibrilas maduras da proteína.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Diabetes mellitus e depósito amilóide

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina associados ou não à resistência a ação deste hormônio. Os extremos das manifestações clínicas constituem-se nas bases para a classificação em DM tipo 1 (quadro clínico exuberante resultante do déficit quase absoluto de insulina) e DM tipo 2 (pacientes oligo ou assintomáticos com predomínio de resistência à insulina).

O DM2 é a forma mais comum de DM em todas as partes do mundo <sup>i</sup> e sua prevalência aumenta com a idade, surgindo geralmente após os 40 anos de idade. A patogênese do DM2 é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais. É caracterizado por defeitos tanto na ação da insulina (resistência insulínica) quanto na secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. Os pacientes apresentam capacidade secretória de insulina inadequada para suplantar a resistência insulínica concomitante e, como resultado, advém a hiperglicemia. A resistência à insulina é o evento central de um grupo de alterações que inclui hipertensão arterial, dislipidemia, hiperuricemia, estado pró-trombótico e microalbuminúria. <sup>ii</sup>

O depósito de amilóide nas ilhotas pancreáticas é um achado patológico característico dos pacientes portadores de DM2. Há muitos anos tem se questionado se este depósito está envolvido ou se é apenas uma consequência fisiopatológica do DM2. Uma vez que a amiloidose da ilhota está associada a uma redução da massa de células  $\beta$  produtoras de insulina, é mais provável que ela esteja diretamente implicada na falência destas células. <sup>iii</sup>

O amilóide é um material proteináceo composto de uma densa rede de fibrilas rígidas, não ramificadas, de comprimento indefinido e diâmetro aproximado de 80 a 100 Å. As fibrilas amilóides contêm uma estrutura central de cadeias polipeptídicas arranjadas em lâminas antiparalelas de conformação  $\beta$ . <sup>iv</sup> A amilina, também conhecida por polipeptídeo amilóide da ilhota (IAPP: *islet amyloid polypeptide*) é o principal constituinte deste tipo de amilóide, é uma proteína de 37 aminoácidos sintetizada pelas células  $\beta$  e co-secretada com a insulina em uma relação molar amilina: insulina de

aproximadamente 1:100.<sup>v</sup> Existem evidências de que apenas as moléculas de amilina que sofrem agregação *in vivo*, tal como a amilina humana, sejam citotóxicas para as células  $\beta$ , enquanto as variedades não agregantes, como a amilina de rato, não apresentam efeito deletério.<sup>vi</sup> Além disso, há evidências de que os efeitos citotóxicos das fibrilas intermediárias do amilóide sejam mais potentes do que os do amilóide já formado.<sup>vii</sup>

Acredita-se que a região da amilina entre as posições 20 e 29, conhecida por seqüência amiloidogênica, esteja envolvida na formação de fibrilas amilóides pelo peptídeo humano<sup>viii</sup>, no entanto, os mecanismos exatos da deposição de amilóide no DM2 carecem de elucidação. Algumas evidências sugerem que a formação de amilóide possa estar relacionada à hipersecreção de amilina associada à hiperglicemia e a outros fatores até o momento desconhecidos. Além da amilina, também estão presentes no depósito amilóide o amilóide P sérico (SAP: *serum amyloid P*), a apolipoproteína E (apo E) e o proteoglicano heparan sulfato perlecan<sup>ix</sup>, embora o papel destes componentes na formação do depósito amilóide não esteja completamente elucidado.

O gene que codifica a amilina foi isolado e caracterizado em 1988.<sup>x</sup> Não se encontrou ligação entre o *locus* da amilina no cromossomo 12 e o desenvolvimento de DM2<sup>xi</sup>, assim como não foram encontradas mutações neste gene em pacientes com DM2.<sup>xii</sup> Baseado nas similaridades estruturais e funcionais e na análise genômica, a amilina é considerada um membro da família da calcitonina, composta pela calcitonina, peptídeos relacionados à calcitonina (CGRPs: *calcitonin gene-related peptides*) e a adrenomedulina.<sup>xiii</sup>

As tentativas iniciais de identificar um receptor para amilina levaram ao receptor de calcitonina (CTR)<sup>xiv</sup>. De fato a amilina, bem como os CGRPs e a adrenomodulina compartilham uma similaridade estrutural com a calcitonina e portanto ativam o mesmo receptor, não obstante a afinidade de cada um destes ligantes pelo CTR é regulada pela associação entre o CTR e um grupo de proteínas conhecidas como proteínas modificadoras da atividade do receptor (RAMPS)<sup>xv</sup>. Desta maneira, heterodímeros formados pelo CTR e RAMP1 ou RAMP3 ligam-se preferencialmente à amilina, podendo ser receptores funcionais para esse peptídeo.<sup>xvi</sup>

Embora existam muitos dados conflitantes, a maioria dos trabalhos aponta para um efeito insulínostático da amilina, mas a relevância fisiológica dessa ação inibitória

ainda é questionável, já que altas concentrações de amilina são necessárias para afetar a secreção de insulina.<sup>xvii</sup> Por outro lado, demonstrou-se que a amilina determina uma hiperpolarização da membrana da célula  $\beta$ <sup>xviii</sup>, um efeito que poderia proteger as células  $\beta$  da exaustão em situações que cursam com alta demanda de insulina, tais como na resistência periférica à insulina.

Inúmeras evidências sugerem que o depósito amilóide desempenhe um importante papel na perda de células  $\beta$  e no declínio progressivo da secreção de insulina característico do DM2. Primeiramente, o depósito amilóide é encontrado em até 90% dos pacientes com DM2 em autópsias e o grau de depósito se correlaciona com a severidade da doença em humanos.<sup>xix</sup> Além disso, a formação do amilóide precede o início da hiperglicemia em primatas e está associada à redução da massa de células  $\beta$  em humanos e primatas.<sup>xx</sup> Esses achados sugerem uma estreita correlação entre o depósito amilóide e o desenvolvimento e progressão do DM2.

Vários mecanismos têm sido implicados na patogênese da citotoxicidade associada à amilina. Já foi sugerido que o contato das fibrilas de amilina com a membrana das células  $\beta$  induza apoptose por um mecanismo que envolve a síntese de RNA e proteína.<sup>xxi</sup> O depósito extracelular de amilóide determina a apoptose das células  $\beta$  em associação com um aumento na expressão de genes relacionados à apoptose, tais como *p53* e *p21*.

Outros mecanismos propostos para explicar a ação citotóxica da amilina humana são: aumento na resposta oxidativa celular<sup>xxii</sup> e a formação de canais iônicos de membrana que poderiam alterar a homeostase do cálcio intracelular<sup>xxiii</sup>. A formação de amilóide intracelular também pode causar a morte das células  $\beta$ , mas esta relação ainda não está claramente estabelecida. O efeito citotóxico da amilina poderia envolver a ruptura das membranas intracelulares pelas partículas amilóides tóxicas de tamanho intermediário.<sup>xxiv</sup> Ainda não está estabelecido se a toxicidade da amilina humana é mediada pelas fibrilas maduras, como demonstrado em trabalhos mais antigos, ou por oligômeros de tamanho intermediário, como tem sido aventado nos trabalhos mais recentes<sup>vii, xxv</sup>

Estudos que permitam uma melhor compreensão das bases moleculares da ação da amilina sobre a célula  $\beta$  podem resultar em novas estratégias terapêuticas para evitar a falência da célula  $\beta$  no DM2.<sup>20</sup>

Considera-se pertinente o desenvolvimento de inibidores peptídicos ou outras moléculas como agentes preventivos da formação amilóide.<sup>xxvi</sup>

