UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

VINÍCIUS DE MORAIS GOMES

**Estudo da função de HSPB1 na citoproteção induzida
pela prolactina em células beta pancreáticas**

Versão original corrigida da dissertação

São Paulo

Data do depósito na SPG:
15/04/2016

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

VINÍCIUS DE MORAIS GOMES

**Estudo da função de HSPB1 na citoproteção induzida
pela prolactina em células beta pancreáticas**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Bioquímica)**

Orientadora: Profª Drª Letícia Labriola

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Gomes, Vinícius de Moraes

G633e Estudo da função de HSPB1 na citoproteção induzida pela prolactina
em células beta pancreáticas / Vinícius de Moraes Gomes. -- São Paulo,
2016.
102p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Labriola, Leticia

1. Proteína de choque térmico : Bioquímica 2. Diabetes mellitus
I. T. II. Labriola, Leticia, orientador.

574.19245 CDD

Aos meus pais e irmãos, por tudo
As minhas princesas Nathália e Beatriz

Agradecimentos

A prof^a. Dr^a. Letícia Labriola pela orientação e discussões que ajudaram a desenvolver esse projeto. Agradeço pela ajuda nas quantificações dos westerns blots e pelas análises estatísticas. Foi sempre um alívio ouvir de você um “não é tão grave” quando os experimentos não deram certo. Sua empolgação com os resultados me motiva a seguir em frente. Muito obrigado pela paciência e pelo apoio, principalmente nos últimos meses.

Ao pessoal do Laboratório de Mecanismos Moleculares de Citoproteção: Ancely, Letícia, Rosângela e Talita. Por me ensinarem todas as técnicas necessárias para desenvolver esse projeto, pela paciência e pelas dicas durante todo o processo de aprendizado e no período da qualificação. E a Juanita, por me ajudar nos momentos difíceis.

A prof^a. Dr^a. Bettina Malnic e ao pessoal do Laboratório de Neurociência Molecular pelo uso do microscópio de fluorescência que foi essencial no desenvolvimento de todo o projeto.

A Jacilene e Valério, meus pais, por todo apoio durante esse tempo longe de casa. Suas palavras de incentivo em momentos difíceis foram essenciais para me fazer seguir em frente sempre. Obrigado pela paciência e por compreender minhas decisões. Vocês são meu exemplo de perseverança, honestidade e amor. Painho e mainha, não sei como agradecer tudo que vocês fizeram por mim.

Aos meus irmãos Valério Junior e Maria da Penha, pelo apoio e incentivo a vir a São Paulo. Penha, não há palavras que mensure o quanto

você é importante na minha vida e o quanto você me ajuda e me apoia em todas as minhas decisões.

A Maria da Guia e Adriana Carla, minha tia e prima, pelas palavras de otimismo e por sempre torcer para que tudo dê certo.

A Luana Quintans, por esses 9 anos de amizade que mais parecem séculos e séculos de convivência. Obrigado por me incentivar a vir a São Paulo, por toda a paciência que tem comigo quando estou na “*bad*”, por sempre me lembrar das minhas qualidades e me fazer seguir em frente. Nosso amor vai além da relação câncer x capricórnio; se existe encarnação, a gente se conhece a no mínimo umas dez.

A Liedson Carneiro, amigo de infância e companheiro de profissão. Obrigado por me incentivar a fazer esse mestrado, a partilhar momentos de muita alegria e descontração.

Aos meus amigos que apesar de estarem longe, sempre torceram por mim. Laércio Teodoro, Ariclones Almeida, Nielson Oliveira, Berg Domingos, Jamir Jr, Danilo Lucena, Delosmar Lucena, Dayse Oliveira e Denise Oliveira.

Aos meus companheiros da biologia UFPB: Patrícia Petrágia, Rachel Ramalho, Elói Matias, Derek Asp e Cyntya Sousa. E a Layane Cabral que também já é da turma. Obrigado pelos momentos inesquecíveis desde 2010.

Aos meus colegas da bioquímica Pedro Furtado, Marcela Mineiro, Railmara Pereira, Sandro Filho e Henrique César. Obrigado pela ótima convivência.

As agências de fomento Fundação para o Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP. Processo n°: 2014/17974-0), Capes e CNPq, pelo financiamento do projeto e pela bolsa.

"However bad life may seem, there is always something you can do, and succeed at.

While there's life, there is hope"

- Stephen Hawking

RESUMO

GOMES, V.M. **Estudo da função de HSPB1 na citoproteção induzida por prolactina em células beta pancreáticas.** 2016. 102p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

O transplante de ilhotas pancreáticas é uma terapia promissora para o tratamento da diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1). No entanto, ilhotas transplantadas estão sujeitas à rejeição pelo sistema imune dos pacientes receptores, portanto faz-se necessário o desenvolvimento de mecanismos moleculares que protejam essas células. Estudos mostraram que o hormônio prolactina (PRL) é capaz de inibir a apoptose desencadeada por citocinas pró-inflamatórias sobre células beta pancreáticas e que este processo citoprotetor depende da presença da chaperona HSPB1. Foi observado que durante o desenvolvimento do DM1, as células beta pancreáticas sofrem estresse de retículo endoplasmático e que isso contribui para desencadear apoptose. O estresse de retículo endoplasmático é caracterizado pelo acúmulo de proteínas mal dobradas nessa organela resultando na ativação da resposta a proteínas mal dobradas (UPR) que tem como finalidade recuperar a homeostase celular. No presente estudo mostramos, pela primeira vez, que PRL foi capaz de proteger células beta pancreáticas contra estresse de retículo endoplasmático promovido tanto por citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IFN γ e IL1 β) quanto pelos estressores de retículo endoplasmático: tunicamicina e taspigargina; e que HSPB1 é essencial nesse mecanismo de citoproteção. No contexto do

DM1, esse hormônio parece ter um efeito modulador da UPR aumentando os níveis de BiP, antecipando a ativação de ATF6 e PERK, mantendo a via de PERK ativa por mais tempo, inibindo a via de IRE1 α , e diminuindo os níveis de CHOP em tempos maiores. Coletivamente, os resultados aqui apresentados aprofundam os conhecimentos sobre a função de HSPB1, conduzindo para o desenvolvimento de estratégias que visam à atenuação da morte de células beta por meio da modulação de uma via de proteção endógena, a qual é independente da modulação do sistema imunológico.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*, células-beta, estresse de retículo endoplasmático, prolactina, HSPB1.

ABSTRACT

GOMES, V. M. **Study of HSPB1 function in the cytoprotection induced by prolactin in pancreatic beta cells.** 2016. 102p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

The islet transplantation is a promising therapy for the treatment of type 1 diabetes *mellitus* (T1DM). However, transplanted islets are subject to rejection by the immune system of the recipient patients, therefore the development of molecular mechanisms that protect these cells is necessary. Studies have shown that the hormone prolactin (PRL) is capable of inhibiting apoptosis triggered by pro-inflammatory cytokines on pancreatic beta cells and that this cytoprotective process depends on the presence of the chaperone HSPB1. It was observed that during the development of type 1 diabetes, pancreatic beta cells undergo endoplasmic reticulum stress and that this contributes to trigger apoptosis. The endoplasmic reticulum stress is characterized by accumulation of misfolded proteins in this organelle resulting in the activation of unfolded protein response (UPR) that aims to restore cellular homeostasis. In the present study, we show for the first time that PRL was able to protect pancreatic beta cells against endoplasmic reticulum stress promoted by both pro-inflammatory cytokines (TNF α , IFN γ and IL1 β) as the endoplasmic reticulum stressors: tunicamycin and thapsigargin; and HSPB1 is essential that cytoprotective mechanism. In the context of T1DM, PRL appears to have a modulating effect of the UPR by increasing the levels of BiP, anticipating the activation of ATF6 and PERK, keeping the PERK pathway active for longer, inhibiting the pathway

IRE1 α , and decreasing the levels of CHOP for longer times. Collectively, the results presented here deepen the knowledge of the HSPB1 function, leading to the development of strategies inducing attenuation of beta cells death through modulation of endogenous protection means, which are independent of the modulation of the immune system.

Keywords: Diabetes *mellitus*, beta cells, endoplasmic reticulum stress, prolactin, HSPB1.

Lista de abreviaturas e siglas

4E-BP1	<i>4E-Binding Protein 1</i>
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
µm	micrometro
%	porcentagem
°C	graus Celsius
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
APAF1	<i>Apoptotic Peptidase Activating Factor-1</i>
ATF4	<i>Activating Transcription Factor 4</i>
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BAK	<i>BCL2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCLXL	<i>BCL extra large</i>
BH3	<i>BCL2 Homology Domains 3</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BiP	<i>Binding Immunoglobulin Protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
Caspase	<i>Cysteine-dependent aspartate-specific proteases</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CHOP	<i>Cytosine Cytosine Adenosine Adenosine Thymidine Enhancer Binding Protein Homologous Protein</i>
cIAP	celular IAP
Cit	Citocinas
cm ²	Centímetros quadrados
Crlt	Controle
DC	<i>Dendritic cell</i>
DIABLO	<i>Direct IAP-Binding Protein with Low pI</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
dL	decilitro
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
eIF2α	<i>eukaryotic Initiation Factor 2 α</i>

eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
Eif4ebp1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
EPM	Erro Padrão da Média
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GLUT1	<i>Glucose Transporter 1</i>
GLUT2	<i>Glucose Transporter 2</i>
GLUT3	<i>Glucose Transporter 3</i>
GLUT4	<i>Glucose Transporter 4</i>
GRP78	<i>Glucose Regulated Proteins 78kDa</i>
h	hora
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HO	<i>Hoescht</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HSPB1	<i>Heat Shock Protein Beta 1</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i>
IDF	<i>Internacional Diabetes Federation</i>
IFN γ	<i>Interferon-γ</i>
IL1 β	<i>Interleucina-1β</i>
IPITA	<i>International Pancreas and Islet Transplant Association</i>
IRE1 α	<i>Inositol-requiring enzyme 1α</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	quilodalton
L	litro
mA	miliampere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
min	minuto
Min6	Linhagem celular derivada de um insulinoma de camundongo
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes Young</i>
mRNA	RNA mensageiro
NF-kB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
ng	nanograma
nM	nanomolar
NO	<i>Nitric Oxide</i>
PBSA	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDI	Proteína Dissulfeto Isomerase

PERK	<i>Pancreatic ER kinase (Protein Kinase RNA-activated)-like ER kinase</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PP	Polipeptídeo pancreático
PRL	Prolactina
PRLR	<i>Prolactin Receptor</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RIP1	<i>Receptor Interacting Protein 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rhPRL	<i>Recombinant Human Prolactin</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> . Meio de cultura para células Min6
s	segundo
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
scA	<i>Scramble A</i>
scC	<i>Scramble C</i>
SERCA	Sarco/Endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SMAC	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase</i>
sXBP1	<i>spliced X-Box Binding Protein 1</i>
Tag	Tapsigargina
tBID	<i>truncated BID</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TNFR	<i>TNF Receptor</i>
TRADD	<i>TNFR-Associated Death Domain</i>
TUDCA	Ácido Tauroursodeoxicólico
Tun	Tunicamicina
UA	Unidades Arbitrárias
UDP	Uridina difosfato
UDP-HexNAc	Uridina difosfato N-acetilhexosamina
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
WB	Western Blot
WWBP1	<i>Tryptophan-Tryptophan Domain Binding Protein 1</i>
XBP1	<i>X-Box Binding Protein 1</i>

Lista de figuras

Figura 1: Localização e anatomia do pâncreas	17
Figura 2: Pâncreas exócrino.....	18
Figura 3: Esquema anatômico de uma ilhota de Langerhans	19
Figura 4: Regulação da secreção de insulina pela glicose nas células beta pancreáticas	21
Figura 5: Representação do transplante de ilhotas pancreáticas.....	28
Figura 6: Representação esquemática da Resposta a Proteínas Mal Dobradas e suas diferentes ações.....	33
Figura 7: Representação do final da UPR.....	34
Figura 8: Estrutura da Tunicamicina e Tapsigargina	35
Figura 9: Mecanismo molecular da morte celular por apoptose	39
Figura 10: Representação da sinalização da prolactina.....	42
Figura 11: Silenciamento de HSP25 ou HSPB1	49
Figura 12: Prolactina inibe morte celular induzida por tratamento com estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina e Tapsigargina) e citocinas em células Min6.....	57
Figura 13: Prolactina inibe morte celular induzida por tratamento com estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina e Tapsigargina) e citocinas em células Min6 scC	59
Figura 14: Prolactina não inibe morte celular induzida por tratamento com estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina e Tapsigargina) e citocinas em células Min6 shHSPB1	60
Figura 15: Modulação dos níveis de BiP na presença ou ausência de prolactina.....	63
Figura 16: Modulação dos níveis de fosforilação de PERK na presença ou ausência de prolactina.....	65
Figura 17: Modulação dos níveis de fosforilação de eIF2 α na presença ou ausência de prolactina.....	67
Figura 18: Modulação dos níveis de ATF4 na presença ou ausência de prolactina.....	69
Figura 19: Modulação dos níveis de ATF6 na presença ou ausência de prolactina.....	71
Figura 20: Modulação dos níveis de IRE1 α na presença ou ausência de prolactina.....	73
Figura 21: Modulação dos níveis de CHOP na presença ou ausência de prolactina.....	75
Figura 22: Modulação da UPR promovida pela prolactina no contexto do diabetes tipo 1 ao longo do tempo	77
Figura 23: Modificação dos níveis proteicos e de fosforilação da UPR promovido pela prolactina via HSPB1	91

Lista de tabelas

Tabela 1. Efeitos da insulina no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas	23
Tabela 2. Lista de anticorpos primários utilizados para detecção dos níveis de proteínas por Western blot.....	53

Sumário

1. Introdução	17
1.1. Pâncreas	17
1.1.1. Ilhotas de Langerhans	19
1.2. Insulina	20
1.3. Diabetes mellitus	24
1.3.1. Diabetes mellitus tipo 1	26
1.4. Transplante de ilhotas pancreáticas	27
1.5. Retículo endoplasmático	29
1.5.1. Estresse de retículo endoplasmático	30
1.5.1.1. Resposta a proteínas mal dobradas	31
1.5.1.2. Indutores de estresse de retículo: tunicamicina e taspigargina	35
1.6. Apoptose	36
1.7. Prolactina	41
1.8. Proteínas de choque térmico	43
1.8.1. Proteínas de choque térmico beta 1 (HSPB1)	44
2. Objetivos	47
2.1. Objetivo geral	47
2.2. Objetivos específicos	47
3. Materiais e métodos	48
3.1. Linhagens celulares	48
3.2. Tratamentos das células	49
3.3. Viabilidade celular por Hoerscht (HO) e Iodeto de Propídeo (PI)	50
3.4. Ensaio de Western Blot	51
3.5. Análise dos dados estatísticos	54
4. Resultados	55
4.1. Prolactina protege células Min6 de morte induzida por citocinas pró-inflamatórias e estressores de retículo endoplasmático	55
4.2. HSPB1 participa no mecanismo de citoproteção induzido pela prolactina em células Min6	56
4.3. Prolactina modula a resposta a proteínas mal dobradas	61
4.3.1. Prolactina modula o início da UPR modificando os níveis de BiP ao longo do tempo	62
4.3.2. Modulação da via PERK promovida pela prolactina	64
4.3.3. Modulação da via ATF6 promovida pela prolactina	70
4.3.4. Modulação dos níveis de IRE1 α	72
4.3.5. Prolactina diminui a morte por apoptose desencadeada pela UPR por meio da modulação de CHOP	74
4.3.6. Participação de HSPB1 na modulação da resposta a proteínas mal dobradas promovida pela prolactina no contexto do diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	76
5. Discussão	78
6. Conclusões	92
Referências	93
Súmula Curricular	104
Anexo	108

1. Introdução

1.1. Pâncreas

O pâncreas é uma glândula longa e estreita que está situada transversalmente através do abdômen superior no espaço retroperitoneal (Figura 1). Embriologicamente, o pâncreas surge a partir de um botão dorsal e um duodenal epitelial ventral, dos quais se desenvolve tanto o tecido ductal quanto o acinar (SEMBULINGAM; SEMBULINGAM, 2012; HEMMING; EGAN, 2013).

Figura 1: Localização e anatomia do pâncreas. O pâncreas é um órgão longo localizado próximo ao estômago e intestinos e outros órgãos. Anatomicamente é dividida em cabeça, corpo e cauda. Adaptado de <<http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR636528-750.jpg>> Acesso em 30/03/2016.

O pâncreas possui função endócrina e exócrina, desempenhando um papel fundamental na digestão, metabolismo, e utilização de substrato energético. A maior parte da massa pancreática é composta por células exócrinas, que secretam um fluido digestivo alcalino para o ducto pancreático e do duodeno (HEMMINGS; EGAN, 2013).

A parte exócrina do pâncreas é constituída por ácidos (Figura 2). Cada ácido tem uma única camada de células acinares com um lúmen no centro. Células acinares contêm grânulos contendo enzimas digestivas na forma de zimogênio. Um pequeno ducto surge a partir do lúmen de cada alvéolo, os quais se unem e desembocam no ducto principal chamado Wirsung (SEMBULINGAM; SEMBULINGAM, 2012).

Figura 2: Pâncreas exócrino. O pâncreas exócrino consiste de células acinares e do ducto. As células acinares produzem enzimas digestivas e constituem a maior parte do tecido pancreático. Os ductos formam uma rede de tamanho crescente, culminando em ductos pancreáticos principais e acessórios que desembocam no duodeno. a) esquema geral do pâncreas exócrino. b) esquema de um ácido. Adaptado de BARDEESY; DEPINHO, 2002.

O suco pancreático é composto principalmente por enzimas proteolíticas tais como tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase, nuclease, elastase e collagenase. Possui ação digestiva de carboidratos feita pela amilase pancreática que converte o amido em dextrinas e maltose. As enzimas lipolíticas presentes são: lipase pancreática, hidrolase de ésteres do colesterol, fosfolipase A e B. O teor em bicarbonato é elevado mantendo o suco pancreático alcalino, de modo a proteger a mucosa intestinal do quimo ácido, neutralizando-o; e fornece íons bicarbonato mantendo o pH desejado (7-9) para a ativação de enzimas pancreáticas (SEMBULINGAM; SEMBULINGAM, 2012).

1.1.1. Ilhotas de Langerhans

O pâncreas endócrino faz-se de 1% a 2% da massa do pâncreas. Dentro dos lóbulos pancreáticos, existem pequenos aglomerados de células endócrinas denominadas ilhotas de Langerhans, as quais são compostas por células alfa, beta, delta e PP (Figura 3) (SEMBULINGAM; SEMBULINGAM, 2012).

Figura 3: Ilhotas de Langerhans. O pâncreas endócrino é composto por diferentes tipos de células que estão aglomerados em estruturas chamadas ilhotas pancreáticas. A) Esquema anatômico de uma ilhota de Langerhans. B) Corte histológico pancreático. Adaptado de <<http://www.allhumananatomy.com/knowning-deeper-about-endocrine-function-of-pancreas/endocrine-function-of-the-pancreas/>> acesso em 30/03/2016; e <<http://histology-world.com/photoalbum/displayimage.php?pid=1113&fullsize=1>> acesso 17/05/2016.

A proporção dos diferentes tipos celulares que compõe as ilhotas varia entre as espécies. Nas ilhotas humanas, as células beta compõe cerca de 73 a 75% da massa total de uma ilhota e secretam o hormônio insulina que funciona reduzindo o nível de glicose no sangue ao induzir a captação e armazenamento da glicose pelas células. Entre 18 e 20% do pâncreas endócrino é composto pelas células alfa que secretam glucagon, este hormônio induz o aumento do nível glicêmico sanguíneo. Cerca de 4% da ilhota é formada pelas células delta, que secretam somatostatina, e aproximadamente 1% da ilhota é composta pelas células PP que secretam o polipeptídeo

pancreático que funciona suprimindo a secreção pancreática e estimula a secreção gástrica (Figura 3) (SEMBULINGAM; SEMBULINGAM, 2012).

As ilhotas recebem de 10% a 15% do fluxo de sangue no pâncreas, essa rica vascularização facilita a dispersão dos hormônios secretados pelas células das ilhotas para a corrente sanguínea (HEMMINGS; EGAN, 2013).

1.2. Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido e secretado pelas células beta. Sua estrutura é formada por 51 aminoácidos dispostos em duas cadeias (A e B) ligadas por duas ligações dissulfeto. Uma terceira ligação dissulfeto está presente na cadeia A que é formada por 21 aminoácidos; a cadeia B é composta por apenas 30 aminoácidos (ABEL, 1926). Este hormônio é responsável pela redução da glicemia ao promover o ingresso da glicose na maioria das células do organismo. É essencial no metabolismo de carboidratos, na síntese de proteínas e no armazenamento de lipídios (SEMBULINGAM; SEMBULINGAM, 2012).

A síntese de insulina inicia-se com uma proteína inativa, a preproinsulina, a qual é submetida a clivagem formando pró-insulina e, em seguida, forma-se a insulina após a clivagem de uma estrutura que une as duas cadeias que compõe esse hormônio, tal estrutura é denominada peptídeo C. A insulina e peptídeo C são armazenados em grânulos nas células beta que são secretados em resposta ao aumento da glicose no sangue (Figura 4) (SEMBULINGAM; SEMBULINGAM, 2012; HEMMINGS; EGAN, 2013).

Após as refeições, as células beta secretam insulina em resposta ao aumento da glicemia no sangue. A secreção de insulina pode ocorrer em

resposta a sinais integrados de nutrientes (glicose e aminoácidos), hormônios (insulina, glucagon like peptide 1, somatostatina e epinefrina) e neurotransmissores (norepinefrina e acetilcolina).

