UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FÁBIO FERNANDO ALVES DA SILVA

**Avaliação do papel de HSPB1 na modulação da
autofagia induzida por PRL em células-beta**

Versão original corrigida da dissertação

São Paulo

Data do depósito na SPG:

30/05/2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FÁBIO FERNANDO ALVES DA SILVA

**Avaliação do papel de HSPB1 na modulação da
autofagia induzida por PRL em células-beta**

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

Orientadora: Profª Drª Letícia Labriola

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Silva, Fábio Fernando Alves da

S586p Avaliação do papel de HSPB1 na modulação da autofagia induzida por PRL em células-beta / Fábio Fernando Alves da Silva. -- São Paulo, 2018. 100p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
Departamento de Bioquímica.

Orientador : Labriola, Letícia

1. Biologia celular 2. Autofagia 3. Diabetes Tipo 1 4. Prolactina 5. HSPB1 I. T. II.
Labriola, Letícia, orientador.

574.87 CDD

**Primeiramente a Deus, pois sem ele nada do que existe haveria
Aos meus amados pais Maria do Socorro e Luiz Carlos
A minha linda irmã Flávia**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Deus, por que dele, por ele e para ele são todas as coisas.

Agradeço a professora Dr(a) Letícia Labriola, que tão gentilmente me recebeu no laboratório. Agradeço pela paciência e dedicação a esse projeto. Obrigado por me ensinar as técnicas do laboratório, me ensinar como ser crítico, metódico e ético na pesquisa científica. Poucos sabem mas quando cheguei em São Paulo – SP para fazer o mestrado em Bioquímica, eu passei alguns meses sem bolsa e a professora Letícia teve a bondade de me ajudar, inclusive doando alguns casacos no período de inverno (“muito obrigado Letícia”). Obrigado pelas palavras de incentivo e pelas críticas construtivas quando necessário, por ser uma ótima orientadora, e também por me ajudar em decisões difíceis e me ensinar princípios de vida que guardo comigo, seus conselhos foram de grande valia e sem sobra de dúvidas, vou levar comigo para sempre. A sua postura e amor a ciência é uma inspiração, não apenas para mim, mas para todos do laboratório.

Agradeço aos meus colegas do laboratório; Dr(a) Leticia Terra, Dr(a) Ancély Ferreira dos Santos, Me. Rosangela Aparecida Wailemann Mansano, Me. Vinícius de Moraes Gomes, Me. Daria Raquel Queiroz de Almeida, Talita Crisitina Oliveira e Augusto César Zago Alves. Sem a ajuda de vocês a realização dessa dissertação seria inviável. Obrigado por me ensinarem as técnicas do laboratório, pelas discussões sobre os resultados e pelas palavras de incentivos frente aos desafios da qualificação, dos resultados, das matérias e na defesa. Foi uma honra participar do Laboratório de Mecanismos Moleculares de Citoproteção do Instituto de Química juntamente com vocês.

A prof(a). Dr(a). Bettina Malnic e ao pessoal do Laboratório de Neurociência Molecular pelo uso do microscópio de fluorescência que foi fundamental para a obtenção de resultados para esse projeto. Assim como ao prof. Dr. Maurício da Silva Baptista e a todo o pessoal do Laboratório de Processos fotoinduzidos e Interfases pelo uso do fotodocumentador, também essencial para a realização desse projeto.

Agradeço a minha família, ao meu pai Luiz Carlos, que sempre foi meu exemplo de dedicação, foco, trabalho duro, honestidade, caráter e fidelidade a Deus e a família. A minha mãe Maria do Socorro, que sempre será a mulher mais linda do mundo, a

minha melhor amiga, minha melhor psicóloga, terapeuta, medica, radialista, meu exemplo de amor a Deus e caráter, honestidade e fé. Vocês são minha base, com vocês eu aprendi princípios que levo comigo e os defendo onde estiver, nossa sociedade seria mais justa e moral se existissem mais pais como vocês, que saibam corrigir quando preciso e amar em todo o tempo. A minha irmã Flávia Fernanda, que sempre esteve ao meu lado e cuidou de mim, antigamente me defendendo dos valentões da escola e hoje me aconselhando e orando por mim (a vida não teria graça sem você). Foram vocês, família, que sempre me apoiaram e abraçaram esse projeto junto comigo, sem o incentivo, financiamento e sacrifícios feitos por vocês, esse projeto nunca aconteceria. Como disse também na minha monografia, esse conquista pertence a vocês, por que sem vossa ajuda eu nunca chegaria aqui, desta forma quero não apenas dedicar esse trabalho a vocês mas também compartilhar essa conquista, afirmando que vocês tiveram uma grande parcela de contribuição nele. Amo muito vocês, sinto saudades todos os dias, e mesmo que a distância nos separe, estaremos sempre juntos, pensando e orando um pelo outro.

Agradeço aos meus amigos em Serranópolis, Pr. Cleosmar, Raimundo, Abiezer, Ebenezer, Aline, Natália, Cleosmar Junior, Juliane, Frank, que me incentivaram nesse projeto e oraram por mim. E aos amigos que fiz em São Paulo durante esse período, principalmente aos da igreja Assembleia de Deus – Belém Pinheiros. Vocês me acolheram como um irmão, estiveram sempre ao meu lado e me apoiaram em tudo. Obrigado Mateus, Camila, Everton, Ângela, Ruth, Leonardo, Rafael, Tallyson, Jéniffer, Gabrielly Pâmela, Lídia, Carol e tantos outros que tiveram paciência de me ouvir em períodos difíceis e me incentivar sempre.

Não poderia deixar de agradecer ao Instituto de Química e a Universidade de São Paulo pela oportunidade e as agências de fomento Fundação para o Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP. Processo nº: 2016/07470-0), Capes e CNPq, pelo financiamento do projeto e pela bolsa.

“If you can’t fly then run, If you can’t run then walk, If you can’t walk then crawl, but whatever you do, you have to keep moving forward.”

- Martin Luther King

RESUMO

SILVA, F. F. A. **Avaliação do papel de HSPB1 na modulação da autofagia induzida por PRL em células-beta.** 2018. 100p. Dissertação – Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

O diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença metabólica, caracterizada pela desregulação glicêmica, que ocorre devido a um ataque autoimune. A insulinoaterapia é o tratamento clássico para o DM1. Contudo, alguns pacientes que apresentam essa doença não respondem de forma eficiente a este tratamento e apresentam episódios frequentes de hipoglicemia severa e despercebida (pacientes hiperlábeis). Essas complicações comprometem de forma significativa a qualidade de vida dessas pessoas. O transplante de ilhotas é uma importante alternativa para o tratamento de pacientes hiperlábeis com DM1. No entanto, essa terapia apresenta restrições como a necessidade de mais de um doador por transplante e significativa morte das ilhotas devido ao estresse provocado pelo procedimento de isolamento, além da morte promovida pelo sistema imune do paciente nos primeiros momentos pós-transplante. A autofagia é um mecanismo de reciclagem de componentes citoplasmáticos que é fundamental para a homeostase celular. Em condições de estresse, este mecanismo é ativado acima do seu nível basal, promovendo a degradação de agregados proteicos e organelas defeituosas, evitando assim, danos celulares que comprometam a viabilidade da célula. Trabalhos realizados por nosso grupo têm mostrado a citoproteção que PRL promove em células-beta, reduzindo a apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias. Também demonstramos o papel essencial de HSPB1 na inibição de apoptose induzida por PRL após o tratamento com citocinas. Além disso, resultados recentes de nosso laboratório mostraram um aumento nos níveis de autofagia em células-beta após sua exposição a citocinas, bem como uma restauração a níveis normais na presença de PRL. Visando um melhor entendimento do papel da PRL na modulação da autofagia em células-beta, o objetivo desse projeto foi estudar se HSPB1 também é essencial no mecanismo de regulação da autofagia induzido por PRL.

Para tal, fizemos experimentos em modelos de células-beta MIN6, MIN6 silenciadas para HSPB1 (MIN6-shHSPB1) e MIN6 com sequência “short hairpin” aleatória (MIN6-SsC), medindo a morte celular através de ensaios de viabilidade, e ensaios de western blot para avaliar os níveis de marcadores de autofagia e fluxo autofágico (degradação de autofagossomos), tratando as células com citocinas, prolactina e indutores ou inibidores de autofagia. Os resultados mostraram que a modulação da autofagia ocasionada pela prolactina em células-beta se dá, em parte, através de HSPB1. O tratamento com prolactina foi capaz de inibir a morte celular induzida por citocinas, mesmo na presença de cloroquina, um bloqueador de autofagia, o que nos levou a concluir que a autofagia não é uma via envolvida na citoproteção de células beta induzida por PRL.

Os resultados gerados nesse estudo contribuíram para uma melhor compreensão dos eventos moleculares induzidos por PRL em células-beta, e poderão permitir a inferência de novas abordagens que melhorem a citoproteção, cultura e transplante dessas células em pacientes com diabetes tipo 1.

Palavras chaves: Diabetes tipo 1, Prolactina, HSPB1, autofagia.

ABSTRACT

SILVA, F. F. A. **Unveiling the role of HSPB1 in PRL-induced autophagy modulation in beta-cells.** 2018. 100p. Masters Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Type 1 diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by glycemic dysregulation, which occurs due to an autoimmune destruction of beta-cells. Insulin therapy is the gold standard treatment for DM1. However, some DM1 patients do not respond efficiently to this treatment and suffer frequent episodes of severe hypoglycemia unawareness. Since this complication jeopardizes the quality of life of these people, Islet transplantation is a therapeutic alternative indicated to treat these patients. However, besides the lack of enough organ donors, the loss of beta cells during both the isolation as well as the infusion of islets into the recipient induce a great estresse and thus a significant cell death is one of the drawbacks of this procedure.

Autophagy is a mechanism of recycling cytoplasmic components and is essential for cellular homeostasis. Under estresse conditions, this mechanism is activated above basal levels, promoting the degradation of protein aggregates and defective organelles, thus avoiding cell damage that could compromise cell viability. Studies carried out by our group have shown not only that PRL promotes cytoprotection in beta-cells, reducing pro-inflammatory cytokines-induced apoptosis, but also that HSPB1 plays an essential role in this inhibition of apoptosis mediated by PRL after treatment with cytokines. Moreover, recent results from our laboratory showed an increase in autophagy levels in beta-cells after exposure to cytokines, as well as a restauration to normal levels in the presence of PRL. In order to better understand the role of PRL in the modulation of autophagy in these cells, the aim of this project is to study whether HSPB1 is also essential in the mechanism of autophagy regulation induced by PRL.

Using MIN6 beta cell models where HSPB1 was silenced (MIN6-shHSPB1) or not (MIN6-SsC), we studied cell death by viability assays. Moreover, western blot assays were performed in order to assess levels of autophagy and autophagic flux markers in the cells.

Our results showed that HSPB1 is one of the mediators of PRL-induced modulation of autophagy. Nevertheless, since hormonal treatment was still able to inhibit cytokines-induced cell death even in the presence of chloroquin, an autophagy blocker, we conclude that autophagy is not a signaling pathway involved in PRL-induced beta-cell cytoprotection.

Altogether, the results shown in this study may help to increase the knowledge of the molecular events induced by PRL in beta-cells, and may allow to infer new approaches to improve cytoprotection, culture and transplantation of these cells into type 1 diabetic patients.

Keywords: Type 1 diabetes, Prolactin, HSPB1, autophagy.

Lista de abreviaturas e siglas

%	porcentagem
3-MA	3-Methyladenine
4E-BP1	<i>4E-Binding Protein 1</i>
aa	aminoácido
ACD	<i>autophagic cell death</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>
AKT	<i>AKT Serine/Threonine Kinase</i>
AMPK	<i>AMP-Activated Protein Kinase</i>
ANOVA	Análise de Variância
APAF1	<i>Apoptotic Peptidase Activating Factor-1</i>
ATG	<i>autophagy-related proteins</i>
ATG12	<i>Ubiquitin-like protein ATG12</i>
ATG13	<i>Autophagy-related protein 13</i>
ATG14	Beclin 1-associated autophagy-related key regulator
ATG16	<i>Autophagy protein 16</i>
ATG101	<i>Autophagy-related protein 101</i>
ATG4	<i>Cysteine protease ATG4</i>
ATG5	<i>Autophagy Related 5</i>
ATG7	<i>Autophagy Related 7</i>
ATP	<i>Adenosina trifosfato</i>
BAG3	<i>BAG Family Molecular Chaperone Regulator 3</i>
BAK	<i>BCL2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL2L2	<i>BCL2 Like 2</i>
BCL2LI	<i>BCL2 Like 1</i>
BCL-XL	<i>BCL extra large</i>
Beclin1	<i>Coiled-Coil, Moesin-Like BCL2 Interacting Protein</i>
BH	<i>BCL2 homology domains</i>
BH1	<i>BCL2 homology domains 1</i>

BH2	<i>BCL2</i> homology domains 2
BH3	<i>BCL2</i> Homology Domains 3
BH4	<i>BCL2</i> homology domains 3
BID	<i>BH3</i> interacting domain death agonist
BSA	Bovine Serum Albumine
Caspase	Cysteine-dependent aspartate-specific proteases
CCL3	C-C Motif Chemokine Ligand 3
CCL4	C-C Motif Chemokine Ligand 4
CD95	<i>CD95</i> antigen
cIAP	celular IAP
CIAP1	cellular IAP 1
CIAP2	cellular IAP 1
CITR	Collaborative Islet Transplant Registry
cm ²	Centímetros quadrados
CQ	Cloroquina
Ctrol	Controle
CXCL11	C-X-C Motif Chemokine Ligand 11
Cyt	Citocinas
DIABLO	Direct IAP-Binding Protein with Low <i>pI</i>
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
dL	decilitro
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
EPM	Erro Padrão da Média
FADD	Fas-Associated Death Domain
Fas	Fas Cell Surface Death Receptor
FIP200	FAK family – interacting protein of 200 kD
GLUT1	Glucose Transporter 1

GLUT2	<i>Glucose Transporter 2</i>
h	hora
HDAC6	<i>Histone deacetylase 6</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HO	Hoescht
HRP	horseradish peroxidase
HSC70	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HSP27	<i>Heat Shock Protein 27</i>
HSP40	<i>Heat shock 40kDa proteins</i>
HSP60	<i>Heat shock 60kDa proteins</i>
HSP70	<i>Heat shock 70kDa proteins</i>
HSPB1	<i>Heat Shock Protein Beta 1</i>
HSPB10	<i>Heat shock protein beta-10</i>
HSPB2	<i>Heat shock protein beta-2</i>
HSPB3	<i>Heat shock protein beta-3</i>
HSPB4	<i>Heat shock protein beta-4</i>
HSPB5	<i>Heat shock protein beta-5</i>
HSPB6	<i>Heat shock protein beta-6</i>
HSPB7	<i>Heat shock protein beta-7</i>
HSPB8	<i>Heat shock protein beta-8</i>
HSPB9	<i>Heat shock protein beta-9</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i>
IDF	<i>Internacional Diabetes Federation</i>
IFN γ	<i>Interferon-γ</i>
III PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3</i>
IL1 β	Interleucina-1 β
INS-1E	células derivadas de insulinoma de rato
IPITA	<i>International Pancreas and Islet Transplant Association</i>
IRF-3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
IRS	<i>Insulin receptor Substrate</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>

JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	quilodalton
KFERQ	lisina, fenilalanina, glutamato, arginina, glutamina
L	litro
LAMP2A	<i>Lysosome-associated membrane glycoprotein 2</i>
LC3	<i>Autophagy-Related Protein LC3</i>
LC3-II	LC3 conjugado com fosfatidiletanolamina
mA	miliampere
MAP1LC3	<i>Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
MDA-5	<i>Melanoma Differentiation-Associated Protein 5</i>
mg	miligrama
MHC-I	<i>major histocompatibility complex class I</i>
min	minuto
MIN6	Linhagem celular derivada de um insulinoma de camundongo
mL	mililitro
mLST8	<i>mammalian lethal with Sec13 protein 8</i>
mM	milimolar
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane</i>
mRNA	<i>RNA mensageiro Permeabilization</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NAD ⁺	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
Nek	<i>NIMA Related Kinase</i>
NF-kB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
ng	nanograma
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NLR	<i>NLR Family CARD Domain-Containing Protein 3</i>
nM	nanomolar
NO	<i>Nitric Oxide</i>
NRB1	<i>Next to BRCA1 gene 1 protein</i>

°C	graus Celsius
p-4EBP1	<i>Phosphorylated 4E-binding protein 1</i>
p62	<i>62 KDa protein</i>
PARP-1	<i>Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1</i>
PBSA	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDI	Proteína Dissulfeto Isomerase
PERK	<i>Pancreatic ER kinase (Protein Kinase RNA-activated)-like</i>
ER kinase	
pH	potencial hidrogeniônico
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
p-mTOR	<i>Phosphorylated Mammalian Target of Rapamycin</i>
PP	Polipeptídeo pancreático
PRL	Prolactina
PRLR	<i>Prolactin Receptor</i>
PRR	<i>patters-recognition receptors</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
Rac1	<i>Rac Family Small GTPase 1</i>
Rapa	Rapamicina
RAPTOR	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RIG1	<i>Probable ATP-Dependent RNA Helicase DDX58</i>
RIP1	<i>Receptor Interacting Protein 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute médium</i> (Meio de cultura
para células MIN6)	
s	segundo
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
scA	<i>Scramble A</i>
scC	<i>Scramble C</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SFB	Soro Fetal Bovino

sh	<i>short hairpin</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
sHSP	<i>Small heat shock protein</i>
SMAC	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase</i>
SNARE-like receptors	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein</i>
SQSTM1	<i>Sequestosome-1</i>
Src	<i>SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase</i>
SRP	<i>signal recognition particles</i>
STAT1	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 1</i>
STAT2	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 2</i>
STAT3	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 3</i>
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
tBID	<i>truncated BID</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNFR	<i>TNF Receptor</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TRADD	<i>TNFR-Associated Death Domain</i>
TRAILR	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
U	<i>Unidades</i>
UA	<i>Unidades Arbitrárias</i>
UBD	<i>Ubiquitin binding domain</i>
ULK	<i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase</i>
ULK1	<i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1</i>
ULK2	<i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 2</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UPS	<i>ubiquitin proteasome system</i>
V	<i>veículo</i>
Vav2	<i>Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 2</i>
VDAC	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 1</i>
VPS13	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 13</i>
VPS34	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase VPS34</i>
WB	<i>Western Blot</i>

XIAP	<i>X linked IAP</i>
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrometro
µM	micromolar

Lista de figuras

FIGURA 1: Localização anatômica do pâncreas.....	23
FIGURA 2: Anatomia do pâncreas.....	24
FIGURA 3: Produção de insulina a partir de pré-proinsulina.....	26
FIGURA 4: Mecanismo molecular de morte celular por apoptose.....	31
FIGURA 5: Mecanismo de transdução de sinal da prolactina.....	36
FIGURA 6: Mecanismo de ação da autofagia.....	42
FIGURA 7: Mecanismos moleculares da autofagia.....	44
FIGURA 8: Prolactina não protege células MIN6 contra a morte provocada por inibição da autofagia.....	56
FIGURA 9: Prolactina não protege células MIN6-SsC contra a morte quando a autofagia esta inibida.....	58
FIGURA 10: HSPB1 não está envolvida na inibição de morte induzida por modulação da autofagia.....	60
FIGURA 11: Modulação da razão LC3-II/LC3-I em células MIN6 e MIN6-SsC, na presença ou na ausência de prolactina.....	62
FIGURA 12: Modulação da razão LC3-II/LC3-1 em células MIN6-shHSPB1, na presença ou ausência de prolactina.....	63
FIGURA 13: Prolactina não modula o fluxo autofágico em células MIN6 e MIN6-SsC.....	64
FIGURA 14: HSPB1 induzida por Prolactina não modula o fluxo autofágico em células MIN6.....	65

Lista de tabelas

TABELA 1: Efeitos da insulina no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas.....	27
---	----

SUMÁRIO

1. Introdução	23
1.1 Pâncreas	23
1.2 Ilhotas pancreáticas	24
1.3 Apoptose	28
1.4 <i>Diabetes mellitus</i>	31
1.5 <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1	32
1.6 Transplante de ilhotas pancreáticas	34
1.7 Prolactina	35
1.8 HSPB1	39
1.9 Autofagia	41
1.10 Autofagia em células-beta	46
1.11 Relação entre prolactina em células-beta, HSPB1 e autofagia	47
2. Objetivos	49
2.1 Objetivo geral	49
2.2 Metas específicas	49
3. Materiais e Métodos	50
3.1 Linhagens celulares	50
3.2 Tratamentos de células	51
3.3 Viabilidade celular por Hoescht (HO) e Iodeto de Propídeo (PI)	51
3.4 Ensaio de Western Blot	52
3.5 Análise dos dados estatísticos	53
4. Resultados	54
5. Discussão	66
6. Conclusões	71
7. Referências Bibliográficas	72
8. Súmula Curricular	94

1.INTRODUÇÃO

1.1 Pâncreas

O pâncreas é um órgão glandular que faz parte do sistema digestório, localizado na cavidade abdominal, macroscopicamente dividido em três regiões principais; a cabeça, o corpo e a cauda. A cabeça do pâncreas é a região em forma de “C” ligada à curvatura superior do duodeno. O corpo do pâncreas está localizado abaixo da extensão do estômago horizontalmente no plano medial, cruzando com a artéria e veia mesentérica superior, aorta abdominal, veia cava inferior e veia porta. A cauda do pâncreas liga-se ao hilo do baço (Bockman, 1993; Case, 2006; Dolen & Rupnik, 2015; Ogilvie, 1937; Rahier, Wallon, & Henquin, 1981). É innervado por fibras simpáticas (nervo esplênico) e parassimpáticas (nervo vago). Apresenta um sistema de fluxo sanguíneo formado por artérias originadas da artéria celíaca e mesentérica superior que drenam o seu conteúdo para a veia porta-hepática (figura 1) (Matsunaga et al., 2009).

