

**ANGELO GUSTAVO DI STEFANO**

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

**ANGELO GUSTAVO DI STEFANO**

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

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

São Paulo  
2019

**ANGELO GUSTAVO DI STEFANO**

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

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ortis

Versão original

São Paulo  
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Di Stefano, Angelo Gustavo

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

69 p.

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

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

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

---

**Candidato(a):** Angelo Gustavo Di Stefano

**Título da Dissertação/Tese:** O papel do HNF4 $\alpha$  na morte das células beta pancreáticas induzida por citocinas pró-inflamatórias

**Orientador:** Profa. Dra. Fernanda Ortis

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, considerou o (a) candidato (a):

(    ) **Aprovado(a)**

(    ) **Reprovado(a)**

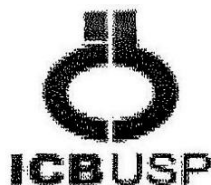
**Examinador(a):** Assinatura: \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_

**Examinador(a):** Assinatura: \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_

**Examinador(a):** Assinatura: \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_

**Presidente:** Assinatura: \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_

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



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

Decl. CEUA.098/2017

## **DECLARAÇÃO**

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

São Paulo, 29 de maio de 2017.

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



## AGRADECIMENTOS

Durante o período do mestrado, os afazeres e as preocupações do dia a dia inerentes a pós-graduação acabam nos afastando das pessoas que gostamos e que são importante para nós, porém temos a oportunidade de conhecer outras pessoas que compartilham da nossa caminhada e a tornam mais leve, seja compartilhando bons momentos, seja cedendo um minuto do seu tempo sempre tão apertado para uma conversa acolhedora. Esses são nossos companheiros das lutas diárias. Sou muito grato a todas essas pessoas que me apoiaram nesse processo tão importante para mim, mesmo aquelas que fizeram parte da construção do caminho que me conduziu à pós-graduação. É impossível, nesse espaço, citar cada lembrança e a importância de cada pessoa, porém, reconheço e guardo no coração todos os momentos vividos e agradeço a todo o apoio e carinho.

Primeiramente, a minha família: meus pais Antonio e Amália e minhas irmãs Roberta e Bianca. Apesar de não poder estar em todos os momentos próximo a vocês, o amor, o apoio incondicional e o encorajamento que me deram, muitas vezes, foram a força que me fez seguir em frente. Não há palavras para descrever o quanto vocês são parte do que eu sou e de todas as conquistas. Nada que eu diga é suficiente para expressar a importância de vocês na minha vida. Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Ortis pela orientação, amizade e, principalmente, por ter me recebido e acolhido no laboratório quando eu, que nem pertencia a comunidade USP, precisava de uma oportunidade para realizar meu sonho de fazer mestrado. Agradeço aos caros colegas e amigos do laboratório de Estudo dos Mecanismos de Morte da Célula Beta (LEMMC $\beta$ ) e do laboratório de Fisiologia da Secreção de Insulina (FSI): Carolina, Catharina, Davidson, Eloísa, Jaqueline e Viviane. Além do essencial apoio nos experimentos e na rotina de laboratório, a paciência, a companhia, as conversas, as risadas, o carinho e as vivências compartilhadas tornaram a rotina mais agradável e foram uma grande força para seguir em frente, guardo no coração vários momentos incríveis e inesquecíveis. Agradeço muito aos professores, colegas e amigos conquistados no ICB, os quais sempre aconselhavam e ofereciam acolhimento através de uma boa conversa, em especial a Patrícia, Andrews e Felipe. Ao meu grande amigo Fernando, pela companhia mesmo antes de eu começar o mestrado, por sempre ter acreditado em minha capacidade e por ter me apoiado em momentos tão difíceis e ao meu grande amigo Phelipe com o qual compartilhei momentos incríveis e inesquecíveis em São

Paulo, ambos me proporcionaram memórias que vou levar para toda a vida. Agradeço também ao apoio dos funcionários e professores do ICB, os quais foram imprescindíveis para a execução desse trabalho, principalmente a técnica do laboratório Adriane por me auxiliar em várias atividades e ao Prof. Dr. Angelo Carpinelli por me acolher em seu laboratório, permitindo que a maior parte dos experimentos fossem realizados. Agradeço também a Dra. Sandra Ferreira e ao Prof. Dr. Gustavo Jorge pela orientação, auxílio em vários experimentos e no desenvolvimento do trabalho. Agradeço aos amigos de república Felipe e Mauro, pois, cada um com seu jeito, tornaram a volta para casa e os finais de semana momentos memoráveis. Apesar dos impasses e dificuldades vividos, vou sempre guardar as muitas boas lembranças que compartilhamos. Agradeço também pelo apoio da CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

Por fim, é importante agradecer aos que não dificultaram ou atrapalharam meu trabalho, pois tornar o ambiente e a vivência menos pesados do que já são por si só é o mais importante para que consigamos seguir em frente.



*“E nenhuma pessoa grande jamais entenderá  
que isso possa ter tanta importância.”*

*Antoine de Saint-Exupéry  
O Pequeno Príncipe*

## RESUMO

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

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Vias da ATF6, PERK e IRE1 ativadas durante a UPR .....	25
<b>Figura 2</b> – Estrutura do HNF4 $\alpha$ e as diferentes isoformas .....	29
<b>Figura 3</b> – Eficiência do silenciamento de HNF4 $\alpha$ em células INS-1E .....	39
<b>Figura 4</b> – Ativação de Caspase-3 em células INS-1E tratadas com citocinas pró-inflamatórias .....	40
<b>Figura 5</b> – Contagem de células INS-1E viáveis, apoptóticas e mortas após exposição a citocinas pró-inflamatórias.....	41
<b>Figura 6</b> – Silenciamento de HNF4 $\alpha$ diminui a ativação de Caspase-3 em células INS-1E tratadas com citocinas pró-inflamatórias.....	42
<b>Figura 7</b> – Silenciamento de HNF4 $\alpha$ diminui a expressão de p-eIF2 $\alpha$ em células INS-1E tratadas com taspigargina .....	43
<b>Figura 8</b> – Silenciamento de HNF4 $\alpha$ diminui a expressão de p-IRE1 em células INS-1E tratadas com taspigargina .....	44
<b>Figura 9</b> – Silenciamento de HNF4 $\alpha$ diminui a expressão de XBP1s em células INS-1E.....	45
<b>Figura 10</b> – Camundongos InsCRE.HNF4 $\alpha^{loxP/loxP}$ apresentam menor tolerância à glicose.....	46
<b>Figura 11</b> – Imunomarcagem nuclear de HNF4 $\alpha$ das ilhotas dos camundongos Controle e camundongos InsCRE.HNF4 $\alpha^{loxP/loxP}$ .....	47
<b>Figura 12</b> – Imunomarcagem de Insulina e Glucagon e Circularidade das ilhotas dos camundongos Controle e camundongos InsCRE.HNF4 $\alpha^{loxP/loxP}$ .....	48

**Figura 13** – Ilhotas de animais HNF4 $\alpha$  *knockout* tratadas com citocinas pró-inflamatórias apresentaram menor ativação de Caspase-3 ..... 49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	–	Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	–	Micrograma por mililitro
$\mu\text{L}$	–	Microlitro
$\mu\text{M}$	–	Micromolar
ATF4	–	<i>Activator transcription factor 4</i>
ATF6	–	<i>Activator transcription factor 6</i>
BiP	–	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
BSA	–	Albumina de soro bovino
CHOP	–	<i>C/EBP-homologous protein</i>
Cito 16	–	Tratamento com citocinas por 16 horas
Cito 24	–	Tratamento com citocinas por 24 horas
Ctrl	–	Controle
DAB	–	<i>3,3-diaminobenzidina</i>
DM	–	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	–	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	–	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DP5	–	<i>Death protein 5</i>
eIF2 $\alpha$	–	<i>Eucariotic initiation factor 2 alpha</i>
FID	–	Federação Internacional de Diabetes
GAPDH	–	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
GTT	–	Teste de tolerância a glicose
HNF4 $\alpha$	–	<i>Hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i>
IgG	–	Imunoglobulina G
IL-1 $\beta$	–	Interleucina 1 beta
INF- $\gamma$	–	Interferon gama
IRE1	–	<i>Inositol requiring ER-to-nucleus signal kinase 1</i>
K <sub>ATP</sub>	–	Canais de potássio sensíveis a ATP
Kir6.2	–	Subunidades Kir6.2 dos canais de potássio sensíveis a ATP
mg/kg	–	Miligrama por quilograma
mM	–	Milimolar
MODY	–	<i>Mature-onset diabetes of the youth</i>
mRNA	–	<i>Messenger RNA</i>



NF-κB	–	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ng/mL	–	Nanograma por mililitro
P1	–	Promotor 1 do HNF4α
P2	–	Promotor 2 do HNF4α
PBS	–	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDX1	–	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PERK	–	<i>Double-stranded RNA-activated kinase-like ER kinase</i>
PP	–	Polipeptídeo pancreático
RE	–	Retículo endoplasmático
RT-qPCR	–	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
SEM	–	Desvio padrão da média
SERCA2b	–	<i>Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump 2</i>
siCTRL	–	siRNA controle
siHNF4α	–	siRNA HNF4α
siRNA	–	<i>Small interference RNA</i>
Taps	–	Tapsigargina
TNF	–	Fator de necrose tumoral
U/mL	–	Unidades por mililitro
UA	–	Unidades arbitrárias
UPR	–	<i>Unfolded protein response</i>
XBP1	–	<i>X-box-binding protein 1</i>
XBP1s	–	<i>X-box-binding protein 1 spliced</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1 <i>O Pâncreas endócrino</i> .....	21
2.2 <i>Diabetes mellitus</i> .....	22
2.3 <i>Estresse de retículo endoplasmático</i> .....	23
2.4 <i>Diabetes do jovem no início da maturidade do tipo 1</i> .....	26
2.5 <i>Hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i> .....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 <i>Objetivos Específicos</i> .....	32
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 <i>Manutenção da cultura celular</i> .....	33
4.2 <i>Transfecção de células INS-1E com siRNA</i> .....	33
4.3 <i>Tratamento de células INS-1E com citocinas pró-inflamatórias</i> .....	33
4.4 <i>Modelos animais</i> .....	34
4.5 <i>Genotipagem</i> .....	34
4.6 <i>Indução do knockout do gene HNF4<math>\alpha</math> em camundongos</i> .....	35

4.7	<i>Teste de tolerância a glicose</i>	35
4.8	<i>Isolamento de ilhotas pancreáticas de camundongos</i>	35
4.9	<i>Imunohistoquímica para Insulina e Glucagon em ilhotas pancreáticas de camundongos</i>	36
4.10	<i>Viabilidade celular por citometria de fluxo</i>	37
4.11	<i>Western blot</i>	37
4.12	<i>RT-qPCR</i>	38
4.13	<i>Análise estatística</i>	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	39
5.1	<i>Tratamento com siRNA para HNF4<math>\alpha</math> reduziu a expressão de mRNA HNF4<math>\alpha</math> em células INS-1E</i>	39
5.2	<i>Padronização das concentrações de citocinas pró-inflamatórias para indução de apoptose em células INS-1E</i>	39
5.3	<i>HNF4<math>\alpha</math> é importante para indução de Caspase-3 por citocinas pró-inflamatórias em células INS-1E</i>	42
5.4	<i>Silenciamento de HNF4<math>\alpha</math> reduz ativação de proteínas do estresse de RE em células INS-1E expostas a citocinas e tapsigarina</i>	43
5.5	<i>Animais HNF4<math>\alpha</math> knockout apresentam menor tolerância à glicose</i>	45
5.6	<i>Ilhotas de animais HNF4<math>\alpha</math> knockout apresentam redução na imunomarcagem para insulina</i>	46

<i>5.7 HNF4<math>\alpha</math> é importante para indução de apoptose por citocinas pró-inflamatórias em ilhotas de animais knockout</i> .....	49
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	59
<b>ANEXOS</b> .....	67

## 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Pâncreas endócrino

O pâncreas é a segunda maior glândula do organismo e se encontra associado ao sistema digestório. Possui cerca de 15-18 cm e é dividido em três partes principais: a cabeça, o corpo e a cauda. No organismo humano, o pâncreas encontra-se na região retroperitoneal, atrás do estômago, entre o duodeno e o baço. É considerado um órgão misto, pois possui a porção exócrina e a porção endócrina. A porção exócrina ocupa cerca de 96-99% do volume total do pâncreas e é responsável por produzir e liberar secreções relacionadas a digestão no duodeno. A porção endócrina é formada principalmente pelas ilhotas de Langerhans, as quais são responsáveis pela produção dos principais hormônios relacionados ao metabolismo da glicose (ORCI et al., 1975; BRAGANZA, 1994).

As ilhotas de Langerhans são grupos redondos ou elipsoides de diferentes tipos de células, altamente vascularizados que se espalham por todo o pâncreas. O número e a distribuição das células que formam as ilhotas diferem de acordo com as espécies. Em humanos, as ilhotas são formadas por cerca de 50-60% de células  $\beta$  secretoras de insulina, 40-50% de células  $\alpha$  secretoras do hormônio glucagon, 10% de células  $\delta$  secretoras de somatostatina e menos que 5% de células PP, secretoras do polipeptídeo pancreático. Essas células não obedecem uma arquitetura específica e se distribuem aleatoriamente por toda a ilhota humana (CABRERA et al., 2006; ABDULREDA et al., 2016). As ilhotas de roedores (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*) apresentam uma arquitetura mais bem definida, na qual se observa cerca de 60-80% de células  $\beta$  que ocupam o centro das ilhotas circundadas por uma camada das outras células endócrinas na periferia como as células  $\alpha$  (cerca de 15-20%), células  $\delta$  (menos de 5%) e células PP (menos de 1%) (KIM et al., 2009; ABDULREDA et al., 2016).

Apesar das diferenças citadas entre as espécies, em ilhotas normais, as células  $\beta$  sempre são predominantes e desempenham função importante secretando a insulina, o hormônio hipoglicemiante do organismo (BRAGANZA, 1994; ABDULREDA et al., 2016). Devido ao importante papel desse hormônio, alterações no funcionamento das células  $\beta$  que prejudiquem a produção da insulina irão causar o desenvolvimento do DM (CNOP et al., 2005).

## 2.2 Diabetes mellitus

O DM é uma doença metabólica crônica que provoca alterações fisiológicas no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (SACKS et al., 2011). É considerada, a níveis mundiais, umas das maiores emergências do século 21. Em 2017, a Federação Internacional de Diabetes (FID) estimou que 1 em cada 11 adultos (425 milhões de indivíduos) tem diabetes, sendo que aproximadamente 50% destes indivíduos não estão diagnosticados. Esses indivíduos correm o risco de desenvolver futuras complicações graves responsáveis pelas altas taxas de morbidade do diabetes como doenças renais, retinopatias e alterações circulatórias em membros inferiores (SEN & CHAKRABORTY, 2015; TAO et al., 2015; FID, 2018). Estima-se que na América do Sul e Central o número de indivíduos com diabetes aumente em 62% passando de 26 milhões em 2017 para 42 milhões em 2045 (FID, 2018). No Brasil, a incidência dessa doença tem aumentado ao longo dos anos. Entre 2006 e 2016, o número de indivíduos com diabetes aumentou 61,8%, acometendo atualmente cerca de 10 milhões de brasileiros (OLIVEIRA et al., 2017; FID, 2018).

