

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

LETÍCIA FERREIRA TERRA

**Mecanismos moleculares envolvidos em
citoproteção e transformação maligna de
células-beta pancreáticas**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
02/04/2013

LETÍCIA FERREIRA TERRA

**Mecanismos moleculares envolvidos em
citoproteção e transformação maligna de
células-beta pancreáticas**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em
Ciências (Bioquímica)*

*Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Coorientadora: Profa. Dra. Letícia Labriola*

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

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

Terra, Letícia Ferreira
T323m Mecanismos moleculares envolvidos em citoproteção e
transformação maligna de células-beta pancreáticas / Letícia
Ferreira Terra. -- São Paulo, 2013.
194p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Sogayar, Mari Cleide.
Co-orientador: Labriola, Letícia.

1. Biologia celular 2. Cancer 3. Apoptose : Patologia 4.
Diabetes Mellitus I. T. II. Sogayar, Mari Cleide, orientador.
III. Labriola, Letícia, orientador.

574.87 CDD

*Aos meus pais, meu exemplo de ciência. Sempre.
Ao Bruno, pela paciência no desenvolver desta tese.*



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Mecanismos moleculares envolvidos em citoproteção e transformação maligna de células-beta pancreáticas”

LETÍCIA FERREIRA TERRA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Orientadora e Presidente

Profa. Dra. Déborah Schechtman
IQ - USP

Profa. Dra. Solange Maria de Toledo Serrano
IQ - USP

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara
ICB - USP

Profa. Dra. Fernanda Ortis
ICB - USP

SÃO PAULO
14 de maio de 2013

Agradecimentos

À Profa. Dra. Mari C. Sogayar, pela orientação e por todo o apoio. Pelos conselhos, sugestões e críticas, sempre mostrando sua opinião em todos os assuntos. Por ter aberto as portas do laboratório para mim oito anos atrás e me introduzido ao fantástico mundo da ciência, favorecendo meu amadurecimento de incontáveis formas. Obrigada ainda por permitir que o laboratório possua o ambiente agradável e receptivo que apresenta, fazendo dele nossa segunda casa.

À Profa. Dra. Leticia Labriola, pela co-orientação desta tese. Por ter me orientado no meu trabalho de conclusão de curso na faculdade, pelas discussões e sugestões. Sinto-me feliz em ter podido presenciar e fazer parte, mesmo que pequena, da evolução de sua carreira. Obrigada por me acalmar em todos os momentos que tudo que precisamos é uma palavra amiga, principalmente quando um resultado importante dá errado, um artigo retorna ou uma bolsa é recusada.

Ao Prof. Dr. Décio L. Eizirik e à Dra. Alessandra K. Cardozo, por terem me recebido em seu laboratório na Université Libre de Bruxelles, por toda a preocupação, conversas e ajuda que me forneceram durante os seis meses que fiquei por lá, pelo contato que mantivemos e ainda mantemos desde minha volta, por me mostrarem a ciência do outro lado do mundo, por terem me apresentado a inúmeras pessoas que com certeza serão importantes em algum momento no meu futuro e por terem me levado a diversos seminários e reuniões que abriram ainda mais a minha mente. À Alessandra pela supervisão e pelas discussões constantes, conseguindo tornar o meu dia-a-dia o mais produtivo que ele poderia ser. Ao Décio pelos conselhos, recomendações e sugestões, não somente sobre o tempo que passei com eles, como também sobre meu futuro, penso nisso constantemente.

Obrigada a ambos por me fazerem sentir como se sempre tivesse sido parte do Laboratory of Experimental Medicine, e por fazer dele um lugar para onde eu sempre poderei voltar.

Aos meus colaboradores do INCOR, Prof. Dr. Edécio C. Neto, por permitir a realização de parte deste trabalho em seu laboratório e disponibilizar seus aparelhos para minha utilização; e à Dra. Priscila C. Teixeira, por me ensinar tudo relacionado ao 2D-DIGE, da técnica à análise de resultados. À Andreia Kuramoto pelo apoio técnico durante este período.

Ao Dr. André Zelanis do Instituto Butantã pela ajuda na espectrometria de massa.

Aos meus colaboradores da University of Southern Denmark, Prof. Dr. Martin R. Larsen e Prof. Dr. Giuseppe Palmisano, agora professor do Instituto de Biociências, pela ajuda na espectrometria de massa.

À Rosangela W. Mansano, meu braço direito desde que entrou no laboratório como aluna de iniciação científica. Pela ajuda nas culturas celulares, fazer um anticorpo funcionar quando eu tinha desistido, e pelo apoio moral por quase todo o tempo de desenvolvimento dessa tese. Obrigada pelo exemplo de motivação.

