

**VIVIANE ROSA DE OLIVEIRA**

**Papel do HNF-4 $\alpha$  na resposta de NF- $\kappa$ B a citocinas pró-inflamatórias em células  
 $\beta$  pancreáticas**

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 Desenvolvimento  
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ortis

Versão corrigida

## RESUMO

OLIVEIRA, VR. Papel do HNF-4 $\alpha$  na resposta de NF- $\kappa$ B a citocinas pró-inflamatórias em células  $\beta$  pancreáticas [dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O DM1 é uma doença autoimune caracterizada pela disfunção e morte de células  $\beta$  pancreáticas produtoras de insulina. Essa destruição se dá através da ativação de vias pró-apoptóticas, como a do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e do estresse RE, por citocinas pró-inflamatórias. O MODY1 é um subtipo de DM caracterizado por uma mutação no gene HNF-4 $\alpha$ , que acarreta deficiência na secreção de insulina. Este fator de transcrição está envolvido na manutenção da homeostase do RE e em hepatócitos é ativado por citocinas e modula a resposta inflamatória. Além disso, sabe-se que em outros tipos celulares há um *crosstalk* entre HNF-4 $\alpha$  e ERK1/2, que em células  $\beta$  é um importante modulador da ativação pró-apoptótica de NF- $\kappa$ B por citocinas pró-inflamatórias. Assim, para um melhor entendimento da relação de HNF-4 $\alpha$  no contexto pró-inflamatório observado durante o desenvolvimento do DM1, este trabalho teve como objetivo avaliar se a ativação de HNF-4 $\alpha$  é modulada por citocinas pró-inflamatórias e se esse efeito pode estar relacionado com a ativação pró-apoptótica de ERK1/2 e NF- $\kappa$ B em células  $\beta$ . Para isso avaliamos em células INS-1E (insulinoma de rato) a ativação de HNF-4 $\alpha$  através de promotor repórter, bem como a ativação de ERK1/2 e NF- $\kappa$ B por western blotting, após exposição a citocinas pró-inflamatórias na presença e na ausência de HNF-4 $\alpha$ , que foi silenciado pelo uso de siRNA específico. Nossos resultados mostram que a ativação de HNF-4 $\alpha$  sofre modulação temporal por citocinas pró-inflamatórias em células  $\beta$  e que o silenciamento desse fator de transcrição parece prevenir a morte dessas células induzido por citocinas. Esse efeito do HNF-4 $\alpha$  nas células  $\beta$  pode estar relacionado com ERK1/2 e NF- $\kappa$ B, uma vez que a ativação desses fatores é modulada por HNF-4 $\alpha$ . Essas informações são de grande interesse para um melhor entendimento das vias relacionadas a morte e disfunção de células  $\beta$  no desenvolvimento do DM1.

**Palavras-chave:** Células  $\beta$ . HNF-4 $\alpha$ . NF- $\kappa$ B. ERK1/2. Citocinas pró-inflamatórias.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, VR. Role of HNF-4 $\alpha$  in the NF- $\kappa$ B response to pro-inflammatory cytokines in pancreatic  $\beta$  cells [dissertation (Master Thesis in Life Systems Biology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Type 1 Diabetes *mellitus* (T1D) is an autoimmune disease characterized by dysfunction and death of insulin-producing pancreatic  $\beta$  cells. This destruction occurs through pro-apoptotic pathways, such as the activation of NF- $\kappa$ B transcription factor and ER stress by pro-inflammatory cytokines. MODY1 is a subtype of DM characterized by a mutation in the HNF-4 $\alpha$  gene, which causes a deficiency in insulin secretion. This transcription factor is involved in the maintenance of ER homeostasis and in hepatocytes is activated by cytokines and modulates inflammatory responses. Furthermore, it is known that in other cell types there is a crosstalk between HNF-4 $\alpha$  and ERK1/2, which in  $\beta$  cells is an important modulator of the pro-apoptotic activation of NF- $\kappa$ B by pro-inflammatory cytokines. Thus, for a better understanding of the relationship of HNF-4 $\alpha$  in the pro-inflammatory context observed during the development of T1D, this study aimed to evaluate whether the activation of HNF-4 $\alpha$  is modulated by pro-inflammatory cytokines and whether this effect may be related to the pro-apoptotic activation of ERK1/2 and NF- $\kappa$ B in  $\beta$  cells. For this, we evaluated in INS-1E cells (rat insulinoma) the activation of HNF-4 $\alpha$  through a promoter reporter, as well as the activation of ERK1/2 and NF- $\kappa$ B by western blotting, after exposure to pro-inflammatory cytokines in the presence and in the absence of HNF-4 $\alpha$ , which was silenced by the use of specific siRNA. Our results show that HNF-4 $\alpha$  activation is temporally modulated by pro-inflammatory cytokines in  $\beta$  cells and that silencing of this transcription factor seems to prevent cytokine-induced  $\beta$  cell death. This effect of HNF-4 $\alpha$  on  $\beta$  cells may be related to ERK1/2 and NF- $\kappa$ B, since the activation of these factors is modulated by HNF-4 $\alpha$ . This information is of great interest for a better understanding of the pathways related to  $\beta$  cell death and dysfunction in the development of T1D.

**Keywords:**  $\beta$  cells. HNF-4 $\alpha$ . NF- $\kappa$ B. ERK1/2. Pro-inflammatory cytokines.

# 1. INTRODUÇÃO

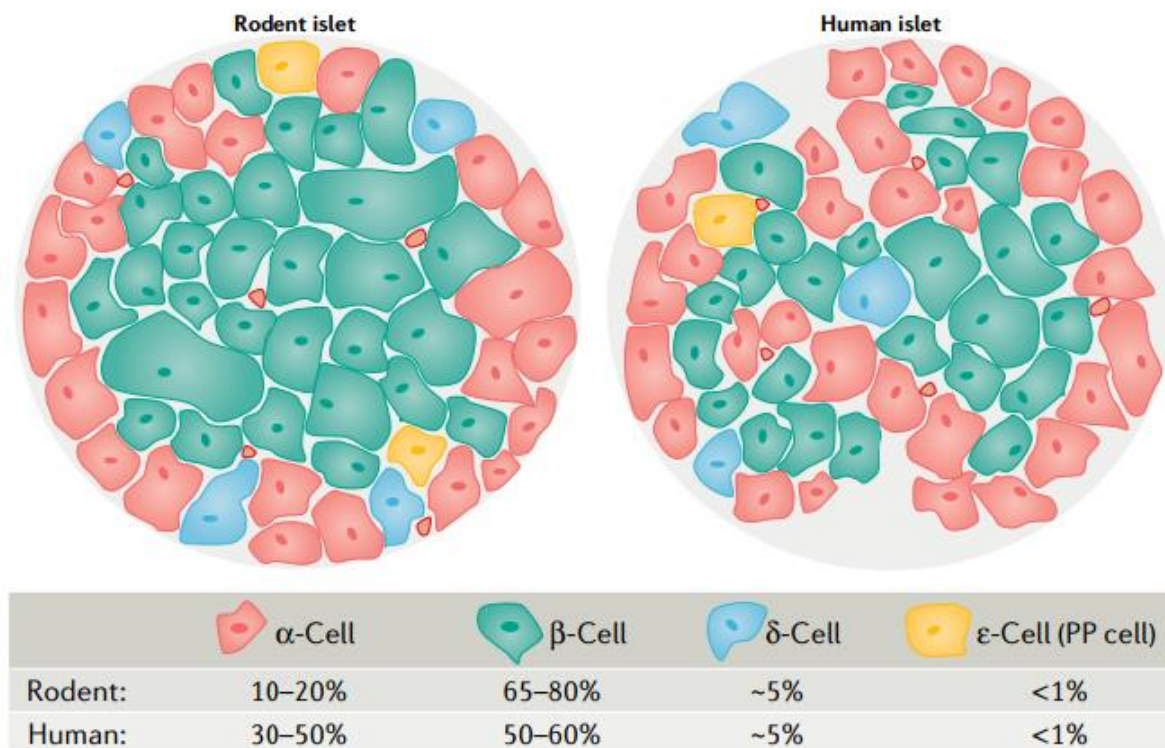
## 1.1 Pâncreas

O pâncreas é uma glândula mista localizada na região retroperitoneal do estômago, se estendendo através da parede abdominal posterior do duodeno até o baço, medindo cerca de 12-15 centímetros de comprimento em adultos. Embora não possua subdivisões anatômicas bem definidas, os vasos adjacentes e os ligamentos servem para definir o órgão em cabeça, pescoço, corpo e cauda (Al 2008; Axis 2010; Leung 2010; Curi 2012; Richard L. Drake 2015).