FIGURA 1: Localização anatômica do pâncreas. O pâncreas é um órgão glandular localizado na cavidade abdominal, macroscopicamente dividido em cabeça, corpo e cauda. Adaptado de: <https://kankeroperatie.nl/alveesklier/nieuws/alveesklier-algemeen/>. Acesso em 12/04/2018.

Esse órgão tem duas porções principais, chamadas de pâncreas endócrino (ilhotas pancreáticas) e pâncreas exócrino. O pâncreas exócrino é constituído por ácinos, cada qual contendo uma única camada de células acinares com um lúmen no

centro. Essas células contêm grânulos de zimogênios com enzimas digestivas que são liberadas através de um sistema de ductos interligados que desembocam no ducto de Wirsung (responsável por interligar o pâncreas ao duodeno) (Sembulingam & Sembulingam, 2012).

O pâncreas endócrino é formado pelas ilhotas pancreáticas (ilhotas de Langerhans). Existem cerca de 1 a 2 milhões destas em um pâncreas humano, e sua função é liberar hormônios reguladores do metabolismo (insulina, glucagon, somatostatina e peptídeo pancreático entre outros) na corrente sanguínea (Sembulingam & Sembulingam, 2012).

1.2 Ilhotas pancreáticas

As ilhotas pancreáticas foram identificadas inicialmente em 1869 por Paul Langerhans, como porção endócrina do pâncreas, por este motivo são também conhecidas como ilhotas de Langerhans (figura 2).

Elas são estruturas em forma de “ilhas” (aglomerados de células) dispersas no parênquima exócrino pancreático. Constituem cerca de 1-2% da massa do pâncreas e são altamente vascularizadas, recebendo cerca de 10-15% do fluxo sanguíneo total destinado a esse (figura 2) (Hemmings & Egan, 2013).

FIGURA 2: Anatomia do pâncreas: A cabeça do pâncreas é a região em forma de “C” ligada a curvatura superior do duodeno. O corpo do pâncreas está localizado abaixo da extensão do estômago. A cauda do pâncreas liga-se ao hilo do baço. Este órgão é formado por uma porção exócrina, constituída pelos ácinos, e por uma porção endócrina, formada pelas ilhotas pancreáticas. Adaptado de: <http://baldaivirtuves.info/anatomy-of-the-pancreas-in-the-human-body/anatomy-of-the-pancreas-in-the-human-body-human-anatomy-physiology-of-pancreas-human-anatomy/>. Acesso em 12/04/2018.

As ilhotas pancreáticas são constituídas de células-beta produtoras de insulina, amilina e peptídeo-C (correspondendo a 73-75% da massa da ilhotas em roedores) células- α (correspondendo a 18-20% da massa da ilhota) produtoras do hormônio glucagon, as células- δ (4-5% da massa da ilhota) produtoras do hormônio somatostatina, células-PP (1% da massa da ilhota) produtoras do hormônio polipeptídeo pancreático e as células épsilon (<1% da massa da ilhota) (Sembulingam & Sembulingam, 2012).

A insulina (do latim “ilha”) foi descoberta inicialmente em 1921 por Banting e colaboradores e sua estrutura monomérica foi desvendada em 1926 (Abel, 1926; Haeusler, McGraw, & Accili, 2017). A insulina é um hormônio polipeptídico composto por 51 aminoácidos (peso molecular de 5,8 KDa) distribuídos em duas cadeias polipeptídicas chamadas de cadeia A (21 aminoácidos) e B (30 aminoácidos), ligadas por duas pontes de sulfeto (A7-B7, A20-B19) e uma terceira presente na cadeia A (A7-A11). O seu gene codifica 110 aa, que forma a estrutura do seu precursor, conhecido como pré-proinsulina. A pré-proinsulina apresenta na região N-terminal um peptídeo sinal, comumente encontrado em proteínas endereçadas ao meio extracelular que é reconhecido pelas SRP (*signal recognition particles*) dos ribossomos no citosol. O SRP facilita a entrada da pré-proinsulina para o interior do retículo endoplasmático através de canais condutores de peptídeos na membrana desta organela. Uma vez no lúmen do retículo, a pré-proinsulina é clivada na região do peptídeo sinal e se transforma em proinsulina, auxiliada por chaperonas que facilitam seu dobramento e a criação das pontes de sulfeto através da atividade de redutases. Subsequentemente ao seu dobramento tridimensional nativo, a pró-insulina é transportada através de vesículas para o complexo de Golgi, onde sofre uma clivagem e é transformada em insulina e peptídeo C. Esses produtos permanecem armazenados dentro de vesículas de secreção (figura 3).

A transcrição e estabilidade da pro-insulina é influenciada por vários fatores, sendo que a concentração de glicose é o principal responsável por induzir a sua secreção (Poitout et al., 2006; Welsh, Nielsen, MacKrell, & Steiner, 1985).

FIGURA 3: Produção de insulina a partir de pré-proinsulina. Após a tradução da pré-proinsulina, o peptídeo sinal na região N-terminal o direciona ao retículo endoplasmático, onde é clivada e ocorre formação de pontes de sulfeto, surgindo assim a proinsulina. Essa por sua vez é transportada para o complexo de Golgi onde sofre clivagem e transforma-se em insulina e peptídeo C. Adaptado de (Hrynuk & Neufeld, 2014).

As células-beta respondem à concentração plasmática de diversos nutrientes como glicose, outros monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos. Estas possuem transportadores extremamente sensíveis para glicose, os GLUT2, que apresentam baixa afinidade pelo seu substrato e facilitam a difusão de altas concentrações de glicose para o interior da célula. Após a glicose ser internalizada nas células-beta, ela é fosforilada pela glicoquinase, primeira enzima da via glicolítica, que atua como uma enzima regulatória. Devido as suas propriedades de baixa afinidade por glicose (6mmol/l), em comparação às demais hexoquinases, e de não ser inibida pelo seu produto, a glicoquinase está continuamente ativa em situações de alta glicemia (Suckale & Solimena, 2008).

O produto da glicólise nas células-beta estimuladas pelo aumento da glicemia é o piruvato. Este é direcionado à mitocôndria para passar pelo ciclo de Krebs e pela fosforilação oxidativa, fornecendo elétrons para a produção de ATP. O aumento da razão ATP/ADP é o responsável por fechar o canal de K dependente de ATP (K_{ATP}), provocando uma despolarização da membrana plasmática, o que permite a abertura dos canais de Ca^{2+} , o influxo desse íon para o citoplasma e a posterior ativação da exocitose de grânulos contendo insulina. A secreção de insulina também pode ser

modulada pela ação de hormônios (*glucagon-like peptide 1*, somatostatina e epinefrina) e neurotransmissores (adrenalina e acetilcolina) (Fu, R. Gilbert, & Liu, 2013; Sembulingam & Sembulingam, 2012).

A prolactina se liga a um receptor do tipo tirosina-quinase do tipo II que, uma vez ativado, é autofosforilado e permite a fosforilação de outros substratos chamados de IRS (*Insulin receptor Substrate*). Os IRS, por sua vez, facilitam a interação do receptor com outros substratos e ativam diversas vias de sinalização, sendo as PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinases*) e MAPK (*mitogen activated protein kinases*) as principais. Após a interação entre a insulina e seu receptor nas membranas celulares, esse complexo é internalizado em endossomos, e a acidificação no seu lúmen dissocia o complexo insulina receptor, promovendo tanto a desfosforilação do receptor quanto a degradação da insulina pela atividade da enzima ácido insulinase. O receptor é posteriormente reciclado e redirecionado para a membrana plasmática (Bratanova-Tochkova et al., 2002; Haeusler et al., 2017).

O efeito da insulina nos tecidos alvo é o de modular o metabolismo, provocando um aumento da atividade de vias anabólicas em detrimento das vias catabólicas, como verificado na tabela abaixo (tabela 1) e mais tardiamente, estimula efeitos de crescimento celular, anabolismo e mitose pela ativação de vias de sinalização envolvendo MAPK (Bratanova-Tochkova et al., 2002; Haeusler et al., 2017; Molina, 2004).

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

Efeitos metabólicos	Insulina estimula	Insulina inibe
Metabolismo de carboidratos	<ul style="list-style-type: none"> • Internalização da glicose no tecido adiposo e muscular; • Glicólise no tecido muscular e adiposo; • Glicogênese no tecido hepático e muscular 	<ul style="list-style-type: none"> • Gliconeogênese e glicogenólise no tecido hepático; • Glicogenólise no tecido muscular;
Metabolismo de lipídios	<ul style="list-style-type: none"> • Captação de triglicerídeos pelo tecido adiposo e muscular; • Síntese de ácido graxos e triacilgliceróis nos tecidos; • Síntese de colesterol no tecido hepático; 	<ul style="list-style-type: none"> • Lipólise no tecido adiposo; • Oxidação de ácidos graxos nos tecidos muscular e hepático; • Cetogênese

Metabolismo de aminoácidos	<ul style="list-style-type: none"> • Internalização de aminoácidos nos tecidos; • Síntese proteica nos tecidos; 	<ul style="list-style-type: none"> • Degradação proteica no tecido muscular; • Formação de ureia;
----------------------------	---	---

Adaptado de (MOLINA, 2004)

1.3 Apoptose

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada importante para a homeostase do organismo, sendo necessária em vários processos e eventos celulares, como no desenvolvimento embrionário, degradação de células disfuncionais, funcionamento e desenvolvimento do sistema imunológico e morte induzida por tóxicos. Defeitos em seu funcionamento ou sua hiperatividade estão relacionados a diversas doenças incluindo doenças neurodegenerativas, lesões isquêmicas, câncer e doenças autoimunes (Ashkenazi & Salvesen, 2014; Duprez, Wirawan, Berghe, & Vandenabeele, 2009; Galluzzi et al., 2018).

A apoptose é caracterizada por uma série de mudanças morfológicas, como a perda de aderência das células à matriz basal e às células vizinhas, a condensação e fragmentação do núcleo e do citoplasma, seguidas por prolongamentos da membrana citoplasmática que envolvem os componentes degradados em vesículas denominadas corpos apoptóticos. Após a destruição das células, os corpos apoptóticos são fagocitados e degradados pelas células periféricas e/ou células do sistema imune sem haver a ativação de uma resposta inflamatória (Ashkenazi & Salvesen, 2014; Duprez et al., 2009; Galluzzi et al., 2018; Mariño, Niso-Santano, Baehrecke, & Kroemer, 2014).

A morte por apoptose pode ocorrer devido a diversos estímulos externos ou internos à célula, como agentes tóxicos, radiações ionizantes, deficiência nutricional e de fatores de crescimento, danos ao DNA, estresse do retículo endoplasmático, sobrecarga de espécies reativas do oxigênio, estresse de replicação, alterações microtubulares, defeitos mitóticos, citocinas pró-inflamatórias dentre outros (Brumatti et al., 2010; Czabotar et al., 2014; Galluzzi et al., 2018; Kroemer et al., 2005, 2009; Nunez et al., 1990; Pihan et al., 2017; Roos et al., 2016; Vitale et al., 2017).

Existem duas classes principais de proteínas que participam dos eventos moleculares da apoptose; a família *B-cell lymphoma 2* (BCL2) (Youle & Strasser, 2008), importante para a manutenção da integridade da membrana externa da mitocôndria, e as *cysteine-aspartic-acid-proteases* (caspases), responsáveis pela fase

de execução da apoptose (Fuentes-Prior, Salvesen, 2004). As caspases apoptóticas são divididas em iniciadoras (caspases 2, 8, 9, 10) e efetoras (caspase 3, 6, 7) e apresentam essencialmente uma cisteína em sua estrutura e um aspartato em seu sítio de clivagem, sendo expressas como zimogênios e ativadas em resposta a estímulos específicos (Salvesen & Riedl, 2008).

As proteínas BCL2 são uma família de proteínas que compartilha o domínio altamente conservado *BCL2 homology domains* (BH) (que podem ser BH1, BH2, BH3 e BH4), essenciais para suas interações e atividades. A maioria delas apresentam todos os domínios (BH1-BH4), contudo, algumas apresentam apenas o BH3, sendo chamadas de *BH3-only* (Czabotar et al., 2014; Moldoveanu et al., 2014; Shamas-Din et al., 2013). Em resposta a um estímulo celular que provoque apoptose, ocorre a permeabilização da membrana externa da mitocôndria (MOMPs), que pode ser formada pela interação de BAX e BAK, proteínas pró-apoptóticas pertencentes a família BCL2 (Czabotar et al., 2014; Moldoveanu et al., 2014; Shamas-Din et al., 2013). Contudo, em condições ideais, a MOMP é inibida pelas proteínas anti-apoptóticas da família BCL2, como BCL2, BCL2L1, (também conhecida como BCL-XL) MCL-1 e BCL2L2 (Czabotar et al., 2014; Moldoveanu et al., 2014; Shamas-Din et al., 2013). Estas possuem todos os domínios BH e estão geralmente inseridas na porção externa da membrana do retículo endoplasmático. Elas se ligam as proteínas pró-apoptóticas, impedindo que estas se oligomerizem e provoquem MOMP (Czabotar et al., 2014; Moldoveanu et al., 2014; Shamas-Din et al., 2013). Nesse contexto, a homeostase celular é mantida através do balanço entre esses dois grupos de proteínas da família BCL2, as anti-apoptóticas e as pró-apoptóticas (figura 4) (Ashkenazi & Salvesen, 2014; Galluzzi et al., 2012).

De acordo com o estímulo e os mecanismos utilizados, a apoptose é classificada em extrínseca e intrínseca com um ponto de convergência mediado pela proteína da família *BH3 only proteins* (*interacting domain death agonist* (BID)) (Duprez et al., 2009).

A via extrínseca da apoptose é iniciada em resposta a perturbações externas no microambiente celular (Ashkenazi et al., 1998; Flusberg et al., 2015; Gibert et al., 2015; Strasser et al., 2009), através de respostas a ativação de receptores de morte, que incluem os CD95 (também conhecidos como receptores Fas), TNFR1 (*tumour necrosis factor receptor 1*) ou TRAILR (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*

receptor) frente a moléculas sinalizadoras como citocinas pró-inflamatórias (Aggarwal et al., 2012; Fleten et al., 2016; von Karstedt et al., 2017; Wajant, 2002). Esta interação resulta na ativação de diversas proteínas adaptadoras, incluindo FADD (*FAS-associated death domain*), TRADD (*TNFR1-associated death domain*) e RIP1 (*receptor interacting protein 1*) que se reúnem em uma estrutura chamada DISC (*Death-inducing signaling complex*) complexo 1 (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). Este processo recruta e ativa caspases iniciadoras (8 e 10) (complexo 2–DISC), levando à ativação de caspases efetoras (3, 6 e 7) e a finalização da apoptose (figura 4) (Galluzzi et al., 2018; Mariño et al., 2014).

A apoptose intrínseca é iniciada a partir de estímulos intracelulares, como dano ao DNA e citotoxicidade, sendo controlada pela família de proteínas BCL2 e mediada por modificações na mitocôndria (Youle & Strasser, 2008). Esta é marcada por um evento fundamental, a permeabilização da membrana externa da mitocôndria (MOMP) (Nakagawa et al., 2005; Yamashima et al., 1998), que resulta no extravasamento de citocromo c para o citoplasma. A liberação de citocromo c inicia a formação de um complexo ativador de caspases formado por caspases 9 e APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*), chamado de apoptossomo (Riedl & Salvesen, 2007). O mecanismo de MOMP envolve, geralmente, a oligomerização de proteínas pro-apoptóticas da família BCL2 como BAX (*BCL-2-associated X protein*) e BAK (*BCL-2 antagonist or killer*) na membrana externa da mitocôndria, modificando proteínas de membranas (como VDAC) e formando canais que permitem a liberação de proteínas mitocondriais (Mikhailov, Mikhailova, Pulkrabek, Dong, Venkatachalam, & Saikumar, 2001; Rostovtseva, Antonsson, Suzuki, Youle, Colombini, & Bezrukov, 2004; Vander, Chandel, Li, Schumacker, Colombini, & Thompson, 2000; Vander et al., 2001). A formação do apoptossomo ativa caspases efetoras 3, 6 e 7, e leva aos eventos finais da apoptose. Outras proteínas liberadas durante a MOMP são as Smac/Diablo, que antagonizam a ação dos inibidores de apoptose (IAP), como a *X linked IAP* (XIAP), que liga-se as caspases 9, 3 e 7, e *cellular IAP* (CIAP) 1 e 2 que inibem proteínas da via extrínseca da apoptose (figura 4) (Lacasse, Mahoney, Cheung, Plenchette, Baird, & Korneluk, 2008; Mariño et al., 2014).

As IAPs CIAP 1 e CIAP 2 inibem a apoptose ligando-se a proteínas adaptadoras da via de sinalização de receptores de morte, medeiam a ubiquitinação de RIP1 e ativam o fator de transcrição NF-κB, que é translocado para o núcleo onde ativa a

transcrição de diversos genes anti-apoptóticos (Lacasse et al., 2008). O ponto de conversão de ambas as vias ocorre através da proteína BID (*BH3-only*). A caspase 8 é capaz de truncar BID, produzindo sua versão truncada tBID. Esse processo facilita a ligação desta com BAX e sua participação na permeabilização da membrana externa da mitocôndria (Duprez et al., 2009).

FIGURA 4: Mecanismo molecular de morte celular por apoptose. A morte celular por apoptose pode ocorrer por via extrínseca ou intrínseca. Adaptado de: (Duprez et al., 2009).