Figura 4: Regulação da secreção de insulina pela glicose nas células beta pancreáticas. Quando o nível de glicose no sangue é elevado, o metabolismo ativo da glicose na célula beta aumenta concentração de ATP intracelular, o que leva ao fechamento dos canais de potássio na membrana plasmática e despolarização da membrana. Em resposta à mudança no potencial de membrana, os canais de cálcio controlados por voltagem na membrana plasmática se abrem, permitindo o cálcio fluir para dentro da célula, assim, aumentando a concentração citosólica de cálcio, levando a liberação de insulina por exocitose. Adaptado de NELSON; COX, 2007.

O mecanismo clássico de secreção de insulina inicia-se quando a glicose é internalizada nas células beta por meio dos transportadores GLUT2. Com isso, ocorre um aumento da relação ATP/ADP após a metabolização desse açúcar feita pela via glicolítica, ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons. O aumento na concentração de ATP fecha os canais de potássio promovendo uma despolarização da membrana plasmática da célula beta. Esse efeito promove a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, aumentando, assim, a concentração de cálcio no interior das células e

promovendo a secreção dos grânulos de insulina, que é liberada na circulação sanguínea (Figura 4) (BRATANOVA-TOCHKOVA et al., 2002; SEMBULINGAM; SEMBULINGAM, 2012).

O receptor de insulina presente nas células que respondem a esse hormônio, é do tipo tirosina cinase. Quando a insulina se liga ao receptor, este se autofosforila e fosforila vários substratos do receptor de insulina chamados IRS (*Insulin Receptor Substrate*). Esta interação promove a ativação das vias de PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinases*) e MAPK (*mitogen activated protein kinases*). O complexo insulina receptor é internalizado em endossomos, posteriormente o hormônio é degradado e o receptor é reciclado pelas células (PESSIN; SALTIEL, 2000; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

Transportadores de glicose desempenham um papel chave na utilização de glicose mediada por insulina. Existem vários transportadores de glicose com distribuições nos diversos tecido. Transportadores GLUT1 são encontrados na maioria dos tecidos, principalmente nos glóbulos vermelhos humanos e nos vasos sanguíneos do cérebro; este transportador auxilia na captação de glicose pelo músculo esquelético e pelo tecido adiposo em condições basais. GLUT2 são transportadores de baixa afinidade encontrados em células beta pancreáticas, fígado, intestino e rim de murinos; este transportador assegura que a absorção de glicose pelas células beta e hepatócitos ocorra apenas quando as concentrações de glicose circulantes são elevadas. Os transportadores GLUT3 são encontrados nos neurônios; GLUT1 e GLUT3 permitem que a glicose atravesse a barreira hematoencefálica tendo acesso ao cérebro. Transportadores GLUT4 são encontrados no músculo estriado, adipócitos, e dentro de vesículas de armazenamento no interior da célula;

GLUT4 medeia o transporte de glicose estimulada por insulina em adipócitos e miócitos (HEMMINGS; EGAN, 2013).

Após internalizada, em geral, a insulina tem um efeito anabólico sobre os órgãos alvo aumentando a síntese de carboidratos, lipídios e proteínas (Tabela 1).

Tabela 1: Efeitos da insulina no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas

Efeitos metabólicos	Insulina estimula	Insulina inibe
Metabolismo de carboidratos	<ul style="list-style-type: none"> • Internalização da glicose no tecido adiposo e músculo • Glicólise no músculo e tecido adiposo • Síntese de glicogênio no músculo e fígado 	<ul style="list-style-type: none"> • Gliconeogênese e glicogenólise no fígado • Degradação de glicogênio no músculo e fígado
Metabolismo de lipídios	<ul style="list-style-type: none"> • Captação de triglicerídeos do sangue para o tecido adiposo e músculo • Síntese de colesterol no fígado 	<ul style="list-style-type: none"> • Lipólise no tecido adiposo • Oxidação de ácidos graxos no músculo e fígado • Cetogênese
Metabolismo de proteínas	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte de aminoácidos para os tecidos • Síntese de proteínas no músculo, tecido adiposo, fígado e outros tecidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Degradação de proteínas no músculo • Formação de ureia

Adaptado de MOLINA, 2004.

A insulina é degradada predominantemente no fígado que capta cerca de 40 a 80% desse hormônio presente na circulação. O restante é degradado nos rins e intracelularmente por meio de proteases que clivam a insulina ligada aos receptores que foram internalizados. Com a acidificação do lúmen endossomal, a insulina se dissocia do receptor terminando os eventos de fosforilação do receptor e promovendo sua degradação pela enzima ácido insulinase. Posteriormente, os receptores podem ser reciclados para a superfície celular (BRATANOVA-TOCHKOVA et al., 2002).

1.3. Diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por uma hiperglicemia resultante da deficiência na secreção de insulina, da ação desta, ou ambas. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada com danos a longo prazo, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente retinopatia, nefropatia, neuropatia, coronariopatias e deficiências vasculares, ocasionadas devido a glicação de proteínas por vias não enzimáticas. As altas concentrações de glicose podem causar elevada osmolaridade e glicosúria, acompanhado de perda excessiva de água na urina (HEMMINGS; EGAN, 2013). Além disso, os pacientes com DM têm diminuição da função do sistema microvascular e imune, portanto, tendo risco de infecções e atraso na cicatrização de feridas (MESOTTEN; VAN DEN BERGHE, 2009; HEMMINGS; EGAN, 2013). Pode-se concluir então que o Diabetes é uma doença crônica complexa que inclui a necessidade de cuidados médicos contínuos com estratégias de redução dos riscos multifatoriais, além do controle glicêmico (ADA, 2016).

Essa patologia possui algumas classificações, sendo a diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2) as principais. DM1 é uma doença autoimune caracterizada pela destruição das células beta, geralmente levando à absoluta deficiência na produção de insulina. DM2 é caracterizada pela resistência à insulina nos tecidos periféricos e por distúrbios no processo de secreção desse hormônio. Diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é uma condição em que as mulheres sem diabetes previamente diagnosticado apresentam glicemia elevada durante a gravidez (especialmente no terceiro trimestre). E há alguns casos especiais de diabetes, como por exemplo: síndromes diabetes

monogênicas, como diabetes neonatal e diabetes MODY (*Maturity Onset Diabetes Young*); doenças do pâncreas exócrino (Ex.: fibrose cística); e diabetes induzida por drogas ou produtos químicos (Ex.: utilização de glicocorticoides ou após transplante de órgãos) (ADA, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 382 milhões de pessoas são detentoras de DM no mundo, dos quais 5 a 10% são apresentam DM1. Estima-se que em 2035, devido ao aumento do sedentarismo, obesidade e envelhecimento da população, o número de pessoas com diabetes vai aumentar em mais de 50%, passando dos 500 milhões (IDF, 2013). No Brasil, o número de diabéticos ultrapassa os 12 milhões, chegando a 6,2% da população. Mais de 124 mil pessoas morreram devido as consequências resultantes da hiperglicemia constante presente nos diabéticos no Brasil (SBD, 2012).

A concentração normal de glicose no sangue é cerca de 72mg/dL. O diagnóstico do diabetes é feita quando a glicemia de jejum é maior do que 99mg/dL ou em níveis superiores a 200mg/dL como medida de glicemia pós-prandial associada ao aumento da hemoglobina glicada acima de 6,7%, com sintomas associados a DM, tais como poliúria, polidipsia, e polifagia (HEMMINGS; EGAN, 2013).

Para o tratamento da DM2, sugere-se aos pacientes mudanças de estilo de vida, que podem incluir estabelecer uma meta de atividade física de, no mínimo, 150min por semana, e perda de no mínimo 7% do peso corporal combinado ao uso de hipoglicemiantes e/ou insulina. No entanto, para indivíduos com DM1 a insulinoaterapia ainda é o tratamento indicado. Existem

excelentes orientações para a iniciação e gestão da insulinoterapia a fim de atingir as metas de glicemia desejadas. (ADA, 2016).

1.3.1. Diabetes *mellitus* tipo 1

Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pela destruição das células beta pancreáticas em resposta a citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos e linfócitos, resultando na deficiência absoluta na produção de insulina (NIELSEN et al., 2004).

O processo de destruição autoimune ocorre quando há uma inflamação local das ilhotas pancreáticas onde mediadores inflamatórios contribuem para a indução e amplificação da reação imune contra células beta. A infiltração por macrófagos e linfócitos desencadeia a secreção de citocinas pró-inflamatórias, às quais as células beta são extremamente sensíveis (NIELSEN et al., 2004). Linfócitos promovem a citólise pancreática mediada pela liberação de perforinas e granzimas ou induzindo a apoptose por meio da ação de citocinas como interferon- γ (INF γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF α). A combinação destas citocinas induz a produção de interleucina-1 β (IL-1 β) em macrófagos residentes nas ilhotas (THOMAS et al., 2009).

Como visto acima, o tratamento mais comum para a DM1 ainda é a insulinoterapia. Mas esse tratamento não previne o aparecimento das complicações derivadas da hiperglicemia crônica como a retinopatia que consiste na deficiente irrigação dos vasos ligados a visão; a neuropatia, definida como danos nos nervos periféricos sensitivos causando a perda da sensibilidade; e a nefropatia causada por danos nas artérias renais impedindo os rins de exercerem seu papel de filtração (ADA, 2016).

No entanto, há um grupo de indivíduos denominados hiperlábeis que, apesar da utilização da insulinoaterapia, apresentam episódios de hipo e hiperglicemia muitas vezes despercebidos e fatais (MAIA; ARAÚJO, 2008). Nesses casos, o transplante de ilhota pancreáticas isoladas de doadores com morte cerebral diagnosticada, é uma terapia a ser considerada (SHAPIRO et al., 2000).

1.4. Transplante de ilhotas pancreáticas

O transplante de ilhotas pancreáticas é realizado por meio do isolamento das ilhotas pancreáticas de doadores cadáveres que vieram a óbito devido a morte cerebral e não apresentaram histórico de doenças pancreáticas, conforme os critérios estabelecidos pela Associação Internacional de Transplante de Pâncreas e Ilhotas (IPITA). Após a coleta do pâncreas, este é submetido a vários processos, dentre os quais incluem-se a lise das células que compõe o pâncreas exócrino, separação e coleta do tecido endócrino, o qual é injetado no paciente receptor. Geralmente o local de injeção é o fígado por meio da veia porta. Uma vez infundidas num ramo secundário da veia porta, as ilhotas são transportadas pela corrente sanguínea até se alojarem no próprio órgão e começarem a produzir e secretar insulina de acordo com o nível glicêmico do paciente (Figura 5) (GABA; GARCIA-ROCA; OBERHOLZER, 2012).

São considerados aptos a submeterem-se ao transplante de ilhotas pancreáticas pacientes que foram considerados com DM1 durante mais de cinco anos, apresentarem descontroles glicêmicos mesmo estando sob insulinoaterapia, e episódios de hipoglicemia graves como coma ou instabilidade

metabólica, de tal forma que o risco global de imunossupressão, após transplante, possa ser considerado menos arriscado do que ter glicemia descontrolada (SHAPIRO et al., 2000).

Esta técnica apresenta vantagens sobre o transplante de pâncreas sólido por ser muito menos invasiva, além de apresentar menos efeitos colaterais decorrentes de complicações cirúrgicas e melhores respostas terapêuticas (KIDO et al., 2000). Um dos fatores limitantes para o uso dessa técnica é a dependência e escassez de doadores cadáveres (GLEASON et al., 2000; DONG; WOO, 2001). No entanto, os enxertos de ilhotas estão sujeitos à autoimunidade, rejeição e dano mediado por uma inflamação não específica no entorno do enxerto pós-transplante (KAUFMAN et al., 1990).

Figura 5: Representação do transplante de ilhotas pancreáticas. As ilhotas são isoladas de pâncreas de pacientes doadores e injetadas no fígado, por meio da veia porta do paciente receptor portador de diabetes tipo 1. Adaptado de NAFTANEL; HARLAN, 2004.

Com o passar do tempo, foi-se aprimorando a técnica de transplante, com o intuito de manter a funcionalidade das estruturas transplantadas por um tempo maior. O estabelecimento do protocolo de Edmonton aumentou a sobrevida das ilhotas de forma bastante significativa. Dentre os critérios

estabelecidos nesse protocolo incluem: dois a três pacientes doadores para se ter um número de ilhotas suficientes que permaneçam viáveis e funcionais após o transplante; o uso de imunossupressores não corticoidais; os doadores não podem ser diabéticos ou ter problemas renais (SHAPIRO et al., 2000; BARTON et al., 2012).

Além do protocolo de Edmonton, foram estabelecidas melhorias no processo de isolamento e uso de melhores imunossupressores para esse tipo de transplante. Com o tempo, o número de pacientes insulino-independentes após 3 anos de transplante, aumentou de 27% para 44% no período de 1999 a 2010 (BARTON et al., 2012). Ainda, o processo de isolamento, manutenção e infusão das ilhotas é extremamente estressante para estas células, contribuindo para diminuir sua sobrevivência. Para evitar tais complicações, faz-se necessário o desenvolvimento de mecanismos moleculares que protejam as células beta, com a finalidade de mantê-las produzindo insulina, garantindo a homeostasia da glicose.

1.5. Retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) está organizado em túbulos ramificados e vesículas achatadas que se estendem através do citosol. Os túbulos e as vesículas interconectam-se, e suas membranas são contínuas com a membrana nuclear externa (STAEHELIN, 1997).

O retículo endoplasmático é responsável pela síntese, modificação e administração de proteínas para os seus sítios-alvo apropriados dentro da via secretora e o espaço extracelular. A membrana do RE é o local de produção de todas as proteínas transmembrana e lipídeos para a maioria das organelas

celulares. Além disso, quase todas as proteínas que são secretadas para o exterior da célula são destinadas inicialmente ao lúmen do RE (STAEHELIN, 1997; TROMBETTA; PARODI, 2003).

No RE, proteínas dobram-se em sua conformação nativa e são submetidas a um grande número de modificações pós-traducionais, incluindo a glicosilação e a formação de ligações dissulfeto intra e intermoleculares (FEWELL et al., 2001).

Algumas proteínas retidas no retículo funcionam auxiliando proteínas a enovelarem-se corretamente. Uma importante proteína residente no RE é a proteína dissulfeto isomerase (PDI) que catalisa a oxidação de grupos sulfidril (SH) livres nas cisteínas para formar ligações dissulfeto (S-S). Outra proteína residente no RE é a chaperona BiP que reconhece proteínas enoveladas incorretamente ligando-se a uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos exposta, que estaria normalmente oculta no interior das cadeias polipeptídicas corretamente enoveladas ou agregadas (TROMBETTA; PARODI, 2003)

1.5.1. Estresse de retículo endoplasmático

Apenas proteínas corretamente dobradas são exportadas do RE para o complexo de Golgi, enquanto que as proteínas incorretamente dobradas são retidas no RE para passar por um novo processo de dobragem ou serem orientadas para a degradação. A desregulação de qualquer destes processos provoca estresse do retículo endoplasmático. Com isso, é ativada a resposta a proteínas mal dobradas (*Unfolded Protein Response* - UPR) cujo objetivo é tentar minimizar o estresse e recuperar a homeostase celular, mas se este não

for atingido, essa resposta leva as células a morte por apoptose (XU; BAILLY-MAITRE; REED, 2005; SZEGEZDI et al., 2006).

Citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) induzem morte celular por apoptose em células beta pancreáticas (CNOP et al., 2005). Essas citocinas, além de promover apoptose, induzem estresse de retículo endoplasmático por meio da formação de óxido nítrico (NO) (CARDOZO et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2008). Em modelos murinos, a produção de NO leva a uma queda na expressão de bomba do retículo sarco/endoplasmático de cálcio ATPase 2b (SERCA2b), levando a uma queda nos níveis de Ca²⁺ no RE. Essa diminuição na concentração de cálcio leva a uma falha na ação das chaperonas dependentes de cálcio. Consequentemente, ocorre um acúmulo de proteínas mal dobradas caracterizando o estresse de retículo endoplasmático e, portanto, ocorre ativação da resposta a proteínas mal dobradas (CARDOZO et al., 2005; XU; BAILLY-MAITRE; REED, 2005; SZEGEZDI et al., 2006).

No contexto do DM1, já foi demonstrado que o desencadeamento de estresse de retículo endoplasmático, resultado dos efeitos das citocinas pró-inflamatórias, contribui para a indução de apoptose nas células beta pancreáticas (D'HERTOG et al., 2010; EIZIRIK; MIANI; CARDOZO, 2013; ENGIN et al., 2013).

1.5.1.1. Resposta a proteínas mal dobradas

A UPR é desencadeada após o acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo. Essa resposta tem como finalidade manter a sobrevivência, a homeostase celular e restaurar a função do retículo através da redução de

proteínas acumuladas no lúmen do RE. Tal resposta é mediada por três receptores presentes na membrana do RE, são eles: PERK (*Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) e IRE1 α (*Inositol-requiring enzyme 1 α*) (Figura 6) (SZEGEZDI et al., 2006; RON; WALTER, 2007; KIM; XU; REED, 2008).

Todos os três receptores se mantem inativos quando estão ligados a chaperona GRP78 (*Glucose Regulated Proteins 78kDa*), também conhecida como BiP (*Binding Immunoglobulin Protein*) quando as células estão em situação de repouso. Quando há o acúmulo de proteínas mal dobradas no RE, BiP perde afinidade pelos três receptores, deixa então de interagir com eles. Esse processo é o responsável pela ativação da UPR (SZEGEZDI et al., 2006; RON; WALTER, 2007; KIM; XU; REED, 2008).

Na primeira via da UPR, PERK se autofosforila e fosforila o fator de iniciação eucariótico 2 α (eIF2 α). O aumento da fosforilação de eIF2 α provoca a diminuição da tradução de proteínas, o que evita o acúmulo destas no retículo endoplasmático, funcionando como mecanismo atenuador de estresse (WEK; ANTHONY, 2009). Apesar do bloqueio da tradução clássica de proteínas, a fosforilação de eIF2 α permite a tradução de ATF4 (*activating transcription factor 4*) que ocorre através de uma via de tradução independente de eIF2 α . ATF4, sendo um fator de transcrição, transloca para o núcleo e induz a transcrição de genes responsáveis por restaurar a homeostase no RE (SZEGEZDI et al., 2006; RON; WALTER, 2007; KIM; XU; REED, 2008). Dentre eles estão genes anti-apoptóticos, de metabolismo de aminoácidos, angiogênese, diferenciação, secreção de proteínas (SZEGEZDI et al., 2006; RON; WALTER, 2007; AMERI;

HARRIS, 2008), de resposta a estresse, chaperonas e reações redox (HARDING et al., 2003).

Por outro lado, ATF6 é ativado depois de ser clivado parcialmente após a sua translocação do RE para o aparelho de Golgi. ATF6 ativo é também um fator de transcrição e regula a expressão de XBP1 (*X-Box Binding Protein 1*), outro fator de transcrição, assim como as chaperonas BiP e GRP94 e a proteína calreticulina (NOZAKI et al., 2004). Para atingir a sua forma ativa, o mRNA de XBP1 é submetido a um processamento catalisado por IRE1 α . XBP1 após sofrer *splicing* (sXBP1) é traduzido e posteriormente translocado para o núcleo, onde controla a transcrição de chaperonas bem como de genes envolvidos na degradação de proteínas. Esta ação concertada visa restaurar a função RE, bloqueando ainda mais o acúmulo de proteínas, aumentando a capacidade de dobrar e iniciar a degradação dos agregados proteicos que não conseguiram adquirir sua estrutura tridimensional reestabelecida (SZEGEZDI et al., 2006; RON; WALTER, 2007; KIM; XU; REED, 2008; MAUREL et al., 2014).

Figura 6: Representação esquemática da Resposta a Proteínas Mal Dobradas e suas diferentes ações. A UPR é ativada após BiP se desligar dos três componentes presente na membrana do retículo, cada componente compõe uma via ativa de resposta ao estresse com a finalidade de retornar a homeostase celular. Adaptado de SZEGEZDI et al., 2006.

IRE1 α é uma enzima que possui atividade nuclease clivando mRNA na tentativa de diminuir a tradução de proteínas que possivelmente se acumulariam no retículo, promovendo assim a atenuação do estresse de retículo endoplasmático (HETZ; GLIMCHER, 2009).

Figura 7. Representação do final da UPR. Há dois destinos após a ativação da UPR, a célula voltar as condições de repouso ou morrer por apoptose. Adaptado de SZEGEZDI et al., 2006.

Em condições de repouso, as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak são mantidas inativas devido a sua interação com Bcl-2. Estresse do retículo endoplasmático intenso leva a célula a morte por apoptose por meio da ativação de C-Jun cinase N-terminal (JNK) e indução de proteína homóloga C/EBP (CHOP). JNK e CHOP neutralizam o efeito anti-apoptótico de Bcl-2. CHOP bloqueia a expressão de Bcl-2, enquanto que JNK a fosforila. JNK também fosforila Bim (componente das proteínas *BH3 only*) ativando-a. Coletivamente, estas alterações permitem a ativação de Bax e Bak, assim como a transmissão do sinal a partir do RE para a mitocôndria onde é

disparado o sinal de apoptose. As caspases 2 e 12 seriam ativadas possivelmente na própria membrana do retículo, bem como no apoptossomo, após a transmissão do sinal de morte para a mitocôndria e a liberação do citocromo c (Figura 7) (SZEGEZDI et al., 2006).