É considerado uma glândula mista por ser composta por duas porções distintas, a porção exócrina e a porção endócrina. A porção exócrina representa a maior parte do volume total do pâncreas e é formada por células secretoras agrupadas em ácinos serosos importantes para a digestão de carboidratos, lipídeos e proteínas (Slack 1995; Axis 2010; Leung 2010; Mastracci and Sussel 2012).

A porção endócrina, por sua vez, representa a menor parte do volume total do pâncreas (aproximadamente 2%) e é formada por diferentes células que se organizam em cordões celulares que se entrelaçam com vasos sanguíneos, formando as ilhotas de Langerhans. As ilhotas são compostas por diferentes tipos de células, sendo essas, células  $\beta$  (~50-70% do número total de células da ilhota) responsáveis pela produção de insulina, células  $\alpha$  (~20-40% do número total de células da ilhota) responsáveis pela produção de glucagon, células  $\delta$  (~10% do número total de células da ilhota) responsáveis pela produção de somatostatina, células PP (~10% do número total de células da ilhota) responsáveis pela produção de polipeptídeo pancreático e células  $\epsilon$  (~1% do número total de células da ilhota) responsáveis pela produção de grelina. Essas células atuam na manutenção da homeostasia glicêmica (Orci and Unger 1975; Slack 1995; Kim et al. 2009; Axis 2010; Leung 2010; Curi 2012; Mastracci and Sussel 2012; Dolenšek et al. 2015).

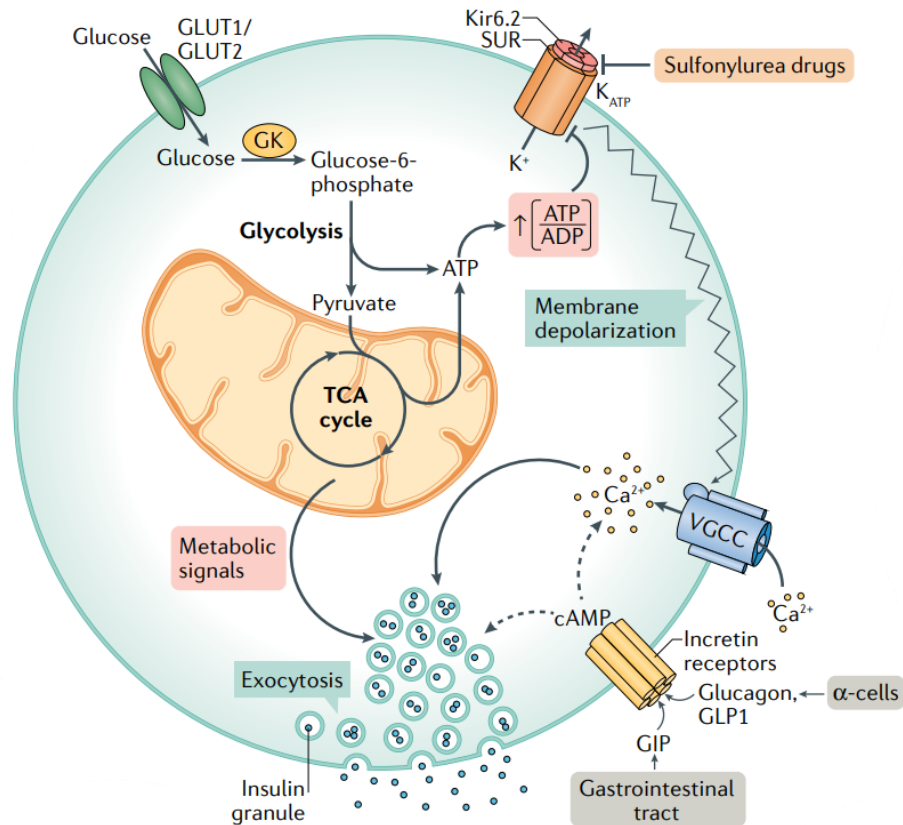
A maneira como essas células se organizam dentro das ilhotas é diferente entre cada espécie. Por exemplo, em primatas, células  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\delta$  se encontram distribuídas por toda a ilhota, enquanto em roedores as células  $\beta$  são encontradas no centro e as células  $\alpha$  e  $\delta$  na periferia das ilhotas (Figura 1) e isso pode estar relacionado à ontogênese do tecido pancreático nessas diferentes espécies (Orci and Unger 1975; Wieczorek et al. 1998; Brissova et al. 2005; Cabrera et al. 2006; Kim et al. 2009; Mastracci and Sussel 2012; Dolenšek et al. 2015; Midhat H. Abdulreda et al. 2016; Campbell and Newgard 2021).



**Figura 1: Arquitetura da ilhota pancreática em diferentes espécies.** Ilhotas de roedores (*rodent islet*) são compostas de 10-20% de células  $\alpha$ , predominante na periferia da ilhota, e 65-80% de células  $\beta$  predominante no centro da ilhota. As células  $\delta$ , as células (PP) e as células  $\epsilon$  se encontram espalhadas por toda a ilhota. As ilhotas humanas (*human islet*) possuem uma porcentagem maior de células  $\alpha$ , encontradas em toda ilhota, e uma porcentagem menor de células  $\beta$  do que os roedores. Fonte: Campbell and Newgard, 2021 (Campbell and Newgard 2021).

A insulina, produzida pelas células  $\beta$ , é o único hormônio hipoglicemiante do organismo, e seu processo de secreção é fortemente induzido por um aumento pós-prandial na concentração plasmática de glicose, definido como GSIS (*glucose-stimulated insulin secretion*) (Campbell and Newgard 2021). Na GSIS o influxo de glicose nas células  $\beta$ , mediado pelo transportador GLUT1 (humanos) ou GLUT2 (roedores) (De Vos et al.; McCulloch et al. 2011), induz o processo de metabolização da glicose para geração de ATP. O conseqüente aumento da relação ATP/ADP induz o fechamento de canais de  $K_{ATP}$  (canais de potássio dependentes de ATP), presentes na membrana plasmática levando à sua despolarização e conseqüente abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem, resultando em um influxo de  $Ca^{2+}$ , que ativa a exocitose de grânulos de secreção de insulina (Figura 2) (Gerber and Sü; Westerlund and Bergsten 2001; Boron and Boulpaep 2012; Curi 2012; Rorsman and Braun 2013; Campbell and Newgard 2021). Outros fatores podem estimular a secreção de insulina, como por exemplo, alguns aminoácidos (leucina e arginina),

ácidos graxos e cetoácidos ( $\alpha$ -cetoisocaproato), entretanto, sabe-se que a glicose é o melhor secretagogo para insulina (Boron and Boulpaep 2012).



**Figura 2: Via de sinalização da GSIS.** A captação de glicose nas células  $\beta$  ocorre via transportadores GLUT1 (humano) ou GLUT2 (roedores); A captação de glicose não é limitante da taxa de GSIS, mas a taxa de metabolismo da glicose nas células  $\beta$  é controlada pela glucoquinase (GK), que determina a entrada da glicose na via glicolítica, seguida de sua oxidação através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e subsequente geração de ATP. O metabolismo da glicose inicia a via de desencadeamento da GSIS através de uma elevação na razão ATP/ADP, resultando no fechamento da despolarização da membrana dos canais  $K_{ATP}$  e subsequente abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCC). O aumento resultante no cálcio intracelular conduz a fase de desencadeamento da exocitose dos grânulos de insulina. Fonte: Campbell and Newgard, 2021 (Campbell and Newgard 2021).

