ANGELO GUSTAVO DI STEFANO

**O papel do HNF4 α na morte das células beta pancreáticas induzida
por citocinas pró-inflamatórias**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2019

ANGELO GUSTAVO DI STEFANO

**O papel do HNF4 α na morte das células beta pancreáticas induzida
por citocinas pró-inflamatórias**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ortis

Versão parcial

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Di Stefano, Angelo Gustavo

O papel do HNF4? na morte das células beta
pancreáticas induzida por citocinas pró-inflamatórias
/ Angelo Gustavo Di Stefano; orientadora Fernanda
Ortis. -- São Paulo, 2019.

69 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Diabetes mellitus. 2. Célula beta
pancreática. 3. Morte celular. 4. Hepatocyte
nuclear factor 4 alpha. I. Ortis, Fernanda,
orientador. II. Título.

Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº.: 066/2015)

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.098/2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 066/2015/CEUA, datado de 27/07/2015, e por solicitação da Profa. Dra. **Fernanda Ortis**, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Angelo Augusto Di Stefano** ao Projeto de Pesquisa "*Estudo da ativação diferencial de NFkB em células beta pancreáticas e dos mecanismos que podem ser modulados para a prevenção de seu caráter pró-apoptótico*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 29 de maio de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador da CEUA-ICB/USP

RESUMO

DI STEFANO, A. G. **O papel do HNF4 α na morte das células beta pancreáticas induzida por citocinas pró-inflamatórias.** 2019. 69f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune que causa a disfunção e a destruição das células β pancreáticas, produtoras de insulina, ao induzir vias pró-apoptóticas, como o estresse de retículo endoplasmático (RE), devido a exposição dessas células à citocinas pró-inflamatórias. O *Mature-onset diabetes of the youth type 1* (MODY1) é um tipo de DM causado por mutações no gene *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha* (HNF4 α), levando a deficiência na secreção de insulina. Além de outras diversas funções na diferenciação e da sobrevivência das células β , esse gene também é importante para a manutenção da homeostase do RE, sugerindo que o papel do HNF4 α na regulação da secreção de insulina poderia estar relacionado a viabilidade das células β frente a exposição à citocinas pró-inflamatórias. Sendo assim, o estudo visou avaliar o papel desse gene na disfunção e morte de células β após exposição destas às citocinas pró-inflamatórias. Foi realizado o silenciamento do HNF4 α em células de insulinoma de rato (INS-1E) com siRNA seguido de tratamento com citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β + IFN- γ + TNF) ou taspigargina (indutor de estresse de RE) para avaliação da ativação da Caspase-3 e das proteínas de estresse de RE (p-eIF2 α , p-IRE1 e XBP1s) por western blot. Para avaliar o efeito do HNF4 α no metabolismo da glicose, foi realizado o Teste de Tolerância a Glicose (GTT) em camundongos da linhagem InsCRE.HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$, após a indução do *knockout*. Em seguida, foi avaliado por western blot a expressão de Caspase-3 nas ilhotas dos camundongos *knockout* após exposição aos mesmos tratamentos que as células INS-1E. Também foi avaliada a expressão de insulina e glucagon nessas ilhotas através de imunohistoquímica. A redução da expressão do HNF4 α protegeu contra morte por apoptose, pois diminui a expressão de Caspase-3 ativada nas células INS-1E e nas ilhotas *knockout*. Além disso, houve a redução da expressão das proteínas relacionadas ao estresse de RE nas células INS-1E. Animais HNF4 α *knockout* apresentam tolerância diminuída a glicose. As ilhotas *knockout* apresentaram significativa redução na marcação de insulina. Como um todo, esses resultados mostram que o HNF4 α parece ter uma participação

deletéria em células β expostas à citocinas pró-inflamatórias, porém exerce um importante papel na função fisiológica dessas células. Frente a esses resultados, sugere-se um importante papel do HNF4 α na manutenção do estado diferenciado das células β , pois, devido à perda desse estado diferenciado, pela redução da expressão desse fator de transcrição, essas células param de responder às citocinas pró-inflamatórias como esperado de uma célula β normal. Sendo assim, um melhor entendimento das vias reguladas pelo HNF4 α em células β é de extrema importância para o desenvolvimento de terapias de prevenção da função e viabilidade dessas células.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*. Célula beta pancreática. Morte celular. *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha*.

