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

ROSANGELA APARECIDA WAILEMANN MANSANO

Estudo do papel da proteína HSP27/25 na ação da prolactina humana recombinante em células beta pancreáticas

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
05/07/2013

ROSANGELA APARECIDA WAILEMANN MANSANO

Estudo do papel da proteína HSP27/25 na ação da prolactina humana recombinante em células beta pancreáticas

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Leticia Labriola

São Paulo
2013

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

Mansano, Rosangela Aparecida Wailemann
M286e Estudo do papel da proteína HSP27/25 na ação da prolactina humana recombinante em células beta pancreáticas / Rosangela Aparecida Wailemann Mansano. -- São Paulo, 2013.
166p.

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

1. Biologia molecular 2. Apoptose : Patologia 3. Diabetes mellitus T. II. Labriola, Letícia, orientador.

574.88 CDD

Aos meus pais, sem os quais nada disto seria possível.

Aos meus filhos, por todo amor e abraços.

Agradecimentos

Desafio tão grande quanto escrever esta dissertação foi encontrar palavras que descrevam a minha vivência nos últimos anos nesta Universidade e em especial no Departamento de Bioquímica. Primeiro, porque encontrei mais do que pessoas competentes e dedicadas, como era esperado. Encontrei pessoas visionárias, que não se contentam com o normal, que exploram todas as possibilidades e nunca desistem, apesar do difícil trabalho que realizamos.

Uma destas pessoas é a Profa. Dra. Letícia Labriola. Agradeço pela orientação, e por todo apoio. Pela dedicação incansável às discussões, direcionamento, críticas e sugestões. Pelas conversas e amizade. Obrigado por me acalmar quando meus resultados saíram errados e quando só eu achava que estavam errados ...

À Profa. Dra. Mari. C. Sogayar agradeço pelo apoio e confiança. Pela orientação do meu trabalho de conclusão de curso. Pela oportunidade de participar de uma pequena parte de sua grande carreira.

À Dra. Letícia F. Terra, por compartilhar generosamente seu grande conhecimento e sua amizade. Por todas as vezes que você respondeu prontamente ao meu chamado: "Lê". Por planejar e organizar nossa maravilhosa viagem e compartilhar muitos dos seus amigos comigo. Por me ajudar a carregar inúmeras lembrancinhas e pesar as malas antes do embarque. Tão jovem e uma grande mulher.

À Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter, uma das primeiras a acreditar e apoiar uma jovem com mais de 40 anos, no desbravamento das Ciências Moleculares.

Às doutorandas Talita C. Oliveira e Ancély F. dos Santos e à Tatiana, tanto na bancada como cuidando dos meus infinitos timers, nas discussões e no apoio moral. Obrigado pelas bolachinhas e chá. Pelas conversas e horas de sono.

Aos Marcos, Ana Cláudia e Lú Gomes, por me ajudarem muito nas dúvidas que surgiam logo pela manhã ou nas longas horas noturnas. Por compartilharem comigo experiências e o amor pela pesquisa.

A todos os demais integrantes do LBCM e UIPH, passados ou atuais. A todos que torciam para dar certo, todas as vezes que eu colocava meu avental especial de Western blot, pelas risadas e encontros na copinha, Roberta, Gú, Helô, Rômulo, Kati, Luís, Camila, Gi, Tati, Ana Lúcia, Patrícia, Fernando, Thaís, Gabriel, Adauto, Nicole, Tatiane, Karen, Erica, Flávia, Camila, Michele, Túlio, Laura, Theri, Aline, Laura Gabriel, Michele, Regina, Renato... Aos técnicos do laboratório, Zizi, Sandra, Débora, Ricardo e Damares, por estarem sempre prontos a resolver os problemas e soluções do dia a dia.

À Marluce, Marina, Ká, Ana Cris e Raquel... precisamos de muitas viagens juntas... e Nanda um especial obrigado, vocês são muito especiais.

Às minhas amigas Fernanda e Maiara, às vezes filhas, às vezes mães, às vezes ouvintes, às vezes professoras, às vezes confidentes,

sempre amigas. Obrigado por acreditarem em mim, quando eu mesmo duvidava. Obrigado pelas brincadeiras e conversas “nerds”. A todos do CM, obrigado por me aceitarem como sou.

Ia dizer obrigado a todos os meus amigos que não fizeram parte da loucura do mestrado, mas tenho certeza que vocês fizeram parte sim... tenho certeza que vocês torceram mais por mim do que pela vitória do Brasil na Copa da Confederações, que não se cansaram em perguntar se podiam me ajudar em alguma coisa e ajudaram muito, que incontáveis vezes rezaram pelo meu sucesso. Se isso não é participar...

Ao Wagner, mesmo não estando presente no dia a dia, nunca deixou de me apoiar, ouvir e entre tantas coisas, trocar a mangueira do gás, que resouveu furar nas vésperas da entrega desta dissertação.

E por último, mas não menos importante, à minha família, meu apoio em todos os momentos, principalmente meus pais Wilson e Antonia e meus filhos Thaís e Tainan, por serem meus anjos da guarda, me protejerem, me apoiarem, rezarem por mim, chorarem e sorrirem comigo. Ao Eduardo e Thamires, por trazerem mais carinho, amizade e felicidade à nossa família. A minha querida irmã, pelos muitos risos, água de coco na praia e preocupações, sei que posso contar com você sempre, obrigado. Osamu, não posso agradecer só pelos almoços maravilhosos que você prepara, mas por ser companheiro e cuidar da minha família também.

Tenho que dedicar um parágrafo só para minhas afilhadas, Flávia, Carol, Tainá e por que não para Camila... Obrigado por vocês estarem sempre presentes na minha vida, por compartilharem suas alegrias,

dores, amores e sonhos. Foi muito bom receber mensagens, sorrisos e beijos nas horas em que eu estava mais estressada.

Calma, por que este parágrafo ainda é para minha família, agradeço a vocês cunhadas, que mais parecem irmãs, sogra, que mais parece mãe, cunhados, que me apóiam sempre, sobrinhos de todos os jeitos, tamanhos e sonhos, todas as sobrinhas em especial à Vivi e Mônica, quase minhas filhas, ainda tem minhas primas Dri, Kaká, Sô, Mani, Bia e ainda minhas tias e tios, Léa, Sônia, Toni, Lídia e Edson, Fada e Omir e Del, sem esquecer dos avós Zizi e João, Aparecida e Jaime e mais uma porção de agregados...perto ou longe, obrigado por todos os momentos e orações.

Aos doadores e pacientes que permitiram que este estudo fosse realizado.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.”

- Charles Chaplin

“E se a dúvida for grande, que Deus decida.”

- Rosangela A Wailemann

RESUMO

Wailemann, R.A. M. **Estudo do papel da proteína HSP27/25 na ação da prolactina humana recombinante em células beta pancreáticas.** 2013. 166p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Um dos objetivos no tratamento de Diabetes *mellitus* é aumentar a função, proliferação e sobrevivência de células beta pancreáticas, pois o transplante de ilhotas pancreáticas é severamente limitado pela escassez de doadores de órgãos. Nós mostramos que prolactina recombinante humana (rhPRL) apresenta efeitos benéficos em células beta, inibindo a apoptose. Recentemente reportamos o aumento dos níveis de expressão da proteína antiapoptótica HSP27/25, regulada por rhPRL em ilhotas humanas. Nosso objetivo é explorar o papel de HSP27/25 na citoproteção induzida por prolactina em células beta.

Métodos: Células MIN6 parentais e silenciadas para HSP25 foram privadas de soro por 24h e cultivadas na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL). Posteriormente foram tratadas na presença ou ausência de uma combinação de citocinas (TNF-α, INF-γ e IL-1β) por diferentes períodos de tempo. A apoptose foi avaliada usando-se análise por citometria de fluxo. Os níveis de expressão gênica de *HSP27/25* e membros da família *BCL-2,* da expressão proteica de membros desta mesma família, além de Caspase-9, Smac-Diablo HSP27/25, HSTF1, pP38 e pSTAT1 foram analisados por Westen blot. Ainda, foram avaliadas a atividade de Caspase-8 e -3, por ensaios fluorimétricos.

Após o tratamento com rhPRL e citocinas, a proporção de núcleos fragmentados aumentou em células silenciadas para HSP25 ($p<0,05$), quando comparadas com células controles. A inibição da atividade de Caspase-3 e -8, tanto quanto os níveis de expressão proteica de caspase-9, por rhPRL e o aumento da razão de expressão Bcl-2/Bax e $Bclx_L$/Bax

foram revertidos em células silenciadas ($p<0,05$). Além disso, a cinética dos níveis de expressão de HSP27/25 e HSTF1 foram estudadas em culturas de ilhotas pancreáticas humanas, mostrando que enquanto HSTF1 apresenta um aumento significativo ($p<0,01$) nos níveis de expressão proteica após 10min de tratamento com rhPRL, HSP27 alcançou seu nível máximo após 2h do tratamento hormonal. Adicionalmente, foi detectado um aumento significante ($p<0,05$) nos níveis de fosforilação de STAT1 e de p38, após 10min, atingindo o pico de expressão após 30min ($p<0,01$) do tratamento com rhPRL.

Estes estudos demonstram o papel chave de HSP27/25 sobre os efeitos citoprotetores induzidos por rhPRL, desde que a ausência desta proteína aboliu completamente os efeitos benéficos induzidos por PRL sobre a morte de células beta. Ainda, nós fornecemos pela primeira vez, evidências da corregulação de HSP27 e HSTF1 induzidas por rhPRL em células humanas pancreáticas, que pode estar sendo mediada pela ativação de STAT1 e p38. Coletivamente, nossos resultados podem conduzir para a atenuação da morte de células beta por meio da regulação de uma via de proteção endógena, a qual é independente da modulação do sistema imunológico.

Palavras-chave: Células beta pancreáticas, Diabetes *mellitus*, prolactina, apoptose, HSP27/25.

ABSTRACT

Wailemann, R.A.M. **Role of HSP27/25 in PRL-induced cytoprotective effects on beta cells.** 2013. 166p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

One of the goals in *Diabetes mellitus* treatment is to enhance pancreatic β-cell function, proliferation and survival since transplantation of pancreatic islets is severely limited by shortage of organ donors. We have shown that recombinant human prolactin (rhPRL) inhibits beta-cell apoptosis. We have recently reported PRL-induced up-regulation of the anti-apoptotic HSP25/27 in human islets. Since the function of HSP25/27 in beta-cells has not been directly studied, we set out to explore the role of HSP25/27 in prolactin-induced beta-cell cytoprotection.

Methods: Parental and HSP25 knocked-down Min6 cells were serum-starved for 24h and then cultured in the presence or in the absence of rhPRL (300ng/mL) for different time periods. Apoptosis was evaluated using flow cytometry analysis. Levels of Bcl-2 gene family members, caspase-9, Bcl-2, $Bclx_L$, Bax, Smac-Diablo, HSP27/25, HSTF1, pStat-1,pP38 were studied by western blot. Caspase-3 and -8 activity, were evaluated by fluorimetric assays.

Upon cytokines and rhPRL treatment, the proportion of fragmented nuclei was increased in HSP25 silenced cells ($p<0.05$) when compared to control cells. The inhibition of cytokine-induced capase-3 and -8 activity as well as Bcl-2/Bax and $Bclx_L$/Bax ratios and caspase-9 protein levels mediated by rhPRL in wild type cells was reverted in knocked-down cells ($p<0.05$). Moreover, the kinetics of HSP 25/27 and HSTF1 expression levels studied in primary cultures of human pancreatic islets showed that while HSTF1 presented a significant increase ($p<0.01$) in protein expression level after 10 min of rhPRL treatment, HSP27 reached its maximum expression level upon 2h of hormonal treatment. Additionally, a significant ($p<0.05$)

increase in both P38 and STAT1 phosphorylation levels were detected after 10min of rhPRL treatment reaching the highest levels upon 30 min ($p<0.001$) of hormonal treatment.

Therefore, we demonstrated a key role for HSP25/27 in rhPRL-induced cytoprotective effects, since the lack of this protein completely abolished the beneficial effects induced by PRL on beta-cell death. Moreover, we provided for the first time, evidence for the co-regulation of HSP27 and HSTF1 induced by rhPRL in human pancreatic cells which could be mediated by activated STAT1 and P38. Collectively, our results could lead to the mitigation of beta-cell death through the up-regulation of an endogenous protective pathway which is independent on the modulation of the immune system.

Keywords: Beta-cell, Diabetes mellitus, prolactin, apoptosis, HSP27/25.

Lista de abreviaturas e siglas

µL	microlitro
µM	micromolar
%	porcentagem
°C	grau Celsius
Ac-DEVD-AFC	Acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid α-(4-methyl-coumaryl-7-amide)
AC-LEHD-AFC	Acetyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-threoninil-L-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumaryl
aa	aminoácido
ADP	Adenosina Difosfato
APAF1	*Apoptotic Peptidase Activing Factor-1*
ATP	Adenosina Trifosfato
BAD	*BCL2 associated death promoter*
BAK	*BCL2 homologous antagonist/killer*
BAX	*BCL2 associated X protein*
BCL-2	*B-cell limphoma -2*
$BCLx_L$	*BCL extra large*
BH	*BCL2 Homology Domains*
BID	*BH3 interacting domain death agonist*
BSA	*Bovine Serum Albumine*
Caspase	*c*ysteine-*asp*artic prote*ases* or **c**ysteine-dependent **asp**artate-directed prote**ases**
CCK	Colecistocinina
cDNA	*complementary DNA*
CEP-HU	Comitê de Ética Institucional local
cIAP	*cellular IAP*
DEX	Dexametazona
DM	Diabetes *mellitus*
DM1	Diabetes *mellitus* tipo 1
DM2	Diabetes *mellitus* tipo 2

DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Médium
DMG	Diabetes *mellitus* gestacional
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
EDTA	*Ethylenediamine tetraacetil acid*
EGTA	*Ethylene glycol tetraacetic acid*
EPM	Erro Padrão da Média
ERK1	*Extracellular signal-Regulated kinase1*
ERK2	*Extracellular signal-Regulated kinase2*
F	feminino
FADD	*Fas-associated death domain*
FID	Federação Internacional de Diabetes
G-6-P	*Glucose-6-Phosphate*
GAPDH	*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
GFP	*Green Fluorescent Protein*
GH	*Growth Hormone*
GLUT2	*Glucose transporter 2*
GLUT4	*Glucose transporter 4*
h	hora
HbA1c	hemoglobina glicada
HEK293	*Human Embryonic Kidney 293 cells*
HEPES	*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
HPRT	*Hipoxanthine Phosphoribosyl Transferase*
HMBS	*Hydroxymethylbilane synthase*
HRP	*Horseradish peroxidase*
HSP	*Heat shock protein*
HSP25	*Heat shock protein 25 (equivalente à Heat shock protein 27 em murinos)*
HSTF1	*Heat shock transcription factor 1*
IAP	*Inhibitor of Apoptosis*
IEQ	*Islet equivelent*
IL-1 β	Interleucina-1β

INF-γ	Interferon-γ
INS-1	linhagem celular de um insulinoma de rato
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
IRS	*Insulin Receptor Substrate*
JAK2	*Janus Kinase 2*
KDa	quilodalton
M	masculino
mA	miliampere
MAC	*Mitochondrial apoptosis-induced channel*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinases*
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimole
MIN6	linhagem celular de um insulinoma de camundongo
ng	nanograma
NG	*Newport Green*
NOD	*Non-obese diabetic*
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR	*Polimerase Chain Reaction*
PI	*Propidium Iodide*
PI3K	*Phosphatidylinositide 3-kinases*
PM	peso molecular
PRL	Prolactin
PRLR	*Prolactin Receptor*
PVDF	*Polyvinylidene difluoride*
qPCR	*Quantitative Polimerase Chain Reaction*
rhPRL	*recombinant human Prolactin*
RNA	*Ribonucleic acid*
RNAi	*RNA interference*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*

RRP	*Readily Releasable Pool*
RT-PCR	*Reverse Transciptase Plimerase chain Reation*
seg	segundo
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SDS	*Sodium Dodecyl Sulfate*
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SFB	Soro Fetal Bovino
shRNA	*Small hairpin RNA*
siRNA	*Small Interfering RNA*
SMAC	*Second Mithocondria- derived Activator of Caspase*
STAT1	*Signal Transducer and Activator of Transcription-1*
STAT3	*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*
STAT5	*Signal Transducer and Activator of Transcription-5*
STZ	Estreptozotocina
TNF-α	*Tumor Necrosis factor-α*
TNFR	*TNF receptor*
TRADD	*TNFR-associated death domain*
TRAF	*TNFR-associated factor*
U	Unidades
W	Watt
WB	Western blot
WHO	*World Health Organization*
XIAP	X-linked IAP

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática da anatomia pancreática..... 30
Figura 2. Esquema histológico de uma ilhota pancreática..... 32
Figura 3. Representação esquemática do processo de síntese e secreção de insulina 34
Figura 4. Representação esquemática da secreção de insulina induzida por glicose e sua ação em tecidos periféricos..... 36
Figura 5. Representação esquemática de Diabetes *mellitus* tipo 1..... 40
Figura 6. Representação esquemática do transplante de ilhotas pancreáticas.. 45
Figura 7. Representação esquemática de processos iniciadores de apoptose... 49
Figura 8: Via extrínseca da apoptose..... 51
Figura 9: Representação esquemática da regulação de membros da família Bcl-2 53
Figura 10. Representação esquemática da ativação do receptor de PRL. 56
Figura 11. Representação esquemática da inibição da via de sinalização canônica de PRL por AG490..... 59
Figura 12. Representação esquemática de estruturas de HSP27, HSP22 e αB-cristalina 61
Figura 13. Representação esquemática do processo de infecção celular por vetor lentiviral shRNA e silenciamento de gene alvo..... 85
Figura 14. Efeito protetor da rhPRL na morte celular induzida por tratamento com citocinas em células MIN6..... 93
Figura 15. rhPRL aumenta a razão de mRNA entre os membros anti e pró-apoptóticos da família *BCl-2*..... 95
Figura 16. Efeito citoprotetor da rhPRL é perdido na presença do inibidor da via de sinalização canônica do hormônio..... 96
Figura 17. Aumento da relação dos níveis de proteínas anti/pró-apoptóticas, após tratamento com rhPRL..... 98
Figura 18. Diminuição dos níveis de proteínas pró-apoptóticas após tratamento com rhPRL..... 99
Figura 19. Efeito citoprotetor da rhPRL esta associado à via de sinalização canônica do hormônio..... 101
Figura 20. rhPRL promove aumento de expressão de Hsp25..... 103
Figura 21. Silenciamento de Hsp25..... 106
Figura 22 Efeito citoprotetor da rhPRL em células MIN6 é perdido após 18h de tratamento com citocinas em células silenciadas para a proteína Hsp25..... 109
Figura 23. Efeito citoprotetor da rhPRL em células MIN6 permanece perdido após 24h de tratamento com citocinas em células silenciadas para a proteína Hsp25.....110
Figura 24. O balanço de proteínas anti/pró-apoptóticas não é regulado por rhPRL com o silenciamento de HSP25..... 114

Figura 25. Proteínas pró-apoptóticas não são reguladas por rhPRL com a inibição de HSP25..... 117
Figura 26: Atividade de Caspase-8 não diminui em cultura de células silenciadas para HSP25, na presença de rhPRL..... 120
Figura 27. Atividade de Caspase-3 não diminui em cultura de células silenciadas para HSP25, na presença de rhPRL..... 122
Figura 28: Níveis proteicos ou fosforilação de HSTF1, p38, STAT1 e HSP27 são induzíveis por rhPRL em cultura primária de ilhotas pancreáticas humanas..... 124
Figura 29. Representação esquemática dos efeitos do hormônio prolactina sobre a via apoptótica 133
Figura 30. Regulação da via apoptótica por HSP27/25..... 138
Figura 31. Modelo hipotético do mecanismo molecular da via de sinalização do hormônio PRL..... 143

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição enzimática do suco pancreático humano..... 29
Tabela 2: Composição e produção celular das Ilhotas pancreáticas..... 31
Tabela 3: Efeitos da insulina no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas..... 37
Tabela 4: Informações dos doadores de ilhotas humanas utilizados neste estudo..... 73
Tabela 5. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a quantificação da expressão gênica através de ensaios de RT-PCR Quantitativa..... 78
Tabela 6: Lista de anticorpos primários utilizados para detecção de níveis de proteínas por *Western blot (WB)*..... 81
Tabela 7: % de Núcleos Hipodiplóides: Tratamento de 18h.....108
Tabela 8: % de Núcleos Hipodiplóides: Tratamento de 24h.....108
Tabela 9: Razão entre a expressão proteica anti/pró-apoptótica $Bclx_L$/Bax.....112
Tabela 10: Razão entre a expressão proteica anti/pró-apoptótica Bcl-2/Bax.....113
Tabela 11: Razão entre a expressão proteica de Caspase-9/Tubulina...118
Tabela 12: Atividade de Caspase-8.....119
Tabela 13: Atividade de Caspase-3..... 121
.

Sumário

***1.*Introdução..... 27**
1.1. Pâncreas..... 29
1.1.1. Ilhotas de Langerhans..... 31
1.2. Insulina..... 32
1.3. Diabetes mellitus..... 38
1.3.1. Diabetes mellitus tipo 1..... 39
1.4. Transplante de Ilhotas Pancreáticas..... 43
1.5. Morte Celular..... 46
1.5.1. Apoptose..... 47
1.6. Prolactina..... 54
1.7. Heat Shock Protein (HSP)..... 59
1.7.1. Small Heat Shock Protein (sHSP ou HSPBs)..... 60
1.7.1.1. Heat Shock Protein 27/25 (HSP27/25 ou HSPB1)..... 62
2. Objetivos..... 65
2.1. Objetivo geral..... 67
2.2. Objetivos Específicos..... 67
2.1.1. Validar o modelo de células de insulinoma MIN6 escolhido para este estudo..... 67
2.1.2. Promover o silenciamento de HSP25 em células MIN6 a fim de estudar a função desta proteína na citoproteção induzida por prolactina.....67
2.1.3. Investigar possíveis mecanismos de indução da expressão da HSP27/25 mediados por prolactina.....67
3. Materiais e Métodos..... 69
3.1. Isolamento e cultura primária de ilhotas pancreáticas humanas 71
3.2. Cultura de Células MIN6..... 74
3.3. Cultura de Células HEK293T..... 74
3.4. Tratamentos Celulares..... 75
3.5. Extração de RNA..... 76
3.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e de transcriptase reversa (RTPCR) e PCR quantitativo em tempo real (qPCR) 77
3.7. Ensaio de Western *blot*..... 79
3.7.1. Obtenção dos extratos proteicos totais..... 79
3.7.2. Separação de proteínas por eletroforese em gel de acrilamida e transferência para membrana de nitrocelulose ou PVDF.....79
3.7.3 Imunorreação..... 80
3.8. Transdução das células MIN6 com partículas virais contendo o vetor de expressão para o shRNA para HSP25..... 82
3.9. Avaliação de fragmentação nuclear por citometria de fluxo 86
3.10. Ensaios de atividade de Caspase-3 e -8 86
3.11. Análise estatística dos dados..... 87
4. Resultados..... 89

4.1. Validação do modelo celular MIN6..... 91

4.1.1. rhPRL protege culturas de células MIN6 de morte induzida por citocinas..... 91
4.1.2. rhPRL altera a razão entre níveis de expressão de mRNA de genes anti- e pró-apoptóticos da família Bcl2..... 94
4.1.3. rhPRL altera os níveis de proteínas anti e pró-apoptóticas favorecendo a inibição de apoptose..... 96
4.1.4. rhPRL inibe a atividade de Caspase-3 através da via de sinalização canônica do hormônio.....100
4.1.5. rhPRL altera tanto os níveis de expressão gênica, como proteica de Hsp27/25..... 101
4.2. Estabelecimento do papel de HSP27/25 mediado por rhPRL. 104

4.2.1. Produção de células MIN6 silenciadas para a proteína Hsp25 (MIN6-shHsp25)..... 104
4.2.2. O efeito citoprotetor de rhPRL é perdido na ausência de Hsp27/25.. 107
4.2.3. Hsp27/25 regula os níveis das proteínas pró- e antiapoptóticas da família BCL-2..... 111
4.2.4. Hsp27/25 participa da regulação da cascata de caspases em células beta..... 116
4.3. Investigação da via de sinalização da prolactina em ilhotas pancreáticas humanas e sua relação com HSP27/25..... 123
5. Discussão..... 125
6. Conclusões..... 145
7. Referências Bibliográficas..... 149
Súmula Curricular..... 167
Artigos Publicados..... 175

1. Introdução

Introdução

1.1. Pâncreas

O pâncreas é um órgão que se encontra, nos seres humanos, na parte superior da cavidade abdominal. Ele se localiza ao longo da borda inferior do estômago e é composto por três partes: cabeça, corpo e cauda (Figura 1). Esse órgão é uma glândula mista, exócrina e endócrina, que desempenha um papel central na digestão e metabolismo, como na utilização e estocagem de substratos energéticos. As células dos ácinos (Figura 2B) são responsáveis pela secreção exócrina enzimática, a qual desempenha função nos processos digestivos, pois além da produção de íons, bicarbonato de sódio e nucleases, o suco pancreático contém enzimas proteolíticas, lipolíticas e amilolíticas. Todas as enzimas proteolíticas e algumas lipolíticas são secretadas na forma inativa de pró-enzimas (Tabela 1).

Tabela 1. Composição enzimática do suco pancreático humano.

Enzimas Proteolíticas	Enzimas Lipolíticas	Enzimas Amilolíticas
Quimiotripsinogênio*	Lípase	Amilase
Tripsinogênio*	Pró-fosfolipase A*	
Pró-elastase*		
Pró-carboxipeptidade A*		
Pró-carboxipeptidade B*		

*Enzimas produzidas na forma de pró-enzimas

A modulação da secreção é feita principalmente por secretina, colecistocinina (CCK) e gastrina, e é recolhida pelos ductos que confluem

para o ducto pancreático, também denominado ducto de Wirsung, que desemboca no ducto colédoco, comum à glândula biliar e que se liga ao duodeno através do Esfíncter de Oddi (Figura 1).

O pâncreas endócrino é composto por aglomerados celulares diferentes do tecido exócrino, designados de ilhotas de Langerhans ou ilhotas pancreáticas, e não fazem conexão com os ductos.

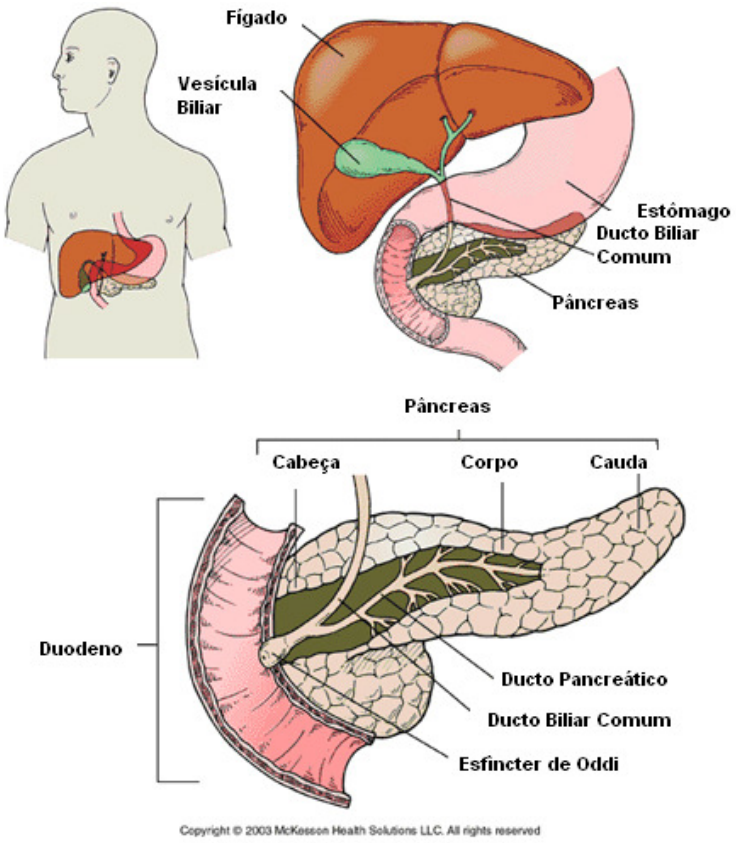


Figura 1. Representação esquemática da anatomia pancreática. Pâncreas está localizado na cavidade abdominal e é composto por três partes: cabeça, corpo e cauda. A secreção exócrina é captada pelo ducto pancreático, que desemboca no ducto colédoco, comum à glândula biliar e que se liga ao duodeno através do Esfíncter de Oddi. Adaptado de http://www.ogrupo.org.br/glandula_pancreas.asp (acesso em 07/05/2013)

1.1.1 Ilhotas de Langerhans

Paul Langerhans identificou as ilhotas de Langerhans, que correspondem à parte endócrina do pâncreas em 1869. Em um ser humano adulto e saudável, esta é constituída por 1 a 2 milhões de ilhotas de Langerhans, que correspondem a 1 a 2% da massa total pancreática, são altamente vascularizadas, recebendo de 10 a 15% do fluxo sanguíneo pancreático, e secretam hormônios diretamente na corrente sanguínea (Figura 2B) (Molina, 2004).

Cinco tipos celulares constituem as ilhotas pancreáticas (Tabela 2), havendo predominância de células beta (β), que representam 73 a 75% do total e são responsáveis pela produção e secreção dos hormônios insulina e amilina (Figura 2C). Em humanos, não há uma disposição definida das células na ilhota, no entanto, a citoarquitetura difere entre as espécies.

Tabela 2: Composição e produção celular das Ilhotas pancreáticas.

Tipo celular	Composição (%)	Produção Hormonal
Células alfa	18 - 20	Glucagon
Células beta	73 - 75	Insulina e Amilina
Células delta	4 - 6	Somatostatina
Células PP	1	Peptídeo Pancreático
Células Épsilon	>1	Grelina

A função pancreática endócrina normal, que envolve a produção e liberação dos hormônios insulina e glucagon, é essencial para o controle fisiológico da homeostase de glicose. Este processo envolve a regulação do

balanço entre a liberação de glicose hepática, proveniente da glicogenólise e gliconeogênese e absorção da glicose da dieta.

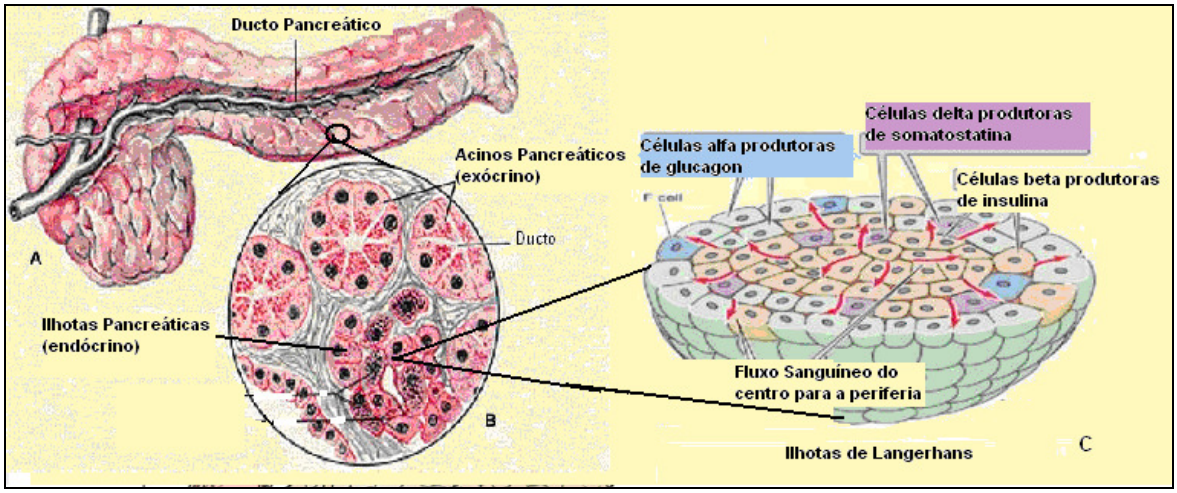


Figura 2. Esquema histológico de uma ilhota pancreática. A- Pâncreas, com destaque para o duto pancreático. B- O pâncreas é composto por dois tipos principais de tecidos: o exócrino, composto pelos ácinos e o endócrino, composto pelas ilhotas de Langerhans. C- As ilhotas por sua vez são compostas por diferentes tipos celulares sem uma organização definida, em humanos. Adaptado de http://www.afh.bio.br/endocrino/endocrino2.asp http://imunologia96.wordpress.com/2013/01/25/ (acesso em 07/05/2013)

1.2. Insulina

A insulina foi descoberta em 1921 por Sir Frederick Grant Banting e o estudante de medicina Charles Best. Sua etimologia tem origem do latim *insula* significando "ilha", e, associada ao sufixo *ina* que corresponde à "natureza de", em relação à sua produção e secreção pelas células beta das ilhotas de Langerhans, no pâncreas. Essa molécula consiste de uma pequena proteína de 51 aminoácidos (aa) distribuídos em duas cadeias polipeptídicas (A-21 aa e B-30 aa), que são mantidas unidas por duas pontes de dissulfeto intermoleculares. Uma terceira ponte de dissulfeto está presente na cadeia A (Figura 3B).

Introdução

A insulina é produzida inicialmente na forma de preproinsulina (109 aa). Esta sofre a clivagem do seu peptídeo sinal durante a inserção no retículo endoplasmático, gerando a proinsulina que, por sua vez, sofre uma segunda clivagem no Complexo de Golgi, gerando o peptídeo C e a insulina, que são, então, empacotados em grânulos secretórios e posteriormente, secretados conjuntamente (Figura 3) (Orci; Ravazzola *et al*., 1987). Os grânulos secretórios contêm hexâmeros de insulina, que são mantidos por dois íons de zinco, que interagem com resíduos de histidina das seis moléculas (Baker; Blundell *et al*., 1988; Ciszak and Smith, 1994).

Somente 5% destes grânulos ficam disponíveis para liberação rápida, enquanto que os 95% restantes ficam armazenados e necessitam de modificações químicas e físicas para serem secretados (Parsons; Coorssen *et al.*, 1995). A existência desses dois conjuntos de grânulos é utilizada para explicar o padrão bifásico da secreção de insulina (Curry; Bennett *et al*., 1968; Henquin; Nenquin *et al*., 2006) (Figura 3A).

Substratos energéticos metabolizáveis pela célula beta pancreática, principalmente a glicose, estimulam a secreção de insulina. O transportador de glicose (GLUT2) é uma proteína integral da membrana de células beta, que possui K_M e V_{MAX} elevados, o que permite que o transporte de glicose aumente rapidamente somente quando a glicemia se eleva.