Existem diferentes tipos de DM, sendo o DM1 e o diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) as principais formas estudadas da doença. O DM1 ocorre em indivíduos com predisposição genética associada a fatores ambientais ainda pouco conhecidos que induzem um ataque autoimune específico contra as células  $\beta$  pancreáticas, causando sua destruição (EIZIRIK et al., 2009; CHRISTOFFERSSON et al., 2016; ALYAFEI et al., 2018). Durante esse processo inflamatório conhecido como insulite, células do sistema imune (principalmente macrófagos e células T) infiltram as ilhotas pancreáticas e produzem citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina (IL)- $1\beta$ , Interferon (IFN)- $\gamma$  e Fator de necrose tumoral (TNF). Essas citocinas, se ligam a receptores específicos nas células  $\beta$  e induzem vias intracelulares responsáveis pela disfunção e morte dessas células, além de potencializar a resposta autoimune pela secreção de quimiocinas e consequente recrutamento de mais células do sistema imune. Esses efeitos deletérios produzidos nas células  $\beta$  estão ligados principalmente à indução do estresse de RE e oxidativo (EIZIRIK et al., 2009; MEYEROVICH et al., 2016).



### 2.3 Estresse de retículo endoplasmático

O estresse de RE caracteriza-se pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas no interior do RE, fenômeno que perturba a homeostase e, por consequência, a função dessa organela. Durante o estresse de RE, vários mecanismos são ativados visando minimizá-lo como, por exemplo, o estímulo a síntese de *Binding immunoglobulin protein* (BiP), também conhecida como *Glucose-regulated protein 78* (GRP78), uma das principais chaperonas residentes no RE (SHIU et al., 1977; LEE, 1987, 2001). A BiP é responsável por facilitar o dobramento de proteínas, impedir a agregação destas durante o processo de dobramento e mantê-las na conformação correta no interior do RE. Em condições fisiológicas, ocorre a ligação da BiP a porção luminal de três proteínas transmembranas presentes no RE tornando-as inativas: a *Activator transcription factor 6* (ATF6), a *Double-stranded RNA-activated kinase-like ER kinase* (PERK) e/ou a *Inositol requiring ER-to-nucleus signal kinase 1* (IRE1) (BERTOLOTTI et al., 2000; LEE, 2005; OSLOWSKI & URANO, 2011).

Em situações de estresse de RE, o acúmulo de proteínas mal enoveladas no interior do RE causa o recrutamento de BiP visando melhorar o dobramento dessas proteínas. Esse processo faz com que a BiP se desligue dessas proteínas transmembranas, tornando-as ativas (SHIU et al., 1977; LITTLE et al., 1994; LEE, 2005). A ativação dessas três proteínas transmembranas dispara vias da chamada UPR que visam à recuperação da homeostase induzindo uma diminuição da produção de proteínas em geral e um aumento da capacidade do dobramento de proteínas pelo RE (OSLOWSKI & URANO, 2011; WALTER & RON, 2011; CHAN et al., 2015). Caso a homeostase não seja recuperada, tanto por uma falha como pela prolongada ativação de alguma dessas vias, a apoptose será induzida (OSLOWSKI & URANO, 2011).

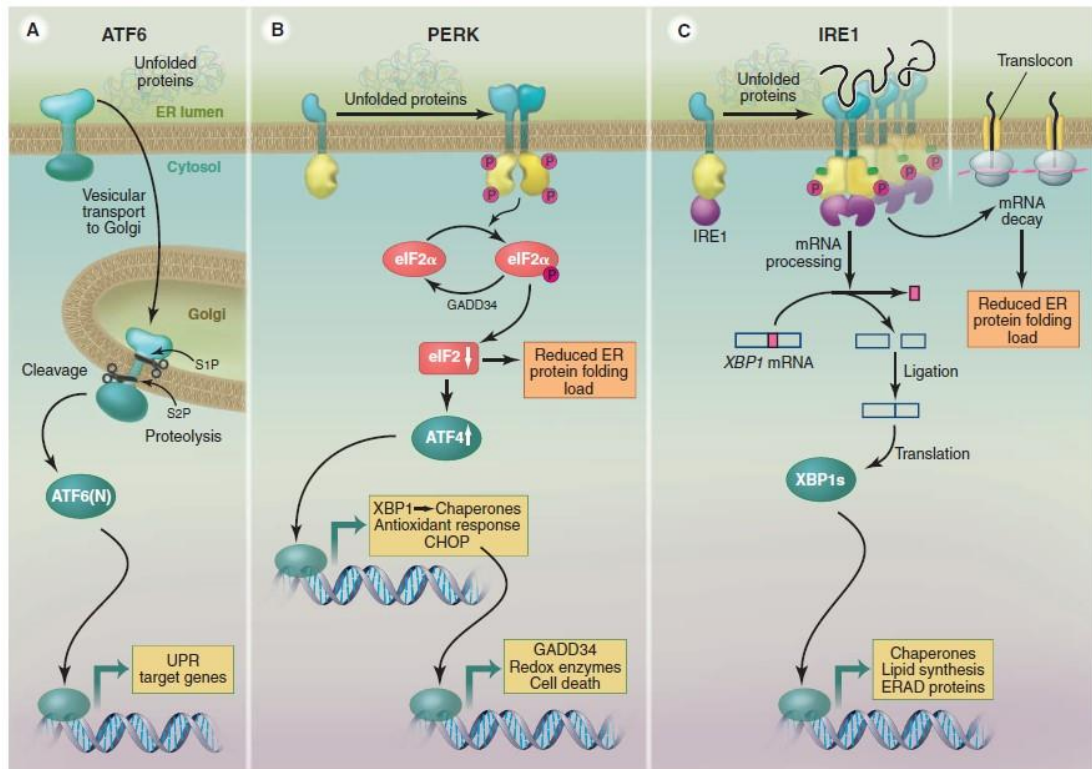
Durante o estresse de RE, a ATF6 migra, através de vesículas de transporte, da membrana do RE para o complexo de Golgi. No complexo de Golgi, ela é clivada próxima a sua porção N-terminal, onde seu principal sítio ativo está, através de proteólise catalisada pelas enzimas *Site 1 protease* (S1P) e pela *Site 2 protease* (S2P). A ATF6 clivada pode agora migrar para o núcleo e induzir transcrição vários genes alvo como da chaperona BiP, que atuarão no RE aumentando a capacidade de dobramento de proteínas (Figura 1-A) (NOZAKI et al., 2004; THUERAUF et al., 2007; WALTER & RON, 2011). Apesar dessa importância, recentemente foi demonstrado que a ativação do ATF6 não é essencial para a indução da maioria dos genes

relacionados a UPR em células  $\beta$ , sendo as vias da PERK e IRE1 as mais efetivas durante a resposta ao estresse de RE nessas células (ODISHO et al., 2015).

A PERK é uma quinase presente na membrana do RE que, durante o estresse de RE, oligomeriza e sofre autofosforilação, tornando-se ativa. Uma vez ativada, a PERK induz a fosforilação e consequente inibição da subunidade  $\alpha$  do fator de iniciação de tradução *Eucariotic initiation factor 2 $\alpha$*  (eIF2 $\alpha$ ) reduzindo assim a tradução de proteínas em geral. Por consequência, haverá uma diminuição da carga de proteínas a serem processadas pelo RE visando amenizar o estresse nessa organela. A fosforilação do eIF2 $\alpha$  também aumenta a expressão do *Activator transcription factor 4* (ATF4) importante para a sobrevivência celular, pois atua na transcrição de genes relacionados a produção de chaperonas do RE pela indução do *X-box-binding protein 1* (XBP1) (WALTER; RON, 2011). Além disso, o ATF4 é responsável por uma resposta antioxidante por fosforilar e, por consequência, ativar o *Nuclear factor erythroid 2 p45 subunit-related factor 2* (NFR2) que atua no DNA induzindo a transcrição de genes relacionados a produção de proteínas antioxidantes que protegem a célula durante o estresse oxidativo (HERBERT, 2007). Na via PERK, caso o estresse de RE seja muito intenso ou a inibição do eIF2 $\alpha$  seja prolongada, haverá a indução de *C/EBP-homologous protein* (CHOP), o qual também pode ser ativado pela via da ATF6 e IRE1 e induz a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas a apoptose como a *Growth arrest and DNA damage-inducible protein* (GADD34), *Death protein 5* (DP5) e a Caspase 12 (Figura 1-B) (CNOP et al., 2007; HERBERT & LAYBUTT, 2016; SONG et al., 2019).

A IRE1 é uma proteína presente na membrana do RE que possui dupla função, de quinase e endoribonuclease. Durante o estresse do RE, a IRE1 oligomeriza e sofre autofosforilação, tornando-se ativa. Quando ativada induz, através de sua função de endoribonuclease, o *splicing* alternativo do RNA mensageiro do XBP1 produzindo o fator de transcrição *X-box-binding protein 1 spliced* (XBP1s). O XBP1s, por sua vez, induz a transcrição de genes envolvidos na biossíntese lipídica da membrana do RE, na produção de chaperonas e na degradação de componentes do RE promovendo a maturação, desenvolvimento e manutenção dessa organela (Figura 1-C) (WALTER & RON, 2011; HERBERT & LAYBUTT, 2016; MEYEROVICH et al., 2016).

**Figura 1** – Vias da ATF6, PERK e IRE1 ativadas durante a UPR.



Durante o estresse de RE, o recrutamento da BiP pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas no interior do RE causa a ativação das três proteínas transmembranas presentes no RE (ATF6, PERK e IRE1) induzindo vias que possuem como alvo transcrição de genes relacionados a UPR. Essa ativação visa a recuperação da homeostase do RE ao reduzir a síntese proteica e aumentar a capacidade dessa organela em dobrar proteínas. Caso uma ou mais vias permaneçam ativadas por muito tempo ou a homeostase não seja recuperada, a apoptose será induzida (WALTER & RON, 2011).

Além da importância do XBP1s durante o estresse de RE, estudos recentes demonstraram que a expressão desse fator de transcrição é importante para a manutenção da função das células  $\beta$ , mesmo na ausência de estresse de RE. Além disso, células  $\beta$  e ilhotas de camundongos com deleção de XBP1s apresentaram aumento da morte celular devido a potencialização do estresse oxidativo, inflamação e apoptose durante condições crônicas de estresse de RE, demonstrando a importância desse fator de transcrição para a viabilidade celular (CHAN et al., 2015).

Apesar dos conhecidos efeitos negativos na viabilidade e função das células  $\beta$  causados pelo estresse de RE, estudos recentes demonstraram um papel importante de um estado “basal de estresse de RE” para a função dessas células. Dessa forma, o estresse de RE basal mantém os mecanismos intracelulares responsáveis pelo controle da produção e secreção de insulina em um “estado de alerta” para uma resposta

rápida às variações da glicemia (OSLOWSKI & URANO, 2011; MEYEROVICH et al., 2016). Apesar disso, no contexto do desenvolvimento do DM1, as citocinas pró-inflamatórias levam a indução do estresse de RE que ativa vias deletérias em células  $\beta$ , levando a sua disfunção e morte (EIZIRIK et al., 2001, 2009, 2013; CNOP et al., 2005; ORTIS et al., 2006, 2008, 2012; BROZZI et al., 2015; MEYEROVICH et al., 2016).

Dada a importância do estresse de RE para o funcionamento e a viabilidade das células  $\beta$ , o melhor entendimento dos mecanismos que regulam a homeostase e a disfunção do RE são importantes para conhecer como a modulação dessas vias poderia auxiliar na sobrevivência das células  $\beta$  frente a um ataque autoimune, como ocorre no DM1, sem que a função dessas células seja prejudicada. Recentemente, diversos estudos têm se aprofundado na função do fator de transcrição HNF4 $\alpha$  na regulação da homeostase do RE e sua importância para a fisiologia das células  $\beta$  (SATO et al., 2012; MOORE et al., 2016b, 2016a), principalmente após se descobrir que uma alteração genética de herança autossômica no gene HNF4 $\alpha$  em humanos é o responsável por prejudicar o funcionamento dessas células e causar o desenvolvimento de um tipo de DM, o MODY 1 (SHIH & STOFFEL, 2002).

#### *2.4 Diabetes do jovem no início da maturidade do tipo 1*

Em 1974, foi descrito pela primeira vez um tipo de DM, causado por uma herança familiar, diagnosticado em indivíduos jovens não-obesos e no início da maturidade. Clinicamente, foi observado que esses indivíduos apresentavam ao nascer peso acima do normal (aproximadamente 800 gramas), associado a um quadro de hipoglicemia e hiperinsulinêmica neonatal. Como passar dos anos esses indivíduos desenvolviam hipertrigliceridemia associada a um estado de tolerância diminuída a glicose, que evoluía lentamente para um estado de hiperglicemia com glicemia de jejum normal (até os 18 anos). Posteriormente, esses indivíduos progrediam muito lentamente para um estado de hiperglicemia de jejum (acima dos 27 anos). O pouco conhecimento na época sobre as causas e características desse tipo de DM fez com que esses casos fossem erroneamente classificados como DM1 ou DM2 (TATTERSALL, 1974; NAYLOR et al., 2018; URAKAMI, 2019).

Como avanço dos estudos, foi demonstrado que esse tipo de DM era causado por uma herança familiar, porém com desenvolvimento diferente do DM1 ou DM2, pois os indivíduos apresentavam ausência de autoimunidade contra células  $\beta$ , ausência de

resistência periférica a insulina, além de uma sustentada produção e secreção de insulina. Sendo assim, foi utilizado o termo *Mature-onset diabetes of the youth* (MODY) para diferenciar esses casos que representavam cerca de 1-2% de todos os casos de DM diagnosticados (TATTERSALL, 1974; FAJANS & BELL, 2011).

O MODY é um grupo monogênico de DM causados por mutações autossômicas dominantes em um dos diversos fatores de transcrição que participam dos processos de desenvolvimento, maturação e função das células  $\beta$  (FAJANS & BELL, 2011; ANIK et al., 2015). Atualmente, já foram identificadas mutações nos genes HNF4 $\alpha$ , *Glucokinase* (GCK), *Hepatocyte nuclear factor 1 alpha* (HNF1 $\alpha$ ), *Pancreatic and duodenal homeobox 1* (PDX1), *Hepatocyte nuclear factor 1 beta* (HNF1 $\beta$ ), *Neurogenic differentiation 1* (NEUROD1), *Kruppel-like factor 11* (KLF11), *Carboxyl ester lipase* (CEL), *Paired box gene 4* (PAX4), *Insulin gene* (INS), *B-lymphocytespecific tyrosine kinase* (BLK), *Sulfonylurea receptor 1* (SUR1), *Potassium channel inwardly rectifying 6.2* (Kir6.2) e *Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interaction, PH domain and leucine zipper containing 1* (APPL1) que causam o desenvolvimento dos subtipos do MODY 1 ao 14, respectivamente (VIONNET et al., 1992; YAMAGATA et al., 1996, 2003; STAFFERS et al., 1997; NEVE et al., 2005; RÆDER et al., 2006; PLENGVIDHYA et al., 2007; EDGHILL et al., 2008; ELLARD et al., 2008; BOROWIEC et al., 2009; BONNEFOND et al., 2012; BOWMAN et al., 2012; PRUDENTE et al., 2015; BISHAY et al., 2016).