1.5.1.2. Indutores de estresse de retículo: tunicamicina e tapsigargina

Tunicamicina é uma combinação de antibióticos homólogos de nucleosídeos que inibe a família de enzimas UDP-HexNAc (Uridina difosfato N-acetilhexosamina) (Figura 8). Nos eucariotos, esta família inclui a enzima N-acetilglicosamina fosfotransferase que catalisa a transferência de N-acetilglucosamina-1-fosfato a partir de UDP-N-acetilglicosamina para o dolicol fosfato, no primeiro passo da síntese de glicoproteínas. Este composto é produzido por várias bactérias, incluindo *Streptomyces clavuligerus* e *Streptomyces lysosuperficus* (DUKSIN; MAHONEY, 1982; XU et al., 2004).

Figura 8: Estrutura da Tunicamicina e Tapsigargina. Adaptado de <
<http://www.abcam.com/tunicamycin-ab120296.html>>
 e <
http://biochem.mybiosource.com/thapsigargin-biochemical_842934> Acesso 01/04/2016.

Tapsigargina é um componente isolado da planta *Thapsia garganica* (Figura 8). Este composto apresenta atividade biológica como inibidor não competitivo da Ca^{2+} ATPase presente no retículo sarco/endoplasmático (SERCA) responsável pelo bombeamento de íons cálcio do citosol para o retículo. Tais íons se ligam às chaperonas promovendo o funcionamento

destas. A ausência de cálcio no retículo prejudica a atividade das chaperonas, consequentemente, promove o aumento de proteínas com dobramento inadequado resultando na ativação da UPR (KIJIMA; OGUNBUNMI; FLEISCHER, 1991; TAO; HAYNES, 1992).

1.6. Apoptose

A apoptose é considerada um componente vital de vários processos incluindo a vida média de células normais, o desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico, desenvolvimento embrionário e morte celular induzida por agentes químicos. Apoptose em níveis alterados ocorre em muitas condições humanas, incluindo doenças neurodegenerativas, lesões isquêmicas, doenças autoimunes e muitos tipos de câncer (ELMORE, 2007; ASHKENAZI; SALVESEN, 2014).

Observa-se na morte por apoptose algumas características morfológicas particulares como a perda da aderência da célula à matriz extracelular ou células vizinhas. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número, tamanho e se rompem. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; ASHKENAZI; SALVESEN, 2014).

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos,

radiação ionizante, danos no DNA, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis elevados de espécies reativas do oxigênio. A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca ou pela via intrínseca (HENGARTNER, 2000; ELMORE, 2007; ASHKENAZI; SALVESEN, 2014).

A via extrínseca é desencadeada por meio de ligantes específicos que interagem com um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR1). Nesta via a apoptose é induzida pela formação de um complexo de sinalização indutor de morte (*Death-Inducing Signaling Complex* - DISC). Neste complexo, o domínio de morte Fas-associado (*Fas-associated Death Domain* - FADD) recruta as caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) iniciadoras 8 e/ou 10 através de interações com o domínio de morte. TNFR1 induz à formação sequencial de dois complexos. O Complexo I é formado na membrana plasmática e é composto por: TNFR1, domínio de morte associado ao TNFR (*TNFR-associated Death Domain* - TRADD), a TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*), RIP1 (*Receptor-Interacting protein 1*), cIAP1 e 2 (*Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 e 2*). Estas proteínas são importantes mediadores de ativação de NF- κ B e MAPK induzida por TNF. A endocitose de TNFR1 é seguida pela formação de complexo II, que é análogo ao DISC e inclui TRADD, FADD, caspase-8 e/ou 10. A ativação de caspase-8 e -10 leva à ativação das caspases executoras -3, -6 e -7 que clivam substratos levando a célula a morte. Dentre esses substratos estão inibidores de enzimas responsáveis por desfazer a condensação da cromatina e fragmentar DNA, proteínas envolvidas no reparo de DNA e na organização do citoesqueleto

(Figura 9) (HENGARTNER, 2000; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; DUPREZ et al., 2009; ASHKENAZI; SALVESEN, 2014).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). Os sinais que são transduzidos convergem principalmente para a mitocôndria. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes. Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, levando a liberação de citocromo c e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol. Quando liberado no citosol, o citocromo c se liga à proteína adaptadora de ativação da procaspase chamada APAF1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), provocando a oligomerização de APAF1 em um heptâmero em forma arredondada chamado de apoptossomo. As proteínas APAF1 no apoptossomo recrutam procaspase-9, que são ativadas por proximidade ao apoptossomo, assim como as proteínas procaspases-8 e -10 são ativadas no complexo DISC. Caspases-9 ativadas clivam as procaspases executoras -3, -6 e -7, ativando-as. Estas, então, clivam substratos levando a célula a morte (Figura 9) (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004; DUPREZ et al., 2009; ASHKENAZI; SALVESEN, 2014).

A família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte que participam ativamente da regulação da apoptose. Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*) inibem a apoptose, prevenindo a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, Bax (*BCL2-*

associated X protein), Bid (*Bcl-2 homology domain 3 Interacting-Domain*) e Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) são proteínas pró-apoptóticas que formam canais no RE e na mitocôndria, resultando no extravasamento do conteúdo dessas organelas, levando a células a morte (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas, promovendo um desequilíbrio que induz a apoptose (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004). Após um estímulo de morte, Bcl-2 inibe a formação do poro na membrana externa da mitocôndria, pelo sequestro de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados por Bax na membrana externa mitocondrial (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

Figura 9: Mecanismo molecular da morte celular por apoptose. A morte celular programada é dividida em duas vias, a extrínseca (1) e a intrínseca (2). Adaptado de DUPREZ et al., 2009.

A proteína Bid é a conexão entre as vias intrínseca e extrínseca. Quando receptores de morte ativam a via extrínseca nessas células, a caspase iniciadora, caspase-8, cliva Bid produzindo uma forma truncada de Bid chamada de tBid. tBid transloca para a mitocôndria, onde inibe proteínas Bcl-2 antiapoptóticas e causa a oligomerização de proteínas proapoptóticas contendo domínios BH1, 2 e 3 que liberam citocromo c e proteínas intermembranas, amplificando o sinal de morte (Figura 9) (DUPREZ et al., 2009; ASHKENAZI; SALVESEN, 2014).

As proteínas inibidoras da apoptose ou IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) são moléculas que exercem seu papel anti-apoptótico inibindo a atividade das caspases efetoras -3 e -7, da caspase iniciadora -9 e modulando o fator de transcrição NF- κ B. Durante a apoptose, as IAPs são removidas por uma proteína liberada da mitocôndria denominada Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI*). Após dano mitocondrial, Smac/DIABLO é liberada do espaço intermembranas para o citoplasma, juntamente com o citocromo c. Enquanto o citocromo c liga-se à APAF-1 e ativa diretamente a caspase-9, Smac/DIABLO remove as IAPs de sua ligação inibitória com as caspases (Figura 9) (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; LACASSE et al., 2008; DUPREZ et al., 2009).

1.7. Prolactina

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico identificado a mais de 80 anos como um fator da hipófise que estimula o desenvolvimento da glândula mamária e lactação (RIDDLE; BATES; DYKSHORN, 1933).

Estudos mostram que há um aumento do número de ilhotas pancreáticas durante a gravidez (WEINHAUS et al., 2007) chegando a quase dobrar em número (SORENSEN; BRELJE, 2009). As mudanças mais importantes na adaptação da ilhota à gravidez são reforçadas por um aumento na secreção de insulina e na massa celular. Embora uma variedade de hormônios aumentem durante o estado gestacional, apenas a PRL e lactogênio placentário, que atuam através de receptores de prolactina (RPRL), são capazes de induzir as mudanças que ocorrem em ilhotas durante a gravidez (BRELJE et al., 2002; WEINHAUS et al., 2007; SORENSON; BRELJE, 2009).

Foi feito um estudo mostrando que PRL é importante no desenvolvimento das ilhotas pancreáticas, onde viu-se que ratos com deficiência de PRLR apresentaram uma massa reduzida de células beta, e um menor conteúdo de insulina em suas ilhotas (FREEMARK et al., 2002).

A via JAK (*Janus Kinase*) / STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) tem um papel fundamental na resposta da prolactina. A interação da PRL com seu receptor induz a homodimerização deste, resultando na ativação de JAK2 que, em seguida, conduz à ativação de STAT5 através de interações com o domínio fosfotirosil SH2 específico (*Src-homology 2*). Isto resulta na dimerização de STAT5 que se transloca para o núcleo onde se liga a genes alvo em locais específicos de ligação (Figura 10) (JACKEROTT et al., 2006; XIAO et al., 2014).

Resultados prévios do nosso laboratório mostraram efeitos benéficos da ação de rhPRL (Prolactina recombinante humana) sobre culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas. O tratamento com rhPRL aumenta o número de ilhotas, a secreção basal de insulina (LABRIOLA et al., 2007a), assim como inibe a apoptose em células beta humanas induzida tanto por privação de soro fetal bovino quanto por tratamento com citocinas pró-inflamatórias (TERRA et al., 2011). Nosso grupo também mostrou que a PRL inibe a morte celular por apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias em células beta pancreáticas murinas (Min6) (MANSANO, 2013).

Figura 10: Representação da sinalização da prolactina. Após a prolactina (PRL) se ligar a seu receptor, este se dimeriza ativando a via JAK/STAT. Adaptado de SHUAI; LIU, 2003.

Também foi avaliado pelo nosso grupo de pesquisa a expressão proteica em ilhotas pancreáticas humanas mantidas na presença ou ausência de rhPRL, por meio de eletroforese bidimensional acoplada a espectrometria de massa. Tais dados mostraram um perfil de expressão proteica diferencial entre as células submetidas ou não ao tratamento com esse hormônio. Dentre as proteínas que se expressaram na presença de PRL, encontra-se a HSPB1 (*Heat Shock Proteins Beta 1*), proteína da família das *Small Heat Shock*

Proteins (HSPs) (LABRIOLA et al., 2007b). Esta proteína tem um papel essencial no mecanismo citoprotetor promovido pela prolactina. Nosso grupo demonstrou que na ausência dessa proteína, PRL perde seu efeito citoprotetor sob células beta pancreáticas submetidas a um tratamento com citocinas pró-inflamatórias (MANSANO, 2013).

1.8. Proteínas de choque térmico

As proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* – HSP) têm em comum sua síntese estimulada pela resposta a um choque de calor ou quando o ambiente de uma célula torna-se prejudicial e altera o dobramento das proteínas (RITOSSA, 1962). Em células expostas a estresse, as HSPs atuam como chaperonas, combatendo a formação de polipeptídeos mal dobrados, permitindo o redobramento destes durante a recuperação do estresse ou as levam a degradação, por meio da via da ubiquitina-proteossomo (RITOSSA, 1962; ARRIGO et al., 2007).

As HSPs partilham a propriedade de formação de estruturas oligoméricas globulares que são caracterizados, em células de mamíferos, por massas moleculares que vão de 50 a cerca de 800kDa. Uma propriedade interessante de algumas HSPs, tais como HSPB1, diz respeito a sua capacidade de ser fosforilada e, por conseguinte, permanecer sob o controle de várias vias de transdução (MACARIO, 1995; THÉRIAULT et al., 2004; LAUNAY et al., 2006).

A regulação das proteínas de choque térmico é induzida principalmente pelo fator de choque térmico (*Heat Shock Factor* - HSF). As HSP aumentam a rapidez de remoção de proteínas desnaturadas dentro das células. Os níveis

proteicos após estresse fornecem a célula meios para: identificar e talvez facilitar redobramento de proteínas afetadas de modo adverso pelo estresse metabólico; identificar e fazer ligação com proteínas anormalmente dobradas, de modo que estas sejam marcadas e enviadas a um sistema proteolítico adequado, assim facilitando a eliminação das proteínas defeituosas; e facilitar a síntese e a maturação de novas proteínas, que irão substituir aquelas destruídas no estresse metabólico (MEYER; SILVA, 1999; SUN; MACRAE, 2005).

Sabe-se que as HSP protegem células e tecidos dos efeitos deletérios da inflamação por meio da prevenção da quebra de cadeias de DNA induzida por espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica, bem como através de proteção da estrutura e função das mitocôndrias. *In vivo*, o choque térmico induz a proteção de órgãos contra uma série de lesões associadas com produção aumentada de citocinas e/ou espécies reativas de oxigênio (LANDRY et al., 1989; JACQUIER-SARLIN et al., 1994; MEYER; SILVA, 1999; MOUNIER; ARRIGO, 2002; SUN; MACRAE, 2005).

No câncer, verificou-se que a expressão aumentada de HSPB1 e HSP70 está associada com maior sobrevida de células neoplásicas submetidas a alguns agentes quimioterápicos (MEYER; SILVA, 1999; SUN; MACRAE, 2005).

1.8.1. Proteína de choque térmico beta 1 (HSPB1)

HSPB1 (*Heat Shock Protein Beta 1*) é uma proteína multifuncional que participa em vários processos nas células. Esta proteína funciona como chaperona ATP-independente formando um complexo de alta massa molecular (LANDRY et al., 1989; CARPER; ROCHELEAU; STORM, 1990; VOSS et al.,

2007). Em adição à sua função de chaperona, HSPB1 também parece ser um importante regulador da integridade estrutural e da estabilidade da membrana, da polimerização de actina e formação do filamento intermediário do citoesqueleto (FERNES; SHAMS; SHAFI, 2006), da migração celular, adesão epitelial célula-célula (WELSH; GAESTEL, 1998), expressão de genes pró-inflamatórios, vias de transdução de sinal (LAMBERT et al., 1999), apresentação de proteínas oxidadas para o proteossoma, diferenciação e apoptose (KOSTENKO; MOENS, 2009).

HSPB1 é produzida em resposta a vários tipos de estresse nos músculos cardíaco e esquelético, bem como no cérebro, atuando como chaperona que suprime a agregação de polipeptídeos específicos. Foram feitos vários estudos que demonstraram que a expressão de HSPB1 está fortemente ligada a proteção contra o enfarte do miocárdio e isquemia cerebral (EFTHYMIOU et al., 2004; LATCHMAN, 2005; ARRIGO et al., 2007).

Alguns estudos mostram a participação de HSPB1 no aumento da degradação de proteínas ubiquitinadas por meio do proteossomo, em resposta ao estresse induzido pelo fator de necrose tumoral (TNF) (PARCELLIER et al., 2003). Foi observado em um estudo a participação de HSPB1 na pancreatite, onde viu-se que a superexpressão dessa proteína promoveu uma maior viabilidade celular por meio da preservação do citoesqueleto de actina (ETHRIDGE et al., 2000; KUBISCH et al., 2004).

Um estudo feito pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que HSPB1 é essencial no mecanismo de proteção promovido pela prolactina contra morte celular em células beta pancreáticas. Tal estudo mostrou que o hormônio

prolactina não é capaz de atenuar a apoptose em células de insulinoma de camundongo (MIN6) HSPB1 silenciadas (MANSANO, 2013).

Cabe salientar que não há relatos na literatura sobre a ação citoprotetora da prolactina e sua correlação com o estresse do retículo endoplasmático, nem a participação de HSPB1 nesse contexto.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estudar se HSPB1 exerce alguma função durante o estresse de retículo endoplasmático induzido nas células beta durante a DM1.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar se a prolactina é capaz de atenuar os efeitos do estresse do retículo endoplasmático em células beta pancreáticas.

Verificar se existe uma função de HSPB1 como mediadora da ação da prolactina.

3. Materiais e métodos

3.1 Linhagens celulares

A linhagem derivada de um insulinoma murino MIN6, responsiva ao aumento de glicose com consequente liberação de insulina (ISHIHARA et al., 1993) foi mantida em meio de cultura RPMI (desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) com suplementação de 10% de SFB, L-glutamina (2mM) (Sigma), 100U/mL de Ampicilina, 100U/mL de Estreptomicina, 10mM HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil)-1-piperazineetane-sulfônico) (Sigma), em estufa a 37°C, com atmosfera contendo 2,0% de CO₂.

O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias de cultivo. Ao atingirem, aproximadamente, 80% da densidade de saturação, as células foram destacadas com solução contendo 1mg/mL de tripsina e 1mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), lavadas e ressuspendidas em meio fresco. Os estoques celulares foram mantidos nos respectivos meios de cultura com concentração final de 40% de SFB e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) estéril e armazenadas a -80°C. Todas as linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram testadas quanto à presença de *Mycoplasma hominis*, por reações de PCR.

Com a finalidade de verificar o papel da chaperona HSPB1 no contexto do diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), foi gerada uma linhagem de Min6 HSPB1 silenciada (Min6 shHSPB1). O processo de silenciamento consistiu na inserção de um vetor shRNA por meio de uma infecção lentiviral. Como controle do processo de silenciamento, foi gerada uma linhagem que expressa um shRNA com uma sequência aleatória formada com a mesma composição de

nucleotídeos que o shRNA de HSPB1, tal sequência foi denominada *scramble* C (Min6 scC). A obtenção e validação da linhagem silenciada e da *scramble* foi resultado do trabalho de mestrado da aluna do nosso grupo de pesquisa, Rosangela Aparecida Wailemann Mansano. A figura 11 mostra que o silenciamento de HSP25 (equivalente murino da chaperona HSPB1) foi de aproximadamente 80% quando comparada as células parentais e células que expressam a sequência aleatória C (Min6 scC) e A (Min6 scA) (MANSANO, 2013).

Figura 11: Silenciamento de HSP25 ou HSPB1. As células foram mantidas em condições de cultura com privação de SFB por 48h. Os níveis proteicos de HSP25 foram detectados por Western blot. Foram utilizados 200 g de proteínas totais extraídas de células Min6 shHSP25, Min6 *scrambles* A e C, e 100 g de proteínas totais das células controle Min6 não transduzidas. Os western blots mostrados são resultados representativos. O histograma corresponde a todos os dados e os resultados estão apresentados como unidade arbitrária de densitometria após a normalização pelo conteúdo proteico de GAPDH. Os resultados estão apresentados como a média±EPM; n=3 experimentos independentes; a vs. b: p<0,05.

3.2 Tratamentos das células

Previamente a qualquer tratamento celular, as células da linhagem Min6, Min6 scC ou Min6 shHSPB1 (3×10^4 células/cm²) foram privadas de soro por 24h em meio RPMI suplementado com 0,1% SFB. No dia seguinte, as células

foram mantidas nestas condições e tratadas por 30min na presença ou ausência de PRL (300ng/mL) e então incubadas por 30min, 1h, 3h, 6h, 9h, 16h e 24h na presença ou ausência de um coquetel de citocinas (IL-1 β , 1,6ng/mL; TNF- α , 16ng/mL; IFN- γ , 8ng/mL) (Peprotech, Cidade do México, México) ou de dois indutores de estresse do retículo endoplasmático Tunicamicina (TUN - 15 μ g/mL – Sigma Aldrich) e Tapsigargina (TAG - 75nM – Sigma Aldrich). Eles foram usados como controles positivos de indução de estresse de retículo endoplasmático.

3.3. Viabilidade celular por Hoescht (HO) e Iodeto de Propídeo (PI)

Células Min6, Min6 scC ou Min6 shHSPB1 foram plaqueadas e mantidas em meio apropriado conforme descrito até a realização dos devidos tratamentos celulares. A porcentagem de células viáveis e mortas foi determinada através da marcação por 15 min com os ligantes de DNA PI (5 μ g/mL) e HO 33342 (5 μ g/mL; Sigma-Aldrich) (CARDOZO et al., 2005).

As células foram examinadas sob microscópio de fluorescência invertido (Nikon Corporation, Tokyo, Japão). Um mínimo de 500 células foi contado em cada condição experimental por dois observadores independentes, sendo um sem conhecimento das identidades das amostras, resultados foram aceitos quando apresentaram uma similaridade superior a 90%. Os resultados foram apresentados como porcentagem de apoptose.

Este método é quantitativo e já foi validado para uso em células beta pancreáticas por comparação sistemática com microscopia eletrônica, ativação de caspase-3 e clivagem de DNA (RASSCHAERT et al., 2005; CUNHA et al., 2008; MOORE et al., 2009).

3.4. Ensaio de Western Blot

O estudo da modulação das vias de resposta a proteínas mal dobradas foi realizado mediante ensaios de western blot.

Para obtenção dos extratos proteicos totais, inicialmente 3×10^4 células/cm² foram plaqueadas e mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após 24h do plaqueamento, as mesmas foram privadas de soro fetal bovino (0,1% SFB) por 24h. Após o carenciamento do meio, as células foram submetidas aos tratamentos com citocinas ou estressores de retículo nos tempos de 30min, 1h, 3h, 6h e 9h, na presença e ausência de prolactina. Após os tratamentos, foi feita a coleta das células, aderidas as placas, por raspagem, a 4°C, com PBSA, na presença de inibidores de protease (Amersham Biosciences) e de fosfatase (Sigma). A suspensão celular foi centrifugada a 0,8x g durante 3min a 4°C, e o precipitado foi ressuscitado em tampão de lise (10mM de Tris pH 7,5; 150mM de NaCl; 5mM de EDTA; 1mM de EGTA; 1% de NP-40; 0,1% de SDS; 1mM de Ortovanadato de Sódio; contendo inibidores de proteases e de fosfatases) a 4°C. Este lisado foi centrifugado a 4° e 13.400x g por 30min para clarificação. As proteínas presentes no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (kit Bio Rad). O material proteico foi mantido em freezer a -80°C.

Extratos proteicos totais das células submetidas aos tratamentos acima enunciados contendo quantidades iguais de proteínas (100µg) foram desnaturadas em banho seco a 99°C por 5min em tampão de amostra 20% v/v (TrisHCL 50mM pH 6.8; SDS 2% m/v; glicerol 10% v/v; betamercaptoetanol 5% v/v; azul de bromofenol 0,3% m/v) e em seguida submetidas ao fracionamento

em eletroforese em gel vertical contendo de 7,5 a 12% de poliacrilamida–SDS, à 15 ou 25mA, durante 2 a 4h.