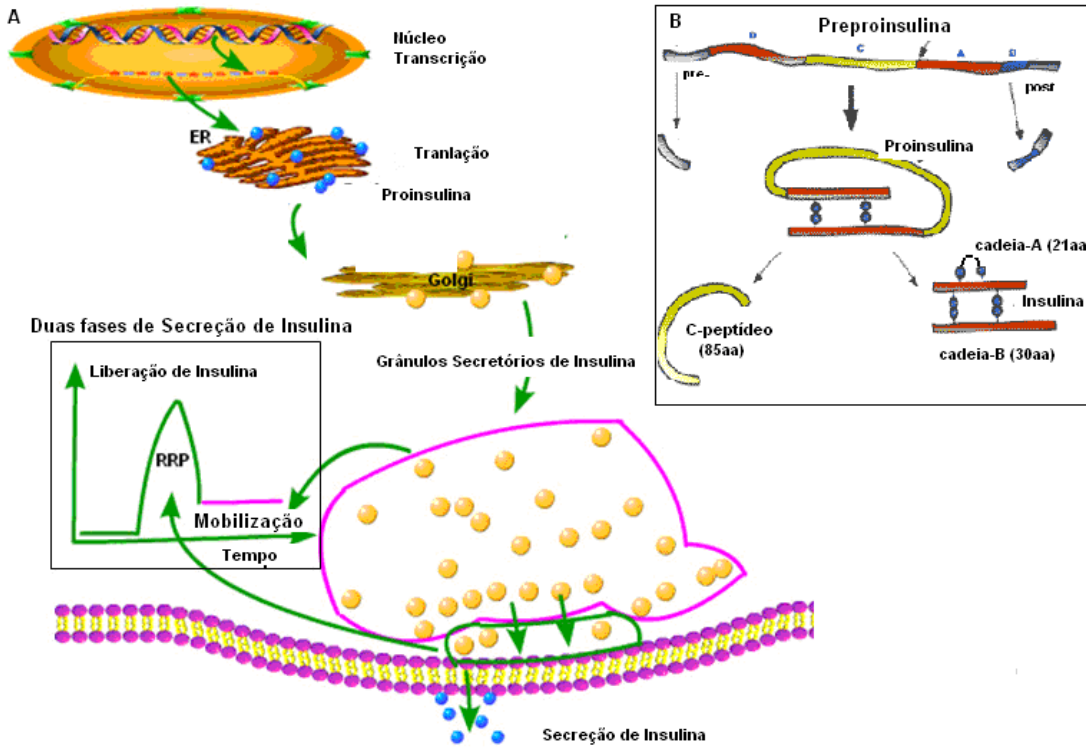


Figura 3. Representação esquemática do processo de síntese e secreção de insulina. A- Após a transcrição do mRNA da preproinsulina, esta é sintetizada no RE, na forma de preproinsulina e convertida à proinsulina. Então, esta é transportada através do aparato do Golgi e empacotada na forma de grânulos imaturos, sendo processada em insulina e peptídeo-C. Após o estímulo de glicose, a insulina exibe duas fases de liberação: 1- fase rápida e transiente – aproximadamente 5% dos grânulos estão prontos para liberação imediata e são chamados de "*readily releasable pool*" (RRP). 2- A maior parte dos grânulos (95%) pertence a um pool de reserva e é responsável pela segunda fase de secreção de insulina, os grânulos deste pool deverão sofrer mobilização antes da liberação. B- Após a última clivagem a molécula de insulina é composta por duas cadeias: A (21 aa) e B (30 aa), unidas por duas pontes de dissulfeto. Há uma terceira ponte de dissulfeto na cadeia A. (Acesso em 07/05/2013. Adaptado de Ren, Jin *et al.,* 2007 e http://diabetesmellituskarinapacheco.blogspot.com.br/).

Duas enzimas são responsáveis pela fosforilação de glicose a glicose-6-fosfato (G-6-P), após sua entrada na célula beta. A hexoquinase (ou glicoquinase) que apresenta uma baixa afinidade por glicose (K_M entre 6 a 11mmol/L), e a hexoquinase I, de alta afinidade (K_M < 0,1mmol/L). Nas

células beta existe expressão majoritária da glicoquinase, fato que lhe confere o papel preponderante na fosforilação da glicose nas células beta, na regulação do fluxo glicolítico e, portanto, na secreção de insulina, caracterizando essa enzima como o sensor da glicose nessas células. O destino preferencial da G-6-P na célula beta é a glicólise.

O metabolismo de glicose gera ATP e o aumento da relação ATP/ADP no citoplasma provoca o fechamento dos canais para potássio sensíveis ao ATP e a consequente despolarização da membrana celular com a abertura de canais para cálcio sensíveis à voltagem. O aumento do influxo de cálcio para a célula beta resulta em despolarização suplementar da membrana plasmática e desencadeamento do processo de exocitose dos grânulos de insulina (Bratanova-Tochkova; Cheng *et al*., 2002; MacDonald e Wheeler, 2003) (Figura 4A).

O receptor de insulina é do tipo tirosina quinase do tipo II que, uma vez ativado, dispara uma autofosforilação em vários substratos chamados de IRS (*Insulin Receptor Substrate)*. Os IRS, por sua vez, facilitam a interação do receptor com outros substratos, ativando diversas vias de sinalização, principalmente as vias *fosfatidilinositol-3 quinase* (PI3K) e das *Mitogen-activated protein Kinases* (MAPK) (Figura 4B).

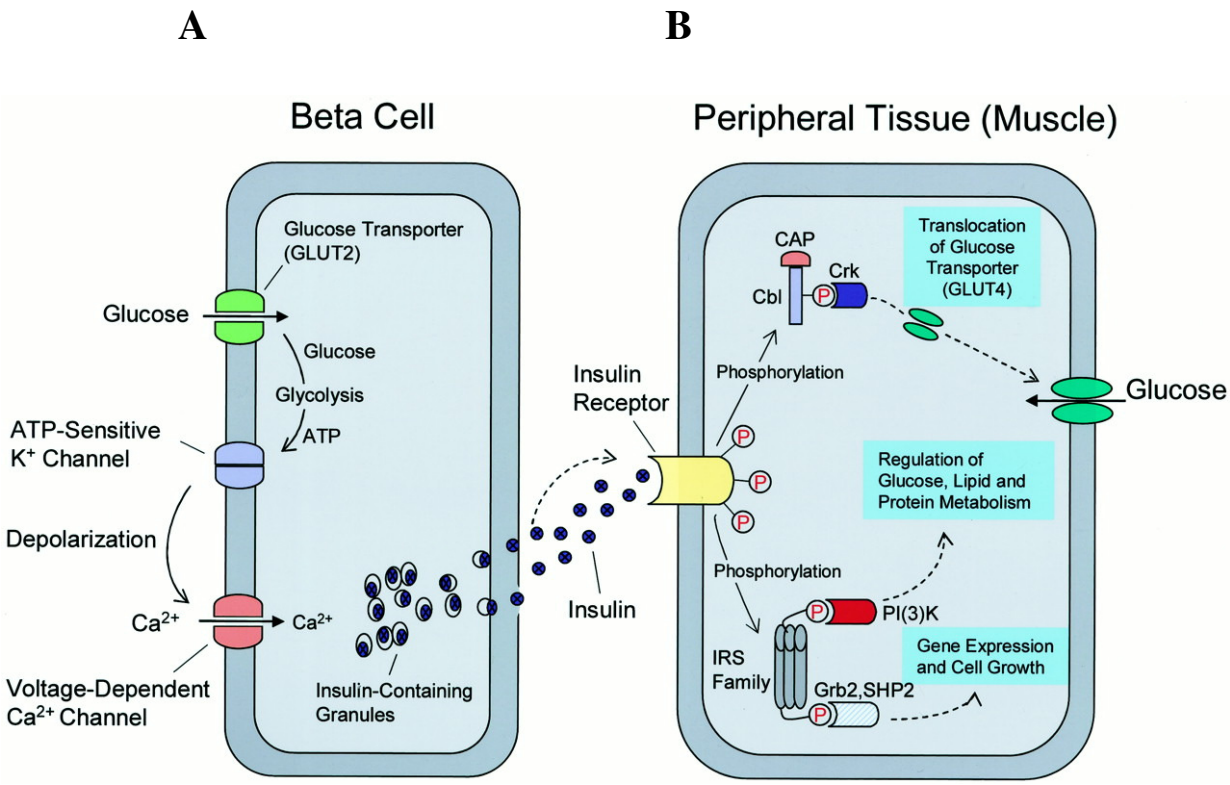


Figura 4. Representação esquemática da secreção de insulina induzida por glicose e sua ação em tecidos periféricos. A- Após a captação de glicose pelo transportador de glicose tipo 2 (GLUT2), esse açúcar é metabolizado, o que leva a um aumento da razão ATP/ADP. Este aumento causa a inativação do canal de potássio dependente de ATP, o que causa uma despolarização na membrana, ocasionando a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e permitindo um influxo de íons de cálcio (Ca^{2+}). O aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} leva à liberação da insulina presente nos grânulos prontos para liberação. B- Em tecidos periféricos, após a ativação do receptor de insulina, vários substratos deste receptor (IRS) são fosforilados, o que pode ocasionar efeitos de rápidos a tardios, como: translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a membrana, regulação de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, regulação da expressão gênica e crescimento celular (Acesso em 10/05/2013. Adaptado de**:** http://intmed.exblog.jp/m2010-01-01/).

Os efeitos da insulina no organismo podem ser divididos em: precoces, intermediários e tardios. Imediatamente após a ativação do receptor de insulina ocorre, por exemplo, a translocação do transportador de glicose GLUT4 do citoplasma para a membrana celular nos tecidos que apresentam a expressão deste receptor (predominantemente nos tecidos adiposo e

muscular estriado), o que permite um rápido transporte de glicose para o interior da célula (Figura 4B).

Tabela 3: Efeitos da insulina no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas.

Efeitos metabólicos	Insulina estimula	Insulina inibe
Metabolismo de Carboidratos	· Transporte de glicose através da membrana celular no tecido adiposo e músculo · Glicólise no músculo e tecido adiposo · Síntese de glicogênio, principalmente no músculo e fígado	· Quebra de glicogênio no músculo e fígado · Glicogenólise e gliconeogênese no fígado
Metabolismo de Lipídios	· Síntese de ácidos graxos e triacilglicerol nos tecidos · Captação de triacilglicerídeos do sangue para o tecido adiposo e músculo · Síntese de colesterol no fígado	· Lipólise no tecido adiposo · Oxidação de ácidos graxos no músculo e fígado · Cetogênese
Metabolismo de Aminoácidos	· Transporte de aminoácidos para os tecidos · Síntese de proteínas no músculo, tecido adiposo, fígado e outros tecidos	· Degradação de proteína no músculo · Formação de Uréia

(Adaptado de Molina, 2004).

Ainda, entre os efeitos rápidos e moderados, podemos destacar que a insulina atua na regulação e na modulação da síntese de enzimas envolvidas no processo metabólico, ativando ou inibindo processos (Tabela 3). Os efeitos no crescimento e diferenciação celular podem ser considerados entre os efeitos tardios da ação insulínica (Figura 4B).

1.3. Diabetes mellitus

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes "Uma epidemia de diabetes *mellitus* (DM) está em curso", devido ao aumento vertiginoso de indivíduos com diabetes *mellitus* e de mortes relacionadas tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Bach, 2002; Okada; Kuhn *et al.,* 2010). O Diabetes *mellitus* não é uma doença única, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia. Esta hiperglicemia é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção desta ou ambos.

A denominação *diabetes* foi utilizada pela primeira vez pelo grego Araeteus (Sec. II d.C.), com o significado de sifão, nome relacionado pela poliúria que o caracteriza. Quanto ao nome *mellitus*, deve-se ao sabor adocicado da urina (Linguagem Médica, 2004). A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pela Associação Americana de Diabetes e recomendada pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento e inclui quatro classes clínicas: Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), Diabetes *mellitus* gestacional (DMG) e outros tipos específicos de DM. Existem, ainda, outras duas categorias referidas como pré-diabetes, no entanto podem ser consideradas como fatores de risco: glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída.

Independente da forma de DM, os indivíduos podem apresentar alguns, mas não todos os seguintes sintomas: sede excessiva (polidipsia), diurese frequente (poliúria), fome extrema (polifagia), perda de peso sem causa aparente, presença de glicose na urina (glicosúria), cansaço ou fadiga, alterações na visão, dormência ou formigamento nas extremidades (mãos e pés), demora para a cicatrização de feridas e maior frequências de infecções (SBD, 2013).

1.3.1. Diabetes mellitus tipo 1

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é um processo inflamatório autoimune órgão-específico caracterizado pela destruição seletiva de células beta pancreáticas produtoras de insulina, o que leva a uma deficiência absoluta na produção de insulina. A ausência do hormônio impede o recrutamento de GLUT4 para a membrana das células alvo, o que causa uma dificuldade na absorção de glicose, levando consequentemente a uma elevação da glicemia em forma crônica (Figura 5) (Lukic; Stosic-Grujcic *et al*., 1998; Todd, 2010). DM1 é um distúrbio endócrino-metabólico crônico mais freqüente na infância (Who Diamond Project Group, 1990) e manifesta-se geralmente abaixo dos 30 anos de idade, concentrando-se no período escolar e na adolescência em 90% dos casos (Cavalcante; Gonçalves *et al*., 1995; Gomes; Aguiar *et al*, 1996; Scott; Smith *et al*., 1997).

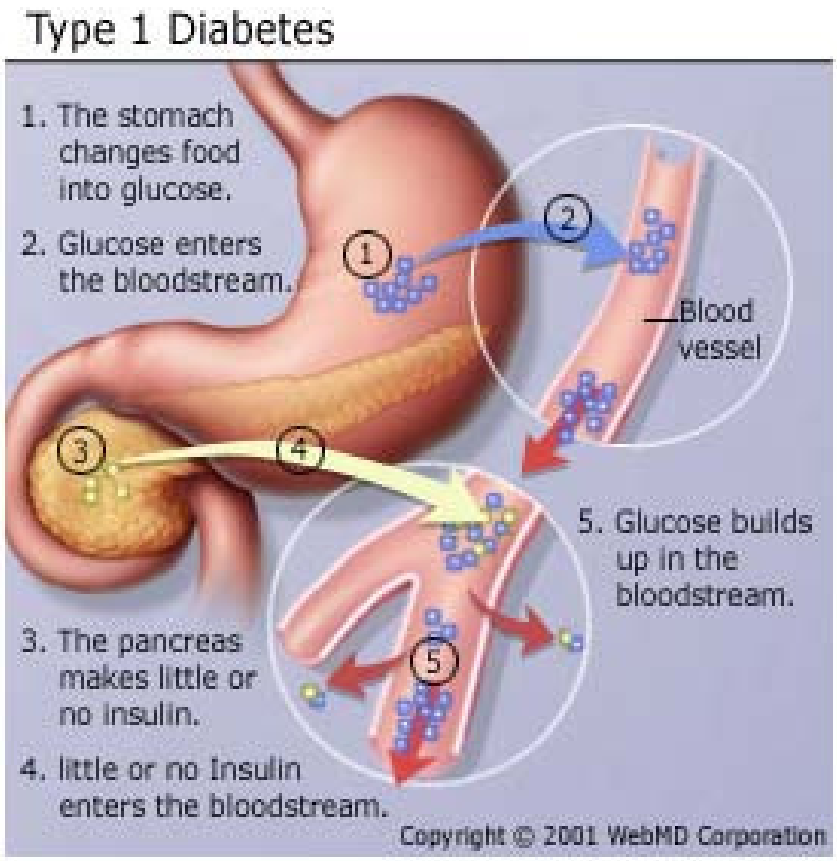


Figura 5. Representação esquemática de Diabetes *mellitus* tipo 1. Em diabetes *mellitus* tipo 1 pouca ou nenhuma insulina é produzida e secretada. Isto promove a deficiência de absorção da glicose, produto da dieta, por exemplo, pelos tecidos periféricos. O aumento da glicose circulante no sangue causa a hiperglicemia e complicações relacionadas à diabetes (Adaptado de http://www.mindthesciencegap.org/2012/01/30/type-1-diabetes-on-the-rise/ acesso em 05/maio/2013)

O DM1 é um importante problema de saúde pública mundial, visto que o número de indivíduos com DM segundo a OMS é estimado em aproximadamente 350 milhões de pessoas e destes, acredita-se que entre 17,5 e 35 milhões representem indivíduos com DM1 (WHO, 2012). A OMS também estima que o número de mortes associadas à DM duplique entre 2005 e 2030. Relacionado a isto é importante destacar que o número de óbitos devido à DM1 atingiu 6% do total de óbitos em âmbito mundial,

associados principalmente a doenças cardiovasculares (50% dos casos) (WHO-DIAMOND Project Group, 2006). Apesar de apresentar uma incidência variável, estima-se que haja um aumento anual de 3,2% no número de casos mundialmente, principalmente entre crianças e adolescentes (Kantarova and Buc, 2007).

No Brasil não existem dados precisos sobre a incidência desta doença, sendo que foi estimado, haver em 2005, 8 milhões de indivíduos com DM e dentre estes de 5 a 10% correspondem a DM1, indicando que cerca de 600 mil são portadores da doença (Gomes e Dib, 2006). Apesar do diagnóstico de cerca de 60% dos portadores de DM1 ser feito em até 30 dias após apresentarem os primeiros sintomas, manter a glicemia sobre controle é uma das dificuldades apresentadas pelos portadores da doença e apenas 15% dos diagnosticados possuem os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) menor do que 7%, média considerada adequada para o não aparecimento de complicações crônicas (Moraes, 2012).

Os mecanismos moleculares envolvidos no início e progressão da doença ainda não são completamente entendidos. No entanto, sabe-se que a predisposição genética (poligênica), fatores ambientais e imunológicos podem estar envolvidos nesta doença. O processo de destruição autoimune ocorre quando há uma inflamação local das ilhotas pancreáticas (Roep; Gepts, 2003; Gepts e Lecompte, 1981). Mediadores inflamatórios contribuem para a indução e amplificação da reação imune contra células beta e, em

fases posteriores, para a estabilização e manutenção da insulite (Elzirik e Mandrup-Poulsen, 2001; Cnop, 2005; revisado por Eizirik; Colli *et al.,* 2009). A infiltração por macrófagos e linfócitos desencadeia a secreção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, às quais as células beta são extremamente sensíveis (Nielsen; Karlsen *et al.*, 1999; Nielsen; Sparre *et al.*, 2004; revisado por Thomas; Mackenzie *et al.,* 2009).

Linfócitos infiltrados promovem a citólise pancreática mediada pela liberação de perforinas e granzimas, além de ativar receptores unidos a moléculas FAS/APO, causando a lise destas células, ou induzindo a apoptose por meio da ação de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-γ (INF-γ) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α). A combinação destas citocinas induz a produção de interleucina-1β (IL-1 β) em macrófagos residentes nas ilhotas (revisado por Thomas; Mackenzie *et al*., 2009) .

Tanto pâncreas de pacientes com DM1 em estágios iniciais, como modelos animais desta doença apresentam expressão de TNF- α e IL-1β (Eizirik e Mandrup-Poulsen, 2001; Kaminitz; Stein *et al.*, 2007; Uno, Imagawa *et al.*, 2007). Isto levou ao desenvolvimento de ensaios clínicos baseados no uso de bloqueadores de TNF-α (Mastrandrea; Yu *et al.*, 2009) ou IL-1β (Pickersgill e Mandrup-Poulsen, 2009) para a prevenção de DM1. Ainda, a exposição *in vitro* de células beta humanas ou de roedores a uma combinação dessas citocinas, mas não a uma destas citocinas isoladamente,

desencadeia a apoptose em células beta (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001; Eizirik; Moore *et al.*, 2008).

Uma vez que no DM1 há a destruição de células beta, o objetivo do tratamento é mimetizar a secreção endógena de insulina desta célula e manter a glicemia ao longo do dia dentro dos limites de normalidade, evitando os episódios hipoglicêmicos e a ampla variabilidade da glicemia. O tratamento indicado para este tipo de diabetes é a administração de insulina exógena que, embora corrija a hiperglicemia, não previne o aparecimento das complicações crônicas associadas a esta doença.

No entanto, há um grupo de indivíduos, denominados "hiperlábeis", que apesar de insulinoterapia ajustada, apresentam frequentes e ou intensos episódios de hipo e hiperglicemia, muitas vezes despercebidos e fatais (Tattersall, 1977). Nesses casos, o transplante de ilhotas pancreáticas isoladas de doadores de órgão com morte cerebral é uma terapia a ser considerada.

1.4. Transplante de Ilhotas Pancreáticas

Segundo a SBD existem três modalidades de transplante de pâncreas órgão sólido: o transplante simultâneo de pâncreas e rim, o de pâncreas após o transplante do rim e a menos utilizada é a modalidade de pâncreas isolado. Mesmo com a melhora das técnicas cirúrgicas, da imunossupressão e dos cuidados multidisciplinares envolvidos no transplante de órgãos, a falta de doadores, o procedimento altamente invasivo, com altas taxa de óbito por

complicações durante e no pós-operatório constituem obstáculos a serem ultrapassados. O transplante de ilhotas pancreáticas surgiu como um avanço clínico no controle glicêmico indicado para pacientes "hiperlábeis". (Gleason; Gonzalez *et al.*, 2000; Kido; Burks *et al.*, 2000; Shapiro; Lakey *et al.*, 2000; Dong e Woo, 2001).

As ilhotas são implantadas no fígado do receptor por meio de uma infusão na veia porta. A escolha do fígado como local do implante é decorrente da capacidade deste órgão em acomodar o volume da infusão, do fato de que a insulina é fisiologicamente secretada no sangue portal e do sucesso clínico alcançado com este sítio de implante (Shapiro; Lakey *et al.,* 2000; Walsh; Eggleston et al., 1982; revisado por Sá; Gonzalez *et al*., 1999) (Figura 6). O procedimento não requer cirurgia e anestesia geral. Ainda, no transplante de ilhotas, o receptor não entra em contato com a secreção exócrina, evitando, assim, a possibilidade de complicações relacionadas à produção das enzimas digestivas, como experimentado no transplante de órgão total (Ichi e Ricordi, 2008).

No entanto, esta abordagem é limitada pela escassez de doadores de órgãos, pela baixa sobrevida dessas células após o transplante e ainda pelos efeitos colaterais ligados à imunossupressão (Ryan; Paty *et al.*, 2005; Kaminitz; Stein *et al.*, 2007; Wenzlau; Juhl *et al.*, 2007). A morte de células beta associada com inflamação não específica parece ser mediada, ao menos em parte, pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β e TNF-α

nas ilhotas transplantadas (Berney; Molano *et al*., 2001; Gysemans, Waer *et al*., 2000; Gysemans; Stoffels *et al*., 2003). Diante disso, a cultura ex-vivo destas células, previamente ao transplante, aparece como uma alternativa atraente, embora a manutenção de ilhotas humanas em cultura não seja uma tarefa simples. Em vista desta dificuldade, a estimulação da proliferação de células beta ou da diferenciação de células-tronco neste tipo celular, juntamente com inibição da morte celular, *in vitro*, constitui um importante desafio científico.

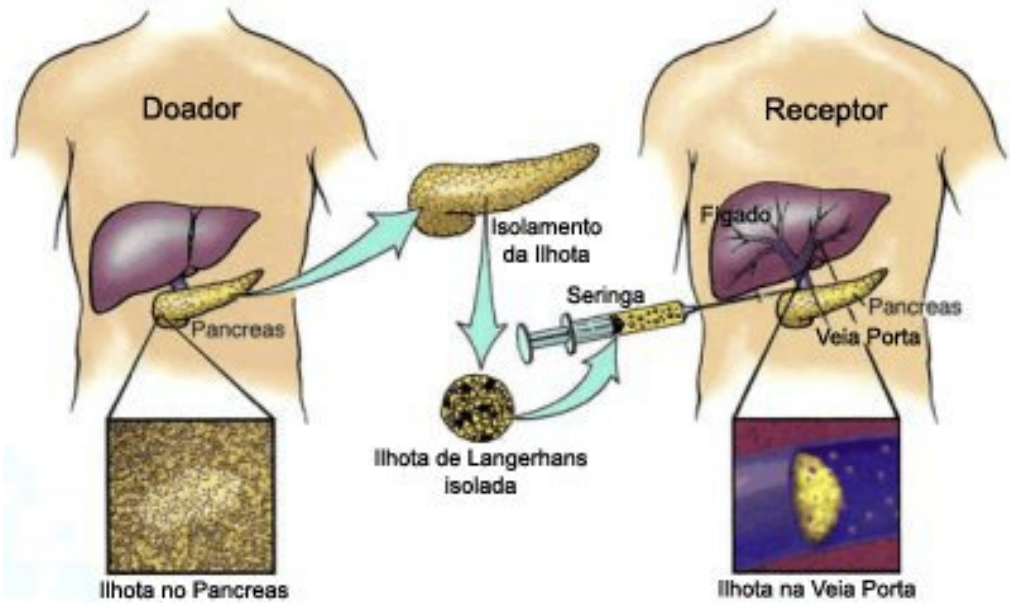


Figura 6. Representação esquemática do transplante de ilhotas pancreáticas. As ilhotas são isoladas do pâncreas de doadores cadáveres e infundidas na veia porta do fígado do paciente diabético receptor (Adaptado de: http://www.pro-renal.org.br/diabete_01.php acesso em 27/05/2013).

O procedimento não requer cirurgia e anestesia geral. Ainda, no transplante de ilhotas, o receptor não entra em contato com a secreção

exócrina, evitando, assim, a possibilidade de complicações relacionadas à produção das enzimas digestivas, como experimentado no transplante de órgão total (Ichi e Ricordi, 2008).

No entanto, esta abordagem é limitada pela escassez de doadores de órgãos, pela baixa sobrevida dessas células após o transplante e ainda pelos efeitos colaterais ligados à imunossupressão (Ryan; Paty *et al.*, 2005; Kaminitz; Stein *et al.*, 2007; Wenzlau; Juhl *et al.*, 2007). A morte de células beta associada com inflamação não específica parece ser mediada, ao menos em parte, pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β e TNF-α nas ilhotas transplantadas (Berney; Molano *et al*., 2001; Gysemans, Waer *et al*., 2000; Gysemans; Stoffels *et al*., 2003). Diante disso, a cultura ex-vivo destas células, previamente ao transplante, aparece como uma alternativa atraente, embora a manutenção de ilhotas humanas em cultura não seja uma tarefa simples. Em vista desta dificuldade, a estimulação da proliferação de células beta ou da diferenciação de células-tronco neste tipo celular, juntamente com inibição da morte celular, *in vitro*, constitui um importante desafio científico.

1.5. Morte Celular

A morte celular é um paradoxo uma vez que em suas várias formas desempenha um papel essencial na vida. O conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos ainda está, no âmbito molecular, interconectado com

a sobrevivência e proliferação celular (Cherlonneix, 2008; Maddika *et al.* 2007). A morte celular é classificada de acordo com os mecanismos moleculares envolvidos, sendo que estes não são totalmente independentes. Os principais tipos de mortes celulares descritos são: necrose, apoptose e autofagia. Dentre estas, a morte celular apoptótica é a predominante durante o desenvolvimento, tanto quanto na regulação do sistema imune como na resposta defensiva ao estímulo de doenças.

Embora não possa ser excluída a hipótese de células beta morrerem por necrose, os dados experimentais suportam a apoptose como o principal mecanismo de morte destas células, tanto em humanos como em murinos (Augstiein; Elefanty *et al.,* 1998; Chervonsky; Wang *et al*.,1997; Delaney; Pavlovic *et al.,* 1997; Dunger; Augstein *et al*., 1996; Itoh; Imagawa *et al.,* 1997; Iwahashi; Hanafusa *et al*., 1996; Kägi; Odermatt *et al*., 1997; Kurrer; Pakala *et al*., 1997; Mandrup-Poulsen, 2001; Mizuno; Yoshitomi *et al.,* 1998; Rabinovitch; Suarez-Pinzon *et al.,* 1994; revisado por Thomas; Mackenzie *et al.,* 2009; Terra; Garay-Malpartida *et al.,* 2011).

1.5.1. Apoptose

Apoptose é frequentemente chamada de morte celular programada, embora alguns pesquisadores reservem este termo somente para o processo de morte relacionado ao desenvolvimento. Aproximadamente, 10 milhões de células sofrem apoptose por dia em um humano adulto saudável (Curtin E e

Cotter, 2003). Semelhante mecanismo é necessário não somente para preservar a homeostase do organismo, mas para controlar o tamanho de tecidos e moldá-los em diferentes estágios do desenvolvimento, ou controlar o número de células imunoefetoras específicas após a erradicação de patógenos (Los *et al*., 1999).

As células sofrem muitas alterações durante a apoptose como: condensação de cromatina, perda do contato com células vizinhas e encolhimento. Na membrana celular inicia-se a formação de bolhas, as quais são progenitoras dos corpos apoptóticos (Figura 7), que podem conter organelas funcionais cercadas por membrana plasmática intacta (Elmore, 2007; Ghavami *et al.,* 2009). A camada lipídica externa da membrana plasmática, que envolve os corpos apoptóticos, expõe os fosfolipídeos fosfatidilserina, que agem como sinalizadores do processo de morte, atraindo macrófagos, sendo assim, efetivamente fagocitados (Elmore, 2007; Ghavami *et al.,* 2009). Assim, além de limitar um dano celular direto, o conteúdo citoplasmático não dispara uma inflamação, já que não entra em contato com células do sistema imune.

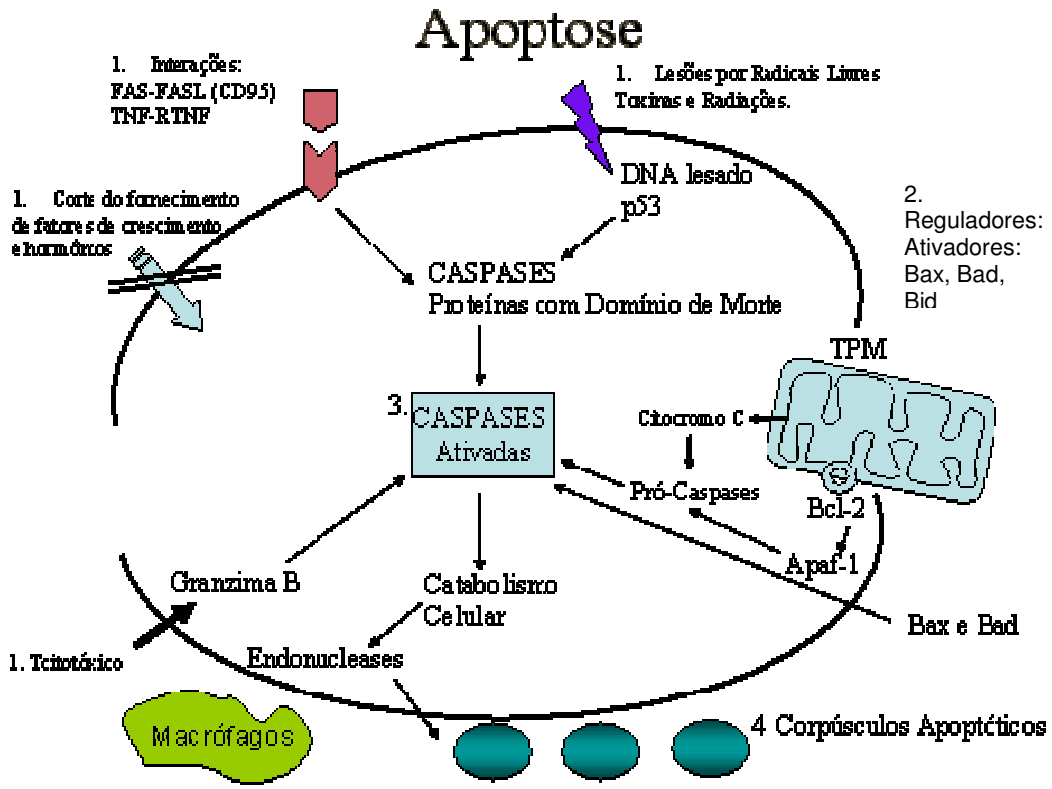


Figura 7. Representação esquemática de processos iniciadores de apoptose. Vários estímulos podem ser iniciadores do processo apoptótico: (1) liberação de granzimas e perforinas por células T-citotóxicas, interações com os receptores da família TNFR, lesões por radicais livres, toxinas ou radiação, deficiência do fornecimento de fatores de crescimento e hormônios; (2) a razão entre a ação de membros da família BCL-2 pode determinar o início da apoptose. (3) Uma vez que o Citocromo c é liberado da mitocôndria, uma cascata de caspases é ativada, determinando a morte celular. (4) Na apoptose, processo que envolve consumo de ATP e síntese de proteínas, não ocorre extravasamento de material, a célula se fragmenta em corpos apoptóticos, que são fagocitados por células vizinhas. TPM: transição da permeabilidade mitocondrial. (Adaptado de: Damiani, 2004)

O mecanismo clássico apoptótico envolve, preferencialmente, duas famílias de proteínas conservadas evolutivamente: a família BCL-2 (B-cell limphoma -2), que controla a transição da permeabilidade mitocondrial (TPM) e a família de Caspases (*c*ysteine-*asp*artic prote*ases* or cysteine-dependent aspartate-directed proteases) que medeiam a fase de execução da apoptose. Atualmente estão descritas 12 tipos de caspases pertencentes

às subfamílias de caspases apoptóticas e inflamatórias. As caspases apoptóticas estão classificadas em dois principais grupos: Caspases iniciadoras (Caspases -2, -8, -9, -10) e Caspases efetoras (Caspases 3, -6 e -7). As Caspases possuem essencialmente uma cisteína e requerem um aspartato no sítio de clivagem do seu substrato (proteases cisteinil-aspartato específicas). São expressas em zimógenos, ou seja, pró-caspases, e são ativadas através de estímulos específicos. Este processo, em mamíferos, pode ser iniciado ou por fatores extrínsecos ou intrínsecos, com um ponto de convergência mediado pela proteína *BH3 interacting domain death agonist* (BID) (Duprez; Wirawan *et al.*, 2009). Estudos mostram que BID pode ser um regulador crítico na apoptose de células beta induzida por perforinas e granzima B e sua ausência previne a célula de morte (Estella e McKenzie, 2006).

A via extrínseca é ativada pela ligação de receptores transmembrana, também conhecidos como receptores de morte (CD95/APO-1/Fas, tumor necrosis factor a, TNF-receptors, ‘‘TNF related apoptosis inducing ligand’’, TRAIL-receptors, associados aos seus ligantes: APO-1/Fas, TNF, TRAIL). Os diferentes pares receptor/ligante (Fas/FasL; TNF/TNFR1; TRAIL/DR4 e DR5 (receptores de morte 4 (TRAIL-R1) e 5 (TRAIL-R2)) induzem uma sinalização que atrai moléculas adaptadoras (geralmente FADD, Fas-associated death domain) que iniciam a cascata de caspases, através do recrutamento e ativação das Caspases-8 e -10. Estas, por sua vez, ativam caspases efetoras,

como a Caspase-3 levando a célula à apoptose (Elmore 2007; Los et al.,1999) (Figura 8).