## 1.2 Apoptose de célula $\beta$

A apoptose, ou morte celular programada, é uma forma de morte celular destinada a eliminar células indesejáveis do organismo por meio da ativação de uma série coordenada de eventos executados por um conjunto exclusivo de proteínas.<sup>xxvii</sup> Um elemento chave no processo apoptótico é a ativação da família caspase, composta por pelo menos 15 membros de cisteína proteases intracelulares aspartil-específicas.<sup>xxviii</sup> As células apoptóticas exibem características patológicas típicas, entre elas, quebras do DNA em fragmentos grandes de 50 a 300 kb, com clivagem internucleossômica subsequente em fragmentos de 180 a 200 pares de bases por endonucleases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e expressão de fosfatidilserina nas camadas externas da membrana plasmática, que permitem que as células mortas sejam reconhecidas precocemente por macrófagos adjacentes para serem fagocitadas.<sup>xxix</sup>

A falha na produção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas é uma característica comum do DM tipo 1 e tipo 2. Várias evidências sugerem que a apoptose seja a principal forma de morte das células  $\beta$  nestas desordens. A célula  $\beta$  é particularmente sensível ao estímulo apoptótico devido às características inerentes ao seu fenótipo especializado. No DM tipo 1, a reação auto-imune anti-célula  $\beta$  ativa o sinal apoptótico por intermédio de altas concentrações de mediadores inflamatórios no micro-ambiente da ilhota ou através de células T efetoras. No DM2, um desarranjo metabólico está associado a produção de mediadores inflamatórios em tecidos insulino-sensíveis com concentrações elevadas de mediadores como a IL-6 e o TNF na circulação periférica. Também tem sido sugerido que a glicose induza síntese de IL-1 pela própria célula  $\beta$ , a qual atuaria de maneira autócrina na indução de apoptose, em um mecanismo semelhante ao observado no DM tipo 1.<sup>xxx</sup> Outros mecanismos que poderiam explicar a redução da capacidade de secreção de insulina e da massa de células  $\beta$  por apoptose observado no DM2 são o



depósito de amilóide nas ilhotas e dois eventos bem caracterizados, a glicotoxicidade, devido a um aumento local de interleucina 1 $\beta$ , ativação do NF-Kappa  $\beta$  e baixa expressão do gene anti apoptótico *BCL-2* e a lipotoxicidade, que também causa redução da expressão do gene anti apoptótico *BCL-2* e conseqüente ativação de caspases executoras do processo de apoptose.

### 1.3 Calpaína-2

A calpaína constitui uma superfamília de cisteíno proteases citoplasmáticas cálcio dependente. Apesar de sua função fisiológica não estar completamente elucidada, ela está implicada em uma grande variedade de processos celulares regulados pelo cálcio, como transdução de sinal, proliferação celular, progressão do ciclo celular, diferenciação e fusão de membranas<sup>xxx</sup>. A desregulação de sua atividade tem sido observada em complicações de inúmeras doenças. No DM2, variantes polimórficas no gene da calpaína 10 estão relacionados a um aumento nas concentrações de ácidos graxos livres e à resistência à insulina<sup>xxxii</sup>. Mutações no gene da calpaína 3 que reduzem a função da proteína desempenham um importante papel na distrofia muscular de cintura tipo 2A<sup>xxxiii</sup>.

A calpaína 2 está relacionada a algumas doenças degenerativas, como a doença de Alzheimer. Um dos marcadores patológicos na doença de Alzheimer são agregados neurofibrilares intracelulares, provocados pela hiperfosforilação de uma proteína microtubular denominada TAU. As calpaínas 1 e 2 estão envolvidas na ativação prolongada do fator que desencadeia esta hiperfosforilação, o que promove a morte celular por apoptose. Além disso, foi observado que este processo mediado pela calpaína se torna mais evidente quando os neurônios estão expostos ao depósito amilóide, outro achado histopatológico freqüente nos pacientes portadores da doença de Alzheimer. A observação da diminuição do índice de apoptose pela utilização de inibidores da atividade da calpaína corrobora a hipótese do papel central desta proteína no processo de degeneração.<sup>xxxiv</sup>

Existem dois tipos principais de calpaína que funcionalmente diferem entre si em relação à sensibilidade ao cálcio *in vitro*. Dessa forma, a calpaína 1 ( $\mu$ - calpaína) e a 2 (m-calpaína) são ativadas em diferentes concentrações de cálcio, sendo que a primeira requer concentrações significativamente menores para desempenhar uma mesma ação.<sup>xxxv</sup>

Estas proteínas são heterodímeros compostos por uma subunidade catalítica de aproximadamente 80 kDa que contém quatro domínios (I-IV) e uma pequena subunidade regulatória de cerca de 30 kDa que compreende os domínios V e VI. O gene *CAPN2*, localizado na região 1q41-q42, codifica a subunidade catalítica da proteína calpaína 2. Esta enzima possui distribuição tecidual ubíqua e é altamente conservada em diferentes espécies de mamíferos.<sup>xxxvi</sup>

Na ausência de cálcio, os dois subdomínios da região catalítica estão posicionados de forma que o sítio ativo apresenta uma conformação estrutural que impossibilita a hidrólise de substratos alvo. A ligação do cálcio aos sítios de ligação da proteína, (domínios II, III, IV e VI) promove alterações conformacionais que tornam a enzima ativa e possibilita sua atividade catalítica.<sup>xxxvii</sup> A atividade da protease é controlada *in vivo* por fosforilação e por inibidores endógenos, representados até o momento pela calpastatina, cuja ligação à calpaína é reversível e dependente de cálcio.<sup>37</sup>

Acredita-se que a calpaína atue ativamente no processo de apoptose<sup>xxxviii</sup>. Tem sido demonstrado que a calpaína 1 e 2 podem agir sinergicamente com a caspase 3 sobre substratos comuns. Além disso, a calpaína 2 pode atuar diretamente na ativação da caspase 12 e na clivagem da proteína pró-apoptótica BCL-xL, membro de uma família de proteínas que controlam a permeabilidade da membrana mitocondrial, relacionadas com a ativação da apoptose pela via intrínseca.<sup>xxxix, xl</sup> Na apoptose induzida por estresse de retículo endoplasmático (RE), a função da calpaína é particularmente evidente devido ao aumento da concentração de cálcio intracelular, em consequência de perturbação em sua homeostase.<sup>xli</sup>

## 2. OBJETIVOS

Estudar em ilhotas pancreáticas de rato tratadas com fibrilas de amilina madura e com oligômeros de tamanho intermediário de amilina:

1. A expressão do gene *Capn2*, por meio de RT-qPCR e
2. O índice de apoptose, por meio da análise da permeabilidade da membrana mitocondrial.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Isolamento de ilhotas pancreáticas de rato**

Para os experimentos foram utilizados ratos Wistar adultos provenientes do biotério central de Faculdade de Medicina da USP. Ratos Wistar machos pesando de 250 a 350 g (dois meses de idade) foram sedados com uso de éter etílico por inalação e, posteriormente, anestesiados com solução de quetamina + xilazina (0,2 mL/100 g de peso do animal) via intra-peritoneal. A seguir, a anti-sepsia do abdômen foi feita com solução de Polivinilpirrolidona Iodo (PVPI 10%). A cavidade abdominal foi aberta com tesoura e após localização e exposição do ducto biliar e sua ramificação que vai para o intestino delgado, o ducto foi pinçado em sua extremidade distal com o auxílio de uma pinça hemostática, a fim de se evitar dispersão da enzima para o intestino (Figura 1), levando à insuflação do pâncreas. A canulação do ducto biliar foi feita pela introdução de um escalpe (25G) por meio de pequeno corte feito com micro-tesoura no terço proximal do ducto. Fez-se uma amarração com fio algodão 4-0 em torno do cateter introduzido no ducto para evitar extravasamento retrógrado da solução de enzima injetada.