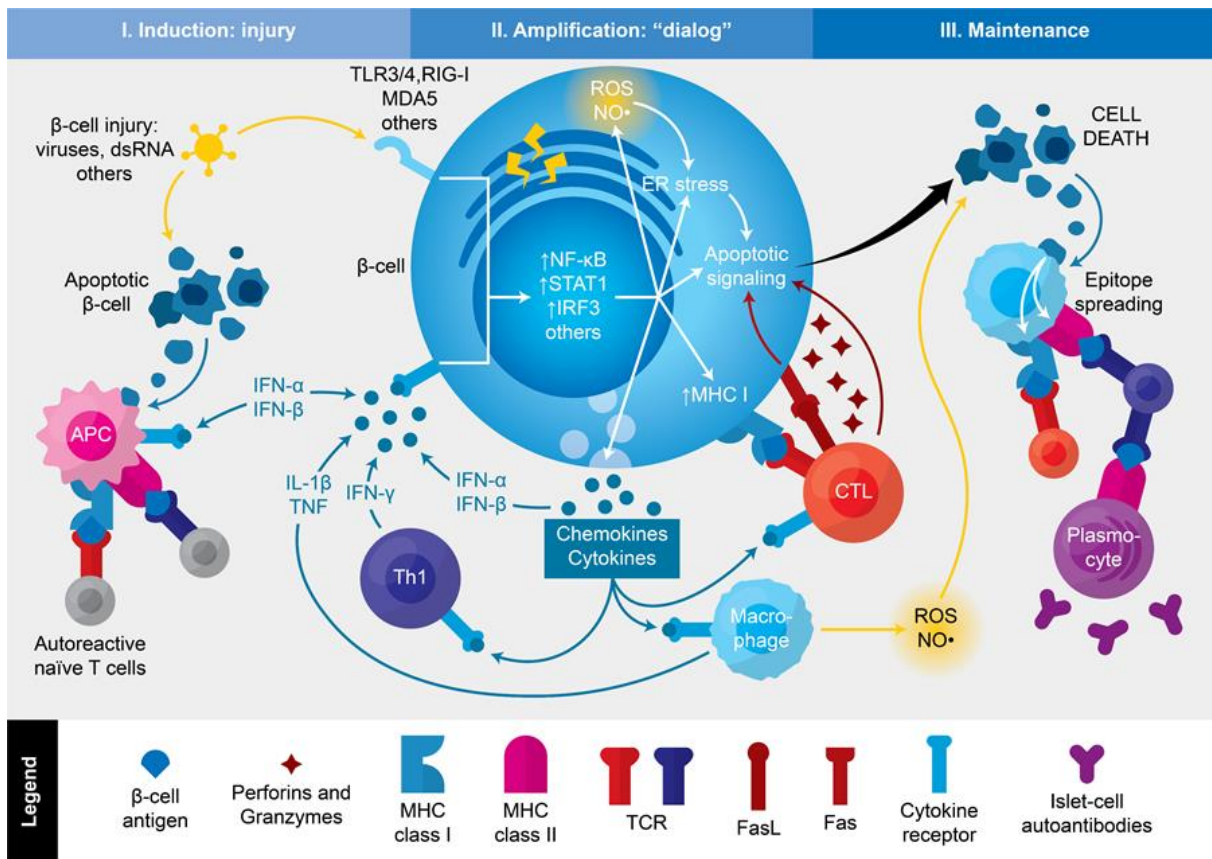
## 1.2 Diabetes mellitus

O DM é uma doença metabólica causada por defeitos na produção da insulina (o hormônio hipoglicemiante), associado ou não a resistência à insulina. Os indivíduos afetados apresentam um quadro de hiperglicemia crônica e disfunção do metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos (Sacks et al. 2011; Mastracci and Sussel 2012). Sabe-se que o DM tem sido um problema de saúde crescente no mundo, estima-se que em 2045 haverá mais de 700 milhões de pessoas vivendo com DM (Narayan et al. 2006; Atlas 2019). A hiperglicemia

crônica está associada a inúmeros danos, disfunções e falhas em diferentes órgãos, entre eles, rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos (Of and Mellitus 2014). Existem diferentes tipos de DM, que diferem principalmente em sua etiologia e forma de tratamento. Entre os tipos mais comuns, encontra-se o Diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) e o Diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2).

O DM1 corresponde a cerca de 10-15% do número total de casos de DM (Daneman 2006; Of and Mellitus 2014), acometendo principalmente crianças, mas podendo ocorrer também em qualquer idade (Daneman 2006; Jahromi and Eisenbarth 2007; Of and Mellitus 2014). Globalmente, tanto a incidência quanto a prevalência de DM1 aumenta cerca de 2-3% ao ano (Maahs et al. 2010; Mayer-Davis et al. 2017) e grande parte desse aumento é observado em crianças menores de 15 anos, particularmente em menores de 5 anos (Chobot et al. 2017).

É uma doença autoimune caracterizada por uma destruição específica às células  $\beta$  pancreáticas induzindo disfunção e destruição dessas células por apoptose (Daneman 2006; Eizirik et al. 2009; Insel et al. 2015; De Beeck and Eizirik 2016; DiMeglio et al. 2018). Essa destruição autoimune se inicia por um processo que leva a uma inflamação nas ilhotas pancreáticas, conhecida como, insulite. O estabelecimento deste processo pode ser dividido em três partes: indução, amplificação e manutenção. Na indução, injúrias contra as células  $\beta$ , como por exemplo infecções virais, que levem à sua morte, liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  e TNF e superexpressão de MHC de classe I promovem o recrutamento e ativação de células apresentadoras de antígeno e células T reativas. Na amplificação, essas células induzem a morte da célula  $\beta$  por meio da liberação de citocinas e produção de óxido nítrico, os quais induzem a ativação de fatores de transcrição que desencadeiam vias apoptóticas, como estresse de retículo endoplasmático (RE). Na manutenção, a apoptose e fagocitose das células  $\beta$  aumentam a apresentação de antígenos modificados às células T, mantendo a inflamação (Figura 3) (Kim and Polychronakos 2005; Pirot et al. 2008; Eizirik et al. 2009).

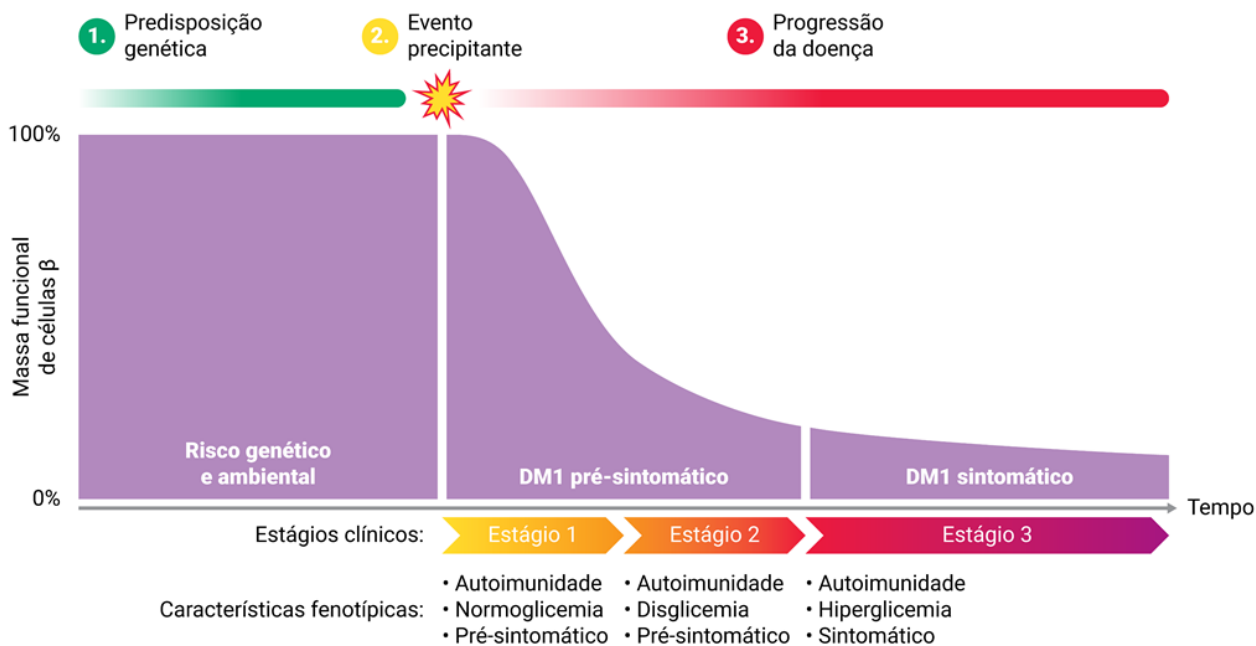


**Figura 3: Processo de insulite na morte de células β.** A indução da insulite é causada por injúrias contra células β, que leva ao recrutamento e ativação de APC e linfócitos T autoreativos. Na amplificação, estes leucócitos causam a morte de células β por quatro mecanismos: a) liberação de citocinas pró-inflamatórias, que nas células β leva à produção de mais citocinas, apresentação de MHC I modificados, indução de estresse de RE e de vias de morte celular; b) liberação de espécies reativas por macrófagos; c) liberação de perforina e granzimas por linfócitos T citotóxicos (CTL); e d) ligação das moléculas Fas-FasL em células β e CTL, respectivamente. Na fase de manutenção, a apoptose das células β e sua fagocitose aumentam a apresentação de autoantígenos modificados aos linfócitos T e o espalhamento de epítipo, com manutenção da inflamação. Fonte: ilustrado por Almeida DC (Pirot et al. 2008; Eizirik et al. 2009).