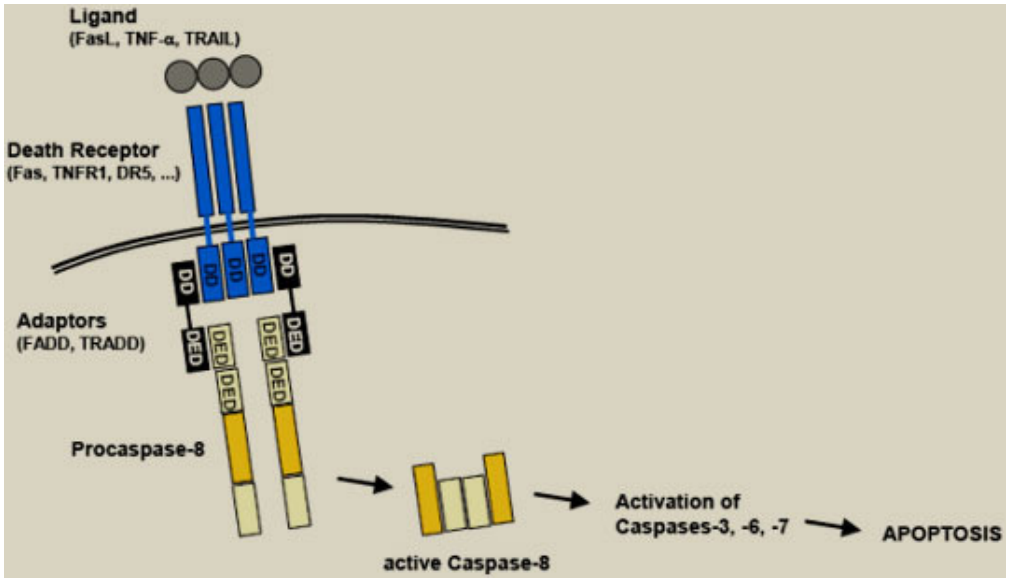


Figura 8: Via extrínseca da apoptose. A ativação de receptores de morte transmembrana promove a ativação de Caspases iniciadoras (-8 e -10). Estas, por sua vez, ativam Caspases efetoras (-3, -6, -7), o que leva à apoptose. Ativação do DISC – Complexo de morte via estímulo extracelular. DD: domínio de morte citoplasmático; DED: adaptador adicional contendo o domínio efetor de morte celular. (Acesso em 27/05/2013. Adaptado de Mecanismos da Apoptose, disponível em: http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=202&materiaver=1).

A via intrínseca pode ser ativada por vários tipos de estímulos, como dano no DNA e indução de citotoxidade por algumas moléculas. Ela é modulada pelo balanço de membros da família BCL-2, que possui proteínas apresentando funções pró- e antiapoptóticas (Zha; Aime-Sempe *et al*., 1996; Aouacheria; Brunet *et al*., 2005). Essas proteínas possuem domínios altamente conservados chamados de *BCL-2 Homology Domains* (BH), que são essenciais para suas interações e atividades. Muitas destas proteínas

possuem os domínios BH1-3, mas algumas possuem apenas o BH3, sendo chamadas de proteínas *BH3-only*.

A regulação é feita através do controle da permeabilidade da membrana mitocondrial (Barczyk *et al.,* 2005; Elmore 2007; Los *et al.,* 1999). Durante o estresse celular os efeitos antiapoptóticos de BCL-2 e BCL-xL (Bcl extra large) são inibidos por *BH3-only* e ocorre a desinibição das proteínas pró-apoptóticas BAX (Bcl-2 associated X protein) e BAK (Bcl-2 Homologous antagonist/killer).

BAX normalmente é encontrado em monômeros solúveis no citosol ou associado frouxamente à mitocôndria. Com o estímulo apoptótico, esta proteína sofre mudanças conformacionais e é translocada para a membrana onde é inserida e oligomerizada, formando o *Mitochondrial apoptosis-induced channel* (MAC), responsável pelo extravasamento de Citocromo-c (Figura 9). Outras proteínas pró-apoptóticas, como a *Second mitochondria-derived activator of caspases* (Smac) também podem ser liberadas da mitocôndria por mecanismos alternativos (Dejean; Martinez-Caballero *et al*., 2005).

A ativação de BAX e sua inserção na membrana mitocondrial regulam a expressão de BID (BH (Bcl-2 Homology Domains)-3- interating domain death agonist).

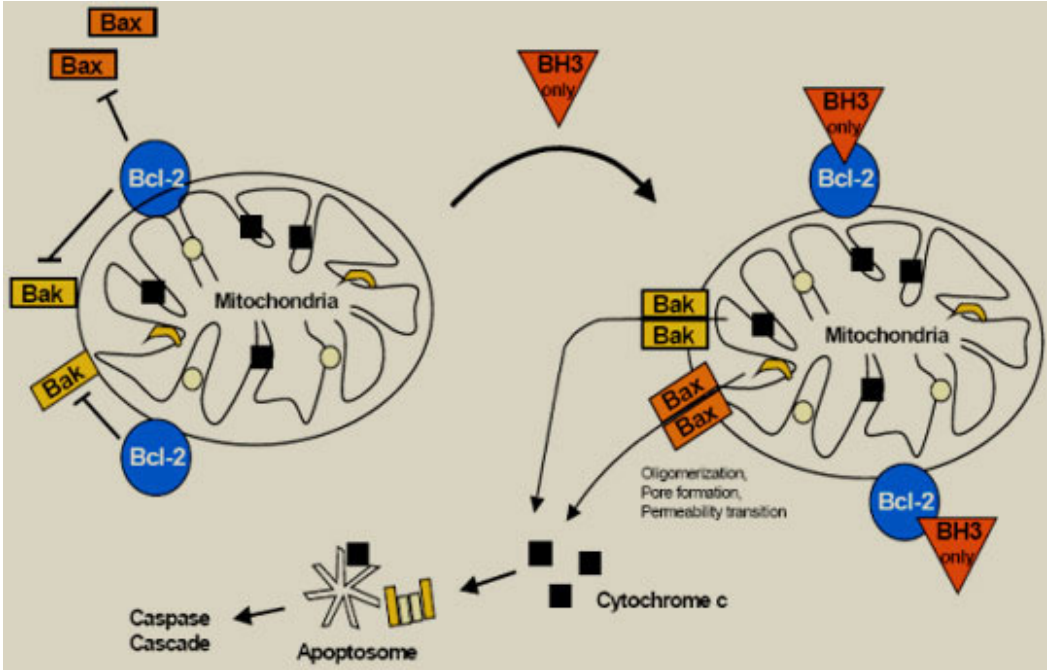


Figura 9: Representação esquemática da regulação de membros da família Bcl-2. Bcl-2 inibi a ação de proteínas antiapoptóticas Bax e Bak. Estímulos de estresse ativam BH3 only, que por sua vez inibe Bcl-2, propiciando o oligomerização de Bax e Bac e sua inserção na membrana externa mitocondrial. Há a formação do poro (MAC) e extravasamento de Citocromo c, entre outras proteínas para o citosol. Uma vez liberado o Citocromo c, há a formação do Apoptossomo e inicio de clivagem e ativação de Caspase-9, ativando a cascata de caspases. (Acesso em 04/05/2013. Adaptado de Mecanismos da Apoptose, disponível em: http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=202&materiaver=1).

Os mecanismos de formação do poro via BAK não estão totalmente elucidados, mas parece que BAK tem ação redundante a BAX. BCL-2 e $BCLx_L$ heterodimerizam com BAX, e a superexpressão de ambos protege as células de apoptose induzida por diversos estímulos (Dupraz; Rinsch *et al.*, 1999; Iwahashi; Hanafusa et al., 1996; Liu; Rabinovitch *et al.*, 1996; Rabinovitch; Suarez-Pinzon et al., 1999). Essas descobertas indicam que estas proteínas antiapoptóticas são funcionalmente redundantes (Chao; Linette *et al.*, 1995). Inclusive, a superexpressão de BCL-2 inibe tanto a ativação quanto a

oligomerização de BAX (Antonsson; Montessuit *et al.*, 2001; Mikhailov; Mikhailova *et al.*, 2001). O extravasamento de Citocromo c para o citosol promove, com a ligação de (d)ATP, a ativação do Apaf1 (Apoptotic protease activating factor) e formação do Complexo Apoptossomo (Barczyk et al. 2005; Elmore 2007; Los et al. 1999). O Apoptossomo ativa Caspase-9 que, por sua vez, ativa elementos a jusante na cascata de caspases.

A liberação de SMACs, por sua vez, como é o caso da DIABLO, também denominada SMAC/DIABLO, antagonizam a ação dos inibidores de apoptose (IAP) como o *X-linked IAP* (XIAP), que se liga às Caspases-9, -3 e -7, inativando-as, e ao *cellular IAP* (cIAP) 1 e 2, que interagem com proteínas da via extrínseca e contribuem para sua inibição (Lacasse, Mahoney *et al.*, 2008).

1.6. Prolactina

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico, secretado pela adeno-hipófise, constituída por uma cadeia de 198 aminoácidos, com peso molecular de 23 kDa (Lewis; Singh *et al.,* 1971), e estrutura similar a dos hormônios de crescimento (GH) e lactogênio placentário. No entanto, a detecção na espécie humana só foi possível após o advento da técnica de radioimunoensaio (Lewis; Singh *et al*., 1971; revisado por Verna; Watanabe *et al*., 2005).

Introdução

No passado, era conhecida apenas por controlar a secreção láctea, mas, atualmente, tem ação sistêmica reconhecida, incluindo seu efeito na reprodução tanto do ser humano quanto de outros mamíferos (Mathers; Stovall *et al.,* 1998; revisado por Verna; Watanabe *et al*., 2005). A PRL atua de modo sinérgico com a progesterona e o estrogênio na promoção do crescimento e do funcionamento das glândulas mamárias e outros tecidos (Lewis, Singh *et al*., 1971; revidado por Verna; Watanabe *et al*., 2005). Sabe-se que em ilhotas pancreáticas, somente células beta possuem o receptor de prolactina (PRLR) (Brelje; Svensson *et al.*, 2002).

Quando a PRL se liga ao seu receptor (PRLR), sem atividade intrínseca de tirosina quinase, ocorre a dimerização do mesmo. Este processo leva à ativação da tironisa quinase associada a ele, Janus Kinase 2 (JAK2). Esta proteína se autofosforila, promove a fosforilação do PRLR assim como o recrutamento e a fosforilação de proteínas da família *Signal Transducer and Activator of Transcription (*STAT).

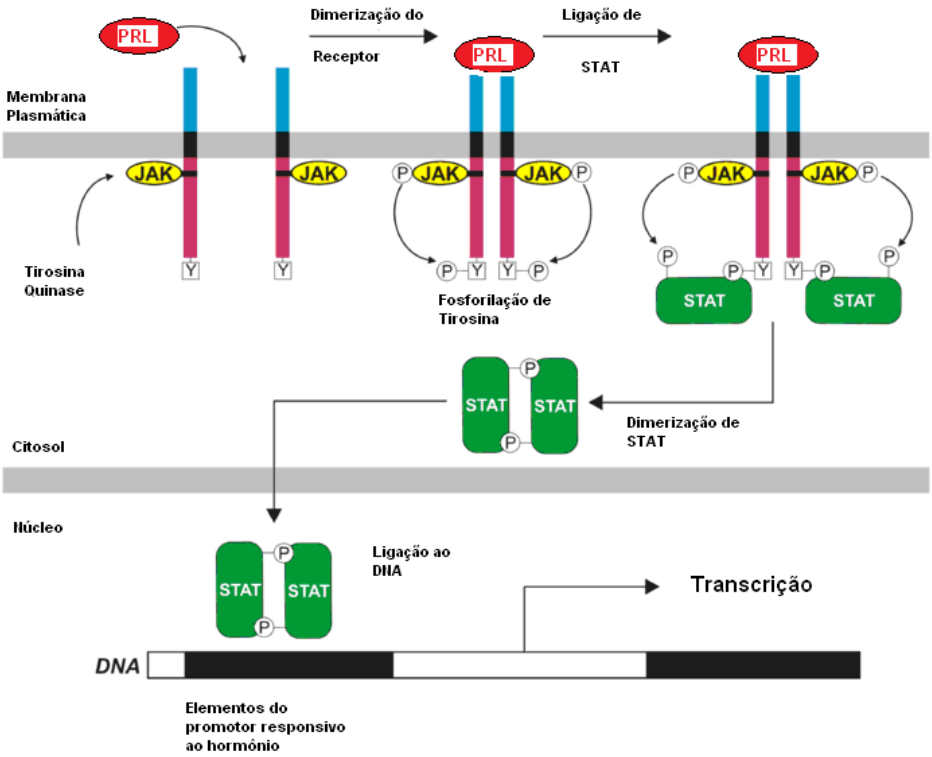


Figura 10. Representação esquemática da ativação do receptor de PRL. PRL se liga ao seu receptor (PRLR), ocorre sua dimerização o que leva à fosforilação da proteína quinase constitutivamente associada ao PRLR, Janus Kinase 2 (JAK2). Este processo leva à fosforilação, dimerização e translocação nuclear da proteína *Signal transducer and activator of transcription5* (STAT5). Esta por sua vez, liga-se a sequências consenso específicas do DNA nos promotores dos genes-alvo, assim regulando a transcrição (Acesso em 04/12/2012. Adaptado de: http://www.eritropoyetina.com/biosintesis-y-funcion-biologica/).

O receptor-associated Janus kinase 2 (JAK2) foi identificado como a principal quinase associada com o PRLR (Rui; Kirken *et al*., 1994; Han, Watling *et al*., 1997) e orienta a fosforilação, dimerização e translocação nuclear da proteína *Signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5) que se liga a sequências consenso específicas do DNA nos promotores dos genes-alvo, assim regulando a transcrição (Schindler e Darnell, 1995) (Figura 10). Muitos estudos mostram a ativação e

caracterização desta via em células beta de roedores (Stout; Svensson *et al.*, 1997; Brelje; Svensson *et al.*, 2002; Brelje; Stout *et al.*, 2004) e em ilhotas pancreáticas humanas com aumento dos níveis proteicos e ativação de JAK2, STATs 1, 3 e 5 na presença de PRL (Labriola; Montor *et al.*, 2007).

Estudos demonstram que o tratamento com PRL leva a um aumento da secreção de insulina, uma característica da gravidez, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Brelje; Allaire *et al.*, 1989; Brelje; Scharp *et al.*, 1993; Nielsen; Galsgaard *et al.,* 2001; Weinhaus; Stout *et al.*, 1996; Weinhaus; Stout *et al.*, 2007). Em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas, o tratamento com PRL induz o aumento do número de ilhotas pancreáticas humanas, bem como da produção, estocagem e liberação basal de insulina pelas células beta. Em resposta a estímulos fisiológicos como a incubação com soluções contendo alta concentração de glicose (a partir de 11mM), o tratamento com prolactina humana recombinante (rhPRL) não modifica a resposta secretória normal das células beta (Labriola; Montor *et al.,* 2007), demonstrando os efeitos benéficos da ação de rhPRL nestas células.

Fujinaka e colaboradores (2007) mostraram que em cultura primária de células beta de camundongo e células de um insulinoma de rato, INS-1, o uso de Prolactina (PRL) foi capaz de induzir a proteção de morte celular induzida por Estrepzotocina (STZ), composto que causa necrose e apoptose através do dano no DNA, ativação da poli-ADP-ribose polimerase e depleção

de NAD^+, e por Dexametazona (DEX), causador de apoptose pela via intríseca (Weinhaus; Bhagroo *et al.*, 2000; Fujinaka; Takane *et al.*, 2007).

Além disso, com o uso de inibidores específicos para as proteínas PI3K (inibidor Wortmannin), *Extracellular signal-Regulated kinase1/2* - ERK1/2 (inibidor PD98059) e JAK2 (inibidor AG490) verificou-se que apenas quando tratadas com AG490 (Figura 11) a citoproteção induzida por PRL era completamente perdida em INS1 quando tratadas com DEX. Estes resultados foram confirmados por siRNA contra JAK2 (Fujinaka; Takane *et al.*, 2007). Ainda, em cultura primária de ilhotas pancreáticas de camundongo tratada com DEX, o efeito citoprotetor da PRL também é perdido quando estas células expressam uma variante de STAT5a truncada, que bloqueia a via de sinalização de STAT5 induzida por prolactina. Através de siRNA para Bcl-x_L foi percebido que este é necessário para a mediação do efeito citoprotetor de PRL em INS-1 tratados com DEX, pelo menos em parte (Fujinaka; Takane *et al.*, 2007).

Os mecanismos envolvidos na ação da prolactina em modelos de ilhotas humanas ainda não foram completamente identificados. No entanto, a partir de um estudo de expressão proteica comparativa, por eletroforese bidimensional acoplada a espectroscopia de massa, entre ilhotas mantidas na presença ou ausência de rhPRL, foram geradas, pela primeira vez, informações sobre o padrão do perfil de expressão diferencial destas células induzido pelo tratamento hormonal (Labriola; Ferreira *et al.*, 2007). Dentre

as proteínas que apresentaram expressão diferencial, encontra-se a proteína HSP27, proteína da família das Heat Shock Proteins (HSPs).

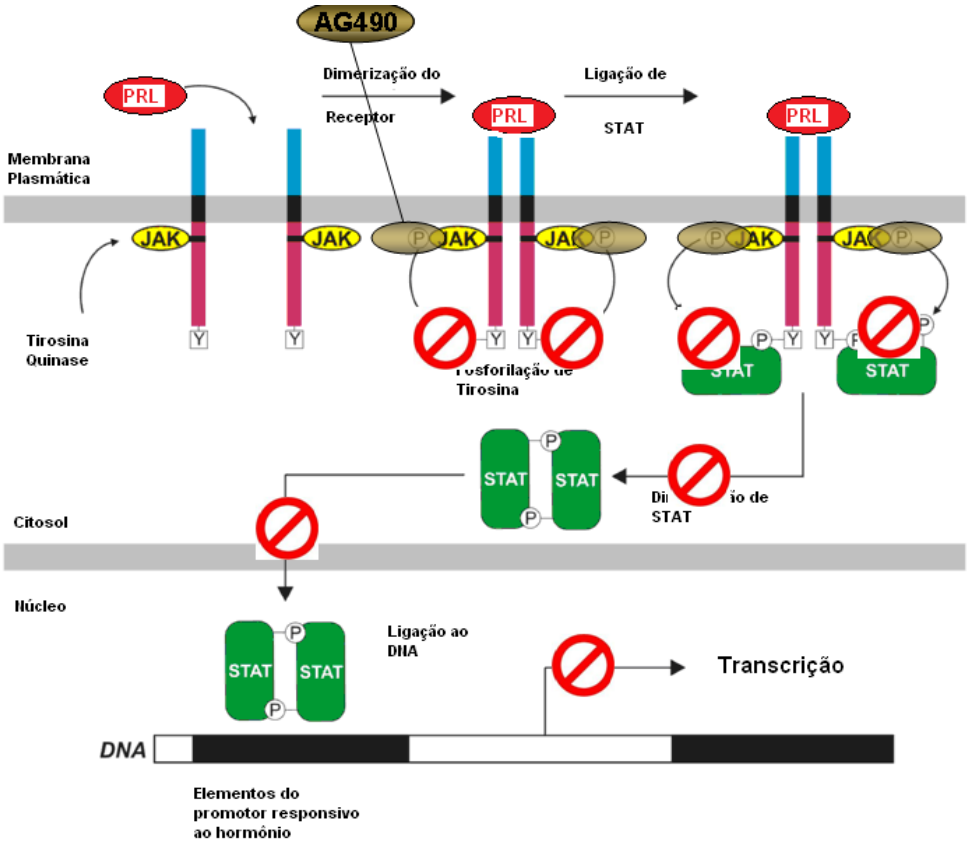


Figura 11. Representação esquemática da inibição da via de sinalização canônica de PRL por AG490. AG490 é permeável à membrana plasmática e se liga à proteína JAK, impedindo que haja a fosforilação desta proteína e dos eventos a jusante, como: fosforilação, dimerização e translocação nuclear de STATs, impedindo a transcrição (Acesso em 04/12/2012. Adaptado de: http://www.eritropoyetina.com/biosintesis-y-funcion-biologica/).

1.7. Heat Shock Protein (HSP)

Uma variedade de proteínas tem sua expressão e ativação aumentadas quando uma célula é exposta a fatores de estresse como temperaturas elevadas, redução na suplementação de oxigênio, agentes infecciosos,

substâncias tóxicas ou mediadores inflamatórios. Claramente, esta resposta reflete um esforço da célula em prevenir ou conter algum dano que poderia ser induzido por estas condições (van Noort; Bisbis *et al.,* 2012). Enquanto o termo "proteína de estresse" seria mais preciso ao refletir as funções biológicas da maioria das proteínas induzidas por estresse, tradicionalmente é usado o termo proteínas de choque térmico (Heat shock protein – HSP). Também por tradição estas têm sido classificadas em diferentes famílias de acordo com seu peso molecular aproximado.

Recentemente, fez-se uma tentativa de racionalizar a nomenclatura das HSPs humanas (Kampinga; Hageman *et al.,*2009), recomendando–se que o termo "HSP" seja usado para referir-se a proteínas de choque térmico em geral, incluindo pequenas e grandes HSPs. Enquanto que para a família das pequenas HSPs (short HSPs (sHSPs)) como a HSP27 fosse adotado o termo de família HSPB (van Noort; Bisbis *et al.,* 2012).

1.7.1. Small Heat Shock Protein (sHSP ou HSPBs)

Pequenas proteínas de choque térmico (sHSPs) compreendem a mais difundida e, no entanto, não tão conservada família de chaperonas moleculares. As sHSPs estão presentes de procariontes a mamíferos (Arrigo e Mehlen, 1994), nos quais são induzidas sob estresse e estão envolvidas na proteção celular contra o choque térmico e em várias condições ambientais e fisiológicas desfavoráveis (Van Montfort; Slingsby *et al*., 2001; Halsbeck;

Franzmann *et al*., 2005; Acunzo; Katsogiannou *et al*., 2012). Em alguns modelos, sua expressão é regulada por estrógenos e progesterona (Ciocca; Adams *et al.,* 1983) e ainda desempenham um papel fundamental na sobrevivência celular (Halsbeck; Franzmann *et al*., 2005; Acunzo, Katsogiannou *et al.,* 2012).

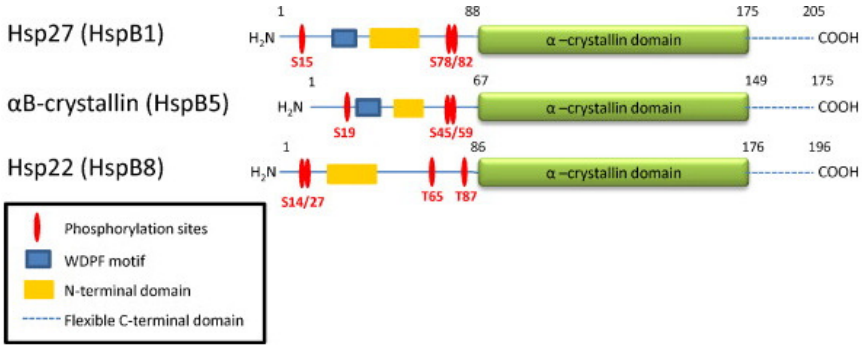


Figura 12. Representação esquemática de estruturas de HSP27, HSP22 e αB-cristalina. Indicação do domínio N-terminal, o domínio flexivel C-terminal, domínio WDPF e o domínio cristalino, tão bem quanto os sítios de fosforilação em Serina (S) e Treonina (T) (adaptado de Acunzo, Katsogiannou *et al.,* 2012).

O genoma humano codifica dez membros da família das sHSPs (HspB1 (Hsp27em humanos, Hsp25 em murinos) – HspB10), com diferenças no tamanho, na sequência e nas regiões N- e C-terminal (Figura 12). No entanto, mantém as seguintes características estruturais e funcionais: baixa massa molecular de 17 a 28,4 KDa; domínio α-cristalino conservado com aproximadamente 90 resíduos; capacidade de formar grandes oligômeros; dinâmica estrutura quaternária e indução por condições de estresse (Acunzo, Katsogiannou *et al.,* 2012).

Ao contrário de outras proteínas de choque térmico, as sHSPs (SHPBs) são chaperonas ATP-independentes, capazes de formar complexos oligoméricos de até 800 KDa, resultado da interação de domínios α-cristalinos de unidades distintas, formando hetero ou homo dímeros, que são a base molecular do complexo oligomérico (Lentze e Narberhaus, 2004; Acunzo, Katsogiannou *et al.,* 2012).

1.7.1.1. Heat Shock Protein 27/25 (HSP27 ou HSPB1)

HSP27 humana, também chamada de HSPB1, HSP25 murina ou HSP28 foi descrita em 1980 quando culturas de células HeLa, cultivadas em alta temperatura, apresentaram a produção de uma desconhecida proteína com peso molecular de 27 KDa (Hickey e Weber, 1982). Sua estrutura primária é altamente homóloga a outros membros da família de sHSP, contendo o conservado domínio α-cristalino e diferindo nas regiões C- e N-terminais (Figura 12).

HSP27 é expresso em todos os tecidos humanos, principalmente em músculo cardíaco, esquelético e liso (Sugiyama; Suzuki *et al*., 2000). Ainda, HSP27 possui atividade chaperona, prevenindo agregação de proteínas parcialmente desnaturadas ou impropriamente dobradas (Bryantsev; Kurchashova *et al.*, 2007).

Entre as vias de morte celular, HSP27 participa principalmente na regulação de apoptose. De fato, HSP27 pode prevenir apoptose por proteção

celular contra choque térmico, efetores de apoptose, estresse oxidativo e isquemia. HSP27 pode também inativar BAX e bloquear a liberação de SMAC e Citocromo-C (Arrigo, 2007; Garrido; Brunet *et al*., 2006).

Jackes Landry e colaboradores (1989) foram os primeiros a demonstrar a relação entre HSP27 e a termorresistência em um estudo de sobrevivência celular. Mais tarde, o efeito citoprotetor desta proteína foi demonstrado contra vários efetores apoptóticos (Mehlen; Schulze-Osthoff *et al*., 1996), que atuam por diferentes vias. Assim, HSP27 age em diversas localizações, com tamanhos oligoméricos e estados de fosforilação distintos, conduzindo a uma orientação negativa da apoptose (Acunzo; Katsogiannou *et al.,* 2012).

A regulação da transcrição de genes de choque térmico é mediada pelo ativador transcricional Heat shock transcription factor (HSTF ou HSF). HSTF1 está constitutivamente localizado no citoplasma e no núcleo de células não estressadas na forma de monômero e sem atividade de ligação com o DNA. Através de um desconhecido sinal gerado durante o estresse, HSTF1 torna-se ativado, localizado no núcleo em estado trimérico, o qual de liga ao DNA (Huang; Nueda *et al.,* 1997).

Existe apenas um relato na literatura sobre o papel de HSP27 nas ilhotas pancreáticas de camundongos (Daí; Patel-Chamberlin *et al.*, 2009). Além disso, nosso laboratório mostrou o aumento da expressão desta proteína em ilhotas pancreáticas humanas na presença de prolactina (Labriola; Ferreira *et al*. 2007). Portanto, neste trabalho nos propusemos

estudar a função da HSP27/25 como uma das proteínas mediadoras dos efeitos benéficos da prolactina. Estabelecemos como modelo celular a linhagem de insulinoma murino MIN6 a mais indicada para estudar os efeitos da prolactina sobre a apoptose, por serem células que possuem um fenótipo bastante similar aquele das células beta normais dos camundongos, bem como, a utilização, fosforilação e o transporte de glicose, assim como a resposta secretória, estão bem caracterizados nesta linhagem celular (Ishihara; Asano *et al.,* 1993). Além disso, a utilização de células MIN6 permite a realização dos experimentos com uma periodicidade maior. Os resultados mais relevantes obtidos no modelo murino estão sendo testados nas células humanas tendo como objetivo final do nosso grupo aumentar a quantidade e a qualidade de células beta humanas disponíveis para o transplante de ilhotas pancreáticas em pacientes com Diabetes do tipo 1.

2. Objetivos

Objetivos

2. 1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é estudar o papel da proteína HSP27/25 nas células beta pancreáticas como uma das proteínas mediadoras dos efeitos benéficos da prolactina (PRL).

2.1.1. Objetivos Específicos

2.1.1.1. Validar o modelo de células de insulinoma MIN6 escolhido para este estudo.

2.1.1.2. Promover o silenciamento de HSP25 em células MIN6 a fim de estudar a função desta proteína na citoproteção induzida por prolactina.

2.1.1.3. Investigar possíveis mecanismos de indução da expressão da HSP27/25 mediados por prolactina.

3. Materiais e Métodos

3.1. Isolamento e cultura primária de ilhotas pancreáticas humanas

Pâncreas humanos de doadores adultos apresentando morte cerebral (idade média 43±2 anos, n=25) foram removidos de acordo com as regulamentações brasileiras e o Comitê de Ética Institucional local (CEP-HU). A Tabela 4 mostra a caracterização dos doadores. As ilhotas pancreáticas foram isoladas após perfusão ductal do pâncreas e digestão tecidual com Liberase HI (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, Estados Unidos) ou Colagenase (NB1 Premium Grade e Protease Neutra NB; Serva Electrophoresis, Heidelberg, Alemanha) de acordo com o método de Ricordi (Ricordi; Lacy *et al.*, 1988) com modificações (Shapiro; Lakey *et al.*, 2000).

A purificação das ilhotas foi realizada utilizando-se um gradiente de densidade contínuo de Ficoll em um processador celular (COBE 2991; Gambro, Lakewood, CO, Estados Unidos). As preparações de ilhotas utilizadas neste estudo (Tabela 4, itens identificados com $^{\#}$), mostraram viabilidade superior a 80% e pureza de 80±2%, como determinado por marcação com Newport Green DCF (NG; Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos), um indicador de Zn^{2+} fluorescente excitável, comumente utilizado para identificar células beta produtoras de insulina de ilhotas pancreáticas humanas, devido ao seu alto conteúdo intracelular de Zn^{2+} (Ichii; Inverardi *et al.*, 2005). A viabilidade celular foi avaliada através do método fluorescente de *live/dead*, baseado na incorporação de diacetato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), pelas

células vivas, ou iodeto de propídeo (PI; Sigma-Aldrich), pelas células mortas.

Após o isolamento, as ilhotas humanas (2.10^4 IEQ por 100 cm^2) foram mantidas em meio CMRL 1066 (5,6 mM de glicose) (Mediatech-Cellgro, Miami, FL, Estados Unidos) suplementado com 100 unidades/mL de penicilina e 5% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas, Brasil) em garrafas de superfície não aderente, em estufa a 37°C, com atmosfera contendo 2,0% de CO_2. Após este período em cultura não aderente, as ilhotas são colocadas em garrafas com tratamento para aderência de células e mantidas também em meio CMRL 1066 (5,6 mM de glicose) contendo 10% de SFB e 100 U/mL de estreptomicina / ampicilina, nas mesmas condições.

O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias. Quando as culturas atingiram 90% de confluência, as células foram destacadas com solução contendo 0,025% de tripsina e 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), lavadas e ressuspendidas em meio fresco. Estas culturas apresentam cerca de 85% de células beta, segundo resultados prévios do laboratório (Maria-Engler; Correa-Giannella *et al.*, 2004; Labriola, Ferreira *et al.*, 2007).

Tabela 4: Informações dos doadores de ilhotas humanas utilizados neste estudo.

Nº do isolamento	Idade	Sexo	IMC (Kg/m2) *	Isquemia fria (h) **	Pureza (%) ***
1	46	F	35	9	60
2 #	48	F	19	7	90
3	49	F	25	8	60
4 #	58	F	25	6	80
5 #	34	M	25	6	80
6 #	57	M	25	21	75
7 #	52	F	23	7	90
8 #	21	M	37	8	80
9	49	M	26	5	60
10	56	F	24	8	95
11 #	33	F	29	9	90
12 #	49	F	24	9	95
13 #	31	F	22	10	80
14	34	F	25	7	60
15	55	M	28	8	90
16	50	F	25	8	90
17	21	M	37	9	80
18 #	34	M	24	6	80
19 #	46	M	21	9	70
20 #	48	F	19	7	80
21	49	F	25	7	60
22	56	F	24	9	95
23	33	F	29	8	85
24	37	M	25	6	95
25	46	F	25	8	85
Média±EPM	43±2		26±1	8±1	80±2

F, feminino M, masculino
* Índice de Massa Corporal
** Período durante o qual o pâncreas foi mantido no gelo, desde o momento em que foi coletado, até omomento do início do isolamento.
*** Porcentagem de ilhotas na massa total de células pancreáticas após o isolamento de ilhotas.

3.2. Cultura de Células MIN6

A linhagem derivada de um insulinoma murino MIN6, responsiva ao aumento de glicose com consequente liberação de insulina (Ishihara, Asano *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 CO_2.

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 1 mM 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 -190°C. Para este estudo foram utilizadas culturas celulares de MIN6 que estavam entre as passagens 8 e 20. Todas as linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram testadas quanto à presença de *Mycoplasma hominis*, por reações de PCR.

3.3. Cultura de Células HEK293T

A linhagem de células 293T, derivada de células embrionárias de rim humano 293 (Human Embryonic Kidney 293 cells (HEK293)), foi mantida em meio de cultura DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Médium) (Life

Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de SFB, 100U/mL de Ampicilina, 100U/mL de Estreptomicina.

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 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), lavadas e ressuspendidas em meio fresco.

3.4. Tratamentos Celulares

Previamente a qualquer tratamento celular, as células provenientes de culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas foram privadas de soro por 24 h em meio CMRL 1066 suplementado com 0,1% SFB. No dia seguinte, as células foram tratadas por 30min com Prolactina humana recombinante (rhPRL) (Pereira; Pouliquen *et al.*, 2001) (200 ng/mL) ou com veículo (construção com o vetor vazio), em meio de cultura CMRL suplementado com 0,5% SFB e incubadas nestas condições por 10min, 30min e 2h (Lawson; Sensui *et al.*, 1982; Sapin; Le Galudec *et al.*, 2001, Labriola; Montor *et al*, 2007).

Previamente a qualquer tratamento celular, as células da linhagem MIN6, derivadas de um insulinoma murino, foram privadas de soro por 24h em meio RPMI suplementado com 0,1% SFB. No dia seguinte, as células foram mantidas nestas condições e pré-tratadas por 30min na presença de veículo ou rhPRL (300 ng/mL) e então incubadas por 30min, 3h, 6h, 9h, 18h, 24h e 48h na presença ou ausência de um coquetel de

citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, 0,8 ng/mL; TNF-α, 8ng/mL; IFN-γ, 4 ng/mL) (Peprotech, Cidade do México, México). Anterior ao tratamento com rhPRL, a via JAK2 foi bloqueada através da pré-incubação das células por 2 h com 1 μM ou 10 μM do inibidor farmacológico específico AG490 (Tocris, Ellisville, MO, Estados Unidos). Células mantidas em meio de cultivo correspondente, suplementado com 10% SFB, foram usadas como controles positivos de viabilidade.

3.5. Extração de RNA

Células da linhagem MIN6 foram plaqueadas e mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB até atingirem 70% de confluência e tratadas como citado no item 3.4. Após este período, os meios das placas foram removidos, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino livre de cálcio ou magnésio (PBSA). A homogeneização foi feita adicionando-se TRIZOL (Invitrogen) (0,7mL/10cm²) a cada placa de cultura, as células foram lisadas através da passagem pela ponteira. Cada amostra foi colocada num tubo, o qual foi incubado a temperatura ambiente por 5min, visando permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. A separação foi feita adicionando-se clorofórmio (0,2mL por 1,0mL de TRIZOL) a cada amostra, mantendo os tubos, primeiro, em agitação por 30 seg, depois, incubando-os a temperatura ambiente por 3min. As amostras foram centrifugadas a 12.000xg por 15min, a 4°C. A fase aquosa, que contém o RNA, foi transferida para novos tubos. A precipitação do RNA foi feita colocando-se

álcool isopropílico (0,5mL por 1,0mL de TRIZOL) a cada amostra e incubando-as por 10min a temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000xg por 10min, a 4°C. Os precipitados contendo o RNA foram lavados com etanol 75%, centrifugados a 7.500xg por 5min, a 4°C, secos a temperatura ambiente, por 15min e ressuspensos em 0,03mL de H_2O DEPC autoclavada, incubando-as a 60°C em Banho Maria.