#### **3.1.2 Canulação e digestão do pâncreas**

A solução de Colagenase tipo V (Sigma) foi preparada com diluição em solução de HBSS (*Hank's balanced salt solution*) para uma concentração de 0,7 mg/mL. Após a injeção intraductal de 10 mL da solução (Figura 2), o pâncreas foi separado do intestino com auxílio de uma tesoura e transferido para uma placa de Petri, sendo lavado em solução de HBSS suplementada com antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). O baço foi retirado juntamente com o excesso de tecido gorduroso e o pâncreas foi cortado em pedaços grandes e colocado em um tubo de 50 mL contendo 5 mL de HBSS. A amostra foi levada ao banho-maria a 37 °C para a digestão com a colagenase. Após 15 min a amostra foi lentamente homogeneizada e uma alíquota foi retirada e colocada em placa de 24 poços onde foi corada com ditizona (DTZ, Sigma), que se liga às moléculas de zinco nos grânulos de insulina e permite a visualização das ilhotas que adquirem cor avermelhada. Desta forma verifica-se o momento em que as ilhotas se encontram livres do tecido acinar (Figura 3).



Figura 1. Localização do ducto biliar e pinçamento da ramificação que vai para o intestino delgado.



Figura 2. Canulação do ducto biliar e introdução de colagenase tipo V diluída em HBSS.

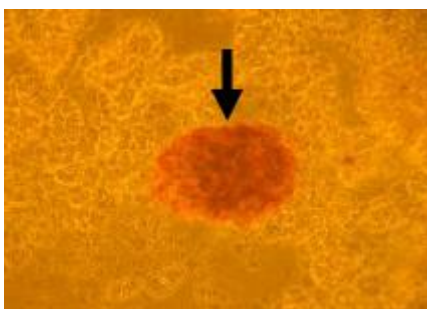


Figura 3. Visualização das ilhotas pancreáticas (coradas em vermelho pela ditizona) livres de tecido acinar após 15 minutos de digestão enzimática.

### 3.1.3 Interrupção da digestão e purificação das ilhotas por Gradiente de HBSS-Ficol

Após o final da etapa de digestão, a solução com as ilhotas foi transferida para um tubo de 50 mL contendo 30 mL de meio de cultura RPMI 1640 com 10% soro fetal bovino (SFB) a 4° C, com o objetivo de interromper a ação da enzima e finalizar a digestão. Após lavagens e centrifugações, o material foi filtrado em malha de aço inoxidável de 600  $\mu$ m e procedeu-se à purificação por gradiente de Ficoll, em soluções de HBSS-Ficoll de diferentes densidades ( $\mu$  = 1.110, 1.096, 1.069 e 1.037). As ilhotas encontram-se localizadas na interface entre as densidades  $\mu$  = 1,069/1,096 (Figura 4). Após centrifugação e lavagens, as ilhotas foram contadas e analisadas quanto a sua pureza (Figura 5). As ilhotas foram distribuídas em frascos de cultura de maneira que não ultrapassassem a densidade de 4 ilhotas/cm<sup>2</sup>, que é descrita como mais adequada, e levadas à estufa a 37°C, 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>.

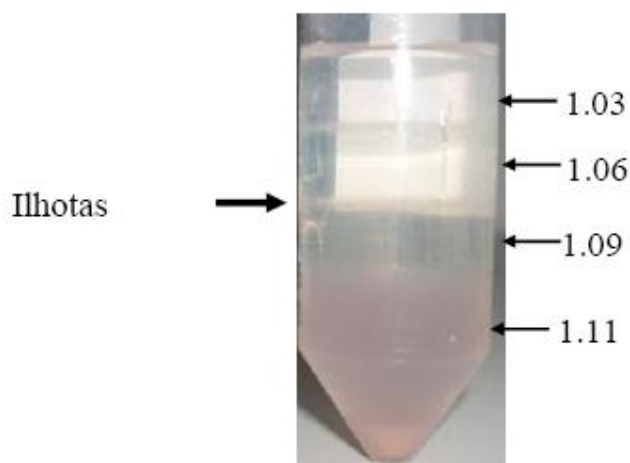


Figura 4. Gradiente de HBSS- Ficoll, mostrando as diferentes densidades e a camada onde as ilhotas estão localizadas após a centrifugação.

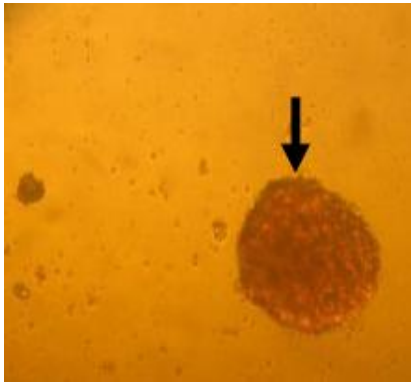


Figura 5. Ilhota purificada e corada com ditizona após a centrifugação em gradiente de HBSS- Ficoll.

### 3.2 Preparo da amilina

Para a realização do tratamento das ilhotas de rato, foi utilizada a proteína amilina humana (Bachem, EUA) cujo liofilizado foi ressuscitado em água deionizada para uma concentração de 500  $\mu\text{M}$ . A forma fibrilar da amilina (“amilina madura”) é obtida incubando-se a mesma com seu veículo de diluição durante sete dias a temperatura ambiente. A forma oligomérica é obtida fazendo-se a ressuspensão da amilina imediatamente antes do tratamento das ilhotas (“amilina fresca”). Conforme pode ser visto no gráfico de caracterização das formas de amilina pelo ensaio de fluorescência da tioflavina T<sup>xlii</sup>, o conteúdo de fibrilas já está em seu nível máximo na “amilina madura”, enquanto a amilina ressuscitada imediatamente antes do ensaio (“amilina fresca”) apresenta uma fluorescência crescente nos primeiros 20 a 30 minutos, quando o conteúdo de fibrilas atinge um platô.

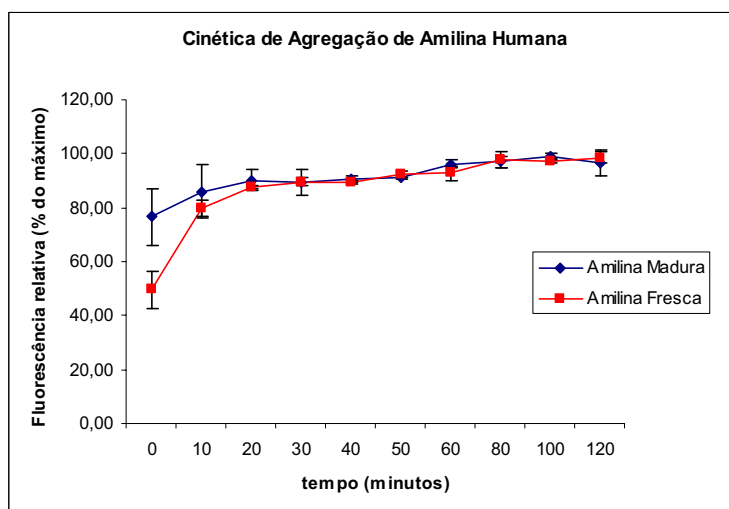


Figura 6. Cinética de agregação da amilina madura e da amilina “fresca” analisada por ensaio fluorimétrico com Tioflavina T.

### 3.3 Tratamento das ilhotas pancreáticas com amilina para os experimentos de análise de expressão do mRNA do gene *Capn2*

Após o isolamento, as ilhotas foram mantidas em cultura por 24 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI 1640, com 2% de SFB e 5,6 mM de glicose em temperatura de 37°C. Após este período, 200 ilhotas foram submetidas ao tratamento com amilina madura ou fresca na concentração de 10 mM em condições fisiológicas (5,6 mM) ou supra-fisiológicas (23 mM) de glicose e incubadas por 24 horas em meio RPMI 1640, com 2% de SFB em temperatura de 37°C. As respectivas condições controle foram realizadas da mesma maneira que as experimentais, porém sem a adição de amilina. Todas as condições estudadas foram realizadas em duplicata biológica. Depois do tratamento, as ilhotas foram transferidas para um tubo de 15 mL, centrifugadas por 10.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* de ilhotas foi adicionado 1 mL do reagente Trizol (Invitogen, EUA). As ilhotas foram vigorosamente homogeneizadas com Trizol e armazenadas em temperatura de – 80°C para posterior extração de RNA total. Foram realizados três experimentos independentes, sendo que a quantificação do conteúdo de mRNA de calpaína 2 por RT-qPCR também foi realizada em amostras de cDNA de ilhotas pancreáticas provenientes de um primeiro experimento semelhante ao descrito

acima e que havia sido realizado por um outro estudante do laboratório antes do início deste projeto de Iniciação Científica.