ABSTRACT

DI STEFANO, A. G. **Hole of HNF4 α in cell death of pancreatic beta cell induced by proinflammatory cytokines.** 2019. 69p. Dissertation (Master's thesis in Celular and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is an autoimmune disease that causes dysfunction and destruction of insulin-producing pancreatic β cells by inducing pro-apoptotic pathways such as endoplasmic reticulum (ER) stress due to exposition to proinflammatory cytokines. Mature-onset diabetes of the youth type 1 (MODY1) is a type of DM caused by mutations in the Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α) gene, leading to deficiency in insulin secretion. Besides several other functions in the differentiation and survival of β cells, this gene is also important for the maintenance of ER homeostasis, suggesting that the role of HNF4 α regulating insulin secretion could be related to β cell viability exposed to proinflammatory cytokines. Thus, this study aimed to evaluate the role of this gene in dysfunction and death of β cells after exposure to proinflammatory cytokines. The expression of HNF4 α was reduced in rat insulinoma cells (INS-1E) with siRNA followed by treatment with proinflammatory cytokines (IL-1 β + IFN- γ + TNF) or thapsigargin (ER stress inducer) to evaluate activation of Caspase-3 and expression of ER stress proteins (p-eIF2 α , p-IRE1 and XBP1s) by western blot. To evaluate the effect of HNF4 α on glucose metabolism, the Glucose Tolerance Test (GTT) was performed on InsCRE.HNF4 $\alpha^{\text{loxP}} / \text{loxP}$ mice after knockout induction. Then, expression of Caspase-3 in islets of knockout mice by western blot was evaluated after exposure to the same treatments as INS-1E cells. The expression of insulin and glucagon in these islets was also evaluated by immunohistochemistry. Reduced HNF4 α expression protected against death by apoptosis decreasing activated Caspase-3 in INS-1E cells and knockout islets. In addition, there was a reduced expression of ER stress-related proteins in INS-1E cells. Animals HNF4 α knockout exhibit decreased glucose tolerance. Knockout islets showed significant reduction in insulin labeling. Overall, these results show that HNF4 α appears to have a deleterious effect on β cells exposed to proinflammatory cytokines, but have an important role in the physiological function of these cells. Given these results, it is suggested an important role of HNF4 α in maintaining the differentiated state of β cells, because, due to the loss of this differentiated state, by

reducing the expression of this transcription factor, these cells stop responding to pro-inflammatory cytokines as expected from a normal β cell. Thus, a better understanding of the pathways regulated by HNF4 α in β cells is extremely important for the development of therapies to maintain the function and viability of these cells.

Keywords: Diabetes mellitus. Pancreatic beta cell. Cell death. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha.

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica considerada uma das maiores emergências em saúde pública no Brasil e no mundo, devido ao aumento do número de casos ao longo dos anos e pelos efeitos provocados no organismo em longo prazo, principalmente nos casos não diagnosticados ou corretamente tratados (FID, 2018).

Existem diferentes tipos de DM que são classificados pela etiologia e pela forma de como a doença se desenvolve no organismo. O diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) é caracterizado por um ataque autoimune específico às células β pancreáticas, produtoras do hormônio insulina, responsável pelo metabolismo da glicose no organismo. Esse ataque autoimune ocorre pela ação de células do sistema imune, as quais produzem citocinas pró-inflamatórias que induzem, dentre outros efeitos, a disfunção das células β e ativação de diversos mecanismos intracelulares que culminam na indução a apoptose (EIZIRIK et al., 2009).

Durante o processo inflamatório produzido pelas citocinas, um dos principais mecanismos responsáveis pela indução da morte das células β é o estresse de retículo endoplasmático (RE), o qual altera a homeostase do RE prejudicando a função dessas células. Frente a isso, diversos mecanismos intracelulares são ativados visando recuperar a homeostase do RE, porém, caso a homeostase não seja recuperada, são induzidas as vias responsáveis pela apoptose (OSLOWSKI & URANO, 2011).