3.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e de transcriptase reversa (RTPCR) e PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

DNA complementar (cDNA) foi gerado através de amostras de RNA obtidas como descrito em 3.5, após tratamento com DNase, utilizando-se SuperScript (Invitrogen). Os *primers* utilizados para os experimentos de amplificação por qPCR quantitativo foram desenhados utilizando-se o *software* Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) conectado ao termociclador *real-time PCR-system* (Applied Biosystems). As reações de qPCR foram quantificadas utilizando um reagente fluorescente (SYBR Green; Applied Biosystems) (Lekanne Deprez; Fijnvandraat *et al.*, 2002). Todas as reações quantitativas foram realizadas em triplicata (n=4 experimentos independentes). A expressão relativa de um gene alvo foi determinada em comparação a um gene referência, obtida pela fómula (Pfaffl, 2001):

$$\text{ratio} = \frac{Ef_{\text{gene alvo}}^{\Delta Cp_{\text{gene alvo}}}}{Ef_{\text{controle endógeno}}^{\Delta Cp_{\text{controle endógeno}}}}$$

Para cada *primer*, a eficiência do qPCR (Ef) de um ciclo na fase exponencial foi calculada de acordo com a equação:

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$Ef\ (\%) = (Ef-1) \times 100$$

(Rasmussen; Ekelund *et al.*, 2001). Para garantir que os níveis de expressão de mRNA eram devidos a uma amplificação específica, todos os resultados de qPCR utilizados neste trabalho foram considerados apenas quando o limiar de amplificação foi atingido até o ciclo 30. As sequências dos *primers* utilizados estão listadas na Tabela 5.

Tabela 5. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a quantificação da expressão gênica através de ensaios de RT-PCR Quantitativa

Gene	*Seqüência do oligonucleotídeo (5' – 3')*
Bax	F: CAA GAA GCT GAG CGA GTG TC
	R: GAA GTT GCC GTC TGC AAA CA
BCl-2	F: ATG TGT GTG GAG AGC GTC AA
	R: ACA GTT CCA CAA AGG CAT CC
BCl-x_L	F: CAG ACC CAG TGA GTG AGC AG
	R: CCG GTT GCT CTG AGA CAT TT
HSP25	F: CAC TGG CAA GCA CGA AGA AA
	R: GGG TGA AGC ACC GAG AGA TG
HPRT	F: GTC CCA GCG TCG TGA TTA GC
	R: TCA TGA CAT CTC GAG CAA GTC TTT
HMBS	F: GCG GAA GAA AAC GGC TCA A
	R: TCC CGT GGT GGA CAT AGC A

3.7. Ensaio de Western Blot

3.7.1. Obtenção dos extratos proteicos totais

Para obtenção do extrato celular proteico total, inicialmente foi feita a coleta das células por raspagem, a 4°C, da monocamada com PBSA, na presença de uma mistura de inibidores de protease (Amersham Biosciences) e de fosfatase (Sigma). A suspenção celular foi centrifugada a 0,8x g durante 3 min a 4°C, e o precipitado foi ressuspendido 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 a mistura de inibidores de proteases e de fosfatases) a 4°C. Este lisado foi centrifugado a 4°C e 13400xg por 30 min para clarificação. As proteínas presentes no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (kit Bio Rad). O material foi mantido em freezer a -80°C.

3.7.2. Separação de proteínas por eletroforese em gel de acrilamida e transferência para membrana de nitrocelulose ou PVDF

As amostras dos extratos proteicos totais das células estimuladas (ou não) com rhPRL foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida homogêneo (7,5% ou 12%). As amostras 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

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

As proteínas separadas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose ou 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.

3.7.3 Imunorreação

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 4ºC. 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 (tabela 6).

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).

Tabela 6: Lista de anticorpos primários utilizados para detecção de níveis de proteínas por *Western blot (WB)*

	Anticorpo	Empresa
Monoclonal	anti-HSTF-1 (SC-17757)	Santa Cruz Biotechnology*
policlonal	anti-APAF-1 (4452)	Cell Signaling Technology**
monoclonal	anti-Caspase-9 (9508)	Cell Signaling Technology**
monoclonal	anti-Smac-Diablo (2954)	Cell Signaling Technology**
monoclonal	anti-HSP27 F4 (SC-13132)	Santa Cruz Biotechnology*
monoclonal	anti-β-Tubulina (SC-5274)	Santa Cruz Biotechnology*
policlonal	anti-BAX (2772)	Cell Signaling Technology**
policlonal	anti-BCL-2 (2876)	Cell Signaling Technology**
policlonal	anti-$BCLx_L$ (2764)	Cell Signaling Technology**
monoclonal	anti-GAPDH A3 (SC-137179)	Santa Cruz Biotechnology*
monoclonal	anti-JAK2	Santa Cruz Biotechnology*
policlonal	anti-STAT1	BD transduction Laboratories***
monoclonal	anti-pP38(9216)	Cell Signaling Technology**
policlonal	anti-P38 (9212)	Cell Signaling Technology**
monoclonal	anti-α-Tubulina Clone B-5-1-2	T5168; Sigma-Aldrich****

* Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca, USA;
** Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA;
**** BD transduction Laboratories, San Diego, CA, USA;
**** Sigma-Aldrich, St Louis, MO

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)).

Para a análise de fosforilação de tirosina-STAT1, um lisado de células (1mg de proteínas totais) foi incubado com 4µg de anticorpo anti-

STAT1 a 4°C por 18h. Os imunocomplexos foram capturados com proteína A-G agarose (Sigma, St Louis, MO), lavadas por três vezes com solução de lise apropriada. A suspensão foi incubada a 96°C por 10min em tampão de amostra e submetidas a SDS-PAGE com gel de 7,5%. As proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. As proteínas tirosina-fosforiladas foram detectadas por Western blot, usando o anticorpo anti-fosfotirosina Clone PY69 (BD transduction Laboratories), seguida de incubação com anticorpo secundário apropriado, conjugado à peroxidase (horseradish peroxidase) (Vector Laboratories). Como controle, as membranas foram estripadas e reincubadas com anticorpo anti-STAT1. A presença da proteína de interesse foi detectada através de um sistema quimioluminescente (kit ECL Plus™ (GE Healthcare)/ kit Immobilon™ (Millipore)).

3.8. Transdução das células MIN6 com partículas virais contendo o vetor de expressão para o shRNA para HSP25

Para a inibição da expressão de HSP25 foi utilizada a metodologia de RNA de interferência, por meio da transdução de células MIN6 com vetores lentivirais, detentores de sequências shRNA específicas para a inibição desta proteína (Figura 13), seguindo o protocolo descrito por Tiscornia e colaboradores (2006a e b). Uma mistura de três a cinco sequências de shRNA distintas, específicas e validadas pelo fornecedor foram usadas para a inibição de HSP25. Como controle, foram geradas células transduzidas com a sequência de shRNA *scramble -A, -B, -C,-D e*

controle-eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)). Os vetores de expressão para as sequências HSP27 shRNA (m): SC-35598 e shRNA SC-35598A, SC-35598B, SC-35598C e SC- eGFP utilizados, fazem parte do sistema shRNA - Santa Cruz Biotechnology, INC. Os vetores de expressão para a sequência shRNA scramble D fazem parte do sistema Mission® shRNA (Sigma-Aldrich), os vetores estruturais (pMDL, pRev and pVSVG) fazem parte do sistema descrito por Tiscornia e colaboradores (2006 b).

Com este intuito, foram geradas as partículas virais recombinantes, por meio de transfecção da linhagem empacotadora 293T. Para cada uma das construções de interesse, no primeiro dia foram plaqueadas 1 x 10^6 células 293T por poço de 34,8mm de diâmetro, em meio de cultura DMEM 10% Hyclone SFB (Thermo Scientific). Após 24h, trocamos o meio de cultura de cada poço (1,5mL de DMEM 10% Hyclone SFB). Duas soluções foram preparadas: a) em 250µL de meio de cultura DMEM sem soro adicionou-se 3:1µL/µg de DNA de Lp2000 de acordo com o recomendado pelo fabricante (Lipofectamine®2000 Transfection Reagent (Invitrogen)). A solução ficou incubada por 5min a temperatura ambiente. b) em 250µL de meio de cultura DMEM sem soro adiciona-se 0,7µg do vetor estrutural pMDL (0,96µL), 0,275µg do vetor estrutural pREV (0,356µL), 0,385µg do vetor estrutural pVSVG (0,386µL) e 1,1 µg do vetor de interesse. As duas soluções foram misturadas e incubadas por 20min a temperatura ambiente. Após este tempo, 5µL da solução foi adicionada ao respectivo poço com células 293T. Após 5h, o meio de cultura destas células foi trocado por DMEM 10% Hyclone SFB. As coletas de meio foram realizadas

após 24h, 48h, 72h e 96h. As alíquotas foram conservadas em ultrafreezer a -80°C.

Para a infecção da linhagem MIN6 com vírus contendo ou a sequência shRNA-HSP25 ou sequências controle shRNA- *scramble*A, -B,-C, - D e shRNA-*eGFP*, $5x10^4$ células foram plaqueadas, em poços de 6,4mm de diâmetro (triplicata), em meio RPMI contendo 10% SFB com polibreno (brometo de hexadimetrina 10μg/mL). As multiplicidades de infecção (MOI) utilizadas foram: MIN6-shHSP25 4,4, MIN6-sh-*scramble*A 4,6, MIN6sh-*scramble*B 1, MIN6sh-*scramble*C 3,4, de modo que o volume final de cada poço foi de 200μl. As placas foram mantidas na estufa a 37°C durante 18h. Após esse período, foi feita a troca de meio para RPMI 10% SFB. Cerca de 48h após a transdução, as células shRNA *scramble-eGFP* foram observadas ao microscópio de fluorescência e após inspeção visual da proporção de células fluorescentes foi selecionada a melhor condição (20μl) de células transduzidas contendo as partículas virais para a manutenção e expansão das culturas. Estas foram mantidas em cultura até atingirem um número suficiente para congelamento.

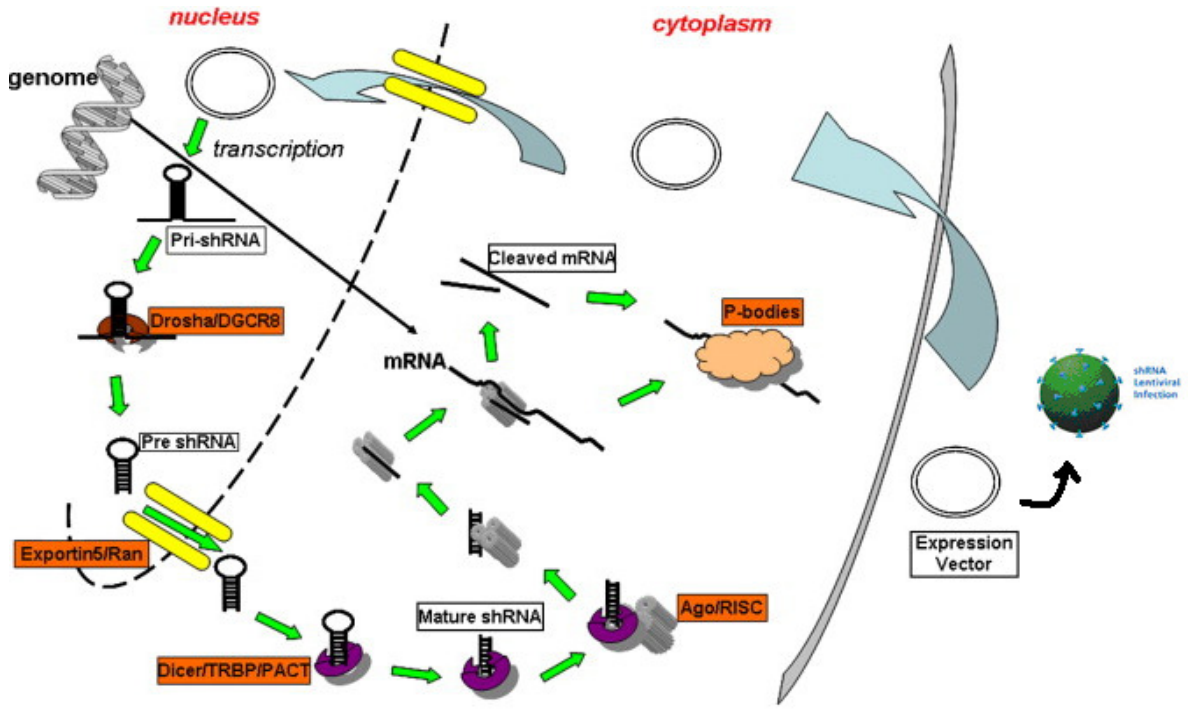


Figura 13: Representação esquemática do processo de infecção celular por vetor lentiviral shRNA e silenciamento de gene alvo. Após a entrega do vetor de expressão de shRNA por lentivirus, no citoplasma, o vetor tem que ser transportado para o núcleo, para a transcrição. As transcrições primárias (pré-shRNA) seguem uma rota semelhante ao descoberto para as transcrições de microRNA. Pré-shRNAs são processados pelos complexos Drosha/DGCR8 e formam pré-shRNAs imaturos. Estes são transportados para o citoplasma, através exportina 5, a são carregados para o complexo Dicer / TRBP / PACT, onde eles são processados, formando shRNA maduros. ShRNA maduro no complexo Dicer / TRBP / PACT são associados com a proteína Argonauta contendo RISC, capaz de fornecer a função da interferência do RNA através de clivagem do mRNA e degradação, ou através da supressão de translação via *p-bodies*. (Adaptado de Rao, Vorhies et al., 2009 e http://www.genengnews.com/gen-articles/next-generation-rna-interference/1321/ acesso em 20/02/2012).

As células MIN6-shRNA-HSP25*, shRNA- scrambleA, -B,- C e - D* foram selecionadas por um mínimo de duas vezes pela adição de 6 µg/mL de puromicina por 6 dias. A escolha desta concentração e tempo do uso de antibiótico foi previamente determinada por meio da exposição das células parentais MIN6 a diferentes concentrações de puromicina (1 a 10 µg/mL).

3.9. Avaliação de fragmentação nuclear por citometria de fluxo

Células MIN6, MIN6-HSP25, MIN6-*scramble*-C foram plaqueadas em poços com 34,8mm de diâmetro e tratadas como mencionado no item 3.4. Posteriormente, o meio de cultura de cada poço foi coletado em tubos, os quais foram centrifugados a 0,4x g por 5min e os sobrenadantes foram descartados. Foi colocado 1,0mL/poço de Versene 10mM, mantidos por 20min em agitação a 4°C e ressuspendidos lentamente. Este meio foi coletado nos respectivos tubos e centrifugado a 0,8xg por 5 min. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e as células do *pellet* foram ressuspendidas em 500μL de PBSA. 500μL de Tampão de Fragmentação (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100, água deionizada (Milli-Q®)) ou não foram acrescentados em cada amostra e estas foram guardadas a 4°C. Antes da análise por Citometria de Fluxo, foi acrescentado Iodeto de Propídeo (PI) (50μg/mL) em cada amotra, sendo que ao menos uma foi utilizada sem marcação a fim de estabelecer o zero no aparelho. Todas as amostras foram filtradas. A fragmentação nuclear foi avaliada pela proporção de células com conteúdo de DNA hipodiplóide.

Todos os experimentos de citometria foram realizados em um citometro de fluxo (FACSAria; BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos) e analisados utilizando-se o software FlowJo (BD Biosciences).

3.10. Ensaios de atividade de Caspase-3 e -8

Aproximadamente $1x10^6$ células MIN6, MIN6-shHSP25 e MIN6-*scramble*C foram coletadas por raspagem da monocamada e manipuladas

para extração proteica como descrito no item 3.4. A atividade de caspase foi quantificada através de um ensaio fluorimétrico utilizando-se substratos específicos (BioVision Research Products, Mountain View, CA, Estados Unidos). As reações foram iniciadas a 37°C, incubando-se 50 µg de proteína total com um substrato específico de caspase (50 µM 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin, Acetyl-L-aspartyl –L-glutamyl-L-valinyl-L-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin [Ac-DEVD-AFC], 50 µM 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin, Acetyl-L-isoleucyl-Lglutamyl-L-threoninyl-L-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin [Ac-IETD-AFC] para caspase-3 e -8, respectivamente), de acordo com instruções do fabricante. A atividade de protease foi avaliada em um comprimento de onda de excitação de 400 nm e um comprimento de onda de emissão de 505 nm, utilizando-se um espectrofluorômetro de placas de 96 poços (Spectra MAX Gemini XS – Molecular Devices). A porcentagem de aumento da atividade de Caspase-3 e -8 foi determinada através da comparação dos resultados com os controles (n≥3 experimentos independentes, realizados em triplicada para cada preparação).

3.11. Análise estatística dos dados

Todos os resultados foram analisados para distribuição gaussiana e passaram o teste de normalidade com o auxílio do programa computacional *GraphPad Prism* versão 5.0. As diferenças estatísticas entre as médias dos grupos experimentados foram testadas através do teste-t de *Student* não pareado de duas caudas com correção de Welch para

diferentes variâncias, quando necessário, ou 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

Resultados

4.1. Validação do modelo celular MIN6

4.1.1. rhPRL protege culturas de células MIN6 de morte induzida por citocinas

Resultados anteriores de nosso laboratório mostraram que rhPRL protege culturas primárias de células beta humanas de morte induzida por privação de soro e por citocinas (Terra; Garay-Malpartida *et al*., 2011). Para identificar os mecanismos envolvidos no processo citoprotetor dos lactogênios utilizamos como modelo a linhagem celular derivada de um insulinoma murino MIN6. Com o intuito de validar se a ação citoprotetora da rhPRL é similar ao observado em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas, nós primeiramente estudamos através de citometria de fluxo, a proporção de núcleos fragmentados em células MIN6, após marcação com PI (50µg/mL). Assim, essas culturas foram carenciadas para soro com 0,1% SFB por 24 h e então pré-tratadas com rhPRL (300ng/mL) ou veículo por 30 minutos e incubadas por 48 horas na presença ou ausência de um coquetel de citocinas pró-inflamatórias (TNFα (8ng/mL), INFγ (4ng/mL) e IL-1β (0,8 ng/mL)). Essa abordagem foi escolhida, uma vez que já foi descrito que a privação de soro, bem como o tratamento com citocinas, induz morte celular principalmente por apoptose nas células beta (Mizuno; Yoshitomi *et al.*, 1998; Ortis; Pirot *et al.*, 2008; Kim e Lee, 2009; Terra; Garay-Malpartida, *et al*., 2011). Como mostrado na Figura 14, células MIN6 tratadas com rhPRL

apresentaram proporção significativamente menor ($p<0,05$) de núcleos fragmentados após o tratamento com citocinas, quando comparado com as células controle (tratamento com SFB 0,1% + citocinas: 42±2; SFB 0,1% + citocinas + rhPRL: 30,4±1) . Ainda, na ausência da incubação com citocinas, células tratadas com rhPRL não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) na proporção de núcleos fragmentados comparado com a situação controle (Figura 14) (tratamento com SFB 0,1%: 31,0±0,4; SFB 0,1% + rhPRL: 27,8 ±0,4).

A fim de validar os resultados mostrados para células beta humanas (Terra; Garay-Malpartida *et al.,* 2011), estudamos se a via sinalização canônica de rhPRL também estaria envolvida na citoproteção de células beta murinas. Para tanto, essas culturas foram carenciadas para soro com 0,1% SFB por 24 h e pré-tratadas com inibidor da via de sinalização canônica da PRL, AG490, por 2h. Posteriormente, foi feito o pré-tratamento com rhPRL (300 ng/mL) ou veículo por 30 minutos e incubadas por 48 horas na presença ou ausência de um coquetel de citocinas (IL-1β - 0,8 ng/mL, TNF-α - 8ng/mL e IFN-γ - 4ng/mL).

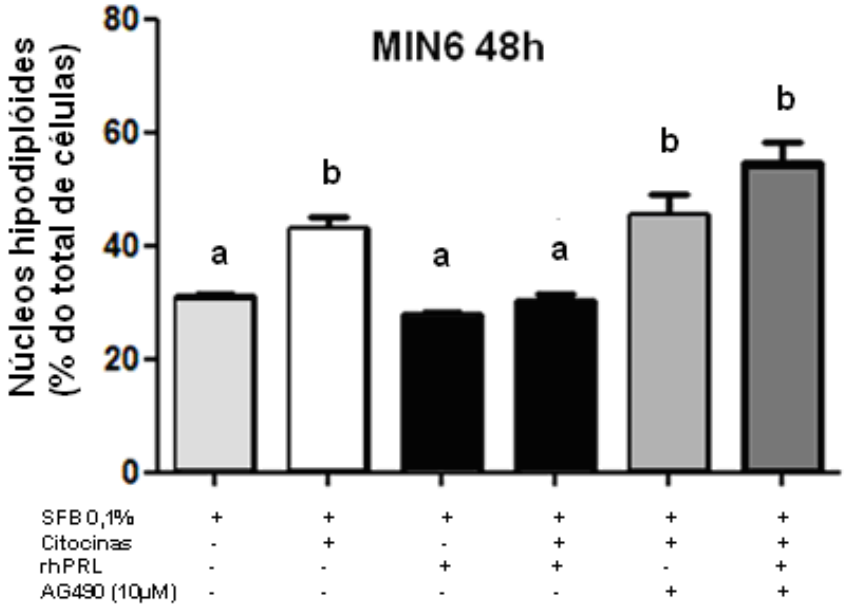


Figura 14: Efeito protetor da rhPRL na morte celular induzida por tratamento com citocinas em células MIN6. As células foram submetidas à privação de soro por 24h, pré-tratadas na ausência ou presença de AG490 (10 μM) por 2h, na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL) por 30min e na presença ou ausência de uma combinação de citocinas (TNFα, 8ng/mL; INFγ, 4ng/mL; IL-1β, 0,8 ng/mL) . 48h após o tratamento, a quantidade de núcleos fragmentados de células MIN6 (células hipodiplóides) foi analisada por citometria de fluxo. Resultados estão apresentados como a média ± EPM; n=5 experimentos independentes. a vs b:$p<0,05$.

A Figura 14 mostra que o bloqueio da ativação de Jak2 pelo seu inibidor farmacológico específico AG490 (10μM) aboliu os efeitos citoprotetores obtidos pelo tratamento hormonal após a incubação com citocinas, em relação a proporção de núcleos fragmentados de células MIN6 (tratamento com SFB 0,1% + citocinas: 42±2; SFB 0,1% + citocinas + rhPRL: 30,4±1; SFB 0,1% + citocinas+rhPRL+AG490: 54±4). Estes resultados confirmam o comportamento similar das células MIN6 ao descrito para células beta humanas.

4.1.2. rhPRL altera a razão entre níveis de expressão de mRNA de genes anti- e pró-apoptóticos da família Bcl2*.*

Uma vez que foi observado o efeito citoprotetor da rhPRL em células MIN6 e que em células humanas a morte se dá principalmente por apoptose, resolvemos não só validar em células MIN6 os resultados mostrados para células beta humanas (Terra; Garay-Malpartida *et al*.,2011), como estudar mais profundamente os níveis de algumas moléculas-chave da via intrínsica de apoptose. Assim, estudamos a razão entre os níveis de mRNA de genes anti/ pró-apoptóticos da família *BCL2* de células beta murinas por RT-PCR quantitativo. A análise foi focada, particularmente, nos genes *Bcl2, Bclx*$_L$ e *Bax.*

Como mostrado na Figura 15 B e D o tratamento hormonal em células MIN6 incubadas com citocinas aumentou significativamente ($p < 0,05$) tanto a relação de mRNA entre *Bcl2/Bax* (tratamento com citocinas: 0,64±0,05; citocinas + rhPRL: 0,9±0,1) como a relação de mRNA entre *Bclx*$_L$*/Bax* (tratamento com citocinas:0,84±0,06; citocinas + rhPRL: 1,1±1). O mesmo não ocorreu com as células mantidas somente sob privação de soro por 48h (Figura 15 A e C).

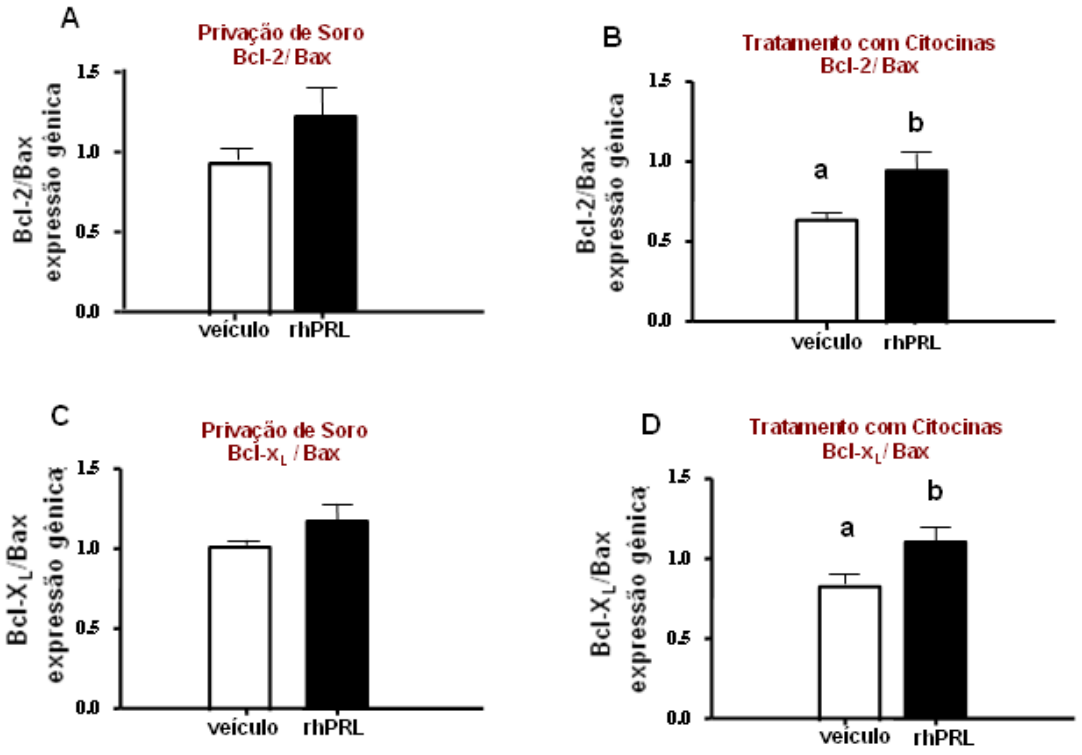


Figura 15: rhPRL aumenta a razão de mRNA entre os membros anti e pró-apoptóticos da família *BCl-2*. Análise quantitativa por RT-PCR de culturas de células MIN6 submetidas (A e C) à privação de soro e (B e D) tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1β (0,8 ng/mL), TNF-α (8ng/mL) e IFN-γ (4ng/mL)), na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL) por 48h. Os resultados são para (A e B) *Bcl2*, (C e D) *Bclx$_L$* e (A-D) *Bax* e estão expressos como a média±EPM (triplicata); n=4 experimentos independentes. a vs. b:p<0,05.

A análise dos resultados por RT-PCR quantitativa mostraram ainda que este efeito foi revertido em culturas tratadas na presença AG490 (10μM), induzidas à morte por uma combinação de citocinas, na presença de rhPRL, tanto para a razão de mRNA entre *Bcl2/Bax,* como para *Bclx$_L$/Bax* (Figuras 16A e 16B respectivamente) (relação *Bcl2/Bax* - citocina:1,02±0,07; citocina+rhPRL: 3±1; citocina+AG490: 1,2±0,3; citocina+AG490+rhPRL:

2,1±0,6. relação *Bclx$_L$/Bax* - citocina:1,01±0,03; citocina+rhPRL: 1,6±0,2; citocina+AG490: 0,98±0,08; citocina+AG490+rhPRL: 0,86±0,06).

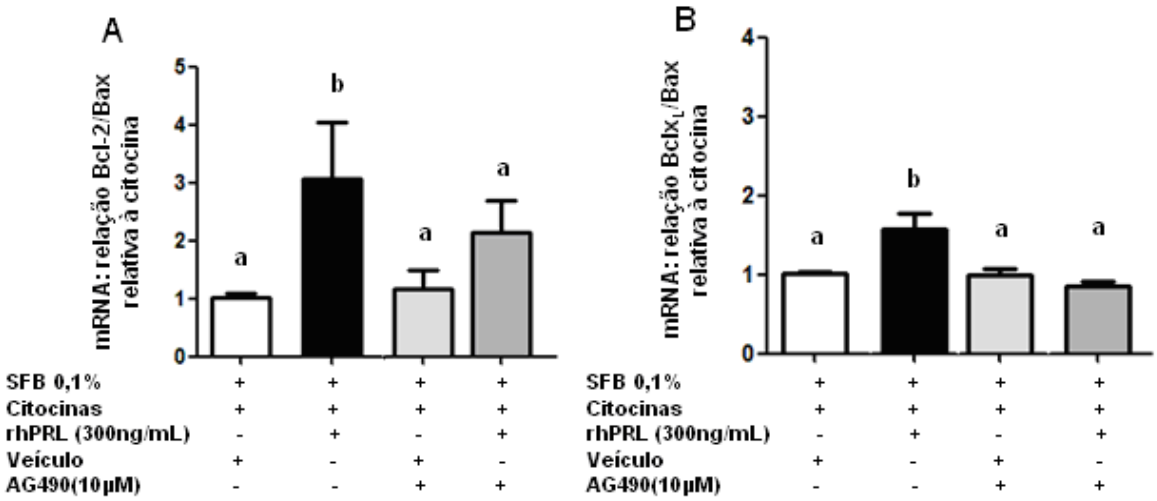


Figura 16: Efeito citoprotetor da rhPRL é perdido na presença do inibidor da via de sinalização canônica do hormônio. Análise quantitativa por RT-PCRq de culturas de células MIN6 sob privação de soro, pré-tratadas na presença ou ausência de AG490 (10µM) por 2h, na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL) por 30min e com uma combinação de citocinas (IL-1β (0,8 ng/mL), TNF-α (8ng/mL) e IFN-γ (4ng/mL)), por 48h. Os resultados são para (A) *Bcl2*, (B) *Bclx$_L$* e (A e B) *Bax* e estão expressos como a média±EPM; n=4 experimentos independentes realizados em triplicata. a vs b:p<0,05 para a diferença comparada com a situação controle, a qual foi fixada em 1.

4.1.3. rhPRL altera os níveis de proteínas anti- pró-apoptóticas favorecendo a inibição de apoptose.

Como não obtivemos aumento de morte celular sob privação de soro em células MIN6, os experimentos foram realizados na presença de uma combinação de citocinas como único estímulo de morte. Assim, culturas de células MIN6 foram carenciadas para soro com 0,1% SFB por 24 h. As culturas foram então pré-tratadas com rhPRL (300ng/mL) ou veículo por 30

minutos e tratadas na presença ou ausência de um coquetel de citocinas. Após 48h foi realizada a extração de proteínas totais.

A proteína antiapoptótica BCL-2 está associada à membrana mitocondrial e é inibidora da ação de proteínas pró-apoptóticas desta mesma família, como BAX e BAK. Os resultados obtidos, por *immunobloting,* mostraram que na presença de rhPRL, a razão dos níveis proteicos de Bcl-2/Bax aumentou em condições de indução à morte por citocinas (Figura 17) (tratamento com veículo: 1,8±0,8; rhPRL: 2,1±0,8; citocinas: 1,9±0,9; citocinas+rhPRL: 9±2).

Além disso, na Figura 18 pode ser observado que na presença de rhPRL, os níveis de expressão das proteínas pró-apoptóticas (A) Bax (citocinas+rhPRL 0,21±0,06 vezes o controle), (B) Smac-Diablo (citocinas+rhPRL 0,5±0,1 vezes o controle) diminuíram significativamente ($p<0,05$) em condições de indução à morte por citocinas na presença de rhPRL.

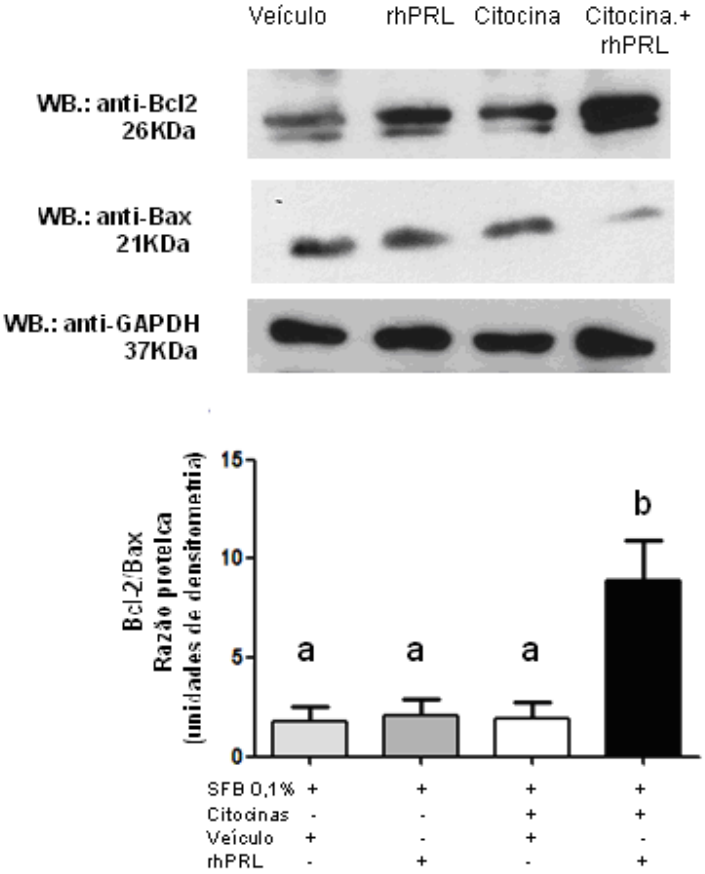


Figura 17: Aumento da relação dos níveis de proteínas anti/pró-apoptóticas, após tratamento com rhPRL. Análise da expressão de Bcl-2 e Bax por *Western Blot,* em cultura de células MIN6 submetidas à privação de soro por 24h e tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1β, 0,8 ng/mL; TNF-α, 8 ng/mL; IFN-γ, 4ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (300 ng/mL) foi realizada após 48 h de tratamento. Os resultados são médias±EPM; n=3 experimentos independentes; a vs. b: $p<0,05$. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. O histograma corresponde a todos os dados e os resultados estão apresentados como unidade arbitrária de densitometria da razão Bcl-2/Bax, após estas proteínas serem independentemente normalizadas pelo conteúdo proteico de GAPDH.

.