### **3.4 Tratamentos das ilhotas pancreáticas com amilina para os experimentos de análise de permeabilidade de membrana mitocondrial**

Após o isolamento, as ilhotas foram mantidas em cultura por 24 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI 1640, com 2% de SFB e 5,6 mM de glicose em temperatura de 37°C. Após este período, 200 ilhotas foram submetidas ao tratamento com amilina madura ou fresca na concentração de 10 mM em condições fisiológicas (5,6 mM) ou supra-fisiológicas (23 mM) de glicose e incubadas por 24 e 48 horas em meio RPMI 1640, com 2% de SFB em temperatura de 37°C. As respectivas condições controle foram realizadas da mesma maneira que as experimentais, porém sem a adição de amilina. Foram realizados dois experimentos independentes.

### **3.5 Extração e controle de qualidade do RNA total**

Para a extração de RNA total das ilhotas, foi utilizado um protocolo baseado na lise das células com Trizol e subsequente isolamento do RNA total pelo método de cromatografia (RNeasy Mini Kit, Qiagen). A amostra foi descongelada lentamente e foram adicionados 266 µL de clorofórmio. Após nova homogeneização, a amostra foi incubada por 10 min em temperatura ambiente e centrifugada por 15 min a 10.600 rpm a temperatura de 4°C. A camada superior aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado um volume (350 a 600 µL) de etanol 70% e homogeneizado por pipetagem. A mistura foi transferida para uma coluna de cromatografia e centrifugada. Após algumas lavagens com tampão, o RNA ligado à coluna foi eluído com 30 µL de água livre de RNase (0,1% DEPC). A qualidade da preparação de RNA foi avaliada quanto à integridade, quantidade e pureza. A análise da integridade foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, sendo que as bandas relativas ao RNA ribossomal 18S e 28S deviam estar bem visíveis e íntegras. A análise da quantidade e da pureza do material foi feita por espectrofotometria (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies). Foram consideradas ótimas amostras com uma relação Abs<sub>260</sub>/Abs<sub>280</sub> entre 1,7 e 2,1.



Os resultados das análises dos RNAs utilizados neste estudo estão demonstrados nas Tabelas 1 até 3 e exemplificados na Figura 7.

Tabela 1: Quantificação e relação OD 260/280 das amostras de RNA total do experimento 2.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (ng/μL)</b>	<b>Relação 260/280</b>	<b>Rendimento (μg)</b>
<b>Controle 5,6 mM- 1</b>	46,3	1,91	1,39
<b>Controle 5,6 mM- 2</b>	93,7	2,01	2,81
<b>Amilina madura 5,6 mM- 1</b>	77,3	2,00	2,32
<b>Amilina madura 5,6 mM- 2</b>	82,9	1,96	2,49
<b>Amilina fresca 5,6 mM- 1</b>	54,9	1,89	1,65
<b>Amilina fresca 5,6mM- 2</b>	36,7	1,80	1,10
<b>Controle 23 mM- 1</b>	48,5	1,87	1,46
<b>Controle 23 mM- 2</b>	39,8	1,89	1,19
<b>Amilina madura 23 mM- 1</b>	26,8	1,75	1,65
<b>Amilina madura 23 mM- 2</b>	54,6	1,93	1,64
<b>Amilina fresca 23 mM-1</b>	19,4	1,77	0,58
<b>Amilina fresca 23mM- 2</b>	14,8	1,70	0,44

Tabela 2: Quantificação e relação OD 260/280 das amostras de RNA total do experimento 3.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (ng/μL)</b>	<b>Relação 260/280</b>	<b>Rendimento (μg)</b>
<b>Controle 5,6 mM- 1</b>	223,5	2,10	6,7
<b>Controle 5,6 mM- 2</b>	136,3	2,09	4,5
<b>Amilina madura 5,6 mM- 1</b>	88,0	2,08	2,6
<b>Amilina madura 5,6 mM- 2</b>	158,8	2,08	4,8
<b>Amilina fresca 5,6 mM- 1</b>	100,3	2,06	3,0
<b>Amilina fresca 5,6mM- 2</b>	87,9	2,05	2,6
<b>Controle 23 mM- 1</b>	150,7	2,08	4,5
<b>Controle 23 mM- 2</b>	130,4	2,06	2,6
<b>Amilina madura 23 mM- 1</b>	69,4	2,04	2,1
<b>Amilina madura 23 mM- 2</b>	130,6	2,05	3,09
<b>Amilina fresca 23 mM-1</b>	83,4	2,08	2,5
<b>Amilina fresca 23mM- 2</b>	87,0	2,08	2,6

Tabela 3: Quantificação e relação OD 260/280 das amostras de RNA total do experimento 4.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Relação 260/280	Rendimento (μg)
Controle 5,6 mM- 1	52,4	1,96	1,6
Controle 5,6 mM- 2	41,3	1,95	1,2
Amilina madura 5,6 mM- 1	45,8	1,96	1,4
Amilina madura 5,6 mM- 2	42,6	2,00	1,3
Amilina fresca 5,6 mM- 1	25,0	1,70	0,8
Amilina fresca 5,6mM- 2	16,6	1,93	0,5
Controle 23 mM- 1	35,8	2,00	1,1
Controle 23 mM- 2	40,6	1,99	1,2
Amilina madura 23 mM- 1	34,1	1,96	1,0
Amilina madura 23 mM- 2	31,8	1,92	1,0
Amilina fresca 23 mM-1	15,4	1,71	0,5
Amilina fresca 23mM- 2	17,3	1,78	0,5

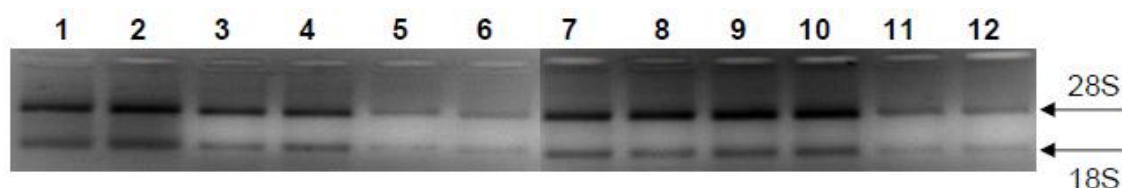


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose dos RNAs, mostrando as subunidades referentes às subunidades 28S e 18S.

1 e 2 = Controle 5,6 mM; 3 e 4 = Amilina madura 5,6 mM; 5 e 6 = Amilina fresca 5,6 mM; 7 e 8 = Controle 23 mM; 9 e 10 = Amilina madura 23 mM; 11 e 12 = Amilina fresca 23 mM

### 3.6 Padronização da técnica de RT-qPCR (reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa relativa) para os genes *Capn2* e da $\beta$ -actina

A RT-qPCR consiste na aferição da quantidade de um produto amplificado a cada ciclo da reação em cadeia da polimerase. Utilizam-se reagentes fluorescentes para identificar o sinal, e o resultado obtido na fase exponencial da reação é extrapolado, de modo a obter a quantidade inicial de amostra<sup>xliii</sup>.

Como normalizador das reações de PCR, foi utilizado o gene que codifica a  $\beta$ -actina. Para a quantificação do conteúdo do mRNA de calpaína-2 e da  $\beta$ -actina, foram desenhados *primers* em éxons diferentes do gene, a fim de evitar a amplificação de DNA

genômico (Tabela 4). Todos os *primers* foram construídos com auxílio do programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu>).

Tabela 4. Seqüência dos *primers* utilizados nas reações de RTq- PCR.