Posteriormente, as proteínas fracionadas foram eletrotransferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), em tampão de transferência contendo 0,3% de Tris-Cl (p/v), Glicina 1,44% (p/v), SDS 0,1% (v/v) e metanol 20% (v/v), por eletroforese a 300mA, 4°C por 2h.

Para a inibição da marcação de sítios inespecíficos as membranas foram incubadas com uma solução de bloqueio (PBSA contendo 5% de leite desnatado ou 5% de BSA + 0,1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) ou Bloqueio Vegetal (Starting Block (PBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific)) + 0,05% de Tween 20), por 16h a 4°C. Posteriormente, as membranas, foram lavadas três vezes com PBSA + 0,1% de Tween 20, por 10 min à temperatura ambiente, e incubadas por 2h ou 18h, sob agitação, a temperatura ambiente ou a 4°C, respectivamente, com o anticorpo primário que reconhece as proteínas de interesse (tabela 2).

Após o período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min, com PBSA + 0,1% de Tween 20 e, então, incubadas por 1h a temperatura ambiente com anticorpo secundário apropriado, conjugado à peroxidase, HRP (horseradish peroxidase) (Vector Laboratories ou Life Technologies).

Em seguida, as membranas foram lavadas 2 vezes por 10min com PBSA + 0,1% de Tween 20 e 1 vez por 10min com PBSA. A presença da proteína de interesse foi detectada através de um sistema quimioluminescente (kit ECL Plus™ (GE Healthcare)/kit Immobilon™ (Millipore)).

Como controle, as membranas foram testadas novamente com anticorpo monoclonal anti- α -Tubulina Clone B-5-1-2 (T5168; Sigma-Aldrich).

Tabela 2: Lista de anticorpos primários utilizados para detecção dos níveis de proteínas por Western blot (WB).

	Anticorpo	Empresa
Monoclonal	Anti-ATF4 (11815)	Cell Signaling Technology*
Monoclonal	Anti-ATF6 (70B1413)	Abcam**
Policlonal	Anti-BiP (3183)	Cell Signaling Technology*
Monoclonal	Anti-CHOP (2832)	Cell Signaling Technology*
Monoclonal	Anti-eIF2 α (5324)	Cell Signaling Technology*
Monoclonal	Anti-IRE1 α (3294)	Cell Signaling Technology*
Monoclonal	Anti-PERK (3192)	Cell Signaling Technology*
Monoclonal	Anti-Phospho-eIF2 α (3597)	Cell Signaling Technology*
Monoclonal	Anti-Phospho-PERK (3179)	Cell Signaling Technology*
monoclonal	Anti- α -Tubulina (B512)	Sigma-Aldrich Corporation***

* Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA; ** Abcam Plc, Cambridge, UK; *** Sigma-Aldrich, St Louis, USA.

Após a imunorreação, as membranas inicialmente incubadas com anticorpos para a detecção de proteínas fosforiladas (Anti-Phospho-PERK e anti-Phospho-eIF2 α) foram submetidas ao processo de *stripping* que consistiu na retirada dos anticorpos anti-phospho e, posteriormente, na incubação dos anticorpos anti-PERK ou anti-eIF2 α . O mesmo processo foi executado para a detecção de α -tubulina. O processo de stripping consistiu em realizar duas lavagens com água por 10min, uma lavagem com a solução de stripping (Glicina 25mM com SDS 1% pH 2,0) por 30min e posteriormente 4 lavagens com PBSA com 0,1% de Tween 20 e por 10min.

Após a revelação, a intensidade das bandas obtidas foi analisada por densitometria quantitativa, utilizando-se o software ImageJ (National Institute of Health [NIH]). A densidade das bandas quimioluminescente e, após a correção do fundo, a expressão diferencial foi analisada dividindo-se os valores das

densitometrias dos anticorpos primários específicos pelos valores de tubulina dos mesmos extratos proteicos.

3.5. Análise estatística dos dados

Todos os resultados foram analisados para distribuição gaussiana e passaram o teste de normalidade com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.0. As diferenças estatísticas entre as médias dos grupos experimentais foram testadas através de One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

4. Resultados

4.1. Prolactina protege células Min6 de morte induzida por citocinas pró-inflamatórias e estressores de retículo endoplasmático

Para avaliar o efeito citoprotetor da prolactina, foi realizado o ensaio de viabilidade em células submetidas a tratamento com indutores de estresse de retículo (Tunicamicina, 15µg/mL; tapsigargina, 75mM) na presença ou na ausência de prolactina (300ng/mL).

Além disso, como forma de controle positivo de verificação da citoproteção da prolactina as células foram tratadas com o coquetel de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , 8ng/mL; INF γ , 16ng/mL; IL-1 β , 1,6ng/mL). Esse tratamento mimetiza o ambiente pró-inflamatório do DM1.

A figura 12 (A-G) mostra o perfil de coloração das células Min6. Nesta figura, podem-se visualizar poucas células mortas ($6,1 \pm 0,4\%$) no grupo controle, o qual foi mantido em meio de cultura com 0,1% de SFB. Nas células tratadas, viu-se que os estressores foram capazes de promover uma quantidade de morte celular maior do que as citocinas. Nas células que foram pré-tratadas com prolactina, viu-se um número significativamente menor de células marcadas em vermelho, mostrando que havia mais células viáveis do que não viáveis, tanto nos tratamentos com citocinas quanto com os estressores.

Após 16 e 24h de tratamento, verificou-se a porcentagem de morte das células na presença ou na ausência de prolactina (Figura 12 H-I). Após 16h, viu-se que o tratamento com citocinas apresentou $28,5 \pm 2,6\%$ de morte. Na presença de prolactina, a porcentagem de morte caiu para $11,0 \pm 1,6\%$. As

células tratadas com tunicamicina e tapsigargina apresentaram aproximadamente 79 ± 4 % e $77,4 \pm 5,2$ % de morte, respectivamente. Na presença da prolactina, esses valores diminuíram em aproximadamente 50% no tratamento com a tunicamicina ($37,0 \pm 5,2$ %), e com tapsigargina a morte diminuiu cerca de 80% ($13,4 \pm 2,1$ %), chegando a ser significativamente semelhantes aos valores de morte tanto do controle 0,1% ($6,1 \pm 0,4$ %) quanto com os valores das células tratadas com citocinas na presença de PRL ($11,8 \pm 1,6$ %). Números semelhantes a estes foram observados nas células que foram submetidas aos mesmos tratamentos por um período de 24h (Figura 12).

Com isso, vimos que a prolactina tem um efeito citoprotetor em células beta pancreáticas tanto nas células tratadas com citocinas pró-inflamatórias quanto com estressores de retículo endoplasmático.

4.2. HSPB1 participa no mecanismo de citoproteção induzido pela prolactina em células Min6

Verificada a capacidade de prolactina em proteger as células Min6 contra a ação dos estressores de retículo endoplasmático e das citocinas, foi investigado se HSPB1 estaria envolvida nesse processo. Para isso, foram realizados ensaios de viabilidade celular com células Min6 silenciadas para HSPB1 (Min6 shHSPB1) assim como com células Min6 scC que expressam em forma estável um shRNA que possui uma sequência aleatória de nucleotídeos, denominada *scramble C*, que não altera a expressão de nenhuma proteína murina.

Figura 12: Prolactina inibe morte celular induzida por tratamento com estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina e Tapsigargina) e citocinas em células Min6. As células foram submetidas à privação de soro por 24h, pré-tratadas na ausência ou na presença prolactina (300ng/mL) por 30min. Após esse período foi induzida a morte celular pelo tratamento com uma combinação de citocinas (Cit) ($\text{TNF}\alpha$, 8ng/mL; $\text{INF}\gamma$, 16ng/mL; $\text{IL-1}\beta$, 1,6ng/mL) ou com estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina (Tun), 15 $\mu\text{g/mL}$; tapsigargina (Tag), 75mM). Após 16h (A-H) e 24h (I) de tratamento foram obtidas imagens por microscopia de fluorescência e contado o número de células totais (azul) e não viáveis (vermelho). (A-G) Imagem representativa de cada uma das condições. (A) Células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0,1% de soro fetal bovino (Controle/Ctrl). (B) Citocinas pró-inflamatórias (C) Tunicamicina. (D) Tapsigargina. (E) PRL e citocinas pró-inflamatórias. (F) PRL e tunicamicina. (G) PRL e tapsigargina. (H-I) Histogramas correspondentes a porcentagem total de células mortas obtida após cada tratamento. Em cada experimento foram contados mais de 500 núcleos totais ($n=3$ experimentos independentes). Resultados estão apresentados como a média $\pm$ EPM. $p<0,05$. *: tratamento vs. controle. #: tratamento vs. PRL correspondente.

A linhagem celular Min6 shHSPB1 foi gerada a partir de um sistema lentiviral onde introduziu-se nas células um shRNA que silenciou em 80% a expressão da chaperona HSPB1. As células Min6 scC também foram geradas

pelo mesmo processo, onde houve a inserção de uma sequência aleatória (*scramble C*) a qual não se ligou a nenhum mRNA murino conhecido, servindo de controle do processo de silenciamento (MANSANO, 2013).

Essas linhagens celulares foram submetidas as mesmas condições dos ensaios realizados com as Min6 parentais. Após 16h de tratamento, verificou-se a porcentagem de morte celular (Figuras 13 e 14).

Com objetivo de verificar se o processo lentiviral de silenciamento de HSPB1 estava interferindo no mecanismo citoprotetor induzido pela prolactina foram realizados ensaios com as células Min6 scC. Os resultados mostraram que o efeito citoprotetor da PRL foi similar ao observado para as células parentais. Observou-se que PRL diminuiu significativamente a porcentagem de morte celular induzida por citocinas (Cit: $12,6\% \pm 1,6\%$; Cit+PRL: $4,3\% \pm 0,4\%$). O mesmo efeito foi observado nas células tratadas com os estressores de retículo endoplasmático. O tratamento hormonal diminuiu significativamente a porcentagem de morte de $76,8 \pm 2,5\%$ (Tun) e $40,8 \pm 6,9\%$ (Tag) para $44,8 \pm 2,7\%$ (Tun+PRL) e $16,83 \pm 2,2\%$ (Tag+PRL). Mostrando que o processo de silenciamento pelo sistema lentiviral não interferiu na citoproteção induzida por PRL, pois essa linhagem celular possui um perfil de resposta similar ao apresentado pelas células parentais (Figura 13).

Com objetivo de verificar se HSPB1 estava envolvida na citoproteção induzida PRL, foram analisados os percentuais de morte nas mesmas condições de tratamento utilizadas com as células Min6 parentais e Min6 scC.

No caso das células Min6 shHSPB1, os valores percentuais de morte celular obtidos no tratamento com citocinas ou com os dois indutores de estresse de retículo foram $18,1 \pm 2,2\%$ (Cit), $87 \pm 4,9\%$ (Tun) e $54,8 \pm 9,3\%$ (Tag)

respectivamente. O tratamento hormonal não modificou significativamente os valores obtidos (Cit+PRL: $17 \pm 2,5\%$, Tun+PRL: $83,8 \pm 4,1\%$ e Tag+PRL: $53,6 \pm 10\%$ (Tag)). (Figura 14).

Figura 13: Prolactina inibe morte celular induzida por tratamento com estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina e Tapsigargina) e citocinas em células Min6 scC. As células foram submetidas à privação de soro por 24h, pré-tratadas na ausência ou na presença prolactina (300ng/mL) por 30min. Após esse período foi induzida a morte celular pelo tratamento com uma combinação de citocinas (Cit) ($\text{TNF}\alpha$, 8ng/mL; $\text{INF}\gamma$, 16ng/mL; $\text{IL-1}\beta$, 1,6ng/mL) ou com estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina (Tun), 15 $\mu\text{g/mL}$; tapsigargina (Tag), 75mM). Após 16h (A-H) de tratamento foram obtidas imagens por microscopia de fluorescência e contado o número de células totais (azul) e não viáveis (vermelho). (A-G) Imagem representativa de cada uma das condições. (A) Células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0,1% de soro fetal bovino (Controle/Crtt). (B) Citocinas pró-inflamatórias (C) Tunicamicina. (D) Tapsigargina. (E) PRL e citocinas pró-inflamatórias. (F) PRL e tunicamicina. (G) PRL e tapsigargina. (H) Histogramas correspondentes a porcentagem total de células mortas obtida após cada tratamento. Em cada experimento foram contados mais de 500 núcleos totais (n=3 experimentos independentes). Resultados estão apresentados como a média $\pm$ EPM. $p < 0,05$. *: tratamento vs. controle. #: tratamento vs. PRL correspondente.

Figura 14: Prolactina não inibe morte celular induzida por tratamentos com estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina e Tapsigargina) e citocinas em células Min6 shHSPB1. As células foram submetidas à privação de soro por 24h, pré-tratadas na ausência ou na presença prolactina (300ng/mL) por 30min. Após esse período foi induzida a morte celular pelo tratamento com uma combinação de citocinas (Cit) ($\text{TNF}\alpha$, 8ng/mL; $\text{INF}\gamma$, 16ng/mL; $\text{IL-1}\beta$, 1,6ng/mL) ou com estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina (Tun), 15 $\mu\text{g/mL}$; tapsigargina (Tag), 75mM). Após 16h (A-H) de tratamento foram obtidas imagens por microscopia de fluorescência e contado o número de células totais (azul) e não viáveis (vermelho). (A-G) Imagem representativa de cada uma das condições. (A) Células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0,1% de soro fetal bovino (Controle/Crt). (B) Citocinas pró-inflamatórias (C) Tunicamicina. (D) Tapsigargina. (E) PRL e citocinas pró-inflamatórias. (F) PRL e tunicamicina. (G) PRL e tapsigargina. (H) Histogramas correspondentes a porcentagem total de células mortas obtida após cada tratamento. Em cada experimento foram contados mais de 500 núcleos totais (n=3 experimentos independentes). Resultados estão apresentados como a média $\pm$ EPM. $p < 0,05$. *: tratamento vs. controle.

Estes resultados mostraram que HSPB1 está envolvida no mecanismo de citoproteção induzido pela PRL dado que o silenciamento de HSPB1 impede a ação citoprotetora da PRL frente a todos os tipos de indutores de morte testados.

4.3. Prolactina modula a resposta a proteínas mal dobradas

Após verificar o efeito citoprotetor da prolactina em células beta pancreáticas submetidas a estresse de retículo endoplasmático, fez-se necessário verificar se esse efeito atenuador de morte estaria correlacionado com a modulação das vias de resposta a proteínas mal dobradas (UPR).

Para verificar a modulação da UPR, foram analisados, por meio de ensaios de Western Blot, níveis proteicos e de fosforilação de alguns componentes dessa resposta.

Para um monitoramento do nível de ativação da cada uma das vias de UPR, foram obtidos extratos proteicos em seis tempos para cada tratamento enunciado no item matérias e métodos (0min, 30min, 1h, 3h, 6h e 9h) com as três linhagens celulares (Min6 parental; Min6 shHSPB1 e Min6 scC). O controle 0min é composto pelas células em crescimento com meio RPMI com 0,1% de SFB; a quantidade reduzida do soro é usada devido o SFB possuir quantidades de PRL ou de outros hormônios que mimetizam a ação da prolactina como, por exemplo, o lactogênio placentário. Esse carenciamento de SFB no meio de cultura não interfere na proliferação nem na viabilidade das células, mas pode ser um fator estressante que provoca variações iniciais nos níveis proteicos dos componentes da UPR.

Os resultados obtidos foram quantificados para os três tipos celulares estudados. Como os valores obtidos para as células parentais e Min6 scC não foram significativamente diferentes dos valores obtidos para as células Min6 shHSPB1, os resultados a seguir são compostos de imagens dos western blots representativas de cada tipo celular e gráficos de barras correspondentes a

todos os resultados analisados apenas para as células parentais e as HSPB1 silenciadas.

4.3.1. Prolactina modula o início da UPR modificando os níveis de BiP ao longo do tempo

Inicialmente foram analisados os níveis de BiP ou GRP78 ao longo do tempo, pois essa chaperona faz parte do início da resposta a proteínas mal dobradas e está envolvida na ativação das três vias que compõe a UPR (SZEGEZDI et al., 2006).

Os resultados apresentados na figura 15 mostraram que tunicamicina induziu um aumento na quantidade dessa chaperona tanto na presença (9h; $1,7 \pm 0,3$ Unidades Arbitrárias (UA)) quanto na ausência da prolactina (6h; $1,7 \pm 0,1$ UA). O silenciamento de HSPB1 inibiu o aumento de BiP induzido por PRL, quando comparado as células parentais (6h $1,3 \pm 0,2$ UA; 9h $1,6 \pm 0,1$ UA). Tapsigargina pareceu aumentar os níveis de BiP de forma significativa apenas em Min6 shHSPB1, tanto na presença (30min $0,8 \pm 0,06$ UA; 1h $1,1 \pm 0,1$ UA; 3h $0,9 \pm 0,06$ UA) quanto na ausência de prolactina (3h $1,4 \pm 0,1$ UA; 6h $1,5 \pm 0,1$ UA; 9h $0,9 \pm 0,06$ UA) (Figura 15).

Já nas células tratadas com citocinas, foi visualizado que prolactina promoveu uma mudança no perfil dos níveis dessa chaperona ao longo dos tempos estudados. A presença de PRL promoveu um adiantamento do pico de aumento de BiP passando de 9h ($1,6 \pm 0,1$ UA) para 30 minutos ($1,4 \pm 0,1$ UA). Nas células Min6 shHSPB1 essa antecipação no aumento de BiP não foi visualizada. Mostrando que HSPB1 estaria mediando este processo nas células beta.

Figura 15: Modulação dos níveis de BiP na presença ou ausência de prolactina. Células Min6, Min6 scC e Min6 shHSPB1 foram submetidas à privação de soro por 24h, pré-tratadas ou não com prolactina (300ng/mL) por 30min, na presença ou ausência de uma combinação de citocinas (Cit) ($\text{TNF}\alpha$, 8ng/mL; $\text{INF}\gamma$, 16ng/mL; $\text{IL-1}\beta$, 1,6ng/mL) ou estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina (Tun), 15 $\mu\text{g/mL}$; tapsigargina (Tag), 75mM). Após os tempos de 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas e 9 horas de tratamento, foram obtidos extratos proteicos dos quais verificou-se os níveis de BiP ao longo dos tempos estudados por meio de ensaios de western blot. (Controle/Ctrl/0min) Níveis de BiP avaliado de extratos proteicos obtidos de células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0,1% de soro fetal bovino. (A-C) Resultados representativos dos westerns blots obtidos. (D-E) Histogramas referentes a todos os resultados apresentados como unidade arbitrária de densitometria após a normalização pelo conteúdo de α -tubulina. Os resultados são médias $\pm$ EPM; $n=3$ experimentos independentes; *: $p<0,05$; tratamento vs. controle (Ctrl/0min).

4.3.2. Modulação da via PERK promovida pela prolactina

A primeira via da UPR, chamada de via PERK, é composta, inicialmente, por essa proteína cinase que dá nome à via. Tal proteína atua se autofosforilando e fosforilando o segundo componente que é o fator de iniciação eucariótico de 2α (eIF2 α). Esse evento ativa o mecanismo de tradução do terceiro componente da via, o fator ativador de transcrição 4 (ATF4). A via PERK é considerada a primeira a via de resposta a proteínas mal dobradas a ser ativada (SZEGEZDI et al., 2006).

Com relação aos níveis de fosforilação de PERK, viu-se que prolactina promoveu um adiantamento e um aumento na fosforilação desta proteína nas células tratadas com tunicamicina (30min $2,8 \pm 0,2$ UA; 1h $1,5 \pm 0,1$ UA) quando comparado com o tratamento com esse estressor na ausência do hormônio prolactina (9h $2,6 \pm 0,4$ UA). O silenciamento de HSPB1 levou a uma diminuição geral dos níveis de ativação de PERK sem promover uma mudança no perfil da resposta máxima observada (Tun+PRL: 30min $0,9 \pm 0,1$ UA; 1h $1,1 \pm 0,06$ UA; 3h $1 \pm 0,1$ UA; TUN: 30min $0,9 \pm 0,02$ UA; 1h $1,3 \pm 0,1$ UA; 3h $1,1 \pm 0,3$ UA; 9h $1,1 \pm 0,2$ UA) (Figura 16).

No tratamento com taspigargina, também foi visto um adiantamento e aumento nos níveis de PERK fosforilado na presença do hormônio (1h $2,2 \pm 0,5$ UA). Nas células silenciadas para HSPB1 e mantidas na presença de PRL, esse aumento foi atenuado (1h $1,1 \pm 0,06$ UA) (Figura 16).

Figura 16: Modulação dos níveis de fosforilação de PERK na presença ou ausência de prolactina. Células Min6, Min6 scC e Min6 shHSPB1 foram submetidas à privação de soro por 24h, pré-tratadas ou não com prolactina (300ng/mL) por 30min, na presença ou ausência de uma combinação de citocinas (Cit) ($\text{TNF}\alpha$, 8ng/mL; $\text{INF}\gamma$, 16ng/mL; $\text{IL-1}\beta$, 1,6ng/mL) ou estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina (Tun), 15 $\mu\text{g/mL}$; taspigargina (Tag), 75mM). Após os tempos de 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas e 9 horas de tratamento, foram obtidos extratos proteicos dos quais verificou-se os níveis de fosforilação de PERK ao longo dos tempos estudados por meio de ensaios de western blot. (Controle/Crt/0min) Níveis de fosforilação de PERK avaliado de extratos proteicos obtidos de células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0,1% de soro fetal bovino. (A-C) Resultados representativos dos westerns blots obtidos. (D-E) Histogramas referentes a todos os resultados apresentados como unidade arbitrária de densitometria após a normalização pelo conteúdo de α -tubulina. Os resultados são médias $\pm$ EPM; $n=1-3$ experimentos independentes; *: $p<0,05$; tratamento vs. controle (Crt/0min).