1.4 Diabetes *mellitus*

Diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia resultante da deficiência na secreção de insulina, da ação desta, ou ambas as causas. O termo *diabetes mellitus* foi dado por Thomas Wills em 1675 e significa “doce poliúria”, o que está relacionado aos eventos de altas concentrações de glicose na urina dos pacientes que apresentam diabetes não controlado (Eknoyan & Nagy, 2005). Pessoas portadoras de diabetes estão sujeitas a desenvolver diversos problemas crônicos incapacitantes que trazem sérios riscos à vida, relacionados com glicação de proteínas intracelulares e extracelulares. Níveis glicêmicos consistentemente altos afetam o coração e os vasos sanguíneos causando doenças cardiovasculares assim como dano à microvasculatura (angina, infarto do miocárdio e

derrame), provocam retinopatias (prejudicando a visão e podendo levar à cegueira), nefropatias (podendo levar a falha renal) e neuropatias (podendo levar à perda de sensibilidade em nervos periféricos). Além disso, o aumento da glicemia de forma continuada pode aumentar o risco de infecções (podendo facilitar o surgimento de periodontites), surgimento de úlceras, dificuldade de cicatrização e infecções nas regiões dos pés e amputações. As altas concentrações de glicose também provocam um aumento da osmolaridade e glicosúria acompanhada de poliúria (Hemmings & Egan, 2013; International Diabetes Federation, 2017; Sembulingam & Sembulingam, 2012).

Essa doença pode ser classificada em dois tipos principais, diabetes *mellitus* tipo 1, caracterizada por uma reação autoimune contra células-beta e diabetes *mellitus* tipo 2, caracterizada pela resistência dos tecidos à insulina e pela deficiência da liberação desta. Existem atualmente cerca de 425 milhões de adultos entre 20-79 anos que tem diabetes, e esse número continua a crescer a cada ano. Estimativas indicam que em 2045 haverá um aumento de 48% desse número, ou seja, haverá cerca de 629 milhões de pessoas com diabetes, sendo que aproximadamente 10% desse número atribui-se à DM1 e 90% à DM2. Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD 2017), existe atualmente cerca de 13 milhões de diabéticos no Brasil (6,9% da população) e esse número obedece à tendência de crescimento verificado em outros países. Estimativas também mostram que o país tem o terceiro maior número de crianças com DM1 do mundo, com 88.300 casos registrados (os EUA estão em primeiro com 169.900) (International Diabetes Federation, 2017).

O DM2 é controlado através de práticas saudáveis, como alimentação controlada, atividades físicas regulares, mudanças de hábito, planos de combate ao tabagismo e controle do peso corpóreo. Em casos mais extremos outros tratamentos podem ser utilizados, como medicamentos hipoglicemiantes e infusão de insulina. O DM1 é tratado principalmente com infusão de insulina ou seus derivados. O tratamento precisa ser feito diariamente, combinado com uma alimentação saudável e atividades físicas regulares. Em geral essas terapias melhoram e normalizam os níveis glicêmicos, evitando e/ou inibindo efeitos crônicos mais graves da doença (International Diabetes Federation, 2017).

1.5 Diabetes *mellitus* tipo 1

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada por uma resposta inflamatória nas ilhotas pancreáticas, chamada de insulitis, que contribui para uma progressiva redução do número de células-beta, causando nos pacientes, já no período da infância e adolescência, uma deficiência na produção de insulina (Cnop, 2005; Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001). Esta inflamação induz em células-beta supressão de função, inibição de regeneração e morte celular. Seu início ocorre através de uma combinação de fatores que envolve defeitos genéticos, como problemas na seleção de células do sistema imune, e resposta a patógenos que invadem as ilhotas pancreáticas. Dessa forma a DM1 é uma doença complexa que apresenta etiologia envolvendo fatores genéticos e ambientais (De Beeck & Eizirik, 2016; Eizirik, Colli, & Ortis, 2009).

A insulitis ocorre através da resposta inata e adaptativa do sistema imune. A resposta imune inata reconhece partículas de microrganismos (como RNA fita dupla) através dos PRRs (*pattern-recognition receptors*) como os TLRs, RIG1, MDA-5 e NLR. As células-beta respondem à ativação destes receptores ativando fatores de transcrição, como NF-kB e IRF-3, que ativam estresse de retículo endoplasmático, superexpresam o complexo MHC-I, produzem citocinas pro-inflamatórias (IL-1- β , TNF- α e INF- γ), quimiocinas (CCL3, CCL4, CXCL11) e apoptose. A produção de quimiocinas atraem macrófagos, linfócitos T e B e células NK (*natural killer*) para as ilhotas pancreáticas e estas produzem perforinas, granzimas e/ou citocinas (IL-1- β , TNF- α e INF- γ) que alvejam células-beta, gerando um ciclo vicioso com progressivo aumento de células do sistema imune nas ilhotas e uma gradativa destruição de células-beta (Eizirik et al., 2009).

Os corpos apoptóticos originados da morte das células-beta nesse contexto são reconhecidos e fagocitados pelas células do sistema imune, incluindo as células dendríticas que apresentam os antígenos de células-beta (como pró-insulina e insulina) nos linfonodos periféricos do pâncreas e ativam ainda mais a resposta inflamatória local. No estágio tardio da DM1 ocorre a estabilização da resposta inata e a manutenção da resposta adaptativa com episódios alternados de aumento e diminuição da inflamação, diminuição da quantidade de células-beta, supressão da função destas e uma possível supressão da sua proliferação. Os primeiros sintomas de DM1 são detectados quando aproximadamente 80% das células-beta já estão

destruídas, e em 40-90% dos casos esses sintomas aparecem antes dos 10 anos de idade (Eizirik et al., 2009).

Como mostrado acima, a terapia para o DM1 é o controle da variação glicêmica diária do paciente em parceria com a infusão de insulina. No entanto, esse tratamento não previne eficientemente as complicações crônicas da doença decorridas dos episódios de hiperglicemia crônica, como a cardiopatia, retinopatia, neuropatia e nefropatia. Além disso, uma parcela considerável de indivíduos que apresentam DM1 não respondem eficientemente ao tratamento da insulinoterapia, apresentando episódios de hipoglicemia severa frequentes e despercebidos (muitas vezes fatais). Esses tipos de pacientes são conhecidos como pacientes hiperlábeis e apresentam uma baixa expectativa e qualidade de vida devido a esta complicação. Para estes, os transplantes de pâncreas ou as ilhotas pancreáticas têm se mostrado uma terapia alternativa eficaz (Maia & Araújo, 2008; Shapiro, Lakey, Ryan, 2000).

1.6 Transplante de ilhotas pancreáticas

Nos últimos anos, o transplante de ilhotas pancreáticas tem evoluído de um procedimento experimental para um procedimento clínico rotineiro e de alta eficiência. Este tratamento é indicado apenas em casos de DM1 instável com severos episódios de hipoglicemia e labilidade glicêmica, que não pode ser estabilizado eficientemente com insulinoterapia. Esse procedimento é aprovado em diversos países do mundo como Canadá, Austrália, EUA, Itália, França, Suíça e Bélgica dentre outros. No Brasil ainda não é um procedimento clínico. Mais de 1500 transplante já foram realizados em todo o mundo (incluindo 864 transplante alográficos e 480 autólogos, de acordo com o CITR (*Collaborative Islet Transplant Registry*)) em mais de 40 centros de excelência que realizam esse procedimento. O transplante de ilhotas é considerado mais seguro do que o transplante de pâncreas total, e traz benefícios a longo prazo como controle glicêmico, normalização da hemoglobina glicada e ausência de episódios hipoglicêmicos severos e despercebidos. Os resultados deste se assemelham à eficiência verificada em transplante de órgão total, com cerca de 50% dos pacientes permanecendo insulino-independentes por 5 anos (Shapiro, 2011; Shapiro, Pokrywczynska, & Ricordi, 2016).

Contudo, existem alguns fatores que limitam a utilização desta técnica em pacientes com DM1 ou DM2 com dependência de insulina; a pouca disponibilidade de doadores cadavéricos e a necessidade de um tratamento crônico de imunossupressão nos pacientes que passam por este procedimento (Shapiro, 2011; Shapiro, Pokrywczynska, & Ricordi, 2016).

Uma vantagem do transplante de ilhotas sobre o transplante de órgão total é esse ser considerado um procedimento clínico pouco invasivo que traz menos efeitos colaterais decorrentes das complicações cirúrgicas. Contudo, ainda é necessário mais de um doador para o transplante, devido ao estresse que as ilhotas passam nos procedimentos de isolamento, manutenção, infusão e adaptação, o que leva muitas delas a morte. Desta forma, existe a necessidade de se pesquisar novos procedimentos e estratégias que melhorem a resistência das células-beta que estão sendo submetidas e esse transplante para que elas se mantenham viáveis e funcionais para normalizar a glicemia dos pacientes.

1.7 Prolactina

O hormônio Prolactina é codificado por apenas um gene, que é conservado em todos os vertebrados e em humanos está localizado no cromossomo 6 (Truong, 1984). Com a clivagem dos 28 aminoácidos do peptídeo sinal, a prolactina é constituída de 199 aminoácidos e tem peso molecular aparente de 23kDa (Freeman, Kanyicska, Lerant, & Nagy, 2000). Ela apresenta uma forte homologia com os hormônios do crescimento e lactogênico placentário. Juntos eles compartilham uma estrutura tridimensional formada por quatro α -helices antiparalelas comprimidas, característica de proteínas da família das citocinas hematopoiéticas grandes (Horseman & Yu-Lee, 1994).

A prolactina tem sido relacionada a diversas funções fisiológicas, como reprodução, produção de leite, crescimento, metabolismo, transporte eletrolítico e comportamento e a alguns eventos patológicos como imunidade e carcinogênese (Ben-Jonathan, LaPensee, & LaPensee, 2008; Bole-Feysot, Goffin, Edery, Binart & Kelly, 1998; Goffin, Binart, Touraine, & Kelly, 2002).

Ela é produzida principalmente pelas células lactotróficas da glândula hipófise anterior. Estudos demonstram que outros tecidos são capazes de produzir esse hormônio, como glândula mamária, ovário, próstata, testículos, linfócitos, células

endoteliais, cérebro, pele, folículos pilosos, tecido adiposo e cóclea (Ben-Jonathan, Mershon, Allen & Steinmetz, 1996; Brandebourg, Hugo, & Ben-Jonathan, 2007; Langan, Foitzik-Lau, Goffin, Ramot, & Paus, 2010; Marano, Tickner, & Redmond, 2013).

A atividade da prolactina é mediada por seu receptor transmembranar (PRL-R) que pertence à família de receptores para citocinas hematopoiéticas (Bole-Feysot et al., 1998). O gene que codifica PRL-R é único para todas as espécies, localizado em humanos no cromossomo 5 (Arden, Boutin, Djiane, Kelly, & Cavennee, 1990; Barker, 1992). Ele é formado por 598 aminoácidos que forma um homodímero ligado por duas pontes dissulfeto, sendo específico para PRL, hormônio de crescimento e lactogênico placentário (Brooks, 2012; Goffin, Shiverick, Kelly, & Martial, 1996). Este é expresso em praticamente todas as células de mamíferos, mas existem diferenças entre o perfil de expressão nos diferentes tecidos (Freemark, Driscoll, Maaskant, Petryk, & Kelly, 1997; Nagano & Kelly, 1994).

O PRL-R é expresso de forma ubíqua nas células humanas (Gadd & Clevenger, 2006; Qazi, Tsai-Morris, & Dufau, 2006). Ele transmite o estímulo provocado pela ligação da PRL através de proteínas citoplasmáticas com atividade de tirosina cinase, como JAK2 (*janus protein kinase 2*), provocando sua ligação na porção citoplasmática do receptor e sua auto-fosforilação em seus resíduos de tirosina (via clássica de PRL-R). PRL-R ligado a PRL e JAK2 fosforilado ativam a fosforilação do fator de transcrição STAT. Esta fosforilação induz a sua dimerização e sua translocação para o núcleo, onde se liga a elementos de resposta dos genes (figura 5) (Goffin et al., 2002). PRL-R ativa também proteínas da família de tirosina kinases Src, que estão relacionadas à regulação de eventos de crescimento e proliferação celular (Clevenger, Furth, Hankinson, & Schuler, 2003; Swaminathan, Varghese, & Fuchs, 2008). Além dessas vias de sinalização, este receptor ativa as vias de fosfoinositol-3-quinase (PI3K)/AKT, MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e a serina – treonina cinase Nek3-Vav2-Rac1 (Berlanga, 1997; Bole-Feysot et al., 1998; Miller, DeMaria, Freier, Riegel, & Clevenger, 2005).

FIGURA 5: Mecanismo de transdução de sinal da prolactina. O hormônio prolactina se liga ao seu receptor, provocando sua dimerização. Este processo ativa a proteína adaptadora – tirosina cinase JAK, esta auto-fosforila-se e fosforila o fator de transcrição STAT, que é dimerizado e internalizado no núcleo das células. Adaptado de (Mansano, 2013).

Diversos estudos têm demonstrado o papel da prolactina como fator de crescimento de células-beta. PRL tem demonstrado ser capaz de aumentar síntese de DNA, produção de insulina e responsividade de liberação de insulina frente a variação de glicemia em ilhotas de roedores (Brelje, Parsons, & Sorenson, 1994; Brelje & Sorenson, 1991; Nielsen et al., 2001; Swenne, Hill, Strain, & Milner, 1987). Trabalhos também demonstraram que a PRL tem um papel fundamental na adaptação das ilhotas pancreáticas a gestação (nesse período as células-beta são mais exigidas devido à sobrecarga de nutrientes necessários ao desenvolvimento do feto) auxiliando na agregação de células-beta, crescimento dessas e aumento da massa de ilhotas pancreáticas, inclusive prevenindo contra o diabetes gestacional (Fleenor, Petryk, Driscoll, & Freemark, 2000; Retnakaran et al., 2016). A deficiência do PRL-R tem mostrado ser altamente prejudicial para o organismo, provocando hiperplasia de ilhotas pancreáticas e células-beta, níveis reduzidos de mRNA para insulina, modificando a responsividade normal da liberação de insulina e provocando intolerância à glicose (Freemark et al., 2002).

Nosso grupo demonstrou que PRL atua melhorando a homeostase e a função de células-beta (aumentando o conteúdo interno de insulina e) através de sua via canônica JAK2 e STAT 1, 3 e 5 (demostrado pela primeira vez em células-beta

humanas) (Labriola et al., 2007). Desta forma, infere-se que o pré-tratamento com prolactina em ilhotas pancreáticas pode melhorar a resposta das ilhotas nos transplantes em pacientes com DM1.

Essa alternativa foi testada em duas ocasiões. Na primeira os autores do estudo, tendo indícios de que PRL também atua promovendo angiogênese, estudaram a possibilidade do pré-tratamento com PRL ser capaz de melhorar os resultados do transplante promovendo angiogênese nos enxertos transplantados. Eles verificaram que o pré-tratamento com PRL (500ng/ml por 24h) em ilhotas de ratos e humanas transplantados na cápsula renal de ratos diabéticos, após um mês, apresentaram melhora na revascularização, perfusão sanguínea e tensão de oxigênio nos enxertos (Johansson, Olerud, Jansson, & Carlsson, 2009). Em outro trabalho, ilhotas humanas foram pré-tratadas com o hormônio (500ng/ml por 48h) e transplantadas na capsula renal de ratos diabéticos. Esses animais apresentaram glicemia controlada durante o tempo de estudo, os experimentos *in vitro* também mostraram que o pré-tratamento com PRL foi importante para a viabilidade das células em cultura e proteção contra morte provocada por citocinas, óxido nítrico e H₂O₂ (Yamamoto et al., 2010).

Um trabalho realizado por nosso grupo, mostrou que o tratamento com PRL em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas reduz a morte por apoptose induzida por privação de soro e pelo tratamento com citocinas (Terra, Garay-Malpartida, Wailemann, Sogayar, & Labriola, 2011), conhecida como a principal forma de morte em DM1 (Mandrup-Poulsen, 1996). A razão dos níveis proteicos de BCL2/BAX aumentou com o tratamento de PRL. Nesse trabalho foi mostrado também que após o tratamento com o hormônio ocorre a inibição da atividade de caspases iniciadoras-8 e -9, e de caspase efetora-3, com consequente inibição da apoptose (Terra et al., 2011; Mansano, 2013).

Estudos realizados previamente em nosso laboratório (Labriola et al., 2007), com o objetivo de entender os mecanismos moleculares relacionados aos efeitos benéficos provocados pela prolactina em células-beta, mostrou proteínas que eram diferencialmente expressas em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas, em resposta ao tratamento hormonal. Neste estudo, mostrou-se que, em resposta a esse hormônio, há um aumento nos níveis de proteínas relacionadas à produção de ATP e potencial redox, catabolismo de carboidratos e lipídios, síntese proteica,

chaperonas, transdução de sinal, regulação metabólica e apoptose. Dentre as chaperonas que tiveram seus níveis proteicos induzidos por PRL se encontra a HSP27 (*heat shock protein 27*).

1.8 HSPB1

A proteína HSPB1 pertence ao grupo de chaperonas que tem baixo peso molecular, conhecidas como sHSPs (small HSPs). Elas foram descobertas inicialmente sendo superexpressas em células submetidas a choque térmico, juntamente com outras chaperonas, como HSP40 e HSP70 (Tissières, Mitchell, & Tracy, 1974). As sHSPs apresentam em sua estrutura um sítio de alta homologia formado pelo domínio alfa-cristalino constituído de 80 aminoácidos, que está presente em todas as proteínas dessa família, que são classificados em 10 grupos (HSPB1 - HSPB10) (Caspers, Leunissen, & de Jong, 1995; Kampinga & Garrido, 2012; Kampinga, de Boer, & Beerstra, 2015; Kappé, Boelens, & de Jong, 2010). Além do domínio alfa-cristalino, que é fundamental para a estrutura e função das sHSPs, estas apresentam sítios adjacentes com variação estrutural, o que indica que elas podem atuar de maneiras diferentes umas das outras (Caspers, Leunissen, & de Jong, 1995; Kampinga & Garrido, 2012). Seu estado de aglomeração é dinâmico e pode mudar rapidamente quando as células são submetidas a estresse, como calor e a pH. Modificações pós-traducionais também são encontradas nas sHSPs, como fosforilação em diversos sítios, que geralmente facilitam a dimerização e oligomerização, tendo importantes implicações funcionais (Arrigo & Gibert, 2012; Lanneau et al., 2008; Parcellier et al., 2005; Rogalla et al., 1999). As sHSPs são chaperonas que atuam de forma independente de ATP (Jakob, Gaestel, Engel, & Buchner, 1993; Kampinga, Brunsting, Stege, Konings, & Landry, 1994; Richter, Haslbeck, & Buchner, 2010) que se ligam e estabilizam proteínas com dobramento tridimensional errado, protegem a integridade do citoesqueleto e facilitam sua recuperação após períodos de estresse, contribuindo para a manutenção da homeostase proteica e auxiliam na reestruturação do citoesqueleto, principalmente em períodos de recuperação de estresse (Kampinga & Garrido, 2012).

A HSPB1 é expressa em todos os tecidos, associada geralmente ao citoesqueleto ou dispersa no citoplasma. Após estresse provocado por calor, ela também pode ser encontrada no núcleo (Mymrikov, Seit-Nebi, & Gusev, 2011; Vos,

Kanon, & Kampinga, 2009). Assim como outras sHSPs, HSPB1 é superexpressa em diversos tecidos quando as células estão em condições de estresse, como choque térmico, estresse oxidativo e em respostas a agentes anti-tumorais (Christians, Ishiwata, & Benjamin, 2012; Landry, Chrétien, Lambert, Hickey, & Weber, 1989). Sua ligação e atividade protetora no citoesqueleto contra choque térmico foi a primeira a ser descrita (Landry et al., 1989; Lavoie, Gingras-Breton, Tanguay, & Landry, 1993; Mounier & Arrigo, 2002). Além disso, HSPB1 demonstrou ser importante para a rápida recuperação e estabilização de agregados proteicos formados em células submetidas a estresse (Kampinga et al., 1994). O acúmulo de agregados proteicos está envolvido com diversas doenças como doenças neurodegenerativas, processos de envelhecimento e proteotoxicidade (Cohen & Dillin, 2008). HSPB1 também apresenta funções importantes em doenças não-neurodegenerativas, como câncer (Zoubeidi & Gleave, 2012), inflamação (van Noort, Bsibsi, Nacken, Gerritsen, & Amor, 2012), catarata (Clark, Lubsen, & Slingsby, 2012) e doenças cardíacas. A produção de HSPB1 mutada é a causa de diversas doenças, conhecidas como chaperonopatias, podendo provocar deficiência em neurônios motores, em tecido muscular liso e cardíaco e catarata (Kampinga et al., 2015).

