

Metformina aumenta a expressão da IDE, mas não reduz a morte causada pelo hIAPP nas células INS-1E

Autores: Carine Marmentini¹, Antonio C Boschero¹ e Mirian A Kurauti¹

¹Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo, Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

Introdução

O polipeptídeo amiloide da ilhota humana (hIAPP) é um hormônio co-secretado com a insulina pelas células β pancreáticas e é o principal componente do amiloide pancreático. O amiloide pancreático é encontrado no pâncreas de pacientes com diabetes tipo 2 e pode estar envolvido na disfunção e morte das células β pancreáticas, observadas nesta doença. A *insulin degrading enzyme* (IDE) é uma das principais enzimas responsáveis pela degradação do hIAPP e estudos têm mostrado que a expressão da IDE pode ser modulada pela *AMP-activated protein kinase* (AMPK) em neurônios e no músculo esquelético. Sendo assim, investigamos se a metformina, um ativador de AMPK, é capaz de modular a expressão de IDE e proteger as células β pancreáticas (INS-1E) da morte induzida por hIAPP

Métodos

Para avaliar se a metformina poderia modular o conteúdo proteico da IDE nas células INS-1E, realizamos um *time course* (tempos 0, 0,5, 2, 8, 16 e 24 h) utilizando 0,5 mM e 1 mM de fármaco. Em seguida, testamos se a concentração capaz de aumentar o conteúdo proteico da IDE também poderia alterar sua expressão gênica e atividade. Nosso próximo passo, foi investigar se a metformina poderia proteger as INS-1E da morte induzida pelo hIAPP. Primeiramente, determinamos a concentração de hIAPP capaz de provocar a morte celular. Para isso, as células foram incubadas com 10 ou 20 μ M de hIAPP por 48 h. Depois de identificada a concentração tóxica de hIAPP, as células foram incubadas com meio contendo apenas o solvente (CTL), hIAPP (hIAPP) ou hIAPP + metformina (hIAPP + MET) por 24 ou 48 h, para análise da viabilidade celular, produção de espécies reativas de oxigênio e de marcadores do estresse de retículo endoplasmático. Para as análises estatísticas, usamos o teste t de Student ou ANOVA de uma via.

Resultados

A concentração de 1 mM de metformina aumentou o conteúdo proteico (0 h: $96,95 \pm 16,38$; 16 h: $291,5 \pm 19,41$) e a expressão gênica da IDE (CTL: $100,0 \pm 11,42$; MET: $193,5 \pm 21,12$) após 16h de tratamento. A atividade da enzima não foi alterada pelo fármaco (CTL: $0,0009624 \pm 0,0001603$; MET: $0,0008083 \pm 0,0001490$). Identificamos que a concentração de 20 μ M de hIAPP, após 48 h, aumentou a porcentagem de células mortas (CTL: $100,0 \pm 34,80$; hIAPP 10 μ M: $160,5 \pm 37,38$; hIAPP 20 μ M: $303,9 \pm 33,21$). Sendo assim, adotamos essa concentração para induzir a morte celular nos experimentos seguintes. Curiosamente, o tratamento com a metformina, ao invés de proteger, potencializou a morte causada pelo hIAPP (CTL: $100,0 \pm 18,22$; hIAPP: $290,6 \pm 91,72$; hIAPP+MET: 3425 ± 383). A incubação concomitante com hIAPP e metformina causou aumento do estresse oxidativo (CTL: $100,0 \pm 12,89$; hIAPP: $135,5 \pm 18,24$; hIAPP+MET: $238,0 \pm 38,91$) e da expressão de marcadores de estresse de retículo endoplasmático como a p-eIF2 α (CTL: $108,3 \pm 10,40$; hIAPP: $196,2 \pm 37,40$; hIAPP+MET: $336,9 \pm 40,08$) e a p-JNK (CTL: $100,0 \pm 4,66$; hIAPP: $85,56 \pm 7,12$; hIAPP+MET: $159,2 \pm 13,11$).

Conclusão

Apesar de aumentar a expressão de IDE, a metformina potencializou a morte causada pelo hIAPP nas células INS-1E. Nossos resultados indicam que o aumento do estresse oxidativo e a indução do estresse de retículo endoplasmático podem ser mecanismos envolvidos nesse efeito.