

CATHARINA DE BARROS PIMENTEL VILLAÇA

**Caracterização do modelo animal de camundongos knockout condicional para
HNF4 α em células β**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia de Sistemas -
Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ortis

Versão original

São Paulo

2022

RESUMO

Villaca, CBP. Caracterização do modelo animal de camundongos knockout condicional para HNF4 α em células β [dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas)]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O HNF4 α é um fator de transcrição importante para a regulação da capacidade das células β de secretar insulina adequadamente em resposta a concentração de glicose. Sabe-se que o *knockout* (KO) de HNF4 α tem influência na homeostasia do retículo endoplasmático (RE), essencial para a capacidade secretora da célula β . Além disso, novas evidências sugerem que o *knockdown* de HNF4 α leva a desdiferenciação da célula β . É importante notar que, em humanos, a mutação de HNF4 α parece ter um efeito progressivo, sendo que o quadro clínico de MODY 1, um tipo de Diabetes *mellitus* (DM) devido a esta mutação, é observado clinicamente no início da fase adulta. Além da idade, existem evidências, em outros tipos de DM, que o sexo influencia a disfunção da célula β , com possível envolvimento de vias de estresse de RE. Considerando a importância de HNF4 α na função da célula β , buscamos avaliar a influência do sexo e da idade na disfunção dessas células. Para isso, utilizamos um modelo animal com KO para HNF4 α , induzido após o nascimento, específico para células β (Ins.CRE HNF4 α ^{loxP/loxP}). Assim, avaliamos em ilhotas de camundongos machos e fêmeas (controle e HNF4 α KO), a marcação para insulina e glucagon, assim como marcadores envolvidos com as vias do estresse de RE e desdiferenciação da célula β ao longo de diferentes tempos de vida. A eficiência da indução do KO foi confirmada pela redução de células de ilhota positivas para HNF4 α . Camundongos KO são intolerantes à glicose após 50 dias de idade, sendo que os machos KO (MKO) apresentam maior intolerância à glicose em comparação as fêmeas KO (FKO). Além disso, a porcentagem de células insulina-positivas na ilhota é menor em KO em relação aos Controle (Ctr) em todas as idades avaliadas, com MKO tendo porcentagem menor em relação a FKO aos 90 e 150 dias de idade. Nesta idade, ambos os grupos KO têm massa de células β reduzida. Por outro lado, a massa de células α está aumentada nos KO em comparação com Ctr, sendo maior nos MKO em relação a FKO. Ao avaliar as vias do estresse de RE, é possível observar que os grupo KO apresentam modulação de vias da UPR, porém apenas os MKO apresentam indícios de apoptose mediada por estresse de RE. As FKO, por outro lado, apresentam evidências de perda de estado diferenciado das células β . Dessa forma, é possível concluir que a ausência de HNF4 α leva a uma alteração na tolerância a glicose e perda da marcação para insulina que são influenciadas pelo sexo e idade, sendo possível sugerir que a

disfunção da célula β nos grupos KO ocorre pela alteração nas vias do estresse de RE. Além disso, é possível hipotetizar que o sexo influencia se essa disfunção será induzida pela ativação de vias pró-apoptóticas ou pela ativação inadequada das vias adaptativas e desdiferenciação da célula β .

Palavras chave: Diabetes *mellitus*, apoptose, HNF4 α , Célula β , Desdiferenciação.

ABSTRACT

Villaca, CBP. Characterization of the β cell specific HNF4 α knockout mice model [dissertação (Master Thesis in Life Systems Biology)]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

HNF4 α is an important transcription factor for regulating the ability of β cells to adequately secrete insulin in response to glucose concentration. It is known that the knockout (KO) of HNF4 α is associated with an influence on the homeostasis of the endoplasmic reticulum (ER), an organelle essential for β cell's secretory capacity. Furthermore, new evidence suggests that HNF4 α knockdown leads to β -cell dedifferentiation. It is important to note that, in humans, HNF4 α mutation appears to have a progressive effect, as the clinical picture of MODY 1, a type of diabetes mellitus (DM) due to this mutation, is observed in early adulthood. In addition to age, there is evidence, in other types of DM, that sex influences β -cell dysfunction, with possible involvement of ER stress pathways. Considering the importance of HNF4 α in β cell function, we sought to assess the influence of sex and age on the dysfunction of these cells. For this, we used an animal model with KO for HNF4 α , induced after birth, specific for β cells (Ins.CRE HNF4 α ^{loxP/loxP}). Thus, we evaluated in islets of male and female mice (control and HNF4 α KO), insulin and glucagon labeling, as well as markers involved with ER stress pathways and β -cell dedifferentiation over different post-lifetimes. The efficiency of KO induction was confirmed by the reduction of islet cells positive for HNF4 α . KO mice are glucose intolerant after 50 days of age, with KO (MKO) males showing greater glucose intolerance compared to KO (FKO) females. Furthermore, the percentage of insulin-positive cells in the islet is lower in KO compared to Control (Ctr) at all ages evaluated, with MKO having a lower percentage compared to FKO at 90 and 150 days of age. At this age, both KO groups have reduced β cell mass. On the other hand, the mass of α cells is increased in KO compared to Ctr, being higher in MKO compared to FKO. When evaluating the ER stress pathways, it is possible to observe that the KO group present modulation of UPR pathways, but only the MKOs show evidence of apoptosis mediated by ER stress. FKOs, on the other hand, show evidence of loss of differentiated state of β cells. Thus, it is possible to conclude that the absence of HNF4 α leads to a change in glucose tolerance and loss of insulin marking that are influenced by sex and age, being possible to suggest that β cell dysfunction in KO groups occurs due to alteration in pathways. of ER stress. Furthermore, it is possible to hypothesize that sex and age influence whether this dysfunction will be induced by the

activation of pro-apoptotic pathways or by the inadequate activation of the adaptative pathways and dedifferentiation of the β cell.