Uma das funções mais estudadas e provavelmente uma das mais importantes de HSPB1 é sua capacidade de proteger células contra a apoptose (Garrido et al., 1998; Mehlen, Schulze-Osthoff, & Arrigo, 1996). Esta função está diretamente relacionada com sua capacidade de oligomerização e fosforilação frente aos estímulos que ativam a apoptose (Arrigo, 2011; Paul et al., 2010). Estudos mostram que essa capacidade permite que HSPB1 se ligue a vários substratos, de acordo com a necessidade celular, podendo estar ligada a proteínas da via de tradução proteica, do citoesqueleto, da apoptose, das vias de degradação proteica, tradução, transcrição e adesão celular, podendo influenciar na modulação da meia vida de proteínas, atividade enzimática, organização e modificação estrutural, na expressão de genes, na adesão e migração celular, morte celular, processos catabólicos e respostas a estímulos (Arrigo, André-Patrick Ducarouge, Lavial, & Benjamin, 2015).

Altos níveis de HSPB1 são encontrados em modelos celulares resistentes a morte celular apoptótica, consequência de sua interação com diversas proteínas envolvidas na iniciação ou manutenção da via extrínseca e intrínseca da apoptose (Arrigo, 2012; Arrigo & Gibert, 2014; Ciocca, Arrigo, & Calderwood, 2013). Por

exemplo, ela é capaz de se ligar a moléculas de F-actina e tBid, impedindo sua translocação e consequente liberação de citocromo c (Paul et al., 2002) e Smac-diablo (Chauhan & Li, 2003) da mitocôndria. Ela também é capaz de ligar-se diretamente ao citocromo c, inibindo a formação do apoptosomo e de caspase 9 ativa (Bruey & Ducasse, 2000; Garrido et al., 1999). HSPB1, através da fosforilação de seus oligômeros, é capaz de inibir a ativação de pro-caspase 3 (A. Arrigo & Gibert, 2013; Gibert & Eckel, 2012) e de aumentar a sua própria meia vida, impedindo sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteossomo (Arrigo & Gibert, 2012). HSPB1s em sua forma de dímero fosforilado é capaz de inibir a atividade de receptores de morte Fas (Charette & Landry, 2000) e inibir indiretamente a atividade apoptótica provocada por citocinas através da redução do estresse oxidativo provocada por estas (Mehlen, Prévile, Kretz-Remy, & Arrigo, 1996).

Trabalhos mostram que os níveis de HSPB1 são maiores em células-beta, em relação aos demais tecidos (Wakayama & Iseki, 1998), e que na presença de citocinas, ocorre um aumento de HSPB1 (Cardozo et al., 2001). Um trabalho realizado por Dai e colaboradores (Dai et al., 2009) testou se a superexpressão de HSPB1 *in vivo* em ratos tratados com estreptozotocina (indutor de diabetes) e *in vitro* em ilhotas tratadas com citocinas é capaz de promover proteção celular. Eles demonstraram que a superexpressão de HSPB1 é capaz de proteger células-beta tanto *in vivo* como *in vitro* contra a morte provocada por esses dois indutores de apoptose.

Esses dados em conjunto demonstram que HSPB1 tem uma importante função na proteção das células-beta contra estresse e morte por apoptose.

1.9 Autofagia

A autofagia, processo celular de auto-degradação, foi descoberta inicialmente como uma via de degradação proteica que está ativa principalmente em casos de estresse devido a uma deficiência nutricional (Choi, Ryter, & Levine, 2013; Mizushima et al., 1998; Mizushima & Komatsu, 2011; Thumm et al., 1994; Yang & Klionsky, 2010). Contudo, estudos posteriores mostraram que a autofagia é uma via de reciclagem celular que degrada não apenas proteínas ou agregados proteicos, mas também outras macromoléculas (carboidratos, lipídios e minerais) e até organelas inteiras como mitocôndrias, fragmentos de retículo endoplasmático, fragmentos do núcleo, peroxissomos e ribossomos (Mizushima, 2007; Stolz, Ernst, & Dikic, 2014). Evidências

mostram que esta via é importante para os períodos de estresse celular devido a sua capacidade de catabolizar estruturas danificadas ou disfuncionais (que podem ser tóxicas para as células), produzindo substratos para a produção de energia ou formação de estruturas celulares, atuando como via de sobrevivência em períodos de privação de nutrientes e contribuindo para o controle de qualidade proteica (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Kuma et al., 2004; Mariño et al., 2014).

A autofagia é classificada em três principais tipos; macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. A macroautofagia é caracterizada pela formação de vesículas de dupla membrana chamadas de autofagossomos que englobam agregados proteicos e organelas, conduzindo-as até os lisossomos, onde serão degradados (figura 6) (Mizushima & Komatsu, 2011). Microautofagia, por sua vez, caracteriza-se pela invaginação do próprio lisossomo ou endossomos sobre as macromoléculas e organelas que serão degradadas, e sua posterior degradação por hidrolases lisossomais (Li, Li, & Bao, 2012). Na autofagia mediada por chaperonas, as proteínas marcadas pela sequência pentapeptídica KFERQ são reconhecidas pela chaperona HSC70. Esta, por sua vez, promove a translocação das proteínas marcadas para o lisossomo e as interioriza em seu lúmen pelo transportador lisossomal LAMP2A (figura 7) (Cuervo & Wong, 2014). O termo autofagia geralmente refere-se à via mais conhecida, macroautofagia (Cuervo & Wong, 2014; Li et al., 2012; Mizushima & Komatsu, 2011).

FIGURA 6: Mecanismo de ação da autofagia. A autofagia é uma via que recicla componentes celulares através do sequestro de estruturas citoplasmáticas, inicialmente em fagóforos, que evolui até autofagossomos e posteriormente, através da fusão dos autofagossomos com os lisossomos, formam-se os autolisossomos, onde as estruturas serão degradadas. Adaptado de (Mizushima, 2007).

A macroautofagia é ativada em condições de estresse através do complexo *mammalian target of rapamycin* (mTOR). A inibição de mTOR ativa a autofagia. mTOR é um complexo formado por três proteínas; mTOR, Raptor (*regulatory protein*

associated with mTOR) e mLST8 (*mammalian lethal with Sec13 protein 8*) (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002, 2003). Raptor facilita a ligação dos substratos e ancora o complexo mTOR em sua correta localização sub-celular (Nojima et al., 2003; Schalm, Fingar, Sabatini, & Blenis, 2003). mLST8 associa-se com o domínio catalítico de mTOR e estabiliza sua função de cinase (H. Yang et al., 2013). mTOR está relacionada a eventos de crescimento e divisão celular, aumentando a síntese de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos e suprimindo eventos catabólicos, como a autofagia, ocupando uma posição central na regulação do metabolismo celular frente as variações ambientais (Saxton & Sabatini, 2017). Quando mTOR está ativado, ele fosforila ULK1 (uma cinase pertencente ao complexo ULK, importante para o passo de iniciação da autofagia) prevenindo assim que esse seja ativado por AMPK (uma cinase chave para a ativação da autofagia que também fosforila outra proteína da via, a Beclin 1) (J. Kim, Kundu, Viollet, & Guan, 2011). Dessa forma, a relativa atividade entre mTOR e AMPK em diferentes contexto celulares determina a extensão da ativação da autofagia (Kim et al., 2011; Saxton & Sabatini, 2017). Outro ponto de regulação da autofagia ocorre no nível do complexo III PI3K (importante para a etapa de nucleação – como veremos a seguir) onde a proteína Beclin 1 pode ser inibida por proteínas anti-apoptóticas da classe BCL2, inibindo dessa forma a autofagia (Mariño et al., 2014; Pattingre et al., 2005).

Em fungos, foram identificados mais de 30 genes relacionados com o mecanismo de autofagia (ATG – *autophagy-related proteins*), muitos deles apresentam seus ortólogos em humanos (Nakatogawa, Suzuki, Kamada, & Ohsumi, 2009; Z. Yang & Klionsky, 2009). A etapa inicial da autofagia ocorre através da seleção de membranas celulares para a formação dos autofagossomos (figura 6) (Hamasaki, 2013). A principal fonte de membranas dos autofagossomos são porções específicas do retículo endoplasmático (RE), chamados de ômegassomos, mas outras fontes são relatadas, como compartimentos RE-Golgi, compartimentos RE-mitocôndria, mitocôndrias, membrana plasmática e endossomos (Axe et al., 2008; Hailey, 2010; Hamasaki, 2013; Mari, 2010; Ravikumar, Moreau, Jahreiss, Puri, & Rubinsztein, 2010; H. Yamamoto, Kakuta, & Watanabe, 2012). A formação do autofagossomo ocorre através de três etapas, chamadas de: iniciação, nucleação e expansão. O início da formação dos autofagossomos ocorre com a ligação do complexo ULK (formado pelas proteínas ULK1, ULK2, ATG13, FIP200 e ATG 101) no sitio de ligação do fagóforo, na

etapa de iniciação (também conhecida como etapa de isolamento de membrana) (Lamb, Yoshimori, & Tooze, 2013). Durante a etapa de nucleação, o complexo ULK ativa o complexo III PI3K (formado por Beclin 1, VPS15, VPS34 e ATG14), este por sua vez induz a formação de fosfatidil-inositol 3-fosfato na membrana dos autofagossomos (Diao et al., 2015). No estágio de expansão, o complexo ATG12-ATG5-ATG16 é recrutado para as membranas dos autofagossomos onde inicia a lipidização de MAP1LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), também conhecido como LC3, com fosfatidiletanolamina, necessário para a expansão das membranas isoladas e termino da formação dos autofagossomos (Huang et al., 2015). Estudos têm mostrado que a lipidização de LC3 também envolve etapas de deacetilação e translocação para o citoplasma de LC3 nucleares (Huang et al., 2015). Após o recrutamento de componentes celulares que serão degradados, os autofagossomos se fundem com os lisossomos, produzindo os autolisossomos (figura 6) (Lamb et al., 2013). A fusão dos lisossomos com os autofagossomos acontece através da proteína SNARE-like. No interior dos autolisossomos, existem hidrolases que degradam proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos em um ambiente com baixo pH. O LC3 que faz parte dos autofagossomos é degradado juntamente com os demais componentes do autofagossomo. Esta última etapa onde ocorre a degradação dos autofagossomos e das estruturas que estão em seu interior é convencionalmente chamada de fluxo autofágico (Lamb et al., 2013; Mariño et al., 2014).

FIGURA 7: Mecanismos moleculares da autofagia. A autofagia pode agir através das vias: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Cada um desses processos têm mecanismos, regulação e proteínas que os define, mas todos conduzem estruturas celulares para serem degradados pelos lisossomos. Adaptado de (Kaur & Debnath, 2015).

Estudos recentes mostram que, diferentemente do que se acreditava, a autofagia não degrada componentes citoplasmáticos de maneira aleatória, mas atua

em alvos específicos marcados para serem degradados. Estas estruturas, geralmente danificadas ou disfuncionais, são marcadas com “receptores de carregamento para a autofagia”, que em mamíferos pode ocorrer através da interação com domínios de ligação a ubiquitina (UBD – *Ubiquitin binding domain*). Dessa forma, esse sistema também age complementando a atividade da via UPS (*ubiquitin proteasome system*), auxiliando na degradação de estruturas proteicas marcadas com ubiquitina através da autofagia. Existem também adaptadores que se ligam a esses receptores de carregamento para a autofagia, como a proteína p62 (também conhecida como SQSTM1), NRB1 e HDAC6, dentre outras, que marcam estruturas proteicas ou organelas para serem degradadas (Deosaran, 2013; Kim, Hailey, Mullen, & Lippincott-Schwartz, 2008; Liu, 2012; Novak, 2010; Okamoto, 2014; Okamoto, Kondo-Okamoto, & Ohsumi, 2009; Rogov, Dötsch, Johansen, & Kirkin, 2014; Stolz et al., 2014; Youle & Narendra, 2011). Esses receptores e adaptadores apresentam afinidade por LC3. Uma vez acoplados a este, tais estruturas são englobadas pelos autofagossomos e conduzidas aos lisossomos (D. J. Klionsky & Al., 2012; Mariño et al., 2014) (figura 7).

Além de proteger as células quanto estão sob estresse, a autofagia auxilia na manutenção da homeostase celular em condições nutricionais ideais. Estudos mostram que níveis de autofagia basal são importantes para o funcionamento normal das células. Os mecanismos de controle de qualidade de proteínas são especialmente importantes em tecidos como neurônios, músculo e glândulas. Nestes a autofagia desempenha o papel de regulador da homeostase proteica atuando juntamente com as vias de UPR (*unfolded protein response*) e UPS, prevenindo o acúmulo de agregados proteicos tóxicos, ajudando na prevenção de possíveis danos celulares e evitando doenças como doenças neurodegenerativas e hipertrofias cardíacas (Masiero, 2009; Mizushima, Levine, Cuervo, & Klionsky, 2008; Nakai, 2007).

Apesar disso, a autofagia pode provocar a morte das células ou induzir a ativação de mecanismos de morte celular programada. Erroneamente, a simples presença de vacúolos típicos da autofagia (autofagossomos) em citoplasma de células que estão em processo de morte, tem sido relacionada com a morte celular autofágica (ACD - *autophagic cell death*). Muitos destes relatos na verdade se referem a outras vias de morte, sendo apenas acompanhadas pela autofagia. Por isso, atualmente têm-se definido dois processos diferentes nesse contexto, morte celular autofágica e morte acompanhada por autofagia, nesse a inibição da autofagia é capaz de evitar a morte

das células, e neste a inibição da autofagia não inibe a morte. Geralmente nestes casos o mecanismo de morte é outro, como apoptose e necrose (Galluzzi et al., 2018; Hailey, 2010; Kroemer & Levine, 2008; Shen, Kepp, & Kroemer, 2012).

Esses estudos nos mostram que a autofagia é uma via de proteção celular altamente complexa, que se relaciona com outras vias, tanto de proteção como de morte celular, e sua função dependerá do modelo estudado e do tratamento a que as células estão sendo submetidas.

1.10 Autofagia em células-beta

As células-beta são especializadas na produção de insulina e elas produzem pro-insulina a uma taxa de 10^6 moléculas/min, um total de aproximadamente 50% de toda sua produção proteica (Schuit, In't Veld, & Pipeleers, 1988). As moléculas de pro-insulina com dobramento normal são transportadas para o complexo de Golgi e passam por diversas cisternas até serem armazenadas em grânulos de insulina e pro-insulina. Esses grânulos podem ser degradados pelos lisossomos através da autofagia (microautofagia ou macroautofagia).

Estudos tem demonstrado que a deleção de Atg7^{-/-} em ratos ou camundongos provoca a degeneração das ilhotas pancreáticas, hipertrofia de células-beta, deficiência na secreção de insulina, intolerância à glicose e imunorreação a insulina. Além disso, observa-se acúmulo de proteínas poliubiquitinadas, um aumento nos níveis de LC3-II e p62 e formação de agregados proteicos (Fujitani, Kawamori, & Watada, 2009; Jung et al., 2008; Jung & Lee, 2009), indicando que a autofagia é importante para a homeostase das células-beta. Outro estudo demonstrou que células-beta de ratos Atg7^{-/-} contêm grânulos de pro-insulina marcados com p62 e que inibidores farmacológicos de autofagia e silenciamento de ATG5/7 podem aumentar a quantidade basal de pró-insulina celular e outras proteínas contidas nos grânulos de secreção das células-beta e aumentar a secreção de insulina frente ao estímulo de glicose ou tratamentos de deficiência nutricional. Demonstrou-se também que os agregados proteicos frutos da inibição da autofagia são tóxicos para as células-beta (Riahi et al., 2016), indicando que a autofagia é importante para a degradação destes em condições normais. Assim, a autofagia em células beta é uma via fundamental para a manutenção da homeostase, evitando o acúmulo de agregados proteicos, proteotoxicidade e uma desregulação na liberação de insulina.

Diversos fatores de transcrição ativados através da sinalização de citocinas no DM1 são capazes de regular a autofagia em células-beta, como NF-kB e STAT-1, assim como regular as vias de estresse de retículo, apoptose, JNK, AMPK, levando a disfunção mitocondrial e aumento de espécies reativas do oxigênio (Eizirik, Cardozo, & Cnop, 2008). O aumento de espécies reativas do oxigênio é importante para a ativação de ATG4 (protease necessária para a formação dos autofagossomos) (Scherz-Shouval et al., 2007). O aumento dessas espécies reativas também provoca danos ao DNA, ativando assim as PARP-1 (enzima que atua no reparo do DNA), cuja atividade reduz os níveis celulares de NAD⁺. Esse evento ativa AMPK, provavelmente devido a inibição de mTOR, e ativa a autofagia (Q. Huang, Wu, Tan, Ong, & Shen, 2009). Dessa forma, em DM1 é verificado que existe a ativação da autofagia, esta via estaria sendo estimulada para reverter o dano provocado nas células devido à ação das citocinas pró-inflamatórias.

Trabalho publicado por Lambelet e colaboradores (2018) demonstrou que citocinas pró-inflamatórias modulam a autofagia através da via AMPK-ULK-1 e da inibição de mTOR, ativando a etapa inicial da autofagia em modelos de células-beta humanas e em ilhotas de ratos, mas estas bloqueiam o fluxo autofágico, levando a um aumento do estresse de retículo endoplasmático devido à disfunção da autofagia e facilitando a apoptose. Desta maneira, citocinas em células-beta estimulam o início da autofagia, mas desregulam a sua etapa final (fluxo autofágico) (Lambelet et al., 2018).

1.11 Relação entre prolactina em células-beta, HSPB1 e autofagia

Estudos feitos por nosso grupo de pesquisa têm mostrado a importância da proteína HSPB1, aumentada através do tratamento com prolactina, na inibição de apoptose provocada por citocinas em células-beta (Mansano, 2013). Mostramos que a inibição da expressão de HSPB1 em células MIN6 (células-beta derivadas de um insulinoma murino) abole completamente o efeito citoprotetor verificado com a utilização da prolactina.

Resultados obtidos em um projeto em andamento no nosso laboratório mostraram que PRL é capaz de diminuir a relação LC3-II/LC3-I em células-beta humanas tratadas com uma combinação de citocinas ou após privação de soro. No ensaio de marcação de vesículas ácidas é visto um aumento considerável na formação destas após exposição das células-beta a diferentes combinações de

citocinas e distintos indutores de estresse de retículo, assim como, após a privação de soro. Uma significativa diminuição na formação destas quando mantidas com PRL em todos os tratamentos estudados foi também observada. Além disso, PRL se mostrou capaz de restaurar os níveis basais de fosforilação de mTOR diminuída pelos tratamentos com combinações de citocinas e indutores de estresse de retículo endoplasmático. Curiosamente, ela também foi capaz de reestabelecer parcialmente os níveis de fosforilação de mTOR após o tratamento com rapamicina (Terra, 2013).

Nesse mesmo projeto mostrou-se que a inibição da autofagia tanto pelo tratamento com inibidores específicos (bafilomicina, 3-MA) quanto pelo silenciamento de ATG5 leva a um aumento na morte celular de células-beta, que é ainda mais proeminente na presença das diferentes combinações de citocinas e indutores de estresse de retículo, nos mostrando a importância de uma via autofágica funcional para a proteção dessas células frente a diversos estressores (Terra, 2013).

As chaperonas e a autofagia estão relacionadas e participam, juntamente com o sistema ubiquitina proteossoma, do controle de qualidade e reciclagem de proteínas intracelulares (Dokladny, Myers, & Moseley, 2015). Estudos mostraram que o aumento da expressão de HSP60 e HSP70 reduz a pancreatite causada por ceruleína em ratos, e que após este tratamento, os níveis de expressão de LC3-II aumentaram (Kim et al., 2011). Este resultado indica que a citoproteção provocada pela autofagia em células-beta estaria relacionada ao aumento da expressão de HSPs. Ainda não existem estudos que relacionem o efeito protetor da PRL em células-beta, a indução de HSPB1, e a regulação de autofagia nestas. Esse conhecimento é importante para identificar novas maneiras de se aumentar a eficiência do cultivo de ilhotas pancreáticas *in vitro*, e contribuir para a melhora da técnica de transplante de ilhotas pancreáticas em pacientes com DM1.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi estudar a participação de HSPB1, induzida por PRL, na modulação da autofagia em células-beta submetidas a estresse provocado por citocinas, e a participação desta via na proteção celular provocada por esse hormônio.