Já no tratamento com citocinas, viu-se uma quantidade bastante significativa da fosforilação de PERK tanto na presença (30min $2,9 \pm 0,2$ UA; 3h $4,6 \pm 0,1$ UA; 6h $2,7 \pm 0,4$ UA; 9h $3,9 \pm 0,1$ UA) quanto na ausência de prolactina (6h $4,3 \pm 0,6$ UA; 9h $3 \pm 0,1$ UA), mas na presença do hormônio esse pico de fosforilação foi detectado mais precocemente do que nas células mantidas na ausência do hormônio. Viu-se também, que prolactina manteve PERK fosforilado por todos os tempos estudados. Esse adiantamento e prolongamento da ativação não foi visualizado nas células HSPB1 silenciadas (Figura 16).

Continuando a analisar a primeira via da URP, estudamos os níveis de fosforilação de eIF2 α . Nas células tratadas com ambos os controles de estresse, os nossos resultados mostraram que PRL induziu um aumento significativo dos níveis eIF2 α . Esse efeito não foi detectado na ausência de HSPB1 (Figura 17). No tratamento com tunicamicina, a fosforilação de eIF2 α foi mais intensa na presença de PRL (6h $4,1 \pm 1,5$ UA) do que na ausência desse hormônio (30min $1,6 \pm 0,1$ UA). Em Min6 shHSPB1, os níveis de eIF2 α permaneceram semelhantes ao longo do tempo independentemente do tratamento hormonal, perdendo-se, portanto, o pico de fosforilação de 6h induzido pelo hormônio observado nas células parentais (Figura 17).

A presença PRL promoveu um aumento na ativação de eIF2 α nas células Min6 desafiadas com tapsigargina, (6h $2,8 \pm 0,4$ UA). Nas células silenciadas, houve aumento significativo da fosforilação desse fator, tanto na presença (30min $1,1 \pm 0,09$ UA; 1h $1,3 \pm 0,03$ UA; 3h $1,3 \pm 0,1$ UA; 6h $1,3 \pm 0,2$ UA) quanto na ausência do hormônio (30min $1,1 \pm 0,01$ UA; 1h $1,3 \pm 0,1$ UA; 3h $1,2 \pm 0,06$ UA), mas não tão intenso quanto nas células parentais (Figura 17).

Figura 17: Modulação dos níveis de fosforilação de eIF2α na presença ou ausência de prolactina. Células Min6, Min6 scC e Min6 shHSPB1 foram submetidas à privação de soro por 24h, pré-tratadas ou não com prolactina (300ng/mL) por 30min, na presença ou ausência de uma combinação de citocinas (Cit) ($\text{TNF}\alpha$, 8ng/mL; $\text{INF}\gamma$, 16ng/mL; $\text{IL-1}\beta$, 1,6ng/mL) ou estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina (Tun), 15μg/mL; tapsigargina (Tag), 75mM). Após os tempos de 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas e 9 horas de tratamento, foram obtidos extratos proteicos dos quais verificou-se os níveis de fosforilação de eIF2α ao longo dos tempos estudados por meio de ensaios de western blot. (Controle/Crt/0min) Níveis de fosforilação de eIF2α avaliado de extratos proteicos obtidos de células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0,1% de soro fetal bovino. (A-C) Resultados representativos dos westerns blots obtidos. (D-E) Histogramas referentes a todos os resultados apresentados como unidade arbitrária de densitometria após a normalização pelo conteúdo de α-tubulina. Os resultados são médias $\pm$ EPM; n=3 experimentos independentes; *: $p < 0,05$; tratamento vs. controle (Crt/0min).

Já no tratamento com citocinas, prolactina também promoveu um aumento da fosforilação desse fator (3h $2,5 \pm 0,7$ UA) quando comparado aos tratamentos sem o hormônio (6h $1,2 \pm 0,1$ UA; 9h $\pm 0,06$ UA). Na ausência da chaperona HSPB1 esse perfil de resposta promovido por PRL não foi visualizado. Estes resultados mostraram que HSPB1 poderia estar envolvido no processo de ativação mais precoce de eIF2 α como parte de uma resposta protetora induzida pela PRL frente ao dano induzido no contexto do diabetes tipo 1 (Figura 17).

Verificou-se também os níveis de ATF4, o último componente da via PERK.

Este fator encontrou-se bastante presente nas células tratadas com os estressores. Viu-se que a PRL induziu aumentos nos níveis de ATF4 quando comparados às células mantidas na ausência do hormônio (TUN+PRL:3h $2,5 \pm 0,04$ UA; 6h $8 \pm 1,5$ UA; TUN:1h $1 \pm 0,2$ UA; 3h $2,5 \pm 0,4$ UA; 6h $1,6 \pm 0,05$ UA; 9h $0,9 \pm 0,08$ UA). Esse aumento significativo promovido pelo hormônio, foi perdido nas células Min6 shHSPB1 tanto na presença (3h $1,7 \pm 0,4$ UA) quanto na ausência de PRL (3h $1,7 \pm 0,1$ UA; 6h $1,7 \pm 0,2$ UA) (Figura 18).

Nas células tratadas com taspargina, foi visto um pico mais intenso na ausência da prolactina (6h $4,6 \pm 1$ UA; 9h $1,6 \pm 0,1$ UA). Por outro lado, o tratamento hormonal manteve os níveis de ATF4 significativamente maiores que o controle ao longo de todos os tempos estudados (30min $1,1 \pm 0,1$ UA; 1h $1 \pm 0,1$ UA; 3h $0,9 \pm 0,2$ UA; 6h $2,1 \pm 0,3$ UA; 9h $1,2 \pm 0,1$ UA). Nas células Min6 shHSPB1, foram observados aumentos significativos, mas não tão intensos quanto nas células parentais. Na presença do hormônio, os níveis de ATF4 mostraram-se significativamente maiores em tempos mais curtos (30min

1,4 $\pm$ 0,3 UA; 1h 1,6 $\pm$ 0,3 UA) do que na ausência de PRL (3h 1,1 $\pm$ 0,1 UA; 6h 1,7 $\pm$ 0,2 UA; 9h 0,8 $\pm$ 0,04 UA) (Figura 18).

Figura 18: Modulação dos níveis de ATF4 na presença ou ausência de prolactina. Células Min6, Min6 scC e Min6 shHSPB1 foram submetidas à privação de soro por 24h, pré-tratadas ou não com prolactina (300ng/mL) por 30min, na presença ou ausência de uma combinação de citocinas (Cit) (TNF α , 8ng/mL; INF γ , 16ng/mL; IL-1 β , 1,6ng/mL) ou estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina (Tun), 15 μ g/mL; taspigargina (Tag), 75mM). Após os tempos de 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas e 9 horas de tratamento, foram obtidos extratos proteicos dos quais verificou-se os níveis de ATF4 ao longo dos tempos estudados por meio de ensaios de western blot. (Controle/Crt/0min) Níveis de ATF4 avaliados de extratos proteicos obtidos de células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0,1% de soro fetal bovino. (A-C) Resultados representativos dos westerns blots obtidos. (D-E) Histogramas referentes a todos os resultados apresentados como unidade arbitrária de densitometria após a normalização pelo conteúdo de α -tubulina. Os resultados são médias $\pm$ EPM; n=1-3 experimentos independentes; *: p<0,05; tratamento vs. controle (Crt/0min).

Já nas células tratadas com citocinas, os resultados preliminares mostrados sugerem que a prolactina estaria adiantando o aumento significativo nos níveis de ATF4 (9h $1,5 \pm 0,2$ UA), quando comparado ao tratamento na ausência do hormônio (30min $1,3 \pm 0,1$ UA; 1h $1,3 \pm 0,1$ UA). Esse perfil não foi visualizado nas células HSPB1 silenciadas (Figura 18). Desta forma, os resultados obtidos até o momento indicariam que HSPB1 seria um dos mediadores da modulação da UPR promovido pela prolactina nas células beta.

4.3.3. Modulação da via ATF6 promovida pela prolactina

Analísaram-se também os níveis do componente da segunda via da UPR, o ATF6 clivado.

Viu-se que apenas os controles de estresse de retículo apresentaram níveis altos de ATF6 clivado, principalmente na presença de prolactina (TUN+ PRL: 3h $16,9 \pm 1,4$ UA; 6h $14,6 \pm 1,1$ UA; TUN: 3h $2,2 \pm 0,4$; 6h $1,5 \pm 0,01$ UA). Resultados preliminares parecem apontar que o perfil de resposta de ATF6 clivado na presença de prolactina se vê modificado nas células silenciadas (Figura 19). A via de ATF6 não parece estar tão ativada no caso das células tratadas com Tapsigargina durante todos os tempos analisados.

Além disso, nas células tratadas com citocinas, viu-se que prolactina adiantou e promoveu aumento nos níveis de ATF6 clivado (30min $3 \pm 1,1$ UA) quando comparado com as células apenas tratadas com citocinas (1h $2,7 \pm 0,4$ UA; 3h $1,5 \pm 0,2$ UA). Viu-se também que o perfil de resposta foi semelhante nas células silenciadas apenas na presença do hormônio, mas de forma menos intensa (30min $0,8 \pm 0,1$ UA; 1h $0,9 \pm 0,1$ UA) (Figura 19). Estes resultados

sugerem que HSPB1 é um mediador parcial da resposta da PRL na via de ATF6.

Figura 19: Modulação dos níveis de ATF6 na presença ou ausência de prolactina. Células Min6, Min6 scC e Min6 shHSPB1 foram submetidas à privação de soro por 24h, pré-tratadas ou não com prolactina (300ng/mL) por 30min, na presença ou ausência de uma combinação de citocinas (Cit) ($\text{TNF}\alpha$, 8ng/mL; $\text{INF}\gamma$, 16ng/mL; $\text{IL-1}\beta$, 1,6ng/mL) ou estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina (Tun), 15 $\mu\text{g/mL}$; taspigargina (Tag), 75mM). Após os tempos de 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas e 9 horas de tratamento, foram obtidos extratos proteicos dos quais verificou-se os níveis de ATF6 ao longo dos tempos estudados por meio de ensaios de western blot. (Controle/Crt/0min) Níveis de ATF6 avaliados de extratos proteicos obtidos de células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0,1% de soro fetal bovino. (A-C) Resultados representativos dos westerns blots obtidos. (D-E) Histogramas referentes a todos os resultados apresentados como unidade arbitrária de densitometria após a normalização pelo conteúdo de α -tubulina. Os resultados são médias $\pm$ EPM; n=1-3 experimentos independentes; *: $p < 0,05$; tratamento vs. controle (Crt/0min).

4.3.4. Modulação dos níveis de IRE1 α

Verificamos também os níveis de IRE1 α , componente da terceira via da UPR, ao longo dos tempos de tratamento estudados.

No caso dos tratamentos com os indutores de estresse de retículo endoplasmático, o tratamento com PRL promoveu um aumento dos níveis proteicos de IRE1 α .

Em particular, nas células tratadas com tunicamicina, a presença do hormônio induziu aumento significativo de IRE1 α partir das 3 horas de tratamento, mantendo-se até 6 horas (3h $7,6 \pm 1$ UA; 6h $7,2 \pm 1,6$ UA) quando comparados aos níveis na ausência de PRL (3h $2 \pm 0,4$ UA; 6h $1,7 \pm 0,1$ UA; 9h $2 \pm 0,2$ UA). O silenciamento de HSPB1 aboliu o aumento induzido pelo tratamento hormonal mantendo os níveis de IRE1 α semelhantes tanto na presença quanto na ausência de PRL (TUN+PRL: 3h $1,5 \pm 0,1$ UA; 6h $1,6 \pm 0,2$ UA; 9h $1,8 \pm 0,2$ UA; TUN: 3h $1,6 \pm 0,01$ UA; 6h $2,5 \pm 0,2$ UA; 9h $1,5 \pm 0,1$ UA) (Figura 20).

O mesmo tipo de perfil de indução de IRE1 α por PRL foi observado nas células expostas à taspigargina. Cabe salientar que a cinética da indução parece diferir um pouco, observando-se aumentos significativos em tempos menores pós-indução do estresse (TAG+PRL: 30min $2,4 \pm 0,3$ UA; 1h $1,9 \pm 0,1$ UA). Em células Min6 shHSPB1, esse aumento não foi observado (Figura 20).

Já no tratamento com citocinas, o tratamento hormonal promoveu uma mudança significativa nos níveis de IRE1 α . Na presença de PRL, foi observado não só que o pico de IRE1 α aparece a tempos menores (Cit: 6h $2,4 \pm 0,2$ UA; 9h $1,8 \pm 0,1$ UA; Cit+PRL: 1h $1,3 \pm 0,1$ UA) pós-indução do estresse, mas também que ele promoveu uma degradação antecipada do fator.

Figura 20: Modulação dos níveis de IRE1 α na presença ou ausência de prolactina. Células Min6, Min6 scC e Min6 shHSPB1 foram submetidas à privação de soro por 24h, pré-tratadas ou não com prolactina (300ng/mL) por 30min, na presença ou ausência de uma combinação de citocinas (Cit) (TNF α , 8ng/mL; INF γ , 16ng/mL; IL-1 β , 1,6ng/mL) ou estressores de retículo endoplasmático (Tunicamicina (Tun), 15 μ g/mL; taspigargina (Tag), 75mM). Após os tempos de 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas e 9 horas de tratamento, foram obtidos extratos proteicos dos quais verificou-se os níveis de IRE1 α ao longo dos tempos estudados por meio de ensaios de western blot. (Controle/Ctrl/0min) Níveis de IRE1 α avaliados de extratos proteicos obtidos de células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0,1% de soro fetal bovino. (A-C) Resultados representativos dos westerns blots obtidos. (D-E) Histogramas referentes a todos os resultados apresentados como unidade arbitrária de densitometria após a normalização pelo conteúdo de α -tubulina. Os resultados são médias $\pm$ EPM; n=3 experimentos independentes; *: p<0,05; tratamento vs. controle (Ctrl/0min).

O silenciamento de HSPB1 exerceu um efeito contrário ao observado anteriormente, já que induziu um adiantamento do máximo de ativação nas células que não foram tratadas com PRL (3h $4,4 \pm 1,4$ UA), assim como um aumento expressivo e tardio naquelas que foram mantidas na presença do hormônio (6h $1,8 \pm 0,1$ UA; 9h $5,1 \pm 0,4$ UA) (Figura 20), indicando que HSPB1 pode está inibindo a ativação de IRE1 α .

4.3.5. Prolactina diminui a morte desencadeada pela UPR por meio da modulação de CHOP

Verificamos os níveis do fator pró-apoptótico CHOP ao longo dos tempos de tratamento estudados.

Resultados preliminares mostraram que o tratamento com o estressor tunicamicina, promove um aumento nos níveis de CHOP a partir de 3 horas da indução do estresse (3h 1,9 UA; 6h 3,6 UA; 9h 5,7 UA). A presença de prolactina promoveu uma diminuição nos níveis desse fator nesses tempos, nas células parentais (6h 1,6 UA; 9h UA indetectável) (Figura 21).

Nas células tratadas com citocinas, os níveis de CHOP seguiram uma cinética de aumento semelhante ao controle de estresse de retículo. O tratamento hormonal promoveu também uma diminuição significativa nos níveis desse fator pró-apoptótico nas células parentais (Cit: 6h 1,4 UA e 9h 1,6 UA); Cit+PRL: 6h 0,2 UA; 9h UA indetectável). Nas células Min6 shHSPB1, não foi detectada uma diminuição dos níveis de CHOP na presença de PRL (Cit+PRL: 6h 1,1 UA; 9h 0,9 UA; Cit: 6h 1,5 UA; 9h 1,4 UA).

Cabe salientar que resultados prévios do nosso grupo mostraram que o pico de atividade de caspase-3 nas células Min6 expostas à combinação de

citocinas pró-inflamatórias utilizadas no experimento acontece às 9h (MANSANO, 2013).

Dada a relação direta entre o aumento de níveis de CHOP e indução de apoptose, os resultados obtidos mostram a importância de HSPB1 no mecanismo anti-apoptótico promovido pela prolactina (Figura 21).

Figura 21: Modulação dos níveis de CHOP na presença ou ausência de prolactina. Células Min6, Min6 scC e Min6 shHSPB1 foram submetidas à privação de soro por 24h, pré-tratadas ou não com prolactina (300ng/mL) por 30min, na presença ou ausência de uma combinação de citocinas (Cit) ($\text{TNF}\alpha$, 8ng/mL; $\text{INF}\gamma$, 16ng/mL; $\text{IL-1}\beta$, 1,6ng/mL) ou estressor de retículo endoplasmático (Tunicamicina (Tun), 15 $\mu\text{g/mL}$). Após os tempos de 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas e 9 horas de tratamento, foram obtidos extratos proteicos dos quais verificou-se os níveis de CHOP ao longo dos tempos estudados por meio de ensaios de western blot. (Controle/Ctrl/0min) Níveis de CHOP avaliado de extratos proteicos obtidos de células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0,1% de soro fetal bovino. (A-C) Resultados representativos dos westerns blots obtidos. (D-E) Histogramas referentes a todos os resultados apresentados como unidade arbitrária de densitometria após a normalização pelo conteúdo de α -tubulina. Os resultados são de n=1 experimentos independentes.

4.3.6. Participação de HSPB1 na modulação da resposta a proteínas mal dobradas promovida pela prolactina no contexto do diabetes *mellitus* tipo 1.

Após serem analisadas as mudanças nos níveis proteicos dos componentes da UPR na presença ou ausência tanto da prolactina quando de HSPB1, pode-se resumir uma possível cinética de ativação das vias de UPR. Como o foco da nossa pesquisa é desvendar os mecanismos de estresse e morte envolvidos no contexto do diabetes; foi realizada uma síntese dos resultados obtidos no caso particular das células expostas à combinação de citocinas pró-inflamatórias utilizadas como modelo do ambiente imunológico ao qual estão submetidas as células beta no DM1.

A figura 22 mostra a modulação da UPR promovida pela prolactina com a participação ou não de HSPB1 em células Min6. Nesse contexto, viu-se que na ausência do hormônio a via de ATF6 foi ativada em primeiro lugar e posteriormente houve ativação tanto da via PERK quanto de IRE1 α , sendo a de PERK de forma mais intensa.

Além disso, por volta das 9h de tratamento, houve possivelmente um aumento dos níveis de CHOP indicando sua possível participação no processo de sinalização de morte por apoptose, já que é sabido que após as 9h de tratamento com citocinas pró-inflamatórias, há atividade máxima de caspase 3, enzima que participa da via clássica de morte por apoptose (MANSANO, 2013).

Na presença de prolactina, a UPR se comportou de forma diferente. A via PERK e ATF6 foram ativadas quase simultaneamente, sendo a intensidade da ativação da via PERK maior. Após isso, houve ativação da via de IRE1 α , e posteriormente a via PERK se ativou uma segunda vez e permaneceu ativada

até o ultimo tempo estudado sem ser detectado o aumento de CHOP como mediador entre a UPR e a indução de apoptose (Figura 22B).

Nas células HSPB1 silenciadas, houve ativação significativa apenas de IRE1 α e possíveis aumentos da concentração de CHOP em tempos mais prolongados de tratamento. Na presença de prolactina, ATF6 se ativou, assim como IRE1 α . Mas essa última esteve presente de forma mais prolongada e intensa, nos mostrando indicações de que HSPB1 talvez inibia a ativação da via de IRE1 α .

Figura 22. Modulação da UPR promovida pela prolactina no contexto do diabetes tipo 1 ao longo do tempo. Perfil da amplitude e tempo de ativação das vias da resposta a proteínas mal dobradas em células Min6 parentais tratadas (B) ou não (A) com citocinas pró-inflamatórias (TNF α , 8ng/mL; INF γ , 16ng/mL; IL-1 β , 1,6ng/mL), na presença (C) ou ausência (D) de HSPB1.

5. Discussão

O transplante de ilhotas pancreáticas é uma alternativa atrativa para o tratamento do DM1 (BARTON et al., 2012). Este tratamento pode efetivamente controlar a glicemia e é recomendado principalmente para os pacientes denominados hiperlábeis, os quais sofrem de episódios de hipoglicemia despercebidos (AGARWAL; BRAYMAN, 2012). No entanto, ainda há questões importantes a serem consideradas para que este tratamento possa suprir a demanda existente, tais como exigências de mais de um paciente doador por cada receptor e a necessidade de imunossupressores com efeitos colaterais associados não danosos ao tecido transplantado (MATSUMOTO, 2010; AGARWAL; BRAYMAN, 2012).

Modificações no processo de isolamento e transplante de ilhotas pancreáticas vem sendo adotadas com a finalidade de manter a sobrevida e a funcionalidade do enxerto por mais tempo (AGARWAL; BRAYMAN, 2012). Uma vez que o isolamento de ilhotas ainda é um processo que gera estresse celular, faz-se necessário o desenvolvimento de mecanismos moleculares que protejam as ilhotas pancreáticas, com a finalidade de mantê-las viáveis e funcionais, otimizando o transplante ao promover uma maior viabilidade das estruturas que manterão a homeostasia da glicose.

Uma das ferramentas promissoras para o aperfeiçoamento do transplante de ilhotas pancreáticas é o uso do hormônio prolactina no processo de isolamento e cultura das mesmas durante período prévio ao transplante. Foi mostrado que este hormônio é importante no desenvolvimento das ilhotas pancreáticas, onde viu-se que ratos com deficiência de receptor de prolactina

(PRLR) apresentaram uma massa reduzida de células beta, e um menor conteúdo de insulina em suas ilhotas (FREEMARK et al., 2002).