Genes	Seqüência <i>forward</i>	Seqüência <i>reverse</i>	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Capn2</i>	5'-CTTGGATCCCTTCC-3'	5'-TCGAGCGATTTCTTCAT-3'	235
$\beta$ -actina	5'-CAACCTTCTTGACGCTCCTC-3'	5'-TCCATATCGTCCCAGTTGGT-3'	300

Para a padronização da amplificação dos genes da  $\beta$ -actina e da calpaína 2, utilizou-se o RNA total extraído de ilhotas pancreáticas. Para a síntese de cDNA, foram utilizados 200 ng de RNA total e seguido o protocolo do conjunto de reagentes *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Invitogen, EUA), onde o RNA total é incubado com 2,5  $\mu$ M de oligo(dT)20, 2,5 ng/ $\mu$ L de *primers* randômicos, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, mistura de nucleotídeos e uma transcriptase reversa. Esta mistura foi incubada a 25°C por 10 min e depois a 50°C por 30 min. A reação foi finalizada aquecendo o tubo a 85°C por 5 min e, a seguir, colocada no gelo. Para a degradação da fita de RNA da molécula híbrida (RNA:cDNA), a amostra foi tratada com 2 U de RNase H por 20 min a 37°C. Ao final do processo, o cDNA foi diluído 1:5 com água livre de nuclease.

Durante a padronização, foi determinada a melhor temperatura de *annealing* dos *primers* para  $\beta$ -actina e calpaína-2. A temperatura ideal é aquela em que não há amplificação inespecífica durante a reação de PCR. Foi constatada a especificidade da reação pela ausência de bandas de tamanho diferente do esperado na análise por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo (Figura 8). Esta especificidade também foi demonstrada por meio de uma curva de dissociação, sendo que a reação é considerada específica para os produtos de PCR analisados quando a curva de dissociação contém apenas um pico de fluorescência em uma determinada temperatura (Figura 9).

As reações de RTq-PCR foram realizadas no equipamento Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research), utilizando-se o *kit* comercial *Platinum® SYBR® Green q-PCR Supermix- UDG* (Invitrogen). O SYBR Green 1 é um corante utilizado como fluoróforo que emite um sinal de fluorescência ao se ligar às moléculas dupla-fitas de DNA, sendo que a excitação e emissão máxima do SYBR Green I ocorrem nos comprimentos de onda de 494 nm e 521 nm, respectivamente. Essas reações foram realizadas conforme recomendações do fabricante com algumas modificações, como mostrado a seguir:

<i>Platinum® SYBR® Green q-PCR Supermix- UDG</i>	12,5 µL
<i>Primer Forward</i> (10 pmoles/µL)	0,5 µL
<i>Primer Reverse</i> (10 pmoles/µL)	0,5 µL
Água estéril q.s.p.	9,0 µL
cDNA	2,5 µL

As amostras foram incubadas durante 10 min a 95° C para a denaturação das dupla- fitas de cDNA. A seguir, foram submetidas a 40 ciclos (15 s a 95° C, 45 s a 57 °C, e 90 s a 72° C) e, após o último ciclo, foi realizada a etapa de extensão final pela incubação por 4 min a 72°C.

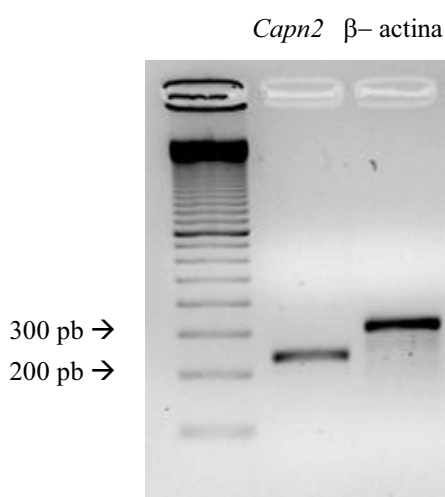


Figura 8. Gel de agarose corado com brometo de etídeo demonstrando os produtos da RT-qPCR para os genes *Capn 2* e β-actina.

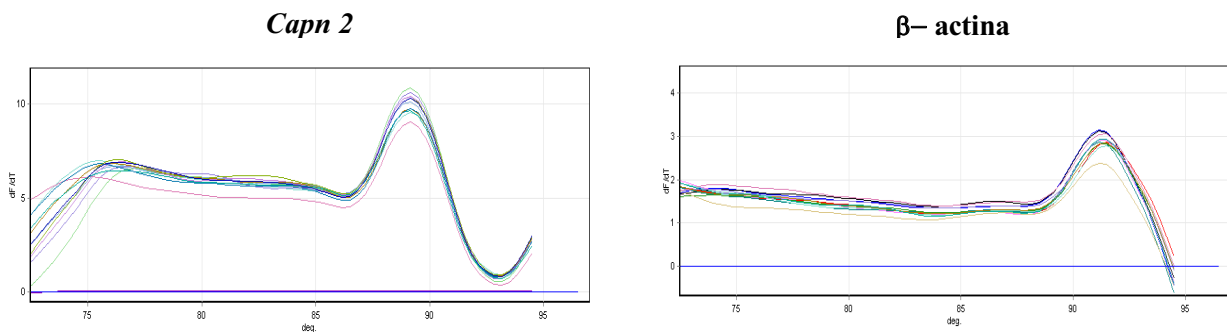


Figura 9. Gráfico mostrando as curvas de dissociação para os genes *Capn2* e  $\beta$ -actina.

### 3.7 Quantificação do conteúdo do mRNA do gene *Capn2*

A intensidade de expressão de cada gene foi obtida pelos valores de Ct (*Threshold cycle*) que é o número do ciclo calculado no qual o produto do PCR atinge um limiar de detecção, quando o aumento no sinal emitido pelo fluoróforo associado à fase exponencial de amplificação do produto de PCR começa a ser detectada. Para a quantificação relativa do produto de amplificação, foi realizado um experimento para calcular a eficiência de amplificação de cada um dos pares de *primers*. Este dado é importante para o cálculo final da expressão do gene-alvo (*Capn2*) em relação ao gene-normalizador ( $\beta$ -actina). Uma amostra de cDNA de ilhotas foi diluída 1:5, 1:50 e 1:500 e foi realizada uma reação de PCR em tempo real para cada par de *primers* em cada uma destas diluições. Foi construído um gráfico colocando o valor de Ct de cada diluição de cDNA em função da diluição da amostra, conforme demonstrado na Figura 10. A inclinação (*slope*) desta reta foi utilizada para o cálculo de eficiência de amplificação conforme a fórmula:

$$\text{Eficiência de amplificação} = 10^{(-1/\text{SLOPE})}$$

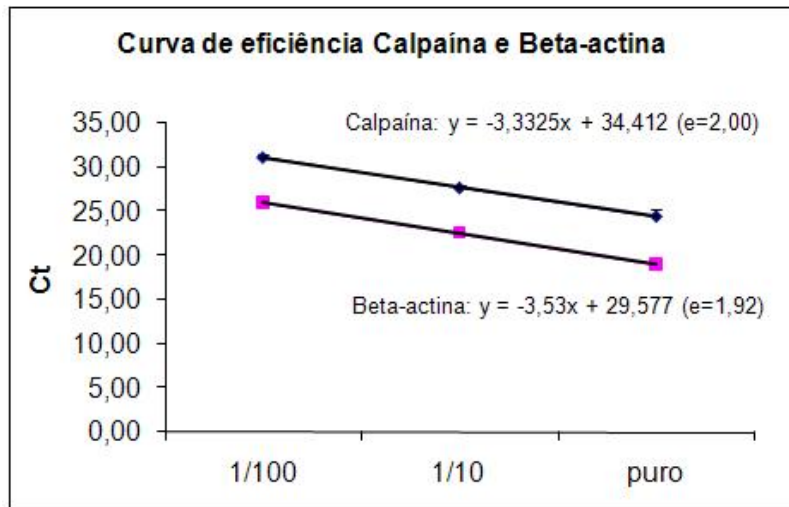


Figura 10. Eficiência de amplificação dos *primers* (Calpaína 2 e  $\beta$ -actina) utilizados na RT-qPCR.