2.2 Metas Específicas

1. Manutenção da linhagem de células-beta MIN6 selvagens; MIN6 expressando em forma estável um shRNA específico para o silenciamento de HSPB1; MIN6 expressando em forma estável um shRNA controle.
2. Tratar estas células com uma combinação de citocinas pró-inflamatórias mantidas na presença ou ausência de PRL. Como controle, essas células também foram tratadas com rapamicina, indutor da via autofágica, e cloroquina, um inibidor da mesma via.
3. Analisar a morte celular através dos ensaios de viabilidade utilizando HO e PI nos diferentes tratamentos.
4. Avaliar a expressão das proteínas autofágicas LC3-II/LC3-I e p62.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

A linhagem celular de insulinoma murino MIN6 foi utilizada nos nossos experimentos. As células MIN6 são responsivas ao aumento de glicose e tem propriedades de transporte, fosforilação de glicose, utilização de glicose, altos níveis de GLUT2, baixos níveis de GLUT1, propriedades cinéticas da glicocinase e metabolismo da glicose semelhantes aos verificados em células-beta normais (Ishihara et al., 1993) sendo um dos modelos celulares mais utilizados em estudos com ilhotas e células-beta. Elas foram mantidas em meio de cultura RPMI (desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) com suplementação de 10% de SFB (soro fetal bovino), L-glutamina (2mM) (Sigma), 100U/mL de Ampicilina, 100U/ML de Estreptomicina, 10mM HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico) (Sigma), em estufa a 37°C, com atmosfera contendo 5,0% de CO₂. O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias de cultivo. Ao atingirem, aproximadamente, 80% da densidade de saturação, as células foram destacadas com solução contendo 1mg/ml de tripsina e 1mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), lavadas e ressuspensas em meio fresco. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultura contendo uma concentração final de 40% de SFB e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) estéril e armazenadas a -80°C e posteriormente no tanque de nitrogênio. Todas as linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram testadas quanto à presença de *Mycoplasma hominis*, por reações de PCR.

Com a finalidade de verificar o papel da chaperona HSPB1 no contexto do diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), foi gerada uma linhagem de MIN6 silenciada para esta proteína (MIN6 shHSPB1) (Mansano, 2013). O processo de silenciamento foi realizado com a técnica de RNA de interferência, através da inserção de um vetor shRNA por meio de uma infecção lentiviral, seguindo o protocolo descrito por (Tiscornia, Singer, & Verma, 2006b, 2006a). Como controle do processo de silenciamento, foi gerada uma linhagem que expressa um shRNA com uma sequência aleatória formada com a mesma composição de nucleotídeos que o shRNA de HSPB1, mas que não interfere com a expressão de nenhuma proteína de mamíferos. Tal sequência foi denominada *scramble C* (MIN6 scC). A obtenção e validação da

linhagem silenciada e da *scramble* foi resultado do trabalho de mestrado da aluna de doutorado do nosso grupo de pesquisa, Rosangela Aparecida Wailemann Mansano. O silenciamento de HSPB1 foi de aproximadamente 80% quando comparada as células parentais e células que expressam a sequência aleatória C (MIN6 scC) e A (MIN6 scA) (Mansano, 2013).

3.2 Tratamentos celulares

Previamente a qualquer tratamento celular, as células da linhagem MIN6, MIN6 ScC, MIN6 shHSPB1 (4×10^4 células/cm²) foram privadas de soro por 24h em meio RPMI suplementado com 0,1% SFB. Após, as células foram mantidas nestas condições e tratadas por 30min na presença ou ausência de prolactina (300ng/mL) (Pereira et al., 2001) e então incubadas por 16h na presença ou ausência de um coquetel de citocinas (INF- γ 32ng/ml, TNF- α 16ng/ml, IL-1 β 3,2ng/ml) (Peprotech, Cidade do México, México), 18h na presença ou ausência de cloroquina (CQ 10 μ m - Sigma) e 48h na presença ou ausência de rapamicina (Rapa 20nM – Cell Signaling). cloroquina e rapamicina foram usados como controles de inibição e ativação da autofagia, respectivamente. Cloroquina é uma base fraca permeável as membranas biológicas que apresenta afinidade por vesículas ácidas, como os lisossomos, podendo ser protonado no interior destes e assim alterar o pH desses ambientes, inibindo a atividade de enzimas no interior dessas vesículas ácidas e inativando sistemas de reciclagem e degradação celular através da inibição da fusão de autofagossomos com lisossomos (Geng, Kohli, Klocke, & Roth, 2010; Poole & Ohkuma, 1981).

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

Células MIN6, MIN6 ScC e MIN6 shHSPB1 foram plaqueadas e mantidas em meio apropriado, conforme descrito, até a realização dos devidos tratamentos celulares. A porcentagem de células totais e mortas foi determinada através da marcação por 15 min com os ligantes de DNA PI (5 μ g/mL) e HO 33342 (5 μ g/mL; Sigma-Aldrich) (Cardozo et al., 2005).

As células foram examinadas sob microscópio de fluorescência invertido (Nikon Corporation, Tokyo, Japão). Um mínimo de 500 células foi contado em cada condição experimental por dois observadores independentes, sendo um sem conhecimento das

identidades das amostras, resultados foram aceitos quando apresentaram uma similaridade superior a 90%. Os resultados foram apresentados como porcentagem de morte.

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

3.4 Ensaio de Western Blot

Após os tratamentos celulares, foi realizada a coleta das células, aderidas as placas, por raspagem, a 4°C, com PBSA, na presença de inibidores de protease (Amersham Biosciences) e de fosfatase (Sigma). A suspensão celular foi centrifugada a 0,8x G durante 3min a 4°C, e o precipitado foi ressuspensionado em tampão de lise (10mM de Tris pH 7,5; 150mM de NaCl; 5mM de EDTA; 1mM de EGTA; 1% de NP-40; 0,1% de SDS; 1mM de Ortovanadato de Sódio; contendo inibidores de proteases e de fosfatases) a 4°C. Este lisado foi centrifugado a 4° e 13.400x G por 30min para clarificação. As proteínas presentes no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (kit Bio Rad) (Bradford, 1976). O material proteico foi mantido em freezer a -80°C.

Extratos proteicos totais das células submetidas aos tratamentos acima enunciados contendo quantidades iguais de proteínas (100µg) foram desnaturadas em banho seco a 99°C por 5min em tampão de amostra 20% v/v (TrisHCL 50mM pH 6,8; SDS 2% m/v; glicerol 10% v/v; betamercaptoetanol 5% v/v; Azul de bromofenol 0,3% m/v) e em seguida submetidas ao fracionamento em eletroforese em gel vertical contendo de 6 à 16% de poliacrilamida–SDS, à 15 ou 25mA, durante 2h a 4h.

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

Para a inibição da marcação de sítios inespecíficos as membranas foram incubadas com uma solução de bloqueio (PBSA contendo 5% de leite desnatado ou 5% de BSA + 0,1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) ou Bloqueio Vegetal (Starting Block (PBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific)) + 0,05% de Tween 20), por 16h a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com PBSA + 0,1% de Tween

20, por 10 min à temperatura ambiente, e incubadas por 2h ou 18h, sob agitação, a temperatura ambiente ou a 4°C, respectivamente, com o anticorpo primário que reconhece as proteínas de interesse (monoclonal anti-LC3 (L8918) Sigma-Aldrich, anti-p62/SQSTM1 (P0067) Sigma-Aldrich, anti- α -Tubulina (B512) Sigma-Aldrich Corporation).

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

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

Após a imunorreação, as membranas inicialmente incubadas com anticorpos para a detecção de proteínas p62 foram submetidas ao processo de *stripping*. Este processo consisti na retirada dos anticorpos através de duas lavagens com água por 10min, uma lavagem com a solução de stripping (Glicina 25mM com SDS 1% pH 2,0) por 30min e posteriormente 4 lavagens com PBSA com 0,1% de Tween 20 e por 10min. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas e incubadas com anticorpos para α -tubulina (Anti- α -Tubulina (B512) Sigma-Aldrich Corporation) e seguiu-se o processo de lavagem e detecção de proteínas descrita anteriormente.

Após a revelação, a intensidade das bandas obtidas foi analisada por densitometria quantitativa, utilizando-se o software ImageJ (National Institute of Health [NIH]). A expressão diferencial foi analisada dividindo-se os valores das densitometrias das bandas quimioluminescente dos anticorpos primários específicos LC3-II pelo seus respectivos LC3-I e p62 pelos suas respectivas tubulinas.

3.5 Análise estatística dos dados

Todos os resultados foram analisados para distribuição gaussiana e passaram no teste de normalidade com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.0. As diferenças estatísticas entre as médias dos grupos experimentais foram testadas através de One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

4.0 RESULTADOS

Prolactina não protege células MIN6 contra a morte provocada por inibição de autofagia provocada por cloroquina

Para confirmar se existe uma relação entre o aumento dos níveis de HSPB1 através do tratamento com PRL em células-beta, e a modulação da autofagia regulada por esse hormônio, foram realizados testes de viabilidade onde foi quantificada a porcentagem de morte nos respectivos tratamentos. Para isso, células MIN6 foram pré-incubadas com veículo ou PRL (300ng/ml) durante 30min e posteriormente tratadas com uma combinação de citocinas pró-inflamatórias que modelam o ambiente imunológico presente nas ilhotas pancreáticas durante o DM1 (INF- γ 32ng/ml, TNF- α 16ng/ml, IL-1 β 3,2ng/ml). Para o controle de indução de autofagia foi utilizado o inibidor de mTOR Rapamicina (20 nM) por 48h. Já havia sido padronizado no nosso laboratório que nesta concentração e neste tempo (em células INS-1E) o composto é capaz de reduzir de forma significativa os níveis da razão p-mTOR/mTOR, p-4E-BP1/4E-BP1 e aumentar LC3-II/LC3-I, sendo capaz de induzir autofagia (Terra, 2013). Cloroquina foi usada na concentração de 10 μ m em um tempo de 18:30h (tratamento já padronizado no nosso laboratório).

Os dados apresentados na figura 8 mostram os resultados de vários ensaios de viabilidade realizados com células MIN6 utilizando Hoescht (HO) e Iodeto de propídeo (PI). Como controle de máxima viabilidade, células foram mantidas em cultura com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (resultados não mostrados), ou, com as células carenciadas utilizando meio RPMI contendo 0,1% SFB (barras brancas). Todos os demais tratamentos foram realizados em células previamente carenciadas de soro (RPMI 0,1% SFB) por 24h. Esse passo é importante porque reduz a influência de possíveis componentes encontrados no soro fetal que influenciam nos resultados por mimetizarem a ação da PRL, como por exemplo, a própria prolactina e o hormônio lactogênio placentário (Fujinaka, Takane, Yamashita, & Vasavada, 2007).

Os resultados apresentados na figura 8 mostram que os tratamentos com esses compostos (Cyt) foram capazes de provocar uma porcentagem de morte significativa em relação ao controle 0.1% SFB. Este é o resultado esperado para tratamentos de células-beta quando se acrescentam citocinas pró-inflamatórias, conhecidas por induzirem apoptose neste tipo celular (Eizirik et al., 2009). Como controle positivo,

mostramos que o pré-tratamento das células com PRL reduziu significativamente a porcentagem de morte induzida pelo tratamento com citocinas.

Os tratamentos com o inibidor farmacológico da autofagia, Cloroquina (CQ), aumentaram significativamente a morte celular quando comparado com os valores obtidos na condição controle, mas não produziu um efeito cumulativo de morte quando colocada juntamente com citocinas. No tratamento que combinou CQ, citocinas e prolactina verificou-se uma redução significativa de morte em relação ao seu controle sem PRL, mas essa redução não alcançou os níveis verificados no controle 0.1% SFB. Por outro lado, ativar autofagia utilizando Rapamicina promoveu citoproteção contra o tratamento com citocinas, ao serem observadas porcentagens de morte similares aos valores obtidos na situação controle. O tratamento com prolactina não alterou significativamente a porcentagem de morte observadas nas células apenas tratadas com veículo e cloroquina ou Rapamicina. Em conjunto, esta série de resultados mostra que os mecanismos de citoproteção induzidos por PRL não envolvem significativamente a modulação da macroautofagia. Quando este processo está inibido o tratamento hormonal é capaz de agir por outras vias de inibição de morte suficientes para contornar os danos ocasionados pelas citocinas pró-inflamatórias.

O tratamento com Rapamicina combinado com citocinas foi realizado com o intuito de corroborar resultados prévios, de que a ativação antecipada da autofagia é capaz de reduzir a porcentagem de morte induzida por citocinas, como já mostrado pelo nosso grupo no modelo de células-beta INS-1E (Terra, 2013). Foi verificado que a ativação do processo autofágico promoveu uma redução de morte em comparação ao tratamento com citocinas em células MIN6. Cabe salientar que o tratamento com PRL não modificou o efeito citoprotetor da Rapamicina na presença das citocinas pró-inflamatórias.

FIGURA 8: Prolactina não protege células MIN6 contra a morte provocada por inibição da autofagia. Células MIN6 foram submetidas à privação de soro por 24h na presença ou na ausência do tratamento com Rapamicina (Rapa 20 nM). Após esse período de tempo, as culturas celulares foram pré-tratadas na ausência ou na presença de Cloroquina (Cloroquina (CQ) 10 μm) e/ ou Prolactina (300ng/mL) por 2h ou 30min respectivamente e as células foram submetidas ao tratamento com uma combinação de citocinas (Cyt) (INF-γ 32ng/ml, TNF-α 16ng/ml IL-1β 3ng/ml) por 16h. Finalizado o tratamento, foram obtidas imagens por microscopia de fluorescência e contado o número de células totais (azul) e mortas (vermelho). (A-M) Imagem representativa de cada uma das condições. (A) Células cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. (B) células tratadas com citocinas pró-inflamatórias. (C) Cloroquina. (D) Células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0.1% de soro fetal bovino. (E) PRL e Cyt. (F) CQ e PRL. (G) Rapamicina. (H) CQ e Cyt. (I) Rapa e Cyt. (J) Rapa e PRL. (L) CQ, Cyt e PRL. (M) Rapa, Cyt e PRL. (N) Histogramas contendo todos os resultados obtidos. Em cada experimento foram contados mais de 500 núcleos totais (n=3 experimentos independentes). Resultados estão apresentados como a média ± EPM. p<0,05. *: tratamento vs. Controle (Ctrl). #: PRL vs. Veículo (V).

Os resultados mostrados na figura 9 correspondem ao experimento realizado com células MIN6 expressando de forma constitutiva um shRNA que não modifica os níveis de da proteína HSPB1 (MIN6-SsC). Como o perfil de resposta observado equivale aos obtidos com as células parentais, podemos concluir que a expressão constitutiva de um “Short Hairpin” (sh) inespecífico não influencia os resultados.

FIGURA 9: Prolactina não protege células MIN6-scC contra a morte provocada por inibição da autofagia.

Células MIN6-SsC foram submetidas à privação de soro por 24h na presença ou na ausência do tratamento com Rapamicina (Rapa 20 nM). Após esse período de tempo, as culturas celulares foram pré-tratadas na ausência ou na presença de Cloroquina (Cloroquina (CQ) 10 μ M) e/ ou Prolactina (300ng/mL) por 2h ou 30min respectivamente e as células foram submetidas ao tratamento com uma combinação de citocinas (Cyt) (INF- γ 32ng/ml, TNF- α 16ng/ml IL-1 β 3ng/ml) por 16h. Finalizado o tratamento, foram obtidas imagens por microscopia de fluorescência e contado o número de células totais (azul) e mortas (vermelho). (A-M) Imagem representativa de cada uma das condições. (A) Células cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. (B) células tratadas com citocinas pró-inflamatórias. (C) Cloroquina. (D) Células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0.1% de soro fetal bovino. (E) PRL e Cyt. (F) CQ e PRL. (G) Rapamicina. (H) CQ e Cyt. (I) Rapa e Cyt. (J) Rapa e PRL. (L) CQ, Cyt e PRL. (M) Rapa, Cyt e PRL. (N) Histogramas contendo todos os resultados obtidos. Em cada experimento foram contados mais de 500 núcleos totais (n=3 experimentos independentes). Resultados estão apresentados como a média $\pm$ EPM. p<0,05. *: tratamento vs. Controle (Ctrl). #: PRL vs. Veículo (V).

Níveis diminuídos de HSPB1 não modificam a resposta ao tratamento com PRL em condições de inibição da autofagia

Com o intuito de avaliar se HSPB1 participa da regulação da autofagia provocada por PRL em células-beta submetidas ao tratamento com citocinas, células MIN6 apresentando um silenciamento de 80% nos níveis proteicos de HSPB1 em forma estável (Mansano, 2013) foram submetidas aos mesmos tipos de tratamentos que as células MIN6 e as MIN6-SsC. Os resultados apresentados na figura 10 corroboram os dados anteriores do nosso laboratório ao mostrar que HSPB1 seria um mediador da citoproteção induzida por PRL, sinalizam também que a inibição desta chaperona não está envolvida na inibição da apoptose induzida pela ativação da autofagia utilizando Rapamicina. Um resultado interessante verificado foi o fato do tratamento com cloroquina, citocinas e prolactina não apresentar uma viabilidade significativamente menor do que seu controle, como visto nos tratamentos com MIN6 não silenciadas. Esses resultados mostram que Rapamicina promove proteção contra a morte induzida por citocinas de maneira HSPB1 independente. Dos efeitos observados no tratamento combinando Cloroquina, citocinas e PRL pode-se concluir que a autofagia não é um dos mecanismos envolvidos na citoproteção induzida pelo hormônio, pois mesmo na presença do inibidor de autofagia, existe remanescente um certo grau de citoproteção promovido pelo hormônio contra os efeitos das citocinas pró-inflamatórias. O componente não relacionado com o processo autofágico, como a regulação da apoptose e do estresse de retículo, seria o que estaria sendo mediado pela indução dos níveis de HSPB1 (figura 10).

FIGURA 10: HSPB1 não está envolvida na inibição de morte induzida por modulação da autofagia. Células MIN6-shHSPB1 foram submetidas à privação de soro por 24h na presença ou na ausência do tratamento com Rapamicina (Rapa 20 nM). Após esse período de tempo, as culturas celulares foram pré-tratadas na ausência ou na presença de Cloroquina (Cloroquina (CQ) 10 μ M) e/ ou Prolactina (300ng/mL) por 2h ou 30min respectivamente e as células foram submetidas ao tratamento com uma combinação de citocinas (Cyt) (INF- γ 32ng/ml, TNF- α 16ng/ml IL-1 β 3ng/ml) por 16h. Finalizado o tratamento, foram obtidas imagens por microscopia de fluorescência e contado o número de células totais (azul) e mortas (vermelho). (A-M) Imagem representativa de cada uma das condições. (A) Células cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. (B) células tratadas com citocinas pró-inflamatórias. (C) Cloroquina. (D) Células cultivadas em meio RPMI suplementado com 0.1% de soro fetal bovino. (E) PRL e Cyt. (F) CQ e PRL. (G) Rapamicina. (H) CQ e Cyt. (I) Rapa e Cyt. (J) Rapa e PRL. (L) CQ, Cyt e PRL. (M) Rapa, Cyt e PRL. (N) Histogramas contendo todos os resultados obtidos. Em cada experimento foram contados mais de 500 núcleos totais (n=3 experimentos independentes). Resultados estão apresentados como a média $\pm$ EPM. p<0,05. *: tratamento vs. Controle (Ctrl). #: PRL vs. Veículo (V).

HSPB1 induzida por Prolactina modula a autofagia em células MIN6.