Mutações no gene do HNF4 $\alpha$  são relativamente incomuns na população fazendo com que o MODY 1 represente 5 a 10% de todos os casos de MODY diagnosticados que se manifesta através de uma lenta e progressiva deficiência na produção de insulina ao longo dos anos (YAMAGATA, 2014). Esse efeito ocorre devido a importância do HNF4 $\alpha$  para a sobrevivência e função das células  $\beta$ .

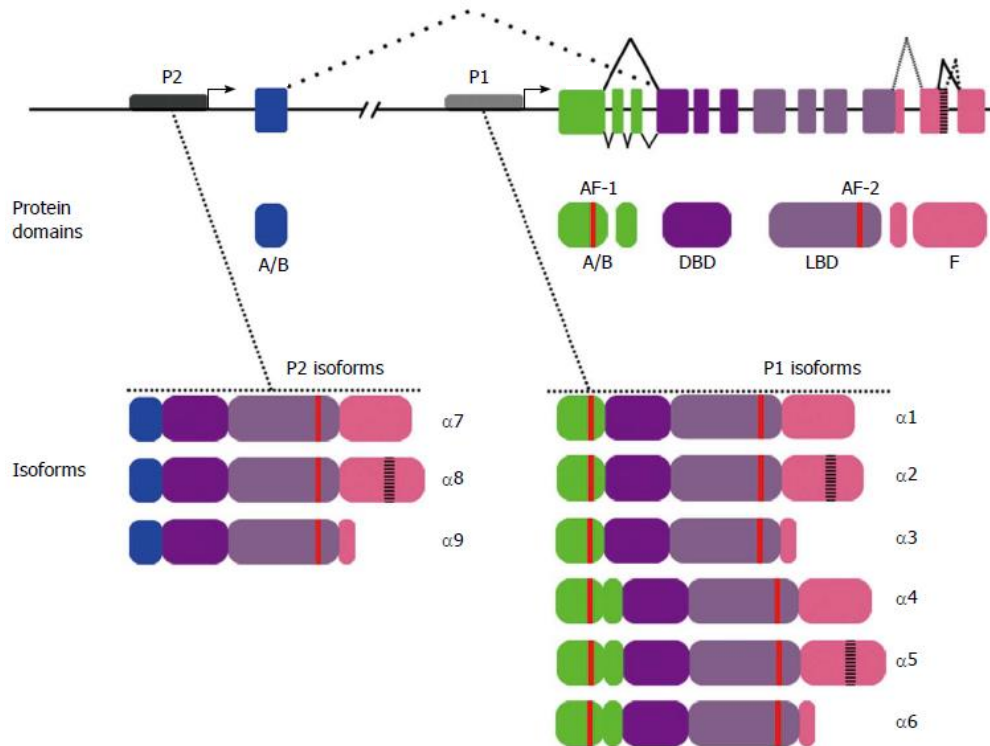
### 2.5 *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha*

O HNF4 $\alpha$  é um receptor da superfamília de receptores hormonais nucleares expressos em vários tecidos como fígado, pâncreas, rins, estômago e intestinos. Esse fator de transcrição está relacionado com a regulação de genes envolvidos na organogênese, no desenvolvimento e na manutenção da função desses órgãos participando do transporte de nutrientes, metabolismo de lipídeos e glicose, proliferação e diferenciação celular e metabolismo de fármacos (HAYHURST et al., 2001; GONZALEZ, 2008; YIN et al., 2011; BABEU & BOUDREAU, 2014; LAU et al., 2018). Mais de

50 genes foram descritos como alvo do HNF4 $\alpha$  em hepatócitos, através da técnica de *Chromatin immunoprecipitation* (ChIP), como genes que codificam as proteínas *Phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PCK1) e a *Glucose-6 phosphatase* (G6PC) importantes enzimas da gluconeogênese, a *Apolipoprotein AII* (ApoA2) e a *Microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP). Essas duas lipoproteínas são as mais abundantes e responsáveis pelo transporte de lipídeos pelo organismo, o que demonstra a importância desse fator de transcrição para a fisiologia do tecido hepático e do organismo (ODOM et al., 2004).

O gene HNF4 $\alpha$  é composto por 12 *exons* e controlado por dois promotores distintos, o *Promoter 1* (P1) e o *Promoter 2* (P2) que produzem nove transcritos ou isoformas diferentes através de *splicing* alternativo: HNF4 $\alpha$ 1-6 e HNF4 $\alpha$ 7-9, respectivamente. A estrutura das isoformas é composta por diversos domínios funcionais: o domínio localizado na porção N-terminal chamado *Activating/binding domain* (A/B) que está associado ao domínio de interação e transativação *Activating function 1* (AF-1); o domínio de ligação ao DNA *DNA binding C domain* (DBD); um complexo funcional de ligação *Ligand binding E domain* (LBD); uma interface de dimerização e transativação *Activating function 2* (AF-2) e um domínio de atividade regulatória negativa *F domain* (F). As nove isoformas diferem entre si por sua estrutura e pela sua capacidade de transativação. Os transcritos do P2 são mais curtos na porção N-terminal, na qual se localiza o domínio de interação AF-1, sendo assim, sua atividade de transativação é mais fraca em relação aos transcritos do P1 (Figura 2) (SATO et al., 2012; BABEU & BOUDREAU, 2014; LU, 2016).

**Figura 2 – Estrutura do HNF4 $\alpha$  e as diferentes isoformas.**



O gene HNF4 $\alpha$  é controlado por dois promotores, o P1 e o P2, os quais produzem nove isoformas (HNF4 $\alpha$ 1-9) através de *splicing* alternativo. As isoformas são compostas por: Domínio A/B - localizado na porção N-terminal e associado ao Domínio AF-1 – função de interação e transativação; Domínio DBD - função de ligação ao DNA; Domínio LBD - complexo funcional de ligação; Domínio AF-2 – interface de dimerização e transativação e Domínio F – possui atividade regulatória negativa. Os transcritos do P2 possuem atividade de transativação mais fraca, pois são mais curtos na porção N-terminal, na qual se localiza o domínio de interação AF-1. (BABEU & BOUDREAU, 2014 – Modificado).

O HNF4 $\alpha$  apresenta um importante papel durante o desenvolvimento, pois animais HNF4 $\alpha$  *knockout* são inviáveis desde a vida embrionária, não se desenvolvendo devido a atrasos e interrupções da gastrulação causando o aumento da morte das células da ectoderme embrionária no momento em que essas células iniciariam a formação da endoderme (CHEN et al., 1994). No organismo, as isoformas do HNF4 $\alpha$  são encontradas distribuídas de forma variada pelos tecidos: os transcritos do P1 são abundantes no fígado do adulto e rins, enquanto os transcritos do P2 são abundantes no fígado fetal e pâncreas, porém a expressão de ambos é intensa no intestino e cólon (TANAKA et al., 2006; GUO & LU, 2019). Estudos demonstraram que mutações nos promotores P1 e P2 são responsáveis pelo desenvolvimento de diversas doenças como disfunções metabólicas, carcinoma hepatocelular, colorretal e gástrico, sendo assim, alterações na expressão das isoformas são consideradas marcadores de

diversas doenças nesses tecidos (OSHIMA et al., 2007; VUONG et al., 2015; CHELLAPPA et al., 2016).

O HNF4 $\alpha$  parece estar relacionado a susceptibilidade a resposta inflamatória e apoptose em diversos tipos celulares. No fígado, o HNF4 $\alpha$  é capaz de inibir a resposta celular induzida por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF, regulando a expressão de genes de resposta a fase aguda da inflamação (genes APR) através de vias similares às ativadas nas células  $\beta$  (BABEU & BOUDREAU, 2014). Em ilhotas pancreáticas humanas, o HNF4 $\alpha$  interage e induz a expressão de diversos genes como o *Liver receptor homologue-1* (LRH-1) que está relacionado a repressão da resposta inflamatória protegendo essas ilhotas contra a apoptose (ODOM et al., 2004; COBO-VUILLEUMIER et al., 2018). Em ilhotas pancreáticas e células  $\beta$  de camundongos da linhagem MIN6, a redução da expressão de HNF4 $\alpha$  causa redução da expressão de proteínas capazes de se complexar a BiP, reduzindo a susceptibilidade dessas células ao estresse de RE e a apoptose (SATO et al., 2012).

Conforme descrito anteriormente, o estado “basal de estresse de RE” é importante para o funcionamento das células  $\beta$ , o qual é mantido pela expressão basal de XBP1s nessas células (OSLOWSKI & URANO, 2011). Estudos recentes demonstraram que a expressão de HNF4 $\alpha$  está relacionada a manutenção da função das células  $\beta$ , pois o *knockdown* do HNF4 $\alpha$  em células  $\beta$  reduziu drasticamente a expressão de XBP1s, bem como a expressão de outros genes relacionados a produção e secreção de insulina o que também reduziu a capacidade da célula  $\beta$  em responder à glicose (MOORE et al., 2016b). Também foi demonstrado que o HNF4 $\alpha$ , no fígado, é responsável por regular a expressão do gene *Receptor for retinoic acid* (RAR $\beta$ ) que, em ilhotas pancreáticas, é responsável pela na manutenção da função e da massa de células  $\beta$  (ODOM et al., 2004; BRUN et al., 2015). Corroborando com esses resultados, animais *knockout* para HNF4 $\alpha$  em células  $\beta$  (InsCre.HNF4 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>) apresentaram intolerância à glicose com hiperinsulinemia tanto no jejum como no estado alimentado. Essa alteração ocorre devido as ilhotas desses animais apresentaram redução da resposta intracelular de cálcio, responsável pela secreção das vesículas contendo insulina. Além disso, houve também a redução da resposta dos canais de potássio dependente de voltagem (K<sub>ATP</sub>) a altas concentrações de glicose, fenômeno importante para a secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) (BYRNE et al., 1995; GUPTA et al., 2005, 2007; MIURA et al., 2006).



A expressão de HNF4 $\alpha$  parece participar de mecanismos relacionados a replicação de células  $\beta$ , pois em camundongos HNF4 $\alpha$  *knockout* específico em células  $\beta$  prenhas não houve a indução da replicação dessas células, fenômeno que deveria ocorrer normalmente durante a gestação (GUPTA et al., 2007). Corroborando com esses resultados, a exposição de ilhotas pancreáticas e de células  $\beta$  isoladas de ratos e camundongos ao BI6015, um potente antagonista de HNF4 $\alpha$ , causou a repressão de diversos genes que bloqueiam a replicação celular, induzindo a replicação das células  $\beta$  isoladas e nas ilhotas, bem como a replicação de células  $\alpha$  e  $\delta$  (LEE et al., 2013). Além disso, a superexpressão de HNF4 $\alpha$ , por adenovírus, em células  $\beta$  de ilhotas humanas, leva a ativação do ciclo celular demonstrando um papel importante do HNF4 $\alpha$  como sinal mitogênico nessas células. Porém, sua expressão, não foi suficiente para ativar os mecanismos de verificação e controle do ciclo celular, induzindo diversos danos ao DNA, fazendo com que o ciclo se tornasse incompleto e incapaz de induzir a total proliferação das células  $\beta$  (RIECK et al., 2012).

Apesar dos diferentes estudos mostrarem a importância do HNF4 $\alpha$  para o desenvolvimento das ilhotas pancreáticas e para a viabilidade e função das células  $\beta$ , pouco ainda se sabe sobre o possível envolvimento deste fator de transcrição em mecanismos relacionados à morte dessas células ou vias pró-apoptóticas reguladas pelo estresse de RE. Além disso, frente ao conhecimento de que citocinas pró-inflamatórias, em células  $\beta$ , levam a ativação do estresse de RE causando sua disfunção e morte, torna-se importante avaliar o possível papel de HNF4 $\alpha$  nesse contexto.

### 3 OBJETIVO

Avaliar o envolvimento de HNF4 $\alpha$  em vias pró-apoptóticas reguladas pelo estresse de RE em células  $\beta$  quando expostas às citocinas pró-inflamatórias e a influência desse fator de transcrição na disfunção e morte dessas células.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular frente a citocinas pró-inflamatórias na ausência ou presença de HNF4 $\alpha$  em linhagem celular de insulinoma de rato INS-1E e em ilhotas de camundongos;
- Avaliar marcadores de estresse de RE frente a citocinas pró-inflamatórias na ausência ou presença de HNF4 $\alpha$  em linhagem celular de insulinoma de rato INS-1E e em ilhotas de camundongos;
- Avaliar a presença e distribuição de células  $\beta$  e  $\alpha$ , pela marcação de insulina e glucagon por imunohistoquímica, em ilhotas de camundongos HNF4 $\alpha$  *knockout*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 *Manutenção da cultura celular*

As células de insulinoma de rato INS-1E foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Claes B. Wollheim e Prof. Dr. Pierre Maechler (Universidade de Genebra, Suíça). Essa linhagem celular apresenta características similares às células  $\beta$  primárias de rato tanto em relação à expressão gênica induzida por citocinas (KUTLU et al., 2003), quanto à secreção de insulina em resposta à glicose (MERGLEN et al., 2004). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (#31800-022, Invitrogen, EUA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (ThermoFisher, EUA), 10 mM de HEPES (Sigma-Aldrich, EUA), 100 U/mL de penicilina (ThermoFisher), 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina (ThermoFisher), 1 mM de piruvato de sódio e 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol e 11,1 mM de glicose em pH 7,4. As células foram mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera de 5% de gás carbônico (CO<sub>2</sub>).

### 4.2 *Transfecção de células INS-1E com siRNA*

Células foram plaqueadas (8x10<sup>4</sup> células/poço) em placas de 24 poços (Corning Inc, EUA). Quarenta e oito horas após o plaqueamento, as células foram transfectadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen) com 1,6 ng/mL de lipofectamina (#11668019, Invitrogen) e 40 ou 80  $\mu$ M de siRNA HNF4 $\alpha$  (#35573, Santa Cruz Biotechnology, EUA) ou siRNA Controle (#03650318, Qiagen, NLD) por 16 horas. Após a padronização, foi utilizada a concentração de 40  $\mu$ M de siRNA HNF4 $\alpha$  por 16 horas para os experimentos seguintes.