Ao Prof. Dr. Miguel G. Malpartida, pela ajuda na citometria de fluxo e nos ensaios de atividade enzimática.

Ao Dr. Florent Allagnat, da Université de Lausanne, pelas discussões sobre os experimentos de autofagia.

Às doutorandas Talita C. Oliveira e Ancély F. dos Santos pela ajuda na parte final, todo apoio e motivação que me deram nestes últimos meses cansativos e muito trabalhosos.

A todos os demais integrantes do LBCM e UIPH, passados ou atuais: primeiramente aos meus queridos colegas de pós-graduação, Ana Lucia, Aline,

Gustavo, Marina, Tati e Erik, pois sofremos juntos desde a prova de ingresso, passando por disciplinas, qualificação até a tese; aos membros da equipe de isolamento de ilhotas humanas, Ana Lucia, Marluce, Roberta, Patrícia e Fernando, com quem dividimos a mesma sala por horas e horas; à Aline, meu ombro, o membro que já era da família antes mesmo de eu conhecer, pela companhia dentro e fora do laboratório com nossos sábados à noite sempre com alguma coisa pra fazer: videogame, jogos de tabuleiro, filmes, séries, animes, comidas, etc., pelas confidências, por me escutar sempre que eu precisei e ser minha cúmplice em tudo; à Ana Lucia, pelas discussões de projeto e artigos, pelas nossas fantásticas e inesquecíveis viagens a congressos, pelas inúmeras risadas, pelos comentários sem noção, pela loucura nossa de todo dia e pelos nossos joguinhos para desestressar; ao Gustavo, pelas inúmeras piadas que você nos proporcionou, cada dia era uma surpresa, quem vê agora até pensa que é chique, pelas nossas horas de estudo e discussões, pelos cafés na copinha, pelas brincadeiras e pela companhia nas sofridas disciplinas da licenciatura; à Roberta, pelas risadas insanas e por sempre me apoiar nas nossas zoeiras; à Marina, por ser sempre a calma em meio ao furacão; à Tati, pelas risadas e festinhas que você sempre se divertia organizando para nós; à Marluce, por toda a ajuda que ela pode dar e por me ensinar o significado de autobullying; à Nanda, pelos conselhos, brincadeiras, barulhos bizarros, expressões diferentes, histórias engraçadas e por ter salvado minhas referências bibliográficas; à Lu Gomes, pela companhia ao lado da mesa por quase todos esses anos, pelas colaborações e pela amizade; à Erika, Camila, Luiz e Gi, pela companhia e risadas de todo esse tempo; à Kati, Marcos e Ana Cláudia, por me ajudarem com minhas dúvidas ao longo dos anos; à todos os alunos de iniciação científica; à Zizi, Débora, Ricardo e Sandra pelo apoio técnico, trabalho e dedicação. E por fim, aos antigos

membros do laboratório, com quem convivi ao menos em parte durante estes anos: Theri, Ilana, Leonardo, Fê Festa, Antero, Christian, Ana Paula, Angelita, Diana, Sheila, Vítor, Rita, Maya, Nicole, Flávia G., Flávia T., Carin e todos os outros muitos que não estão listados aqui. Obrigada a todos por fazerem do laboratório além de um ambiente de aprendizagem, me sinto muito privilegiada de ter trabalhado com pessoas tão brilhantes quanto vocês, um ambiente familiar, amigável, e acima de tudo, divertido, vai ser difícil comparar outros colegas de trabalho com vocês. Vocês sempre farão parte de mim e levarei comigo aonde for.

A todos os outros integrantes do LABOMEDEX: à Dra. Miriam Cnop e Dra. Laurance Laudrière; à Kira, Makiko, Leli e Diane, com quem trabalhei mais de perto, convivíamos juntas nas reuniões, conversávamos, discutíamos resultados e desabafávamos quando os experimentos não davam certo; à Leli, Kira, Makiko, Flávia, Olatz, Izortze, Fabio, Tati, Baroj, Daniel e Flora, para alguém que estava sozinha poder conversar sempre e sair para almoçar todos dias, chegar o fim de semana e poder sair pra tomar cerveja, ir a um restaurante novo e dançar até de madrugada foi fundamental; à Miriam, Wael, Michaela, Mariana, Jenny, Jean-Valery e Guy, apesar de ter convivido menos com vocês, por um motivo ou outro, tenho boas recordações de conversas e risadas que demos juntos; e à Beatrice, Alex, Anyshaï, Stephanie, Michael, Rogier e Isabelle, obrigada não só por todo o apoio técnico que me deram direta- ou indiretamente, mas por sanarem minhas dúvidas quando elas surgiram. É muito difícil largar tudo e todos que você conhece e ir morar em um lugar totalmente diferente e conviver diariamente com pessoas que você nunca viu. Muito obrigada por fazerem desta experiência algo muito menos doloroso, e mais do que isso, obrigada por todas as risadas, brincadeiras, desabafos, jantares, cervejas, saídas nos fim de semana, etc. que tornaram este meu tempo na Bélgica