Com o intuito de estudar o efeito provocado por HSPB1 induzida por PRL em células-beta tratadas com citocinas na regulação da autofagia, os níveis proteicos da razão LC3-II/LC3-I foram avaliados mediante o uso da técnica de western blot. Os resultados apresentados na figura 11 mostram que o tratamento com Cloroquina foi eficiente em aumentar a razão LC3-II/LC3-I em todos os tratamentos, indicando uma diminuição eficiente da fusão dos autofagossomos com os lisossomos, mostrando assim, a consequente inibição da autofagia e redução da reciclagem de LC3-II. O motivo pelo qual não verificamos um aumento da razão LC3-II/LC3-I nos tratamentos com Rapamicina e citocinas pode ter sido devido ao fato de que a autofagia nesses tratamentos não está inibida e, portanto, LC3-II está sendo degradado normalmente juntamente com os autofagossomos. Em síntese, o fluxo autofágico nesses tratamentos não está inibido e a degradação e reciclagem do conteúdo das vesículas autofágicas está sendo realizado normalmente, reduzindo assim a banda de LC3-II verificadas nos nossos resultados de western blot. Foi possível constatar também que o tratamento hormonal reduziu significativamente os níveis de LC3-II se comparado contra as células sem prolactina nas células MIN6 e MIN6-SsC (controle com sequência “sh” aleatória) tratadas com cloroquina e citocinas, reduzindo os níveis de LC3-II significativamente em relação ao controle (cloroquina mais citocinas), indicando que prolactina está modulando a via da autofagia nessas condições. Um resultado interessante verificado foi que nas células MIN6-SsC houve um aumento geral dos níveis de LC3-II em relação as células parentais. Em conjunto esses resultados corroboram estudos feitos por nosso grupo em células INS-1E (Terra, 2013) mostrando que prolactina regula a autofagia em células-beta.

FIGURA 11: Modulação da razão LC3-II/LC3-I em células MIN6 e MIN6-SsC, na presença ou na ausência de prolactina. Células MIN6 e MIN6-SsC foram submetidas à privação de soro por 24h na presença ou na ausência do tratamento com Rapamicina (Rapa 20 nM). Após esse período de tempo, as culturas celulares foram pré-tratadas na ausência ou na presença de Cloroquina (Cloroquina (CQ) 10 μ m) e/ ou Prolactina (300ng/mL) por 2h ou 30min respectivamente e finalmente a morte celular foi induzida pelo tratamento com uma combinação de citocinas (Cyt) (INF- γ 32ng/ml, TNF- α 16ng/ml, IL-1 β 3ng/ml). Após o término dos tratamentos, foram obtidos extratos proteicos que foram submetidos à ensaios de western blot para dosagem da razão LC3-II/LC3-I. (A) Imagens representativas dos ensaios de Western blot. (B) Histogramas referentes a todos os resultados obtidos apresentados como unidades arbitrárias de densitometria após a normalização de α -tubulina. Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ EPM; n=3 experimentos independentes; *: p<0,05; tratamento vs. controle (Ctrl) #: p<0,05 veículo vs. PRL.

O resultado verificado na figura 11 não se repetiu no experimento feito nas células MIN6-shHSPB1, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos cloroquina mais citocinas e cloroquina mais citocinas juntamente com prolactina (figura 12). Indicam que a autofagia só é modulada por PRL na presença de níveis aumentados de HSPB1 em células MIN6 tratadas com citocinas e cloroquina.

FIGURA 12: Modulação da razão LC3-II/LC3-I em células MIN6-shHSPB1, na presença ou ausência de prolactina. Células MIN6-shHSPB1 foram submetidas à privação de soro por 24h na ausência ou na presença de Rapamicina (Rapa) 20 nM. Após esse período de tempo, as culturas celulares foram pré-tratadas na ausência ou na presença de Cloroquina (Cloroquina (CQ) 10 µm) e/ ou Prolactina (300ng/mL) por 2h ou 30min respectivamente e finalmente a morte celular foi induzida pelo tratamento com uma combinação de citocinas (Cyt) (INF-γ 32ng/ml, TNF-α 16ng/ml, IL-1β 3ng/ml). Após o término dos tratamentos, foram obtidos extratos proteicos que foram submetidos à ensaios de western blot para dosagem da razão LC3-II/LC3-I. (A) Imagens representativas dos ensaios de Western blot. (B) Histogramas referentes a todos os resultados obtidos apresentados como unidades arbitrárias de densitometria após a normalização de α-tubulina. Os resultados estão apresentados como médias ± EPM; n=3 experimentos independentes; *: p<0,05; tratamento vs. controle (Ctrl) #: p<0,05 veículo vs. PRL.

HSPB1 induzida por Prolactina não modula o fluxo autofágico em células MIN6

Com o objetivo de avaliar se o aumento de HSPB1 através do tratamento com PRL é capaz de modular o fluxo autofágico em células MIN6 tratadas com citocinas, realizamos o experimento de western blot para verificarmos a proteína p62. Os resultados mostram que prolactina não é capaz de modular o fluxo autofágico em nenhuma das condições estudadas em células MIN6, MIN6-SsC e MIN6-shHSPB1 (figura 13 e 14). Esses resultados indicam que o aumento de HSPB1 através do tratamento com PRL não é capaz de modular o fluxo autofágico em células MIN6 submetidas ao tratamento com citocinas. Nesse experimento verificamos também que os níveis de p62 em células MIN6-SsC são maiores, indicando um fluxo autofágico basal maior.

Com o objetivo de verificar se níveis aumentados de HSPB1 através do tratamento com PRL são capazes de modular o fluxo autofágico (medido através dos

níveis proteicos de p62) em condições de ativação ou inibição de autofagia, células MIN6, MIN6-SsC e MIN6-shHSPB1 foram tratadas com Cloroquina ou Rapamicina na presença ou ausência de prolactina (figura 13 e 14). Os resultados, tanto em células MIN6, MIN6-SsC como nas MIN6-shHSPB1, mostram que não houve diferença significativa entre os tratamentos com PRL e os controles. Isso indica que o aumento de HSPB1 através do tratamento com prolactina não modula o fluxo autofágico quando a autofagia está ativada ou inibida. Além disso, nas células MIN6-shHSPB1 não houve o aparecimento de padrões verificados no experimento com as células MIN6 em nenhum dos tratamentos, indicando uma possível desregulação nos mecanismos de reciclagem de p62 devido à ausência de HSPB1.

FIGURA 13: Prolactina não modula o fluxo autofágico em células MIN6 e MIN6-SsC. Células MIN6 e MIN6-SsC foram submetidas à privação de soro por 24h na ausência ou na presença de Rapamicina (Rapa) 20 nM. Após esse período de tempo, as culturas celulares foram pré-tratadas na ausência ou na presença de Cloroquina (Cloroquina (CQ) 10 μ m) e/ ou Prolactina (300ng/mL) por 2h ou 30min respectivamente e finalmente a morte celular foi induzida pelo tratamento com uma combinação de citocinas (Cyt) (INF- γ 32ng/ml, TNF- α 16ng/ml, IL-1 β 3ng/ml). Após o término dos tratamentos, foram obtidos extratos proteicos que foram submetidos à ensaios de western blot para dosagem da razão p62/Tubulina. (A) Imagens representativas dos ensaios de Western blot. (B) Histogramas referentes a todos os resultados obtidos apresentados como unidades arbitrárias de densitometria após a normalização de α -tubulina. Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ EPM; n=3 experimentos independentes; *: p<0,05; tratamento vs. controle (Ctrl) #: p<0,05 veículo vs. PRL

5.0 DISCUSSÃO

Em conjunto, nossos resultados mostraram que a citoproteção induzidos por PRL não envolve o funcionamento do processo de macroautofagia. Quando este processo está inibido o tratamento hormonal é capaz de agir por outras vias de inibição de morte suficientes para contornar os danos ocasionados pelas citocinas pró-inflamatórias. Mostramos também que prolactina regula a autofagia em células-beta, contudo, não é capaz de modular o fluxo autofágico.

Esses resultados vão ao encontro de trabalhos que mostram a autofagia como uma via fundamental para manter a homeostase e a função das células beta, já que estas são células endócrinas especializadas na produção de pró-insulina (106 moléculas/min) (Schuit et al., 1988) e necessitam manter uma eficiente regulação do estado estacionário basal desta proteína, através de sua degradação (Riahi et al., 2016).

No nosso trabalho mostramos que o pré tratamento com rapamicina por 48h em células-beta é eficiente em promover citoproteção celular contra citocinas pró-inflamatórias, tanto em células MIN6 como em células MIN6-SsC e MIN6-shHSPB1, com ou sem a presença de prolactina. Isto indica que a ativação farmacológica antecipada da autofagia é capaz de promover proteção em modelos de células-beta e que nem a prolactina, nem o aumento de HSPB1 promovido por essa, interfere nessa proteção. Um estudo realizado em nosso laboratório mostrou que em modelos de insulinomas de ratos (INS1-E) e ilhotas de camundongos e humanas, rapamicina não foi capaz de reduzir a morte celular provocada por citocinas e não provocou morte (Terra, 2013). Existem trabalhos que descrevem a toxicidade de rapamicina em pacientes transplantados com ilhotas pancreáticas, contudo evidências têm mostrado que este efeito colateral está relacionado mais a resposta do paciente a imunossupressão do que ao seu efeito em células-beta (Berney & Secchi, 2009). Quando tratamos as células com cloroquina, percebemos um aumento da porcentagem de morte em relação ao controle. Este resultado vai ao encontro de outros artigos que mostram que a autofagia é importante para a homeostase de células-beta (Kaniuk et al., 2007; Riahi et al., 2016; Welsh, 2012). Contudo, não verificamos um aumento de morte provocado pela combinação de citocinas e cloroquina, indicando que a redução da autofagia por si não apresenta sinergia em relação à morte provocada por citocinas. Embora prolactina não tenha se mostrado

capaz de reduzir a morte no tratamento com cloroquina, ela reduziu significativamente, a morte no tratamento com cloroquina mais citocinas nas células MIN6 e MIN6-SsC, mas não nas células MIN6-shHSPB1 (figura 8, 9 e 10). Em conjunto, estes resultados mostram que os mecanismos de citoproteção induzidos por PRL não envolvem a macroautofagia. Quando este processo está inibido o tratamento hormonal é capaz de agir por outras vias de inibição de morte suficientes para contornar os danos ocasionados pelas citocinas pró-inflamatórias, e este contorno envolve diretamente a chaperona HSPB1.

Esses resultados estão de acordo com estudos realizados no nosso laboratório que mostram que prolactina através de HSPB1, além de modular a apoptose em células-beta (Mansano, 2013) modula também a via da UPR (Gomes, 2016), reduzindo assim o estresse de retículo provocado por citocinas, e o estresse oxidativo provocado por esta (resultados ainda não publicados). Tem sido mostrado em diversos artigos a importância de uma via autofágica funcional em células-beta em condições normais, mantendo a proteostase, e sobretudo em condições de estresse celular (Kaniuk et al., 2007; Riahi et al., 2016; N. Welsh, 2012). Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa tem mostrado que a inibição da autofagia com bafilomicina e 3-MA (inibidores farmacológicos) e o silenciamento de ATG5 leva a um aumento na morte celular, sendo mais proeminente na presença de citocinas e indutores de estresse de retículo (Terra, 2013). Dessa forma, esses trabalhos em conjunto nos ajudam a perceber que o efeito protetor da prolactina sobre células-beta é mediado por diversas vias de proteção celular, e que a autofagia, embora seja necessária para a homeostase de células-beta, não está envolvida nessa proteção.

Para verificarmos a autofagia, medimos os níveis de autofagossomos através da medição de LC3-II por western blot. Esta técnica é muito empregada nos ensaios que estudam autofagia, contudo seu resultado pode apresentar duas interpretações, o aumento de LC3-II pode ser devido ao aumento da indução da autofagia, ou devido a redução do fluxo autofágico, já que LC3-II é degradada juntamente com os autofagossomos na última etapa da autofagia (Klionsky et al., 2009). Nos nossos resultados verificamos que apenas os tratamentos e controles submetidos a exposição com cloroquina apresentaram níveis de LC3-II consideráveis em todos os modelos celulares. Isto é esperado já que a função da cloroquina é inibir a fusão dos autofagossomos com os lisossomos, impedindo o fluxo autofágico e causando

acúmulo destas estruturas (Geng et al., 2010; Poole & Ohkuma, 1981). Contudo, este padrão de resposta não se assemelha ao verificado em resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa que mostraram mudanças significativas de LC3-II em tratamentos com citocinas e/ou prolactina sem o tratamento de cloroquina em ilhotas de ratos, humanas e células INS-1E (Terra, 2013). O aparecimento deste padrão pode ser devido as diferenças dos modelos celulares estudados. Além disso, o motivo pelo qual não verificamos um aumento da razão LC3-II/LC3-I nos tratamentos com rapamicina e citocinas pode ter sido devido ao fato de que a autofagia nesses tratamentos não está inibida e, portanto, LC3-II está sendo degradado juntamente com os autofagossomos em uma velocidade mais rápida do que a que podemos detectar.

Nos tratamentos com cloroquina e citocinas a prolactina reduziu os níveis de LC3-II nas células MIN6 e MIN6-SsC. Contudo este padrão não se repetiu nas células MIN6-shHSPB1 (figura 11 e 12). Esses resultados indicam que PRL modula a autofagia induzida pelo tratamento com citocinas em células-beta, e descreve pela primeira vez que essa modulação ocorre através de HSPB1. Esses dados corroboram, em parte, um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa onde verificou-se que o tratamento com citocinas em células-beta (INS-1E) foi capaz de reduzir os níveis de mTOR e 4-EBP1 fosforilado e aumentar os níveis de LC3-II (Terra, 2013). Mostrou-se também que prolactina é capaz de restaurar os níveis de mTOR fosforilado, reduzir LC3-II e a quantidade de vesículas autofágicas marcadas com laranja de acridina, após o tratamento com citocinas, indicando assim uma modulação da autofagia (Terra, 2013), o que corrobora nossos resultados realizados em células MIN6.

A modulação da autofagia provocada por prolactina pode estar relacionada com a função desta no contexto da morte provocada por citocinas pro-inflamatórias em células-beta. Um artigo publicado por Lambelet e colaboradores (2018), demonstrou que citocinas pró-inflamatórias ativam a via AMPK-ULK-1 e inibem mTOR, sendo responsável, assim, por ativar a etapa inicial da autofagia em modelos de células-beta e ilhotas de ratos. Contudo, esse estudo revelou que citocinas bloqueiam o fluxo autofágico, levando a um aumento do estresse de retículo endoplasmático, devido a disfunção da autofagia e facilitam a apoptose. Desta maneira, citocinas em células-beta estimulam o início da autofagia, mas desregulam a sua etapa final (fluxo autofágico) (Lambelet et al., 2018). Este trabalho está de acordo com um trabalho do nosso grupo (Terra, 2013) que estudou a função da autofagia no contexto do DM1,

quando células-beta estão submetidas a estresse provocada por citocinas. Em ambos os estudos, conclui-se que citocinas ativam a autofagia, mas esta via é ineficiente em provocar proteção celular neste contexto.

Outro resultado que precisa ser focado é a capacidade de HSPB1 mediar a regulação da autofagia provocada por prolactina em células-beta submetidas a exposição de citocinas. Estudos tem mostrado a relação entre indução de estresse de retículo e ativação da autofagia (Deegan, Saveljeva, Gorman, & Samali, 2012), mostrando também que HSPB1 pode estar indiretamente relacionada com a regulação da autofagia através da modulação da UPR, como no caso de células de carcinoma hepatocelular submetidas a estímulo de morte provocado por ciplastina (Chen & Dai, 2011). Um estudo realizado em modelos celulares de blastoderma ovopositado de aves, demonstrou que a autofagia e a expressão de genes pró-autofágicos está suprimida nas células silenciadas para HSPB1 (Hwang et al., 2016). Uma outra regulação indireta sobre a autofagia provocada por HSPB1 está relacionada a sua capacidade de reduzir estresse oxidativo (Mehlen, Prévile, et al., 1996). Recentemente, HSPB1 também tem sido relacionada com a regulação da autofagia e mitofagia através da estabilização do citoesqueleto (Tang et al., 2011). Contudo, até a data deste trabalho, nenhuma relação direta foi encontrada entre HSPB1 e regulação da autofagia em células-beta. Outras sHSPs (*Small HSPs*) são descritas regulando a autofagia. Por exemplo, HSPB6 fosforilada em seu resíduo serina 16, é capaz de proteger células renais do estresse provocado por isquemia/reperfusão em ratos, reduzindo a apoptose e ativando a autofagia (Qian et al., 2009). A HSPB7 também é capaz de aumentar a autofagia e sua influência se dá através da sua ligação a agregados proteicos, facilitando assim o reconhecimento desses pelos autofagossomos (Vos, Zijlstra, Carra, Sibon, & Kampinga, 2011). Outra sHSP relacionada é a HSPB8, que em casos de estresse proteotóxicos, liga-se a BAG3 e aos agregados proteicos, facilitando seu reconhecimento e degradação pela autofagia (Carra, Brunsting, Lambert, Landry, & Kampinga, 2009; Carra, Seguin, & Landry, 2008; Nivon et al., 2016).

Embora tenhamos encontrado evidências de que a prolactina regula autofagia através de HSPB1, não existem indícios que demonstrem como ocorre esse efeito. Trabalho realizado em nosso laboratório encontrou evidências de como prolactina poderia modular a autofagia, demonstrando que, em parte, esta ocorre através da

atividade da via de sinalização PI3K (Terra, 2013). Contudo, como ocorre a modulação da autofagia provocada por HSPB1 ainda é um questão que precisa ser estudada.

Nossos resultados mostraram também que em células MIN6, MIN6-SsC e MIN6-shHSPB1 a prolactina não foi capaz de modular o fluxo autofágico, verificado através da medição de p62. Um resultado interessante que verificamos foi uma desregulação no padrão de resposta verificada nas células MIN6-shHSPB1, indicando uma possível influência de HSPB1 na manutenção do fluxo autofágico em células-beta.

Neste trabalho demostramos pela primeira vez até então descrita, que a modulação da autofagia induzida pela PRL não estaria relacionada com proteção celular em células-beta submetidas a estresse provocado por citocinas. Por outro lado, a modulação da autofagia provocada por prolactina dependeria pelo menos em parte, de HSPB1. Esses resultados são uteis para o entendimento de como e por quais vias moleculares a prolactina promove proteção em células-beta e possibilita a inferência de novas estratégias que possam melhorar a sobrevivência das células-beta nas ilhotas que estão sendo transplantadas. Ajudando assim na taxa de sucesso do transplante, e melhorando a saúde de milhares de pessoas que tem DM1.

6.0 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou, pela primeira vez, que os mecanismos de citoproteção induzidos por PRL não envolvem o funcionamento do processo de macroautofagia, pois quando este processo está inibido, o tratamento hormonal é capaz de agir por outras vias de inibição de morte suficientes para contornar os danos ocasionados pelas citocinas pró-inflamatórias. Mostramos também que a prolactina regula a autofagia em células-beta, contudo, não é capaz de modular o fluxo autofágico.

Esses resultados são importantes, pois trazem novos conhecimentos sobre os mecanismos moleculares, induzidos por prolactina, que promovem proteção em células-beta, e possíveis estratégias que poderão ser utilizadas com o objetivo de contribuir para a melhora da técnica de cultivo de ilhotas, o transplante destas e a qualidade de vida de milhões de pacientes que apresentam o diabetes *mellitus* tipo 1.