### 4.3 *Tratamento de células INS-1E com citocinas pró-inflamatórias*

As células INS-1E foram expostas às seguintes concentrações de citocinas: 10 U/mL, 50 U/mL, 60 U/mL e 100 U/mL de IL-1 $\beta$  (#PRC0815, Invitrogen), 10 U/mL, 14 U/mL e 50 U/mL de IFN- $\gamma$  (#PRC4035, Invitrogen) e 50 U/mL, 100 U/mL e 185 U/mL de TNF (#PRC3014, ThermoFisher) por 24 horas ou deixadas sem tratamento (controle). A eficiência dos tratamentos foi avaliada através da viabilidade celular por citometria de fluxo e expressão de Capase-3 ativada por western blot. Após padronização

foi escolhida a combinação de citocinas 10 U/mL de IL-1 $\beta$ , 14 U/mL de IFN- $\gamma$  e 100 U/mL de TNF. Setenta e duas horas após a transfecção com siRNA, as células foram expostas a combinação de citocinas, ou 1  $\mu$ M de taspargina (#T9033, Sigma-Aldrich) por 16 ou 24 horas ou deixadas sem tratamento (controle). Em seguida, as células foram coletadas para western blot ou RT-qPCR.

#### 4.4 Modelos animais

A obtenção dos camundongos InsCre.HNF4 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup> foi realizada através do cruzamento de matrizes homozigotas para o gene HNF4 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup> e heterozigotas para o gene InsCre provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Estadual de Campinas/SP. Os animais foram pareados de acordo com o sexo e mantidos em gaiolas coletivas em ambiente com temperatura (21  $\pm$  2°C) e umidade (50-60%) controlados, com ciclo claro-escuro de 12 horas e alimentados com ração comercial padrão. A prole foi desmamada com 21 dias de idade, quando se coletou uma amostra da cauda para genotipagem. As metodologias que foram empregadas *in vivo* neste trabalho foram submetidas a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP com protocolo n<sup>o</sup>.: 066/2015.

#### 4.5 Genotipagem

A extração do DNA foi realizada com o kit REDEExtract-N-Amp<sup>TM</sup> (#XNAT-100RXN, Sigma-Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram submetidas à reação de PCR utilizando-se primers *reverse* (R) e *forward* (F) para amplificação dos genes HNF4 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup> (F: AGAATGACCCTGAAGCACCAGG / R: GCCAGAGGTCTGTGAAACAAGG) e InsCre (F: AACCTGGATAGTGAAACAGGGGC / R: TTCCATGGAGCGAACGACGAGACC) e comparadas com o resultado obtido para o controle positivo (animal InsCre.HNF4 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>) e controle negativo (*WildType*) após separação em gel de Agarose 1,5% (Kasvi, BRA).

#### 4.6 Indução do knockout do gene *HNF4α* em camundongos

Ao completarem aproximadamente 40 dias de idade, camundongos machos foram separados em: grupo *InsCre.HNF4α<sup>loxP/loxP</sup>* e grupo Controle (animais *HNF4α<sup>loxP/loxP</sup>* sem a expressão do gene *InsCre*). Para indução do *knockout* do gene *HNF4α* especificamente nas células  $\beta$  pancreáticas, o tamoxifeno (#T5648, Sigma-Aldrich) foi previamente diluído em óleo de gergelim (#3547-250, Sigma-Aldrich) e administrado em ambos os grupos intraperitonealmente na dosagem de 75 mg/kg de peso por 5 dias consecutivos (MOORE et al., 2016a).

#### 4.7 Teste de tolerância a glicose (GTT)

Uma semana após a injeção intraperitoneal de tamoxifeno, foi realizado o teste de tolerância à glicose para avaliação da indução do *knockout* nesses animais. Para tanto, os animais foram deixados em jejum noturno por 10-12 horas e avaliou-se a glicemia de jejum (tempo 0) através de amostra sanguínea obtida pela veia caudal mensurada em glicosímetro *One Touch Ultra* (Johnson & Johnson, EUA). Em seguida, foi administrada uma solução salina de glicose (1,25 g de glicose/kg de peso do animal) intraperitonealmente e avaliada a glicemia nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

#### 4.8 Isolamento de ilhotas pancreáticas de camundongos

Após decapitação e assepsia da região abdominal, o pâncreas dos camundongos foi retirado e mantido em solução *Hanks* suplementada com 0,2% de albumina bovina (ThermoFisher), 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (ThermoFisher), 10mM de glicose e pH 7,4. Em seguida, o pâncreas foi reduzido a fragmentos pequenos com auxílio de tesouras. Esses fragmentos foram lavados, digeridos em solução *Hanks* com 7mg/mL de colagenase (#C9263, Sigma-Aldrich) e as ilhotas foram separadas manualmente. Todo o material utilizado para cultura de ilhotas foi submetido a condições especiais de esterilização. O cultivo dessas ilhotas foi feito em meio RPMI 1640 puro – sem glicose (Invitrogen) suplementado com 5% de soro fetal bovino (ThermoFisher), 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (ThermoFisher), 10mM de glicose e pH 7,4. As ilhotas pancreáticas foram mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera

de 5% de gás carbônico (CO<sub>2</sub>). Após 48 horas em cultura, as ilhotas pancreáticas foram expostas a tratamentos com citocinas pró-inflamatórias e taspigargina ou deixadas sem tratamento (controle) nas mesmas condições e concentrações descritas para as células INS-1E.

#### 4.9 *Imunohistoquímica para Insulina e Glucagon em ilhotas pancreáticas de camundongos*

Após a eutanásia dos animais, o pâncreas foi coletado e imerso em banho de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) 4%, pH 7,4 a 4°C, durante 24 horas. Após esse período o tecido foi desidratado em banhos de etanol, diafanizado em banhos de xilol absoluto e incluso em parafina. Foram feitos cortes seriados no tecido (5,0 µm) com micrótomo rotativo/semiautomático (Leica Biosystems, DE) que foram estendidos em lâminas tratadas com poli-L-lisina *Olen* (Kasvi, BRA). Os tecidos foram desparafinizados em banhos de xilol, hidratados em banhos de álcool e então corados por Hematoxilina-Eosina ou submetidos aos ensaios de imunohistoquímica.

Para a imunohistoquímica, foi realizado o bloqueio de peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio 10% (Labsynth, BRA), seguido de exposição do epítipo antigênico com tampão Citrato de ódio 10 mM pH 6,02 em vaporizador a 90°C. Logo após, foi realizado o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos com solução de bloqueio PBS + BSA 5% + soro normal de cabra (Invitrogen) na proporção de 1:1 e incubação do anticorpo primário diluído em PBS + BSA 5% ou solução de diluição sem anticorpo para o controle negativo. Após incubação com anticorpo primário, foi realizada a incubação com anticorpo secundário *anti-rabbit IgG* (1:200, #1704057, Bio-Rad) conjugado à peroxidase diluído em PBS + BSA 5% seguida de revelação com 3,3-diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (Labsynth). Para melhor visualização das marcações, os tecidos foram contra-corados com hematoxilina. Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo policlonal de coelho anti-insulina (1:500, doado pelo Dr. Leclercq-Meyer, Université Libre de Bruxelles, BE), anticorpo policlonal de coelho anti-glucagon (1:350, #13091, Santa Cruz Biotechnology) e anticorpo monoclonal de coelho anti-HNF4α (1:200, #3113, Cell Signaling) (Anexo 1).

Para avaliação das marcações e análise estatística, os cortes histológicos foram analisados em microscópio *Axioskop 2* (Carl Zeiss, DE) e a quantificação foi realizada utilizando a distribuição *Fiji* (SCHINDELIN et al., 2012) do software *ImageJ* (National

Institutes of Health, EUA). Todas as lâminas foram documentadas através de fotomicrografias com a objetiva no aumento de 40x, sendo utilizados três cortes seriados para a análise. A quantificação foi realizada utilizando a função *colour deconvolution*, a qual permite a separação da marcação de hematoxilina da marcação com DAB. A marcação de DAB dentro da ilhota foi delimitada por contraste (*threshold*) e a ilhota foi circundada, obtendo-se a partir dessas duas áreas, a proporção da área marcada. Foi obtida então a média desse valor por animal.

#### 4.10 Viabilidade celular por citometria de fluxo

Após os tratamentos com citocinas pró-inflamatórias e taspigargina, as células INS-1E foram submetidas a citometria de fluxo para avaliação da viabilidade celular através da contagem do número de células viáveis, mortas ou em apoptose. Para tanto, as células INS-1E foram encubadas com os corantes do kit *Guava ViaCount Reagent* (#4000-0040, Millipore, EUA) e a leitura da fluorescência das células em suspensão foi analisada no aparelho *Guava EasyCyte 8HT Flow Cytometer* (Sigma-Aldrich).

#### 4.11 Western blot

As proteínas totais das células INS-1E ou das ilhotas pancreáticas foram lisadas com tampão de amostra *Laemmli* e separadas em SDS-PAGE com concentração de 12% ou 15% de acordo com o tamanho das proteínas de interesse. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, EUA) e incubadas por 16 horas a 4°C com anticorpo policlonal de coelho anti-Caspase-3 (1:1000, #9662, Cell Signaling, EUA), anticorpo monoclonal de coelho anti-HNF4 $\alpha$  (1:500, #3113, Cell Signaling), anticorpo policlonal de coelho anti-p-eIF2 $\alpha$  (1:1000, #9721, Cell Signaling), anticorpo monoclonal de coelho anti-p-IRE1 (1:1000, #742, Millipore), anticorpo policlonal de coelho anti-XBP1s (1:1000, #83418, Cell Signaling), anticorpo monoclonal de coelho anti-GAPDH (1:1000, #25778, Santa Cruz Biotechnology) e anticorpo monoclonal de camundongo anti- $\alpha$ -tubulina (1:1000, #9026, Sigma-Aldrich). Em seguida, as membranas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo secundário *anti-mouse IgG* (#1704056, Bio-Rad) ou *anti-rabbit IgG* (#1704057, Bio-Rad) associado à peroxidase. Para detectar a intensidade das bandas, foi utilizado o sistema

*Enhanced chemiluminescence* (ECL) no aparelho *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare, UK) e quantificação pelo programa *ImageQuant TL 8.1* (GE Healthcare). A intensidade das bandas foi normalizada pela  $\alpha$ -tubulina ou GAPDH (ORTIS et al., 2012).

#### 4.12 RT-qPCR

O RNA total das células INS-1E foi extraído com TRIzol (ThermoFisher) e foi feita a transcrição reversa utilizando-se 1  $\mu$ g de RNA total. O cDNA produzido foi submetido à reação de qPCR utilizando-se primers específicos e marcação com *Platinum SYBR Green* (Invitrogen). Os produtos do qPCR foram quantificados pelo equipamento *Rotor-Gene 6000* (Qiagen) e analisados pelo *software Rotor-Gene Q Series* (Qiagen). A expressão dos genes de interesse foi corrigida pela expressão do gene constitutivo GAPDH (EIZIRIK et al., 2012). As sequências dos primers utilizados foram: HNF4 $\alpha$  (F: GCAAGTGAGCCTGGAGGATT / R: TGTCCATTGCTGAGGTGAGA) e GAPDH (F: AGTTCAACGGCACAGTCAAG / R: TACTCAGCACCAGCATCACC).

#### 4.13 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente com o uso do programa *GraphPad Prism 7* (GraphPad, EUA), utilizando-se *t-test Student* (pareado ou não-pareado) para comparações entre dois grupos de acordo com o indicado em cada figura. A diferença foi considerada estatisticamente significativa com valor de  $p < 0,05$ .

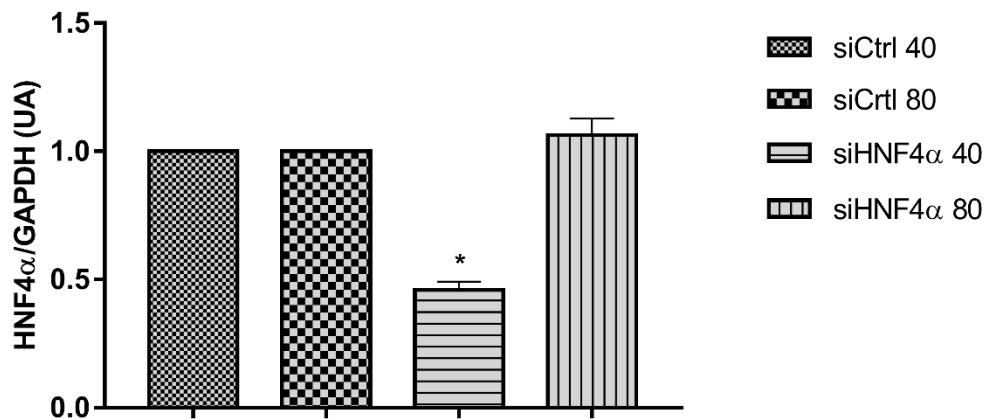


## 5 RESULTADOS

### 5.1 Tratamento com siRNA para HNF4 $\alpha$ reduziu a expressão de mRNA HNF4 $\alpha$ em células INS-1E

Para a padronização da concentração de siRNA HNF4 $\alpha$  (siHNF4 $\alpha$ ) a ser utilizada nos experimentos, foram realizadas transfecções das células INS-1E com 40  $\mu$ M e 80  $\mu$ M de siRNA HNF4 $\alpha$ . Na figura 3, observa-se que a concentração de 40  $\mu$ M diminuiu a expressão do mRNA HNF4 $\alpha$  em aproximadamente 50%.

**Figura 3** – Eficiência do silenciamento de HNF4 $\alpha$  em células INS-1E.



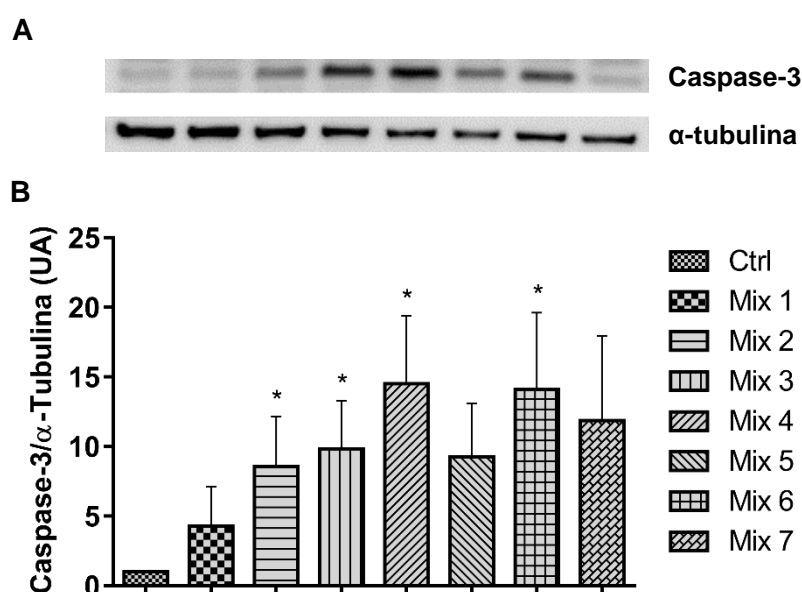
As células INS-1E foram transfectadas por 16h com 40  $\mu$ M ou 80  $\mu$ M de siRNA controle (siCtrl) ou siRNA HNF4 $\alpha$  (siHNF4 $\alpha$ ). Após 72 h, as células foram lisadas, o RNA extraído e utilizado em ensaios de RT-PCR. O gráfico representa a média (SEM) dos valores obtidos em 3 experimentos independentes corrigidos pela expressão de GAPDH e normalizados pelo controle, considerado como 1. \* $p < 0,05$  contra siCtrl 40, *t-test Student* pareado. UA – Unidades Arbitrárias.