A semelhança das eficiências de amplificação dos pares de *primers* do gene alvo e do gene normalizador da reação permitiu a utilização do seguinte modelo matemático para o cálculo da expressão relativa de cada amostra:

Expressão Relativa =  $2^{(\text{Delta Ct})}$ , onde:

Delta Ct = Ct do gene de referência ( $\beta$ -actina) – Ct do gene-alvo (Calpaína 2)<sup>xliv</sup>

### 3.8 Detecção de permeabilidade da membrana mitocondrial pelo *kit MitoProbe* (Molecular Probes)

A detecção de morte celular, pela análise da permeabilidade da membrana mitocondrial, foi realizada utilizando-se o *kit MitoProbe* (Molecular Probes). A permeabilidade mitocondrial é o evento que determina o início da apoptose celular mediada pela via intrínseca. O colapso no gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial leva à inserção de proteínas pró-apoptóticas membros da família BCL2, que acabam por formar poros que permitem a saída do citocromo c para o citoplasma e conseqüente formação do apoptossomo, composto pelo complexo citocromo c, caspase 9 e Apaf (fator ativador de proteases apoptóticas). A perda do potencial de membrana mitocondrial como marcador do processo de apoptose pode ser detectado pelo marcador

catiônico fluorescente iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1).

Durante a incubação, o JC-1 penetra nas células normais e apoptóticas. Nas células não apoptóticas, este reagente lipofílico que possui cargas positivas, entra na membrana mitocondrial que possui carga negativa, se agrega e emite uma fluorescência vermelha. Nas células apoptóticas, a perda do potencial de membrana impede que o reagente se acumule dentro da mitocôndria, e ele fica distribuído pela célula. Esta forma dispersa do reagente emite fluorescência verde, permitindo uma fácil distinção entre as células apoptóticas e não apoptóticas.

Após os tratamentos, as ilhotas pancreáticas foram retiradas da cultura, transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas. O precipitado de células foi suspenso em 500 µL de HBSS e foi adicionado 10 µL do corante JC-1. A seguir, as células foram incubadas a 37°C por 20 min na estufa a 5% de CO<sub>2</sub>. Após diversas lavagens, as ilhotas foram suspensas em 200 µL de HBSS e a suspensão de células foi analisada com microscopia de fluorescência, utilizando o microscópio Zeiss Axiovert 200® (Carl Zeiss, Alemanha) utilizando filtros para visualização de fluorescência verde (527 nm) e vermelha (590 nm). Os resultados foram analisados dividindo-se o valor de coloração verde pelo valor de coloração vermelha, calculados pelo *software* AxioVision nos grupos de ilhotas.

### 3.9 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa SPSS versão 13. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado na comparação entre dois grupos, enquanto o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado na comparação de mais de dois grupos. A hipótese de nulidade foi rejeitada sempre que o valor de *P* era menor que 5%. Nas figuras, os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Quantificação do conteúdo do mRNA de *Capn2*

No experimento de microarranjos, este gene foi positivamente regulado nas ilhotas mantidas em condições fisiológicas de glicose e tratadas com amilina fresca em relação ao controle. Esta alteração, entretanto, não se confirmou, pois não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de RNAm de *Capn 2* entre as diferentes condições experimentais na avaliação por RT-pPCR (Figura 11).

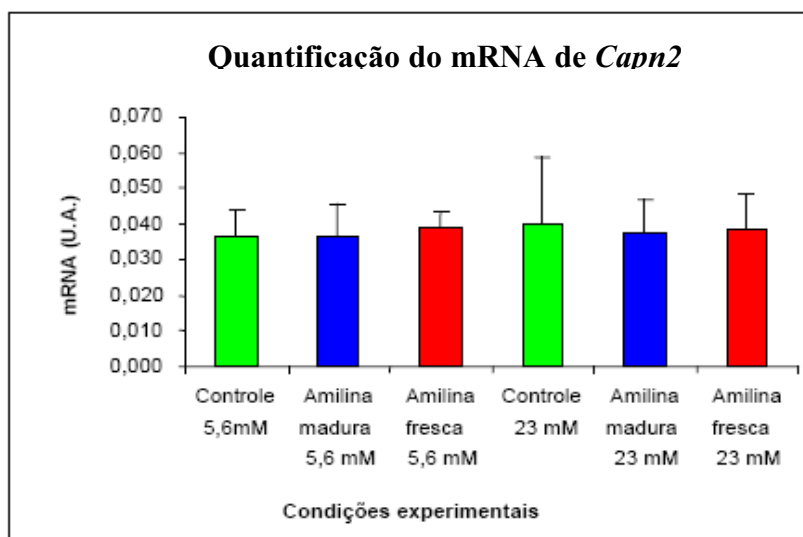


Figura 11: Quantificação do mRNA de *Capn2* nas diferente condições experimentais estudadas.

### 4.2 Detecção de permeabilidade da membrana mitocondrial pelo *kit MitoProbe* (Molecular Probes)

A análise do índice de apoptose das ilhotas pancreáticas submetidas aos tratamentos com fibrilas maduras ou com oligômeros de amilina revelou um efeito pró-apoptótico por parte ambos os tratamentos em relação ao controle. Entretanto, o tratamento com oligômeros de amilina de tamanho intermediário apresentou um maior potencial citotóxico sobre as ilhotas quando comparado ao tratamento com fibrilas maduras da proteína nas diferentes condições experimentais (Figuras 12 e 13).



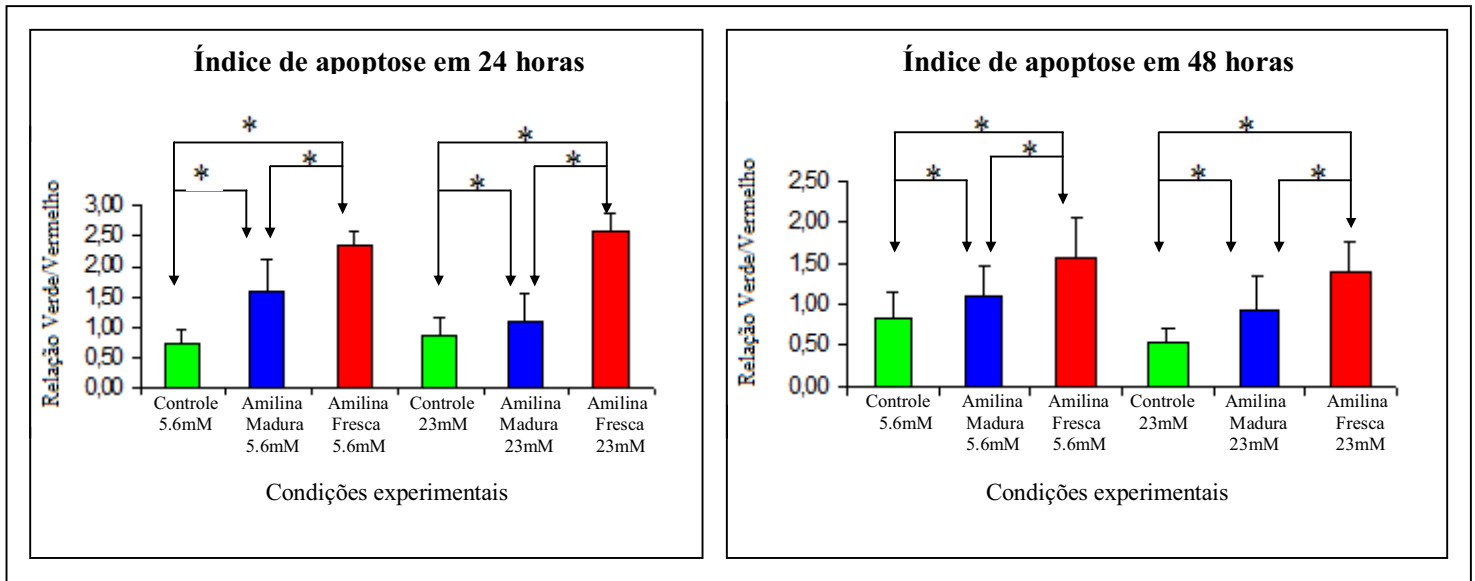


Figura 12. Gráficos representativos do índice de apoptose das ilhotas pancreáticas nas diferentes condições experimentais no Experimento 1 (\*= $p < 0,05$ )