A etiologia do DM1 é multifatorial e por observação em modelos animais foi proposto que sua progressão, até a instauração da hiperglicemia deve seguir três estágios, sendo eles, 1-predisposição genética, 2-evento precipitante e 3-progressão da doença (Figura 4) (Eisenbarth 1986; Jahromi and Eisenbarth 2007; Atkinson et al. 2014; Insel et al. 2015; De Beeck and Eizirik 2016; DiMeglio et al. 2018). Indivíduos que possuem pré-disposição genética para desenvolver DM1 ao sofrer um evento precipitante ou “gatilho”, que pode estar relacionado a fatores ambientais, como por exemplo infecções virais, principalmente infecções por enterovírus (Pirot et al. 2008; Eizirik et al. 2009; Pugliese et al. 2014; De Beeck and Eizirik 2016; DiMeglio et al. 2018; Atkinson et al. 2020), podem ter um ataque autoimune iniciado em suas ilhotas pancreáticas. A partir do evento precipitante, ocorre o estágio pré-sintomático



do DM1, apresentando autoimunidade, mas normoglicemia. Ao longo da progressão da doença, a presença de autoimunidade é acompanhada de hiperglicemia e ao aparecer os sintomas de DM1 grande parte da massa funcional de células  $\beta$  é diminuída (Eisenbarth 1986; Jahromi and Eisenbarth 2007; Insel et al. 2015).



**Figura 4: Estágios de evolução do DM1.** O gráfico indica a massa funcional de células  $\beta$  durante o desenvolvimento do DM1 ao longo do tempo. A predisposição genética é o primeiro evento necessário para o desenvolvimento de DM1. O evento precipitante se manifesta como uma injúria às células  $\beta$  que ativa a autoimunidade, conseqüentemente dando início à progressão clínica da doença. No primeiro estágio apresenta-se autoimunidade, normoglicemia e pré-sintomático. No segundo estágio apresenta-se autoimunidade, disglicemia e é assintomático. No terceiro estágio apresenta-se hiperglicemia e os sintomas de DM. Fonte: ilustrado por Almeida DC (Atkinson et al. 2014; Insel et al. 2015).

Atualmente, a terapia para o controle dos níveis glicêmicos de pacientes com DM1 é a administração de doses diárias de insulina exógena, dieta e exercício físico. O tratamento com transplante de ilhotas de doadores cadavéricos também tem sido utilizado como uma ferramenta terapêutica com relativo sucesso, porém há ainda perda gradual da função das ilhotas (Shapiro et al. 2000, 2006). Esses resultados mostram que ainda temos que entender melhor as vias de sinalização que regulam os processos de morte da célula  $\beta$  num ambiente pró-inflamatório, de forma a modular essas vias para fins terapêuticos.

### 1.3 O fator de transcrição NF- $\kappa$ B na morte de células $\beta$

O fator de transcrição NF- $\kappa$ B regula importantes vias celulares, incluindo vias de sobrevivência celular (Luo et al. 2005), porém, quando ativado por citocinas pró-inflamatórias em células  $\beta$ , apresenta um caráter pró-apoptótico (Cnop et al. 2005; Eldor et al. 2006; Ortis et al. 2006, 2008, 2010; Eizirik et al. 2009, 2012, 2020; Meyerovich et al. 2016). Nesse contexto, NF- $\kappa$ B ativa a expressão de uma série de genes envolvidos na morte da célula  $\beta$  (Cnop et al. 2005; Eizirik et al. 2009).

Nosso grupo mostrou que essa ativação pró-apoptótica de NF- $\kappa$ B em células  $\beta$  apresenta características relacionadas a uma ativação diferenciada de quinases que regulam suas atividades transcricionais. Deste modo, existe uma regulação diferencial do complexo quinásico IKK (Ortis et al. 2012) e da ERK1/2 (Larsen et al. 2005; Ortis et al. 2012).

Entre as vias pró-apoptóticas reguladas por NF- $\kappa$ B, está a ativação do estresse de RE (Meyerovich et al. 2016). A manutenção da homeostase do RE tem papel importantíssimo na função da célula  $\beta$ . Em células  $\beta$ , a exposição a citocinas pró-inflamatórias leva a uma diminuição da atividade da bomba de cálcio do RE (SERCA2b), pelo aumento da produção de NO, induzido por NF- $\kappa$ B (Cardozo et al. 2005). Isso faz com que haja uma diminuição na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no RE, acarretando no acúmulo de proteínas mal-enoveladas no interior dessa organela, levando à ativação de uma resposta celular conhecida como *Unfolded Protein Response* (UPR) (Cardozo et al. 2005; Eizirik et al. 2009; Meyerovich et al. 2016). A UPR é um importante mecanismo para recuperação da homeostase do RE e da função celular através do aumento da capacidade de dobrar proteínas no RE e da diminuição da produção de proteínas em geral (Eizirik et al. 2009; Osowski and Urano 2011; Hara et al. 2014; Meyerovich et al. 2016). Quando a homeostasia do RE não é recuperada, por insultos muito fortes e contínuos, a estimulação da UPR pode levar à ativação de vias pró-apoptóticas e morte da célula. No caso de células  $\beta$ , que são células com alta função secretória e assim, apresentam um RE com muita atividade sintética, elas são células sensíveis ao estresse de RE. A ativação do estresse de RE por citocinas leva à indução de vias pró-apoptóticas e contribui para sua morte nessas condições, sendo uma causa para a perda de células  $\beta$  observada no DM1 (Cardozo et al. 2001; Mandrup-Poulsen 2001; Størling et al. 2005; Meyerovich et al. 2016, 2018).

#### 1.4 Ativação de ERK1/2 em células $\beta$

A quinase regulada por sinal extracelular (ERK)1/2 é um membro da família de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que são quinases do tipo serina/treonina. Essas enzimas são ubíquas e apresentam muitos substratos, participando de inúmeras vias de transdução de sinal, incluindo proliferação, diferenciação e morte celular (Yoon and Seger 2006; Lawrence et al. 2008; Cargnello and Roux 2011).

A ativação de ERK1/2 geralmente ocorre via fatores de crescimento (Hill and Treisman 1995; Whitmarsh et al. 1995) e em menor grau pelo estresse celular, uma vez que IL-1 $\beta$  mostrou ter um papel importante na ativação dessa quinase em alguns tipos celulares (Saklatvala et al. 1996; Singh et al. 1996). Além disso, ERK1/2 é ativado pela glicose de maneira dependente de Ca<sup>2+</sup> em células  $\beta$  e regula fatores de transcrição importantes para expressão do gene da insulina e sobrevivência dessas células (Briaud et al. 2003; Lawrence et al. 2008).

Além disso, a ativação de ERK1/2 parece mediar a resposta de células  $\beta$  aos hormônios da gravidez (Amaral et al. 2003, 2004). Camundongos prenhas *knockout* para HNF-4 $\alpha$ , não foram capazes de aumentar a proliferação de suas células  $\beta$ , evento comum durante a prenhez em resposta a um aumento de resistência periférica à insulina. Este efeito foi relacionado a uma redução na ativação da via de sinalização de Ras/ERK, importante para essa resposta adaptativa na prenhez (Gupta et al. 2007).