Keywords: Diabetes *mellitus*, apoptosis, HNF4 α , β cell, dedifferentiation.

.

INTRODUÇÃO

Ilhota de Langherans e a célula β

O pâncreas é uma glândula mista, possuindo uma porção exócrina, composta de ácinos que secretam enzimas digestivas, e uma porção endócrina (Henry et al., 2019). Esta última é composta por micro-órgãos, denominados ilhotas de Langherans ou pancreáticas, dispersos pelo pâncreas, que são responsáveis por secretar os hormônios associados ao metabolismo da glicose (Bastidas-Ponce et al., 2017).

As ilhotas são agrupamentos celulares constituídos por 5 tipos celulares distintos: β , α , δ , ϵ e PP, responsáveis pela produção e secreção de insulina, glucagon, somatostatina, grelina e polipeptídeo pancreático, respectivamente. A citoarquitetura da ilhota (distribuição dos diferentes tipos celulares) é de grande importância para o adequado funcionamento das células, visto que os diferentes tipos celulares exercem um papel regulatório entre si (Brereton et al., 2015).

Dentre os diferentes tipos celulares, a célula β é a mais abundante, variando entre 60-80% das células da ilhota (Kim et al., 2009), dependendo da espécie. Essa célula apresenta grande importância para o metabolismo da glicose, pois é responsável por produzir e secretar a insulina, o único hormônio hipoglicemiante (Banting et al., 1922).

Produção e secreção de insulina

O processo de secreção de insulina frente ao aumento da concentração de glicose plasmática (GSIS, do inglês “*Glucose stimulated insulin secretion*”) se inicia pelo aumento do influxo de glicose na célula através do transportador Glut-2 (Thorens, 2015). A metabolização da glicose leva ao aumento da razão ATP/ADP, o que causa fechamento dos canais de K_{ATP} e despolarização da membrana celular (Cook and Hales, 1984). Essa despolarização ativa canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, levando ao influxo deste íon para o citoplasma celular, o que estimula a secreção de insulina (Wollheim and Sharp, 1981).

Durante a GSIS, ocorre um aumento da produção de insulina, que tem sua síntese iniciada no Retículo Endoplasmático (RE) (Schwarz and Blower, 2016). Dentro dessa organela a pró-insulina atinge sua conformação adequada, com o auxílio de chaperonas de RE, antes de ser direcionada para as próximas etapas de processamento e secreção. Nas células β , com o aumento da concentração plasmática de glicose e consequente aumento da produção de insulina, pode ocorrer um acúmulo de proteínas mal-enoveladas dentro do RE, perturbando a

homeostasia da organela, em um quadro chamado de estresse de RE (Eizirik et al., 2008; Meyerovich et al., 2016; Schwarz and Blower, 2016). A fim de reestabelecer a homeostasia da organela, e portanto sua capacidade de dobramento, são ativadas as vias da UPR (do inglês “*Unfolded Protein Response*”). Essas vias se iniciam em três transdutores de sinal (IRE1 α , PERK, ATF6) (Eizirik et al., 2008; Meyerovich et al., 2016). Para que ocorra a ativação dessas vias, a chaperona GRP78/BiP precisa ser desligada dos transdutores de sinal, sendo o aumento dessa proteína um importante indicador do quadro de estresse de RE (Cnop et al., 2010; Eizirik et al., 2008; Meyerovich et al., 2016).

Em condições normais, o aumento da demanda de produção e secreção nas células β leva ao acúmulo de pro insulina mal-enovelada no RE e conseqüentemente a ativação das vias da UPR (Eizirik et al., 2008; Fonseca et al., 2009). O subseqüente aumento da capacidade funcional permite a adequada produção e secreção de insulina, sendo assim, a ativação dessas vias permite que a célula β se adapte a condições oscilantes de glicose plasmática (desfecho adaptativo da UPR) (Chan et al., 2015; Eizirik and Cnop, 2010). Além disso, a desativação das vias da UPR, após o reestabelecimento da homeostasia do RE, induz um período de recuperação do estresse celular, essencial para a sobrevivência da célula (Xin et al., 2018). A ativação das vias da UPR pode ser insuficiente para reestabelecer a homeostasia do RE, levando a um desfecho deletério, ou seja, pró-apoptótico (Eizirik et al., 2008; Eizirik and Cnop, 2010).

Perda das células β

Defeitos na produção de insulina, que podem ou não ser acompanhados de defeitos na ação deste hormônio, culminam na hiperglicemia crônica, que é a principal característica do Diabetes *mellitus* (DM) (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes, 1997).

Nesses quadros, ocorre uma perda da massa funcional de células β , que tem origem na morte, disfunção e desdiferenciação celular, dentre outras causas (Butler et al., 2003; Eizirik et al., 2020; Weir and Bonner-Weir, 2004). Além disso, a perda de células β está associada com a alteração do microambiente da ilhota (Almaça et al., 2020). Diferentes fenômenos podem contribuir para os desfechos deletérios da célula β , dentre eles, o estabelecimento de estresse de RE crônico, ou seja, o não reestabelecimento da homeostasia da organela que leva a ativação do perfil pró apoptótico das vias da UPR (Eizirik and Cnop, 2010). Nesse cenário, ocorre um acúmulo de proteínas, em especial pró-insulina, mal-enoveladas no lúmen do RE, já que a organela não é capaz de expandir sua capacidade funcional de acordo com a demanda

(Eizirik and Cnop, 2010). Esse acúmulo de pró-insulina mal-enovelada não só contribui para a ativação das vias pró-apoptóticas e secreção inadequada de insulina (Fonseca et al., 2009), como pode contribuir para a desdiferenciação celular, já que a própria insulina é parcialmente responsável pela manutenção do fenótipo maduro e funcional da célula β (Balboa et al., 2018; Efrat, 2019; Wang et al., 2014). Sabe-se que a desdiferenciação é uma importante causa da perda de células β funcionas no DM do tipo 2 e que esse fenômeno está associado a uma ativação inadequada das vias adaptativas da UPR nas células β (Bensellam et al., 2018).