O zimógeno de Caspase-9 tem peso molecular de 59KDa. Para ser ativado, duas clivagens são necessárias formando peptídeos de 39 e 37KDa, respectivamente. A Figura 18C mostra que tanto os níveis proteicos, como a ativação de Caspase-9 diminuíram na presença de rhPRL, sob tratamento com citocinas (citocinas+rhPRL 0,07±0,01 vezes o controle).

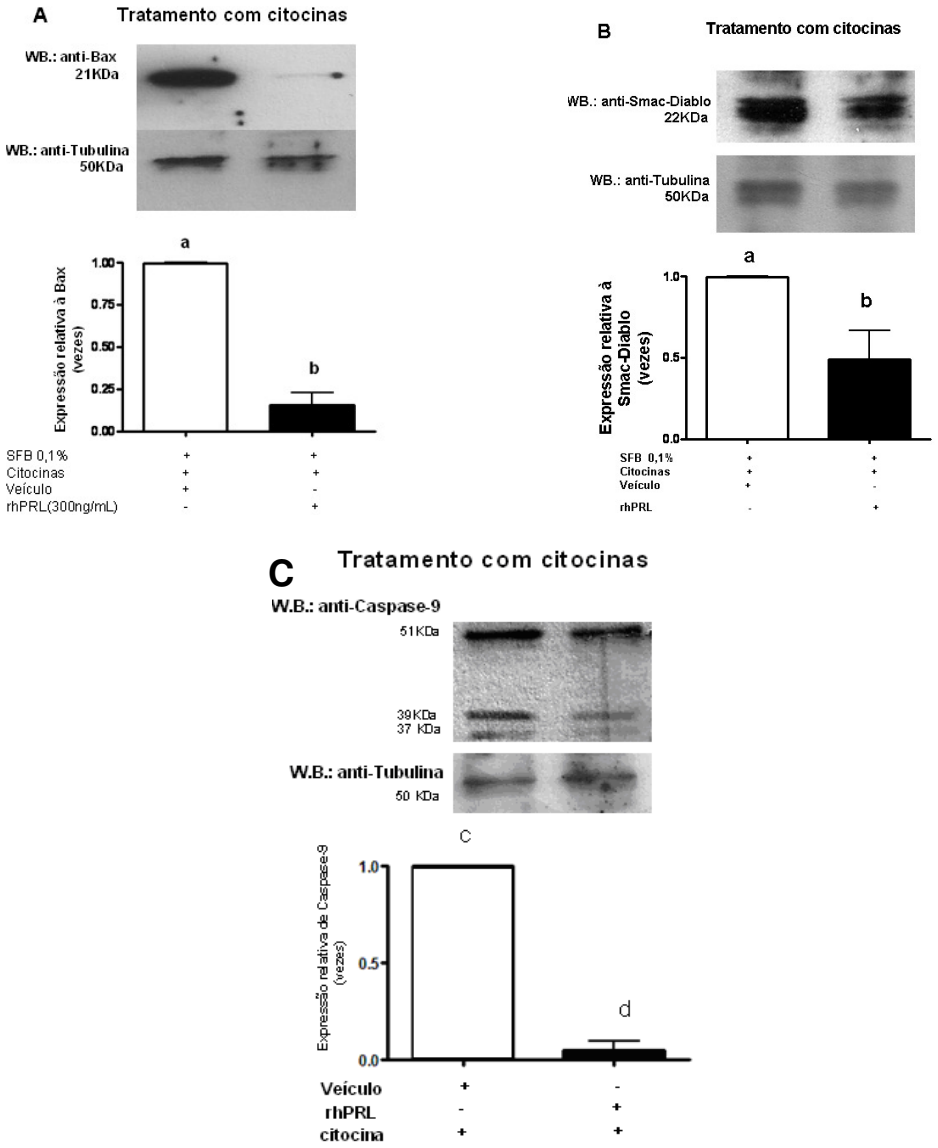


Figura 18: Diminuição dos níveis de proteínas pró-apoptóticas após tratamento com rhPRL. Análise de *Western Blot* de cultura de células MIN6 submetidas à privação de soro por 24h e tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1β, 0,8 ng/mL; TNF-α, 8 ng/mL; IFN-γ, 4ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (300 ng/mL) foi realizada após 48 h de tratamento. A- Bax, B- Smac-Diablo e C- Caspase9. Os resultados são médias±EPM; n=3 experimentos independentes; a vs. b: $p<0,05$ e c vs. d: $p<0,0005$ para diferenças comparadas com a situação controle que foi fixada em 1. Os imunoblots 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 Tubulina.

4.1.4. rhPRL inibe a atividade de Caspase-3 através da via de sinalização canônica do hormônio.

Para aprofundar o entendimento sobre os mecanismos moleculares que estão por trás dos efeitos citoprotetores da rhPRL em células MIN6, foi examinado o efeito desse tratamento na atividade de Caspase-3, enzima central em ambas as vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Assim, culturas de células MIN6 foram carenciadas para soro com 0,1% SFB por 24h e tratadas ou não com um coquetel de citocinas por 30min, 3h, 6h e 9h. Foi feito o controle positivo com células MIN6 em ótimas condições de cultura (10% SFB). A extração de proteínas totais das amostras foi realizada, e a atividade de Caspase-3 foi avaliada segundo o protocolo descrito em Materiais e Métodos 3.10. O pico de atividade de Caspase-3 foi obtido no ponto de 9h (Figura 19). Então, avaliamos o efeito do hormônio e a inibição da via de sinalização deste em células MIN6. Para tanto, as culturas foram pré-tratadas com AG490 (10μM) por 2h. Posteriormente, foi feito o pré-tratamento com rhPRL (300 ng/mL) ou veículo por 30 minutos e incubadas na presença ou ausência de um coquetel de citocinas por 9h. O tratamento com prolactina reduziu significativamente ($p<0,05$) a atividade de Caspase-3 em relação ao controle. Ainda, a Figura 19 mostra que a via de sinalização clássica da prolactina está diretamente envolvida neste fenômeno, uma vez que o bloqueio da ativação de Jak2 por AG490 aboliu os efeitos

citoprotetores obtidos pelo tratamento hormonal (citocina: 170,6±0,7; citocina+rhPL: 103±5; citocina+rhPRL+AG490: 174±8; SFB 10%: 72±2).

Estes resultados mostram que a rhPRL diminuiu a apoptose de células MIN6 murinas através da inibição de Caspase-3. Adicionalmente, a via de sinalização do hormônio ativada é necessária para mediar esse fenômeno.

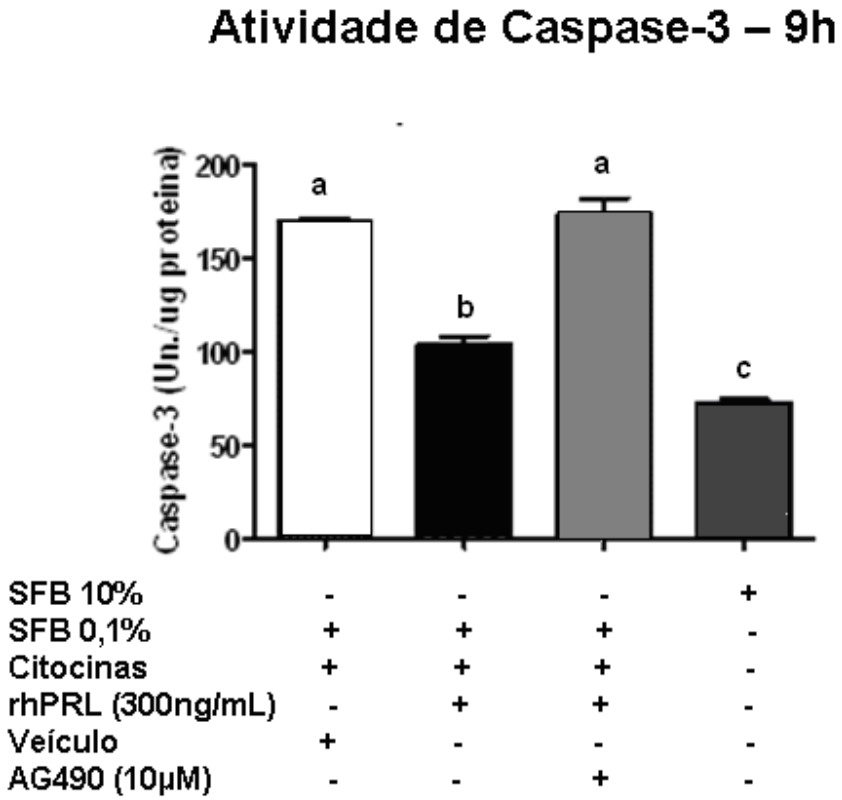


Figura 19: Efeito citoprotetor da rhPRL esta associado à via de sinalização canônica do hormônio. As células foram tratadas com uma combinação de citocinas pró-inflamatórias (TNFα (8ng/mL), INFγ (4ng/mL) e IL-1β(0,8 ng/mL)), na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL) e na ausência ou presença de AG490 (10 μM), carenciadas para soro com 0,1% SFB. Após 9h do tratamento, as células foram coletadas em um tampão apropriado. A atividade de Caspase-3 foi medida por um ensaio fluorimétrico utilizando um substrato específico. Os resultados foram normalizados relativos ao conteúdo proteico total e são médias±EPM; n=5 experimentos independentes; a vs b; a vs c; b vs c: $p<0,05$.

4.1.5. rhPRL altera tanto os níveis de expressão gênica, como proteica de Hsp27/25.

Resultados prévios de nosso laboratório mostraram que a proteína antiapoptótica HSP27 teve os níveis de expressão aumentados em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas quando estas foram carenciadas para soro com 0,1% SFB por 24h e tratadas com rhPRL (300 ng/mL) ou veículo (Labriola; Ferreira *et al*., 2007). Assim, culturas de células MIN6 foram carenciadas para soro com 0,1% SFB por 24h. As células foram pré-tratadas ou não com o AG490 (10μM) por 2h. Posteriormente, foi feito o pré-tratamento com rhPRL (300ng/mL) ou veículo por 30 minutos e a incubação por 48h na presença ou ausência de um coquetel de citocinas (IL-1β - 0,8 ng/mL, TNF-α -8ng/mL, e IFN-γ - 4ng/mL). Foi realizada tanto a extração de mRNA e síntese de cDNA como a extração de proteínas totais das amostras. Resultados por RT-PCR quantitativa mostraram que sob condições de morte induzida por citocinas há aumento significativo da expressão gênica de Hsp25 ($p<0,05$) em relação à cultura de células mantidas em meio de cultura acrescido de 10% SFB (Figura 20A) (tratamento com citocinas:1,00±0,02; SFB10%: 0,4±0,1). No entanto, em culturas de células tratadas com rhPRL, há maior aumento da expressão de Hsp25 (Figura 20A), (tratamento com citocinas: 1,00±0,02; citocinas+rhPRL: 2,5±1), indicando que esta proteína pode estar envolvida no papel citoprotetor derhPRL. Este efeito é revertido quando as células são tratadas na presença

de AG490 (10 μM) (tratamento com citocinas+rhPRL+AG490: 0,9±0,2) (Figura 20A).

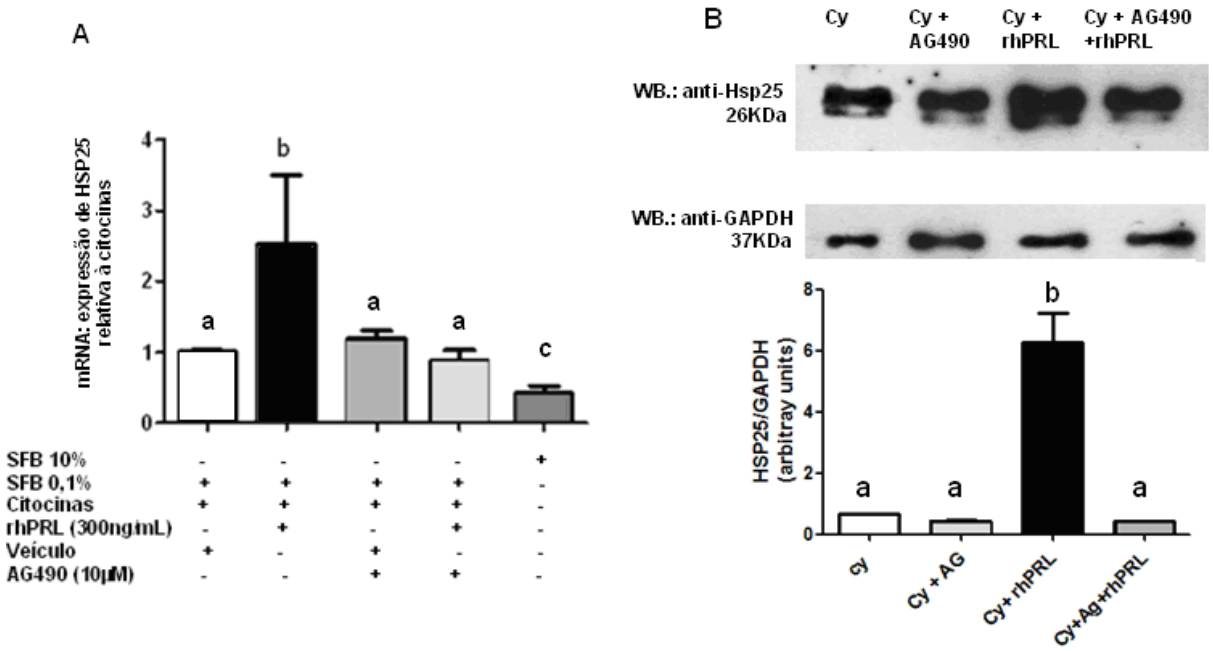


Figura 20: rhPRL promove aumento de expressão de Hsp25. Culturas de células MIN6 pré-tratadas na presença ou ausência de AG490 (10μM) por 2h, na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL) por 30min e com uma combinação de citocinas (IL-1β (0,8 ng/mL), TNF-α (8ng/mL) e IFN-γ (4ng/mL)), por 48h. Foram extraídos mRNAs ou proteínas totais. Os resultados são para Hsp25 e estão expressos como a média±EPM. A-Análise quantitativa por RT-PCRq; n=4 experimentos independentes realizados em triplicata; a vs. b; a vs. c: p<0,05; b vs. c: p <0,05 para a diferença comparada com a situação controle, a qual foi fixada em 1. B- Análise de WB; n=3 experimentos independentes; a vs. b: p<0,05. Os imunoblots 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.

Do mesmo modo, a análise por immunobloting mostrou que células tratadas na presença de rhPRL apresentaram aumento significativo dos níveis proteicos de Hsp25 (p<0,05), sob condição de morte induzida por citocinas (Figura 20B), sendo este efeito revertido com o bloqueio da via de sinalização clássica da PRL por AG490 (10μM), indicando que esta via estaria

envolvida tanto na citoproteção como na regulação de expressão de Hsp25 (tratamento com citocinas: 0,650±0,007; citocinas+ AG490: 0,44±0,04; citocinas+rhPRL:6,3±1,0; citocinas+AG490+rhPRL: 0,418±0,002).

4.2. Estabelecimento do papel de HSP27/25 mediado por rhPRL.

4.2.1. Produção de células MIN6 silenciadas para a proteína Hsp25 (MIN6-shHsp25).

HSP27/25 foi descrita como uma chaperona envolvida em diversos mecanismos de estresse celular. Além disso, exerce função antiapoptótica e está relacionada com processos de citoproteção em diversos modelos. Estudos anteriores de nosso laboratório identificaram HSP27 como uma das proteínas diferencialmente expressa em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas, quando incubadas na presença de rhPRL (300ng/mL) em relação à incubação com veículo (Labriola; Ferreira *et al.,* 2007). Depois de ter confirmado que o modelo das células MIN6 apresenta comportamento similar ao observado nas culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas utilizamos a técnica de RNA de interferência (RNAi) para gerar células MIN6 silenciadas especificamente para a Hsp25.

Para alcançar este objetivo, foram produzidas partículas lentivirais detentoras de vetores recombinantes capazes de expressar sequências de shRNA específicas para a inibição de Hsp25 (MIN6-shHsp25), conforme descrito no item 3.8 dos Materiais e Métodos. Além da infecção com

partículas contendo sequências específicas para Hsp25, também foram gerados quatro tipos celulares (MIN6-scA, MIN6-scB, MIN6-scC e MIN6-scD) infectados com quatro sequências diferentes e independentes de shRNA *scramble*. Apesar de apresentarem a mesma composição de nucleotídeos, em uma ordem aleatória, as sequências *scramble* são incapazes de interagir com qualquer sequência conhecida de RNA mensageiro expresso em camundongos. Ainda, foram geradas células infectadas com sequência específica da proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein* - GFP), a qual funciona como indicador da eficiência da transdução (não mostrado).

A transdução e seleção das linhagens MIN6 com vírus contendo a sequência específica shRNA-Hsp25 e shRNA-*scrambles* A, B, C e D, foram realizadas segundo descrito em Materiais e Métodos 3.8 e as células MIN6 e MIN6 transduzidas foram mantidas em meio RPMI contendo 10% SFB.

Para a confirmação da inibição da expressão de Hsp25, as células MIN6 transduzidas foram mantidas sob privação de soro (0,1%SFB) por 48h. Posteriormente, as proteínas totais foram extraídas e 200µg de extrato proteico foram utilizados em ensaios de *Western blot* das células transduzidas e 100 µg para as culturas parentais. Dessa maneira, verificou-se que em células MIN6-shHsp25 houve uma inibição na expressão desta proteína de 81 ± 3% (n=3 experimentos independentes, $p<0,05$) em relação às células parentais (Figura 21).

Silenciamento de HSP25 - Privação de Soro

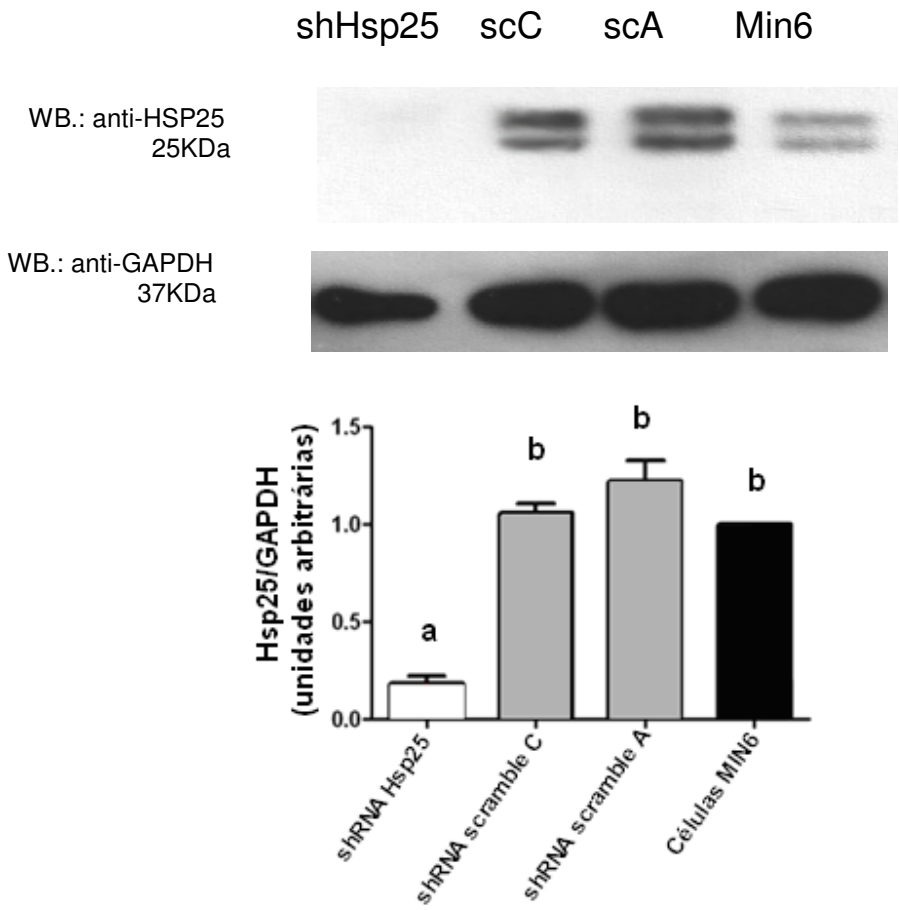


Figura 21: Silenciamento de Hsp25. As células foram mantidas em condições de cultura com privação de SFB por 48h. Os níveis proteicos de HSP25 foram detectados por *Western blot*. Foram utilizados 200µg de proteínas totais extraídas de células MIN6-shHSP, MIN6-*scrambles* A e C, e 100µg de proteínas totais das células controle MIN6 não transduzidas. Os i*munoblots* 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:$p<0,05$.

Esta inibição foi ainda maior em relação às células controle MIN6-scA e MIN6-scC (Figura 21) (MIN6-shHsp25: 0,18±0,04; MIN6-scC: 1,06±0,05; MIN6-scA: 1,2±0,1; MIN6: 1,000±0,0002). Desta forma, nos ensaios de

citometria de fluxo, RT-PCR quantitativo, *Western blot* e atividade de Caspases realizados a seguir, foram utilizadas as culturas celulares MIN6-shHsp25 obtidas e mantidas nas condições de cultura descritas previamente. Como entre MIN6-scA e MIN6-scC não se verificou diferença estatística decidimos usar como controle para os experimentos realizados a seguir, as células parentais e MIN6-scC.

4.2.2. O efeito citoprotetor de rhPRL é perdido na ausência de Hsp27/25.

A fim de verificar o papel antiapoptótico da proteína Hsp25 e sua relação com o papel citoprotetor do hormônio rhPRL em células beta pancreáticas, células MIN6, MIN6-scC e MIN6-shHSP25 foram carenciadas para soro com 0,1% SFB por 24 h. As culturas foram então pré-tratadas na ausência ou na presença de AG490 (10μM) por 2h. Posteriormente, foi feito o tratamento com rhPRL (300 ng/mL) ou veículo por 30 minutos e incubadas por 18h e 24h na presença ou ausência de uma combinação de citocinas (IL-1β (0,8 ng/mL), TNF-α (8ng/mL) e IFN-γ (4ng/mL)). Então foi feita a análise de ensaios de citometria de fluxo de cinco experimentos independentes, com os núcleos fragmentados marcados com PI.

Nas Figuras 22 e 23, não foram observados, em células silenciadas para a proteína HSP25 (MIN6-shHsp25) os efeitos citoprotetores induzidos por rhPRL, tanto após 18h (Figura 22C; Tabela 7) como após 24h da

indução de morte (Figura 23C; Tabela 8). Além disso, este efeito foi observado após 18h de indução à morte, permanecendo após 24h, tanto em células MIN6 (Figuras 22A e 23A; Tabelas 7 e 8, respectivamente), como nas culturas de MIN6-scC (Figuras 22B e 23B; Tabelas 7 e 8, respectivamente) que apresentaram uma proporção significativamente menor ($p<0,05$) de núcleos fragmentados quando tratadas com rhPRL e comparadas com culturas controles.

Tabela 7: % de Núcleos Hipodiplóides: Tratamento de 18h

	MIN6	MIN6-scC	MIN6-shHSP25
0,1% SFB	21±2	31±3	23±2
0,1% SFB+citocinas	47±3	59±5	43±3
0,1% SFB+citocinas+rhPRL	33±3	43±2	50±4
0,1%SFB+citocinas+AG490	47±3	57±3	35±1
0,1%SFB+citocinas+AG490+rhPRL	45±6	59±2	40±2

Os valores apresentados estão expressos como Média±EPM.
n=5 experimentos independentes

Tabela 8: % de Núcleos Hipodiplóides: Tratamento de 24h

	MIN6	MIN6-scC	MIN6-shHSP25
0,1% SFB	28±1	38±3	23±1
0,1% SFB+citocinas	46±1	61±1	51±3
0,1% SFB+citocinas+rhPRL	35±3	36±4	47±2
0,1%SFB+citocinas+AG490	46±1	54±3	40±2
0,1%SFB+citocinas+AG490+rhPRL	45±2	57±2	33±3

Os valores apresentados estão expressos como Média±EPM.
n=5 experimentos independentes.

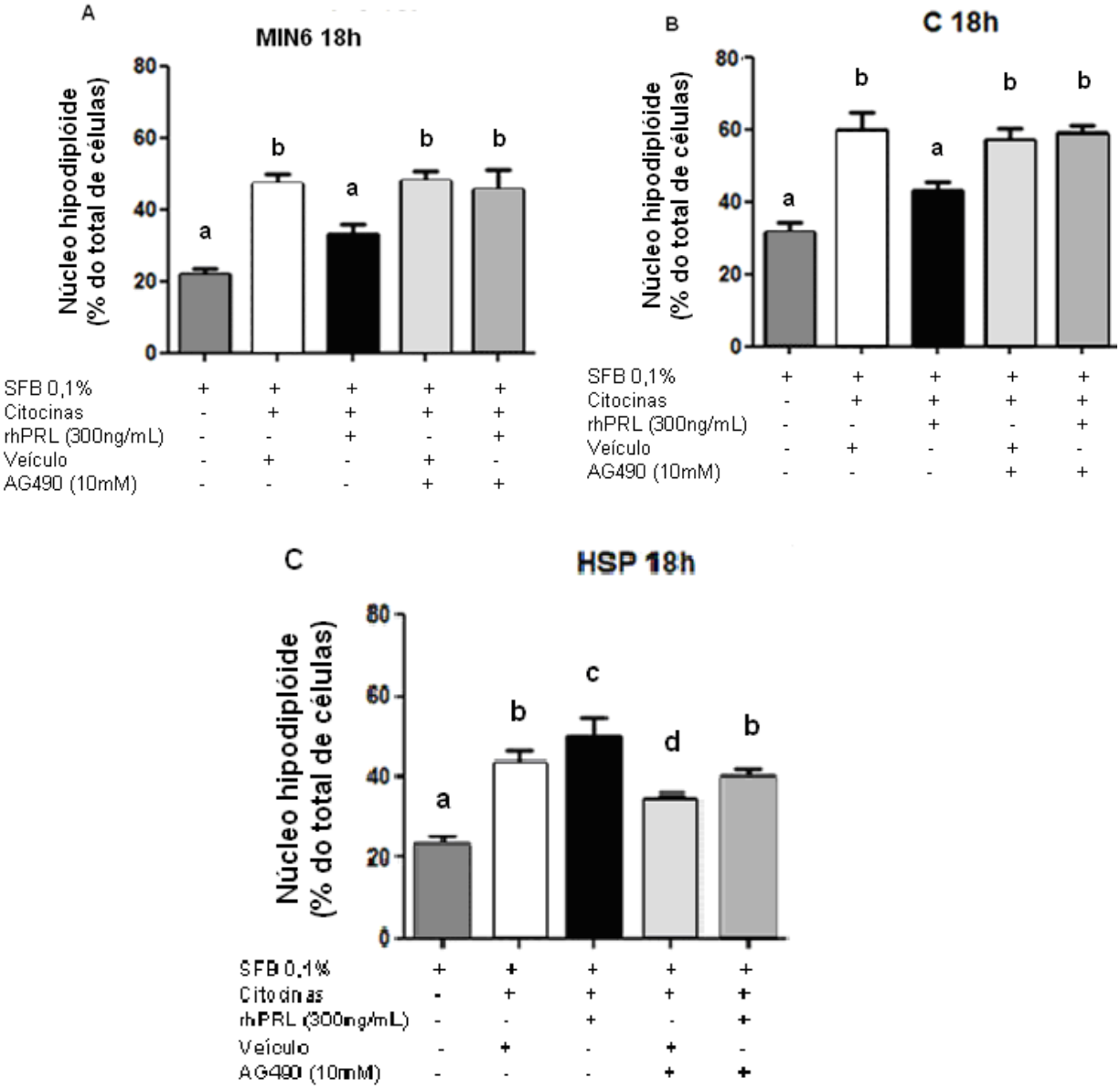


Figura 22: Efeito citoprotetor da rhPRL em células MIN6 é perdido após 18h de tratamento com citocinas em células silenciadas para a proteína Hsp25. A porcentagem de células apresentando o conteúdo hipodiplóide de DNA foi analisada por citometria de fluxo. As células foram tratadas por 18h, com citocinas TNFα (8ng/mL), INFγ (4ng/ML) e IL-1β(0,8 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL) e ausência ou presença de AG490 (inibidor farmacológico de JAK2) (10 μM). Resultados estão apresentados como a média ± EPM; n=5 experimentos independentes. A – Células MIN6. a vs. b:p<0,05**.** B - Células MIN6C. a vs. b:p<0,05. C – Células MIN6- HSP25 silenciadas. a vs. b, a vs. c, a vs. d:p<0.05. c vs.d:p<0,05. Os respectivos tratamentos estão indicados na tabela.

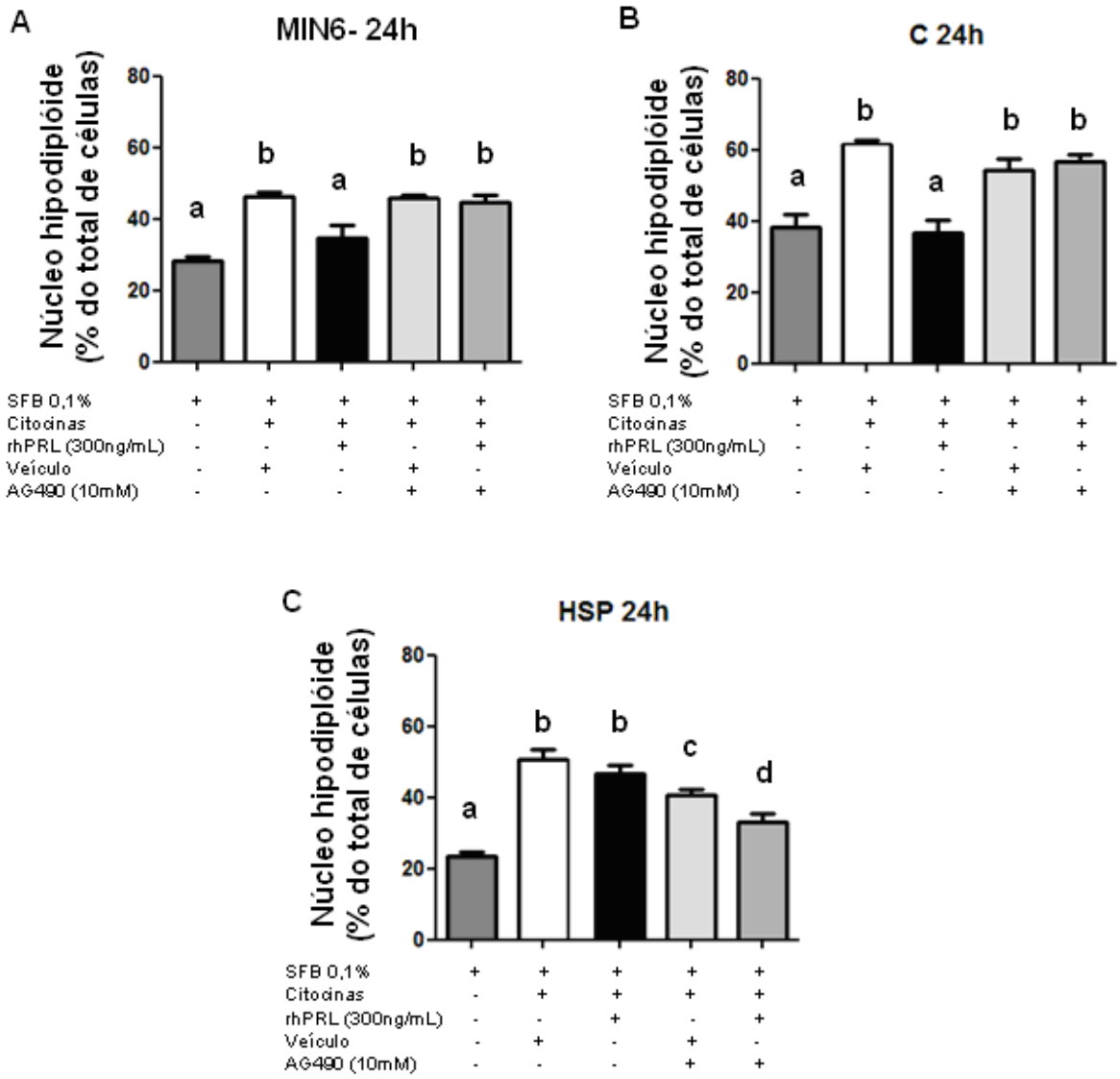


Figura 23: Efeito citoprotetor da rhPRL em células MIN6 permanece perdido após 24h de tratamento com citocinas em células silenciadas para a proteína Hsp25. A porcentagem de células apresentando o conteúdo hipodiplóide de DNA foi analisada por citometria de fluxo. As células foram tratadas por 24h, com citocinas TNFα (8ng/mL), INFγ (4ng/ML) e IL-1β(0,8 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL) e ausência ou presença de AG490 (inibidor farmacológico de JAK2) (10 μM). Resultados estão apresentados como a média ± EPM; n=5 experimentos independentes. A – Células MIN6. a vs.b:p<0,05. B - Células MIN6C. a vs. b:p<0,05. C – Células MIN6- HSP25 silenciadas. a vs.b, a vs.c:p<0,05; b vs. d:P<0,05. Os respectivos tratamentos estão indicados na tabela.

Estes resultados mostraram, ainda, que o bloqueio da ativação de Jak2 aboliu os efeitos citoprotetores induzidos pela rhPRL após o tratamento de 18h com citocinas, em relação à proporção de núcleos fragmentados, tanto de células MIN6 (Figura 22A; Tabela 7), como em MIN6-scC (Figura 22B; Tabela 7) e este efeito permaneceu abolido após 24h da indução da morte celular em ambos os tipos celulares (Figura 23A e B; Tabela 8). Estes resultados demonstram a importância de Hsp25 na citoproteção de células beta, ao menos em tempo de até 24h após a indução de morte.

4.2.3. Hsp27/25 regula os níveis das proteínas pró- e antiapoptóticas da família BCL-2.

Com o intuito de estudar os mecanismos moleculares envolvidos no efeito citoprotetor de rhPRL e sua relação com a proteína HSP27/25, foram verificados por Western *blot* os níveis das proteínas antiapoptóticas Bcl-2, e $Bclx_L$ e da proteína pró-apotótica Bax. Para tanto, culturas de células MIN6, MIN6-scC e MIN6-shHsp25 foram carenciadas para soro com 0,1% SFB por 24 h. As células foram pré-tratadas ou não com o AG490 (10μM) por 2h. Posteriormente, foi feito o pré-tratamento com rhPRL (300ng/mL) ou veículo por 30 minutos e a incubação por 24h na presença ou ausência de um coquetel de citocinas, e então, foi realizada a extração de proteínas totais.

A Figura 24 mostra que não houve mudança significativa na razão dos níveis proteicos de $Bclx_L$ /Bax em culturas silenciadas para HSP25, tratadas

com rhPRL e posteriormente induzidas à morte por citocinas (D). No entanto, tanto em culturas MIN6 (A), como MIN6-scC (B), esta razão aumentou significativamente ($p<0,05$) (Tabela 9). Em ambas as células controle, após a inibição da via hormonal com AG490, esta proporção retornou a níveis similares aos controles (Figura 24A e B; Tabela 9).

Tabela 9: Razão entre a expressão proteica anti/pró-apoptótica $Bclx_L$/Bax.