Apesar de ter esse importante papel na manutenção da viabilidade de células  $\beta$ , a ativação de ERK1/2 por citocinas ou em um ambiente pró-inflamatório, como o da ilhota durante a insulite (Eizirik et al. 2009; Figura 2), pode colaborar para a disfunção e morte dessas células. A exposição de ilhotas ou células  $\beta$  a IL-1 $\beta$  leva a uma rápida ativação de ERK1/2, o que é importante para uma indução mais rápida e com caráter pró-apoptótico de NF- $\kappa$ B (Ortis et al. 2006), e um aumento da produção de NO (Larsen et al. 1998; Ortis et al. 2006; Kim et al. 2014).

#### 1.5 MODY

O MODY (do inglês “*Maturity-Onset Diabetes of the Young*”) é um subtipo monogênico de DM caracterizado por herança autossômica dominante com início em idade precoce - sendo frequentemente diagnosticado na infância ou adolescência - causado por um defeito primário da função de células  $\beta$  na GSIS (Fajans; Tattersall 1974; Fajans and Bell

2011; Of and Mellitus 2014). O MODY foi descrito inicialmente em 1974 como uma forma de Diabetes familiar leve com herança dominante (Tattersall 1974). Naquela época pouco se sabia sobre a genética e a patogênese da doença e isso gerou diagnósticos incorretos. Um estudo realizado em população infantil mostrou que 36% e 51% desses pacientes foram diagnosticados com DM1 e DM2, respectivamente, quando na realidade tinham MODY (Pihoker et al. 2013).

Atualmente, o MODY é caracterizado como um tipo de DM estabelecido em indivíduos com menos de 25 anos com presença de diabetes em duas gerações consecutivas, ausência de autoimunidade de células  $\beta$  e secreção de insulina endógena sustentada. Apesar de indivíduos com MODY terem um defeito primário na GSIS, não há perda da massa de células  $\beta$ , como ocorre em DM1 (Ellard et al. 2008). É uma doença com pouca incidência, representando cerca de 1-5% de todos os casos de DM (Thanabalasingham et al. 2012; Kim 2015).

O desenvolvimento do MODY está relacionado a mutações em 14 genes diferentes resultando nos subtipos MODY1-14 que codificam fatores importantes para função de células  $\beta$  (Vionnet et al. 1992; Yamagata et al. 1996; Group 1997; Kavvoura and Owen 2012; Thanabalasingham et al. 2012; Yamagata 2014; Kim 2015; Ore 2018). O subtipo MODY1 está relacionado a uma mutação no gene que codifica para o fator de transcrição HNF-4 $\alpha$ . Mutações nesse gene não são tão comuns, visto que o MODY1 representa de 5-10% de todos os casos de MODY. Esse tipo de MODY se manifesta através de uma lenta e progressiva deficiência na produção de insulina em longo prazo (Yamagata 2014) e isso ocorre devido ao importante papel de HNF-4 $\alpha$  na sobrevivência e função das células  $\beta$ .

### 1.6 *Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha*

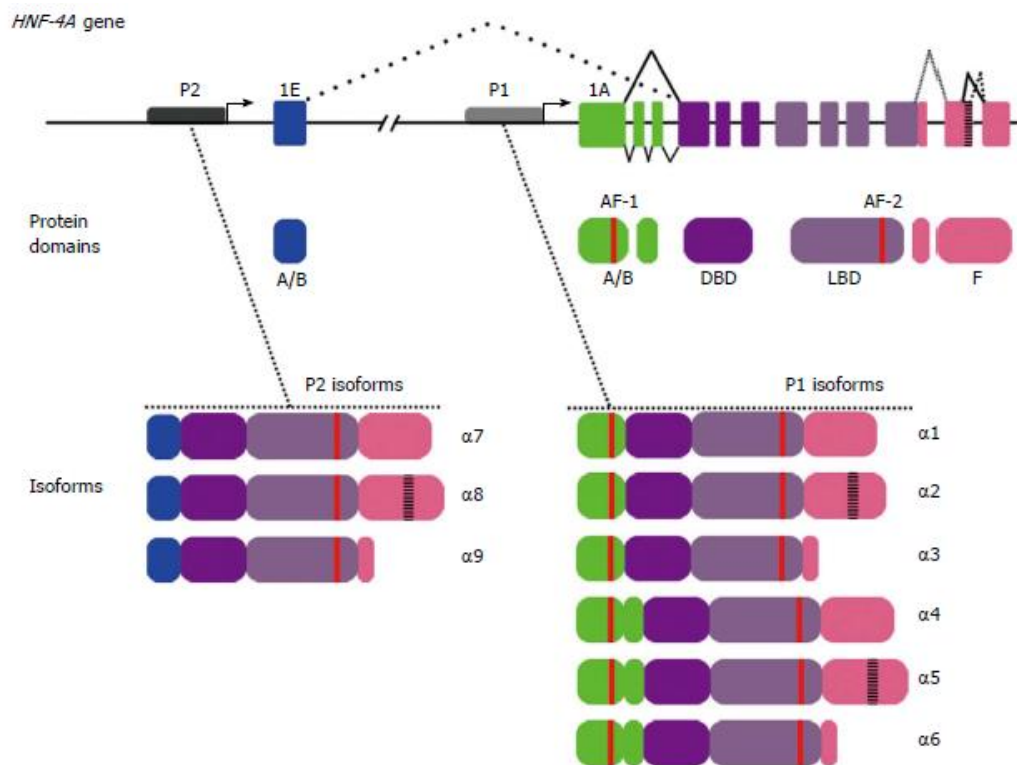
O HNF-4 $\alpha$  é um membro altamente conservado da superfamília de receptores nucleares (NR2A1). É um fator de transcrição altamente expresso no fígado, estando associado à regulação da transcrição de genes de hepatócitos relacionados ao metabolismo lipídico e da glicose, diferenciação e morfogênese. É também expresso nos rins, intestino e pâncreas (Sladek et al. 1990; Hayhurst et al. 2001; Babeu and Boudreau 2014). Além disso, o HNF-4 $\alpha$  parece ter um papel fundamental durante o desenvolvimento, visto que animais *knockout* para HNF-4 $\alpha$  são inviáveis desde a vida embrionária. Esses animais não se desenvolvem por conta de atrasos e interrupções da gastrulação, desencadeando morte nas células da ectoderme embrionária no período de iniciação da formação da endoderme (Chen

et al. 1994).

Em humanos, o HNF-4 $\alpha$  é codificado por um gene localizado no braço longo do cromossomo 20 (Aristidis A. Kritis 1996), a expressão desse gene é transcricionalmente regulada através da utilização de dois promotores, conhecidos como P1 e P2, os quais são separados por mais de 45kb (Thomas et al. 2001). Existem seis isoformas reguladas (ou transcritas) pela atividade P1, ( $\alpha$ 1 a  $\alpha$ 6), resultantes de *splicing* alternativo. O promotor P2, por sua vez, regula a expressão de outras três isoformas ( $\alpha$ 7 a  $\alpha$ 9) também obtidas por *splicing* alternativo (Aristidis A. Kritis 1996; Drewes et al. 1996; Furuta et al. 1997; Nakhei et al. 1998; Thomas et al. 2001; Hansen et al. 2002; Shuying Jiang, Toshiya Tanaka, Hiroko Iwanari et al. 2003; Oshima et al. 2007).

Diversos domínios funcionais compõem a estrutura das isoformas, entre eles, um domínio localizado na porção N-terminal conhecido como *Activating/binding domain* (A/B); o *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). Os transcritos regulados pelo promotor P2, o qual está presente na célula  $\beta$ , são menores na porção N-terminal, onde se encontra o domínio de interação AF-1, dessa forma sua atividade de transativação é mais fraca em relação aos transcritos regulados pelo promotor P1 (Figura 5) (Miura et al. 2006; Sato et al. 2012; Babeu and Boudreau 2014; Lu 2016).