Estresse de Retículo Endoplasmático e apoptose

A ativação aguda e fisiológica das vias da UPR permite a adaptação da célula β a variação de glicose plasmática e, conseqüentemente, adequada secreção de insulina (desfecho adaptativo da UPR) (Eizirik et al., 2008; Fonseca et al., 2009; Meyerovich et al., 2016). Já a ativação crônica dessas vias tem uma efeito patológico, levando a ativação de vias pró-apoptóticas, e morte das células β (Eizirik and Cnop, 2010; Osowski and Urano, 2010; Walter and Ron, 2011).

O CHOP é um importante fator nas vias deletérias, sendo que a sua expressão leva a ativação da apoptose mitocondrial (Allagnat et al., 2012; Hu et al., 2019; Tabas and Ron, 2011). É interessante notar que a interação de CHOP com outros sinalizadores das vias da UPR é importante para determinar o desfecho adaptativo ou apoptótico, por exemplo a redução de XBP-1s, um importante sinalizador do desfecho adaptativo, aumenta a apoptose das células β dependente de CHOP quando ocorre a indução do estresse de RE nas células β (Chan et al., 2015).

Desdiferenciação da célula β

A hiperglicemia crônica compromete o funcionamento das células β de diferentes formas, podendo levar a perda do seu estado diferenciado, ou seja, se tornam células insulina-negativas e sem o fenótipo funcional de célula β (Gershengorn et al., 2004). Apesar de não se saber qual o mecanismo envolvido com esse fenômeno, hipotetiza-se que, em função do estresse de RE causado pela hiperglicemia, a ativação das vias adaptativas da UPR possa ocorrer de maneira inadequada, sendo essa ativação errônea capaz de desencadear a desdiferenciação da célula β (Bensellam et al., 2018; Han et al., 2009; Herbert and Laybutt, 2016) Esse processo é marcado por perda de marcadores de estado diferenciado e maduro de

célula β , como GLUT-2, e o reaparecimento de fatores de precursor endócrino, como PAX-4 e NGN3 (Honzawa and Fujimoto, 2021)..

Quando expostas, *in vitro*, a altas concentrações de glicose por um período prolongado, as células β apresentam um fenótipo imaturo, com redução da capacidade secretora de insulina e redução de GLUT-2 (Neelankal John et al., 2017). Além disso, utilizando um modelo de DM do tipo 2, foi descrita uma redução dos genes envolvidos com a repressão da expressão de fatores endócrinos nas células β (Gutiérrez et al., 2017; Mollet et al., 2016). Apesar de ser um fenômeno descrito mais recentemente, observou-se que a perda do fenótipo diferenciado da célula β é um fator importante na redução da massa funcional de células β que ocorre no tipos de DM mais prevalentes (Cinti et al., 2016; Moin et al., 2016; Moin and Butler, 2019).

MODY

Existem diferentes tipos de DM, dentre eles os mais prevalentes são DM do tipo 1 e o DM do tipo 2, que são quadros de origem multifatorial (ADA, 2015). Entre os outros tipos, existem os quadros de MODY (do inglês “Mature onset Diabetes of the Young”), que são quadros de origem autossômica dominante, cujos subtipos estão associados a uma mutação específica (Anik et al., 2015; Fajans, 1989). Dentre os subtipos, o MODY1 é de especial importância, já que o estudo deste subtipo permitiu observar a importância do HNF4 α na célula β (Stoffel and Duncan, 1997; Yamagata et al., 1996). Demonstrou-se, por exemplo, a importância desse fator de transcrição para a GSIS (Gupta et al., 2005)

HNF4 α e a função da célula β

O HNF4 α tem grande importância funcional para as células β (Byrne et al., 1995; Herman et al., 1997). Isso foi demonstrado na década de 90, por estudos que observaram uma redução da GSIS em paciente com MODY1 (Byrne et al., 1995; Herman et al., 1997). A mutação do gene reduz sua dimerização, portanto sua capacidade de se ligar ao DNA e exercer seu papel regulatório em diferentes vias na metabolização da glicose e secreção de insulina (Gupta et al., 2005; Stoffel and Duncan, 1997)

Devido ao envolvimento do estresse de RE para a disfunção da célula β em diferentes modelos de DM (Eizirik et al., 2008), dois grupos buscaram avaliar o efeito da deleção de HNF4 α nessas vias. Nesses trabalhos existe um conflito, visto que um demonstra que na ausência de HNF4 α a indução do estresse de RE leva a menor apoptose das células β *in vitro* quando comparadas as células com expressão normal de HNF4 α (Sato et al., 2012). O outro

trabalho observou uma relação positiva na expressão de HNF4 α e XBP-1s, ou seja, a redução de HNF4 α *in vitro* levou a um prejuízo da capacidade adaptativa das células β , prejudicando o reestabelecimento da homeostasia de RE (Moore et al., 2016), o que poderia contribuir para um desfecho apoptótico dessas células. Apesar desses trabalhos indicarem um efeito do HNF4 α na homeostasia do RE, ainda não se sabe como ocorre a progressão temporal da perda de homeostasia do RE em células β sem HNF4 α em um ambiente com aumento da glicemia plasmática. Sabendo que o desenvolvimento do quadro de MODY1 e consequente disfunção da célula β tem influência da idade, é possível especular que a avaliação temporal do efeito do KO de HNF4 α nas vias da UPR de células β permita explicar as observações conflitantes dos trabalhos existentes na literatura.