Tratamentos\Tipos Celulares	*MIN6*	MIN6-scC	MIN6-shHSP25
0,1% SFB	0,9±0,2	1,6±0,2	1,87±0,08
0,1% SFB+citocinas	0,3±0,1	0,28±0,09	0,23±0,01
0,1% SFB+citocinas+rhPRL	18 ±1	23±3	0,30±0,01
0,1%SFB+citocinas+AG490	0,8±0,1	1,72±0,02	1,0±0,1
0,1%SFB+citocinas+AG490+rhPRL	0,4±0,2	2,8±0,1	1,3±0,2

Os valores apresentados estão expressos como Média±EPM.
n=3 experimentos independentes.

Como vimos anteriormente, em células MIN6, na presença de rhPRL, a razão dos níveis proteicos de Bcl-2/Bax aumentou em condições de indução à morte por um coquetel de citocinas por 48h (Figura 17). A Figura 24C mostra que este comportamento se repete em culturas de MIN6-scC e que o tratamento com AG490 reverte a citoproteção relacionada à presença do hormônio ($p<0,05$) (Tabela 10). Em culturas de MIN6-shHSP25, rhPRL parece restabelecer o padrão das células controle sob privação de soro (Figura 24E). No entanto, se compararmos os tipos celulares MIN6-scC e MIN-shHSP, percebemos que o silenciamento de HSP25 reverte o efeito

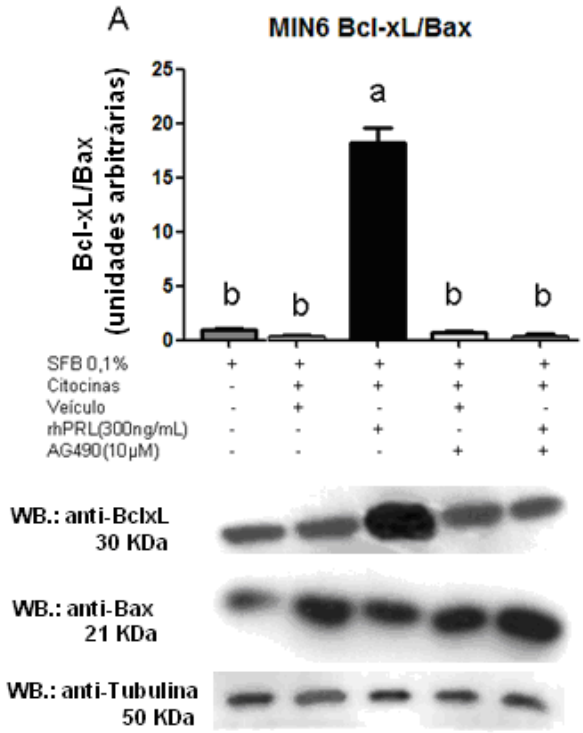
citoprotetor promovido pelo hormônio, responsável pelo aumento da razão anti/pró-apoptótica em células não silenciadas (Tabela 10).

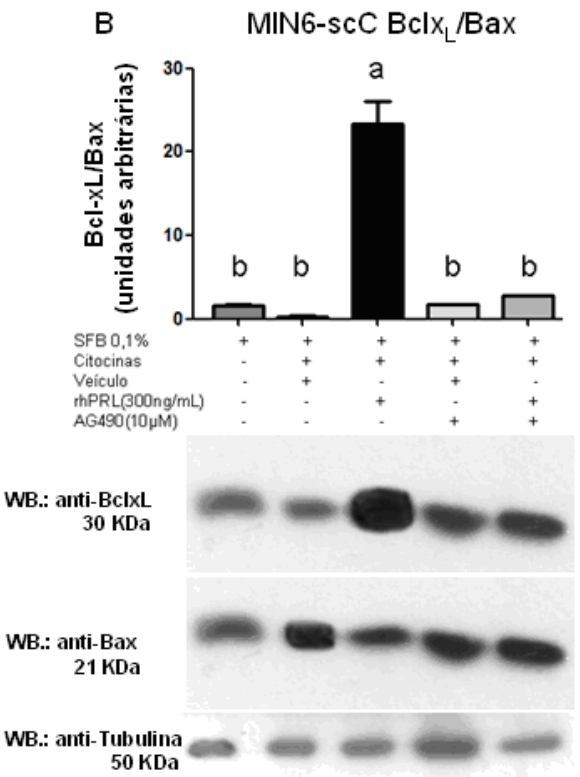
Tabela 10: Razão entre a expressão proteica anti/pró-apoptótica Bcl-2/Bax.

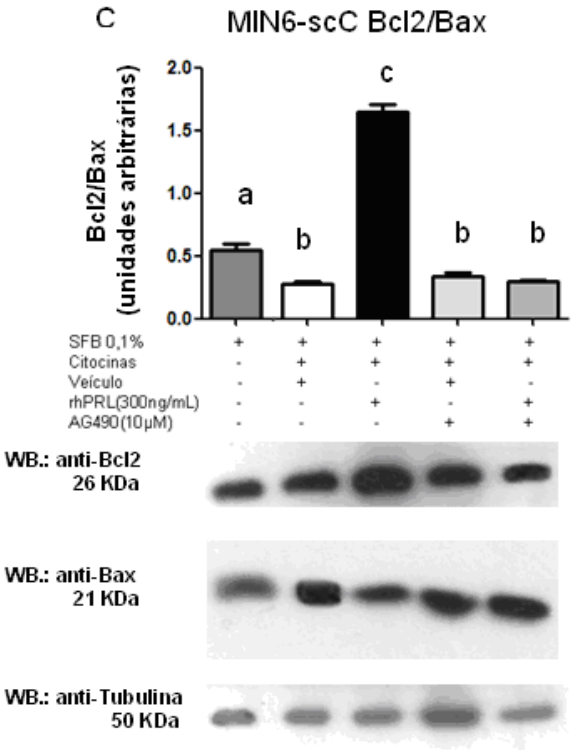
Tratamentos\Tipos Celulares	MIN6-scC	MIN6-shSP25
0,1% SFB	0,54±0,05	0,30±0,03
0,1% SFB+citocinas	0,28±0,02	0,17±0,01
0,1% SFB+citocinas+rhPRL	1,64±0,06	0,43±0,06
0,1%SFB+citocinas+AG490	0,33±0,04	0,47±0,08
0,1%SFB+citocinas+AG490+rhPRL	0,29±0,01	0,45±0,03

Os valores apresentados estão expressos como Média±EPM.
n=3 experimentos independentes.

Estes resultados em conjunto mostraram que a presença de Hsp25 é importante na regulação de membros da família Bcl2 em células beta, e que esta proteína contribuiria para a inibição da via intrínseca da apoptose.







*continua na próxima página

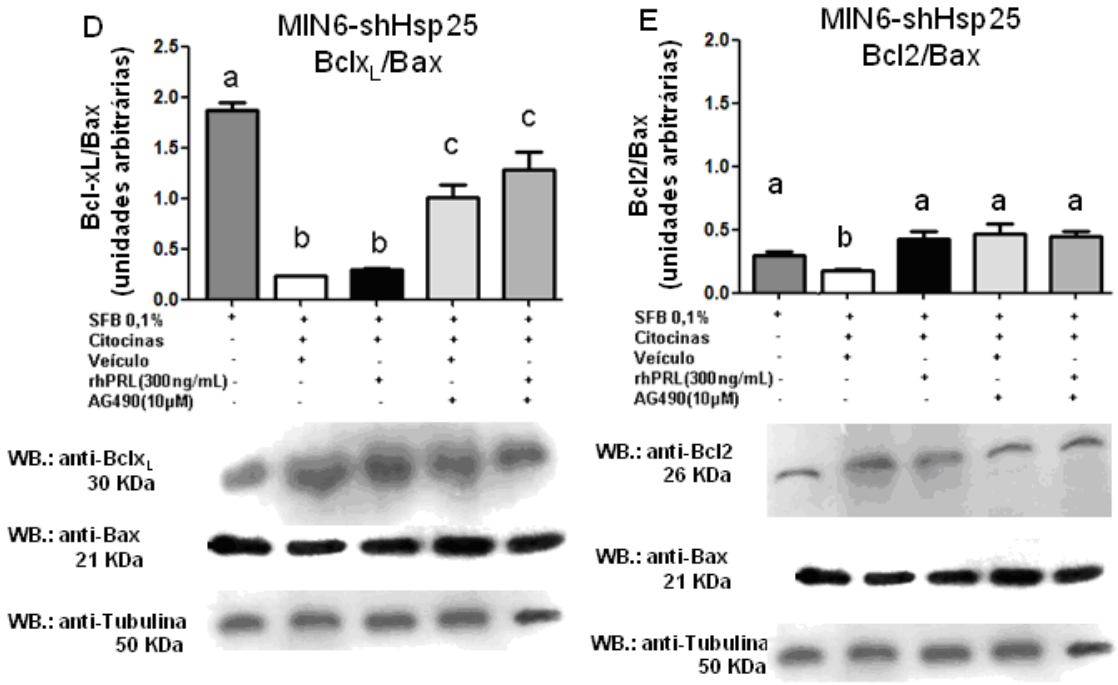


Figura 24: O balanço de proteínas anti/pró-apoptóticas não são reguladas por rhPRL após o silenciamento de HSP25. As células foram tratadas por 24h, com citocinas TNFα (8ng/mL), INFγ (4ng/ML) e IL-1β(0,8ng/mL), na presença ou ausência de rhPR (300ng/mL) e ausência ou presença de AG490 (10 μM). Os níveis proteicos de Bcl-2, $Bclx_L$ e Bax foram detectados por Western *blot*. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. O histograma corresponde a todos os dados e os resultados estão apresentados como unidade arbitrária de densitometria da razão Bcl-2/Bax (B e D) e $Bclx_L$ (A, C e E) após a normalização pelo conteúdo proteico de Tubulina. Os resultados estão apresentados como a média±EPM; n=3 experimentos independentes. A- células MIN6- $Bclx_L$ /Bax. a vs. b; $p<0,05$. B- Células MIN6-scC- $Bclx_L$ /Bax. a vs. b; $p<0,05$. C- células MIN6-scC- Bcl-2/Bax. a vs. b, a vs. c; $p<0,05$. b vs. c; $p<0,05$. D- MIN6-shHSP25 - $Bclx_L$/Bax. a vs. b, a vs. c; $p<0,05$. b vs. c; $p<0,05$. E – MIN6-shHSP25 – Bcl-2/Bax. a vs. b; $p<0,05$.

4.2.4. Hsp27/25 participa da regulação da cascata de Caspases em células beta.

A fim de estudar se o silenciamento de HSP25 estaria modulando os níveis proteicos de Caspase-9, uma caspase iniciadora da cascata que atua pela via intrínseca e está à jusante dos efeitos provocados pelo balanço de expressão e ativação de membros da família BCL-2, foram utilizados extratos proteicos de células MIN6, MIN6-scC e MIN6-shHsp25 sob privação de soro (0,1% SFB), pré-tratadas ou não com o AG490 (10μM) por 2h, e posteriormente, na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL) ou veículo por 30 minutos e incubadas por 24h na presença ou ausência de um coquetel de citocinas.

Os resultados mostrados na Figura 25 evidenciam que o silenciamento de HSP25 bloqueou a diminuição dos níveis de Caspase-9 induzidos pela rhPRL (C) observados tanto em células MIN6 (A), como em células MIN6-scC (B) após o tratamento de 24h com citocinas (Tabela 11).

Ainda, a Figura 25 mostrou que o bloqueio da ativação da via de sinalização clássica da prolactina reverteu o efeito de citoproteção do hormônio observado tanto em cultura de MIN6 (A), como em MIN6-scC (B) (Tabela 11).

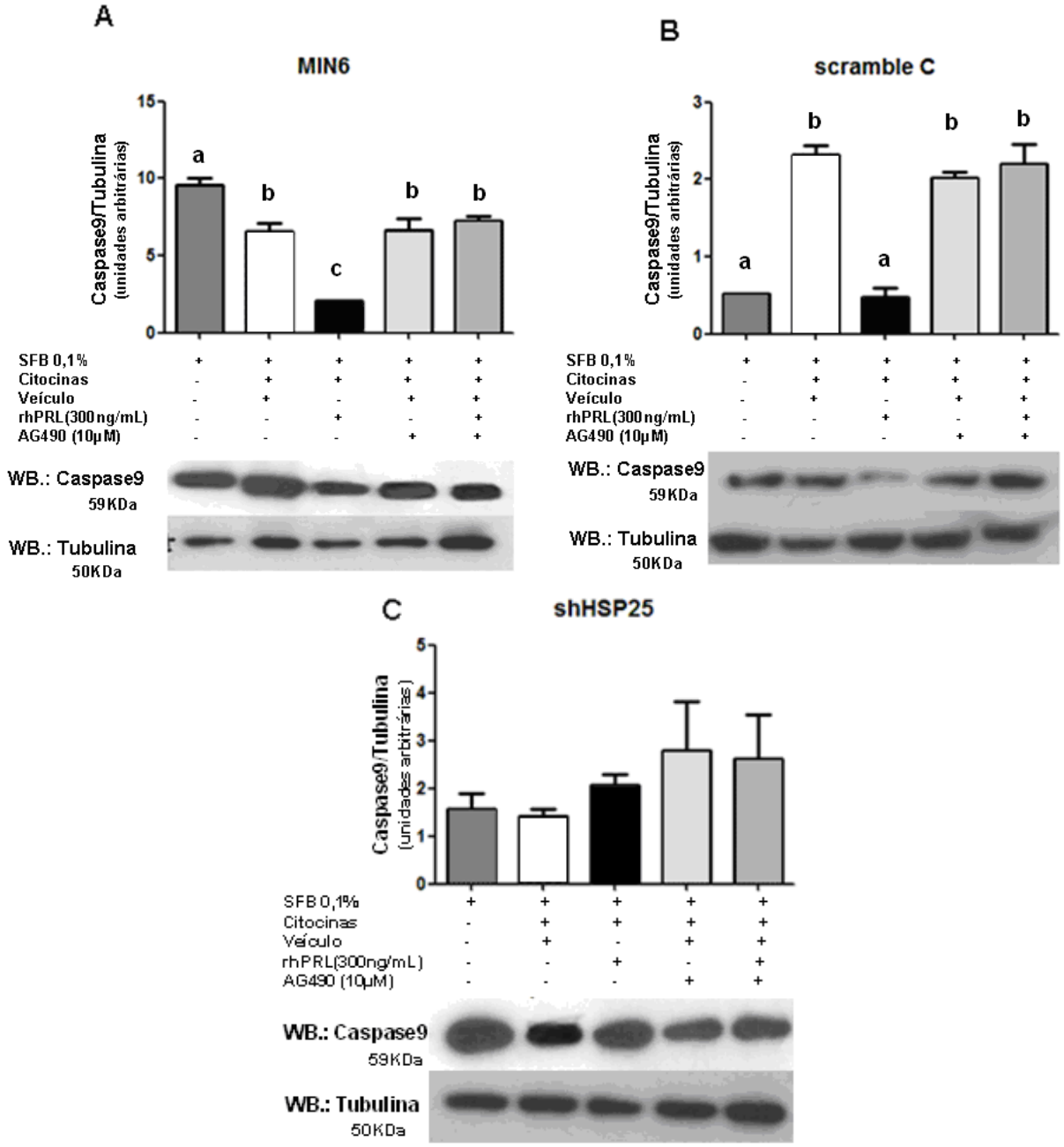


Figura 25: Proteínas pró-apoptóticas não são reguladas por rhPRL com a inibição de HSP25. As células foram tratadas por 24h, com citocinas TNFα (8ng/mL), INFγ (4ng/ML) e IL-1β(0,8ng/mL), na presença ou ausência de rhPR (300ng/mL) e ausência ou presença de AG490 (10 μM). Os níveis proteicos de Caspase 9 foram detectados por Western blot. Os imunoblots 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 Tubulina. Os resultados estão apresentados como a média ± EPM; n=3 experimentos independentes. A- células MIN6 . a vs. b; a vs. c:p<0,05; b vs. c:p<0,05. B- células MIN6C. a vs. b:p<0,05. C- Células MIN6-shHSP25.

Tabela 11: Razão entre a expressão proteica de Caspase-9/Tubulina.

Tratamentos\Tipos Celulares	*MIN6*	MIN6-scC	MIN6-shHSP25
0,1% SFB	9,6±0,5	0,52±0,01	1,6±0,3
0,1% SFB+citocinas	6,5±0,6	2,3±0,1	1,4±0,2
0,1% SFB+citocinas+rhPRL	2,05±0,05	0,5±0,1	2,1±0,2
0,1%SFB+citocinas+AG490	6,6±0,8	2,02±0,08	3,0±1
0,1%SFB+citocinas+AG490+rhPRL	7,3±0,3	2,2±0,3	2,6±0,9

Os valores apresentados estão expressos como Média±EPM
n=3 experimentos independentes.

Para reforçar nossa hipótese, repetimos os tratamentos acima descritos em cultura de células MIN6, MIN6C e MIN6-shHSP25, extraímos as proteínas totais das amostras em tampão apropriado, após 30min, 3h, 6h, 9h e 18h de indução á morte e foi examinado o efeito deste tratamento na atividade de Caspase-8, envolvida na via extrínseca da apoptose. Ainda, a atividade de Caspase-3, enzima central em ambas as vias induzidas na apoptose, também foi avaliada. O pico de atividade tanto de Caspase-8, como de Caspase-3 foi observado após 9h de indução à morte pela combinação de citocinas utilizada.

Como mostrado na Figura 26 e Tabela 12, em células MIN6-shHSP25, sob morte induzida por 9h, na presença de rhPRL, não houve inibição da atividade de Caspase-8 (C), contrariamente ao observado tanto em culturas de MIN6 (A), como em MIN6-scC (B), mostrando que a presença de Hsp25 é importante para regular a ativação desta proteína, participando assim, na

inibição da via extrínseca da apoptose. Ainda, podemos observar que o inibição da ativação de JAK2 por AG490 aboliu os efeitos citoprotetores obtidos pelo tratamento hormonal, em relação à atividade de caspase-8, tanto em cultura de células MIN6 (A), como em cultura de células MIN6-scC (B) (Tabela 12).

Tabela 12: Atividade de Caspase-8.

Tratamentos\Tipos Celulares	*MIN6*	MIN6-scC	MIN6-shHSP25
0,1% SFB	80±3	83±3	83±3
0,1% SFB+citocinas	113±6	99,7±1,0	103±3
0,1% SFB+citocinas+rhPRL	75±2	84±2	102±3
0,1%SFB+citocinas+AG490	98±4	100±1	98±3
0,1%SFB+citocinas+AG490+rhPRL	98±4	107±4	100±2

Os valores apresentados estão expressos como Média±EPM
n=3 experimentos independentes.

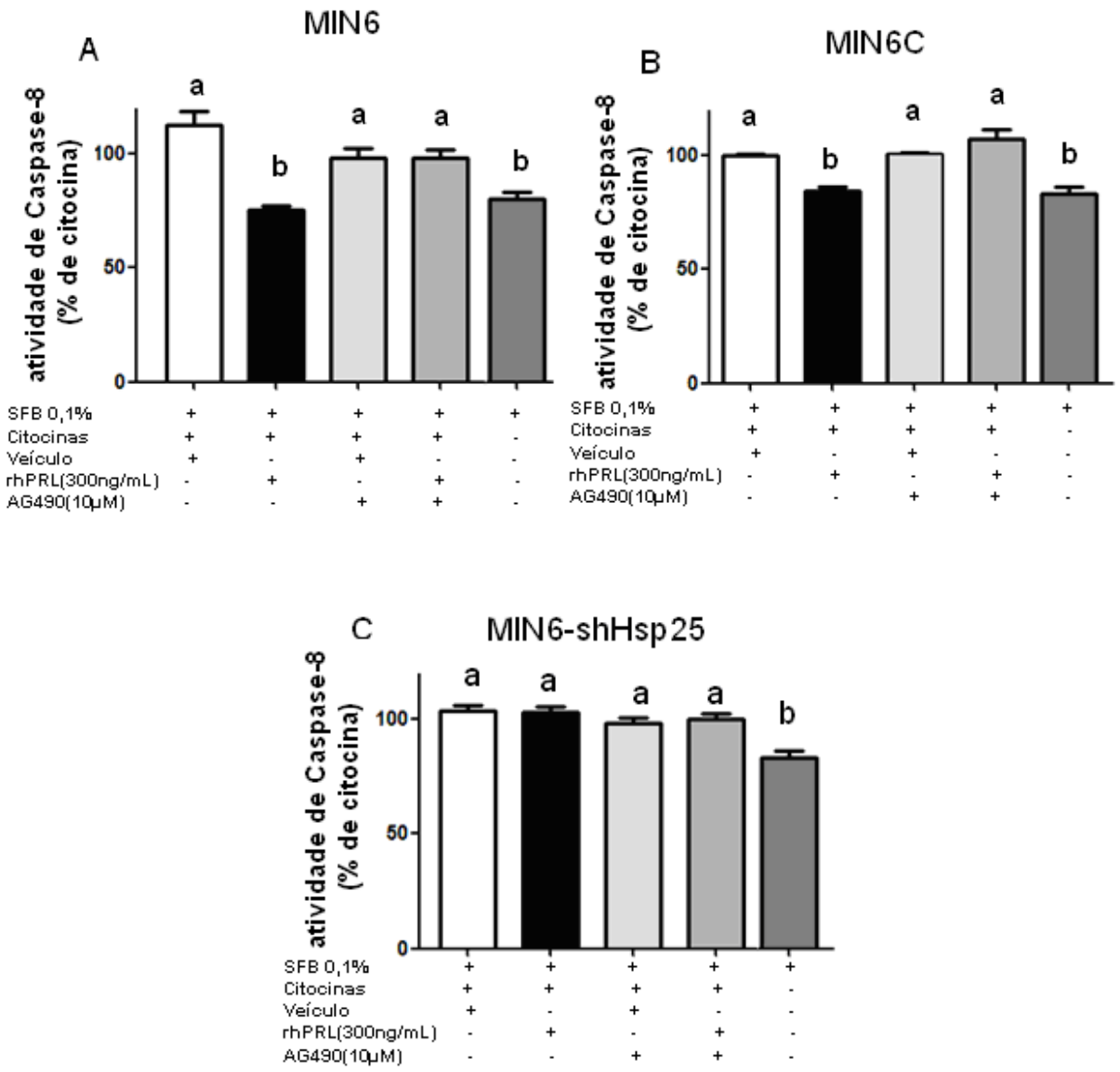


Figura 26: Atividade de Caspase-8 não diminui em cultura de células silenciadas para HSP25, na presença de rhPRL. As células foram submetidas à privação de soro e tratadas por 9h, com uma combinação de citocinas TNFα (8ng/mL), INFγ (4ng/ML) e IL-1β(0,8ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL) e ausência ou presença de AG490 (10 μM). 9h após o tratamento as células foram coletadas em um tampão apropriado. A atividade de Caspase-8 foi medida por um ensaio fluorimétrico utilizando um substrato específico. Os resultados foram normalizados relativos ao conteúdo proteico total e são médias±EPM; n≥3 experimentos independentes realizados em triplicata.A- Células MIN6. a vs. b:p<0,05. B- células MIN6-*scramble* C. a vs. b:p<0,05. C- Células MIN6-shHSP25. a vs.b:p<0,05.

Os resultados da atividade de Caspase-3 apresentados na Figura 27 (Tabela 13), em células MIN6-shHSP25, sob morte induzida por citocinas, na presença de rhPRL, mostrou que não houve inibição da atividade de Caspase-3 neste tipo celular (C), contrariamente ao observado tanto em culturas de MIN6 (A), como em MIN6-scC (B).

Ainda, podemos observar que a inibição da ativação de JAK2 por AG490 aboliu os efeitos citoprotetores obtidos pelo tratamento hormonal, em relação à atividade de Caspase-3, tanto em cultura de células MIN6 (Figura 27A), como em cultura de células MIN6-scC (Figura 27B) (Tabela 13). Estes resultados indicam que a presença de Hsp25 pode ser importante para regular tanto a ativação desta proteína, como perpetuar os efeitos citoprotetores da prolactina, exercidos tanto na via intrínseca, como na via extrínseca da apoptose.

Tabela 13: Atividade de Caspase-3.

Tratamentos\Tipos Celulares	*MIN6*	MIN6-scC	MIN6-shHSP25
0,1% SFB	23±1	51±1	106±3
0,1% SFB+citocinas	100±8	97±10	100±2
0,1% SFB+citocinas+rhPRL	28±2	57,4±0,8	96±3
0,1%SFB+citocinas+AG490	85±21	92±4	116±5
0,1%SFB+citocinas+AG490+rhPRL	90±11	117±13	94±2

Os valores apresentados estão expressos como Média±EPM
n=3 experimentos independentes.

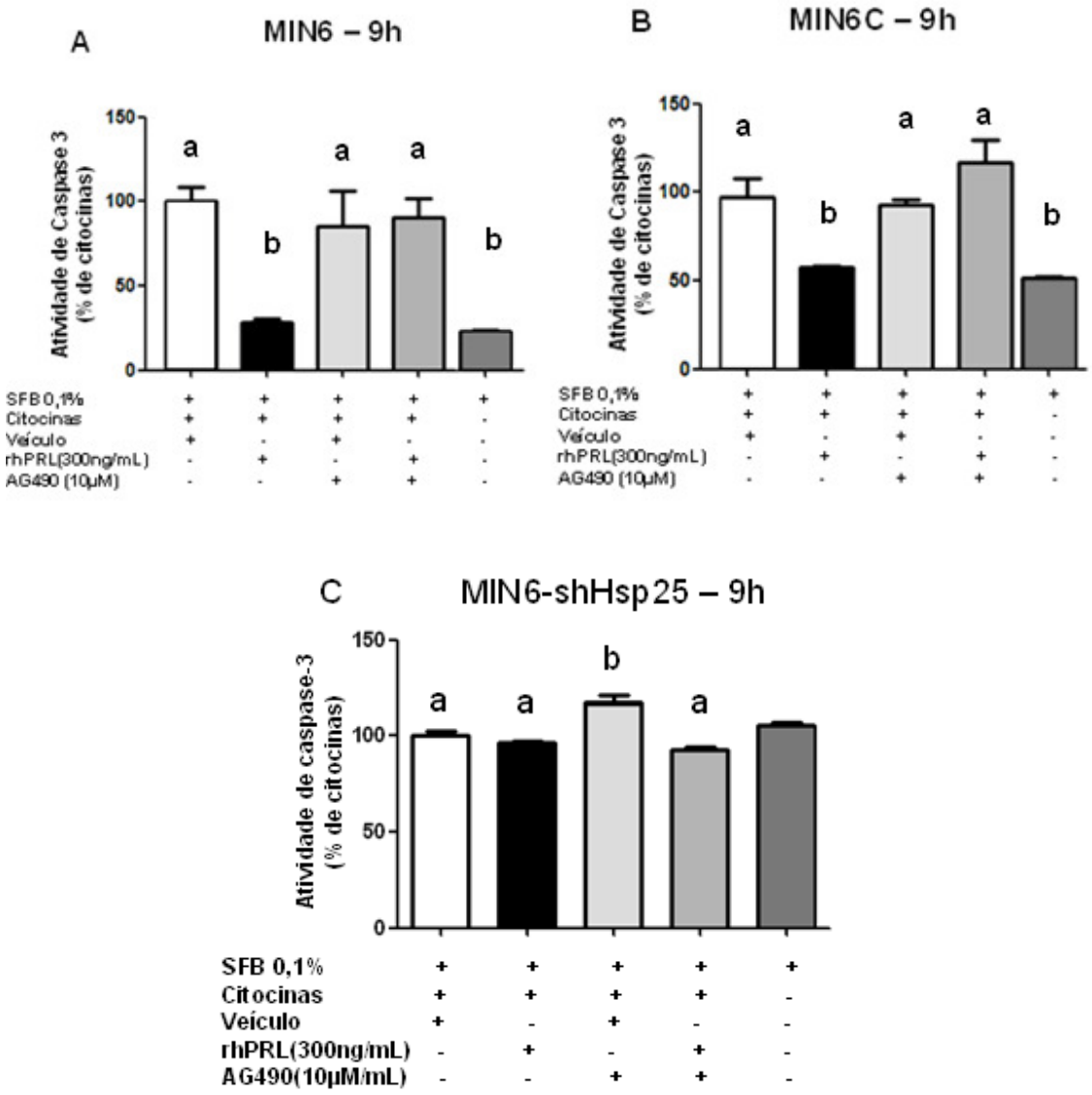


Figura 27: Atividade de Caspase-3 não diminui em cultura de células silenciadas para HSP25, na presença de rhPRL. As células foram submetidas à privação de soro e tratadas por 9h, com uma combinação de citocinas TNFα (8ng/mL), INFγ (4ng/ML) e IL-1β(0,8ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL) e ausência ou presença de AG490 (10 μM). 9h após o tratamento as células foram coletadas em um tampão apropriado. A atividade de Caspase-3 foi medida por um ensaio fluorimétrico utilizando um substrato específico. Os resultados foram normalizados relativos ao conteúdo proteico total e são médias±EPM; n≥3 experimentos independentes realizados em triplicata.A- Células MIN6 a vs. b:p<0,05; B- células MIN6-*scramble* C.a vs. b:p<0,05. C- Células MIN6- shHSP25.

4.3. Investigação da via de sinalização da prolactina em ilhotas pancreáticas humanas e sua relação com HSP27/25.

Com o intuito de estudar melhor os mecanismos moleculares envolvidos na proteção celular de ilhotas pancreáticas humanas, na presença de rhPRL. Estas foram isoladas a partir de pâncreas de doador humano com morte cerebral e mantidas em cultura em CMRL 10%SFB. Foi investigada então, a cinética da ativação de p38, STAT1 (STAT1β p84 e STATα p91) e *Heat Shock Transcription Factor-1* (HSTF1), para tanto as culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas foram cultivadas em CMRL suplementado com 0,5% SFB e tratadas com rhPRL.

Como mostrado na Figura 28A, o tratamento com rhPRL induziu um rápido aumento na expressão de HSTF1, com nível máximo em 10min e perdurando com nível aumentado até 2h após o tratamento.

Além disso, o tratamento com rhPRL também induziu uma rápida fosforilação de p38 (Figura 28B) e de STAT1 (Figura 28C), com início aos 10min e atingindo seu nível máximo em 30min, com posterior declínio. A fim de verificar a compatibilidade dos tempos de aumento de expressão ou fosforilação de HSTF1, p38 e STAT1 com o aumento de expressão de HSP27, foi investigada então, a cinética da ativação desta, após o tratamento das ilhotas humanas células com rhPRL. A Figura 30D mostra que a incubação com rhPRL induziu um aumento na expressão de HSP27 após 2h do tratamento.

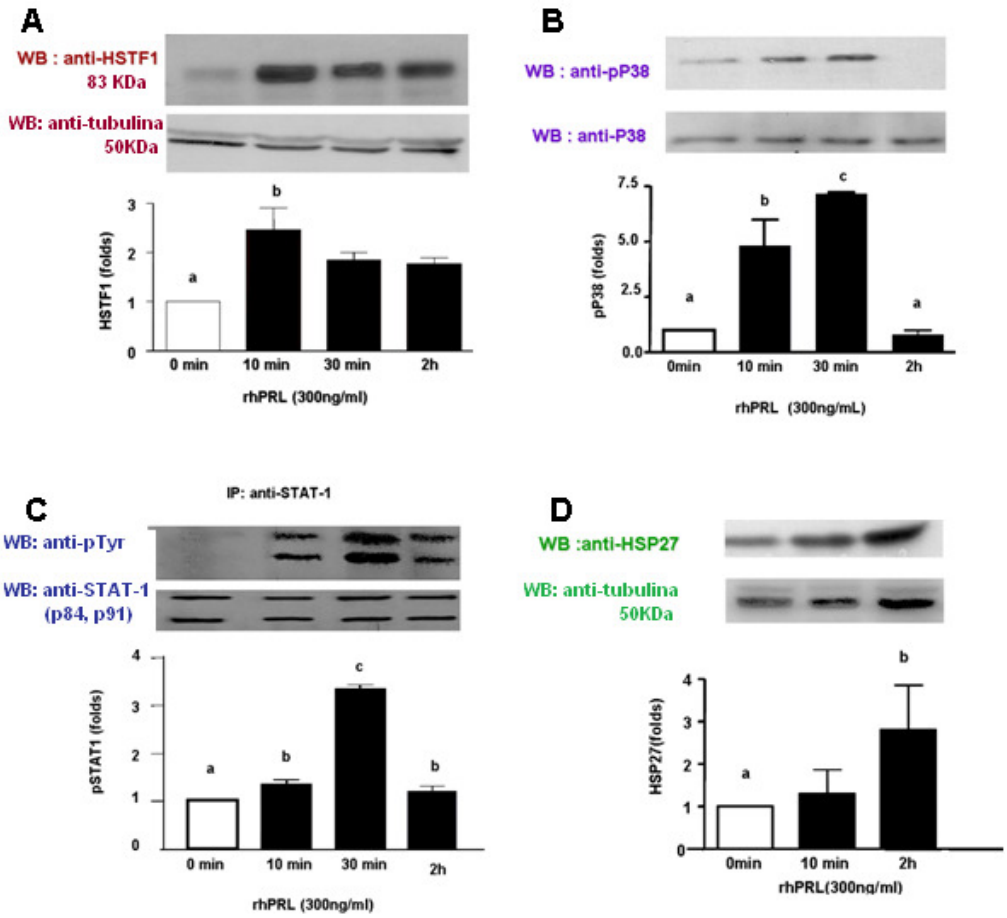


Figura 28: Níveis proteicos ou fosforilação de HSTF1, p38, STAT1 e HSP27 são induzíveis por rhPRL em cultura primária de ilhotas pancreáticas humanas. Cultura primária de ilhotas pancreáticas humanas cultivadas em CMRL suplementado com 0,5% SFB foram tratadas com rhPRL (200ng/mL) por diferentes tempos. A- Os níveis proteicos de HSTF1 foram avaliados por WB em extratos proteicos totais (100µg de proteínas totais por tratamento). A normalização foi feita pelo conteúdo proteico de Tubulina; a vs. b: $p<0,01$. B- A ativação de P38 foi avaliada através da relação pP38 /P38, por WB em extratos proteicos totais (100µg de proteínas totais por tratamento), a vs. b: $p<0,01$; a vs. c:$p<0,001$. C- As células foram então lisadas e STAT1 foi imunoprecipitada de 1mg de preoteínas totais. Imunocomplexos foram submetidos à SDS-PAGE e analisados por WB com anti-pTYRmAb. As membranas foram estripadas e reemcubadas com o mesmo anticorpo usado para a imunoprecipitação, confirmando que quantidades semelhantes de cada proteína foram utilizadas, a vs. b: $p<0,05$; a vs. c:$p<0,001$; b vs. c: $p<0,01$. D- Os níveis proteicos de HSP27 foram avaliados por WB em extratos proteicos totais (100µg de proteínas totais por tratamento). A normalização foi feita pelo conteúdo proteico de Tubulina; a vs. b: $p<0,05$. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. O histograma corresponde a todos os dados e os resultados estão apresentados como unidade arbitrária de densitometria. Os resultados estão apresentados como a média ± EPM; n=3 experimentos independentes.