### 5.2 Padronização das concentrações de citocinas pró-inflamatórias para indução de apoptose em células INS-1E

Para a padronização das concentrações de citocinas pró-inflamatórias utilizadas para indução de morte celular por apoptose, foram testadas diferentes combinações de concentrações de citocinas que foram selecionadas com base em trabalhos anteriores e padronizações do laboratório visando mimetizar o ambiente da insulite, responsável pelo desenvolvimento do DM1 (ORTIS et al., 2006, 2008, 2012; EIZIRIK et al., 2009). A eficiência dos tratamentos foi avaliada através da indução da expressão

de Caspase-3 ativada por western blot. Na figura 4, observa-se que as combinações das concentrações: 10 U/mL de IL-1 $\beta$ , 14 U/mL de IFN- $\gamma$  e 100 U/mL de TNF; 60 U/mL de IL-1 $\beta$ , 14 U/mL de IFN- $\gamma$  e 185 U/mL; 50 U/mL de IL-1 $\beta$ , 14 U/mL de IFN- $\gamma$  e 50 U/mL de TNF; 100 U/mL de IL-1 $\beta$  e 50 U/mL de IFN- $\gamma$  induziram a expressão de Caspase-3, e portanto, a apoptose de células INS-1E.

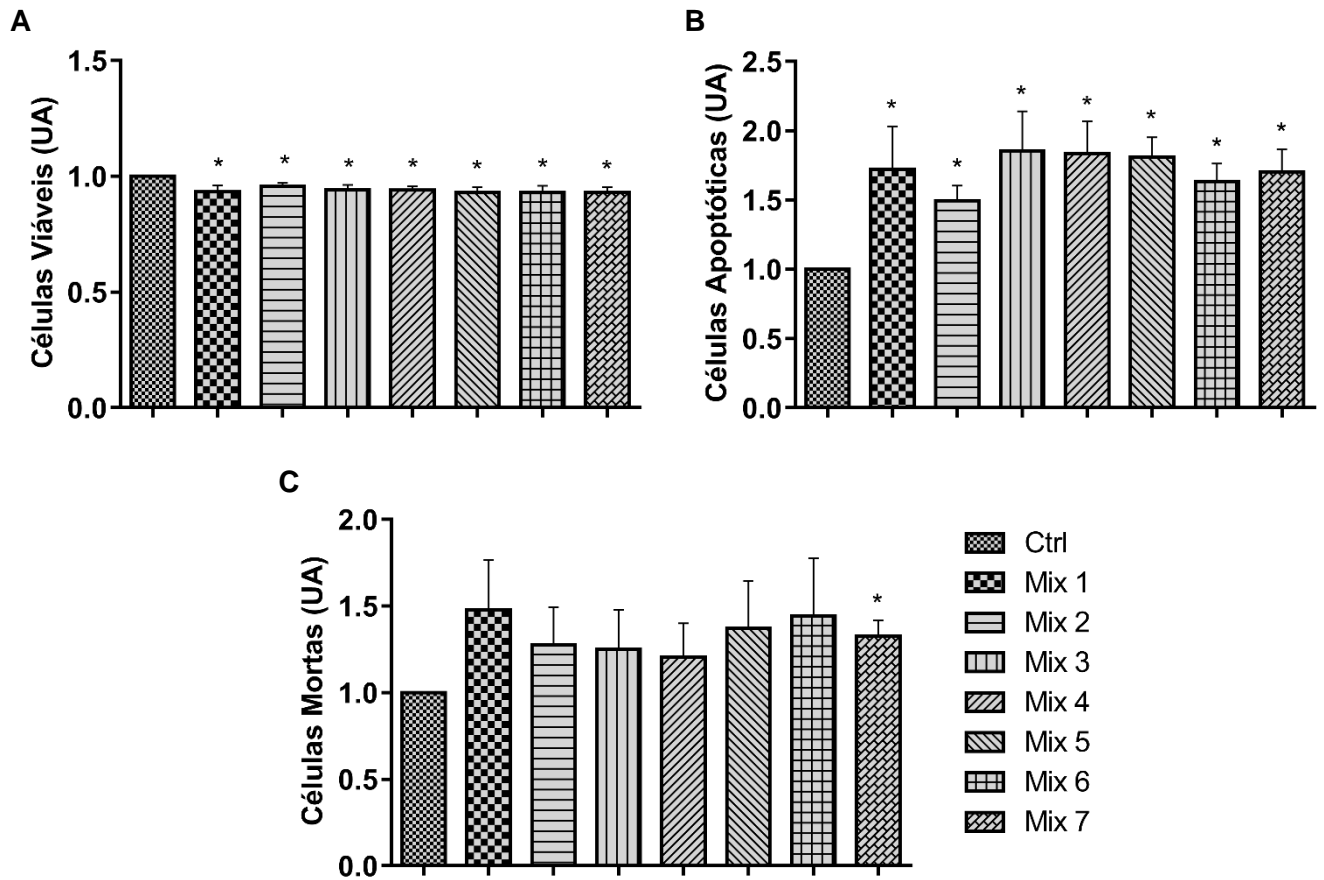
**Figura 4** – Ativação de Caspase-3 em células INS-1E tratadas com citocinas pró-inflamatórias.



Células INS-1E foram expostas por 24 h na ausência ou presença de combinações de citocinas: Mix 1 (50 U/mL de IL-1 $\beta$  + 140 U/mL de IFN- $\gamma$ ), Mix 2 (10 U/mL de IL-1 $\beta$  + 14 U/mL de IFN- $\gamma$  + 100 U/mL de TNF), Mix 3 (60 U/mL de IL-1 $\beta$  + 14 U/mL de IFN- $\gamma$  + 185 U/mL de TNF), Mix 4 (50 U/mL de IL-1 $\beta$  + 14 U/mL de IFN- $\gamma$  + 50 U/mL de TNF), Mix 5 (100 U/mL de IL-1 $\beta$  + 10 U/mL de IFN- $\gamma$ ), Mix 6 (100 U/mL de IL-1 $\beta$  + 50 U/mL de IFN- $\gamma$ ) e Mix 7 (50 U/mL de IL-1 $\beta$  + 10 U/mL de IFN- $\gamma$ ). Em seguida, as células foram lisadas e utilizadas em ensaios de western blot. **A.** Figura representativa de 4 experimentos independentes para as proteínas Caspase-3 e  $\alpha$ -tubulina. **B.** Gráfico da média (SEM) dos valores obtidos em 4 experimentos corrigidos pela proteína constitutiva  $\alpha$ -tubulina e normalizados pelo controle, considerado como 1. \* $p < 0,05$  contra Ctrl, *t-test Student* pareado. UA – Unidades Arbitrárias.

A eficiência dos tratamentos com citocinas pró-inflamatória foi avaliada também através da viabilidade celular por citometria de fluxo. Na figura 5, a contagem do número de células viáveis, mortas ou em apoptose demonstrou que, em relação ao controle, todas as diferentes combinações das concentrações de citocinas foram capazes de reduzir o número de células INS-1E viáveis e induzir a apoptose.

**Figura 5** – Contagem de células INS-1E viáveis, apoptóticas e mortas após exposição a citocinas pró-inflamatórias.



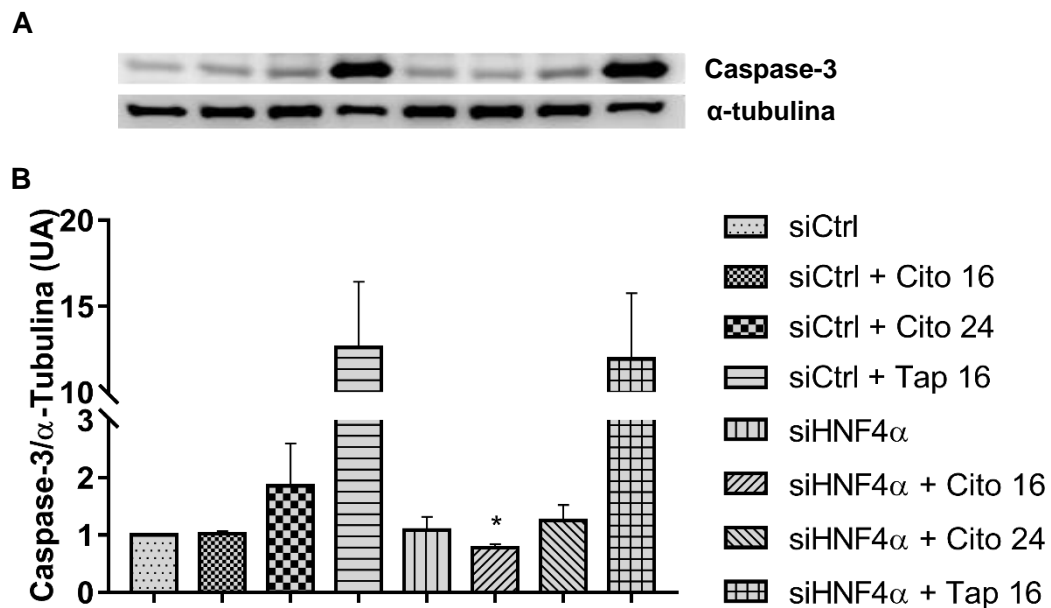
Células INS-1E foram expostas por 24 h na ausência ou presença de combinações de citocinas: Mix 1 (50 U/mL de IL-1 $\beta$  + 140 U/mL de IFN- $\gamma$ ), Mix 2 (10 U/mL de IL-1 $\beta$  + 14 U/mL de IFN- $\gamma$  + 100 U/mL de TNF), Mix 3 (60 U/mL de IL-1 $\beta$  + 14 U/mL de IFN- $\gamma$  + 185 U/mL de TNF), Mix 4 (50 U/mL de IL-1 $\beta$  + 14 U/mL de IFN- $\gamma$  + 50 U/mL de TNF), Mix 5 (100 U/mL de IL-1 $\beta$  + 10 U/mL de IFN- $\gamma$ ), Mix 6 (100 U/mL de IL-1 $\beta$  + 50 U/mL de IFN- $\gamma$ ) e Mix 7 (50 U/mL de IL-1 $\beta$  + 10 U/mL de IFN- $\gamma$ ). Em seguida, as células foram submetidas a avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo. **A.** Contagem de células viáveis. **B.** Contagem de células apoptóticas. **C.** Contagem de células mortas. Gráficos da média (SEM) dos valores obtidos em 5 experimentos independentes normalizados pelo controle. \* $p < 0,05$  contra Ctrl, *t-test Student* pareado. UA – Unidades Arbitrárias.

A padronização da concentração de citocinas suficiente para a indução de morte das células  $\beta$  demonstrou que a maioria das concentrações testadas foram capaz de induzir a expressão de Caspase-3 ativada, bem como a apoptose dessas células por citometria de fluxo. Para os experimentos seguintes, foi escolhida a combinação com a menor concentração das três principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas no desenvolvimento do DM1: 10 U/mL de IL-1 $\beta$ , 14 U/mL de IFN- $\gamma$  e 100 U/mL de TNF.

### 5.3 HNF4 $\alpha$ é importante para indução de Caspase-3 por citocinas pró-inflamatórias em células INS-1E

Como esperado, o tratamento de células INS-1E com citocinas pró-inflamatórias ou taspigargina leva à morte dessas células, o que pode ser observado pela indução da expressão de Caspase-3 ativada (Figura 6). Após o silenciamento do HNF4 $\alpha$ , observou-se a diminuição da expressão de Caspase-3 nas células tratadas com citocinas, o que foi estatisticamente significativo no tratamento de 16 horas em relação ao controle. No caso do tratamento com taspigargina, não observamos esse efeito benéfico com o silenciamento do HNF4 $\alpha$  (Figura 6).

**Figura 6** – Silenciamento de HNF4 $\alpha$  diminui a ativação de Caspase-3 em células INS-1E tratadas com citocinas pró-inflamatórias.

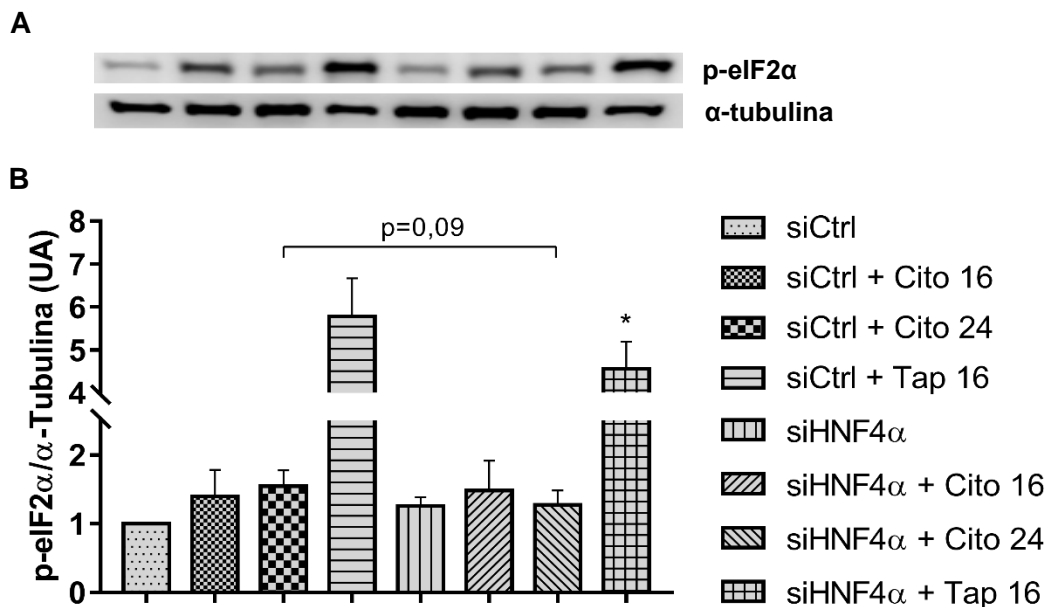


Células INS-1E transfectadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA HNF4 $\alpha$  (siHNF4 $\alpha$ ) foram expostas por 16 ou 24 h na ausência ou presença de uma combinação de citocinas: 10 U/mL de IL-1 $\beta$ , 14 U/mL de IFN- $\gamma$  e 100 U/mL de TNF (Cito 16 ou Cito 24) ou 16 h a 1  $\mu$ M de taspigargina (Tap 16) e utilizadas em ensaios de western blot. **A.** Figura representativa de 4 experimentos independentes para as proteínas Caspase-3 e  $\alpha$ -tubulina. **B.** Gráfico da média (SEM) dos valores obtidos em 4 experimentos corrigidos pela proteína constitutiva  $\alpha$ -tubulina e normalizados pelo controle, considerado como 1. \* $p < 0,05$  contra siCtrl + Cito 16, *t-test Student* pareado.