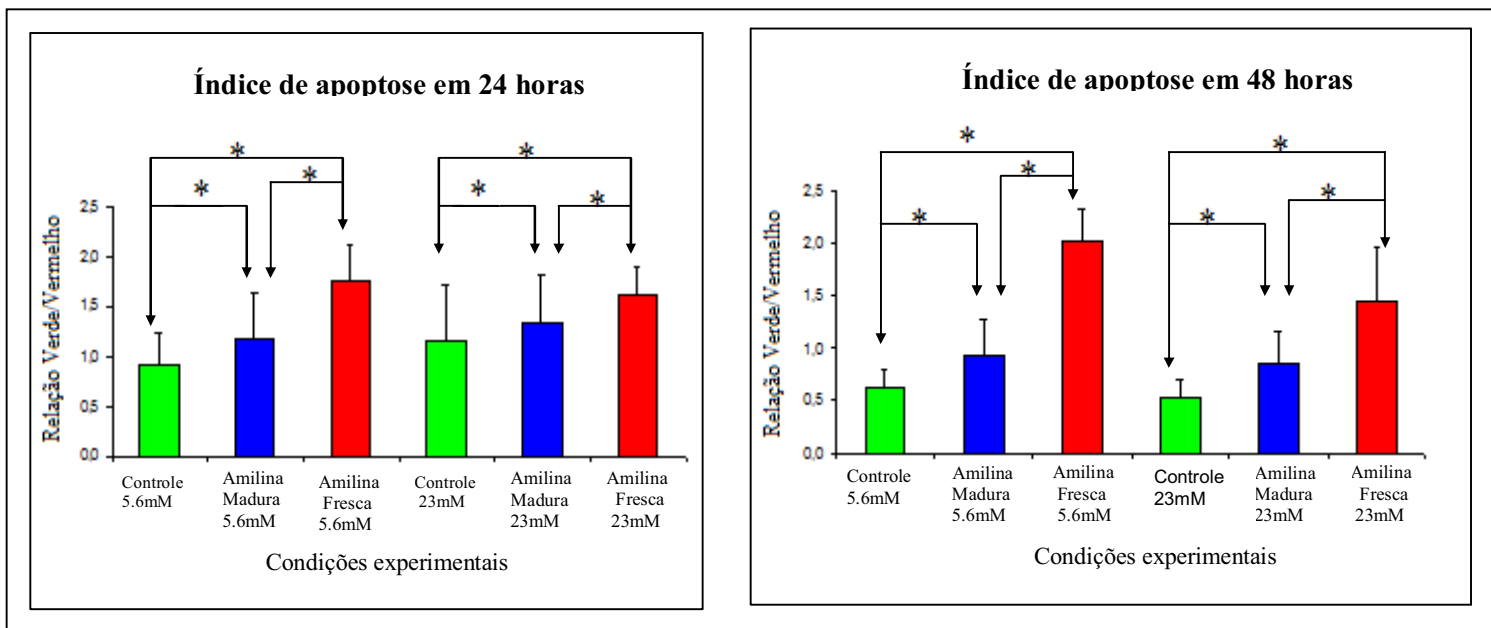


Figura 13. Gráficos representativos do índice de apoptose das ilhotas pancreáticas nas diferentes condições experimentais no Experimento 2 (\*= $p < 0,05$ )

## 5. DISCUSSÃO

Tem sido demonstrado que o depósito amilóide pode contribuir para a fisiopatologia do DM 2<sup>xxi, xlv</sup>. Há muitas evidências de que as moléculas de amilina que sofrem agregação *in vivo*, assim como a amilina humana, exercem efeitos pró-apoptóticos sobre as células  $\beta$  pancreáticas, sendo que estudos recentes têm indicado que as formas pré-fibrilares da amilina (oligômeros) são responsáveis pelos efeitos citotóxicos desta proteína<sup>xlvi, xlvii, vii</sup>, porém os mecanismos pelos quais a amilina exerce seu efeito deletério sobre as células  $\beta$  não estão totalmente esclarecidos.

Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos de toxicidade associados à forma agregante da amilina, foi desenvolvido em nosso laboratório um estudo comparando o perfil de expressão gênica de ilhotas pancreáticas expostas a fibrilas intermediárias e a fibrilas maduras de amilina. A metodologia empregada neste estudo foi a de microarranjos de DNA, que possibilita ter uma idéia geral das vias que estão sendo moduladas em cada uma das situações estudadas. Na tentativa de melhor mimetizar *in vitro* o ambiente ao qual a ilhota está exposta *in vivo* no paciente diabético, optamos por realizar os tratamentos não somente em concentrações fisiológicas de glicose (5,6 mM), como também em concentração supra-fisiológica de glicose (23 mM), mesmo sabendo que não estaríamos reproduzindo completamente o ambiente ao qual a ilhota de um paciente com DM2 está exposta, já que não consideramos a presença, por exemplo, da lipotoxicidade.

Dentre os genes modulados pela amilina fresca, selecionamos o gene que codifica a Calpaína 2, cuja expressão aumentou em relação às ilhotas não tratadas, para validação por RT-qPCR nas condições experimentais estudadas. Este gene foi selecionado por seu envolvimento no processo de apoptose, uma vez que esta via mostrou-se modulada pelos oligômeros de amilina. Os resultados obtidos nos experimentos de RT-qPCR não confirmaram aqueles observados no estudo de microarranjos de DNA, pois não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de mRNA de Calpaína 2 entre as diferentes condições experimentais em estudo. Visto que a técnica de estudo de expressão gênica diferencial por microarranjos de DNA está sujeita a grande variabilidade, recomenda-se que sejam realizadas várias replicatas de um mesmo experimento<sup>xlviii</sup>, o que pode ser impossibilitado por questões econômicas, pois se trata de

uma técnica ainda cara. Por essa razão, recomenda-se que os resultados obtidos por essa metodologia sejam validados por outras técnicas, como, por exemplo, o RT-qPCR. Os resultados aqui obtidos sugerem que o achado para o gene da Calpaína 2 no estudo de microarranjos após tratamento com amilina fresca tenha sido um falso positivo, sendo que o aumento da magnitude de expressão do RNA mensageiro da calpaína 2 provavelmente não ocorre no processo de apoptose das ilhotas submetidas ao tratamento com oligômeros de amilina. Este achado não exclui a participação da Calpaína 2 no processo de apoptose induzido por amilina, já que não estudamos as concentrações da proteína ou a atividade da mesma nas condições experimentais testadas.

Para complementar a avaliação dos efeitos das duas formas de amilina sobre as ilhotas pancreáticas, procedemos à análise comparativa do índice de apoptose de ilhotas tratadas pelas fibrilas maduras de amilina e pelos oligômeros de amilina de tamanho intermediário. Para isto, analisamos a permeabilidade da membrana mitocondrial por tratar-se do evento inicial que determina a apoptose celular mediada pela via intrínseca. Os resultados obtidos neste estudo vão ao encontro dos dados mais recentes da literatura, que apontam para um maior potencial citotóxico dos oligômeros de amilina em relação às fibrilas maduras. Este efeito foi semelhante tanto em ilhotas mantidas em concentração fisiológica quanto em concentração suprafisiológica de glicose, bem como nos dois tempos estudados (24 e 48 horas). Ressaltamos, entretanto, que no presente estudo, as fibrilas maduras de amilina também exerceram um efeito pró-apoptótico sobre as ilhotas, ainda que de menor magnitude que os oligômeros de amilina.