Dados prévios do nosso grupo (Santos, GJ., *in preparativo*), mostraram que o silenciamento do HNF4 α em células β isoladas influencia o fenótipo diferenciado das células. Em resposta a redução de HNF4 α , observamos a redução de mRNA para PDX-1, NKX2.2 e MafA, que são importantes fatores para a manutenção do estado diferenciado da célula β . Além disso, observa-se um aumento significativo na expressão de PAX-4 e NGN3, fatores importantes de progenitor endócrino. É importante ressaltar que nos dados obtidos *in vitro* pelo nosso grupo, as células não estão expostas a hiperglicemia e não estão inseridas na ilhota pancreática. Dessa forma, apesar desses dados sugerirem que o HNF4 α está envolvido com a desdiferenciação da célula β , é importante ressaltar que o microambiente da ilhota (Golson, 2021; Sakhneny et al., 2021) assim como a concentração plasmática de glicose (Jonas et al., 1999) são importantes para a manutenção do estado diferenciado da célula β , assim é importante avaliar se o fenômeno da desdiferenciação em resposta a ausência de HNF4 α ocorre nas células β quando inseridas na ilhota pancreática.

Idade e a disfunção da célula β

Em quadros de DM1 e DM2 ocorre uma progressiva piora na hiperglicemia com a idade, que pode ser correlacionada com uma pior capacidade de manutenção da homeostasia de RE (Hudish et al., 2019; Okano et al., 2013). Além disso, existem evidências que a progressão da disfunção da célula β em camundongos diabéticos (db/db), que ocorre com tempo, é em parte mediada pela perda do fenótipo de célula β diferenciada (Murao et al., 2022). Dessa forma, a idade é um fator chave na progressão da disfunção da célula β em diferentes modelos de DM.

O aparecimento dos sintomas de MODY, que ocorre no início da fase adulta, sugerem que a idade é um fator chave para a progressão da doença (Anik et al., 2015). Como discutido anteriormente, é possível especular que o tempo é um fator importante para avaliar o efeito do

HNF4 α na manutenção da homeostasia de RE. Além disso, com o *knockdown* de HNF4 α em células β isoladas foi observada uma perda do estado diferenciado, mas não se sabe se o mesmo ocorreria dentro da ilhota pancreática e qual o efeito do tempo na desdiferenciação.

Influência do dimorfismo sexual na função da célula β

Em diferentes momentos na vida de mamíferos, pode ocorrer um aumento da resistência periférica a insulina, que faz parte dos processos fisiológicos (Parsons et al., 1992). Nessas etapas, ocorre uma proliferação compensatória das células β , ocorrendo em resposta ao aumento da demanda por insulina (Parsons et al., 1992). Esse fenômeno é observado em fêmeas durante a gestação, e foi demonstrado que o HNF4 α é essencial para a proliferação compensatória de células β durante a gravidez (Gupta et al., 2007). A puberdade é outra fase durante a qual ocorre um aumento da resistência periférica à insulina (Bloch et al., 1987; Jasik and Lustig, 2008; Kelsey and Zeitler, 2016). Nessa fase, em roedores, foi observado aumento na proliferação das células β , sendo esse fenômeno importante para a manutenção da normoglicemia (Castell et al., 2018). Dessa forma, considerando que o MODY1 é um quadro que se inicia entre a puberdade e o início da fase jovem adulto (Anık et al., 2015), a disfunção da célula β , observada após esse período, pode estar relacionada com uma perda na capacidade de proliferação em resposta a resistência a insulina, natural na fase de adolescência.

Em humanos, existem evidências que na puberdade o estrógeno protege a célula β da disfunção (Blohmé et al., 1992). Dessa forma, sexo, em conjunto com a idade, é um fator importante a ser considerado ao avaliar a disfunção da célula β (Blohmé et al., 1992; Castell et al., 2018). Em modelos animais, demonstrou-se que a ação do 17 β -estradiol através do receptor de estrógeno α (ER α , do inglês “*estrogen receptor α* ”) previne o desenvolvimento do DM1, induzido por streptozotocina, em fêmeas e em machos tratados com 17 β -estradiol (Paik et al., 1982). Além disso, o 17 β -estradiol é capaz de aumentar a biossíntese de insulina (Wong et al., 2010) e está associado a um melhor funcionamento do sistema de degradação de proteínas associado ao RE, levando a uma melhor degradação da pro-insulina mal-enovelada e uma redução do quadro de estresse de RE em um modelo de DM2 (Xu et al., 2018). É importante notar que fêmeas tratadas com 5 α -dihidrotestosterona, um análogo do hormônio esteroide masculino, adquirem a mesma susceptibilidade a disfunção da célula β observada nos machos (Paik et al., 1982). Dessa forma, é possível observar um efeito protetor da disfunção da célula β em fêmeas, devido à presença fisiológica do estrógeno, demonstrando um efeito dos hormônios esteroidais na disfunção da célula β .