A recuperação da homeostase do RE, nesse contexto, torna-se importante para a sobrevivência das células β durante o efeito deletério produzido pelas citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, a melhor compreensão dos mecanismos relacionados a indução da morte e susceptibilidade dessas células ao estresse de RE, bem como formas de modulação das vias de recuperação da homeostase tem se tornado, recentemente, alvo de diversos estudos sobre o desenvolvimento do DM. Dentre os diversos mecanismos relacionados as vias de sobrevivência da célula β , a importância do fator de transcrição *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha* (HNF4 α) para a fisiologia dessas células vêm sendo melhor estudado quando se descobriu que mutações no gene do HNF4 α são responsáveis pelo desenvolvimento do *Mature-onset diabetes of the youth type 1* (MODY 1), um tipo de DM (SHIH & STOFFEL, 2002; GUPTA et al., 2005).

O HNF4 α apresenta um importante papel na formação e função de diversos tipos de células secretoras no organismo (BABEU & BOUDREAU, 2014; LAU et al., 2018). Nas células β , o HNF4 α atua em mecanismos intracelulares responsáveis pela

diferenciação e sobrevivência celular, assim como na secreção de insulina (FERRER, 2002; ODOM et al., 2004; GUPTA et al., 2005, 2007; MIURA et al., 2006; RIECK et al., 2012; SATO et al., 2012; MOORE et al., 2016a, 2016b). Apesar dos inúmeros trabalhos demonstrando a importância do HNF4 α para a fisiologia das células β , pouco ainda se sabe sobre os mecanismos relacionados a disfunção com os quais esse fator de transcrição possa estar envolvido, bem como sua relação com vias pró-apoptóticas do estresse de RE.

Dessa forma, o presente trabalho visa avaliar o efeito da presença ou ausência do HNF4 α na viabilidade e na susceptibilidade ao estresse de RE frente a exposição das células β a citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pelo desenvolvimento do DM1.

7 CONCLUSÃO

A expressão de HNF4 α é importante para morte da célula β induzida por citocinas pró-inflamatórias. Esses efeitos parecem estar relacionados com modulação das proteínas do estresse de RE, porém outros fatores como indução da dediferenciação poderiam estar envolvidos alterando a resposta esperada das células β frente às citocinas pró-inflamatórias. Apesar disso, confirmamos que a presença de HNF4 α nessas células é importante para a manutenção da sua função e do seu estado diferenciado em ilhotas pancreáticas.

Alguns dos principais pontos observados foram: a redução da expressão de HNF4 α melhorou a viabilidade das células β , devido a diminuição da expressão de Caspase-3 e das proteínas do estresse de RE. O silenciamento da expressão de HNF4 α nas células INS-1E causou a redução da expressão de Caspase-3 frente a citocinas pró-inflamatórias por 16 horas e nas ilhotas pancreáticas dos animais *knockout* observou-se uma tendência a redução da expressão de Caspase-3 no tratamento com citocinas pró-inflamatórias por 24 horas. O silenciamento causou também a redução da expressão das proteínas do estresse de RE p-eIF2 α e p-IRE1 e uma tendência a redução do XBP1s nos tratamentos com tapsigargina por 16 horas. Além disso, o silenciamento do HNF4 α também causou uma tendência a redução da expressão de p-eIF2 α e XBP1s nos tratamentos com citocinas pró-inflamatórias por 24 horas.

A expressão de HNF4 α é importante para o funcionamento das células β , pois a redução da expressão desse fator de transcrição nas células β causou a diminuição da expressão de XBP1s em condições basais, proteína cuja expressão basal é importante para a função das células β . Associado a isso, animais HNF4 α *knockout* apresentam tolerância diminuída a glicose e a ilhotas desses animais apresentaram redução da marcação de insulina por imunohistoquímica.

Dessa forma, a redução da expressão de HNF4 α melhorou a viabilidade, porém, a expressão desse fator de transcrição é importante para o funcionamento das células β . Sendo assim, sugere-se que esses efeitos podem estar relacionados a perda do estado diferenciado das células β , fazendo com que essas células parem de responder a esses estímulos da mesma forma que se era esperado de uma célula β normal.