7.0 Referências Bibliográficas

- ABEL, J. J. (1926). Crystalline insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 12(2), 132–136.
- Aggarwal, B., & Al., E. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119, 651–65.
- Arden, K. C., Boutin, J. M., Djiane, J., Kelly, P. A., & Cavennee, W. K. (1990). The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of human chromosome 5. *Cytogenet. Cell Genet.*, 53, 161–165.
- Arrigo, André-Patrick Ducarouge, B., Lavial, F., & Benjamin, G. (2015). Immense Cellular Implications Associated to Small Stress Proteins Expression: Impacts on Human Pathologies. In R. M. Tanguay & L. E. Hightower (Eds.), *The Big Book on Small Heat Shock Proteins, Heat Shock Proteins* (pp. 27–83). Switzerland: Springer International Publishing.
- Arrigo, A. (2012). Editorial: heat shock proteins in cancer. *Curr Mol Med*, 12, 1099–1101.
- Arrigo, A., & Gibert, B. (2012). HspB1 dynamic phospho-oligomeric structure dependent interactome as cancer therapeutic target. *Curr Mol Med*, 12, 1151–1163.
- Arrigo, A., & Gibert, B. (2013). Protein interactomes of three stress inducible small heat shock proteins: HspB1, HspB5 and HspB8. *Int J Hyperthermia*, 29, 409–422.
- Arrigo, A., & Gibert, B. (2014). HspB1, HspB5 and HspB4 in human cancers: potent oncogenic role of some of their client proteins. *Cancers (Basel)*, 6, 333–365.
- Arrigo, A. P. (2011). Structure-functions of HspB1 (Hsp27). *Methods Mol Biol*, 787, 105–119.
- Ashkenazi, A., & Al., E. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305–08.
- ASHKENAZI, A., & SALVESEN, G. (2014). Regulated cell death: signaling and

- mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 337–356.
- Axe, E., Walker, S., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H., Habermann, A., & Al., E. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 182, 685–701.
- Barker, C. S. et al. (1992). Activation of the prolactin receptor gene by promoter insertion in a Moloney murine leukemia virus-induced rat thymoma. *J. Virol.*, 66, 6763–6768.
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., & LaPensee, E. W. (2008). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr. Rev.*, 29, 1–41.
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L., & Steinmetz, R. W. (1996). Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.*, 17, 639–669.
- Berlanga, J. J. et al. (1997). Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *J. Biol. Chem.*, 272, 2050–2052.
- BERNEY, T., & SECCHI, A. (2009). Rapamycin in islet transplantation: friend or foe? *Transpl Int*, 22, 153–161.
- Bockman, D. (1993). Anatomy of the Pancreas. In V. Go, E. DiMagno, J. Gardner, E. Lebenthal, H. Reber, & G. Scheele (Eds.), *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease* (pp. 1–8). New York.
- Boldin, M., & Al., E. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/ FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 85, 803–15.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.*, 19, 225–268.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Analytical Biochemistry, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brandebourg, T., Hugo, E., & Ben-Jonathan, N. (2007). Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions. *Diabetes Obes. Metab.*, 9, 464–476.

BRATANOVA-TOCHKOVA, T., CHENG, H., DANIEL, S GUNAWARDANA, S., LIU, Y., MULVANEY-MUSMA, J SCHERMERHORN, T STRAUB, S., YAJIMA, H., & SHARP, G. (2002). Triggering and augmentation mechanismus, granule pool, and biphysic insulin secretion. *Diabetes*, 51, S83–S90.

Brelje, T. C., Parsons, J. A., & Sorenson, R. L. (1994). Regulation of islet beta-cell proliferation by prolactin in rat islets. *Diabetes*, 43, 263–273.

Brelje, T. C., & Sorenson, R. L. (1991). Role of prolactin versus growth hormone on islet B-cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. *Endocrinology*, 128, 45–57.

Brooks, C. L. (2012). Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr. Rev.*, 33, 504–525.

Bruey, J., & Ducasse, C. et al. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*, 2, 645–652.

Brumatti, G., & Al., E. (2010). Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. *Cell Mol Life Sci*, 67, 1619–30.

Cardozo, A., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhøffer, M., ... Eizirik, D. (2001). Acomprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor- κ B-dependent genes in primary rat pancreatic β -cells. *J Biol Chem*, 276, 48879–48886.

Carra, S., Brunsting, J., Lambert, H., Landry, J., & Kampinga, H. (2009). HspB8 participates in protein quality control by a non-chaperonelike mechanism that requires eIF2 α phosphorylation. *J Biol Chem*, (284), 5523–5532.

Carra, S., Seguin, S., & Landry, J. (2008). HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy*, 4, 237–239.

- Case, R. (2006). Is the rat pancreas an appropriate model of the human pancreas? *Pancreatology*, 6, 180–190. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1159/0000091849>
- Caspers, G. J., Leunissen, J. A., & de Jong, W. W. (1995). The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved “alpha-crystallin domain.” *J Mol Evol*, 40, 238–248.
- Caspers, G., Leunissen, J., & de Jong, W. (1995). The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved “alpha-crystallin domain.” *J Mol Evol*, 40, 238–248.
- Charette, S., & Landry, J. (2000). The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 926, 126–131.
- Chauhan, D., & Li, G. et al. (2003). Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood*, 102, 3379–3386.
- Chen, R., & Dai, R. Y. (2011). Unfolded protein response suppresses cisplatin-induced apoptosis via autophagy regulation in human hepatocellular carcinoma cells. *Folia Biologica*, 57(1), 87–95.
- Choi, A. M., Ryter, S. W., & Levine, B. (2013). Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.*, 368, 1845–1846.
- Christians, E. S., Ishiwata, T., & Benjamin, I. J. (2012). Small heat shock proteins in redox metabolism: implications for cardiovascular diseases. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1632–1645.
- Ciocca, D., Arrigo, A., & Calderwood, S. (2013). Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol*, 87, 19–48.
- Clark, A., Lubsen, N., & Slingsby, C. (2012). sHSP in the eye lens: crystallin mutations, cataract and proteostasis. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1687–1697.
- Clevenger, C. V., Furth, P. A., Hankinson, S. E., & Schuler, L. A. (2003). The role of

prolactin in mammary carcinoma. *Endocr. Rev.*, 24, 1–27.

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

Cohen, E., & Dillin, A. (2008). The insulin paradox: aging, proteotoxicity and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 9, 759–767.

Cuervo, A. M., & Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.*, 24, 92–104.

Czabotar, P., & Ali, E. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 49–63.

Dai, T., Patel-Chamberlin, M., Natarajan, R., Todorov, I., Ma, J., LaPage, J., ... Adler, S. G. (2009). Heat shock protein 27 overexpression mitigates cytokine-induced islet apoptosis and streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology*, 150(7), 3031–3039. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0732>

De Beeck, A. O., & Eizirik, D. L. (2016). Viral infections in type 1 diabetes mellitus- why the β cells? *Nature Reviews Endocrinology*, 12(5), 263–273. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.30>

Deegan, S., Saveljeva, S., Gorman, A. M., & Samali, A. (2012). Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cell. Mol. Life Sci.*, 70, 2425–2441.

Deosaran, E. et al. (2013). NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J. Cell Sci.*, 126, 939–952.

Diao, J., & Ali, E. (2015). ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature*, 520, 563–566.

Dokladny, K., Myers, O. B., & Moseley, P. L. (2015). Heat shock response and autophagy — cooperation and control, 11(2), 200–213.

Dolen, J., & Rupnik, M. S. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas, (January), 2–9.

Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. Vanden, & Vandenabeele, P. (2009). Major cell

- death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 11(13), 1050–1062.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>
- Eizirik, D. L. Mandrup-Poulsen, T. (2001). A choice of death—the signal-transduction of immunemediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*, 44, 2115–2133.
- Eizirik, D., Cardozo, A., & Cnop, M. (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*, 29, 42–61.
- Eizirik, D. L., Colli, M. L., & Ortis, F. (2009). The role of inflammation in insulinitis and B-cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(4), 219–226.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.21>
- Eknoyan, G., & Nagy, J. (2005). A history of diabetes mellitus or how a disease of the kidneys evolved into a kidney disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 12(2), 223–229. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2005.01.002>
- Fleenor, D., Petryk, A., Driscoll, P., & Freemark, M. (2000). Constitutive expression of placental lactogen in pancreatic beta cells: effects on cell morphology, growth, and gene expression. *Pediatr. Res.*, 47, 136–142.
- Fleten, K., & Al., E. (2016). hvTRA, a novel TRAIL receptor agonist, induces apoptosis and sustained growth retardation in melanoma. *Cell Death Discov*, 2, 16081.
- Flusberg, D., & Al., E. (2015). Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. *Trends Cell Biol*, 25, 446–58.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.*, 80, 1523–1631.
- Freemark, M., Avril, I., Fleenor, D., Driscoll, P., Petro, A., Opara, E., ... Kelly, P. A. (2002). Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology*, 143, 1378–1385.
- Freemark, M., Driscoll, P., Maaskant, R., Petryk, A., & Kelly, P. A. (1997). Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development. *J. Clin. Invest.*, 99, 1107–1117.

- Fu, Z., R. Gilbert, E., & Liu, D. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 9(1), 25–53. <https://doi.org/10.2174/157339913804143225>
- FUENTES-PRIOR, P. SALVESEN, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, 384, 201–232.
- Fujinaka, Y., Takane, K., Yamashita, H., & Vasavada, R. C. (2007). Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 30707–30717.
- Fujitani, Y., Kawamori, R., & Watada, H. (2009). The role of autophagy in pancreatic beta-cell and diabetes. *Autophagy*, 5, 280–282.
- Gadd, S. L., & Clevenger, C. V. (2006). Ligandindependent dimerization of the human prolactin receptor isoforms: functional implications. *Mol. Endocrinol.*, 20, 2734–2746.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., ... P Vandenabeele³⁶, 37, E White³⁸, J Yuan³⁹, B Zhivotovsky⁴⁰, G Melino⁴¹, 42 and G Kroemer. (2012). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Garrido, C., Bruey, J., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A., & Solary, E. (1999). HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J*, 13, 2061–2070.
- Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A. P., ... Solary, E. (1998). Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res*, 58, 5495–5499.
- Geng, Y., Kohli, L., Klocke, B. J., & Roth, K. A. (2010). Chloroquine-induced

- autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. *Neuro-Oncology*, 12, 473–481.
- Gibert, B., & Al., E. (2015). Dependence receptors and cancer: addiction to trophic ligands. *Cancer Res*, 75, 5171–75.
- Gibert, B., & Eckel, B. et al. (2012). Knock down of heat shock protein 27 (HspB1) induces degradation of several putative client proteins. *PLoS One*, 7, e29719.
- Goffin, V., Binart, N., Touraine, P., & Kelly, P. A. (2002). Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu. Rev. Physiol.*, 64, 47–67.
- Goffin, V., Shiverick, K. T., Kelly, P. A., & Martial, J. A. (1996). Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocr. Rev.*, 17, 385–410.
- Gomes, V. de M. (2016). *Estudo da função de HSPB1 na citoproteção induzida pela prolactina em células beta pancreáticas.*
- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2017). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Publishing Group*.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
- Hailey, D. W. A. E. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 141, 656–667.
- Hamasaki, M. et al. (2013). Autophagosomes form at ER– mitochondria contact sites. *Nature*, 495, 389–393.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., ... Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110, 177–189.
- Hara, T., & Al., E. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441, 885–889.
- HEMMINGS, H. C., & EGAN, T. C. (2013). *Pharmacology and physiology for anesthesia foundations and clinical application*. (1st ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.

- Horseman, N. D., & Yu-Lee, L. Y. (1994). Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocr. Rev.*, 15, 627–649.
- Hrynyk, M., & Neufeld, R. J. (2014). Insulin and wound healing. *Burns*, 40(8), 1433–1446. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.03.020>
- Huang, Q., Wu, Y., Tan, H., Ong, C., & Shen, H. (2009). A novel function of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in modulation of autophagy and necrosis under oxidative stress. *Cell Death Differ*, 16, 264–277.
- Huang, R., & Al., E. (2015). Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol. Cell*, 57, 456–466.
- Huang, R. et al. (2015). Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol. Cell*, 57, 456–466.
- Hwang, Y. S., Ko, M. H., Kim, Y. M., Park, Y. H., Ono, T., & Han, J. Y. (2016). The avian-specific small heat shock protein HSP25 is a constitutive protector against environmental stresses during blastoderm dormancy. *Scientific Reports*, 6(July), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep36704>
- International Diabetes Federation. (2017). *IDF Diabetes Atlas Eighth Edition 2017*. International Diabetes Federation (8th ed.). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007>
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., & Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*, 268, 1517–1520.
- Johansson, M., Olerud, J., Jansson, L., & Carlsson, P. O. (2009). Prolactin treatment improves engraftment and function of transplanted pancreatic islets. *Endocrinology*, 150(4), 1646–1653. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1318>
- Jung, H., Chung, K., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., & Tanaka, K. et al. (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab*, 8, 318–324.
- Jung, H., & Lee, M. (2009). Macroautophagy in homeostasis of pancreatic β -cell. *Autophagy*, 5, 241–243.

- Kampinga, H., Brunsting, J., Stege, G., Konings, A., & Landry, J. (1994). Cells overexpressing Hsp27 show accelerated recovery from heat-induced nuclear protein aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*, 204, 1170–1177.
- Kampinga, H., & Garrido, C. (2012). HSPBs: small proteins with big implications in human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1706–1710.
- Kampinga, H. H., de Boer, R., & Beerstra, N. (2015). The Multicolored World of the Human HSPB Family. In L. M. Tanguay & E. Hightower (Eds.), *The Big Book on Small Heat Shock Proteins* (8th ed., pp. 3–27). Switzerland: Springer International Publishing.
- Kaniuk, N., Kiraly, M., Bates, H., Vranic, M., Volchuk, A., & Brumell, J. (2007). Ubiquitinated protein aggregates form in pancreatic β -cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes*, 56, 930–939.
- Kappé, G., Boelens, W., & de Jong, W. (2010). Why proteins without an alpha-crystallin domain should not be included in the human small heat shock protein family HSPB. *Cell Stress Chaperones*, 15, 457–461.
- Kaur, J., & Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(8), 461–472.
<https://doi.org/10.1038/nrm4024>
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110, 163–175.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., ... Sabatini, D. M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell*, 11, 895–904.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.*, 13, 132–141.

- Kim, J. N., Lee, H. S., Ryu, S. H., Kim, Y. S., Moon, J. S., Kim, C. D., ... Yoon, S. P. (2011). Heat shock proteins and autophagy in rats with cerulein-induced acute pancreatitis. *Gut and Liver*, 5(4), 513–520.
<https://doi.org/10.5009/gnl.2011.5.4.513>
- Kim, P. K., Hailey, D. W., Mullen, R. T., & Lippincott-Schwartz, J. (2008). Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 105, 20567–20574.
- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., ... Pinkas-kramarski, R. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 5(2), 151–175.
- Klionsky, D. J., & Al., E. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 8, 445–544.
- Komatsu, M., & Al., E. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441, 880–884.
- Kroemer, G., & Et, A. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, 12, 1463–67.
- Kroemer, G., & Et, A. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16, 3–11.
- Kroemer, G., & Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 1004–1010.
- Kuma, A., & Al., E. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432, 1032–1036.
- Labriola, L., Ferreira, G. B., Montor, W. R., Demasi, M. A. A., Pimenta, D. C., Lojudice, F. H., ... Sogayar, M. C. (2007). Prolactin-induced changes in protein expression in human pancreatic islets. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264(1–2), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.10.004>

- Labriola, L., Montor, W. R., Krogh, K., Lojudice, F. H., Genzini, T., Goldberg, A. C., ... Sogayar, M. C. (2007). Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 263(1–2), 120–133. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.09.011>
- LACASSE, E. C., MAHONEY, D. J., CHEUNG, H. H.; PLENCHETTE, S., BAIRD, S., & KORNELUK, R. G. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27, 6252–6275.
- Lamb, C. A., Yoshimori, T., & Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 14, 759–774.
- Lambelet, M., Terra, L. F., Fukaya, M., Meyerovich, K., Labriola, L., Cardozo, A. K., & Allagnat, F. (2018). Dysfunctional autophagy following exposure to pro-inflammatory cytokines contributes to pancreatic β -cell apoptosis article. *Cell Death and Disease*, 9(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0121-5>
- Landry, J., Chrétien, P., Lambert, H., Hickey, E., & Weber, L. (1989). Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J Cell Biol*, 109, 7–15.
- Langan, E. A., Foitzik-Lau, K., Goffin, V., Ramot, Y., & Paus, R. (2010). Prolactin: an emerging force along the cutaneous-endocrine axis. *Trends Endocrinol. Metab.*, 21, 569–577.
- Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., & Garrido, C. (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med*, 12, 743–761.
- Lavoie, J. N., Gingras-Breton, G., Tanguay, R. M., & Landry, J. (1993). Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J Biol Chem*, 268, 3420–3429.
- Li, W. -W., Li, J., & Bao, J. -K. (2012). Microautophagy: lesserknown self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.*, 69, 1125–1136.
- Liu, L. et al. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates

hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.*, 14, 1–10.

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

Mandrup-Poulsen, T. (1996). The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia*, 39(9), 1005–1029.

Mansano, R. aparecida wailemann. (2013). *Estudo do papel da proteína HSP27/25 na ação da prolactina humana recombinante em células beta pancreáticas*. Universidade de São Paulo.

Marano, R. J., Tickner, J., & Redmond, S. L. (2013). Prolactin expression in the cochlea of aged BALB/c mice is gender biased and correlates to loss of bone mineral density and hearing loss. *PLoS ONE*, 8, e63952.

Mari, M. et al. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *J. Cell Biol.*, 1005–1022.

Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>

Masiero, E. et al. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab.*, 10, 507–515.

Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabatara, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., & Al., E. (2009). Two Beclin1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol*, 11, 385– 396.

Mehlen, P., Prévile, X., Kretz-Remy, C., & Arrigo, A.-P. (1996). Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human α B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these protein against TNF α -induced cell death. *EMBO J*, 15, 2695–2706.

Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K., & Arrigo, A. P. (1996). Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem*, 271, 16510–16514.

- MIKHAILOV, V., MIKHAILOVA, M. PULKRABEK, D. J., DONG, Z., & VENKATACHALAM, M. A. SAIKUMAR, P. (2001). Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, 276, 18361–18374.
- Miller, S. L., DeMaria, J. E., Freier, D. O., Riegel, A. M., & Clevenger, C. V. (2005). Novel association of Vav2 and Nek3 modulates signaling through the human prolactin receptor. *Mol. Endocrinol.*, 19, 939–949.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21, 2861–2873.
- Mizushima, N., & Al., E. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395–398.
- Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147, 728–741.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 452, 1069–1075.
- Moldoveanu, T., & Al., E. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem Sci*, 39, 101–11.
- MOLINA, P. E. (2004). *Endocrine physiology* (4th ed.). New Orleans.
- Moore, F., Colli, M. L., Cnop, M., Esteve, M. I., Cardozo, A. K., Cunha, D. A., ... Eizirik, D. L. (2009). PTPN2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Interferon- γ -Induced Pancreatic β -Cell Apoptosis. *Diabetes*, 58(6), 1283–1291. <https://doi.org/10.2337/db08-1510>.
- Mounier, N., & Arrigo, A. (2002). Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones*, 7, 167–176.
- Muzio, M., & Al., E. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-- inducing signaling complex. *Cell*, 85, 817–27.
- Mymrikov, E., Seit-Nebi, A., & Gusev, N. (2011). Large potentials of small heat shock proteins. *Physiol Rev*, 91, 1123–1159.

- Nagano, M., & Kelly, P. A. (1994). Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.*, 269, 13337–13345.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., ... Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 434, 652–658.
- Nakai, A. et al. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.*, 13, 619–624.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 10, 458–467.
- Nielsen, J. H., Galsgaard, E. D., Moldrup, A., Friedrichsen, B. ., Billestrup, N., Hansen, J. A., ... Carlsson, C. (2001). Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes*, 50, S25–S29.
- Nivon, M., Fort, L., Muller, P., Richet, E., Simon, S., Guey, B., ... Kretz-Remy, C. (2016). NFκB is a central regulator of protein quality control in response to protein aggregation stresses via autophagy modulation. *Molecular Biology of the Cell*, 27(11), 1712–1727. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-12-0835>
- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., ... Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J. Biol. Chem.*, 278, 15461–15464.
- Novak, I. et al. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.*, 11, 45–51.
- Nunez, G., & Al., E. (1990). Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol*, 144, 3602–610.
- Ogilvie, R. (1937). A quantitative estimation of the pancreatic islet tissue. *QJM*, 6,

287–300.