Além do estrogênio, a prolactina tem um efeito protetor contra a apoptose da célula β em ambientes pró-inflamatórios, como o associado ao DM1, sugerindo que ocorre um aumento do limiar para apoptose na presença desse hormônio (Nardelli et al., 2018; Terra et al., 2011). Sabe-se que o aumento da prolactina durante a gestação é importante para a proliferação das células β que ocorre nesse período (Cao et al., 2021) e mesmo camundongas não gestantes tem níveis suficientes do hormônio para apresentarem proteção contra a apoptose da célula β mediada por estresse de RE (Li et al., 2020).

CONCLUSÃO

Concluimos que o sexo e a idade afetam o efeito da ausência de HNF4 α , sendo que esses efeitos podem ocorrer em marcadores associados as vias da UPR e desdiferenciação da célula β como resumido no quadro abaixo (tabela 1). Assim, a ausência de HNF4 α leva a uma alteração na tolerância a glicose e perda da marcação para insulina que são influenciadas pelo sexo e idade, sendo possível sugerir que a disfunção da célula β nos grupos KO ocorre pela alteração nas vias do estresse de RE. Além disso, é possível hipotetizar que o sexo influencia se essa disfunção será induzida pela ativação de vias pró-apoptóticas ou pela ativação inadequada das vias adaptativas e desdiferenciação da célula β .

	CHOP	GRP78	XBP-1s	Glut-2	PAX-4	NGN3	SOX9
MKOvs MCtr	↑	↑					
FKO vs FCtr		↑		↓	↑	↑	
MKO vs FKO	↑			↑			

Tabela 1: Resumo da alteração dos marcadores avaliados. Tabela comparativa das alterações observadas entre os grupos com 150 dias de idade. Em verde estão destacados os marcadores elevados, e em vermelho os reduzidos.

BIBLIOGRAFIA

- Allagnat F, Fukaya M, Nogueira TC, Delaroché D, Welsh N, Marselli L, et al. C/EBP homologous protein contributes to cytokine-induced pro-inflammatory responses and apoptosis in β -cells. *Cell Death Differ* 2012;19:1836–46. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.67>.
- Almaça J, Caicedo A, Landsman L. Beta cell dysfunction in diabetes: the islet microenvironment as an unusual suspect. *Diabetologia* 2020;63:2076–85. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05186-5>.
- Almaça J, Weitz J, Rodriguez-Diaz R, Pereira E, Caicedo A. The Pericyte of the Pancreatic Islet Regulates Capillary Diameter and Local Blood Flow. *Cell Metab* 2018;27:630–644.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.016>.
- Ank A, Çatlı G, Abacı A, Böber E. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM* 2015;28:251–63. <https://doi.org/10.1515/jpem-2014-0384>.
- Back SH, Scheuner D, Han J, Song B, Ribick M, Wang J, et al. Translation Attenuation through eIF2 α Phosphorylation Prevents Oxidative Stress and Maintains the Differentiated State in β Cells. *Cell Metab* 2009;10:13–26. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.06.002>.
- Baeyens L, Bonn e S, German MS, Ravassard P, Heimberg H, Bouwens L. Ngn3 expression during postnatal in vitro beta cell neogenesis induced by the JAK/STAT pathway. *Cell Death Differ* 2006;13:1892–9. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401883>.
- Balboa D, Saarim aki-Vire J, Borshagovski D, Survila M, Lindholm P, Galli E, et al. Insulin mutations impair beta-cell development in a patient-derived iPSC model of neonatal diabetes. *ELife* 2018;7:e38519. <https://doi.org/10.7554/eLife.38519>.
- Bankhead P, Fernández JA, McArt DG, Boyle DP, Li G, Loughrey MB, et al. Integrated tumor identification and automated scoring minimizes pathologist involvement and provides new insights to key biomarkers in breast cancer. *Lab Invest* 2018;98:15–26. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.131>.
- Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017;7:16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>.
- Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* 1922;12:141–6.
- Bastidas-Ponce A, Scheibner K, Lickert H, Bakhti M. Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development. *Dev Camb Engl* 2017;144:2873–88. <https://doi.org/10.1242/dev.140756>.
- Bensellam M, Jonas J-C, Laybutt DR. Mechanisms of β -cell dedifferentiation in diabetes: recent findings and future research directions. *J Endocrinol* 2018;236:R109–43. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0516>.
- Bloch CA, Clemons P, Sperling MA. Puberty decreases insulin sensitivity. *J Pediatr* 1987;110:481–7. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(87\)80522-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(87)80522-X).
- Blohmé G, Nyström L, Arnqvist HJ, Lithner F, Littorin B, Olsson PO, et al. Male predominance of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in young adults: results from a 5-year prospective nationwide study of the 15-34-year age group in Sweden. *Diabetologia* 1992;35:56–62. <https://doi.org/10.1007/BF00400852>.