Para a melhor investigação da correlação da expressão do HNF4 α com a diferenciação das células β , seria necessário investigar a expressão de genes relacionados

ao estado diferenciado de células β em linhagem celular com silenciamento do HNF4 α e nas ilhotas de camundongos *knockout*. Além disso, seria necessário aumentar o número de experimentos no GTT, com células as INS-1E e com as ilhotas *knockout* expostas a citocinas pró-inflamatórias e a taspigargina, pois, estatisticamente falando, alguns resultados apresentados aqui demonstraram tendência a redução e/ou aumento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

IDF - INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas - 8th Edition**, 2017.

OLIVEIRA, J. et al. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. São Paulo: Editora Clannad, 2017.

ABDULREDA, M. H. et al. The different faces of the pancreatic islet. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]938p. 11–24.

ALYAFEI, F. et al. Clinical and biochemical characteristics of familial type 1 diabetes mellitus (FT1DM) compared to non-familial type 1 DM (NFT1DM). **Acta Bio Medica Atenei Parmensis**, v. 89, n. S5, p. 27–31, 23 maio 2018.

ANIK, A. et al. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): An update. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, 2015. .

ARNES, L. et al. Ghrelin Expression in the Mouse Pancreas Defines a Unique Multipotent Progenitor Population. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 52026, 2012.

BABEU, J. P.; BOUDREAU, F. Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 1, p. 22–30, 2014.

BADER, E. et al. Identification of proliferative and mature β -cells in the islets of langerhans. **Nature**, v. 535, n. 7612, p. 430–434, 11 jul. 2016.

BERTOLOTI, A. et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 6, p. 326–332, 8 jun. 2000.

BISHAY, R. H.; GREENFIELD, J. R. A review of maturity onset diabetes of the young (MODY) and challenges in the management of glucokinase-MODY. **The Medical journal of Australia**, 21 nov. 2016. .

BONNEFOND, A. et al. Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e37423, 11 jun. 2012.

BOROWIEC, M. et al. Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and β -cell dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 34, p. 14460–14465, 2009.

BOWMAN, P. et al. Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY. **Diabetologia**, v. 55, n. 1, p. 123–127, 2012.

BOYCE, M. et al. A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. **Science**, v. 307, n. 5711, p. 935–939, 11 fev. 2005.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BOYD, M. et al. Mapping of HNF4 α target genes in intestinal epithelial cells. **BMC Gastroenterology**, v. 9, p. 68, 2009.

BRAGANZA, J. M. The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease. **Gut**, v. 35, n. 3, p. 431–432, 1994.

BROZZI, F. et al. Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. **Diabetologia**, v. 58, n. 10, p. 2307–2316, 2015.

BRUN, P. J. et al. Retinoic acid receptor signaling is required to maintain glucose-stimulated insulin secretion and β -cell mass. **FASEB Journal**, v. 29, n. 2, p. 671–683, fev. 2015.

BYRNE, M. M. et al. Altered insulin secretory responses to glucose in subjects with a mutation in the MODY1 gene on chromosome 20. **Diabetes**, v. 44, n. 6, p. 699–704, 1 jun. 1995.

CABRERA, O. et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 7, p. 2334–2339, 2006.

CARDOZO, A. K. et al. Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca²⁺ ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca²⁺, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic β -cells. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 452–461, 1 fev. 2005.

CHAN, J. Y. et al. The balance between adaptive and apoptotic unfolded protein responses regulates β -cell death under ER stress conditions through XBP1, CHOP and JNK. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 413, p. 189–201, set. 2015.

CHELLAPPA, K. et al. Opposing roles of nuclear receptor HNF4 α isoforms in colitis and colitis-associated colon cancer. **eLife**, v. 5, n. MAY2016, 11 maio 2016.

CHEN, W. S. et al. Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. **Genes and Development**, v. 8, n. 20, p. 2466–2477, 1994.

CHRISTOFFERSSON, G.; RODRIGUEZ-CALVO, T.; VON HERRATH, M. Recent advances in understanding Type 1 Diabetes. **F1000Research**, 2016.

CNOP, M. et al. Mechanisms of pancreatic β -cell death in Type 1 and Type 2 diabetes many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54, n. suppl 2, p. S97–S107, 2005.

CNOP, M. et al. Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 γ dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 6, p. 3989–3997, 2007.