Os dados obtidos no presente estudo sugerem que os efeitos deletérios da amilina sobre as ilhotas pancreáticas estejam mais relacionados ao processo de formação do amilóide do que ao amilóide já formado e que o efeito pró-apoptótico exercido pela mesma sobre as ilhotas não envolva o aumento do RNA mensageiro da calpaína 2.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- <sup>i</sup> Nathan DM, Cagliero E. Diabetes Mellitus. In: Felig P, Frohman LA. Endocrinology and Metabolism (4 Ed). United States of America: McGraw-Hill Company. 2001:827-926.
- <sup>ii</sup> Reaven GM. Banting Lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607, 1988.
- <sup>iii</sup> Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Sletten K. A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 140:827-31, 1986.
- <sup>iv</sup> Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis: the *b*-fibrilloses. *N Engl J Med* 302:1283-92, 1980.
- <sup>v</sup> Cooper GJS, Willis AC, Clark A et al. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 8628-32, 1987.
- <sup>vi</sup> Pepys MB, Booth DR, Hutchinson WL et al. Amyloid P component: a critical review. *Amyloid* 4:274-95, 1997.
- <sup>vii</sup> Konarkowska B, Aitken JF, Kistler J et al. The aggregation potential of human amylin determines its cytotoxicity towards islet  $\beta$ -cells. *FEBS Journal* 273:3614-3624, 2006.
- <sup>viii</sup> Cooper GJS, Day AJ, Willis, AC et al. Amylin and the amylin gene: structure, function and relationship to islet amyloid and to diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta* 1014: 247-58, 1989.
- <sup>ix</sup> Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB. Islet amyloid: a long recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 241–53, 1999.
- <sup>x</sup> Mosselman S, Höppener JWM, Zandberg J, et al. Islet amyloid polypeptide: identification and chromosomal localization of the human gene. *FEBS Lett* 239:227-32, 1988.
- <sup>xi</sup> Cook JTE, Patel PP, Clark A, et al. Non-linkage of the islet amyloid polypeptide gene with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 34:103-8, 1991.

- 
- <sup>xii</sup> Nishi M, Bell GI, Steiner DF. Islet amyloid polypeptide (amylin): no evidence of an abnormal precursor sequence in 25 type 2 (non-insulindependent) diabetic patients. *Diabetologia* 33:628-30, 1990.
- <sup>xiii</sup> Muff R, BornW, Fischer JA. Calcitonin, calcitonin generelated peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions. *Eur J Endocrinol* 133: 17-20, 1995.
- <sup>xiv</sup> Chen WJ, Armour S, Way J et al. Expression cloning and receptor pharmacology of human calcitonin receptors from MCF-7 cells and their relationship to amylin receptors. *Mol Pharmacol* 52: 1164-1175, 1997.
- <sup>xv</sup> Christopoulos G, Perry KJ, Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product *Mol Pharmacol* 56:235-242, 1999.
- <sup>xvi</sup> Muff R, et al. An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology* 140: 2924-7,1999.
- <sup>xvii</sup> Gebre-Medhin S, Olofsson C, Mulder H. Islet amyloid polypeptide in the islets of Langerhans: friend or foe? *Diabetologia* 43: 687-95, 2000.
- <sup>xviii</sup> Wagoner PK, Chen C, Worley JF et al. Amylin modulates beta-cell glucose sensing via effects on stimulus-secretion coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9145-9, 1993.
- <sup>xix</sup> Westermark P. Amyloid and polypeptide hormones: what is their interrelationship? *Amyloid* 1: 47–58, 1994.
- <sup>xx</sup> de Koning EJP, Bodkin NL, Hansen BC, et al. Diabetes mellitus in *Macaca mulatta* monkeys is characterised by islet amyloidosis and reduction in beta-cell population. *Diabetologia* 36: 378–84, 1993.
- <sup>xxi</sup> Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC and Yankner BA. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* 368: 756-60, 1994.
- <sup>xxii</sup> Janciauskiene S, and Ahren B. Fibrillar islet amyloid polypeptide differentially affects oxidative mechanisms and lipoprotein uptake in correlation with cytotoxicity in two insulin-producing cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 619-625, 2000.

- 
- <sup>xxiii</sup> Mirzabekov TA, Lin MC and Kagan B L. Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin *J Biol Chem* 271: 1988-92, 1996.
- <sup>xxiv</sup> Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S, Butler PC. The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate- sized toxic amyloid particles. *Diabetes* 48:491-8, 1999.
- <sup>xxv</sup> Meier JJ, Kaye R, Lin CY et al. Inhibition of human IAPP fibril formation does not prevent  $\beta$ -cell death: evidence for distinct actions of oligomers and fibrils of human IAPP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E1317-E1324, 2006.
- <sup>xxvi</sup> Hull RL, Westermark GT, Westermark P., and Kahn SE. Islet Amyloid: A Critical Entity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3629-3643, 2004.
- <sup>xxvii</sup> Wylie AH: Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 53: 451 - 65 , 1997.
- <sup>xxviii</sup> Salvesen GS, Dixit VM: Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91: 443 - 46, 1997.
- <sup>xxix</sup> Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 53: 491 - 08 , 1997.
- <sup>xxx</sup> Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochemical Pharmacology* 66: 1433-40, 2003.
- <sup>xxxi</sup> Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. Structure, activation and biology of calpain. *Diabetes* 53: Suppl 1:S12-8, 2004.
- <sup>xxxii</sup> Ortho-Malender M, Klannemark M, Svensson MK et al. Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid level. *Diabetes* 51:2658–2664, 2002
- <sup>xxxiii</sup> Jia Z, Petrounevitch V, Wong A. et al. Mutations in calpain 3 associated with limb girdle muscular dystrophy: analysis by molecular modeling and by mutation in m-calpain. *Biophys J.* 80:2590-6, 2001.
- <sup>xxxiv</sup> Raynaud F, Marcilhac A. Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease. *FEBS Journal* 273:3437–3443, 2006.
- <sup>xxxv</sup> Suzuki K, Tsuji S, Kubota S, Kimura Y, Imahori K. Limited autolysis of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  ions. *J Biochem.* 90:275-8, 1981.

- 
- <sup>xxxvi</sup> Biswas S, Harris F, Dennison S, Singh JP, Phoenix D. Calpain: enzymes of vision? *Med Scie Monit* 11: 301-10, 2005.
- <sup>xxxvii</sup> Wu HY, Tomizawa K, Matsui H. Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder. *Acta Med Okayama*. 61:123-37, 2007
- <sup>xxxviii</sup> Squier MK. et al. Calpain activation in apoptosis. *J. Cell Physiol*. 159, 229–237, 1994.
- <sup>xxxix</sup> Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci*. 23:20–26, 2000.
- <sup>xl</sup> Nakagawa T, and Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell. Biol.* 150: 887–894, 2000.
- <sup>xli</sup> Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 37:719-27, 2005.
- <sup>xlii</sup> Yates SL, Burgess LH, Kocsis-Angle J, Antal JM, Dority MD, Embury PB, Piotrkowski AM, Brunden KR. Amyloid  $\beta$  and Amylin Fibrils Induce Increases in Proinflammatory Cytokine and Chemokine Production by THP-1 Cells and Murine Microglia. *J. Neurochem* 74:1017–1025, 2000.
- <sup>xliii</sup> Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream *Experimental Hematology*. 30 (6): 503-512, 2002.
- <sup>xliv</sup> Yuan J, Reed A, et al. Statistical Analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7:85, 2006.
- <sup>xlv</sup> Clark A, Cooper GJ, et al. Islet amyloid formed from diabetes-associated peptide may be pathogenic in type-2 diabetes. *Lancet* 2: 231–234, 1987.
- <sup>xlvi</sup> Bai JZ, Saafi EL, Zhang S. and Cooper GJ. Role of  $\text{Ca}^{2+}$  in apoptosis evoked by human amylin in pancreatic islet  $\beta$ -cells. *Biochem J* 343: 53–61, 1999.
- <sup>xlvii</sup> Zhang S, Liu J, Dragunow M and Cooper GJ. Fibrillogenic amylin evokes islet  $\beta$ -cell apoptosis through linked activation of a caspase cascade and JNK1. *J Biol Chem* 278: 52810–52819, 2003.
- <sup>xlviii</sup> Lee MLT, et al. Importance of replication in microarray gene expression studies: Statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *PNAS* 97: 9834-9839, 2000.