- Braun M, Kirsten R, Rupp NJ, Moch H, Fend F, Wernert N, et al. Quantification of protein expression in cells and cellular subcompartments on immunohistochemical sections using a computer supported image analysis system. *Histol Histopathol* 2013;28:605–10. <https://doi.org/10.14670/HH-28.605>.
- Brereton MF, Vergari E, Zhang Q, Clark A. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 2015;63:575–91. <https://doi.org/10.1369/0022155415583535>.
- Briant LJB, Reinbothe TM, Spiliotis I, Miranda C, Rodriguez B, Rorsman P. δ -cells and β -cells are electrically coupled and regulate α -cell activity via somatostatin: β -to- δ gap junction coupling. *J Physiol* 2018;596:197–215. <https://doi.org/10.1113/JP274581>.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2003;52:102–10. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.102>.
- Cao Y, Feng Z, He X, Zhang X, Xing B, Wu Y, et al. Prolactin-regulated Pbk is involved in pregnancy-induced β -cell proliferation in mice. *J Endocrinol* 2021;252:107–23. <https://doi.org/10.1530/JOE-21-0114>.
- Castell A-L, Ethier M, Fergusson G, Ghislain J, Poitout V. Investigation into [beta]-cell Adaptation During Puberty. *ESPE Abstr.*, vol. 89, Bioscientifica; 2018.
- Chan JY, Luzuriaga J, Maxwell EL, West PK, Bensellam M, Laybutt DR. The balance between adaptive and apoptotic unfolded protein responses regulates β -cell death under ER stress conditions through XBP1, CHOP and JNK. *Mol Cell Endocrinol* 2015;413:189–201. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.06.025>.
- Chung C-H, Hao E, Piran R, Keinan E, Levine F. Pancreatic β -cell neogenesis by direct conversion from mature α -cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 2010;28:1630–8. <https://doi.org/10.1002/stem.482>.
- Chung C-H, Levine F. Adult pancreatic alpha-cells: a new source of cells for beta-cell regeneration. *Rev Diabet Stud RDS* 2010;7:124–31. <https://doi.org/10.1900/RDS.2010.7.124>.
- Cinti F, Bouchi R, Kim-Muller JY, Ohmura Y, Sandoval PR, Masini M, et al. Evidence of β -Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:1044–54. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2860>.
- Cnop M, Ladrière L, Igoillo-Esteve M, Moura RF, Cunha DA. Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic β -cell dysfunction. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:76–82. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01279.x>.
- Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, et al. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* 2009;138:449–62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.035>.
- Cook DL, Hales CN. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 1984;311:271–3. <https://doi.org/10.1038/311271a0>.
- Courtney M, Pfeifer A, Al-Hasani K, Gjernes E, Vieira A, Ben-Othman N, et al. In vivo conversion of adult α -cells into β -like cells: a new research avenue in the context of type 1 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2011;13 Suppl 1:47–52. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01441.x>.
- Efrat S. Beta-Cell Dedifferentiation in Type 2 Diabetes: Concise Review. *STEM CELLS* 2019;37:1267–72. <https://doi.org/10.1002/stem.3059>.
- Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes Mellitus. *Endocr Rev* 2008;29:42–61. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0015>.

- Eizirik DL, Cnop M. ER stress in pancreatic beta cells: the thin red line between adaptation and failure. *Sci Signal* 2010;3:pe7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3110pe7>.
- Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat Rev Endocrinol* 2020;16:349–62. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0355-7>.
- Fajans SS. Maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabetes Metab Rev* 1989;5:579–606. <https://doi.org/10.1002/dmr.5610050705>.
- Fonseca SG, Burcin M, Gromada J, Urano F. Endoplasmic reticulum stress in beta-cells and development of diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:763–70. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.07.003>.
- Fox J, Stephen Barthold, Muriel Davisson, Christian Newcomer, Fred Quimby, Abigail Smith. *The Mouse in Biomedical Research - 2nd Edition*. Elsevier; 2006.
- Furuyama K, Chera S, van Gurp L, Oropeza D, Ghila L, Damond N, et al. Diabetes Relief in Mice by Glucose-Sensing Insulin-Secreting Human α -Cells. *Nature* 2019;567:43–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0942-8>.
- Gershengorn MC, Hardikar AA, Wei C, Geras-Raaka E, Marcus-Samuels B, Raaka BM. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Generates Proliferative Human Islet Precursor Cells. *Science* 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1101968>.
- Golson ML. Islet Epigenetic Impacts on β -Cell Identity and Function. *Compr Physiol* 2021;11:1961–78. <https://doi.org/10.1002/cphy.c200004>.
- Gupta RK, Gao N, Gorski RK, White P, Hardy OT, Rafiq K, et al. Expansion of adult β -cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4 α . *Genes Dev* 2007;21:756–69. <https://doi.org/10.1101/gad.1535507>.
- Gupta RK, Vatamaniuk MZ, Lee CS, Flaschen RC, Fulmer JT, Matschinsky FM, et al. The MODY1 gene HNF-4 α regulates selected genes involved in insulin secretion. *J Clin Invest* 2005;115:1006–15. <https://doi.org/10.1172/JCI22365>.
- Gutiérrez GD, Bender AS, Cirulli V, Mastracci TL, Kelly SM, Tsirigos A, et al. Pancreatic β cell identity requires continual repression of non- β cell programs. *J Clin Invest* 2017;127:244–59. <https://doi.org/10.1172/JCI88017>.
- Han D, Ag L, L VW, Jp U, W X, A H, et al. IRE1 α kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* 2009;138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.017>.
- He KHH, Lorenzo PI, Brun T, Jimenez Moreno CM, Aeberhard D, Ortega JV, et al. In Vivo Conditional Pax4 Overexpression in Mature Islet β -Cells Prevents Stress-Induced Hyperglycemia in Mice. *Diabetes* 2011;60:1705–15. <https://doi.org/10.2337/db10-1102>.
- Henry BM, Skinningsrud B, Saganiak K, Pękala PA, Walocha JA, Tomaszewski KA. Development of the human pancreas and its vasculature — An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. *Ann Anat - Anat Anz* 2019;221:115–24. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.09.008>.
- Herbert TP, Laybutt DR. A Reevaluation of the Role of the Unfolded Protein Response in Islet Dysfunction: Maladaptation or a Failure to Adapt? *Diabetes* 2016;65:1472–80. <https://doi.org/10.2337/db15-1633>.
- Hoffman RP, Vicini P, Sivitz WI, Cobelli C. Pubertal adolescent male-female differences in insulin sensitivity and glucose effectiveness determined by the one compartment minimal model. *Pediatr Res* 2000;48:384–8. <https://doi.org/10.1203/00006450-200009000-00022>.
- Honzawa N, Fujimoto K. The Plasticity of Pancreatic β -Cells. *Metabolites* 2021;11:218. <https://doi.org/10.3390/metabo11040218>.

- Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol* 2019;9.
- Hudish LI, Reusch JE, Sussel L. β Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2019;129:4001–8. <https://doi.org/10.1172/JCI129188>.
- Jacques-Silva MC, Correa-Medina M, Cabrera O, Rodriguez-Diaz R, Makeeva N, Fachado A, et al. ATP-gated P2X3 receptors constitute a positive autocrine signal for insulin release in the human pancreatic beta cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:6465–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908935107>.
- Jasik CB, Lustig RH. Adolescent obesity and puberty: the “perfect storm.” *Ann N Y Acad Sci* 2008;1135:265–79. <https://doi.org/10.1196/annals.1429.009>.
- Jonas JC, A S, W H, H I, G P, R L, et al. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 1999;274. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.14112>.
- Kawaguchi Y. Sox9 and programming of liver and pancreatic progenitors. *J Clin Invest* 2013;123:1881–6. <https://doi.org/10.1172/JCI66022>.
- Kelsey MM, Zeitler PS. Insulin Resistance of Puberty. *Curr Diab Rep* 2016;16:64. <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0751-5>.
- Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M. Islet architecture: A comparative study. *Islets* 2009;1:129–36. <https://doi.org/10.4161/isl.1.2.9480>.
- Kim J-W, Ko S-H, Cho J-H, Sun C, Hong O, Lee S-H, et al. Loss of beta-cells with fibrotic islet destruction in type 2 diabetes mellitus. *Front Biosci J Virtual Libr* 2008;13:6022–33. <https://doi.org/10.2741/3133>.
- Kooptiwut S, Mahawong P, Hanchang W, Semprasert N, Kaewin S, Limjindaporn T, et al. Estrogen reduces endoplasmic reticulum stress to protect against glucotoxicity induced-pancreatic β -cell death. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;139:25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.018>.
- Li R, Kondegowda NG, Filipowska J, Hampton RF, Leblanc S, Garcia-Ocana A, et al. Lactogens Reduce Endoplasmic Reticulum Stress–Induced Rodent and Human β -Cell Death and Diabetes Incidence in Akita Mice. *Diabetes* 2020;69:1463–75. <https://doi.org/10.2337/db19-0909>.
- Lorenzo PI, Juárez-Vicente F, Cobo-Vuilleumier N, García-Domínguez M, Gauthier BR. The Diabetes-Linked Transcription Factor PAX4: From Gene to Functional Consequences. *Genes* 2017;8:101. <https://doi.org/10.3390/genes8030101>.
- Matsuda T, Kido Y, Asahara S, Kaisho T, Tanaka T, Hashimoto N, et al. Ablation of C/EBP β alleviates ER stress and pancreatic β cell failure through the GRP78 chaperone in mice. *J Clin Invest* 2010;120:115–26. <https://doi.org/10.1172/JCI39721>.
- Mellado-Gil JM, Jiménez-Moreno CM, Martín-Montalvo A, Alvarez-Mercado AI, Fuente-Martín E, Cobo-Vuilleumier N, et al. PAX4 preserves endoplasmic reticulum integrity preventing beta cell degeneration in a mouse model of type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2016;59:755–65. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3864-0>.
- Meyerholz DK, Beck AP. Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research. *Lab Invest* 2018;98:844–55. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0057-0>.
- Meyerovich K, Ortis F, Allagnat F, Cardozo AK. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. *J Mol Endocrinol* 2016;57:R1–17. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0306>.

- Mizukami H, Takahashi K, Inaba W, Tsuboi K, Osonoi S, Yoshida T, et al. Involvement of oxidative stress-induced DNA damage, endoplasmic reticulum stress, and autophagy deficits in the decline of β -cell mass in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2014;37:1966–74. <https://doi.org/10.2337/dc13-2018>.
- Moin AS, Dhawan S, Shieh C, Butler PC, Cory M, Butler AE. Increased Hormone-Negative Endocrine Cells in the Pancreas in Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:3487–96. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1350>.
- Moin ASM, Butler AE. Alterations in Beta Cell Identity in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* 2019;19:83. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1194-6>.
- Mollet IG, Malm HA, Wendt A, Orho-Melander M, Eliasson L. Integrator of Stress Responses Calmodulin Binding Transcription Activator 1 (Camta1) Regulates miR-212/miR-132 Expression and Insulin Secretion. *J Biol Chem* 2016;291:18440–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.716860>.
- Moore BD, Jin RU, Lo H, Jung M, Wang H, Battle MA, et al. Transcriptional Regulation of X-Box-binding Protein One (XBP1) by Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (HNF4A) Is Vital to Beta-cell Function. *J Biol Chem* 2016;291:6146–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685750>.
- Murao N, Yokoi N, Takahashi H, Hayami T, Minami Y, Seino S. Increased glycolysis affects β -cell function and identity in aging and diabetes. *Mol Metab* 2022;55:101414. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101414>.
- Nardelli TR, Vanzela EC, Benedicto KC, Brozzi F, Fujita A, Cardozo AK, et al. Prolactin protects against cytokine-induced beta-cell death by NF κ B and JNK inhibition. *J Mol Endocrinol* 2018;61:25–36. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0257>.
- Neelankal John A, Morahan G, Jiang F-X. Incomplete Re-Expression of Neuroendocrine Progenitor/Stem Cell Markers is a Key Feature of β -Cell Dedifferentiation. *J Neuroendocrinol* 2017;29. <https://doi.org/10.1111/jne.12450>.
- Okano S, Hayasaka K, Igarashi M, Togashi Y, Nakajima O. Characterization of age-associated alterations of islet function and structure in diabetic mutant cryptochrome 1 transgenic mice. *J Diabetes Investig* 2013;4:428–35. <https://doi.org/10.1111/jdi.12080>.
- Oropeza D, Cigliola V, Romero A, Chera S, Rodríguez-Seguí SA, Herrera PL. Stage-specific transcriptomic changes in pancreatic α -cells after massive β -cell loss. *BMC Genomics* 2021;22:585. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07812-x>.
- Osłowski CM, Urano F. The binary switch between life and death of ER stressed beta cells. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:107–12. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3283372843>.
- Paik SG, Michelis MA, Kim YT, Shin S. Induction of insulin-dependent diabetes by streptozotocin. Inhibition by estrogens and potentiation by androgens. *Diabetes* 1982;31:724–9. <https://doi.org/10.2337/diab.31.8.724>.
- Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 1992;130:1459–66. <https://doi.org/10.1210/endo.130.3.1537300>.
- Rafacho A, Cestari TM, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E681–689. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90931.2008>.
- Reed DR, Bachmanov AA, Tordoff MG. Forty mouse strain survey of body composition. *Physiol Behav* 2007;91:593–600. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.026>.