COBO-VUILLEUMIER, N. et al. LRH-1 agonism favours an immune-islet dialogue

which protects against diabetes mellitus. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1488, 16 dez. 2018.

EDGHILL, E. L. et al. Insulin mutation screening in 1,044 patients with diabetes mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 1034–1042, 2008.

EIZIRIK, D. L. et al. The human pancreatic islet transcriptome: Expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 3, 2012.

EIZIRIK, D. L.; COLLI, M. L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and B-cell loss in type 1 diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, abr. 2009. .

EIZIRIK, D. L.; MANDRUP-POULSEN, T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. **Diabetologia**, v. 44, n. 12, p. 2115–2133, 2001.

EIZIRIK, D. L.; MIANI, M.; CARDOZO, A. K. Signalling danger: Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. **Diabetologia**, 7 fev. 2013. .

ELLARD, S. et al. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. **Diabetologia**, v. 51, n. 4, p. 546–553, 23 abr. 2008.

FAJANS, S. S.; BELL, G. I. MODY: History, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. **Diabetes Care**, 25 ago. 2011. .

FERREIRA, T.; RASBAND, W. ImageJ User Guide User Guide ImageJ. **Image J user Guide**, v. 1.46r, 2012.

FERRER, J. A genetic switch in pancreatic β -cells: Implications for differentiation and haploinsufficiency. **Diabetes**, v. 51, n. 8, p. 2355–2362, 2002.

GONZALEZ, F. J. Regulation of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α -mediated Transcription. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 23, n. 1, p. 2–7, 1 jan. 2008.

GUO, S.; LU, H. Novel mechanisms of regulation of the expression and transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 α . **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 1, p. 519–532, 2019.

GUPTA, R. K. et al. The MODY1 gene HNF-4 α regulates selected genes involved in insulin secretion. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 4, p. 1006–1015, 2005.

GUPTA, R. K. et al. Expansion of adult β -cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4 α . **Genes and Development**, v. 21, n. 7, p. 756–769, 2007.

HABENER, J. F.; STANOJEVIC, V. **α -cell role in β -cell generation and regeneration***Islets*, 27 maio 2012. .

HARA, M. et al. Imaging pancreatic β -cells in the intact pancreas. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 290, n. 5, p. 1041–1047, 2006.

HAYHURST, G. P. et al. Hepatocyte nuclear factor 4 α (Nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 4, p. 1393–1403, 15 fev. 2001.

HERBERT, T. P. PERK in the life and death of the pancreatic β -cell. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1205–1207, 1 nov. 2007.

HERBERT, T. P.; LAYBUTT, D. R. A reevaluation of the role of the unfolded protein response in islet dysfunction: Maladaptation or a failure to adapt? **Diabetes**, v. 65, n. 6, p. 1472–1480, 24 jun. 2016.

KIM, A. et al. Islet architecture: A comparative study. **Islets**, v. 1, n. 2, p. 129–136, 2009.

KUTLU, B. et al. Discovery of Gene Networks Regulating Cytokine-Induced Dysfunction and Apoptosis in Insulin-Producing INS-1 Cells. **Diabetes**, v. 52, n. 11, p. 2701–2719, 2003.

LAU, H. H. et al. The molecular functions of hepatocyte nuclear factors – In and beyond the liver. **Journal of Hepatology** Elsevier, , 1 maio 2018. .

LEE, A. S. Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. **Trends in Biochemical Sciences** Elsevier, , 1 jan. 1987. .

LEE, A. S. The glucose-regulated proteins: Stress induction and clinical applications. **Trends in Biochemical Sciences**, ago. 2001. .

LEE, A. S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. **Methods**, v. 35, n. 4, p. 373–381, abr. 2005.

LEE, S. H. et al. Induction of β -Cell Replication by a Synthetic HNF4 α Antagonist. **Stem Cells**, v. 31, n. 11, p. 2396–2407, nov. 2013.

LITTLE, E. et al. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 4, n. 1, p. 1–18, 1994.

LU, H. Crosstalk of HNF4 α with extracellular and intracellular signaling pathways in the regulation of hepatic metabolism of drugs and lipids. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, set. 2016. .

MERGLIN, A. et al. Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 667–678, 2004.

MEYEROVICH, K. et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. **Journal of Molecular Endocrinology**, jul. 2016.