Resultados prévios do nosso laboratório e de outros grupos mostraram efeitos benéficos da ação da PRL tanto sobre culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas como no aumento da taxa de sucesso no transplante em modelos animais. Este hormônio foi capaz de aumentar o número de ilhotas e a secreção basal de insulina (LABRIOLA et al., 2007b; YAMAMOTO et al., 2008), além de melhorar a revascularização, a perfusão sanguínea dessas estruturas (JOHANSSON et al., 2009) e inibir a morte celular por apoptose (TERRA et al., 2011; MANSANO, 2013).

Ainda não existem relatos na literatura do envolvimento do hormônio prolactina e seus mecanismos citoprotetores correlacionados com estresse de retículo endoplasmático e a modulação das vias de resposta a proteínas mal dobradas. O presente trabalho mostrou que a prolactina foi capaz de inibir a morte desencadeada pelo estresse de retículo endoplasmático induzido tanto por citocinas pró-inflamatórias quanto pelos estressores tunicamicina e taspigargina.

A perda da viabilidade celular utilizando indutores de estresse de retículo e análise da UPR é bem relatado na literatura em outros modelos celulares. O percentual de células de hepatocarcinomas viáveis foi avaliado após 24h de tratamento com Tunicamicina, Taspigargina e NaF, mostrando que hepatocarcinomas tratados com estressores de ER apresentaram um aumento na morte celular de aproximadamente 46% e 66%, respectivamente (MATSUMOTO et al., 2013). Um outro estudo mostrou que a viabilidade de células derivadas de neuroblastoma tratadas por 24h com Taspigargina foi

reduzida a 81%; sendo que após 48h houve uma redução de 35% de células viáveis (FOLDI et al., 2013).

No contexto do diabetes, vale ressaltar um estudo relacionado a DM2 onde foi verificado o efeito citoprotetor de Lipoproteínas de alta densidade (HDLs) no estresse de retículo endoplasmático. Foi visto que HDLs protegem células beta pancreáticas do estresse de retículo endoplasmático induzido por vários estressores incluindo tunicamicina e taspigargina. Essa diminuição na morte ocorreu pela inibição da via intrínseca da apoptose (PUYAL et al., 2013).

Resultados anteriores do nosso laboratório mostraram uma expressão proteica diferencial em ilhotas pancreáticas humanas mantidas na presença ou ausência de prolactina. Dentre essas proteínas com expressão diferencial, encontrou-se a HSPB1, proteína da família das *Small Heat Shock Proteins* (HSPs) (LABRIOLA et al., 2007a). Em células expostas ao estresse celular, as HSPs atuam como chaperonas, combatendo a formação de polipeptídeos mal dobrados, permitindo o redobramento destes durante a recuperação do estresse ou levando-os à degradação, por meio da via da ubiquitina-proteassoma (ARRIGO et al., 2007).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que HSPB1 está ligada ao mecanismo citoprotetor da prolactina. Viu-se que em células beta pancreáticas murinas (Min6) HSPB1 silenciadas, o hormônio prolactina não foi capaz de proteger tais células da morte induzida por citocinas pró-inflamatórias (MANSANO, 2013). Esses dados corroboram os resultados obtidos no presente estudo onde foi mostrado que HSPB1 participa do mecanismo citoprotetor da prolactina em células Min6 tratadas tanto com citocinas pró-inflamatórias assim como com estressores de retículo endoplasmático. Ainda

não existem relatos na literatura sob a participação de HSPB1 na citoproteção promovida pela prolactina sob estresse de retículo endoplasmático.

HSPB1 é produzida em resposta a vários tipos de estresse nos músculos cardíaco e esquelético, bem como no cérebro, atuando como chaperonas que suprimem a agregação de polipeptídeos específicos. Foram feitos alguns estudos que demonstraram que a expressão de HSPB1 está fortemente ligada a proteção contra o enfarte do miocárdio e isquemia cerebral (EFTHYMIOU et al., 2004; LATCHMAN, 2005). Viu-se também que o aumento da expressão de HSPB1 em tumor colorretal está correlacionado a resistência a ação antitumoral da droga 5-fluoruracil. Esse aumento de HSPB1, assim como das suas formas fosforiladas tanto na serina 15 quanto na serina 82, inibem proteínas pró-apoptóticas e aumenta a expressão de proteínas antiapoptóticas (SAKAI et al., 2012).

Sabe-se que o aumento da expressão de chaperonas é um dos mecanismos de atenuação do estresse de retículo ativado por alguns componentes da UPR (SZEGEZDI et al., 2006). Foi visto que o aumento de HSP70 protege células HeLa de estresse de retículo endoplasmático induzido tanto por tunicamicina quanto por taspigargina (KENNEDY; MNICH; SAMALI, 2014).

As células beta pancreáticas apresentam uma alta sensibilidade ao estresse de retículo endoplasmático devido a sua função secretória de insulina. Nesse trabalho mostramos o papel da prolactina e participação da HSPB1 na modulação na resposta a proteínas mal dobradas. Analisamos os níveis proteicos e a fosforilação de alguns componentes da UPR. No contexto geral, a prolactina foi capaz de adiantar o aumento dos níveis proteicos de

componentes da UPR que estão envolvidos no aumento da sobrevivência e manutenção celular. A ativação das vias da UPR tem como efeito inicial manter a homeostase celular atuando na expressão de mais chaperonas com o intuito de restaurar as proteínas que estão mal dobradas no retículo endoplasmático e evitar o acúmulo destas (SZEGEZDI et al., 2006; KIM; XU; REED, 2008).

A Proteína de Regulação por Glicose 78kDa (GRP78) também conhecida como BiP é uma chaperona abundantemente encontrada no retículo endoplasmático sendo um grande componente modulador da UPR. No nosso trabalho, vimos que a prolactina promoveu um aumento e adiantamento da ativação da UPR através do aumento dos níveis da chaperona BiP em células sob estresse (citocinas, tunicamicina e tapsigargina) comparadas com células mantidas em ótimas condições de cultura. No entanto, na ausência de HSPB1, essa antecipação no aumento de BiP não foi mais visualizada. Estes resultados estariam indicando que prolactina e a HSPB1 poderiam modular os níveis de BiP no contexto do DM1. A atenuação da UPR por meio da expressão de genes regenerativos (mReg) em células Min6 foi relatado por Liu e colaboradores (2014). Esse estudo mostrou que os mRegs super-expressos em Min6 protegem as células contra a morte por apoptose, modulando a UPR, induzida por tapsigargina, por meio do aumento da expressão de BiP (LIU et al., 2014).

No presente estudo, foi visto que PRL está envolvida na ativação precoce e prolongamento da via PERK. Nos controles de estresse, prolactina promoveu um adiantamento e um aumento na fosforilação de PERK nas células tratadas tanto com tunicamicina quanto com tapsigargina, e que esse aumento expressivo se perdeu nas células silenciadas para HSPB1. Já no

tratamento com citocinas, viu-se um aumento significativo da fosforilação de PERK. Prolactina pareceu manter PERK fosforilado durante todos os tempos estudados. Esse adiantamento e prolongamento da ativação são perdidos nas células HSPB1 silenciadas. Os resultados obtidos mostram que HSPB1 é essencial para a ativação de PERK induzida por PRL.

A função secretora das células beta explica porque ratos sem PERK são suscetíveis à diabetes. Esses animais apresentaram um aumento na apoptose em células beta e, conseqüentemente, hiperglicemia ao longo do envelhecimento. Sem a ativação da via PERK, esses ratos são mais susceptíveis a sofrer morte celular desencadeada por estresse de retículo endoplasmático (HARDING et al., 2001), pois esta via tem como finalidade tanto o aumento da expressão de componentes que diminuem a tradução como daqueles que aumentam a degradação de proteínas (SZEGEZDI et al., 2006; KIM; XU; REED, 2008).

Um estudo feito com células Min6 mostrou que o aumento da expressão de PERK protege estas células contra estresses causados por algumas patologias incluindo diabetes. A participação de PERK no mecanismo molecular de citoproteção também foi visto em hepatoblastoma. Nesse estudo, viu-se que o ácido tauroursodeoxicolico (TUDCA) foi capaz de reduzir estresse de retículo por meio da ativação da via PERK por se ligar a regiões hidrofóbicas de proteínas facilitando o processo de degradação destas estruturas (GANI; UPPALA; RAMAIAH, 2015).

No nosso trabalho, também foram analisados os níveis de fosforilação do fator de iniciação eucariótico 2 α . Nas células tratadas com os indutores de estresse usados como controle positivo, vimos que os níveis de eIF2 α se

apresentaram significativamente mais intensos na presença de prolactina, e que tal intensidade foi perdida na ausência de HSPB1. Já no tratamento com citocinas, prolactina também promoveu um aumento da fosforilação desse fator quando comparado aos tratamentos sem o hormônio, e na ausência da chaperona, esse perfil de resposta promovido por PRL desapareceu; evidenciando que HSPB1 estaria envolvida nesse processo de ativação de eIF2 α induzido pelo tratamento hormonal no contexto do DM1. Estes resultados mostram que o efeito citoprotetor da PRL poderia envolver uma parada da tradução proteica por meio da fosforilação de eIF2 α .

Um estudo recente mostrou que HSPB1 está envolvida na citoproteção de câncer de pâncreas e de próstata, levando a resistência a drogas antitumorais. Esse mecanismo de citoproteção de HSPB1 se dá pela interação dessa chaperona com fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E), esta interação impede a degradação desse fator pelo mecanismo da ubiquitina-proteassoma (BAYLOT et al., 2011). A ausência da fosforilação de eIF2 α em células beta causa um severo fenótipo diabético devido ao aumento e a não regulação de eventos como: tradução da pró-insulina, defeitos no tráfico de proteínas realizado pelo RE e redução da expressão de genes de resposta a estresse (BACK et al., 2010).

O fator de transcrição de ativação 4 (ATF4) é induzido por sinais de estresse tais como hipóxia, estresse oxidativo, estresse de RE e privação de aminoácidos (AMERI; HARRIS, 2008). Na UPR, existe um aumento na expressão de ATF4 após o fator de iniciação eucariótico 2 α ser fosforilado por PERK (LU; HARDING; RON, 2004). No nosso estudo, ATF4 encontrou-se elevado nas células tratadas com os estressores, e a presença de prolactina

promoveu um aumento ainda maior da quantidade deste fator. Tais perfis foram modificados quando comparados com as células HSPB1 silenciadas e submetidas a esses mesmos tratamentos. Já nas células tratadas com citocinas, viu-se que a prolactina adiantou um aumento significativo nos níveis de ATF4, quando comparado ao tratamento na ausência do hormônio. Resultados preliminares mostraram uma modificação desse perfil quando os tratamentos foram realizados nas células HSPB1 silenciadas. Tais dados mostram que a UPR estaria sendo mais ativa e os benefícios celulares poderiam estar relacionados com o aumento de ATF4, corroborando os dados de viabilidade celular, nos quais PRL protegeu Min6 em mais de 50% de morte induzida tanto por citocinas quanto por estressores de RE, indicando que esse fator de transcrição de pró-sobrevivência celular, poderia ser um mediador do mecanismo de citoproteção induzido por PRL.

Cabe salientar que o aumento de ATF4 contribui para a sobrevivência de células beta pancreáticas (Min6) por meio da ativação da proteína 4E-BP1. ATF4 aumenta a expressão do gene Eif4ebp1 que codifica 4E-BP1, que, por sua vez, participa do processo de tradução proteica se ligando ao cap 5' do mRNA impedindo a formação do complexo eIF4E, causando uma parada na tradução de proteínas (YAMAGUCHI et al., 2008). O aumento dos níveis de ATF4 observados no nosso estudo poderiam indicar uma maior sobrevivência celular por meio do aumento da expressão de genes pró-sobrevivência. Atenuação do estresse de retículo endoplasmático foi observado em células beta pancreáticas de rato, onde o hormônio peptídico exendin-4 quando ligado ao receptor GLP-1R, induzem um aumento de ATF4 promovendo uma adaptação e sobrevivência dessas células beta (YUSTA et al., 2006).

Em relação às outras vias da UPR, o nosso trabalho mostrou que apenas o tratamento controle de estresse de retículo apresentou níveis altos de ATF6 clivado, principalmente na presença de prolactina. Observou-se também que o perfil de resposta de ATF6 clivado na presença de PRL pareceu ser bastante diferente quando analisado nas células HSPB1 silenciadas. O tratamento com taspigargina não induziu grandes mudanças nos níveis desse fator ao longo do tempo tanto na presença quanto na ausência da PRL. No entanto, nossos dados indicam um possível aumento nos níveis de ATF6 nas células HSPB1 silenciadas.

Já nas células tratadas com citocinas, viu-se que prolactina adiantou e promoveu um aumento dos níveis de ATF6 clivado quando comparado com as células apenas tratadas com citocinas. Viu-se também que o perfil de resposta foi diferente nas células silenciadas, mostrando que pelo menos em parte, HSPB1 pareceu promover uma ativação mais intensa desse fator.

Em outros modelos, foi reportado que ATF6 promoveu a restauração da homeostasia celular por meio do aumento da expressão de chaperonas, e diminuição da morte por apoptose por meio da supressão do fator pró-apoptótico WWBP1 (*tryptophan-tryptophan domain binding protein 1*) e aumento da expressão do fator anti-apoptótico Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia sequence 1*) (MORISHIMA; NAKANISHI; NAKANO, 2011), tais eventos benéficos poderiam estar ocorrendo nas células Min6 mantidas na presença da prolactina no nosso modelo celular que mimetiza a DM1. Células beta pancreáticas de rato submetidas a constante estresse de retículo devido a uma mutação no gene que produz insulina, apresentaram um aumento de ATF6 clivado, consequentemente foi visto um aumento das chaperonas GRP78 e

GRP94, assim como um aumento da expressão do fator XBP1 (NOZAKI et al., 2004).

O presente trabalho mostrou que nos tratamentos com os estressores, os níveis de IRE1 α estavam altos em células tratadas com prolactina. No tratamento com tunicamicina, os níveis de IRE1 α na presença do hormônio se apresentaram bastante altos, tal perfil de expressão foi perdido nas células Min6 HSPB1 silenciadas, tornando-se semelhante ao das células que foram tratadas apenas com esse estressor. No tratamento com taspargina, o perfil dos níveis de IRE1 α se perdeu na ausência de HSPB1, tornando-se parecido com o obtido nos tratamentos sem o hormônio tanto nas células silenciadas quanto nas parentais. Já no tratamento com citocinas, prolactina adiantou o aumento significativo de IRE1 α , mas na ausência desse hormônio, foram observados níveis maiores desse componente da UPR.

Estes resultados mostram, mais uma vez, que a UPR é ativada com muita intensidade e que a citoproteção promovida por prolactina, além de estar relacionada à diminuição da morte por apoptose já relatada na literatura (MANSANO, 2013). Este efeito poderia estar correlacionado à modulação das vias de resposta a proteínas mal dobradas. Uma das formas de restaurar a homeostasia celular é a atividade nuclease de IRE1 α (SZEGEZDI et al., 2006; RON; WALTER, 2007). Essa enzima, é capaz de clivar mRNAs, em sequências similares às de XBP1, as quais são degradadas devido a exposição das terminações 5' e 3' que são reconhecidas por exoribonucleases (MAUREL et al., 2014). Tal evento, impede a tradução de mais proteínas e o futuro acúmulo destas no retículo endoplasmático, tornando assim, um evento citoprotetor que pode estar ocorrendo na presença de prolactina.

No nosso estudo, observou-se um aumento mais expressivo de IRE1 α nas células HSPB1 silenciadas tanto na presença quanto na ausência de prolactina. Nessa linhagem, prolactina adiantou a ativação de IRE1 α . Mostrando evidências de que talvez IRE1 α , nesse caso, fosse ativada de forma mais intensa devido a seu envolvimento na promoção da morte celular por apoptose, ativando componentes que fosforilam proteínas antiapoptóticas, tais como BCL-2 (SZEGEZDI et al., 2006), assim como, pode ter ocorrido um aumento da degradação do pré-microRNA que inibe componentes pró-apoptóticos como a caspase-2. O envolvimento de IRE1 α é essencial na indução da morte por apoptose, enquanto, nesse caso, PERK ou ATF6 são dispensáveis (UPTON et al., 2012).

Na UPR, tanto ATF4 quanto ATF6 induzem a expressão de CHOP. CHOP é responsável por bloquear a expressão de proteínas antiapoptóticas da família BCL2, porém, ativa proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bak, promovendo um sinal de morte celular por apoptose (SZEGEZDI et al., 2006; RON; WALTER, 2007; KIM; XU; REED, 2008). No nosso estudo, observamos que prolactina diminuiu os níveis de CHOP em tempos mais longo, nas células parentais, tanto no tratamento com os indutores de estresse de retículo endoplasmático quanto após a exposição às citocinas pró-inflamatórias. Analisando os níveis de CHOP nas células silenciadas para HSPB1, vimos que na presença de prolactina não houve uma diminuição de CHOP em tempos maiores de tratamento.

A diminuição da expressão de CHOP protege células que foram submetidas a estresse de retículo endoplasmático (ZINSZNER et al., 1998) mostrando que esse fator estaria diretamente relacionado no aumento da morte

celular por apoptose por meio da repressão de Bcl-2 (MCCULLOUGH et al., 2001). Uma diminuição da expressão de CHOP por meio do aumento de chaperonas promovido pela UPR é um dos mecanismos de proteção ativado por células sob estresse de retículo endoplasmático (OYADOMARI et al., 2002). Resultados recentes mostraram que HSPB1 estaria também ligada à diminuição de CHOP em modelos de isquemia e reperfusão em células dos túbulos renais proximais (MATSUMOTO et al., 2015).

Um estudo feito com células Min6 mostrou que a inibição de CHOP diminui a morte celular por apoptose. Nesse mesmo estudo, foi visto que a inibição de IRE1 α e XBP1 aumenta a morte de ilhotas pancreáticas de camundongos. Além disso, o balanço entre o mediador pró-sobrevivência XBP1 e o fator apoptótico CHOP é importante para a sobrevivência das células beta pancreática sob estresse de retículo endoplasmático (CHAN et al., 2015).

Outros benefícios da ausência de CHOP foram reportados. Camundongos com deficiência em CHOP e submetidos a alta concentração de glicose, apresentaram menos disfunção cardíaca, e baixa taxa de apoptose em células musculares (NAM et al., 2015). Foi observado em camundongos com diabetes tipo 1, um aumento da quantidade de CHOP em células neuronais, indicando a participação desse fator na morte dessas células e consequente desenvolvimento de encefalopatia (ZHAO et al., 2015).

A indução da expressão de CHOP em resposta ao estresse de retículo é dependente de JNK por meio da via de IRE1 α (OYADOMARI et al., 2002) e ativação de caspase-12 (NAKAGAWA et al., 2000). Nossos resultados mostraram que nas células tratadas com citocinas na presença de PRL houve uma diminuição tanto de CHOP quanto de IRE1 α , indicando, portanto, que

provavelmente a atenuação da morte esteja correlacionada a diminuição desses componentes e de JNK.

Após a análise da modulação da UPR no contexto do DM1, podemos inferir que nas células tratadas com prolactina, a parada da tradução proteica promovida pela via PERK, seria ativada antecipadamente e permaneceria ativa por um tempo mais prolongado. Este efeito poderia levar à indução da expressão de mais chaperonas, efeito este promovido pelos fatores de ativação 4 e 6. Além disso, a diminuição no número de mRNA estimulado pela atividade nuclease de IRE1 α , poderiam ser mecanismos citoprotetores ativados pela prolactina que impediriam que as células ativassem a apoptose, reestabelecendo a homeostase celular obtida após ativação intensa da UPR. Além do mais, prolactina poderia estar atenuando a morte por apoptose diminuindo os níveis de CHOP e ativando as vias de resposta a proteínas mal dobradas precocemente. Estes dados contribuem para desvendar um novo mecanismo molecular citoprotetor promovido pela prolactina. Todos os eventos da modulação da UPR pela prolactina via HSPB1 podem ser visualizados na figura 23.

Figura 23: Modificação dos níveis proteicos e de fosforilação da URP promovido pela prolactina via HSPB1. Após o tratamento das células beta com prolactina, a via JAK/STAT é ativada promovendo o aumento da expressão de HSPB1. Essa proteína é um importante mediador dos efeitos citoprotetores da PRL. O aumento de HSPB1 ativa a via de PERK e ATF6, assim como inibe a via de IRE1α e CHOP. A resposta celular resultante levaria a inibição de apoptose e a um aumento da expressão de chaperonas.

6. Conclusões

Diante de todos os resultados obtidos, podemos concluir que prolactina é capaz de proteger células beta pancreáticas contra estresse de retículo endoplasmático sendo HSPB1 essencial no mecanismo de citoproteção. No contexto do DM1, PRL parece ter um efeito modulador da resposta a proteínas mal dobradas aumentando os níveis de BiP, antecipando a ativação de ATF6 e PERK, mantendo a via PERK ativa por mais tempo e inibindo os níveis de CHOP em tempos mais longos. Além disso, a presença de HSPB1 parece inibir a ativação da via de IRE1 α .

Conhecer os mecanismos envolvidos na morte das células beta propicia o desenvolvimento de novas estratégias para promover o aumento do número disponível destas células para transplante, ou ainda a indução da regeneração da massa endógena de células beta de pacientes diabéticos tipo 1 recém diagnosticados e tipo 2 dependentes de insulina. Coletivamente, os resultados aqui apresentados aprofundam os conhecimentos sobre a função de HSPB1, um fator associado a sobrevivência das células beta. Os nossos resultados podem conduzir para o desenvolvimento de estratégias que visam à atenuação da morte de células beta por meio da modulação de uma via de proteção endógena, a qual é independente da modulação do sistema imunológico.