5. Discussão

O principal objetivo no tratamento do diabetes é o aumento da função, proliferação e sobrevida das células beta pancreáticas. Apesar do desenvolvimento dos processos que envolvem o isolamento e transplante das ilhotas pancreáticas, estes ainda representam condições de alto estresse para as células beta. Assim, uma citoproteção específica para estas células poderia ajudar no desenvolvimento de novas e eficientes estratégias para aumentar a eficiência e o sucesso do transplante.

Resultados prévios do nosso laboratório mostraram um efeito benéfico do tratamento com prolactina em células beta humanas, tanto em sua função como na proliferação (Labriola; Montor *et al.*, 2007). É amplamente aceito que o mecanismo de progressão de morte celular mais importante em células beta é a apoptose (Rabinovitch; Suarez-Pinzon *et al.*, 1994; Mandrup-Poulsen, 1996; Augstein, Elefanty *et al*., 1998; Mandrup-Poulsen, 2001; Thomas, McKenzie *et al.,* 2009). Recentemente foi mostrado também, que o tratamento com PRL em ilhotas humanas melhorou o enxerto e a função das células transplantadas por aumentar a revascularização e a sobrevivência celular (Johansson; Olerud *et al.*, 2009; Yamamoto; Mita *et al.*, 2010). Resultados recentes do nosso laboratório mostraram que rhPRL promove a sobrevivência de células beta e que este efeito citoprotetor acontece pela inibição tanto da via extrínseca como da via intrínseca da apoptose (Terra; Garay-Malpartida *et al*., 2011).

Além disso, nossos estudos mostraram que a proteína antiapoptótica HSP27 tem seus níveis de expressão aumentados em cultura de ilhotas pancreáticas humanas, na presença de prolactina, em relação às culturas de células controle não tratadas com o hormônio (Labriola; Ferreira *et al*., 2007). A proteína HSP27 (HSPB1), descrita em murinos como Hsp25, é uma proteína induzida em resposta a diferentes estímulos de estresse e sua expressão tem sido correlacionada com o aumento de sobrevivência a estímulos citotóxicos e a agentes indutores de apoptose (Concannon; Gorman *et al*., 2003). O presente estudo foi focado no papel de HSP27/25 no efeito citoprotetor da prolactina humana recombinante em células beta. Para tanto foi gerada uma linhagem celular de MIN6 silenciada para Hsp25 (MIN6-shHSP25) em forma estável, assim como linhagens controles, utilizando-se sequências *scramble*: MIN6-scA, MIN6-scB, MIN6-scC e MIN6-scD.

A falta de doadores humanos de pâncreas e a dificuldade em obter e manter cultura de células beta por longos períodos, sem que percam suas principais características morfofisiológicas representam os principais obstáculos para o transplante de ilhotas pancreáticas isoladas, assim como, para o desenvolvimento de pesquisas que se propõem entender os mecanismos moleculares envolvidos no DM1 (Adcock; Austin *et al*., 1975, Gragnoli, 2008, Terra; Teixeira *et al*., 2013). Neste sentido, linhagens de células derivadas de insulinomas de roedores, representam uma alternativa amplamente utilizada para o estudo de mecanismos fisiológicos

e patofisiológicos que envolvem o metabolismo de glicose e para o estabelecimento de modelos *in vitro* envolvendo danos de célula beta que ocorrem em DM1 (Frodin; Sekine *et al.,* 1995, Gylfe and Hellman, 1986, Hill; Oberwetter *et al*., 1987, Meglasson; Manning *et al.,* 1986, Trautmann and Wollheim, 1987, Verspohl; Tollkuhn *et al*., 1995).

A utilização, fosforilação e o transporte de glicose, assim como a resposta secretória, estão bem caracterizados na linhagem de células de insulinoma de camundongo MIN6 (Ishihara; Asano *et al*., 1993). Estas características são similares àquelas encontradas em ilhotas isoladas, indicando que esta linhagem pode ser um modelo apropriado no estudo de mecanismos de secreção de insulina estimulado por glicose em células beta pancreáticas (Ishihara; Asano *et al*., 1993). Neste estudo foi utilizado como modelo a linhagem celular MIN6. Para tanto, foi adaptado um protocolo que proporcionou manter em longo prazo as células MIN6, MIN6-shHSP25 e MIN6-sc em ótimas condições de cultura.

Em nosso laboratório, duas abordagens distintas são utilizadas para induzir a morte celular programada em células beta humanas: privação de soro (Galli e Fratelli, 1993; Mizuno; Yoshitomi *et al.*, 1998; Terra; Garay-Malpartida *et al*., 2011) e tratamento com citocinas (Suk; Kim *et al.*, 2001; Allagnat; Cunha *et al.*, 2011; Terra, Garay-Malpartida *et al*., 2011). O presente estudo mostrou que na linhagem celular MIN6, rhPRL apresentou efeitos citoprotetores no caso da morte induzida por uma combinação de citocinas pró-inflamatórias semelhantes ao observado em

ilhotas pancreáticas humanas (Terra; Garay-Malpartida et al., 2011). No entanto, nada podemos afirmar sobre os efeitos citoprotetores da rhPRL no caso de morte induzida por privação de soro. Estes resultados estão de acordo com a literatura, e possivelmente sejam devido ao fato das células MIN6 pertencerem a uma linhagem de células tumorais que podem ser cultivadas livres de SFB, ao menos até 48h, sem que haja significante perda no número de células vivas (Mizuno; Yoshitomi *et al*., 1999).

Assim, foram então avaliadas as características-chave de algumas das principais vias de apoptose induzidas por uma combinação de citocinas, em células beta, e foram validadas as propriedades de citoproteção específicas da rhPRL para as culturas de células MIN6. Como previamente descrito, o efeito do GH humano na apoptose induzida por citocinas de células beta murinas envolve o balanço entre proteínas pró- e antiapoptóticas da família BCL2 (Jensen; Galsgaard *et al.*, 2005; Fujinaka; Takane *et al.*, 2007). Em estudos prévios mostramos pela primeira vez em células humanas, que o efeito citoprotetor da prolactina envolve, ao menos em parte, níveis aumentados da proteína antiapoptótica BCL2, mas não $BCLx_L$, níveis diminuídos da proteína pró-apoptótica Bax, assim como a inibição das caspases iniciadoras (caspase-8 e -9), e da caspase efetora (caspase-3) (Terra, Garay-Malpartida *et al*., 2011). Neste estudo mostramos, que em células MIN6 na presença de rhPRL e tratamento com uma combinação de citocinas, não somente aumentou o balanço anti/pró-apoptótico de genes da família BCL2, tanto para a relação Bcl2/Bax, como

para $BCLx_L$/Bax, mas diminuíram os níveis de expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bax, Smac-Diablo e Caspase-9. Ainda, na presença de rhPRL, diminuíram a atividade de Caspase-8 e Caspase-3. Além disso, os níveis de expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl2 e os níveis de expressão gênica e proteica de Hsp25 aumentaram na presença do hormônio. Estes resultados estão de acordo com outros já publicados (Fujinaka, Takane et al., 2007), os quais mostram que o silenciamento da proteína $BCLx_L$ inibe significativamente a proteção mediada por lactogênios contra morte induzida por Dexametasona (DEX), tanto de culturas primárias de células beta de camundongo, como de células de insulinoma de rato (INS-1). Estudos mostram também que a prevenção da apoptose por um inibidor de caspases melhora significativamente a função e longevidade de ilhotas humanas em um modelo de camundongos diabéticos (Emamaullee; Davis *et al.*, 2008). Ainda, está demonstrado que a superexpresssão de BCL2 protege células beta de apoptose (Rabinovitch; Suarez-Pinzon *et al*., 1999; Liu; Rabinovitch *et al.,* 1996; Dupraz; Rinsch *et al*., 1999).

Relatos prévios mostram que lactogênio placentário (PL) promove a sobrevivência de células beta através da via de sinalização JAK2/STAT5 (Fujinaka; Takane *et al.,* 2007; Kondegowda; Mozar *et al.,* 2012). Tanto a Prolactina como o lactogênio placentário atuam através de um mesmo receptor (receptor de prolactina - PRLR), e ativam inúmeras vias de sinalização, como JAK2/STAT5, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/Akt), e

extra-cellular signal-regulated kinase-1/2 (ERK1/2), que estão envolvidas na sobrevivência celular. As três vias são imediatamente ativadas após tratamento com PRL em células INS-1. O uso de inibidores específicos para cada uma das três vias (AG490, Wortmannin e PD98059, respectivamente) foi utilizado e os efeitos sobre o estímulo de PRL analisado. Somente o inibidor de JAK2, AG490, reduziu os efeitos citoprotetores contra morte induzida por DEX (Fujinaka; Takane *et al.,* 2007).

Além disso, usando transferência gênica mediada por adenovirus para a expressão de um mutante dominante negativo para STAT5, foi anulado o efeito antiapoptótico do hormônio de crescimento humano (hGH). Resultados recentes do nosso laboratório mostraram, utilizando o inibidor específico de JAK2, AG490, que a via de sinalização clássica da PRL é responsável pela inibição de Caspase-8 e Caspase-9 (Terra; Garay-Malpartida *et al*., 2011). Neste estudo mostramos que a inibição da via clássica da PRL, Jak2/STAT5, por seu inibidor específico AG490 (10μM), em culturas de células MIN6, reverteu o efeito de citoproteção da rhPRL na morte induzida por um coquetel de citocinas, aumentando a porcentagem de núcleos hipodiplóides marcados com PI, diminuindo o balanço anti/pró-apoptótico de genes da família BCL2, tanto para a relação Bcl2/Bax, como para $BCLx_L$/Bax, aumentando os níveis de expressão ou atividade de proteínas pró-apoptóticas Caspase-8, Caspase-9 e Caspase-3. Além disso, a inibição de Jak2 promoveu uma diminuição

nos níveis de expressão gênica de Hsp25, mostrando que além do papel citoprotetor, rhPRL está envolvida na regulação desta proteína. A figura 29 mostra um esquema da regulação citoprotetora da rhPRL, sobre a via apoptótica de células MIN6, como observado neste trabalho.

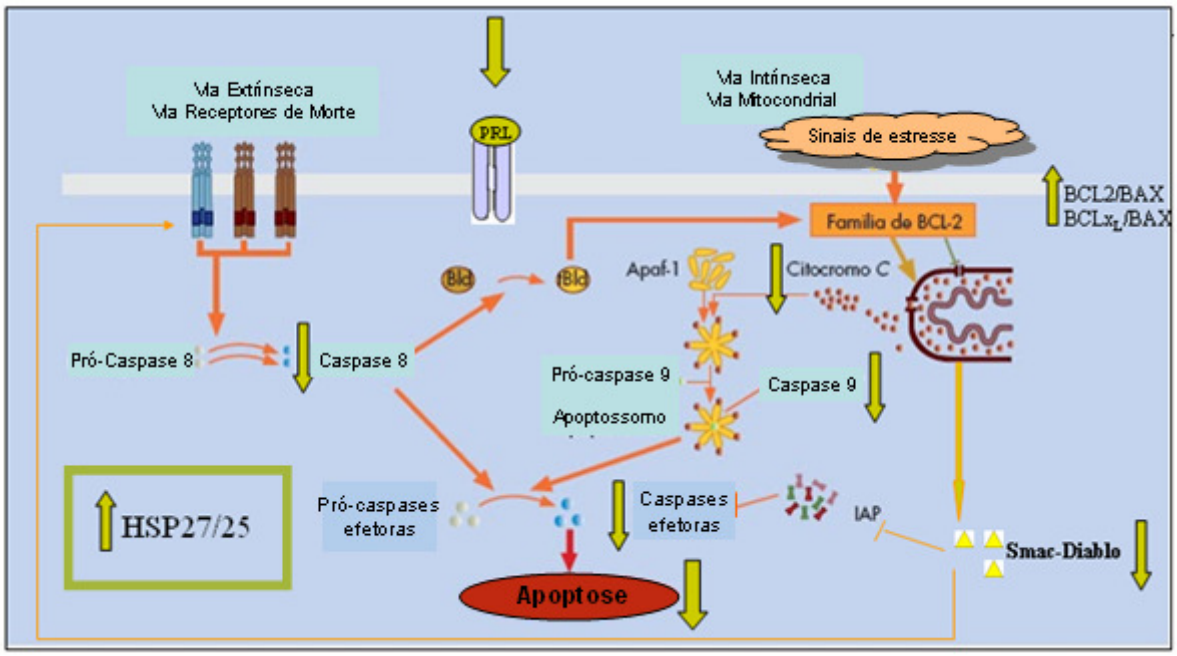


Figura 29: Representação esquemática dos efeitos do hormônio prolactina sobre a via apoptótica (setas verdes). Em destaque a proteína HSP27/25, a qual teve tanto seus níveis de expressão gênica, como proteica, aumentados na presença do hormônio, após indução à morte celular com uma combinação de citocinas pró-inflamatórias. IAP: *Inhibitor of Apoptosis* (acesso em 10/10/2012. Adaptado de: http://oncorred.blogspot.com.br/2012/07/survivina-la-homeostasia-celular-esta.html).

Proteínas de choque térmico (HSPs) compreendem diferentes famílias que são induzidas na resposta a uma grande variedade de insultos fisiológicos e ambientais (Lindquist and Craig, 1988; Tissieres; Mitchel *et al.*, 1974; revisado por Concannon; Gorman *et al.*, 2003). Uma das proteínas que é fortemente induzida durante a resposta ao estresse é a

proteína de choque térmico 27 (HSP27/25), a qual é correlatada com o aumento da sobrevivência em resposta ao estímulo citotóxico.

Células não estressadas apresentam, em geral, níveis baixos de HSP27, predominantemente, como uma grande unidade oligomérica com aproximadamente 800KDa, composta por seis complexos tetraméricos da proteína. O tamanho destas unidades oligoméricas dependem de parâmetros físicos e químicos, como temperatura, pH, força iônica e o grau de fosforilação dos monômeros individuais (Lavoie; Lambert *et al*., 1995; Zantema; Verlaan-De Vries *et al*., 1992).

Durante a resposta ao estresse, ocorre um aumento no nível de expressão de HSP27 que é precedido por uma indução à fosforilação e reorganização do estado multimérico das proteínas. A fosforilação pode ocorrer em três diferentes resíduos de serina, Ser-15, Ser-78 e Ser-82 (Lavoie; Lambert *et al*., 1995; Zantema; Verlaan-De Vries *et al*., 1992) e pode ser modulada por hormônios da família da prolactina (Mandrup-Pousen, 2001). Em geral, a indução de HSP27 é transiente e a proteína retorna ao estado basal após a remoção do estresse (Pauli, Arrigo *et al*., 1989). Este tipo de mudança de expressão e localização também ocorre com HSP25 de murina (a equivalente da HSP27 humana).

A função de HSP27 é altamente influenciada por modificações pós-traducionais. Recentemente, foi mostrado que a superexpressão de HSP27 fosforilada induziu a neuroproteção contra injúria neuronal isquêmica. Em adição, esta fosforilação, essencial para o efeito antiapoptótico de HSP27, é induzida por proteína quinase D (Stetler *et al.*, 2012). Em células não

neuronais, o efeito de HSP27 sobre a sobrevivência celular parece atuar por mecanismos dependentes do tipo celular (Acunzo; Katsogiannou *et al.,* 2012).

Neste trabalho, mostramos que o silenciamento da proteína HSP25 em células MIN6 promoveu a reversão do efeito citoprotetor obtido após o tratamento com prolactina e indução de morte por citocinas em comparação com as células controle. Uma hipótese para este resultado é que rhPRL promoveu uma inibição da via extrínseca da apoptose, uma vez que na ausência de HSP25, as células silenciadas não apresentaram a inibição da atividade de Caspase-8, como visto nas células controle nas condições acima descritas. Durante o processo inflamatório característico do DM1, células beta são expostas às citocinas pró-inflamatórias, liberadas por células do sistema imune que, por sua vez, ativam os receptores ligados às moléculas Fas/APO, induzindo, assim, a ativação de caspases iniciadoras como a Caspase-8. A expressão constitutiva de HSP27 em células L929 (fibroblasto murino), bloqueou a morte celular mediada por Fas/APO-1 (Mehlen; Schulze-Osthoff *et al*., 1996). Portanto, a via extrínseca da apoptose poderia estar sendo regulada por inibição da ativação dos receptores de moléculas pró-inflamatórias (Figura 29). Adicionalmente, a inibição da atividade de Caspase-8, coíbe a ativação de BID, proteína responsável pelo cruzamento das vias extrínseca e intrínseca, diminuindo, assim, o estímulo apoptótico sobre esta última via.

Estudos mostram que HSP27 pode coibir a apoptose através da inibição direta da ativação de caspases. Em células leucêmicas humanas U937, a superexpressão de HSP27 inibiu a clivagem do zimógeno de Caspase-9, impedindo sua ativação, em um evento a jusante da liberação de Citocromo-c (Garrido; Bruey *et al*., 1999; Bruey; Ducasse *et al*.; 2000). No entanto, em linfócitos-T Jurkat a inibição da apoptose durante

estresse, acontece, preferencialmente, pelo bloqueio da liberação de Citocromo-c da mitocôndria (Samalli; Robertson *et al*., 2001). Adicionalmente, HSP27, também regula a formação e funcionamento do apoptossomo e consequente ativação de pró-caspases-9, por uma habilidade de sequentrar Citocromo-c, após o extravasamento deste para o citosol. Conjuntamente, uma imunoprecipitação de HSP27 resultou em uma co-precipitação tanto de Citocromo-c, como de Caspase-3, indicando duas interações independentes (Concannon; Orrenius *et al.,* 2001; Pandey; Farber *et al*., 2000). Ainda, a inibição de HSP27 por RNAi em macrófagos induz a apoptose e a superexpressão desta proteína em monócitos promove a proteção celular por ligação de HSP27 a Caspase-3 (Voss; Batra et al., 2007). Neste estudo foi mostrado que em células MIN6 silenciadas para Hsp25, não houve inibição de expressão de Caspase-9, na presença de rhPRL e indução de morte por citocinas, em comparação com as células controle. Além disso, em células MIN6, com o tratamento na presença do hormônio não somente houve menor expressão de Caspase-9, mas também menor ativação desta proteína, evidenciando assim que HSP27/25 têm um papel importante na inibição da via intrínseca da apoptose, mediada por rhPRL. Adicionalmente, em células MIN6-shHSP25, não houve inibição de atividade de Caspase-3.

Já é conhecido que células induzidas ao acúmulo de HSPs tornam-se mais tolerantes aos insultos citotóxicos, um fenômeno denominado "termotolerância" (Concannon; Gorman *et al*., 2003). Interessantemente,

evidências recentes têm mostrado que um significante "pool" de HSP27 está localizado na fração mitocondrial de células termotolerantes Jurkat (Samalli; Robertson *et al*., 2001), talvez desempenhando um papel similar a BCL-2. A função de BCL-2 é inibir proteínas pró-apoptóticas da mesma família, coibindo a liberação de Citocromo-c do espaço intermembranas mitocondrial. No entanto, o papel de HSP27 localizado próximo na membrana mitocondrial é controverso. Paul e colegas reportaram recentemente, que esta localização não é significante em termos de prevenir a liberação de Citocromo-c da mitocôndria, mas pela capacidade de HSP27 em manter a integridade da rede de actina e prevenir a translocação de fatores pró-apoptóticos, como BAK e BAX, para a mitocôndria (Concannon; Gorman *et al*., 2003). A ativação da via apoptótica se dá, essencialmente, pelo resultado do balanço entre proteínas pró-/antiapoptóticas. Nosso estudo mostrou que na ausência de HSP27, não houve aumento da razão de expressão proteica, tanto para Bcl-2/Bax, como para $Bclx_L$/Bax, induzido por rhPRL, após incubação com uma combinação de citocinas pró-inflamatórias, como observado nas células controle e também visto para a relação BCL-2/BAX, em ilhotas pancreáticas humanas (Terra; Garay-Malpartida *et al*., 2011). A Figura 30 mostra alguns dos possíveis pontos de regulação da via apoptótica pela proteína HSP27/25, dependentes do tipo celular estudado.

Há somente um relato da ação de HSP27/25 em células beta. Camundongos transgênicos que superexpressam HSP27 são mais

resistentes à diabetes induzida por estrepzotocina (STZ). Adicionalmente, a expressão de HSP27 se deu preferencialmente em célula beta e foi observada uma atenuação de apoptose nestas células após às injeções com STZ (Daí; Patel-Chamberlin *et al.,* 2009).

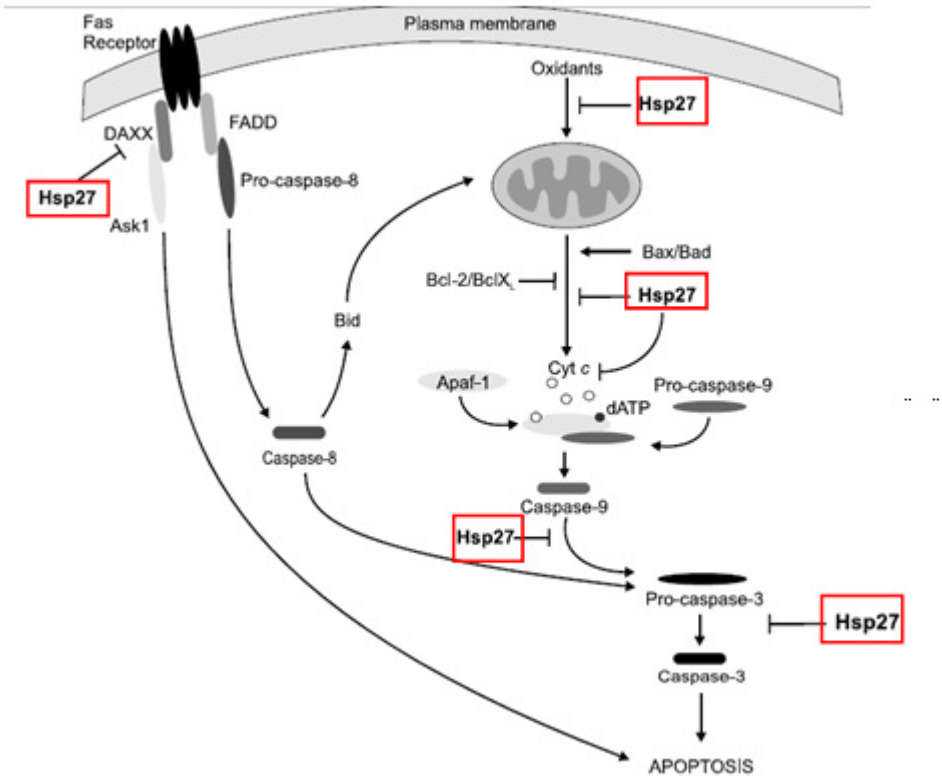


Figura 30. Regulação da via apoptótica por HSP27/25. HSP27/25 pode inibir a via extrínseca da apoptose através da inibição de moléculas ligadas aos receptores desta via, como pode coibir a via intrínseca, atuando em diversos pontos a montante e a jusante da liberação de citocromo-c do espaço intermembrana da mitocôndria (Adaptado de Concannon; Gorman *et al*., 2003).

Em conjunto, nossos resultados indicam que HSP27/25 desempenha um papel importante na citoproteção de células beta, mediada por rhPRL, tanto pela inibição da via extrínseca como pela via intrínseca da

apoptose, ativadas pela indução de morte por citocinas pró-inflamatórias. O aumento dos níveis de expressão de HSP27/25 na presença do hormônio inibe a atividade de Caspase-8 e coíbe o aumento de expressão de Caspase-9, processos estes, que induzem a clivagem e ativação de Caspase-3. No entanto, a inibição da atividade de Caspase-3 pode acontecer de modo sinergístico, através da interação direta de Hsp25, com esta caspase efetora. Ainda a predominância do efeito antiapoptótico dado pelo balanço de expressão de proteínas da família BCL-2 na presença de rhPRL, é dependente da presença de HSP27/25 e concorrem para a inibição da via intrínseca em células beta.

Adicionalmente, o acúmulo de proteínas desnaturadas pode ativar uma resposta ao estresse, aumentando a expressão de HSPs, com a função de chaperonas moleculares. Se grandes quantidades de proteínas danificadas estão presentes, podem formar agregados, os quais servem como um sinal para a indução de apoptose. Concomitantemente, o aumento de expressão de HSP27/25 facilitaria o reparo ou destruição destas proteínas, promovendo a recuperação celular. Esta habilidade de HSP27/25 pode contribuir para o aumento da taxa de sobrevivência de células beta por limitar os níveis de proteínas malformadas (Bryantsev; Kurchashova *et al*., 2007; Concannon; Gorman *et al*., 2003).

O mecanismo clássico da PRL envolve a ligação do hormônio ao seu receptor de membrana (PRLR), o qual se dimeriza, recrutando a proteína Janus Kinase 2 (JAK2) que, uma vez fosforilada, promove a fosforilação

dos resíduos de tirosina na porção citoplasmática do receptor, iniciando a cascata de fosforilação de diversas proteínas, incluindo as proteínas da família das STATs (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) e de MAPk (mitogen-activated protein kinases), entre outras. Contudo, não se sabe qual dessas vias poderia estar mediando o efeito citoprotetor causado pela rhPRL em células beta humanas. Resultados prévios de nosso laboratório, descreveram pela primeira vez em ilhotas humanas, a ativação de JAK2 induzida por rhPRL, e a transdução de sinal e ativação de STAT5, 3 e 1 (Labriola, Montor et al., 2007). Ainda, está descrito que células humanas infectadas com o vírus do Sarampo tornam-se suscetíveis à apoptose causada por estresse extracelular. O vírus do Sarampo estimula a degradação de STAT1 dependente do proteassomo. Estas células infectadas, com diminuição de STAT1, fracassam em adquirir termotolerância após exposição ao calor e estresse químico. Ainda, o mesmo grupo tem reportado que STAT1 é requerida para a transcrição de HSP27, mas não de HSP70 (Yokota, Yokosawa *et al.,* 2003). Nossos resultados demonstram que, em células beta humanas há uma rápida fosforilação de STAT1, com pico máximo em 30min após o tratamento com rhPRL.

De modo interessante, alguns trabalhos recentes mostraram que p38 estaria regulando um aumento da sobrevivência de células INS-1 (Ehses; Casilla *et al.*, 2003), levando à investigação da cinética de ativação de p38 após tratamento com prolactina. Os nossos resultados mostraram

que há uma fosforilação rápida e transitória de p38 após o tratamento com rhPRL, em células beta humanas.

Além disso, está amplamente descrito na literatura que a expressão gênica de eucariotos é mediada por um fator de transcrição de *choque térmico 1* (HSF1 ou HSTF1). HSTF1 está presente em estado latente em condições normais e é ativado sob estresse de calor. Como demonstrado neste trabalho, prolactina induziu um aumento na expressão de HSTF1 após 10min de tratamento hormonal.

Foi amplamente discutido neste trabalho a indução de expressão de HSP27/25 por prolactina em células beta. No entanto, com o intuito de verificar se a cinética de expressão de HSP27/25 era compatível com os tempos encontrados para HSTF1, em ilhotas humanas, foram observados o padrão de indução desta proteína em tempos iniciais após o estímulo, mostrando que em 2h, já ocorre o aumento de expressão.

Resultados anteriores mostraram que lactogênios promovem a sobrevivência (Fujinaka; Takane *et al*, 2007) e citoproteção (Kondegowda; Mozar *et al,* 2012; Jensen; Galsgaard *et al*., 2005) de células beta pancreáticas, através da ativação da via de sinalização JAK2/STAT5. A análise dos dados aqui apresentados e de resultados prévios de nosso laboratório, que tem mostrado o efeito citoprotetor de rhPRL em cultura primária de ilhotas pancreáticas humanas, além dos efeitos deste hormônio sobre JAK2 e STAT5, 3 e 1 (Labriola; Montor *et al*., 2007; Labriola; Ferreira *et al*., 2007; Terra; Garay-Malpartida; *et al*., 2011),

auxiliaram-nos a propor um modelo hipotético do mecanismo molecular envolvido na via de sinalização do hormônio PRL e a transdução do sinal via JAK2-STAT1 em ilhotas pancreáticas humanas. A ligação do hormônio ao seu receptor (PRLR) promove sua dimerização e recrutamento de JAK2, que após fosforilação, catalisa a fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor e direta ou indiretamente, de STAT1 e de p38, o que possibilita a ligação destas proteínas ao HSTF1 e seu direcionamento ao núcleo, onde se liga à região promotora do gene de HSP27, dando início à transcrição deste (Figura 31). Em duas horas, após o estímulo, a proteína HSP27 já está sendo traduzida no citoplasma, e o aumento de sua expressão pode ser detectada por Western *blot*.

Não sabemos exatamente se existe uma hierarquia das vias, nas quais HSP27 está agindo e se isso é regulado diferentemente, dependendo do estímulo que leva à superexpressão desta proteína, mas conseguimos provar pela primeira vez que esta proteína é crucial na ação da PRL em células beta. Nosso objetivo é aprofundar este estudo, na tentativa de desvendar melhor os mecanismos pelos quais PRL provoca a citoproteção, visando, no futuro, poder estabelecer os pilares para uma estratégia que promova a sobrevida das células beta, auxiliando, assim a otimizar o sucesso do transplante de ilhotas.

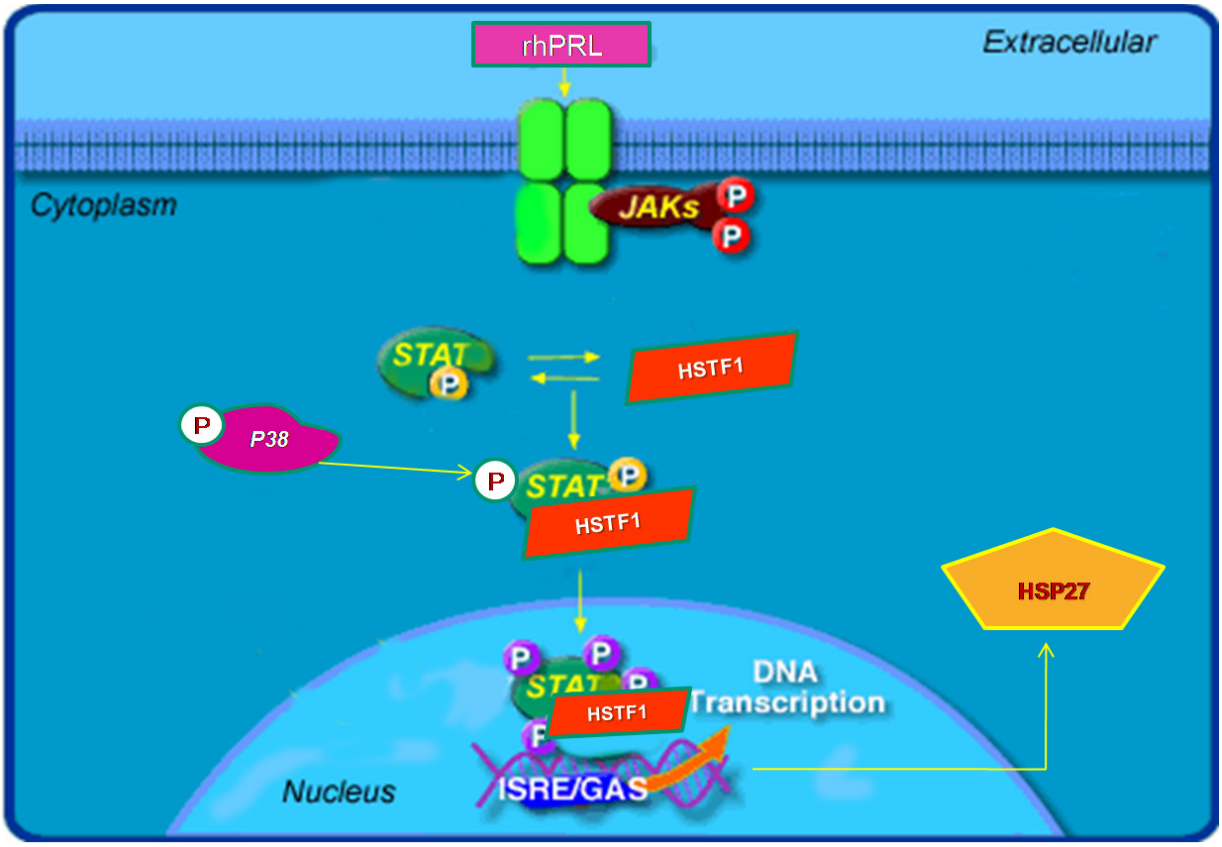


Figura 31: Modelo hipotético do mecanismo molecular da via de sinalização do hormônio PRL. A ligação do hormônio ao seu receptor (PRLR) promove sua dimerização, recrutamento e fosforilação de JAK2. As proteínas STAT1 e p38 são fosforiladas e se ligam ao HSTF1. Este complexo proteico é transportado para o núcleo, se ligando à região promotora do gene HSP25 e dando início da transcrição do gene. Em duas horas, após o estímulo, a proteína HSP27 já está sendo traduzida no citoplasma, e sua expressão detectada por Western blot. (Figura adaptada de www.biocarta.com).

6. Conclusões

Conclusões

O modelo de células de um insulinoma murino MIN6 foi validado. Ainda, estes estudos demonstram o papel chave de HSP27/25 nos efeitos citoprotetores induzidos por rhPRL, desde que a ausência desta proteína aboliu completamente os efeitos benéficos induzidos por PRL sobre a morte de células beta. Além disso, nós fornecemos pela primeira vez, evidências da co-regulação de HSP27 e HSTF1 induzidas por rhPRL em células humanas pancreáticas, que pode estar sendo mediada pela ativação de STAT1 e p38. Coletivamente, nossos resultados podem conduzir para a atenuação da morte de células beta por meio da sobre-regulação de uma via de proteção endógena, a qual é independente da modulação do sistema imunológico.

7. Referências Bibliográficas

ACUNZO, J.; KATSOGIANNOU, M.; ROCCHI, P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), αB-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**; v. 44,issue 10:1622–1631, 2012.

ADCOCK, K.; AUSTIN, M.; DUCKWORTH, W. C.; SOLOMON, S. S.; MURRELL, L. R. Human islet cell adenoma: metabolic analysis of the patient and of tumor cells in monolayer culture. **Diabetologia**, v. 11, n. 6, p. 527-534, 1975.

ALLAGNAT, F.; CUNHA, D.; MOORE, F.; VANDERWINDEN, J. M.; EIZIRIK, D. L.; CARDOZO, A. K. Mcl-1 downregulation by pro-inflammatory cytokines and palmitate is an early event contributing to beta-cell apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 2, p. 328-337, 2011.

ANTONSSON, B.; MONTESSUIT, S.; SANCHEZ, B.; MARTINOU, J. C. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 15, p. 11615-11623, 2001.

AOUACHERIA, A., BRUNET, F. & GOUY, M. Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-only, and BNip families of apoptotic regulators. Mol. Biol. Evol. 22, 2395–2416, 2005.

ARRIGO, A.P. The cellular networking of mammalian Hsp27 and its functions in the control of protein folding, redox state and apoptosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**; 594:14-26, 2007.

ARRIGO, A.P.; MEHLEN, P. Expression and function of the low molecular weight heat shock proteins. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory press**; 335-373, 1994.

AUGUSTEIN, P.; ELEFANTY, A.G.; ALLISON, J.; HARRISON, L.C.; Apoptosis and beta-cell destruction in pancreatic islets of NOD mice with spontaneous and cyclophosphamide-accelerated diabetes. **Diabetologia,** 41 :1381 –1388,1998.