O efeito na disfunção da célula no MODY1 é devido, principalmente, ao HNF-4 $\alpha$  regular a expressão de Kir6.2, uma subunidade do K<sub>ATP</sub> (Sladek et al. 1990; Odom et al. 2004; Gupta et al. 2005). O Kir6.2 tem um importante papel na homeostase da glicose, visto que mutações desse gene induzem uma disfunção ou perda da função do canal de K<sub>ATP</sub>, levando a níveis basais elevados de cálcio (Miki et al. 1997, 1998; Koster et al. 2002). Esse importante efeito na célula  $\beta$  também foi comprovado ao se avaliar um modelo animal *knockout* para HNF-4 $\alpha$  específico em células  $\beta$  (induzido após nascimento), que apresentou deficiência na GSIS (Miura et al. 2006).



**Figura 5: Estrutura e diferentes isoformas do HNF-4 $\alpha$ .** O HNF-4 $\alpha$  possui dois promotores (P1 e P2) os quais direcionam nove isoformas ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 9) através de splicing alternativo. Essas isoformas são compostas por diferentes domínios, entre eles: 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 (atividade regulatória negativa). Fonte: Babeu and Boudreau 2014 (Babeu and Boudreau 2014).

Além disso, o HNF-4 $\alpha$  tem um importante papel no controle da homeostase do RE, uma vez que coordena a expressão de proteínas como a *X-box Binding Protein- 1* (XBP1), que estabiliza e mantém a maquinaria de síntese celular no RE (Moore et al. 2016). Essa significativa função na homeostase do RE juntamente com a regulação de genes que codificam proteínas importantes na secreção de insulina, faz com o HNF-4 $\alpha$  seja imprescindível para a função das células  $\beta$  e conseqüentemente para manutenção da glicemia e metabolismo de glicose normais no organismo.

## 2. CONCLUSÃO

Concluimos que a ativação e a expressão do fator de transcrição HNF-4 $\alpha$  é modulado temporalmente por citocinas pró-inflamatórias em células  $\beta$  e que o seu silenciamento parece prevenir a morte dessas células induzida por citocinas. Além disso, a expressão de ERK1/2 fosforilada é inibida por HNF-4 $\alpha$ , uma vez que seu silenciamento aumentou a expressão da p-ERK1/2 induzida por citocinas. A via de ativação do NF- $\kappa$ B também é modulada pelo HNF-4 $\alpha$ . A ativação de NF- $\kappa$ B está relacionada à ativação de vias pró-apoptóticas na célula  $\beta$ , que ativam diferentes vias que contribuem para a morte das células  $\beta$ , como o estresse de RE. Até o momento, não mostramos que os efeitos observados pelo silenciamento de HNF-4 $\alpha$  estão envolvidos com o estresse de RE, com o marcador e tempo avaliados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al SS et. Pancreas [Internet]. Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice - Fortieth Edition. 2008. Available from: [http://www.crossref.org/deleted\\_DOI.html](http://www.crossref.org/deleted_DOI.html)
- Amaral MEC, Cunha DA, Anê GF, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, et al. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J Endocrinol.* 2004;183(3):469–76.
- Amaral MEC, Ueno M, Carvalheira JB, Carneiro EM, Velloso LA, Saad MJA, et al. Prolactin-signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway. *Horm Metab Res.* 2003;35(5):282–9.
- Aristidis A. Kritis. Isolation and characterization of a third isoform of human hepatocyte nuclear factor 4. *Gene.* 1996;275–80.
- Atkinson MA, Campbell-Thompson M, Kusmartseva I, Kaestner KH. Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. Vol. 63, *Diabetologia.* Springer; 2020. p. 1966–73.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet* [Internet]. 2014;383(9911):69–82. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
- Atlas IDFD. Atlas, I. D. F. 2019.
- Axis EE. Physiology of the pancreas. *Adv Exp Med Biol.* 2010;690:13–27.
- Babeu JP, Boudreau F. Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. *World J Gastroenterol.* 2014;20(1):22–30.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF-B: Ten Years After Meeting Review. Vol. 87, *Cell.* 1996.
- Baldwin AS. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649–81.
- Bartoov-Shifman R, Hertz R, Wang H, Wollheim CB, Bar-Tana J, Walker MD. Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ . *J Biol Chem* [Internet]. 2002;277(29):25914–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M201582200>
- De Beeck AO, Eizirik DL. Viral infections in type 1 diabetes mellitus-why the  $\beta$  cells? Vol. 12, *Nature Reviews Endocrinology.* Nature Publishing Group; 2016. p. 263–73.
- Boisvert FM, Ahmad Y, Gierliński M, Charrière F, Lamont D, Scott M, et al. A quantitative spatial proteomics analysis of proteome turnover in human cells. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Mar;11(3).



- Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology*. News.Ge. 2012.
- Briaud I, Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, Rhodes CJ, Pka H, et al. p70 S6K by Glucose in Pancreatic  $\beta$ -Cells. 2003;52(April).
- Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*. 2005 Sep;53(9):1087–97.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2334–9.
- Campbell JE, Newgard CB. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. Vol. 22, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research; 2021. p. 142–58.
- Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y, Leeman R, Kutlu B, Kruhøffer M, et al. A Comprehensive Analysis of Cytokine-induced and Nuclear Factor- $\kappa$ B-dependent Genes in Primary Rat Pancreatic  $\beta$ -Cells. *J Biol Chem*. 2001;276(52):48879–86.
- Cardozo AK, Ortis F, Storling J, Feng YM, Rasschaert J, Tonnesen M, 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-Cells. 2005.
- Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011 Mar;75(1):50–83.
- Chen WS, Manova K, Weinstein DC, Duncan SA, Plump AS, Prezioso VR, 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. 1994;2466–77.
- Chobot A, Polanska J, Brandt A, Deja G, Glowinska-Olszewska B, Pilecki O, et al. Updated 24-year trend of Type 1 diabetes incidence in children in Poland reveals a sinusoidal pattern and sustained increase. *Diabet Med*. 2017;34(9):1252–8.
- Cnop M, Toivonen S, Igoillo-Esteve M, Salpea P. Endoplasmic reticulum stress and eIF2 $\alpha$  phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic  $\beta$  cells. Vol. 6, *Molecular Metabolism*. Elsevier GmbH; 2017. p. 1024–39.
- Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jö A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of Pancreatic-Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes Many Differences, Few Similarities [Internet]. 2005. Available from: [http://t1dbase.org/cgi-bin/enter\\_](http://t1dbase.org/cgi-bin/enter_)

- Curi R. *Fisiologia básica*. Vol. 66, 2012. עלון הברטע.
- Daneman D. Type 1 Diabetes. *Lancet*. 2006;367.9513:847–58.
- Darsigny M, Babeu JP, Dupuis AA, Furth EE, Seidman EG, Lévy É, et al. Loss of hepatocyte-nuclear-factor-4 $\alpha$  affects colonic ion transport and causes chronic inflammation resembling inflammatory bowel disease in mice. *PLoS One*. 2009 Oct 29;4(10).
- DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet* [Internet]. 2018;391(10138):2449–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
- Dolenšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. Vol. 7, *Islets*. Taylor and Francis Inc.; 2015.
- Drewes T, Senkel S, Holewa B, Ryffel GU. Human Hepatocyte Nuclear Factor 4 Isoforms Are Encoded by Distinct and Differentially Expressed Genes. 1996;16(3):925–31.
- Eisenbarth GS. Type I Diabetes Mellitus. *New Engl J Med*. 1986;314(3):1360–8.
- Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and B-cell loss in type 1 diabetes. Vol. 5, *Nature Reviews Endocrinology*. 2009. p. 219–26.
- Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic  $\beta$ -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. Vol. 16, *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Research; 2020. p. 349–62.
- Eizirik DL, Sammeth M, Bouckenooghe T, Bottu G, Sisino G, Igoillo-Esteve M, et al. The human pancreatic islet transcriptome: Expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. *PLoS Genet*. 2012 Mar;8(3).
- Eldor R, Yeffet A, Baum K, Doviner V, Amar D, Ben-Neriah Y, et al. Conditional and specific NF- $\kappa$ B blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(13):5072–7.
- Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT, Carette C, Castano Gonzalez L, De Nanclares Leal G, et al. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia*. 2008;51(4):546–53.
- Fajans SS. Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)\*.
- Fajans SS, Bell GI. MODY: History, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care*. 2011;34(8):1878–84.
- Furuta H, Iwasaki N, Oda N, Hinokio Y, Horikawa Y, Yamagata K. Organization and Partial Sequence of the Hepatocyte Nuclear Factor-4a/MODY1 Gene and Identification of a Missense Mutation, R127W, in a Japanese Family With MODY. 1997;46(October).