Referências

- ABEL, J. J. Crystalline insulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 12, n. 2, p. 132–6, 1926.
- ADA. Standards of medical care in diabetes. **Association American Diabetes**, v. 39, n. 1, p. 49–612, 2016.
- AGARWAL, A.; BRAYMAN, K. Update on Islet Cell Transplantation for Type 1 Diabetes. **Seminars in Interventional Radiology**, v. 29, n. 02, p. 090–098, 2012.
- AMERI, K.; HARRIS, A. L. Activating transcription factor 4. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 1, p. 14–21, 2008.
- ARRIGO, A. P.; SIMON, S.; GIBERT, B.; KRETZ-REMY, C.; NIVON, M.; CZEKALLA, A.; GUILLET, D.; MOULIN, M.; DIAZ-LATOUD, C.; VICART, P. Hsp27 (HspB1) and α B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. **FEBS Letters**, v. 581, n. 19, p. 3665–3674, 2007.
- ASHKENAZI, A.; SALVESEN, G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 337–356, 2014.
- BACK, S. H.; SCHEUNER, D.; HAN, J.; SONG, B.; RIBICK, M.; WANG, J.; GILDERSLEEVE, R. D.; PENNATHUR, S.; RANDAL, J. NIH Public Access. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 1, p. 13–26, 2010.
- BARDEESY, N.; DEPINHO, R. a. Pancreatic cancer biology and genetics. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 12, p. 897–909, 2002.
- BARTON, F. B.; RICKELS, M. R.; ALEJANDRO, R.; HERING, B. J.; WEASE, S.; NAZIRUDDIN, B.; OBERHOLZER, J.; ODORICO, J. S.; GARFINKEL, M. R.; LEVY, M.; PATTOU, F.; BERNEY, T.; SECCHI, A.; MESSINGER, S.; SENIOR, P. A.; MAFFI, P.; POSSELT, A.; STOCK, P. G.; KAUFMAN, D. B.; LUO, X.; KANDEEL, F.; CAGLIERO, E.; TURGEON, N. A.; WITKOWSKI, P.; NAJI, A.; O'CONNELL, P. J.; GREENBAUM, C.; KUDVA, Y. C.; BRAYMAN, K. L.; AULL, M. J.; LARSEN, C.; KAY, T. W. H.; FERNANDEZ, L. A.; VANTYGHM, M. C.; BELLIN, M.; SHAPIRO, A. M. J. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. **Diabetes Care**, v. 35, n. 7, p. 1436–1445, 2012.
- BAYLOT, V.; ANDRIEU, C.; KATSOGIANNOU, M.; TAIEB, D.; GARCIA, S.; GIUSIANO, S.; ACUNZO, J.; IOVANNA, J.; GLEAVE, M.; GARRIDO, C.; ROCCHI, P. OGX-427 inhibits tumor progression and enhances gemcitabine chemotherapy in pancreatic cancer. **Cell Death and Disease**, v. 2, n. 10, p. e221, 2011.
- BRATANOVA-TOCHKOVA, T.; CHENG, H.; DANIEL, S.; GUNAWARDANA, S.; LIU, Y.; MULVANEY-MUSMA, J.; SCHERMERHORN, T.; STRAUB, S.; YAJIMA, H.; SHARP, G. Triggering and augmentation mechanismus, granule

pool, and biphasic insulin secretion. **Diabetes**, v. 51, p. S83–S90, 2002.

BRELJE, T. C.; SVENSSON, A. M.; STOUT, L. E.; BHAGROO, N. V.; SORENSON, R. L. An immunohistochemical approach to monitor the prolactin-induced activation of the JAK2/STAT5 pathway in pancreatic islets of Langerhans. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 50, n. 3, p. 365–83, 2002.

CARDOZO, A. K.; ORTIS, F.; STORLING, J.; FENG, Y. H.; RASSCHAERT, J.; TONNESEN, M.; VAN EYLEN, F.; MANDRUP-POULSEN, T.; HERCHUELZ, A.; EISIRIK, D. L. 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, 2005.

CARPER, S. W.; ROCHELEAU, T. a; STORM, F. K. cDNA sequence of a human heat shock protein HSP27. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 21, p. 6457, 1990.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.

CHAN, J. Y.; LUZURIAGA, J.; MAXWELL, E. L.; WEST, P. K.; BENSELLAM, M.; LAYBUTT, D. R. Molecular and Cellular Endocrinology The balance between adaptive and apoptotic unfolded protein responses regulates β -cell death under ER stress conditions through. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 413, p. 189–201, 2015.

CNOP, M.; WELSH, N.; JONAS, J.; JO, A.; LENZEN, S. Mechanisms of Pancreatic Beta Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. December 2005, p. 97–107, 2005.

CUNHA, D. A.; HEKERMANN, P.; LADRIÈRE, L.; BAZARRA-CASTRO, A.; ORTIS, F.; WAKEHAM, M. C.; MOORE, F.; RASSCHAERT, J.; CARDOZO, A. K.; BELLOMO, E.; OVERBERGH, L.; MATHIEU, C.; LUPI, R.; HAI, T.; HERCHUELZ, A.; MARCHETTI, P.; RUTTER, G. A.; EIZIRIK, D. L.; CNOP, M. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. **Journal of cell science**, v. 121, p. 2308–18, 2008.

D'HERTOG, W.; MARIS, M.; FERREIRA, G. B.; VERDRENGH, E.; LAGE, K.; HANSEN, D. A.; CARDOZO, A. K.; WORKMAN, C. T.; MOREAU, Y.; EIZIRIK, D. L.; WAELKENS, E.; OVERBERGH, L.; MATHIEU, C. Novel insights into the global proteome responses of insulin-producing INS-1E cells to different degrees of endoplasmic reticulum stress. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 10, p. 5142–5152, 2010.

DONG, H.; WOO, S. L. . Hepatic insulin production for type 1 diabetes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 12, n. 10, p. 441–446, 2001.

- DUKSIN, D.; MAHONEY, W. C. Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of tunicamycin. **The Journal of biological chemistry**, v. 257, n. 6, p. 3105–3109, 1982.
- DUPREZ, L.; WIRAWAN, E.; BERGHE, T. Vanden; VANDENABEELE, P. Major cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 13, p. 1050–1062, 2009.
- EFTHYMIOU, C. A.; MOCANU, M. M.; DE BELLEROCHE, J.; WELLS, D. J.; LATCHMANN, D. S.; YELLON, D. M. Heat shock protein 27 protects the heart against myocardial infarction. **Basic Research in Cardiology**, v. 99, n. 6, p. 392–394, 2004.
- EIZIRIK, D. L.; MIANI, M.; CARDOZO, A. K. Signalling danger: Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. **Diabetologia**, v. 56, n. 2, p. 234–241, 2013.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.
- ENGIN, F.; YERMALOVICH, A.; NGUYEN, T.; NGYUEN, T.; HUMMASTI, S.; FU, W.; EIZIRIK, D. L.; MATHIS, D.; HOTAMISLIGIL, G. S. Restoration of the unfolded protein response in pancreatic β cells protects mice against type 1 diabetes. **Science translational medicine**, v. 5, n. 211, p. 211ra156, 2013.
- ETHRIDGE, R. T.; EHLERS, R. A.; HELLMICH, M. R.; RAJARAMAN, S.; EVERS, B. M. Acute pancreatitis results in induction of heat shock proteins 70 and 27 and heat shock factor-1. **Pancreas**, v. 21, n. 3, p. 248–256, 2000.
- FERNS, G.; SHAMS, S.; SHAFI, S. Heat shock protein 27: Its potential role in vascular disease. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 87, n. 4, p. 253–274, 2006.
- FEWELL, S. W.; TRAVERS, K. J.; JONATHAN, S.; BRODSKY, J. L. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. **Annu. Rev. Genet.**, v. 35, p. 149–191, 2001.
- FOLDI, I.; TOTH, A. M.; SZABO, Z.; MOZES, E.; BERKECZ, R.; DATKI, Z. L.; PENKE, B.; JANAKY, T. Proteome-wide study of endoplasmic reticulum stress induced by thapsigargin in N2a neuroblastoma cells. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 1, p. 58–69, 2013.
- FREEMARK, M.; AVRIL, I.; FLEENOR, D. O. N.; DRISCOLL, P.; PETRO, A. N. N.; OPARA, E.; KENDALL, W.; ODEN, J. O. N.; BRIDGES, S.; BINART, N.; BREANT, B.; KELLY, P. A. Targeted deletion of the PRL receptor: Effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1378–1385, 2002.
- GABA, R. C.; GARCIA-ROCA, R.; OBERHOLZER, J. Pancreatic islet cell transplantation: An update for interventional radiologists. **Journal of Vascular**

and **Interventional Radiology**, v. 23, n. 5, p. 583–594, 2012.

GANI, A. R.; UPPALA, J. K.; RAMAIAH, K. V. A. Tauroursodeoxycholic acid prevents stress induced aggregation of proteins in vitro and promotes PERK activation in HepG2 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 568, p. 8–15, 2015.

GLEASON, C. E.; GONZALEZ, M.; HARMON, J. S.; ROBERTSON, R. P. Determinants of glucose toxicity and its reversibility in the pancreatic islet beta-cell line, HIT-T15. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, n. 5, p. E997–1002, 2000.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

HARDING, H. P.; ZENG, H.; ZHANG, Y.; JUNGRIES, R.; CHUNG, P.; PLESKEN, H.; SABATINI, D. D.; RON, D. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in Perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. **Molecular Cell**, v. 7, n. 6, p. 1153–1163, 2001.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; NOVOA, I.; LU, P. D.; CALFON, M.; SADRI, N.; YUN, C.; POPKO, B.; PAULES, R.; STOJDL, D. F.; BELL, J. C.; HETTMANN, T.; LEIDEN, J. M.; RON, D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Molecular Cell**, v. 11, n. 3, p. 619–633, 2003.

HEMMINGS, H. C.; EGAN, T. C. **Pharmacology and physiology for anesthesia foundations and clinical application**. 1^a. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770–6, 2000.

HETZ, C.; GLIMCHER, L. H. Fine-Tuning of the Unfolded Protein Response: Assembling the IRE1 α Interactome. **Molecular Cell**, v. 35, n. 5, p. 551–561, 2009.

IDF. **Number of people with diabetes**. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas/data-visualisations>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

ISHIHARA, H.; ASANO, T.; TSUKUDA, K.; KATAGIRI, H.; INUKAI, K.; ANAI, M.; KIKUCHI, M.; YAZAKI, Y.; MIYAZAKI, J. I.; OKA, Y. Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. **Diabetologia**, v. 36, n. 11, p. 1139–1145, 1993.

JACKEROTT, M.; MØLDRUP, A.; THAMS, P.; GALSGAARD, E. D.; KNUDSEN, J.; LEE, Y. C.; NIELSEN, J. H. STAT5 activity in pancreatic β -cells influences the severity of diabetes in animal models of type 1 and 2 diabetes.

Diabetes, v. 55, n. 10, p. 2705–2712, 2006.

JACQUIER-SARLIN, M. R.; FULLER, K.; DINH-XUAN, A. T.; RICHARD, M. J.; POLLA, B. S. Protective effects of hsp70 in inflammation. **Experientia**, v. 50, n. 11-12, p. 1031–1038, 1994.

JOHANSSON, M.; OLERUD, J.; JANSSON, L.; CARLSSON, P. O. Prolactin treatment improves engraftment and function of transplanted pancreatic islets. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1646–1653, 2009.

KAUFMAN, B. D. B.; PLATT, J. L.; RABE, F. L.; DUNN, D. L.; BACH, F. H.; SUTHERLAND, D. E. R. Differential Roles of Mac-1 + Cells, and CD4+ and CD8+ T Lymphocytes in Primary Nonfunction and Classic Rejection of Islet Allografts. **J . Exp. Med**, v. 172, n. July, p. 291–302, 1990.

KENNEDY, D.; MNICH, K.; SAMALI, A. Heat shock preconditioning protects against ER stress-induced apoptosis through the regulation of the BH3-only protein BIM. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 813–821, 2014.

KIDO, Y.; BURKS, D. J.; WITHERS, D.; BRUNING, J. C.; KAHN, C. R.; WHITE, M. F.; ACCILI, D. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 2, p. 199–205, 2000.

KIJIMA, Y.; OGUNBUNMI, E.; FLEISCHER, S. Drug action of thapsigargin on the Ca²⁺ pump protein of sarcoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 34, p. 22912–22918, 1991.

KIM, I.; XU, W.; REED, J. C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 12, p. 1013–1030, 2008.

KOSTENKO, S.; MOENS, U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 66, n. 20, p. 3289–3307, 2009.

KUBISCH, C.; DIMAGNO, M. J.; TIETZ, A. B.; WELSH, M. J.; ERNST, S. A.; BRANDT-NEDELEV, B.; DIEBOLD, J.; WAGNER, A. C. C.; GOKE, B.; WILLIAMS, J. A.; SCHAFER, C. Overexpression of heat shock protein Hsp27 protects against cerulein-induced pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 127, n. 1, p. 275–286, 2004.

LABRIOLA, L.; FERREIRA, G. B.; MONTOR, W. R.; DEMASI, M. A. A.; PIMENTA, D. C.; LOJUDICE, F. H.; GENZINI, T.; GOLDBERG, A. C.; ELIASCHEWITZ, F. G.; SOGAYAR, M. C. Prolactin-induced changes in protein expression in human pancreatic islets. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 264, n. 1-2, p. 16–27, 2007a.

LABRIOLA, L.; MONTOR, W. R.; KROGH, K.; LOJUDICE, F. H.; GENZINI, T.; GOLDBERG, A. C.; ELIASCHEWITZ, F. G.; SOGAYAR, M. C. Beneficial

effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 263, n. 1-2, p. 120–133, 2007b.

LACASSE, E. C.; MAHONEY, D. J.; CHEUNG, H. H.; PLENCHETTE, S.; BAIRD, S.; KORNELUK, R. G. IAP-targeted therapies for cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6252–6275, 2008.

LAMBERT, H.; CHARETTE, S. J.; ANDRÉ, F.; GUIMOND, A.; LANDRY, J.; BERNIER, F. CELL BIOLOGY AND METABOLISM: HSP27 Multimerization Mediated by Interactions at the Amino Terminus HSP27 Multimerization Mediated by Phosphorylation-sensitive Intermolecular Interactions at the Amino Terminus *. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 14, p. 9378–9385, 1999.

LANDRY, J.; CHRETIEN, P.; LAMBERT, H.; HICKEY, E.; WEBER, L. A. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. **Journal of Cell Biology**, v. 109, n. 1, p. 7–15, 1989.

LATCHMAN, D. S. HSP27 and cell survival in neurones. **International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group**, v. 21, n. 5, p. 393–402, 2005.

LAUNAY, N.; GOUDEAU, B.; KATO, K.; VICART, P.; LILIENBAUM, A. Cell signaling pathways to B-crystallin following stresses of the cytoskeleton. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 18, p. 3570–3584, 2006.

LIU, L.; CHOWDHURY, S.; FANG, X.; LIU, J. L.; SRIKANT, C. B. Attenuation of unfolded protein response and apoptosis by mReg2 induced GRP78 in mouse insulinoma cells. **FEBS Letters**, v. 588, n. 11, p. 2016–2024, 2014.

LU, P. D.; HARDING, H. P.; RON, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. **Journal of Cell Biology**, v. 167, n. 1, p. 27–33, 2004.

MACARIO, A. J. Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 25, n. 2, p. 59–70, 1995.

MAIA, F. F. R.; ARAÚJO, L. R. A hipoglicemia silenciosa é parte do controle glicêmico ideal em pacientes com DM1?: tempo de hipoglicemia pelo CGMS versus média glicêmica. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 6, p. 994–1000, 2008.

MANSANO, R. A. W. **Rosangela aparecida wailemann mansano**. 2013. Universidade de São Paulo, 2013.

MARHFOUR, I.; LOPEZ, X. M.; LEFKADITIS, D.; SALMON, I.; ALLAGNAT, F.; RICHARDSON, S. J.; MORGAN, N. G.; EIZIRIK, D. L. Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1

diabetes. **Diabetologia**, v. 55, n. 9, p. 2417–2420, 2012.

MATSUMOTO, H.; MIYAZAKI, S.; MATSUYAMA, S.; TAKEDA, M.; KAWANO, M.; NAKAGAWA, H.; NISHIMURA, K.; MATSUO, S. Selection of autophagy or apoptosis in cells exposed to ER-stress depends on ATF4 expression pattern with or without CHOP expression. **Biology open**, v. 2, n. 10, p. 1084–90, jan. 2013.

MATSUMOTO, S. Islet cell transplantation for Type 1 diabetes. **Journal of Diabetes**, v. 2, n. 1, p. 16–22, 2010.

MATSUMOTO, T.; URUSHIDO, M.; IDE, H.; ISHIHARA, M.; HAMADA-ODE, K.; SHIMAMURA, Y.; OGATA, K.; INOUE, K.; TANIGUCHI, Y.; TAGUCHI, T.; HORINO, T.; FUJIMOTO, S.; TERADA, Y. Small heat shock protein beta-1 (HSPB1) is upregulated and regulates autophagy and apoptosis of renal tubular cells in acute kidney injury. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–22, 2015.

MAUREL, M.; CHEVET, E.; TAVERNIER, J.; GERLO, S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 5, p. 245–254, 2014.

MCCULLOUGH, K. D.; MARTINDALE, J. L.; AW, T.; HOLBROOK, N. J.; CULLOUGH, K. D. M. C.; KLOTZ, L. Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 4, p. 1249–1259, 2001.

MESOTTEN, D.; VAN DEN BERGHE, G. Clinical benefits of tight glycaemic control: focus on the intensive care unit. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 23, n. 4, p. 421–429, 2009.

MEYER, T. N.; SILVA, a. L. Da. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 181–188, 1999.

MOLINA, P. E. **Endocrine physiology**. 4^a. ed. New Orleans. 2004. 320p.

MOORE, F.; COLLI, M. L.; CNOP, M.; ESTEVE, M. I.; CARDOZO, A. K.; CUNHA, D. A.; BUGLIANI, M.; MARCHETTI, P.; EIZIRIK, D. L. PTPN2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Interferon-γ-Induced Pancreatic β-Cell Apoptosis. **Diabetes**, v. 58, n. 6, p. 1283–1291, 2009.

MORISHIMA, N.; NAKANISHI, K.; NAKANO, A. Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein via induction of WW domain binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 40, p. 35227–35235, 2011.

MOUNIER, N.; ARRIGO, A.-P. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? **Cell stress & chaperones**, v. 7, n. 2, p. 167–76, 2002.

- NAFTANEL, M. A.; HARLAN, D. M. Pancreatic islet transplantation. **PLoS Medicine**, v. 1, n. 3, p. 198–201, 2004.
- NAKAGAWA, T.; ZHU, H.; MORISHIMA, N.; LI, E. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . **Nature**, v. 403, n. January, p. 8–13, 2000.
- NAM, D. H.; HAN, J. H.; LEE, T. J.; SHISHIDO, T.; LIM, J. H.; KIM, G. Y.; WOO, C. H. CHOP deficiency prevents methylglyoxal-induced myocyte apoptosis and cardiac dysfunction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 85, p. 168–177, 2015.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4^a. ed. Savier. 2007. 1202p.
- NIELSEN, K.; SPARRE, T.; LARSEN, M. R.; NIELSEN, M.; FEY, S. J.; MOSE LARSEN, P.; ROEPSTORFF, P.; NERUP, J.; KARLSEN, A. E. Protein expression changes in a cell system of beta-cell maturation reflect an acquired sensitivity to IL-1 β . **Diabetologia**, v. 47, n. 1, p. 62–74, 2004.
- NOZAKI, J. I.; KUBOTA, H.; YOSHIDA, H.; NAITOH, M.; GOJI, J.; YOSHINAGA, T.; MORI, K.; KOIZUMI, A.; NAGATA, K. The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in. **Genes to Cells**, v. 2, p. 261–270, 2004.
- OYADOMARI, S.; KOIZUMI, A.; TAKEDA, K.; GOTOH, T.; AKIRA, S.; ARAKI, E.; MORI, M. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress – mediated diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 4, p. 443–445, 2002.
- PARCELLIER, A.; SCHMITT, E.; GURBUXANI, S.; SEIGNEURIN-BERNY, D.; PANCE, A.; CHANTÔME, A.; PLENCHETTE, S.; KHOCHBIN, S.; SOLARY, E.; GARRIDO, C. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaB α proteasomal degradation. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 16, p. 5790–5802, 2003.
- PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, n. 2, p. 165–169, 2000.
- PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1644, n. 2-3, p. 83–94, 2004.
- PUYAL, J.; PÉTREMAND, J.; DUBUIS, G.; RUMMEL, C.; WIDMANN, C. HDLs protect the MIN6 insulinoma cell line against tunicamycin-induced apoptosis without inhibiting ER stress and without restoring ER functionality. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 381, n. 1-2, p. 291–301, 2013.

RASSCHAERT, J.; LADRIÈRE, L.; URBAIN, M.; DOGUSAN, Z.; KATABUA, B.; SATO, S.; AKIRA, S.; GYSEMANS, C.; MATHIEU, C.; EIZIRIK, D. L. Toll-like receptor 3 and STAT-1 contribute to double-stranded RNA+ interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 40, p. 33984–91, 2005.

RIDDLE, O.; BATES, R. W.; DYKSHORN, S. W. The preparation, identification and assay of prolactin-a hormone of the anterior pituitary. **American journal of physiology**, v. 105, p. 191 – 216, 1933.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Experientia**, v. 18, n. 12, p. 571–573, 1962.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 7, p. 519–529, 2007.