#### 5.4 Silenciamento de HNF4 $\alpha$ reduz ativação de proteínas do estresse de RE em células INS-1E expostas a citocinas e tapsigargina

O tratamento com citocinas pró-inflamatórias induziu o aumento da expressão de p-eIF2 $\alpha$ , o que foi parcialmente prevenido pelo silenciamento de HNF4 $\alpha$  no tratamento de 24 h, ainda que não estatisticamente significativo (Figura 7). O tratamento com tapsigargina, como esperado, leva a um aumento na expressão de p-eIF2 $\alpha$ , o que também é parcialmente prevenido pelo silenciamento de HNF4 $\alpha$  (Figura 7).

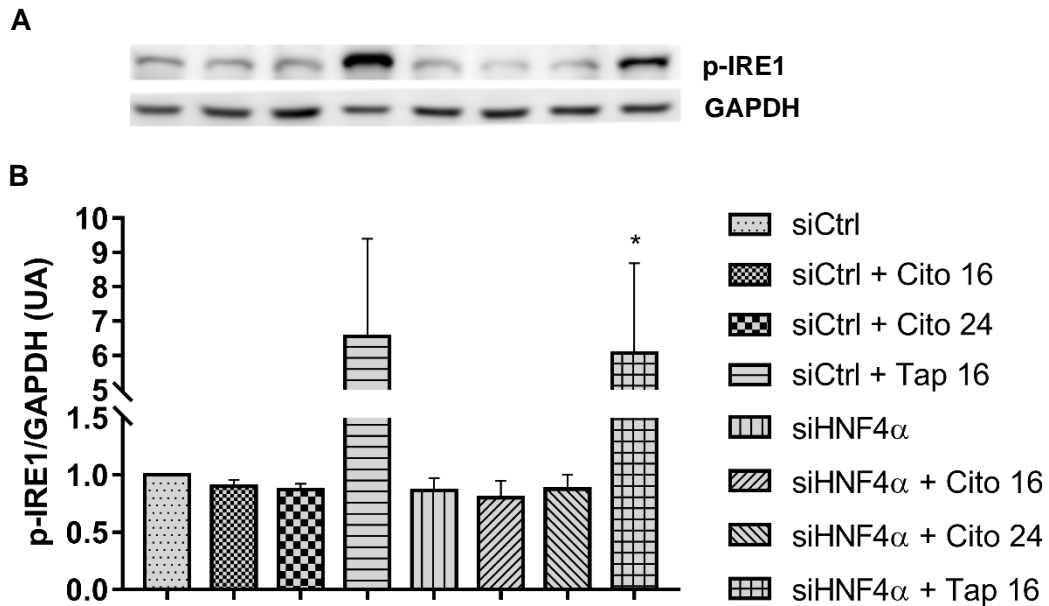
**Figura 7** – Silenciamento de HNF4 $\alpha$  diminui a expressão de p-eIF2 $\alpha$  em células INS-1E tratadas com tapsigargina.



Células INS-1E transfectadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA HNF4 $\alpha$  (siHNF4 $\alpha$ ) foram expostas por 16 ou 24 h na ausência ou presença de uma combinação de citocinas: 10 U/mL de IL-1 $\beta$ , 14 U/mL de IFN- $\gamma$  e 100 U/mL de TNF (Cito 16 ou Cito 24) ou 16 h a 1  $\mu$ M de tapsigargina (Tap 16) e utilizadas em ensaios de western blot. **A.** Figura representativa de 4 experimentos independentes para as proteínas p-eIF2 $\alpha$  e  $\alpha$ -tubulina. **B.** Gráfico da média (SEM) dos valores obtidos em 4 experimentos corrigidos pela proteína constitutiva  $\alpha$ -tubulina e normalizados pelo controle, considerado como 1. \*p < 0,05 contra siCtrl + Tap 16, *t-test Student* pareado.

O tratamento com tapsigargina aumenta a expressão de p-IRE1 em células INS-1E, como esperado, porém, o silenciamento de HNF4 $\alpha$  previne parcialmente essa indução (Figura 8). Estranhamente, o tratamento dessas células com citocinas pró-inflamatórias não induziu um aumento da fosforilação dessa proteína (Figura 8).

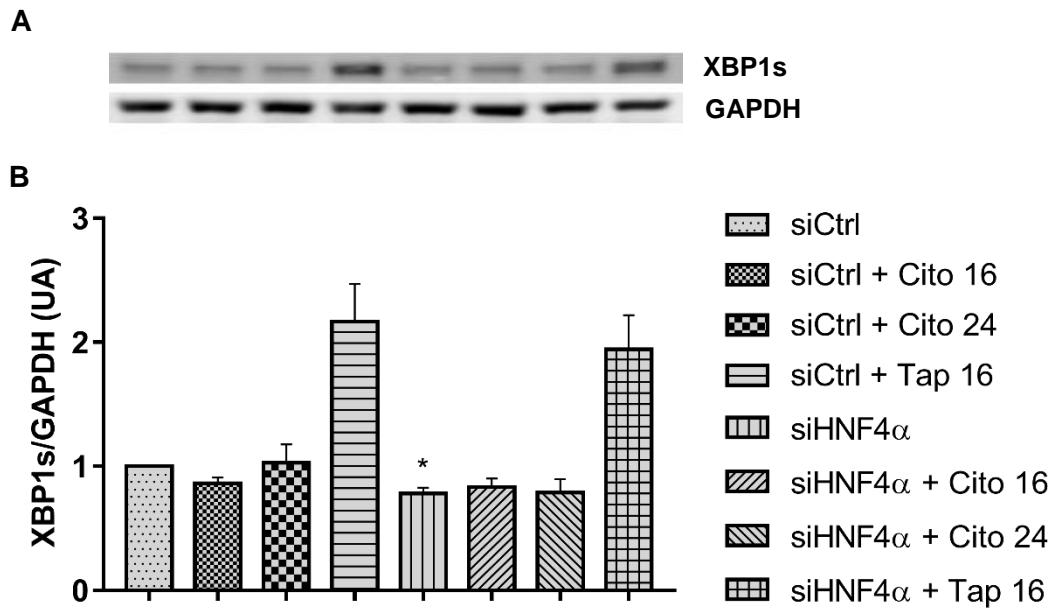
**Figura 8** – Silenciamento de HNF4 $\alpha$  diminui a expressão de p-IRE1 em células INS-1E tratadas com tapsigargina.



Células INS-1E transfectadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA HNF4 $\alpha$  (siHNF4 $\alpha$ ) foram expostas por 16 ou 24 h na ausência ou presença de uma combinação de citocinas: 10 U/mL de IL-1 $\beta$ , 14 U/mL de IFN- $\gamma$  e 100 U/mL de TNF (Cito 16 ou Cito 24) ou 16 h a 1  $\mu$ M de tapsigargina (Tap 16) e utilizadas em ensaios de western blot. **A.** Figura representativa de 4 experimentos independentes para as proteínas p-IRE1 e GAPDH. **B.** Gráfico da média (SEM) dos valores obtidos em 4 experimentos corrigidos pela proteína constitutiva GAPDH e normalizados pelo controle, considerado como 1. \* $p < 0,05$  contra siCtrl + Tap 16, *t-test Student* pareado.

O tratamento de células INS-1E com tapsigargina aumentou, conforme esperado, a expressão de XBP1s (Figura 9). O tratamento com citocinas pró-inflamatórias apresenta uma tendência ao aumento da expressão de XBP1s. O silenciamento de HNF4 $\alpha$  reduziu em condições basais a expressão de XBP1s (Figura 9). Uma tendência para essa redução também pode ser observada nas células com HNF4 $\alpha$  silenciado nos tratamentos com citocinas e tapsigargina quando comparadas ao controle, porém essa diminuição não é apresentada diferença estatística (Figura 9).

**Figura 9** – Silenciamento de HNF4 $\alpha$  diminui a expressão de XBP1s em células INS-1E.

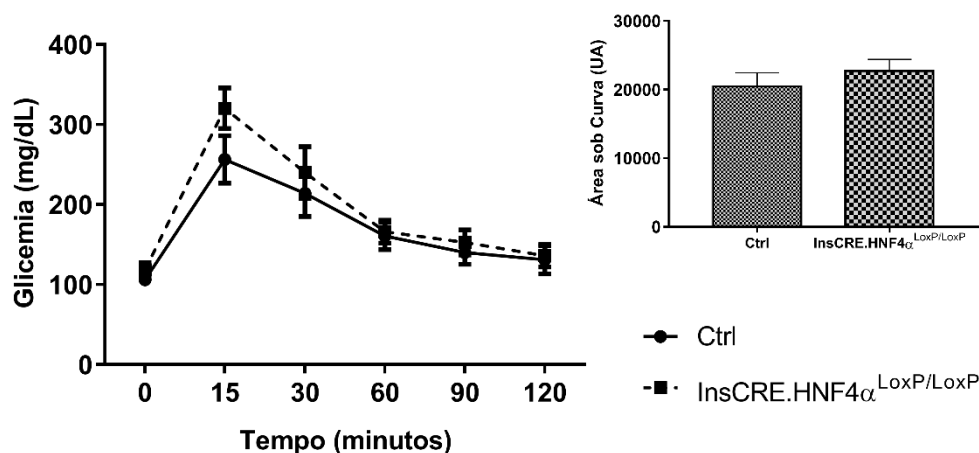


Células INS-1E transfetadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA HNF4 $\alpha$  (siHNF4 $\alpha$ ) foram expostas por 16 ou 24 h na ausência ou presença de uma combinação de citocinas: 10 U/mL de IL-1 $\beta$ , 14 U/mL de IFN- $\gamma$  e 100 U/mL de TNF (Cito 16 ou Cito 24) ou 16 h a 1  $\mu$ M de taspigargina (Tap 16) e utilizadas em ensaios de western blot. **A.** Figura representativa de 4 experimentos independentes para as proteínas XBP1s e GAPDH. **B.** Gráfico da média (SEM) dos valores obtidos em 4 experimentos corrigidos pela proteína constitutiva GAPDH e normalizados pelo controle, considerado como 1. \* $p < 0,05$  contra siCtrl, *t-test Student* pareado.

### 5.5 Animais HNF4 $\alpha$ knockout apresentam menor tolerância à glicose

Os camundongos *knockout* (InsCRE.HNF4 $\alpha^{loxP/loxP}$ ) apresentaram menor tolerância à glicose nos tempos iniciais do GTT, pois os níveis glicêmicos foram superiores em relação aos camundongos Controle. Nos tempos seguintes, o controle glicêmico dos camundongos *knockout* foi recuperado, assemelhando-se aos animais Controle (Figura 10).

**Figura 10** – Camundongos  $\text{InsCRE.HNF4}\alpha^{\text{loxP/loxP}}$  apresentam menor tolerância à glicose.



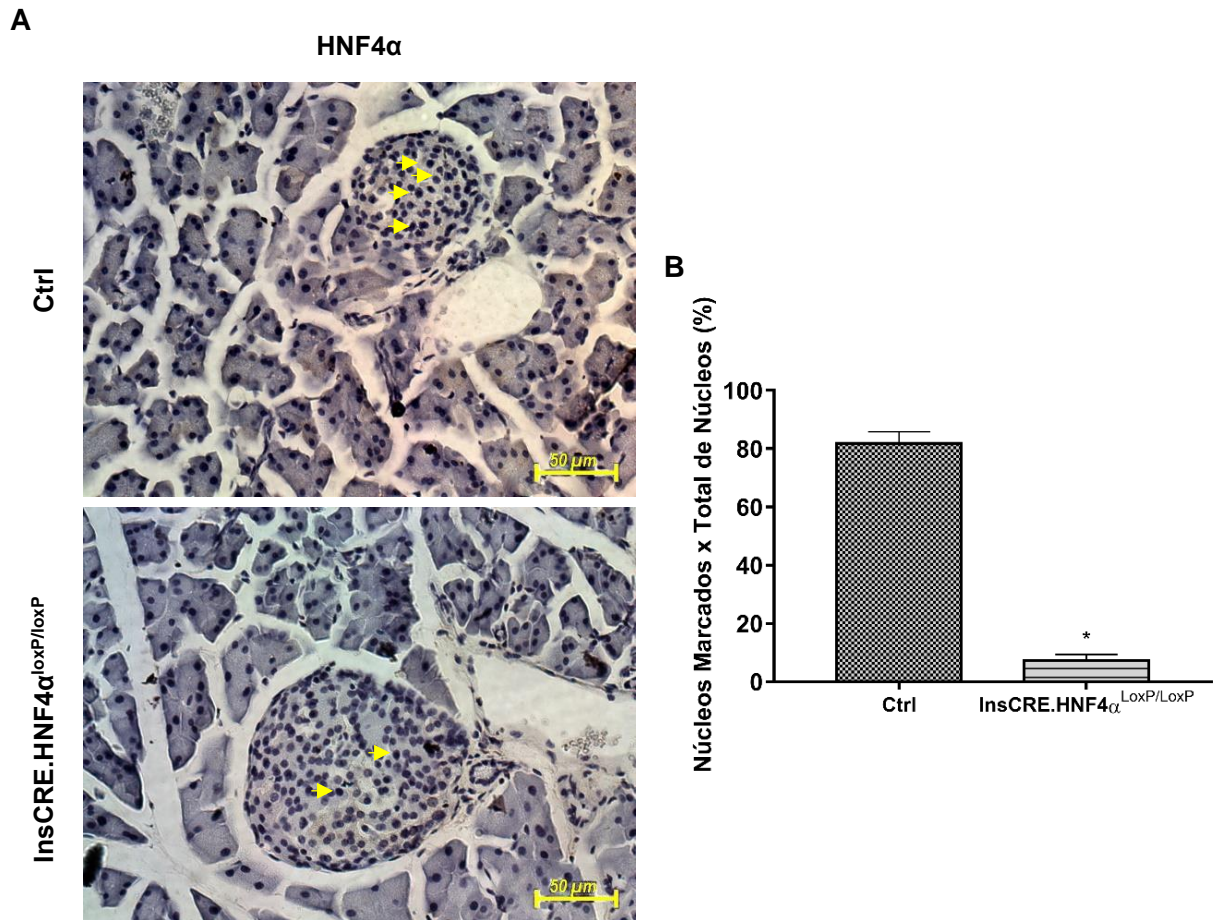
Níveis de glicose sanguínea avaliados antes (tempo 0) e após a administração intraperitoneal de 1,25 g/kg de solução de glicose (tempos 15, 30, 60 e 120 minutos) em camundongos em jejum por 10 a 12 h. O gráfico à esquerda representa a média (SEM) dos valores de glicose sanguínea obtida em 4 camundongos Controle (linha contínua) e 6 camundongos  $\text{InsCRE.HNF4}\alpha^{\text{loxP/loxP}}$  (linha tracejada). O gráfico no canto superior direito mostra a área sob a curva (AUC) das curvas obtidas. *t*-test *Student* não-pareado. UA – Unidades Arbitrárias.