- Okamoto, K. (2014). Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J. Cell Biol.*, 205, 435–445.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., & Ohsumi, Y. (2009). Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev. Cell*, 17, 87–97.
- Parcellier, A., Schmitt, E., Brunet, M., Hammann, A., Solary, E., & Garrido, C. (2005). Small heat shock proteins HSP27 and alphaB-crystallin: cytoprotective and oncogenic functions. *Antioxid Redox Signal*, 7, 404–413.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., ... Schneider, M.D. Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122, 927–939.
- Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viot, S., & Arrigo, A. (2002). Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol*, 22, 816–834.
- Paul, C., Simon, S., Gibert, B., Viot, S., Manero, F., & Arrigo, A. (2010). Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27). *Exp Cell Res*, 316, 1535–1552.
- Pereira, C. A., Pouliquen, Y., Rodas, V., Massotte, D., Mortensen, C., Sogayar, M. C., & Murcia, J. M. (2001). Optimized insect cell culture for the production of recombinant heterologous proteins and baculovirus particles. *BioTechniques*, 31(6), 1262–1268.
- Pihan, P., & Al., E. (2017). BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death Differ*, 24, 1478–87.
- Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R., & Harmon, J. (2006). Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr.*, 136(4), 873–6.
- Poole, B., & Ohkuma, S. (1981). Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *Journal of Cell Biology*, 90, 665–669.
- Qazi, A. M., Tsai-Morris, C. -H., & Dufau, M. L. (2006). Ligand-independent homo-

and heterodimerization of human prolactin receptor variants: inhibitory action of the short forms by heterodimerization. *Mol. Endocrinol.*, 20, 1912–1923.

Qian, J., Ren, X., Wang, X., Zhang, P., Jones, W., Molkentin, J., ... EG, K. (2009). Blockade of Hsp20 phosphorylation exacerbates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressed autophagy and increased cell death. *Circ Res*, 105, 1223–1231.

Rahier, J., Wallon, J., & Henquin, J. (1981). Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia*, 20, 540–546. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/%0ABF00252762>

Rasschaert, J., Ladriere, L., Urbain, M., Dogusan, Z., Katabua, B., Sato, S., ... Eizirik, D. L. (2005). Toll-like Receptor 3 and STAT-1 Contribute to Double-stranded RNA+ Interferon- γ -induced Apoptosis in Primary Pancreatic β -Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33984–33991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502213200>

Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., & Rubinsztein, D. C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.*, 12, 747–757.

Retnakaran, R., Ye, C., Kramer, C. K., Connelly, P. W., Hanley, A. J., Sermer, M., & Zinman, B. (2016). Maternal serum prolactin and prediction of postpartum β -cell function and risk of prediabetes/diabetes. *Diabetes Care*, 39(7), 1250–1258. <https://doi.org/10.2337/dc16-0043>

Riahi, Y., Wikstrom, J. D., Bachar-Wikstrom, E., Polin, N., Zucker, H., Lee, M. S., ... Leibowitz, G. (2016). Autophagy is a major regulator of beta cell insulin homeostasis. *Diabetologia*, 59(7), 1480–1491. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3868-9>

Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010a). The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell*, 40, 253–266.

Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010b). The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell*, 40, 253–266.

- Riedl, S. J., & Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 405–413.
- Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., ... Arrigo AP, Buchner J, G. M. (1999). Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem*, 274, 18947–18956.
- Rogov, V., Dötsch, V., Johansen, T., & Kirkin, V. (2014). Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol. Cell*, 53, 167–178.
- Roos, W., & Al., E. (2016). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer*, 16, 20–33.
- ROSTOVTSEVA, T. K. ANTONSSON, B., SUZUKI, M., YOULE, R. J., COLOMBINI, M., & BEZRUKOV, S. M. (2004). Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J Biol Chem*, 279, 13575–13583.
- SALVESEN, G. S., & RIEDL, S. J. (2008). Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, 615, 13–23.
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Schalm, S. S., Fingar, D. C., Sabatini, D. M., & Blenis, J. (2003). TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr. Biol.*, 13, 797–806.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*, 26, 1749–1760.
- Schuit, F., In't Veld, P., & Pipeleers, D. (1988). Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 3865–3869.
- Sembulingam, K., & Sembulingam, P. (2012). *Medical Physiology*. (J. B. M. P. (P) Ltd, Ed.) (1st ed.). New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.

- Shamas-Din, A., & Al., E. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a008714.
- Shapiro, A. M. (2011). State of the art of clinical islet transplantation and novel protocols of immunosuppression. *Curr. Diab. Rep.*, 11, 345–354.
- Shapiro, A. M. J., Pokrywczynska, M., & Ricordi, C. (2016). Clinical pancreatic islet transplantation. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(5), 268–277.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.178>
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 343(4), 230–238.
- Shen, S., Kepp, O., & Kroemer, G. (2012). The end of autophagic cell death? *Autophagy*, 8, 1–3.
- Stolz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat. Cell Biol.*, 16, 495–501.
- Strasser, A., & Al., E. (2009). The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*, 30, 180–92.
- Suckale, J., & Solimena, M. (2008). Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci.*, 13, 7156–71.
- Swaminathan, G., Varghese, B., & Fuchs, S. Y. (2008). Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 13, 81–91.
- Swenne, I., Hill, D. J., Strain, A. J., & Milner, R. D. (1987). Effects of human placental lactogen and growth hormone on the production of insulin and somatomedin C/insulin-like growth factor I by human fetal pancreas in tissue culture. *J. Endocrinol.*, 113, 297–303.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K. M., Kroemer, G., Billiar, T. R., Van Houten, B., ... Lotze, M. T. (2011). High-mobility group box 1 is essential for mitochondrial quality control. *Cell Metabolism*, 13(6), 701–711.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.008>

- Terra, L. F. (2013). Mecanismos moleculares envolvidos em citoproteção e transformação maligna de células-beta pancreáticas. *Tese*.
- Terra, L. F., Garay-Malpartida, M. H., Wailemann, R. A. M., Sogayar, M. C., & Labriola, L. (2011). Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Diabetologia*, 54(6), 1388–1397. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2102-z>
- Thumm, M., & Al., E. (1994). Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 349, 275–280.
- Tiscornia, G., Singer, O., & Verma, I. M. (2006a). Design and cloning of lentiviral vectors expressing small interfering RNAs. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.36>
- Tiscornia, G., Singer, O., & Verma, I. M. (2006b). Production and purification of lentiviral vectors. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.37>
- Tissières, A., Mitchell, H., & Tracy, U. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, 84, 389–398.
- Truong, A. T. et al. (1984). Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J.*, 3, 429–437.
- van Noort, J., Bsibsi, M., Nacken, P., Gerritsen, W., & Amor, S. (2012). The link between small heat shock proteins and the immune system. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1670–1679.
- VANDER HEIDEN, M. G. CHANDEL, N. S., LI, X. X., SCHUMACKER, P. T., COLOMBINI, M., & THOMPSON, C. B. (2000). Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4666–4671.
- VANDER HEIDEN, M. G., LI, X. X., GOTTLEIB, E., HILL, R. B., THOMPSON, C. B., & COLOMBINI, M. (2001). Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 276, 2001.
- Vitale, I., & Al., E. (2017). DNA damage in stem cells. *Mol Cell*, 66, 306–19.

- von Karstedt, S., & Al., E. (2017). Exploring the TRAILS less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*, 17, 352–66.
- Vos, M. J., Kanon, B., & Kampinga, H. H. (2009). HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 1343–1353.
- Vos, M. J., Zijlstra, M. P., Carra, S., Sibon, O. C. M., & Kampinga, H. H. (2011). Small heat shock proteins, protein degradation and protein aggregation diseases. *Autophagy*, 7(1), 101–103. <https://doi.org/10.4161/auto.7.1.13935>
- Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296, 1635–6.
- Wakayama, T., & Iseki, S. (1998). Expression and cellular localization of the mRNA for the 25-kDa heat-shock protein in the mouse. *Cell Biol Int*, 22, 295–304.
- Welsh, M., Nielsen, D., MacKrell, A., & Steiner, D. (1985). Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. II. Regulation of insulin mRNA stability. *J Biol Chem*, 260(25), 13590–4.
- Welsh, N. (2012). Does the small tyrosine kinase inhibitor Imatinib mesylate counteract diabetes by affecting pancreatic islet amyloidosis and fibrosis? *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21, 1743–1750.
- Yamamoto, H., Kakuta, S., & Watanabe, T. M. (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.*, 198, 219–233.
- Yamamoto, T., Mita, A., Ricordi, C., Messinger, S., Miki, A., Sakuma, Y., ... Ichii, H. (2010). Prolactin supplementation to culture medium improves β -cell survival. *Transplantation*, 89(11), 1328–1335. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181d98af1>
- Yamashima, T., Kohda, Y., Tsuchiya, K., Ueno, T., Yamashita, J., Yoshioka, T., & Kominami, E. (1998). Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis.' *Eur. J. Neurosci.*, 10, 1723–1733.
- Yang, H., Rudge, D. G., Koos, J. D., Vaidialingam, B., Yang, H. J., & Pavletich, N. P.

- (2013). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, 497, 217–223.
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 335, 1–32.
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 22, 124–131.
- Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011). No Title Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 12, 9–14.
- YOULE, R. J., & STRASSER, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 47–59.
- Zoubeidi, A., & Gleave, M. (2012). Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1646–1656.

8.0 SÚMULA CURRICULAR

Fábio Fernando Alves da Silva

Resumo

Graduado em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (Bacharelado) pela Universidade Federal de Goiás. Aluno de pós-graduação em Ciências Biológicas - Modalidade Bioquímica (Mestrado) no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Desenvolve pesquisa na área de mecanismos moleculares de citoproteção, com enfoque no efeito de hormônios que promovem proteção em modelos de células-beta tratadas com indutores de diabetes tipo 1. Estuda os efeitos provocado por prolactina na modulação da autofagia nas células-beta tratadas com citosinas pró-inflamatórias. **(Texto informado pelo autor)**

IDENTIFICAÇÃO

Nome

Fábio Fernando Alves da Silva

Nome em citações bibliográficas

SILVA, F. F. A.

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Instituto de Química. Avenida Professor Lineu Prestes Butantã 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (064) 36681374 URL da Homepage: <http://www3.iq.usp.br/>

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2016

Mestrado em andamento em Ciências Biológicas (Bioquímica) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Avaliação do papel de HSPB1 na modulação da autofagia induzida por PRL em células-beta, Orientador: Letícia Labriola. Grande área: Ciências Biológicas

2012 - 2016

Graduação em CIENCIAS BIOLOGICAS. Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil. Título: Inibição da peçonha de Bothrops moojeni por extratos e princípios ativos

vegetais. Orientador: Mirian Machado Mendes. Bolsista do(a): Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil.

2009 - 2011

Ensino Médio (2º grau). Colégio Estadual Dom Abel, SEDA, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2017 - 2017

PROGRAMA DE APERFEIÇOAMENTO DE ENSINO. (Carga horária: 120h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2015

Extensão universitária em Monitoria de Metabolismo Celular. (Carga horária: 192h). Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil.

2015 - 2016

Extensão universitária em Estágio no Laboratório de Bioquímica (LB-UFG). (Carga horária: 800h). Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil.

2015 - 2015

Extensão universitária em XIV Curso de Inverno em Bioquímica e Biol. Mol.. (Carga horária: 80h). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), FMRP-USP, Brasil.

2015 - 2015

Produção e Manutenção de Zebrafish. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil.

2015 - 2015

Tratamento de diabetes tipo 1. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil.

2014 - 2014

Extensão universitária em Monitoria de Bioquímica. (Carga horária: 384h). Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil.

2013 - 2013

Extensão universitária em Bolsa Permanencia/ Proj. Embriogenesi Somática. (Carga horária: 192h). Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil.

2013 - 2013

Estágio Curricular não Obrigatório. (Carga horária: 400h). Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil.

2010 - 2010

Básico em Espanhol. (Carga horária: 30h). Centro Evangélico Educacional e Assistência Social, CEEASO, Brasil.

2010 - 2010

Montagem e Assistência Técnica em Microcomputadore. (Carga horária: 60h). Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial, SENAC, Brasil.

2010 - 2010

Windows, Word, Excel, Power Point, Access, Corel D. (Carga horária: 84h). Digicom Informatica, DI, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional**2016 - Atual**

Vínculo: Estudante, Enquadramento Funcional: Estudante de pós-graduação, Regime: Dedicação exclusiva.

Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil.

Vínculo institucional**2013 - 2016**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Realização de Projetos de Pesquisas, Carga horária: 20

PROJETOS DE PESQUISA**2016 - Atual**

Avaliação do papel de HSPB1 na modulação da autofagia induzida por PRL em células-beta

Descrição: A autofagia é um mecanismo que recicla componentes citoplasmáticos e é fundamental para a homeostase celular. Em condições de estresse, este mecanismo é ativado acima do seu nível basal, promovendo a degradação de agregados proteicos e organelas defeituosas, evitando assim, danos celulares que comprometam a viabilidade da célula. Trabalhos realizados por nosso grupo, tem mostrado a citoproteção que PRL promove em células-beta, reduzindo a apoptose e autofagia causadas por citocinas pró-inflamatórias. Evidências mostraram o papel de

HSPB1 na resposta a PRL nestas células, e sua importância para a inibição de apoptose induzida por citocinas. Tem sido mostrado também que o tratamento com PRL inibe a autofagia nestas células. Nosso objetivo é estudar se HSPB1 tem papel na regulação desse mecanismo. Os resultados gerados nesse estudo contribuirão para uma melhor compreensão dos eventos moleculares induzidos por PRL em células-beta, e permitirão a inferência de novas abordagens que melhorem a citoproteção, cultura e transplante dessas células em pacientes com diabetes tipo 1. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Integrantes: Fábio Fernando Alves da Silva - Integrante / Dra. Letícia Labriola - Coordenador.

2015 - 2016

Identificação extratos vegetais e princípios ativos purificados que apresente efeito inibitório contra toxinas de peçonha de serpentes.

Descrição: Este trabalho procura identificar espécies vegetais com potencial para o tratamento de acidentes ofídicos e extrair destas princípios ativos capazes de inibir as toxinas enzimáticas encontradas na peçonha de serpentes. Situação: concluído; Natureza: Pesquisa. Integrantes: Fábio Fernando Alves da Silva - Integrante / Dra. Miriam Machado Mendes - Coordenador.

2013 - 2014

Embriogênese somática de guanandi (*Calophyllum brasiliense*)

Descrição: Este trabalho caracteriza-se basicamente em estabelecer calos in vitro a parti de folhas de guanandi (*Calophyllum brasiliense*). Subcutivar esses calos e obter calos pro-embriogênicos in vitro a parti dos subcutivos. Estabelecer um protocolo para obtenção de embriões somáticos. Regenerar plântulas in vitro através da maturação de embriões somáticos e aclimatizar plântulas oriundas da maturação desses embriões somáticos.. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) . Integrantes: Fábio Fernando Alves da Silva - Coordenador / Dra. Vanessa Cristina Stein - Integrante.

PROJETOS DE EXTENSÃO

2015 - 2016

Picado por cobra? e agora?

Descrição: Palestras expositivas que visam informar a população sobre o que fazer, e o que não fazer, quando se deparar com um acidente ofídico.. Situação: Concluído;

Natureza: Extensão. Alunos envolvidos: Graduação: (5) / Mestrado acadêmico: (1) / Doutorado: (1) . Integrantes: Fábio Fernando Alves da Silva - Integrante / Miriam Machado Mendes - Coordenador.

ÁREAS DE ATUAÇÃO

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

IDIOMAS

Espanhol

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Bem, Escreve Pouco.

Inglês

Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

PRÊMIOS E TÍTULOS

2015

Menção Honrosa, 5º lugar na apresentação de trabalhos, "INIBIÇÃO DA AÇÃO DA PEÇONHA DE Bothrops moojeni POR PRINCÍPIOS ATIVOS VEGETAIS", Universidade Federal de Goiás- Regional Jatai.

2015

Menção Honrosa, 2º lugar na apresentação de trabalho, "BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA O TRATAMENTO DE ACIDENTES OFÍDICOS", Universidade Federal de Goiás- Regional Jatai.

Produções

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. **SILVA, F. F. A.**; YAMAMOTO, G. Y. Y ; OLIVEIRA, D. S ; MENDES, M. M . Monitoria de bioquímica e metabolismo: um relato de experiencia. In: Congresso de ensino, pesquisa e extensão (CONPEXX 2014), 2014, Jatai. Anais de congresso, 2014. p. 3897-3901.

Resumos publicados em anais de congressos

1. CARDOSO, J. K. ; **SILVA, F. F. A.** ; STEIN, D. V. C. . EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUANANDI (CALOPHYLLUM BRASILIENSE). In: Congresso de ensino, pesquisa

e extensão (CONPEXX 2014), 2014, Jatai. I mostra de pesquisa de Jatai, 2014. p. 5729-5729.

APRESENTAÇÕES DE TRABALHO

- 1. SILVA, F. F. A.; MENDES, M. M .** Neutralização da Atividade Coagulante e Fosfolipásica de *Bothrops moojeni* por inibidores de extratos vegetais. 2015. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
 - 2. SILVA, F. F. A.; MACHADO, M. R. ; NASCIMENTO, J. C. ; PAULA, V. F. ; MENDES, M. M .** BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA O TRATAMENTO DE ACIDENTES OFÍDICOS. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 - 3. SILVA, F. F. A.; JANUARIO, L. ; NASCIMENTO, J. C. ; PAULA, V. F. ; MENDES, M. M .** CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti* POR *Piper klotzschianum* E *Caryocar brasiliense*. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 - 4. SILVA, F. F. A.; NASCIMENTO, J. C. ; PAULA, V. F. ; MENDES, M. M .** INIBIÇÃO DA AÇÃO DA PEÇONHA DE *Bothrops moojeni* POR PRINCÍPIOS ATIVOS VEGETAIS. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 - 5. SILVA, F. F. A.; MENDES, M. M .** Coagulant activity neutralization of *Bothrops moojeni* snake venom by inhibitors from vegetal extracts. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 - 6. SILVA, F. F. A.; YAMAMOTO, G. Y. Y ; OLIVEIRA, D. S ; MENDES, M. M .** Monitoria de Bioquímica e Metabolismo: Um Relato de Experiencia. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- Eventos

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

- 1. 12º Congresso de Pesquisa e extensão (CONPEEX). AVALIAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS COMO INSETICIDAS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE *Aedes aegypti*. 2015. (Congresso).**
- 2. Conferência em Bioquímica e Biologia Molecular "Prof. Dr. Moura Gonçalves".** Neutralização da Atividade Coagulante e Fosfolipásica da Peçonha de *Bothrops moojeni* por inibidores de extratos vegetais. 2015. (Outra).

3. VII Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia. Coagulant activity neutralization of Bothrops moojeni snake venom by inhibitors from vegetal extracts. 2015. (Encontro).
4. VII Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia (ENAPEBI 2015). Coagulant Activity Neutralization of Bothrops moojeni Snake Venom by Inhibitors from Vegetal Extracts. 2015. (Encontro).
5. XI Semana Acadêmica da Biologia. 2015. (Outra).
6. 11º Congresso de Pesquisa e Extensão (CONPEEX). Monitoria de Bioquímica e Metabolismo: Um relato de Experiência. 2014. (Congresso).
7. Espaço das Profissões 2014. Atividades e áreas de atuação de um Biólogo. 2014. (Exposição).
8. I Ciclo de Palestras sobre Serpentes e Ofidismo. 2014. (Seminário).
9. Projeto Comunidade de pequenos mamíferos em sistemas agrícolas no Cerrado. Assistente de campo. 2014. (Outra).
10. I Encontro de Estudos Biológicos do Sudoeste Goiano. 2013. (Encontro).
11. Palestra: Segurança Reprodutiva em Plantas. 2012. (Seminário).

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRA

1. **SILVA, F. F. A.** X Semana Acadêmica da Biologia. 2014. (Outro).
2. **SILVA, F. F. A.** I Ciclo de Palestras sobre Serpentes e Ofidismo. 2014. (Outro).
3. **SILVA, F. F. A.** I Encontro de Estudos Biológicos do Sudoeste Goiano. 2013. (Outro).