- Gerber SH, Sü TC. Section 1: Insulin Release: Some Molecular Requisites Molecular Determinants of Regulated Exocytosis [Internet]. Available from: [http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/51/suppl\\_1/S3/372528/db02t20000s3.pdf](http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/51/suppl_1/S3/372528/db02t20000s3.pdf)
- Group NP. Early-onset type- II diabetes mellitus. 1997;17(october):138–9.
- Guo H, Gao C, Mi Z, Wai PY, Kuo PC. Phosphorylation of Ser158 regulates inflammatory redox-dependent hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  transcriptional activity. *Biochem J*. 2006 Mar 1;394(2):379–87.
- Guo H, Wei J, Inoue Y, Gonzalez FJ, Kuo PC. Serine/threonine phosphorylation regulates HNF-4-dependent redox-mediated iNOS expression in hepatocytes Serine/threonine phosphorylation regulates HNF-4-dependent redox-mediated iNOS expression in hepatocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2003;284:1090–9. Available from: [www.ajpcell.org](http://www.ajpcell.org)
- Gupta RK, Gao N, Gorski RK, White P, Hardy OT, Rafiq K, et al. Expansion of adult  $\beta$ -cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4 $\alpha$ . *Genes Dev*. 2007;21(7):756–69.
- Gupta RK, Vatamaniuk MZ, Lee CS, Flaschen RC, Fulmer JT, Matschinsky FM, et al. The MODY1 gene HNF4 $\alpha$  regulates selected.pdf. 2005;115(4):1006–15.
- Hansen SK, Ferrer J, Hansen T, Hansen SK, Párrizas M, Jensen ML, et al. Genetic evidence that HNF-1  $\alpha$  – dependent transcriptional control of HNF-4  $\alpha$  is essential for human pancreatic  $\beta$  cell function Find the latest version : Genetic evidence that HNF-1  $\alpha$  – dependent transcriptional control of HNF-4  $\alpha$  is essential for human pa. 2002;110(6):827–33.
- Hara T, Mahadevan J, Kanekura K, Hara M, Lu S, Urano F. Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to  $\beta$ -cell death. *Endocrinology*. 2014 Mar;155(3):758–68.
- Hayhurst GP, Lee Y hue, Lambert G, Ward JM. Hepatocyte Nuclear Factor 4  $\alpha$  ( Nuclear Receptor 2A1 ) Is Essential for Maintenance of Hepatic Gene Expression and Lipid Homeostasis. 2001;21(4):1393–403.
- Hill CS, Treisman R. Transcriptional Regulation by Extracellular Signals: Mechanisms and Specificity. Vol. 80, *Cell*. 1995.
- Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D, Gottlieb PA, et al. Staging presymptomatic type 1 diabetes: A scientific statement of jdrf, the endocrine society, and the American diabetes association. *Diabetes Care*. 2015;38(10):1964–74.
- Jahan A, Chiang JYL. Cytokine regulation of human sterol 12-hydroxylase (CYP8B1) gene. *Am J Physiol Gas-trointest Liver Physiol* [Internet]. 2005;288:685–95. Available from:

<http://www.ajpgi.org>

- Jahromi MM, Eisenbarth GS. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. Vol. 64, Cellular and Molecular Life Sciences. 2007. p. 865–72.
- Kavvoura F, Owen KR. Maturity Onset Diabetes of the Young : Clinical Characteristics , Diagnosis and. 2012;(May 2014).
- Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M. Islet architecture: A comparative study. *Islets*. 2009;1(2):129–36.
- Kim EJ, Kim J, Lee MY, Sudhanva MS, Devakumar S, Jeon YJ. Silymarin inhibits cytokine-stimulated pancreatic beta cells by blocking the ERK1/2 pathway. *Biomol Ther*. 2014;22(4):282–7.
- Kim MS, Polychronakos C. Immunogenetics of type 1 diabetes. Vol. 64, Hormone Research. 2005. p. 180–8.
- Kim SH. Maturity-onset diabetes of the young: What do clinicians need to know? Vol. 39, Diabetes and Metabolism Journal. Korean Diabetes Association; 2015. p. 468–77.
- Koster JC, Remedi MS, Flagg TP, Johnson JD, Markova KP, Marshall BA, et al. Hyperinsulinism induced by targeted suppression of beta cell KATP channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16992–7.
- Krajewski J, Batmunkh C, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T. Interleukin-1 $\beta$  inhibits the hypoxic inducibility of the erythropoietin enhancer by suppressing hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ . *Cell Mol Life Sci*. 2007 Apr;64(7–8):989–98.
- Kutlu B, Naamane N, Berthou L, Eizirik DL. New approaches for in Silico identification of cytokine-modified  $\beta$  cell gene networks. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1037:41–58.
- Larsen CM, Wadt KAW, Juhl LF, Andersen HU, Karlsten AE, Su MSS, et al. Interleukin-1 $\beta$ -induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen- activated protein kinases. *J Biol Chem*. 1998;273(24):15294–300.
- Larsen L, Størling J, Darville M, Eizirik DL, Bonny C, Billestrup N, et al. Extracellular signal-regulated kinase is essential for interleukin-1- induced and nuclear factor  $\kappa$ B-mediated gene expression in insulin-producing INS-1E cells. *Diabetologia*. 2005;48(12):2582–90.
- Lawrence M, Shao C, Duan L, McGlynn K, Cobb MH. The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. In: *Acta Physiologica*. 2008. p. 11–7.
- Legewie S, Herzog H, Westerhoff H V., Blüthgen N. Recurrent design patterns in the feedback regulation of the mammalian signalling network. *Mol Syst Biol*. 2008;4.

- Leung PS. Overview of the pancreas. *Adv Exp Med Biol.* 2010;690:3–12.
- Lu H. Crosstalk of HNF4 $\alpha$  with extracellular and intracellular signaling pathways in the regulation of hepatic metabolism of drugs and lipids. Vol. 6, *Acta Pharmaceutica Sinica B.* Chinese Academy of Medical Sciences; 2016. p. 393–408.
- Luo J li, Kamata H, Karin M, Luo J li, Kamata H, Karin M. IKK / NF-  $\kappa$  B signaling : balancing life and death – a new approach to cancer therapy Find the latest version : Review series IKK / NF-  $\kappa$  B signaling : balancing life and death — a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2625–32.
- Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;39(3):481–97.
- Makeeva N, Myers JW, Welsh N. Role of MKK3 and p38 MAPK in cytokine-induced death of insulin-producing cells. *Biochem J.* 2006 Jan 1;393(1):129–39.
- Mandrup-Poulsen T. Cell Apoptosis Stimuli and Signaling [Internet]. Vol. 50. 2001. Available from: [http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/50/suppl\\_1/S58/533213/s58.pdf](http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/50/suppl_1/S58/533213/s58.pdf)
- Mastracci TL, Sussel L. The endocrine pancreas: Insights into development, differentiation, and diabetes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2012;1(5):609–28.
- Mayer-Davis EJ, Lawrence JM, Dabelea D, Divers J, Isom S, Dolan L, et al. Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002–2012. *N Engl J Med.* 2017 Apr 13;376(15):1419–29.
- McCulloch LJ, van de Bunt M, Braun M, Frayn KN, Clark A, Gloyn AL. GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: Implications for understanding genetic association signals at this locus. *Mol Genet Metab.* 2011 Dec;104(4):648–53.
- Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P. Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology.* 2004 Feb;145(2):667–78.
- Meyerovich K, Ortis F, Allagnat F, Cardozo AK. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. Vol. 57, *Journal of Molecular Endocrinology.* BioScientifica Ltd.; 2016. p. R1–17.
- Meyerovich K, Ortis F, Cardozo AK. The non-canonical NF- $\kappa$ B pathway and its contribution to  $\beta$ -cell failure in diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2018;61(2):F1–6.
- Midhat H. Abdulreda RRD, Over Cabrera AC, Berggren and PO. The Different Faces of the Pancreatic Islet. 2016; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319->