MILLER, K. et al. Islet formation during the neonatal development in mice. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. 7739, 2009.

MIURA, A. et al. Hepatocyte nuclear factor-4 α is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic β -cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p. 5246–5257, 2006.

MOORE, B. D. et al. Hepatocyte nuclear factor 4— is required for cell differentiation and homeostasis in the adult mouse gastric epithelium. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 311, n. 2, p. G267–G275, 2016a.

MOORE, B. D. et al. Transcriptional regulation of X-Box-binding protein One (XBP1) by hepatocyte nuclear factor 4- (HNF4-) Is vital to beta-cell function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 12, p. 6146–6157, 2016b.

NAYLOR, R.; KNIGHT JOHNSON, A.; DEL GAUDIO, D. **Maturity-Onset Diabetes of the Young Overview**. [s.l.] University of Washington, Seattle, 2018.

NEVE, B. et al. Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 13, p. 4807–4812, 2005.

NISHIMURA, W.; BONNER-WEIR, S.; SHARMA, A. Expression of MafA in pancreatic progenitors is detrimental for pancreatic development. **Developmental Biology**, v. 333, n. 1, p. 108–120, 2009.

NOZAKI, J. I. et al. The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic β cells. **Genes to Cells**, v. 9, n. 3, p. 261–270, 2004.

ODISHO, T.; ZHANG, L.; VOLCHUK, A. ATF6 β regulates the Wfs1 gene and has a cell survival role in the ER stress response in pancreatic β -cells. **Experimental Cell Research**, v. 330, n. 1, p. 111–122, jan. 2015.

ODOM, D. T. et al. Control of Pancreas and Liver Gene Expression by HNF Transcription Factors. **Science**, v. 303, n. 5662, p. 1378–1381, 2004.

ORCI, L.; UNGER, R. FUNCTIONAL SUBDIVISION OF ISLETS OF LANGERHANS AND POSSIBLE ROLE OF D CELLS. **The Lancet**, v. 306, n. 7947, p. 1243–1244, 20 dez. 1975.

ORTIS, F. et al. Cytokine-Induced Proapoptotic Gene Expression in Insulin-Producing Cells Is Related to Rapid, Sustained, and Nonoscillatory Nuclear Factor- κ B Activation. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 8, p. 1867–1879, 2006.

ORTIS, F. et al. Induction of nuclear factor- κ B and its downstream genes by TNF- α and IL-1 β has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 51, n. 7, p. 1213–1225, 2008.

ORTIS, F. et al. Differential usage of NF- κ B activating signals by IL-1 β and TNF- α in pancreatic beta cells. **FEBS Letters**, v. 586, n. 7, p. 984–989, 5 abr. 2012.

OSHIMA, T. et al. Downregulated P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α expression in human colorectal carcinoma is a new prognostic factor against liver metastasis. **Pathology International**, v. 57, n. 2, p. 82–90, fev. 2007.

OSLOWSKI, C. M.; URANO, F. The binary switch that controls the life and death decisions of ER stressed β cells. **Current Opinion in Cell Biology**, 2011. .

PLENGVIDHYA, N. et al. Brief report: PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 7, p. 2821–2826, 1 jul. 2007.

RÆDER, H. et al. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. **Nature Genetics**, v. 38, n. 1, p. 54–62, 20 jan. 2006.

RAUM, J. C. et al. FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 Regulate Islet -Cell-Specific mafA Expression through Conserved Sequences Located between Base Pairs -8118 and -7750 Upstream from the Transcription Start Site. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 15, p. 5735–5743, 2006.

RIECK, S. et al. Overexpression of hepatocyte nuclear factor-4 α initiates cell cycle entry, but is not sufficient to promote β -cell expansion in human islets. **Molecular Endocrinology**, v. 26, n. 9, p. 1590–1602, set. 2012.

RÖDER, P. V et al. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. **Experimental & molecular medicine**, 2016. .

ROSCIONI, S. S. et al. Impact of islet architecture on β -cell heterogeneity, plasticity and function. **Nature Reviews Endocrinology**, 2 dez. 2016. .

RUSS, H. A. et al. In vitro proliferation of cells derived from adult human β -cells revealed by cell-lineage tracing. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1575–1583, 1 jun. 2008.