### 5.6 Ilhotas de animais $\text{HNF4}\alpha$ knockout apresentam redução na imunomarcagem para insulina

A indução do *knockout* nas ilhotas dos camundongos  $\text{InsCRE.HNF4}\alpha^{\text{loxP/loxP}}$  foi eficiente para uma importante redução da expressão proteica nuclear (setas amarelas) do  $\text{HNF4}\alpha$  comparado com os animais Controle (Figura 11). As ilhotas dos animais  $\text{HNF4}\alpha$  *knockout* apresentaram significativa redução da imunomarcagem para Insulina (Figura 12A e 12B), porém não foi observado alterações na imunomarcagem para Glucagon nessas ilhotas quando comparados aos animais Controle (Figura 12A e 12C). A circularidade é um parâmetro que avalia o formato e, por consequência, a maturidade das ilhotas pancreáticas (HARA et al., 2006; MILLER et al., 2009). Valores próximos a 1,0 indicam o formato de um círculo perfeito, em contrapartida, valores próximos a 0,0 indicam aumento de formato alongado (FERREIRA et al., 2012). Em relação a circularidade, não houveram diferenças estatísticas na avaliação das ilhotas pancreáticas dos animais  $\text{HNF4}\alpha$  *knockout* em relação aos animais Controle (Figura 12D).

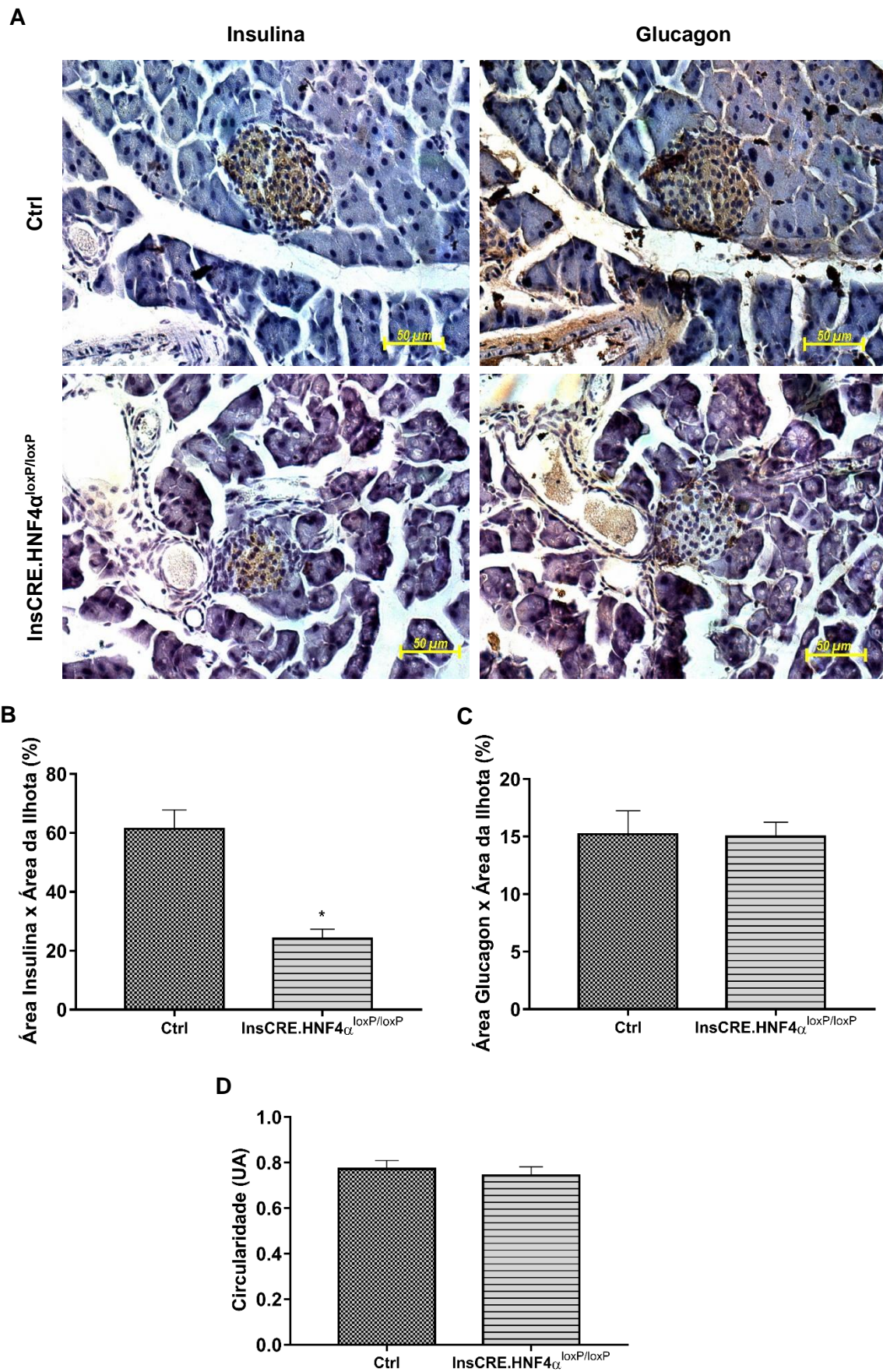


**Figura 11** – Imunomarcção nuclear de HNF4 $\alpha$  das ilhotas dos camundongos Controle e camundongos InsCRE.HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$ .



Após fixação e inclusão em parafina, o tecido foi cortado (5,0  $\mu\text{m}$ ) e os cortes foram imunomarcados para HNF4 $\alpha$ . A imunomarcção foi revelada por DAB e peróxido de hidrogênio. **A.** Figuras representativas das marcações nucleares nos diferentes grupos. Setas amarelas indicam alguns núcleos marcados. **B.** O gráfico representa a média (SEM) da quantificação das marcações nucleares positivas para HNF4 $\alpha$  em relação ao total de núcleos da ilhota (% da núcleos marcados) obtidas de 5 camundongos Controle (Ctrl) e 5 camundongos InsCRE.HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$ . \* $p < 0,05$  contra Ctrl, *t-test Student* não-pareado.

**Figura 12** – Imunomarcação de Insulina e Glucagon e Circularidade das ilhotas dos camundongos Controle e camundongos *InsCRE.HNF4 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>*.

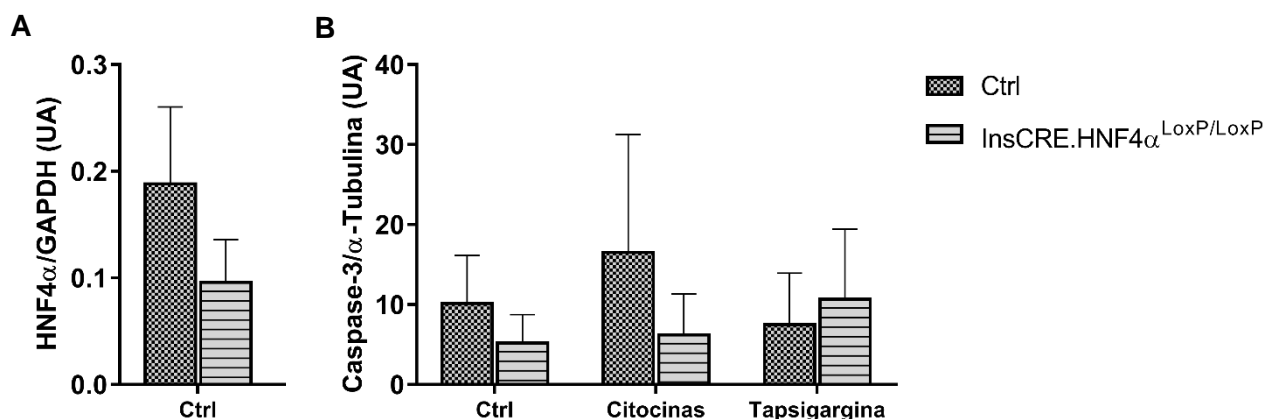


Após fixação e inclusão em parafina, o tecido foi cortado (5,0  $\mu\text{m}$ ) e os cortes foram imunomarcados para Insulina e Glucagon. A imunomarcação foi revelada por DAB e peróxido de hidrogênio. **A.** Figuras representativas das marcações nos diferentes grupos. Os gráficos representam a média (SEM) das quantificações das marcações para Insulina (**B**) ou Glucagon (**C**) em relação à área da ilhota (% da área da ilhota marcada), além da Circularidade (**D**) das ilhotas pancreáticas obtidas de 5 camundongos Controle (Ctrl) e 5 camundongos InsCRE.HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$ . \* $p < 0,05$  contra Ctrl, *t-test Student* não-pareado. UA – Unidades Arbitrárias.

### 5.7 HNF4 $\alpha$ é importante para indução de apoptose por citocinas pró-inflamatórias em ilhotas de animais knockout

A indução do *knockout* do HNF4 $\alpha$  nos animais InsCRE.HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$  reduziu a expressão proteica do HNF4 $\alpha$  nas ilhotas pancreáticas desses animais (Figura 13A). Porém, como o *knockout* induzido pelo tamoxifeno ocorre especificamente em células  $\beta$ , a expressão de HNF4 $\alpha$  observada mesmo após a indução pode ser proveniente dos outros tipos celulares que compõe a ilhota pancreática. O tratamento das ilhotas pancreáticas com citocinas pró-inflamatórias induziu a morte celular pelo aumento da ativação da Caspase-3 (Figura 13B). Esse efeito parece ter sido reduzido nos animais *knockout* para HNF4 $\alpha$ . Em relação ao tratamento com tapsigargina, não foi possível avaliar efeito benéfico contra a morte celular pelo *knockout* do HNF4 $\alpha$  (Figura 13B).

**Figura 13** – Ilhotas de animais HNF4 $\alpha$  *knockout* tratadas com citocinas pró-inflamatórias apresentaram menor ativação de Caspase-3.



Ilhotas de camundongos Controle (Ctrl) e camundongos *knockout* (InsCRE.HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$ ) foram cultivadas por 24 h na ausência (Ctrl) ou presença de uma combinação de citocinas: 10 U/mL de IL-1 $\beta$ , 14 U/mL de IFN- $\gamma$  e 100 U/mL de TNF (Cito) e utilizadas em ensaios de western blot. Os gráficos representam a média (SEM) dos valores obtidos para HNF4 $\alpha$  (**A**) e Caspase-3 (**B**) nas ilhotas de 6 camundongos Controle e 6 camundongos InsCRE.HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$ .

corrigidos pela proteína constitutiva GAPDH ou  $\alpha$ -tubulina e normalizados pelo controle considerado como 1. *t-test Student* não-pareado. UA – Unidades Arbitrárias.

## 6 DISCUSSÃO

O tratamento com siRNA HNF4 $\alpha$  reduziu em aproximadamente 50% a expressão do mRNA HNF4 $\alpha$  nas células INS-1E, o que diminuiu a expressão de Caspase-3 ativada frente a exposição a citocinas pró-inflamatórias. Efeito semelhante pode também ser observado nas ilhotas pancreáticas dos animais *knockout* para HNF4 $\alpha$ , as quais demonstram uma tendência a proteção contra morte por apoptose após exposição a citocinas pró-inflamatórias. A expressão de p-eIF2 $\alpha$  e XBP1s foi parcialmente prevenida pela redução da expressão do mRNA HNF4 $\alpha$  nas células INS-1E expostas às citocinas pró-inflamatórias em relação ao controle, ainda que não estatisticamente significativa. O silenciamento de HNF4 $\alpha$  também preveniu parcialmente a indução de p-eIF2 $\alpha$  e p-IRE1 nas células INS-1E expostas à taspigargina, um potente indutor do estresse de RE. Esses resultados mostram que a presença de HNF4 $\alpha$  parece ser importante para indução da morte das células  $\beta$  frente a citocinas pró-inflamatórias e ao estresse de RE.

As citocinas pró-inflamatórias induzem a morte das células  $\beta$  através da ativação de genes e vias pró-apoptóticas dentre as quais estão a via do *Nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) em rato (EIZIRIK et al., 2001, 2009; ORTIS et al., 2006, 2008, 2012) e do *c-JUN N-terminal kinase* (JNK) em camundongos e humanos (BROZZI et al., 2015). Em ratos, a ativação do NF- $\kappa$ B induzem a expressão da enzima *Inducible nitric oxide synthase* (iNOS) que produz Óxido nítrico (NO), o qual reduz a expressão do mRNA e o funcionamento das *Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump 2* (SERCA2b) uma ATPase presente na membrana do RE responsável pelo transporte do cálcio (CARDOZO et al., 2005; TONG et al, 2015). A depleção do cálcio no interior do RE irá induzir o estresse de RE pela importante função desse íon no dobramento e secreção das vesículas de transporte contendo proteínas (EIZIRIK et al., 2013; MEYEROVICH et al., 2016).

Em camundongos e humanos, a ativação da JNK induz a expressão da proteína DP5 que bloqueia genes pró-sobrevivência como o *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) e o *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein* (MCL1) e ativam genes pró-apoptóticos como o *Bcl-2-associated X protein* (BAX). Esse processo culmina na formação de poros na membrana mitocondrial causando a liberação de Citocromo C para o citoplasma, ativando a via mitocondrial ou intrínseca da apoptose. Além disso, a indução do estresse de RE ocorre por vias parcialmente dependentes e independentes da

produção de NO e do bloqueio da bomba SERCA2b em camundongos e humanos, respectivamente. Dessa forma, a redução do cálcio no interior do RE em humanos ocorre através de mecanismos ainda não conhecidos (BROZZI et al., 2015).

Durante o estresse de RE, o eIF2 $\alpha$  é fosforilado e conseqüentemente inativado visando à recuperação da homeostase do RE, porém a inibição prolongada de eIF2 $\alpha$  induz a expressão de CHOP, um fator de transcrição que ativa genes relacionados à apoptose (WALTER & RON, 2011). Observamos aqui que o silenciamento do HNF4 $\alpha$  diminui a expressão de p-eIF2 $\alpha$  em células INS-1E, o que pode estar relacionado com a diminuição da apoptose (redução da expressão de Caspase-3 ativada) dessas células expostas às citocinas pró-inflamatórias. Boyce e colaboradores demonstraram que o salubrinal, um seletivo e potente bloqueador da desfosforilação de eIF2 $\alpha$  é capaz de proteger células de tumor de medula adrenal de rato contra a morte celular (BOYCE et al., 2005). Cnop e colaboradores avaliaram se esse efeito protetor produzido pelo salubrinal poderia também ocorrer em células  $\beta$  tratadas com palmitato, um potente indutor de estresse de RE nessas células. Foi observado que, as células tratadas com palmitato e salubrinal apresentaram uma maior ativação de CHOP e, por consequência, maior indução de morte celular. Dessa forma, a inibição específica prolongada da desfosforilação de p-eIF2 $\alpha$  também induz a ativação de CHOP e a transcrição de NF- $\kappa$ B, potencializando a disfunção e morte das células  $\beta$  (CNOP et al., 2007). Esse resultado vai de encontro aos resultados observados aqui, pois a redução da expressão de p-eIF2 $\alpha$  produzido pelo silenciamento do HNF4 $\alpha$ , melhorou a viabilidade das células INS-1E.