39824-2

- Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, et al. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(18):10402–6.
- Miki T, Tashiro F, Iwanaga T, Nagashima K, Yoshitomi H, Aihara H, et al. Abnormalities of pancreatic islets by targeted expression of a dominant-negative KATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(22):11969–73.
- Miura A, Yamagata K, Kakei M, Hatakeyama H, Takahashi N, Fukui K, et al. Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells. *J Biol Chem*. 2006 Feb 24;281(8):5246–57.
- 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- (HNF4-) Is vital to beta-cell function. *J Biol Chem*. 2016;291(12):6146–57.
- Nakhei H, Lingott A, Lemm I, Ryffel GU. An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4  $\alpha$  predominates in undifferentiated murine cell types. 1998;26(2):497–504.
- Narayan KMV, Boyle JP, Geiss LS, Saaddine JB, Thompson TJ. Impact of recent increase in incidence on future diabetes burden: U.S., 2005-2050. *Diabetes Care*. 2006;29(9):2114–6.
- Odom DT, Zizlsperger H, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, et al. Control of Pancreas and Liver Gene Expression by HNF Transcription Factors. *Science* (80- ). 2004 Feb 27;303(5662):1378–81.
- Of D, Mellitus D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(SUPPL.1):81–90.
- Orci L, Unger RH. Functional Subdivision of Islets of Langerhans and Possible Role of D Cells. *Lancet*. 1975;306(7947):1243–4.
- Ore DIN. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. 2018;
- Ortis F, Cardozo AK, Crispim D, Störling J, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL. Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Mol Endocrinol*. 2006;20(8):1867–79.
- Ortis F, Miani M, Colli ML, Cunha DA, Gurzov EN, Allagnat F, et al. Differential usage of NF- $\kappa$ B activating signals by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in pancreatic beta cells. *FEBS Lett*. 2012

Apr 5;586(7):984–9.

- Ortis F, Naamane N, Flamez D, Ladrie L, Moore F, Cunha D a, et al. Cytokines interleukin-1b and TNF-a regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary beta cells. *Diabetes* [Internet]. 2010;59:358–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934004>
- Ortis F, Pirot P, Naamane N, Kreins AY, Rasschaert J, Moore 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*. 2008 Jul;51(7):1213–25.
- Oshima T, Kawasaki T, Ohashi R, Hasegawa G, Jiang S, Umezumi H, et al. Downregulated P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  expression in human colorectal carcinoma is a new prognostic factor against liver metastasis. *Pathol Int*. 2007 Feb;57(2):82–90.
- Osowski CM, Urano F. The binary switch that controls the life and death decisions of ER stressed  $\beta$  cells. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2011;23(2):207–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2010.11.005>
- Pihoker C, Gilliam LK, Ellard S, Dabelea D, Davis C, Dolan LM, et al. Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: Results from the SEARCH for diabetes in Youth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):4055–62.
- Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL. Mediators and Mechanisms of Pancreatic Beta-cell Death in Type 1 Diabetes. Vol. 52, *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008.
- Pugliese A, Yang M, Kusmarteva I, Heiple T, Vendrame F, Wasserfall C, et al. The Juvenile Diabetes Research Foundation Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes (nPOD) Program: Goals, operational model and emerging findings. Vol. 15, *Pediatric Diabetes*. 2014. p. 1–9.
- Richard L. Drake AWW and AWMM. Regional anatomy; Abdominal viscera. In: *Gray's Anatomy For Students 3rd Edition*. 2015. p. 333–6.
- Rorsman P, Braun M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. Vol. 75, *Annual Review of Physiology*. 2013. p. 155–79.
- Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2011;34(6).
- Saklatvala J, Rawlinson L, Waller RJ, Sarsfield S, Lee JC, Morton LF, et al. Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *J Biol Chem*. 1996;271(12):6586–9.

- Saldeen J, Lee JC, Welsh N. Role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in cytokine-induced rat islet cell apoptosis. 2001.
- Sato Y, Hatta M, Karim F, Sawa T, Wei F yan, Sato S, 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 \*  $\square$ . 2012;287(27):23236–45.
- Shapiro AMJ, Lakey JR., Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000;343:230–8.
- Shapiro AMJ, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006;355(13):1318–30.
- Shuying Jiang, Toshiya Tanaka, Hiroko Iwanari HH, Hisahiko Yamashita, Junko Kumakura, Yuichiro Watanabe, Yasutoshi Uchiyama, Hiroyuki Aburatani TH, Naito TK and M. Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) isoforms in human and rats. *Nucl Receptor*. 2003;12:1–12.
- Simó R, Barbosa-Desongles A, Lecube A, Hernandez C, Selva DM. Potential role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in downregulating sex hormone-binding globulin. *Diabetes*. 2012 Feb;61(2):372–82.
- Singh K, Balligand JL, Fischer TA, Smith TW, Kelly RA. Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells: Role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/ERK2) and STAT1 $\alpha$ . *J Biol Chem*. 1996;271(2):1111–7.
- Slack JMW. Developmental biology of the pancreas. *Development*. 1995;121:1569–80.
- Sladek FM, Zhong W, Lai E, Darnell JE. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. 1990.
- Størling J, Binzer J, Andersson AK, Züllig RA, Tonnesen M, Lehmann R, et al. Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt. *Diabetologia*. 2005 Oct;48(10):2039–50.
- Tattersall RB. Mild familial diabetes with dominant inheritance. *Qjm*. 1974;43(2):339–57.
- Thanabalasingham G, Pal A, Selwood MP, Dudley C, Fisher K, Bingley PJ, et al. Systematic assessment of etiology in adults with a clinical diagnosis of young-onset type 2 diabetes is a successful strategy for identifying maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Care*. 2012 Jun;35(6):1206–12.



- Thomas H, Jaschkowitz K, Bulman M, Frayling TM, Mitchell SMS, Roosen S, et al. A distant upstream promoter of the HNF-4  $\alpha$  gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. 2001;10(19):2089–98.
- Vetö B, Bojcsuk D, Bacquet C, Kiss J, Sipeki S, Martin L, et al. The transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 alpha is inhibited via phosphorylation by ERK1/2. PLoS One. 2017;12(2):1–19.
- Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, Zouali H, et al. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. Nature. 1992;356(6371):721–2.
- De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D, et al. Rapid Publication Human and Rat Beta Cells Differ in Glucose Transporter but Not in Glucokinase Gene Expression.
- Wang H, Maechler P, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  regulates the expression of pancreatic  $\beta$ -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. J Biol Chem. 2000 Nov 17;275(46):35953–9.
- Wang Z, Bishop EP, Burke PA. Expression profile analysis of the inflammatory response regulated by hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ . BMC Genomics. 2011;12(II):1–14.
- Westerlund J, Bergsten P. Glucose Metabolism and Pulsatile Insulin Release From Isolated Islets [Internet]. Vol. 50, DIABETES. 2001. Available from: <http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/50/8/1785/369159/1785.pdf>
- Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. Science (80- ). 1995;269(5222):403–7.
- Wieczorek G, Pospischil A, Perentes E. A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). Exp Toxicol Pathol [Internet]. 1998;50(3):151–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0940-2993\(98\)80078-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0940-2993(98)80078-X)
- Xue TC, Jia QA, Bu Y, Chen RX, Cui JF, Tang ZY, et al. CXCR7 correlates with the differentiation of hepatocellular carcinoma and suppresses HNF4 $\alpha$  expression through the ERK pathway. Oncol Rep. 2014 Dec 1;32(6):2387–96.
- Yamagata K. Roles of HNF1  $\alpha$  and HNF4  $\alpha$  in Pancreatic  $\beta$ -Cells: Lessons from a Monogenic Form of Diabetes ( MODY ). 2014;95:407–23.
- Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, et al. Mutations in the

hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1).  
Nature. 1996;384(6608):458–60.

Yen HCS, Xu Q, Chou DM, Zhao Z, Elledge SJ. Global protein stability profiling in mammalian cells. Science (80- ). 2008;322(5903):918–23.

Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. Growth Factors. 2006 Jan;24(1):21–44.

Zhang C, Wu Q, Huang H, Chen X, Huang T, Li W, et al. Caveolin-1 promotes Rfng expression via Erk-Jnk-p38 signaling pathway in mouse hepatocarcinoma cells. J Physiol Biochem. 2019 Nov 1;75(4):549–59.