RUSS, H. A. et al. Epithelial-mesenchymal transition in cells expanded in vitro from lineage-traced adult human pancreatic beta cells. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6417, 29 jul. 2009.

RUSS, H. A. et al. Insulin-Producing cells generated from dedifferentiated human pancreatic beta cells expanded in vitro. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e25566, 30 set. 2011.

SACKS, D. B. et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 2011. .

SANGAN, C. B. et al. In vitro reprogramming of pancreatic alpha cells towards a beta

cell phenotype following ectopic HNF4 α expression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 399, p. 50–59, 2015.

SATO, Y. et al. Anks4b, a novel target of HNF4 α protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 27, p. 23236–23245, 2012.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 676–82, 2012.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R. EDITORIAL (Thematic issue: Treatment and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Its Complication: Advanced Approaches). **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 14, p. 1132–1133, 2015.

SHIH, D. Q.; STOFFEL, M. Molecular etiologies of MODY and other early-onset forms of diabetes. **Current diabetes reports**, abr. 2002. .

SHIU, R. P. C.; POUYSSEGUR, J.; PASTAN, I. Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 9, p. 3840–3844, 1 set. 1977.

SONG, S. et al. Intermittent-hypoxia-induced autophagy activation through the ER-Stress-Related PERK/eIF2 α /ATF4 pathway is a protective response to pancreatic β -cell apoptosis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 6, p. 2955–2971, 2019.

STAFFERS, D. A. et al. Early-onset type-II diabetes mellitus (Mody4) linked to ipf1. **Nature Genetics**, v. 17, n. 2, p. 139, out. 1997.

STIJNEN, P. et al. PCSK1 mutations and human endocrinopathies: From obesity to gastrointestinal disorders. **Endocrine Reviews** Narnia, , 1 ago. 2016. .

TANAKA, T. et al. Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α in the pathogenesis of human cancer. **Journal of Pathology**, v. 208, n. 5, p. 662–672, abr. 2006.

TAO, Z.; SHI, A.; ZHAO, J. Epidemiological Perspectives of Diabetes. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 73, n. 1, p. 181–185, 25 set. 2015.

TATTERSALL, R. B. Mild familial diabetes with dominant inheritance. **QJM**, v. 43, n. 2, p. 339–357, abr. 1974.

THUERAUF, D. J. et al. Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 α and ATF6 β on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 31, p. 22865–22878, 2007.

TONG, X.; KONO, T.; EVANS-MOLINA, C. Nitric oxide stress and activation of AMP-activated protein kinase impair β -cell sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase 2b activity and protein stability. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 6, p. e1790, 18 jun. 2015.

TREIMAN, M.; CASPERSEN, C.; BRØGGER, S. A tool coming of age : thapsigargin as an inhibitor of sarco- endoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPases. **Zywnie Czlowieka I Metabolizm**, v. 19, n. April, p. 131–135, 1998.

URAKAMI, T. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. Volume 12, p. 1047–1056, 2019.

VETHE, H. et al. Probing the missing mature β -cell proteomic landscape in differentiating patient iPSC-derived cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4780, 6 dez. 2017.

VIONNET, N. et al. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature**, v. 356, n. 6371, p. 721–722, 23 abr. 1992.

VUONG, L. M. et al. Differential Effects of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Isoforms on Tumor Growth and T-Cell Factor 4/AP-1 Interactions in Human Colorectal Cancer Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 35, n. 20, p. 3471–3490, 15 out. 2015.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, 25 nov. 2011. .

YAMAGATA, K. et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). **Nature**, v. 384, n. 6608, p. 455–458, 5 dez. 1996.

YAMAGATA, K. et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). **Nature**, v. 384, n. 6608, p. 458–460, 5 dez. 2003.

YAMAGATA, K. Roles of HNF1 α and HNF4 α in pancreatic β -cells: Lessons from a monogenic form of diabetes (MODY). **Vitamins and Hormones**, v. 95, p. 407–423, 2014.

YIN, L. et al. Hepatic hepatocyte nuclear factor 4 α is essential for maintaining triglyceride and cholesterol homeostasis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 2, p. 328–336, fev. 2011.