Observamos um efeito protetor do silenciamento de HNF4 $\alpha$  nas células INS-1E contra o estresse de RE nos tratamentos com taspigargina, assim como uma tendência de prevenção para o tratamento com citocinas pró-inflamatórias, observado pela redução da expressão de p-eIF2 $\alpha$ , IRE1 e XBP1s. Porém, em relação a redução da ativação da Caspase-3, observamos que o silenciamento do HNF4 $\alpha$  protegeu as células INS-1E expostas a citocinas pró-inflamatórias, mas não células tratadas com taspigargina. O mesmo resultados foi observado nas ilhotas dos animais *knockout*, nas quais observou-se uma tendência a redução da ativação da Caspase-3 nessas ilhotas quando expostas a citocinas pró-inflamatórias, porém não nos tratamentos com taspigargina. Sato e colaboradores demonstraram que em células  $\beta$ , o HNF4 $\alpha$  influencia na susceptibilidade dessas células ao estresse de RE, pois atua no promotor do gene da *Ankyrin repeat and sterile  $\alpha$  motif domain containing 4b* (Anks4b). A Anks4b é uma



proteína que se localiza no RE e se liga à chaperona BiP, inativando-a. Além disso, foi demonstrado que o *knockdown* da expressão de Anks4b melhora a viabilidade das células  $\beta$  durante o estresse de RE, induzido por tansigargina, reduzindo drasticamente a expressão de CHOP, um dos principais indutores da apoptose (SATO et al., 2012). Vale lembrar que a tansigargina é um potente e irreversível indutor do estresse de RE por inibir a bomba SERCA2b (TREIMAN et al., 1998). Deste modo, essa falha em proteger as células  $\beta$  observada nos nossos resultados poderia ser devido ao estresse de RE provocado pelo tratamento com tansigargina ser tão intenso que exige um silenciamento mais expressivo de HNF4 $\alpha$ , o qual aqui foi de apenas 50%, enquanto Sato e colaboradores, utilizando-se de siRNA obtiveram silenciamento da expressão de HNF4 $\alpha$  em cerca de 80% (SATO et al., 2012).

A diminuição da expressão de HNF4 $\alpha$  nas células INS-1E causou a diminuição da expressão de XBP1s em condições basais quando comparadas ao controle. A expressão desse fator de transcrição é induzida por p-IRE1 e constitui uma das vias ativadas durante a UPR, importante na regulação da transcrição de genes envolvidos no dobramento e maturação de proteínas e de chaperonas (WALTER & RON, 2011). Em vários tecidos secretores, como estômago e intestino, o HNF4 $\alpha$  atua como indutor da transcrição de XBP1s (BOYD et al., 2009). Em células  $\beta$ , Moore e colaboradores demonstraram que, a redução da expressão de HNF4 $\alpha$  por siRNA em células INS-1E, a mesma linhagem utilizada no nosso trabalho, causou a redução de XBP1s quando comparadas às células controle (MOORE et al., 2016b). Isso é condizente com a tendência que observamos aqui, porém o silenciamento de HNF4 $\alpha$  não foi capaz de prevenir totalmente a indução de XBP1s em células INS-1E tratadas com citocinas pró-inflamatórias ou tansigargina, provavelmente devido ao silenciamento obtido ter sido de aproximadamente 50%, o que pode ser suficiente para a expressão parcial de XBP1s.

A intolerância à glicose observada nos camundongos HNF4 $\alpha$  *knockout*, associada a redução da presença de células positivas para insulina, em suas ilhotas, reforça a importância da presença do HNF4 $\alpha$  para a manutenção da função da célula  $\beta$  em condições fisiológicas, conforme descrito na literatura (GUPTA et al., 2005, 2007). Sabe-se que para o funcionamento adequado das células  $\beta$  é necessária uma expressão basal de XBP1s mais alta do que em outros tipos celulares. Alguns autores descrevem essa expressão basal de XBP1s como uma manutenção de um “estresse de RE basal” para que essas células estejam prontas a responder eficientemente às

variações de glicose sanguínea (OSLOWSKI & URANO, 2011; MEYEROVICH et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que a redução da expressão do HNF4 $\alpha$  causa a diminuição da expressão de genes relacionados a secreção da insulina na célula  $\beta$ , como os genes das subunidades Kir6.2 dos canais K<sub>ATP</sub> e pela redução da expressão das bombas SERCA2b importantes para o metabolismo de cálcio conforme descrito anteriormente (MOORE et al., 2016b). Nesse processo, a glicose é captada pelas células  $\beta$  e sua metabolização aumenta a concentração intracelular de ATP. Isso faz com que os canais de potássio sejam fechados estimulando a despolarização da membrana plasmática que abre os canais de cálcio dependentes de voltagem permitindo a entrada do cálcio, importante para a secreção das vesículas contendo a insulina. Uma alteração nas subunidades do canal de potássio impede essa despolarização alterando a secreção de insulina (RÖDER et al., 2016).

Miura e colaboradores, avaliaram os efeitos do *knockout* de HNF4 $\alpha$  em ilhotas de camundongos InsCre.HNF4 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>, mesma linhagem utilizada nesse trabalho. Foi observado que a ausência do HNF4 $\alpha$  causou a redução da secreção de insulina estimulada pela glicose e da resposta intracelular de cálcio devido a alterações no funcionamento dos K<sub>ATP</sub>. Porém, comparando a glicemia dos animais *knockout* em relação aos animais controle não houve diferença estatística entre os grupos, semelhante ao observado nos nossos resultados. Nesse contexto, os autores propuseram um possível mecanismo de compensação na secreção de insulina, o qual permanece desconhecido (MIURA et al., 2006). Vethe e colaboradores avaliaram os efeitos de mutações do gene HNF4 $\alpha$  no desenvolvimento de uma linhagem de células produtoras de insulina derivadas de células tronco pluripotentes humanas. Foi observado que a mutação não preveniu o desenvolvimento dessas células produtoras de insulina *in vitro*, bem como, essas células expressaram normalmente genes relacionados a produção de insulina como os genes INS, o *NK homeobox 6.1* (NKX6.1) e o *Glucose transporter 2* (GLUT2) e o *Urocortin-3* (UCN3). Porém ao serem comparadas com células  $\beta$  humanas, em relação ao processamento e secreção da insulina, essas células apresentavam padrão imaturo devido à baixa expressão de genes como o *Proprotein convertase 1* (PCSK1), importante durante a biossíntese da insulina (STIJNEN et al., 2016). Além disso, a ausência de HNF4 $\alpha$  nessas células fez com que a secreção de insulina, se tornasse não controlada, não respondendo de forma correta às concentrações de glicose (VETHE et al., 2017).



A redução da marcação de insulina nas ilhotas dos animais *knockout* além de demonstrar a importância da expressão do HNF4 $\alpha$  para a função das células  $\beta$  pode sugerir uma redução da população dessas células ou uma perda do seu estado diferenciado. A presença do HNF4 $\alpha$  está relacionada com a manutenção do estado diferenciado de células e da arquitetura de diversos tecidos secretores pela interação com junções intracelulares e com mecanismos de proliferação (BABEU & BOUDREAU, 2014). Estudos demonstraram que a deficiência na secreção de insulina ou danos as células  $\beta$  faz com que as células  $\alpha$ , produtoras de glucagon, passem a sinalizar estímulos de regeneração para as células  $\beta$ . Além disso, de acordo com a extensão do dano à população de células  $\beta$ , essas células  $\alpha$  podem sofrer processo de dediferenciação (RUSS et al., 2008, 2009, 2011; HABENER & STANOJEVIC, 2012). Devido a maior predominância de células  $\beta$ , bem como sua importância para a fisiologia da ilhota pancreática, a população e o estado de maturação das células  $\beta$  são responsáveis pela manutenção da arquitetura das ilhotas (BADER et al., 2016; ROSCIONI et al., 2016). A circularidade é um parâmetro morfológico que permite avaliar uma possível desorganização estrutural das ilhotas, bem como o estado de maturação das mesmas, pois ilhotas recém-formadas tendem a se apresentar com a morfologia variada enquanto ilhotas maduras possuem formato circular (HARA et al., 2006; MILLER et al., 2009). Nossos resultados não mostraram alterações na circularidade das ilhotas *knockout* em relação às ilhotas controles, demonstrando que, no período entre a indução do *knockout* até a execução dos experimentos (14 dias) não foi observado a destruição nem a formação de novas ilhotas.

É interessante notar que, apesar de seu papel importante na função e manutenção da homeostase do RE em condições fisiológicas, nossos resultados mostram que a ausência de HNF4 $\alpha$  parece proteger as células  $\beta$  e as ilhotas pancreáticas contra a ação de citocinas pró-inflamatórias, indicando um possível papel deletério dessa proteína em situação pró-inflamatória. Recentemente, a importância da expressão do HNF4 $\alpha$  para a manutenção do fenótipo das células  $\beta$  foi demonstrado por Sangán e colaboradores, no qual a indução da expressão ectópica de HNF4 $\alpha$  utilizando-se de adenovírus em células  $\alpha$ TC1-9, uma linhagem de células  $\alpha$ , reduziu a expressão de glucagon e induziu a produção de insulina quando comparada a células  $\alpha$ TC1-9 controle. Dessa forma, foi demonstrado que essas células  $\alpha$  teriam passado por um processo de transdiferenciação causado pela indução de HNF4 $\alpha$  que as reprogramou para o fenótipo de células  $\beta$  (SANGAN et al., 2015). Dados obtidos por nosso grupo

(não mostrados aqui) mostraram que a redução da expressão de HNF4 $\alpha$  utilizando-se de siRNA em células  $\beta$  de linhagem humana EndoC- $\beta$ H1 reduziu a expressão de vários genes envolvidos na manutenção do estado diferenciado de células  $\beta$ , como o PDX1, o *NK homeobox 2* (NKX2) e o *Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A* (MafA) (RAUM et al., 2006; NISHIMURA et al., 2009), além da diminuição da expressão de genes relacionados às subunidades Kir6.2 dos canais K<sub>ATP</sub>, importantes para a secreção de insulina (RÖDER et al., 2016). Além disso, houve uma diminuição de marcadores de proliferação celular como Ki-67 e aumento da expressão de *Neurogenin-3* (NGN3) e *Sex-determining region Y box 9* (SOX9), comumente expresso em células precursoras das células  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  (ARNES et al., 2012), indicando uma possível dediferenciação das células  $\beta$  na ausência do HNF4 $\alpha$ . Além disso, essas células  $\beta$  passaram a expressar mRNA do glucagon (dados não publicados).

Dessa forma, sugerimos que a diminuição da morte por apoptose e do estresse de RE induzidos pelas citocinas pró-inflamatórias e taspigargina nas células INS-1E com o silenciamento de HNF4 $\alpha$  também poderiam estar relacionadas a uma dediferenciação das células  $\beta$  provocada pela redução da expressão de HNF4 $\alpha$  e não por uma ação direta dessa proteína em vias pró-apoptóticas. De algum modo, essas células poderiam ter deixado de ser sensíveis a estes estímulos e não respondem da mesma forma que uma célula  $\beta$  normal.

## 7 CONCLUSÃO

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

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

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

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

Para a melhor investigação da correlação da expressão do HNF4 $\alpha$  com a diferenciação das células  $\beta$ , seria necessário investigar a expressão de genes relacionados

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

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HABENER, J. F.; STANOJEVIC, V.  **$\alpha$ -cell role in  $\beta$ -cell generation and regeneration***Islets*, 27 maio 2012. .

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TREIMAN, M.; CASPERSEN, C.; BRØGGER, S. A tool coming of age : thapsigargin as an inhibitor of sarco- endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> -ATPases. **Zywnie Czwolwieka I Metabolizm**, v. 19, n. April, p. 131–135, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ANEXO 1

### Protocolo de Imunohistoquímica para Insulina e Glucagon

#### Laboratório de Estudo dos Mecanismos de Morte de Células Beta - LEMMC $\beta$

##### Desparafinização

- Xilol I (30 minutos);
- Xilol II (30 minutos).

##### Hidratação

- Álcool 100% I (20 minutos);
  - Álcool 100% II (20 minutos);
  - Álcool 95% (15 minutos);
  - Álcool 70% (5 minutos);
  - Água destilada (5 minutos);
  - PBS 1x + Tween 20 0,03% pH 7,32 (5 minutos);
    - **Preparo:** para 100 mL de PBS 1x, usar 300  $\mu$ L de Tween 20.
- } Devem estar no volume máximo da jarra de Coplin para que todo o xilol seja removido.

##### Bloqueio da Peroxidase Endógena

- PBS 1x + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% (40 minutos – Temperatura ambiente);
  - **Preparo:** para 100 mL de PBS 1x, usar 33,3 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (uso único);
- PBS 1x + Tween 20 0,03% pH 7,32 (5 minutos – 3 vezes).

##### Recuperação Antigênica

- Tampão Citrato de sódio 10 mM pH 6,02 + Tween 20 0,3% (30 minutos – Vaporreia);
  - **Preparo:** para 200 mL de Tampão Citrato de sódio, usar 600  $\mu$ L de Tween 20. Usar 29,2 g de Citrato de sódio para 1 L de Água destilada;
- Esfriar (15 minutos – Temperatura ambiente);
- PBS 1x + Tween 20 0,3% pH 7,32 (5 minutos – 3 vezes);
  - **Preparo:** para 100 mL de PBS 1x, usar 30  $\mu$ L de Tween 20.

##### Bloqueio dos Sítios Antigênicos Inespecíficos

- Circundar os cortes com caneta hidrofóbica para histologia;

- PBS 1x + BSA 5% + Soro normal de cabra 1:1 (1 hora – Câmara úmida – Temperatura ambiente).

### **Incubação do Anticorpo Primário**

- Escorrer os cortes;
- Anticorpo anti-insulina (diluição 1:500) e anti-glucagon (diluição 1:350) (*Overnight* – Câmara úmida – 4°C).

### **Incubação em Anticorpo Secundário**

- PBS 1x + Tween 20 0,3% pH 7,32 (5 minutos – 3 vezes).
- Anticorpo secundário (diluição 1:200) + PBS 1x + BSA 5% (2:30 horas – Câmara úmida – Temperatura ambiente);
- PBS 1x + Tween 20 0,3% pH 7,32 (5 minutos – 3 vezes).

### **Revelação**

- DAB (aproximadamente 4 minutos depois do primeiro corte). **Atenção:** reagente cancerígeno, utilizar luvas e descartar o material em hipoclorito;
  - **Preparo:** para 4,5 mL de PBS 1x, usar 0,5 mL de DAB e 4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Atenção:** calcular a quantidade de DAB de acordo com o número de lâminas. A quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não muda, pois é calculada em relação ao anticorpo secundário;
- Água destilada (5 minutos – 3 vezes).

### **Contra-coloração**

- Hematoxilina de Mayer (1 minuto);
- Água destilada (10 minutos – 3 vezes).

### **Desidratação**

- Álcool 95% (5 minutos);
- Álcool 100% I (10 minutos);
- Álcool 100% II (10 minutos);
- Álcool/xilol 1:1 (10 minutos);
- Xilol I (10 minutos);
- Xilol II (10 minutos).

**Montagem**

- Goma de Damar: gotejar na lamínula e colocar sobre os cortes.
- Retirar as bolhas;
- Secagem em capela (24 horas).