SAKAI, A.; OTANI, M.; MIYAMOTO, A.; YOSHIDA, H.; FURUYA, E.; TANIGAWA, N. Identification of phosphorylated serine-15 and -82 residues of HSPB1 in 5-fluorouracil-resistant colorectal cancer cells by proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 3, p. 806–818, 2012.

SBD. **São 12 milhões de diabéticos no Brasil**. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/ultimas/421-sao-12-milhoes-de-diabeticos-no-brasil>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

SEMBULINGAM, K.; SEMBULINGAM, T. **Pancreas**. 6^a. ed. New Delhi. 2012. 1092p.

SHAPIRO, A. M. J.; M.B., B.S., J.; LAKEY, R. T.; RYAN, E. A.; KORBUTT, G. S.; TOTH, E.; WARNOCK, G. L.; KNETEMAN, N. M.; RAJOTTE, R. V. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes using glycocorticoid-free immunosuppressive regime. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 4, p. 230–238, 2000.

SHUAI, K.; LIU, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 11, p. 900–911, 2003.

SORENSEN, R. L.; BRELJE, T. C. Prolactin receptors are critical to the adaptation of islets to pregnancy. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1566–1569, 2009.

STAEHELIN, L. A. **The plant ER: A dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains** *Plant Journal*, 1997.

SUN, Y.; MACRAE, T. H. Small heat shock proteins: Molecular structure and chaperone function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 21, p. 2460–2476, 2005.

SZEGEZDI, E.; LOGUE, S. E.; GORMAN, A. M.; SAMALI, A. Mediators of

endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **EMBO reports**, v. 7, n. 9, p. 880–5, 2006.

TAO, J.; HAYNES, D. H. Actions of Thapsigargin on the Ca^{2+} -handling Systems of the Human Platelet. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 24972–24982, 1992.

TERRA, L. F.; GARAY-MALPARTIDA, M. H.; WAILEMANN, R. A. M.; SOGAYAR, M. C.; LABRIOLA, L. Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. **Diabetologia**, v. 54, n. 6, p. 1388–1397, 2011.

THÉRIAULT, J. R.; LAMBERT, H.; CHÁVEZ-ZOBEL, A. T.; CHAREST, G.; LAVIGNE, P.; LANDRY, J. Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23463–23471, 2004.

THOMAS, H. E.; MCKENZIE, M. D.; ANGSTETRA, E.; CAMPBELL, P. D.; KAY, T. W. Beta cell apoptosis in diabetes. **Apoptosis**, v. 14, n. 12, p. 1389–1404, 2009.

TROMBETTA, E. S.; PARODI, A. J. Quality control and protein folding in secretory pathway. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 19, p. 649–676, jun. 2003.

UPTON, J.-P.; WANG, L.; HAN, D.; WANG, E. S.; HUSKEY, N. E.; LIM, L.; TRUITT, M.; MCMANUS, M. T.; RUGGERO, D.; GOGA, A.; PAPA, F. R.; OAKES, S. A. IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 338, n. 6108, p. 818–22, 2012.

VOSS, O. H.; BATRA, S.; KOLATTUKUDY, S. J.; GONZALEZ-MEJIA, M. E.; SMITH, J. B.; DOSEFF, A. I. Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 34, p. 25088–25099, 2007.

WEINHAUS, A. J.; STOUT, L. E.; BHAGROO, N. V.; BRELJE, T. C.; SORENSON, R. L. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: A mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. **Journal of Endocrinology**, v. 193, n. 3, p. 367–381, 2007.

WEK, R. C.; ANTHONY, T. G. **Beta Testing the Antioxidant Function of eIF2 γ Phosphorylation in Diabetes Prevention** *Cell Metabolism*, 2009.

WELSH, M. J.; GAESTEL, M. Small heat-shock protein family: function in health and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, p. 28–35, 1998.

XIAO, F.; XIA, T.; LV, Z.; ZHANG, Q.; XIAO, Y.; YU, J.; LIU, H.; DENG, J.; GUO, Y.; WANG, C.; LI, K.; LIU, B.; CHEN, S.; GUO, F. Central prolactin

receptors (prlrs) regulate hepatic insulin sensitivity in mice via signal transducer and activator of transcription 5 (stat5) and the vagus nerve. **Diabetologia**, v. 57, n. 10, p. 2136–2144, 2014.

XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; REED, J. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 10, p. 2656–2664, 2005.

XU, L.; APPELL, M.; KENNEDY, S.; MOMANY, F. a; PRICE, N. P. J. Conformational analysis of chirally deuterated tunicamycin as an active site probe of UDP-N-acetylhexosamine:polyprenol-P N-acetylhexosamine-1-P translocases. **Biochemistry**, v. 43, n. 42, p. 13248–55, 2004.

YAMAGUCHI, S.; ISHIHARA, H.; YAMADA, T.; TAMURA, A.; USUI, M.; TOMINAGA, R.; MUNAKATA, Y.; SATAKE, C.; KATAGIRI, H.; TASHIRO, F.; ABURATANI, H.; TSUKIYAMA-KOHARA, K.; MIYAZAKI, J. ichi; SONENBERG, N.; OKA, Y. ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic β Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 3, p. 269–276, 2008.

YAMAMOTO, T.; RICORDI, C.; MITA, A.; MIKI, A.; SAKUMA, Y.; MOLANO, R. D.; FORNONI, A.; PILEGGI, A.; INVERARDI, L.; ICHII, H. β -Cell Specific Cytoprotection by Prolactin on Human Islets. **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 2, p. 382–383, 2008.

YUSTA, B.; BAGGIO, L. L.; ESTALL, J. L.; KOEHLER, J. A.; HOLLAND, D. P.; LI, H.; PIPELEERS, D.; LING, Z.; DRUCKER, D. J. GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 5, p. 391–406, 2006.

ZHAO, Y.; YAN, Y.; ZHAO, Z.; LI, S.; YIN, J. The dynamic changes of endoplasmic reticulum stress pathway markers GRP78 and CHOP in the hippocampus of diabetic mice. **Brain Research Bulletin**, v. 111, p. 27–35, 2015.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 19, n. 10, p. 124–8, 2004.

ZINSZNER, H.; KURODA, M.; WANG, X.; BATCHVAROVA, N.; LIGHTFOOT, R. T.; REMOTTI, H.; STEVENS, J. L.; RON, D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. **Genes and Development**, v. 12, n. 7, p. 982–995, 1998.

Súmula Curricular

Vinicius de Moraes Gomes

Endereço profissional

Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica. Avenida Professor Lineu Prestes, 748. Butantã - São Paulo 05508000, SP – Brasil. Telefone: 11 30919049

Endereço eletrônico

E-mail para contato: vinickjp@gmail.com

E-mail alternativo: vinicksp@usp.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2014 - 2016** Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica) (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.
Título: Estudo da função de HSPB1 na citoproteção induzida por prolactina em células beta pancreáticas.
Orientadora: Letícia Labriola.
Bolsista do (a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.
- 2008 - 2011** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, Brasil.
Título: Ação anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana e caracterização físico-química da lectina presente nas sementes de *Abelmoschus esculentus*.
Orientadora: Tatiane Santi Gadelha.
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Produção científica

Artigos publicados em periódicos

1. Leite, J. F. M. Assreuy, A. M. S. Mota, M. R. L. Bringel, P. H. D. F. Lacerda, R. R. **Gomes, V. M.** Cajazeiras, J. B. Nascimento, K. S. Pessoa, H. L. F. Gadelha, C. A. A. Delatorre, P. Cavada, B. S. Santi-Gadelha, T. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. *Molecules* (Basel. Online). v. 17, p.3277 - 3290, 2012.
2. Soares, S. F. G. Assreuy, A. M. S., Gadelha, C. A. A. **Gomes, V. M.** Delatorre, P. Simões, R. C. Cavada, B. S. Leite, J. F. M. Nagano, C. S. Pinto, N. V. Pessoa, H. L. F. Santi-Gadelha, T. Purification and Biological Activities of *Abelmoschus esculentus* Seed Lectin. *The Protein Journal*. , v.1, p.2 - 3, 2012.
3. Soares, S. F. G. **Gomes, V. M.** Albuquerque, A. R. Dantas, M. B. Rosenhain, R. Souza, A. G. Persunh, D. C. Gadelha, C. A. A. Costa, M. J. C. Santi-Gadelha, T. Spectroscopic and Thermooxidative Analysis of Organic Okra Oil and Seeds from *Abelmoschus esculentus*. *The Scientific World Journal*. v.2012, p.1 - 6, 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. Lacerda, R. R. Leite, J. F. M. **Gomes, V. M.** Caluete, M. E. E. Cunha, F. Q. Figueiredo, J. G. Gadelha, C. A. A., Santi-Gadelha, T. *Acacia Farnesiana* (L.) Willd. (Mimosoideae) Lectin-like decreases neutrophils migration and vascular permeability In: 23rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, João Pessoa/PB. PBA 2011. Brazil, 2011.
2. Caluete, M. E. E. **Gomes, V. M.** Lacerda, R. R. Leite, J. F. M. Pessoa, H. L. F. Gadelha, C. A. A. Santi-Gadelha, T. Assessment Activity of Plant Lectins on the Development of Pathogenic and Non-Pathogenic Bacteria In: 23rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, João Pessoa/PB. PBA 2011. Brazil, 2011.
3. **Gomes, V. M.** Caluete, M. E. E. Leite, J. F. M. Lacerda, R. R. Cunha, F. Q. Gadelha, C. A. A., Santi-Gadelha, T. The antiinflammatory potencial of *Abelmoschus esculentus* seed lectin in mice. In: 23rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, João Pessoa/PB. PBA 2011. Brazil, 2011.
4. **Gomes, V. M.** Leite, M. C. A. Gadelha, C. A. A., Santi-Gadelha, T. Ação antioxidante, resistência a proteólise e a desnaturação da fração lectínica de sementes de *Luffa operculata*. In: XXI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2010, João Pessoa/PB. Plantas Medicinais: Avanços, Utilização e Conservação, 2010.
5. **Gomes, V. M.** Leite, J. F. M. Lacerda, R. R. Gadelha, C. A. A. Pessoa, H. L. F. Santi-Gadelha, T. Atividade citotóxica e antibacteriana da fração lectínica presente na semente do quiabo, *Abelmoschus esculentus* (Malvaceae). In: XXXIII REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 2010, Aracaju/SE. Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação, 2010.
6. Abrantes, V. E. F. **Gomes, V. M.** Lacerda, R. R. Leite, M. C. A. Leite, J. F. M. Santi-Gadelha, T. Gadelha, C. A. A. Atividade hemaglutinante das frações albumina, globulina, glutelina ácida extraídas das sementes de *Stecurlia foetida* L. (Malvaceae). In: XXXIII REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 2010, Aracaju/SE. Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação, 2010.
7. Leite, M. C. A. **Gomes, V. M.** Leite, J. F. M. Albuquerque, C. L. Costa, M. J. C. Gadelha, C. A. A. Santi-Gadelha, T. Detecção e atividade hemaglutinante e atividade hemolítica em folhas de cenoura (*Daucus carota* L.). In: XXXIII REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 2010, Aracaju/SE. Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação, 2010.
8. Leite, M. C. A. **Gomes, V. M.** Abrantes, V. E. F. Lacerda, R. R. Gadelha, C. A. A. Costa, M. J. C. Santi-Gadelha, T. Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade da lectina em extrato da folha da cenoura (*Daucus carota* L.). In: XXXIII REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 2010, Aracaju/SE. Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação, 2010.
9. Leite, M. C. A. **Gomes, V. M.** Leite, J. F. M. Gadelha, C. A. A. Costa, M. J. C. Santi-Gadelha, T. Estudos da integridade da lectina de folha de cenoura (*Daucus carota* L.) frente a diferentes agentes In: XXI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2010, João Pessoa/PB. Plantas Medicinais: Avanços, Utilização e Conservação, 2010.
10. Lacerda, R. R. Leite, M. C. A. **Gomes, V. M.** Gadelha, C. A. A. Santi-Gadelha, T. Purificação e caracterização de uma lectina presente nas sementes de *Mucuna pruriens* (L) DC (Leguminosae). In: XXXIII REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 2010, Aracaju/SE. Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação, 2010.
11. Lacerda, R. R. Leite, M. C. A. Leite, J. F. M. **Gomes, V. M.** Abrantes, V. E. F. Gadelha, C. A. A. Santi-Gadelha, T. Purificação Parcial de uma Lectina de *Talinum fruticosum* (L) Juss (Portulacaceae). In: XXXIII REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 2010, Aracaju/SE. Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação, 2010.

12. **Gomes, V. M.** Sousa, C. N. Abrantes, V. E. F. Lacerda, R. R. Gadelha, C. A. A. Pessoa, H. L. F. Santi-Gadelha, T. Purificação parcial e citotóxicidade da lectina presente em sementes de *Luffa operculata* (Cucurbitaceae). In: XXXIII REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 2010, Aracaju/SE. Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação, 2010.
13. **Gomes, V. M.** Lacerda, R. R. Caluete, M. E. E. Leite, J. F. M. Pessoa, H. L. F. Gonçalves, G. F. Gadelha, C. A. A. Santi-Gadelha, T. *Abelmoschus esculentus* Lectin Reduces Oxidant Action of Phenylhydrazine. Resumo publicado no periódico: Experimental Pathology and Healthy Sciences, 2011.
14. Leite, J. F. M. Lacerda, R. R. **Gomes, V. M.** Sanca, D. Assreuy, A. M. S. Gadelha, C. A. A. Santi-Gadelha, T. Cavada, B. S. Anti-inflammatory potential of a lectin-like from seeds of *Clitoria fairchildiana*. Resumo Publicado no Periódico Experimental Pathology and Healthy Sciences, 2011.
15. Lacerda, R. R. Leite, J. F. M. **Gomes, V. M.** Caluete, M. E. E. Gadelha, C. A. A. Santi-Gadelha, T. Isolation and Characterization of a Lectin from Seeds of *Mucuna pruriens*. Resumo Publicado no Periódico Experimental Pathology and Healthy Sciences, 2011.
16. Lacerda, R. R. Leite, J. F. M. **Gomes, V. M.** Caluete, M. E. E. Gadelha, C. A. A. Santi-Gadelha, T. Prospecting Biochemistry and Pharmacology of Protein Fractions of *Sterculia foetida*. Resumo Publicado no Periódico Experimental Pathology and Healthy Sciences, 2011.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **Gomes, V. M.** Santi-Gadelha, T. Detecção e atividade biológica das lectinas de *Daucus carota*, 2011. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa/PB. XIX Encontro de Iniciação Científica.
2. **Gomes, V. M.** Santi-Gadelha, T. Isolamento e purificação de lectinas presentes nas sementes de *Luffa operculata*, 2010. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa/PB. XVIII Encontro de Iniciação Científica.

Experiência profissional

Monitoria

1. Participação como monitor no **X Curso de Verão de Bioquímica e Biologia Molecular**. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 2015.
2. Participação como monitor do Programa de Apoio ao Ensino (PAE) na disciplina de **Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo**. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 2015.
3. Participação como monitor no **XIV Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular**. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 2015.
4. Participação como monitor do Programa de Apoio ao Ensino (PAE) na disciplina de **Bioquímica Experimental**. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 2015.

Iniciação Científica

1. Estágio sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Tatiane Santi Gadelha, no Departamento de Biologia Molecular da UFPB, como voluntário, no projeto "Purificação e Atividade Biológica de Lectinas de *Abelmoschus esculentus*", no período de agosto de 2009 a janeiro de 2010.

2. Estágio sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Tatiane Santi Gadelha, no Departamento de Biologia Molecular da UFPB, como bolsista de iniciação científica, CNPq, no projeto “Isolamento e Purificação de Lectinas Presentes em Sementes de *Luffa operculata*”, no período de fevereiro de 2010 a julho de 2010.
3. Estágio sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Tatiane Santi Gadelha, no Departamento de Biologia Molecular da UFPB, como bolsista de iniciação científica, CNPq, no projeto “Detecção e Atividade Biológica da Lectina de *Daucus carota*”, no período de agosto de 2010 a julho de 2011.
4. Estágio sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Tatiane Santi Gadelha, no Departamento de Biologia Molecular da UFPB, como bolsista de iniciação científica, CNPq, no projeto “Lectinas de *Daucus carota*: matrizes para a descoberta de novos compostos promissores como composto antifúngico”, no período de agosto de 2011 a dezembro de 2011.

Formação complementar

Participação em Cursos, Minicursos e Palestras

1. **Assays to evaluate the effect of stem cells.** Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil. Carga horária: 20h.
2. **Oratória: Expressão verbal e corporal.** Escola de Serviço Público do Estado da Paraíba, ESPEP, Brasil. Carga horária: 50h.
3. **Como apresentar um trabalho científico oralmente.** Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, Brasil. Carga horária: 4h.
4. **Samambaias como fonte de biomoléculas ativas.** XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, SPMB, Brasil. Carga horária: 3h.
5. **Práticas em Biologia do Desenvolvimento.** Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, Brasil. Carga horária: 30h.
6. **Câncer e seus aspectos moleculares.** XII Semana de Biologia da UFPB, XIISB UFPB, Brasil. Carga horária: 12h.

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster/Painel no(a) I Luso-Brazilian Congress of the Experimental Pathology, 2011. (Congresso). *Abelmoschus esculentus* lectin reduces oxidant action of phenylhydrazine.
2. Apresentação de Poster/Painel no(a) 23rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. (Simpósio). The antiinflammatory potencial of *Abelmoschus esculentus* seed lectin in mice.
3. Apresentação de Poster/Painel no(a) XXI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2010. (Simpósio). Ação antioxidante, resistência a proteólise e a desnaturação da fração lectínica de sementes de *Luffa operculata*.
4. Apresentação de Poster/Painel no(a) XXXIII REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 2010. (Congresso). Atividade citotóxica e antibacteriana da fração lectínica presente na semente do quiabo, *Abelmoschus esculentus* (Malvaceae).

Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BCAN-D-16-00432	
Full Title:	Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells	
Article Type:	Research article	
Section/Category:	Cell and molecular biology	
Funding Information:	FAPESP (2103/07029-4)	Dr. LETICIA LABRIOLA
	FAPESP (2012/16785-4)	Ms Ancély F dos Santos
	FAPESP (2012/50680-5)	M Maurício S Baptista
	FAPESP (2013/07937-8)	M Maurício S Baptista
	CNPq (141529/2012-1)	Ms Ancély F dos Santos
	USP (NAP-PhotoTech-USP)	M Maurício S Baptista
Abstract:	<p>Background: Breast cancer is the main cause of mortality among women presenting high recurrence due to primary treatment failure. Photodynamic therapy (PDT), which causes tissue destruction by visible light in the presence of a photosensitizer (Ps) and oxygen, is a promising alternative to cure cancer. However, the efficacy of PDT to treat breast tumors as well as the mechanisms that lead to tumorigenic cell death remain unclear.</p> <p>Methods: In this study, we assessed the cytotoxic potential of PDT using methylene blue (MB-PDT) in three breast epithelial cell lines that represent non-malignant conditions and different molecular subtypes of breast tumors. Cells were incubated in the absence or presence of MB and irradiated or not at 640 nm with 4,5J/cm². We used a combination of imaging and biochemistry approaches to assess the involvement of classical autophagic and apoptotic pathways in mediating the cell-deletion action of MB-PDT. The role of these pathways was investigated using specific inhibitors, activators and gene silencing.</p> <p>Results: We observed that MB-PDT differentially induces massive cell death of tumor cells. Non-malignant cells were significantly more resistant to the therapy compared to malignant cells. Morphological and biochemical analysis of dying cells pointed to alternative mechanisms rather than classical apoptosis. MB-PDT-induced autophagy resulted in either cytoprotection or cytotoxicity depending on the cell model used. However, impairment of one of these pathways did not prevent the fatal destination of MB-PDT treated cells. Additionally, when using a physiological 3D culture model that recapitulates relevant features of normal and tumor breast tissue morphology, we found that MB-PDT differential action in killing tumor cell was even higher than what was detected in 2D cultures.</p> <p>Conclusions: Finally, our observations underscore the potential of MB-PDT as a highly efficient strategy to safely treat breast cancer and possibly other types of tumors.</p>	
Corresponding Author:	LETICIA LABRIOLA Universidade de Sao Paulo SAO PAULO, SP BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Sao Paulo	
Corresponding Author's Secondary Institution:		

First Author:	Ancély F dos Santos, Ms.Sc.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Ancély F dos Santos, Ms.Sc.
	Leticia F Terra, PhD
	Rosangela A.M. Wailemann, Ms.Sc.
	Talita C Oliveira, Bachelor in Sciences
	Vinicius M Gomes
	Marcela F Mineiro
	Flávia C Meotti, PhD
	Alexandre Bruni-Cardoso, PhD
	Maurício S Baptista, PhD
	LETICIA LABRIOLA
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	<p>Patrizia Agostinis, Professor, PhD School of Medicine- Catholic University of Leuven (KUL)- Belgium patrizia.agostinis@med.kuleuven.be She is an expert on Photodynamic Therapy.</p>
	<p>Marina Simian, PhD Professor, Universidade Nacional de San Martín- Argentina simian@galuzzi.com Dr. Simian is a well known researcher in the field of tumor- microenvironment importance.</p>
	<p>Michael R Hamblin, Professor, PhD Wellman Center for Photomedicine hamblin@helix.mgh.harvard.edu Dr. Hamblin is a specialist in the use of phototherapy for multiple diseases.</p>
	<p>Julio Aguirre-Ghiso, PhD Professor, Mount Sinai Hospital julio.aguirre-ghiso@mssm.edu Dr. Aguirre-ghiso is an specialist in breast cancer cell biology</p>