- Rezanejad H, Ouziel-Yahalom L, Keyzer CA, Sullivan BA, Hollister-Lock J, Li W-C, et al. Heterogeneity of SOX9 and HNF1 β in Pancreatic Ducts Is Dynamic. *Stem Cell Rep* 2018;10:725–38. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.028>.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004;14:20–8. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.11.001>.
- Sakhneny L, Mueller L, Schonblum A, Azaria S, Burganova G, Epshtein A, et al. The postnatal pancreatic microenvironment guides β cell maturation through BMP4 production. *Dev Cell* 2021;56:2703–2711.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.08.014>.
- Sato Y, Hatta M, Karim MF, Sawa T, Wei F-Y, Sato S, et al. Anks4b, a novel target of HNF4 α protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 2012;287:23236–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.368779>.
- Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2016;73:79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>.
- Seymour PA. Sox9: a master regulator of the pancreatic program. *Rev Diabet Stud RDS* 2014;11:51–83. <https://doi.org/10.1900/RDS.2014.11.51>.
- Stoffel M, Duncan SA. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13209–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13209>.
- Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011;13:184–90. <https://doi.org/10.1038/ncb0311-184>.
- Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell* 2012;150:1223–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.029>.
- Terra LF, Garay-Malpartida MH, Wailemann RAM, Sogayar MC, Labriola L. Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Diabetologia* 2011;54:1388–97. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2102-z>.
- Thorel F, Népote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, et al. Conversion of Adult Pancreatic α -cells to β -cells After Extreme β -cell Loss. *Nature* 2010;464:1149–54. <https://doi.org/10.1038/nature08894>.
- Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* 2015;58:221–32. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3451-1>.
- Villaça C de BP, de Paula CC, de Oliveira CC, Vilas-Boas EA, dos Santos-Silva JC, de Oliveira SF, et al. Beneficial effects of physical exercise for β -cell maintenance in a type 1 diabetes mellitus animal model. *Exp Physiol* 2021;106:1482–97. <https://doi.org/10.1113/EP088872>.
- Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011;334:1081–6. <https://doi.org/10.1126/science.1209038>.
- Wang Z, York NW, Nichols CG, Remedi MS. Pancreatic β Cell Dedifferentiation in Diabetes and Redifferentiation following Insulin Therapy. *Cell Metab* 2014;19:872–82. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.010>.
- Watada H. Neurogenin 3 is a Key Transcription Factor for Differentiation of the Endocrine Pancreas. *Endocr J* 2004;51:255–64. <https://doi.org/10.1507/endocrj.51.255>.
- Watts M, Ha J, Kimchi O, Sherman A. Paracrine regulation of glucagon secretion: the $\beta/\alpha/\delta$ model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016;310:E597–611. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00415.2015>.

- Weir GC, Bonner-Weir S. Five Stages of Evolving Beta-Cell Dysfunction During Progression to Diabetes. *Diabetes* 2004;53:S16–21. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.S16.
- Wollheim CB, Sharp GW. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev* 1981;61:914–73. <https://doi.org/10.1152/physrev.1981.61.4.914>.
- Wong WPS, Tiano JP, Liu S, Hewitt SC, Le May C, Dalle S, et al. Extranuclear estrogen receptor-alpha stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:13057–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914501107>.
- Wysham C, Shubrook J. Beta-cell failure in type 2 diabetes: mechanisms, markers, and clinical implications. *Postgrad Med* 2020;132:676–86. <https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1771047>.
- Xin Y, Dominguez Gutierrez G, Okamoto H, Kim J, Lee A-H, Adler C, et al. Pseudotime Ordering of Single Human β -Cells Reveals States of Insulin Production and Unfolded Protein Response. *Diabetes* 2018;67:1783–94. <https://doi.org/10.2337/db18-0365>.
- Xu B, Allard C, Alvarez-Mercado AI, Fuselier T, Kim JH, Coons LA, et al. Estrogens Promote Misfolded Proinsulin Degradation to Protect Insulin Production and Delay Diabetes. *Cell Rep* 2018;24:181–96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.019>.