BACH, J. F.; The Efect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **N Engl J Med,** Vol. 347, 12, 2002.

BAKER, E. N.; BLUNDELL, T. L.; CUTFIELD, J. F.; CUTFIELD, S. M.; DODSON, E. J.; DODSON, G. G.; CROWFOOT HODGKIN, D. M.; HUBBARD, R. E.; ISAACS, N. W.; REYNOLDS, C. D.; SAKABE, K.; SAKABE, N. and VIJAYAN, N. M. The Structure of 2Zn Pig Insulin Crystals at 1.5 Resolution**. Phil. Trans. R. Soc. Lond.** B319, 369-456, 1988.

BARCZYK, K.; KREUTER, M.; PRYJMA, J. et al. Serum cytochrome c indicates in vivo apoptosis and can serve as a prognostic marker during cancer therapy. **J Int Cancer;** 116:167–173, 2005.

BERNEY, T.; MOLANO, R. D.; CATTAN, P. *et al.* Endotoxin-mediated delayed islet graft function is asssociated with increased intra-islet cytokine production and islet cell apoptosis. **Transplantation**; 71: 125–132, 2001.

BRATANOVA-TOCHKOVA, T.K.; CHENG, H.; DANIEL, S.; GUNAWARDANA, S.; LIU, Y. J.; MULVANEY-MUSA, J.; SCHERMERHORN, T.; STRAUB, S. G.; YAJIMA, H.; SHARP, G, W. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. **Diabetes,** 51 Suppl 1:S83-90, 2002.

BRELJE, T.; SVENSSON, A.; STOUT, L.; BHAGROO, N.; SORENSON, R. An immunohistochemical approach to monitor the prolactin-induced activation of the JAK2/STAT5 pathway in pancreatic islets of Langerhans. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n. 3, p. 365-383, 2002.

BRELJE, T.; STOUT, L.; BHAGROO, N.; SORENSON, R. Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of langerhans. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4162-4175, 2004.

BRELJE, T. C.; ALLAIRE, P.; HEGRE, O.; SORENSON, R. L. Effect of prolactin versus growth hormone on islet function and the importance of using homologous mammosomatotropic hormones. **Endocrinology**, v. 125, n. 5, p. 2392-2399, 1989.

BRELJE, T. C.; SCHARP, D. W.; LACY, P. E.; OGREN, L.; TALAMANTES, F.; ROBERTSON, M.; FRIESEN, H. G.; SORENSON, R. L. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. **Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 879-887, 1993.

BRUEY, J. M, ; DUCASSE, C. ; BONNIAUD, P. ; et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. **Nat Cell Biol**, 2: 645–652, 2000.

BRYANTSEV, A.L.; KURCHASHOVA, S.Y.; GOLYSHEV, S. A.; POLYAKOV, V. Y.; WUNDERINK, H. F.; KANON, B. Regulation of stress-induced intracellular sorting and chaperone function of Hsp27 (HspB1) in mammalian cells. **The Biochemical Journal**; 407:407-417, 2007.

CAVALCANTE, L.F.; GONÇALVES, M.M.; SANTOS, A.M.; AGUIAR, L.G.K.; CUNHA, E.F.; GOMES, M.B.;t al.; Aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1 do ambulatório de Diabetes do HUPE-UERJ. **9° Congresso da Associação Latino-Americana de Diabetes** / **10° Congresso Brasileiro de Diabetes** (resumo), 1995.

CHAO, D. T.; LINETTE, G. P.; BOISE, L. H.; WHITE, L. S.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. **J Exp Med**, v. 182, n. 3, p. 821-828, 1995.

CHERLONNEIX, L. L'e´quivocite´ vive: Une nouvelle representation du vivant [The vivid equivocity. A new representation of living]. **L'Harmattan,** Paris. ISBN: 978-2-296-05340-3, 2008

CHERVONSKY, A.V.; WANG, Y.; WONG, F.S.; VISINTIN, I.; FLAVELL, R.A.; JANEWAY, C.A.; MATIS, L.A. The Role of Fas in Autoimmune Diabetes. **Cell**, 89(1): 17-24, 1997

CIOCCA, D. R.; ADAMS, D. J.; EDWARD, D. P.; BJERCKE, R. J.; McGUIRE, W. L. Distribution of an estrogen-induced protein with a molecular weight of 24,000 in normal and malignant human tissues and cells. **Cancer Res**.;43(3):1204-10, 1983.

CISZAK, E. And SMITH, G. D.; Crystallographic Evidence for Dual Coordination around Zinc in the T_3R_3 Human Insulin Hexamer. **Biochemistry**, 33, 1512-1517, 1994.

CNOP, M. et al. Mechanisms of pancreatic beta‐cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes** 54 (Suppl. 2), s97–s107, 2005.

CONCANNON, C. G.; ORRENIUS, S.; SAMALI, A. Hsp27 inhibits cytochrome c mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. **Gene Expr,** 9:195–201, 2001.

CONCANNON, C. G.; GORMAN, A. M.; SAMALI, A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. **Apoptosis**; 8:61-70, 2003.

CURRY, D. L.; BENNETT, L. L.; GRODSKY, G. M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. Endocrinology 83:572–584, 1968.

CURTIN, J. F.; and COTTER, T. G. Defects in death-inducing signalling complex formation prevent JNK activation and Fas-mediated apoptosis in DU 145 prostate carcinoma cells. **Br J Cancer**; 89(10):1950-7, 2003.

DAI, T. ; PATEL-CHAMBERLIN, M. ; NATARAJAN, R. ; TODOROV, I. ; MA, J. ; LaPAGE, J. ; PHILLIPS, L. ; NAST, C. C. ; BECERRA, D. ; CHUANG, P. ; TONG, L. ; BELLEROCHE, J. ; WELLS, D. J. ; WANG, Y. ; ADLER, S. G. Heat shock protein 27 overexpression mitigates cytokine-induced islet apoptosis and streptozotocin-induced diabetes. **Endocrinology** ; 150(7) :3031-3039, 2009.

DAMIANI, D. Mecanismos da Apoptose. Manual de Patologia e Citopatologia Oncológica 2004. www.sistemanervoso.com (Acesso em 27/maio/2013).

DEJEAN, L.M.; MARTINEZ-CABALLERO, S.; GUO, L.; HUGHES, C.; TEIJIDO, O.; DUCRET, T.; ICHAS, F.; KORSMEYER, S.J.; ANTONSSON, B.; JONAS, E.A.; KINNALLY, K.W. Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. **Mol Biol Cell***; 16(5): 2424-32, 2005.*

DELANEY, C.A.; PAVLOVIC, D.; HOORENS, A.; PIPELEERS, D.G.; EIZIRIK, D.L. Cytokines Induce Deoxyribonucleic Acid Strand Breaks and Apoptosis in Human Pancreatic Islet Cells. **Endocrinology**,vol. 138 no. 6 2610-2614, 1997.

DONG, H.; WOO, S. L. Hepatic insulin production for type 1 diabetes. **Trends Endocrinol Metab**, v. 12, n. 10, p. 441-446, 2001.

DUNGER, A.; AUGSTEIN, P.; SCHMIDT, S.; FISHER, U. Identification of interleukin 1-induced apoptosis in rat islets using in situ specific labelling of fragmented DNA. **Journal of Autoimmunology**, 9:309–313, 1996.

DUPRAZ, P.; RINSCH, C.; PRALONG, W.F.; et al. Lentivirus-mediated Bcl-2 expression in betaTC-tet cells improves resistance to hypoxia and cytokine-induced apoptosis while preserving in vitro and in vivo control of insulin secretion. **Gene Ther** 6:1160–1169. doi:10.1038/sj.gt.3300922, 1999.

DUPREZ, L.; WIRAWAN, E.; VANDEN, B., T; VANDENABEELE, P. Major cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 13, p. 1050-1062, 2009.

EHSES, J. A.; CASILLA, V. R.; DOTY, T.; POSPISILIK, J. A.; WINTER, K. D.; DEMUTH, H. U.; PEDERSON, R. A.; MCINTOSH, C. H. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide promotes beta-(INS-1) cell survival via cyclic adenosine monophosphatemediated caspase-3 inhibition and regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. **Endocrinology**, v. 144, n. 10, p. 4433-4445, 2003.

EIZIRIK, D.; COLLI, M.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. **Nat Rev Endocrinol**, v. 5, n. 4, p. 219-226, 2009.

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

EIZIRIK, D. L.; MOORE, F.; FLAMEZ, D.; ORTIS, F. Use of a systems biology approach to understand pancreatic beta-cell death in Type 1 diabetes. **Biochem Soc Trans**, v. 36, n. Pt 3, p. 321-327, 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death.**Toxicol Pathol** 35:495–516, 2007.

EMAMAULLEE, J. A.; DAVIS, J.; PAWLICK, R.; TOSO, C.; MERANI, S.; CAI, S. X.; TSENG, B.; SHAPIRO, A. M. The caspase selective inhibitor EP1013 augments human islet graft function and longevity in marginal mass islet transplantation in mice. **Diabetes**, v. 57, n.6, p. 1556-1566, 2008.

ESTELLA, E.; McKENZIE, M.D.; CATTERALL, T.; et al. Granzyme B-mediated death of pancreatic beta-cells requires the proapoptotic BH3-only molecule bid. **Diabetes** 55:2212–2219**.** doi:10.2,337/db06-0,129, 2006.

FRODIN, M.; SEKINE, N.; ROCHE, E.; FILLOUX, C.; PRENTKI, M.; WOLLHEIM, C. B.; VAN OBBERGHEN, E. Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. **J Biol Chem**, v. 270, n. 14, p. 7882-7889, 1995.

FUJINAKA, Y.; TAKANE, K.; YAMASHITA, H.; VASAVADA, R. C. Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 42, p. 30707-30717, 2007.

GALLI, G.; FRATELLI, M. Activation of apoptosis by serum deprivation in a teratocarcinoma cell line: inhibition by L-acetylcarnitine. **Exp Cell Res**, v. 204, n. 1, p. 54-60, 1993.

GARRIDO, C.; BRUEY, J. M.; FROMENTIN, A.; HAMMANN, A.; ARRIGO, A.P.; SOLARY, E. HSP27 inhibits cytochrome *c*-dependent activation of procaspase-9. **FASEB J.** 13, 2061–2070, 1999.

GARRIDO, C.; BRUNET, M.; DIDELOT, C.; ZERMATI, Y.; SCHIMITT,E.; KROEMER, G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. **Cell Cycle**; 5:2592-2601, 2006.

GEPTS, W.; LECOMPTE, P.M.; The pancreatic islets in diabetes. **Am J Med**; 70(1):105-15, 1981.

GHAVAMI, S.; HASHEMI, M.; ANDE, S.R.; et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes**. J Med Genet**; 46:497–510, 2009.

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.

GOMES, M.B.; AGUIAR, L.G.K.; MARQUES, E.P.; SARNO, E.N.; CHACRA, A.R. Estudo comparativo de variáveis epidemiológicas em casos múltiplos e esporádicos de Diabetes Mellitus do tipo tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab.**;40:13-5, 1996.

GOMES, M.B.; DIB, A.S.; editors. Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Sociedade Brasileira de Diabetes**;1-154, 2006.

GRAGNOLI, C. The CM cell line derived from liver metastasis of malignant human insulinoma is not a valid beta cell model for in vitro studies. **J Cell Physiol**, v. 216, n. 2, p.569-570, 2008.

GYLFE, E.; HELLMAN, B. Glucose-stimulated sequestration of Ca2+ in clonal insulinreleasing cells. Evidence for an opposing effect of muscarinic-receptor activation. **Biochem J**, v. 233, n. 3, p. 865-870, 1986.

GYSEMANS, C. A.; WAER, M. ; VALCKX, D. ; *et al.* Early graft failure of xenogeneic islets in NOD mice is accompanied by high levels of interleukin-1 and low levels of transforming growth factor-β mRNA in the grafts. **Transplantation**; 49: 1992–1997, 2000.

GYSEMANS, C.; STOFFELS, K.; GIULIETTI, A.; *et al.* Prevention of primary non-function of islet xenografts in autoimmune diabetic NOD mice by anti-inflammatory agents. **Diabetologia**; 46: 1115–1123, 2003. DOI: 10.1007/s00125-003-1154-0

HAN, Y.; WATLING, D.; ROGERS, N. C.; STARK, G. R. Jak2 and Stat5, but not Jak1 and Stat1, are required for prolactin-induced b-lactoglobulin transcription. **Mol Endocrinol** 11:1180–1188, 1997

HICLEY, E. D.; WEBER, L. A. Modulation of heat-shock polypeptide synthesis in HeLa cells during hyperthermia and recovery. **Biochemistry**; 21:1513-1521, 1982.

HASLBECK, M.; FRANZMANN, T.; WEINFURTNER, D.; BUCHNER, J. Some like is hot: the structure and function of small heat-shock proteins. Nature Structural & Molecular Biology; 12: 842-846, 2005.

HENQUIN, J. C.; NENQUIN, M.; STIERNET, P. ; AHREN, B. In vivo and in vitro glucose-induced biphasic insulin secretion in the mouse : pattern and role of cytoplasmic Ca2+ and amplification signals in {beta}-cells. Diabetes, 55(2):441-451, 2006.

HILL, R. S.; OBERWETTER, J. M.; BOYD, A. E., 3RD. Increase in cAMP levels in beta cell line potentiates insulin secretion without altering cytosolic free-calcium concentration. **Diabetes**, v. 36, n. 4, p. 440-446, 1987.

HUANG, J.; NUEDA, A.; YOO, S.; DYNAN, W. S. Heat shock transcription factor 1 binds selectively in vitro to Ku protein and the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. Oct 10;272(41):26009-16, 1997.

ICHII, H.; INVERARDI, L.; PILEGGI, A.; MOLANO, R. D.; CABRERA, O.; CAICEDO, A.; MESSINGER, S.; KURODA, Y.; BERGGREN, P. O.; RICORDI, C. A novel method for the assessment of cellular composition and beta-cell viability in human islet preparations. **Am J Transplant**, v. 5, n. 7, p. 1635-1645, 2005.

ICHII, H.; RICORDI, C. Current status of islet cell transplantation. **J Hepatobiliary Pancreat Surg**, 16:101-112, 2008.

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** 36: 1139-1145, 1993.

ITOH, N.; IMAGAWA, A.; HANAFUSA, T.; WAGURI, M.; YAMAMOTO, K.; IWAHASHI, H.; MORIWAKI, M.; NAKAJIMA, H.; MIYAGAWA, J.; NAMBA, M.; MAKINO, S.; NAGATA, S.; KONO, N.; and MATSUZAWA, Y. Requirement of Fas for the Development of Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. **J Exp Med**; 186:613-618, 1997.

IWAHASHI, H.; HANAFUSA, T.; EGUCHI, Y.; [et al.] Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. **Diabetologia**, 39S.530-536, 1996.

JENSEN, J.; GALSGAARD, E. D.; KARLSEN, A. E.; LEE, Y. C.; NIELSEN, J. H. STAT5 activation by human GH protects insulin-producing cells against interleukin-1beta, interferongamma and tumour necrosis factor-alpha-induced apoptosis independent of nitric oxide production. **J Endocrinol**, v. 187, n. 1, p. 25-36, 2005.

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.

KÄGI, D.; ODERMATT, B.;[...]; HENGARTNER, H. Reduced Incidence and Delayed Onset of Diabetes in Perforin-deficient Nonobese Diabetic Mice. **J Exp Med** 186: 989-997, 1997.

KAMINITZ, A.; STEIN, J.; YANIV, I.; ASKENASY, N. The vicious cycle of apoptotic beta cell death in type 1 diabetes. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 8, p. 582-589, 2007.

KAMPINGA, H.H.; HAGEMAN, J.; VOS, M.J.; KUBOTA, H.; TANGUAY, R.M.; BRUFORD, E.A.; et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. **Cell Stress Chaperones**;14:105–111, 2009.

KANTAROVA, D.;, BUC, M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. **Physio Res**;56(3):255-66, 2007.

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.

KIM, K. A.; LEE, M. S. Recent progress in research on beta-cell apoptosis by cytokines. **Front Biosci**, v. 14, n., p. 657-664, 2009.

KONDEGAWDA, N. G.; MOZAR, A.; CHIN, C.; OTERO, A.; GARCIA-OCAÑA, A.; VASAVADA, R. C. Lactogens protect rodent and human beta cells against glucolipotoxicity-induced cell death through Janus kinase-2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) signalling. **Diabetologia**; 55:1721-1732, 2012.

KURRER, M.O.; PAKALA, S.V., HANSON, H.L.; et al. Beta cell apoptosis in Tcell-mediated autoimmune diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A.**;94:213–218, 1997.

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. **Mol Cell Endocrinol**, v. 263, n.1-2, p. 120-133, 2007.

LABRIOLA, L.; FERREIRA, G. B.; MONTOR, W. R.; DEMASI, M. 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. **Mol Cell Endocrinol**, v. 264, n. 1-2, p. 16-27, 2007.

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.

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. **The Journal of Cell Biology**; 109: 7-15, 1989.

LAWSON, D. M.; SENSUI, N.; HAISENLEDER, D. H.; GALA, R. R. Rat lymphoma cell bioassay for prolactin: observations on its use and comparison with radioimmunoassay. **Life Sci**, v. 31, n. 26, p. 3063-3070, 1982.

LAVOIE, J. N.; LAMBERT, H. ; HICKEY, E.; WEBER, L. A.; LANDRY, J. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. Mol Cell Biol; 15: 505-516, 1995.

LEKANNE DEPREZ, R. H.; FIJNVANDRAAT, A. C.; RUIJTER, J. M.; MOORMAN, A. F. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using

SYBRgreen I depends on cDNA synthesis conditions. **Anal Biochem**, v. 307, n. 1, p. 63-69, 2002.

LENTZE, N.; NARBERHAUS, F. Detection of oligomerisation and substrate recognition sites of small heat shock proteins by peptide arrays. **Biochemical and Biophysical Research Communications**; 325:401-407, 2004.

LEWIS, U. J.; SINGH, R. N.; SEAVEY, B. K.; Human prolactin: isolation and some properties. **Biochem Biophys Res Commun**; 44(5):1169-76, 1971.

LINDQUIST, S. CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annu Rev Genet**; 22: 631-677, 1988.

LINGUAGEM MÉDICA, 3a. ed., Goiânia, **AB Editora e Distribuidora de Livros Ltda**, 2004.

LIU, Y.; RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON,W.; MUHKERJEE, B.; BROWNLEE, M.; EDELSTEIN, D.; FEDEROFF, H. J. Human Gene Therapy, 7(14): 1719-1726. **doi**:10.1089/hum.1996.7.14-1719, 1996.

LOS, M.; WESSELBORG, S.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. **Immunity.**;10(6):629-39, 1999**.**

LUKIC, M.L.; STOSIC-GRUJCIC, S.; Shahin, A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. **Dev. Immunol**., 6: 119-128, 1998.

MacDONALD, P.E.; WHEELER, M.B.; Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. **Diabetologia**, 46(8):1046-1062, 2003.

MADDIKA, S.; ANDE, S.R.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHY, T.; WEGLARCZYK, K.; ZUSE, A.; ESHRAGHI, M.; MANDA, K.D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected. **Drug Resist Updates**, 10 (1-2) 13-29, 2007.

MANDRUP-POULSEN, T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. **Diabetologia**, v. 39, n. 9, p. 1005-1029, 1996.

MANDRUP-POULSEN, T. β-Cell apoptosis: stimuli and signaling. **Diabetes**, v50, S1, 2001.

MARIA-ENGLER, S. S.; CORREA-GIANNELLA, M. L.; LABRIOLA, L.; KROGH, K.; COLIN, C.; LOJUDICE, F. H.; AITA, C. A.; DE OLIVEIRA, E. M.; CORREA, T. C.; DA SILVA, I. C.; GENZINI, T.; DE MIRANDA, M. P.; NORONHA, I. L.; VILELA, L.; COIMBRA, C. N.; MORTARA, R. A.; GUIA, M. M.; ELIASCHEWITZ, F. G.; SOGAYAR, M. C. Co-localization of nestin and insulin and expression of islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell cultures. **J Endocrinol**, v. 183, n. 3, p. 455-467, 2004.

MASTRANDREA, L.; YU, J.; BEHRENS, T.; BUCHLIS, J.; ALBINI, C.; FOURTNER, S.; QUATTRIN, T. Etanercept treatment in children with new-onset type 1 diabetes: pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Diabetes Care**, v. 32, n. 7, p. 1244-1249, 2009.

MATHERS, W.D.; STOVALL, D.; LANE, J.A.; ZIMMERMAN, M.B.; JOHNSON, S. Menopause and tear function: the influence of prolactin and sex hormones on human tear production. **Cornea**;17(4):353-358, 1998.

MEGLASSON, M. D.; MANNING, C. D.; NAJAFI, H.; MATSCHINSKY, F. M. Glucose transport by radiation-induced insulinoma and clonal pancreatic beta-cells. **Diabetes**, v. 35, n.12, p. 1340-1344, 1986.

MEHLEN, P.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; ARRIGO, A. P. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. **J Cell Chem**; 271:16510-16514, 1996.

MIKHAILOV, V.; MIKHAILOVA, M.; PULKRABEK, D. J.; DONG, Z.; VENKATACHALAM, M. A.; SAIKUMAR, P. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. **J Biol Chem**, v. 276, n. 21, p. 18361-18374, 2001.

MIZUNO, N.; YOSHITOMI, H.; ISHIDA, H.; KUROMI, H.; KAWAKI, J.; SEINO, Y.; SEINO, S. Altered bcl-2 and bax expression and intracellular Ca2+ signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose-induced insulin secretion. **Endocrinology**, v.139, n. 3, p. 1429-1439, 1998.

MOLINA, P.E. Endocrine Physiology**. Lange Physiology Books**/**McGraw Hill**, 2004.

MORAES, P. Panorama da Diabetes Mellitus Tipo 1. Diabetes, **Sociedade Brasileira de Diabetes**,v19(3);6-7, 2012.

NIELSEN, J. H.; GALSGAARD, E. D.; MOLDRUP, A.; FRIEDRICHSEN, B. N.; BILLESTRUP, N.; HANSEN, J. A.; LEE, Y. C.; CARLSSON, C. Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. **Diabetes**, v. 50 Suppl 1, n., p. S25-29, 2001.

NIELSEN, K.; KARLSEN, A. E.; DECKERT, M.; MADSEN, O. D.; SERUP, P.; MANDRUP-POULSEN, T.; NERUP, J. Beta-cell maturation leads to in vitro sensitivity to cytotoxins. **Diabetes**, v. 48, n. 12, p. 2324-2332, 1999.

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-1beta. **Diabetologia**, v. 47, n. 1, p. 62-74, 2004.

OKADA, H.; KUHN, C.; FEILLET, H.; BACH, J-F. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update **Clin Exp Immunol.,** 160(1): 1–9, 2010.

ORCI, L.; RAVAZZOLA, M.; STORCH, M. J.; ANDERSON, R. G.; VASSALLI, J.D, PERRELET, A. Proteolytic maturation of insulin is a post-Golgi event which occurs in acidifying clathrin-coated secretory vesicles. *Cell* , 49(6):865-868, 1987.

ORTIS, F.; PIROT, P.; NAAMANE, N.; KREINS, A. Y.; RASSCHAERT, J.; MOORE, F.; THEATRE, E.; VERHAEGHE, C.; MAGNUSSON, N. E.; CHARIOT, A.; ORNTOFT, T. F.; EIZIRIK, D. L. Induction of nuclear factor-kappaB and its downstream genes by TNF-alpha and IL-1beta has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 51, n. 7, p. 1213-1225, 2008.

PANDEY, P.; FARBER, R.; NAKAZAWA, A.; et al. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. **Oncogene**; 19: 1975-1981, 2000.

PARSONS, T. D.; COORSSEN, J. R.; HORSTMANN, H.; ALMERS, W. Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. **Neuron**, v. 15, n. 5, p.1085-1096, 1995.

PAULI, D.; ARRIGO, A.P.; VASQUEZ, J.; TONKA, C. H.; TISSIERES, A. Expression of the small heat shock genes during Drosophila development: Comparison of the accumulation of hsp23 and hsp27 mRNAs and polypeptides. **Genome**; 31:671-676, 1989.

PEREIRA, C. A.; POULIQUEN, Y.; RODAS, V.; MASSOTTE, D.; MORTENSEN, C.; SOGAYAR, M. C.; MENISSIER-DE MURCIA, J. Optimized insect cell culture for the production of recombinant heterologous proteins and baculovirus particles. **Biotechniques**, v.31, n. 6, p. 1262, 1264, 1266, 1268, 2001.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PICKERSGILL, L. M.; MANDRUP-POULSEN, T. R. The anti-interleukin-1 in type 1 diabetes action trial--background and rationale. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 25, n. 4, p. 321-324, 2009.

RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W. L.; SHI, Y.; MORGAN, A. R.; BLEACKLEY, R. C. DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. **Diabetologia**, v. 37, n. 8, p. 733-738, 1994.

RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W.; STRYNADKA, K.; JU, Q.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M.; KORBUTT, G. S.; RAJOTTE, R. V. Transfection of human pancreatic islets

with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction. **Diabetes**, v. 48, n. 6, p. 1223-1229, 1999.

RAO, D. D.; VORHIES, J. S.; SENZER, N.; NEMUNAITIS, J. siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. Advance Drug Delivery Reviews. 61, 746-759, 2009.

RASMUSSEN, L. D.; EKELUND, F.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J.; JOHNSEN, K. Group-Specific PCR Primers to Amplify 24S a-Subunit rRNA Genes from Kinetoplastida (Protozoa) Used in Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Microb Ecol**, v. 42, n. 2, p. 109-115, 2001.

REN, J.; JIN, P.; WANG, E,; LIU, E.; HARLAN, D. M.; LI, X.; STROCEK, D. F.; Pancreatic islet cell therapy for type I diabetes: understanding the effects of glucose stimulation on islets in order to produce better islets for transplantation. Journal of Translational Medicine, 5:1, 2007.

RICORDI, C.; LACY, P. E.; FINKE, E. H.; OLACK, B. J.; SCHARP, D. W. Automated method for isolation of human pancreatic islets. **Diabetes**, v. 37, n. 4, p. 413-420, 1988.

ROEP, B.O.; GEPTS. W.;, LECOMPTE, P.M. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. **Diabetologia,** 46(3):305-21, 2003.

RUI, H.; KIRKEN, R.A.; FARRAR, W.L. Activation of receptor-associated tyrosine kinase JAK2 by prolactin. **J Biol Chem;** 269:5364–5368, 1994.

RYAN, E. A.; PATY, B. W.; SENIOR, P. A.; BIGAM, D.; ALFADHLI, E.; KNETEMAN, N. M.; LAKEY, J. R.; SHAPIRO, A. M. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2060-2069, 2005.

SÁ, J.R.; GONZALEZ, A. M.; MELARAGNO, C. S.; SAITOVICH, D.; FRANCO, D. R.; RANGEL, E. B.; NORONHA, I. L.;[et al.]; ELIASCHEWITZ, F. G. Transplante de Pâncreas e de Ilhotas em Potadores de Diabetes Melito. **Rev. Assoc. Med. Bras**. vol.45 n.2 São Paulo Apr./June 1999.

SAMALI, A.; ROBERTSON, J. D.; PETERSON, E.; MANERO, F.; van ZEIJL, L.; PAUL, C.; COTGREAVE, I. A.; ARRIGO, A.P.; ORRENIUS, S. Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli.**Cell Stress Chaperones**, 6(1): 49–58, 2001.

SAPIN, R.; LE GALUDEC, V.; GASSER, F.; PINGET, M.; GRUCKER, D. Elecsys insulin assay: free insulin determination and the absence of cross-reactivity with insulin lispro. **Clin Chem**, v. 47, n. 3, p. 602-605, 2001.

SBD-SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. www.diabetes.org.br , 2013.

SCHINDLER, C.; DARNELL, J. E., JR. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. **Annu Rev Biochem**, v. 64, n., p. 621-651, 1995.

SCOTT, C.R.; SMITH, J.M.; CRADOCK, M.M.; PIHOKER, C. Characteristics of youth-onset noninsulin-dependent diabetes mellitus and insulin-dependent diabetes mellitus at diagnosis. **Pediatrics**, 100:84-91, 1997.

SHAPIRO, A. M.; LAKEY, J. R.; 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 mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. **N Engl J Med**, v. 343, n. 4, p. 230-238, 2000.

STETLER, R. A.; GAO, Y.; ZHANG, L.; WENG, Z.; ZHANG, F.; HU, X.; WANG, S.; VOSLER, P.; CAO, G.; SUN, D.; GRAHAM, S. H.; CHEN, J. Phosphorylation of HSP27 by protein kinase D is essential for mediating neuroprotection against ischemic neuronal injury. **J Neurosci.** Feb 22;32(8):2667-82. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5169-11, 2012.

STOUT, L. E.; SVENSSON, A. M.; SORENSON, R. L. Prolactin regulation of islet-derived INS-1 cells: characteristics and immunocytochemical analysis of STAT5 translocation. **Endocrinology**, v. 138, n. 4, p. 1592-1603, 1997.

SUK, K.; KIM, S.; KIM, Y. H.; KIM, K. A.; CHANG, I.; YAGITA, H.; SHONG, M.; LEE, M. S. IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. **J Immunol**, v.166, n. 7, p. 4481-4489, 2001.

SUGUYAMA, Y.; SUZUKI, A.; KISHIKAWA, M.; AKUTSU, R.; HIROSE, T.; WAYE, M. M.; et al. Muscle develops a specific form of small heat-shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**; 275:1095-1104, 2000.

TATTERSALL, R. Brittle diabetes. **Clin Endocrinol Metab**.;6(2):403-19, 1977

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** (Berlin), v. 54, p. 1388-1397, 2011.

TERRA, L. F.; TEIXEIRA, P. C.; **WAILEMANN, R. A**.; ZELANIS, A.; Palmisano, G.; Cunha-Neto, E.; Kalil, J.; Larsen, M. R.; Labriola, L.; PhD; Sogayar, M. C. Identification of Differentially Expressed Proteins in Human Beta-Cells-Enriched Pancreatic Islet Cultures

and Human Insulinomas. **Elsevier Editorial System(tm) for Molecular and Cellular Endocrinology**; Manuscript Number: MCE-D-13-00134R1

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.

TISCORNIA, G., SINGER, O., VERMA, I. M. Production and purification of lentiviral vectors**.** **doi**: 10.1038/nprot.2006.37, 2006a.

TISCORNIA, G., SINGER, O., VERMA, I. M. Design and cloning of lentiviral vectors expressing small interfering RNAs; **doi**: 10.1038/nprot.2006.36, 2006b.

TISSIERES, A.; MITCHEL, H. K.; TRACY, U. M. Protein synthesis in salivary glands of Dorsophila melanogaster: Relalation to chromossome puffs. **Journal of Molecular Biology**; 85:389-398, 1974.

TODD, J. A.; Etiology of type 1 diabetes. **Immunity**, 23;32(4):457-67, 2010.

TRAUTMANN, M. E.; WOLLHEIM, C. B. Characterization of glucose transport in an insulin-secreting cell line. **Biochem J**, v. 242, n. 3, p. 625-630, 1987.

UNO, S.; IMAGAWA, A.; OKITA, K.; SAYAMA, K.; MORIWAKI, M.; IWAHASHI, H.; YAMAGATA, K.; TAMURA, S.; MATSUZAWA, Y.; HANAFUSA, T.; MIYAGAWA, J.; SHIMOMURA, I. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n. 3, p. 596-601, 2007.

VAN MONTFORT, R.; SLINGSBY, C.; VIERLING, E. Structure and function of small heat-shock protein/ alpha-crytallin family of molecular chaperonas. **Advances in Protein Chemitry**; 59:105-156, 2001.

van NOORT J. M.; BSIBSI, M.; NACKEN, P.; GERRITSEN, W.H.; AMOR, S. The link between small heat shock proteins and the immune system. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**; 44: 167–1679, 2012.

VERNA, C.; MARTINS, F. W.; MOSQUETTE, R.; SIMÕES, R. S.; SIMÕES, M. J.; SOARES JR, J. M.; BARACAT, E. C. Efeito da hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida na glândula lacrimal: estudo experimental. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**. vol.27 no.9 Rio de Janeiro, 2005**.**

VERSPOHL, E. J.; TOLLKUHN, B.; KLOSS, H. Role of tyrosine kinase in insulin release in an insulin secreting cell line (INS-1). **Cell Signal**, v. 7, n. 5, p. 505-512, 1995.

VOSS, O. H.; BATRA, S.; KOLATTUKUDY, S. J.; GONZALEZ-MEJIA, M. E.; JEFFREY, B. 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*. **The Journal of Biological Chemistry.** v.282, NO. 34, pp. 25088–25099, 2007.

WALSH, T.J.; EGGLESTON J.C.; CAMERON, J.L. Portal hypertension, hepatic infarction, and liver failure complicating pancreatic islet autotransplantation. **Surgery;** 91:485–487, 1982.

WEINHAUS, A. J.; BHAGROO, N. V.; BRELJE, T. C.; SORENSON, R. L. Dexamethasone counteracts the effect of prolactin on islet function: implications for islet regulation in late pregnancy. **Endocrinology**, v. 141, n. 4, p. 1384-1393, 2000.

WEINHAUS, A. J.; STOUT, L. E.; SORENSON, R. L. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p. 1640-1649, 1996.

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. **J Endocrinol**, v. 193, n. 3, p. 367-381, 2007.

WENZLAU, J. M.; JUHL, K.; YU, L.; MOUA, O.; SARKAR, S. A.; GOTTLIEB, P.; REWERS, M.; EISENBARTH, G. S.; JENSEN, J.; DAVIDSON, H. W.; HUTTON, J. C. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 43, p. 17040-17045, 2007.

WHO- World Health Organization; February 28th, 2012, http:www.who.int

WHO- Diamond Project Group. WHO Multinational Project for Childhood Diabetes. **Diabetes Care**;13: 1062-8, 1990.

WHO- Diamond Project Group. Incidence and trends of chilhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. **Diabet Med**;23(8):857-66, 2006.

YAMAMOTO, T.; MITA, A.; RICORDI, C.; MESSINGER, S.; MIKI, A.; SAKUMA, Y.; TIMONERI, F.; BARKER, S.; FORNONI, A.; MOLANO, R. D.; INVERARDI, L.; PILEGGI, A.; ICHII, H. Prolactin supplementation to culture medium improves beta-cell survival. **Transplantation**, v. 89, n. 11, p. 1328-1335, 2010.

YOKOTA, S.; YOKOSAWA, N.; KUBOTA, T.; OKABAYASHI, T.; ARATA, S.; FUJII, N. Suppression of thermotolerance in mumps virus-infected cells is caused by lack of HSP27 induction contributed by STAT-1**. J Biol Chem,** Oct 24;278(43):41654-60, 2003.

.ZANTEMA, A.; VERLAAN-De VRIES, M.; MAASDASM, D.; BOL, S.; v der E. A. Heat shock protein 27 and alpha B-crytallin can form a complex, which dissociates by heat shock. **J Biol Chem** 1992; 267: 12936-12941, 1992.

ZHA, H., AIME-SEMPE, C., SATO, T. & REED, J. C. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. J. Biol. Chem. 271, 7440–7444 (1996).