tão único e especial. Aprendi muito com cada um de vocês, pode não ter sido algo relacionado diretamente a ciência, mas ter convivido com pessoas tão diferentes e de lugares tão distintos enriquece qualquer um, me lembrarei de cada um de vocês com um carinho especial. Espero muito que possamos continuar mantendo contato e nos encontrando sempre que possível. Não posso terminar esta seção sem voltar a agradecer duas pessoas que particularmente me ajudaram muito nesta jornada; à Leli, muito obrigada por ter me ajudado desde antes de eu ir para Bruxelas, a arrumar um apartamento, pagar minhas contas, me ajudar com todas as minhas dúvidas de banco, documentos, e a resolver as pendências quando voltei para o Brasil; à Flávia, obrigada por me receber quando voltei a Bruxelas alguns meses depois; e obrigada a ambas pela amizade, pelas viagens maravilhosas que fizemos juntas, pelas risadas, saídas, desabafos e a companhia de vocês, a coisa que mais sinto falta desde que voltei.

À Profa. Alicia J. Kowaltowski, à Profa. Anamaria A. Camargo e ao Prof. A. Henning Ulrich pela análise crítica e discussões em meu exame de qualificação.

A todos os meus amigos que não fizeram parte da loucura do doutorado, mas foram pacientes comigo quando disse que não podia sair porque tinha que fazer experimento, trabalhar, ler ou escrever, e que uma forma ou outra me apoiaram durante esta etapa.

Por último, mas com certeza não menos importante, à minha família, meu apoio incondicional sempre e a todas as coisas; principalmente aos meus pais, pela educação que me deram, dentro e fora de casa, por sempre acreditarem em mim, pela confiança, por tentar ajudar de todas as maneiras possíveis, e por sempre ficarem ao meu lado, se algum dia puder dar aos meus filhos o que vocês me deram, saberei que terei tido sucesso na vida; à minha vózinha, minha segunda

“The only man who never makes mistakes is the man who never does anything”
- Theodore Roosevelt

*“All these places have their moments with lovers and friends, I still can recall.
Some are dead and some are living, in my life, I've loved them all.”*
- The Beatles

Resumo

Terra, L.F. **Mecanismos moleculares envolvidos em citoproteção e transformação maligna de células-beta pancreáticas**. 2013. 194p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O transplante de ilhotas pancreáticas constitui uma alternativa atraente para o tratamento de diabetes tipo 1 (DM1), contudo, é limitado devido à escassez de doadores de órgãos. O papel da prolactina humana recombinante (rhPRL), que apresenta efeitos benéficos em células-beta, e seu mecanismo de ação foram investigados neste estudo. O número de células apoptóticas diminuiu significativamente na presença de rhPRL. Essa citoproteção envolveu diminuição da razão BCL2/BAX e inibição de caspase-8, -9 e -3. Este estudo revelou, pela primeira vez, evidência direta do efeito protetor de lactogênios contra apoptose de células-beta humanas.

Levando em consideração a relação conhecida entre citocinas e DM1 e observações recentes sugerindo o papel da autofagia no desenvolvimento e prevenção do DM1, foi investigada a conexão entre citocinas (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) e autofagia em células-beta. O co-tratamento com citocinas e rapamicina, um indutor de autofagia via inibição de mTOR, não aumentou os níveis de apoptose em células INS-1E. Contudo, exposição a citocinas levou ao aumento nos níveis de autofagossomos e na relação LC3-II/LC3-I, do mesmo modo que o tratamento com rapamicina. O tratamento com citocinas também levou à diminuição dos níveis de mTOR e 4E-BP1 fosforilados. Foi demonstrada aqui, pela primeira vez, uma relação direta entre o tratamento com citocinas e a indução de autofagia em células-beta. Recentemente, surgiram novas evidências mostrando ligação entre a morte de células-beta induzida por citocinas e indução de estresse de retículo endoplasmático. Em nosso modelo, foram observados níveis diminuídos de p-mTOR e aumento da formação de autofagossomos após o tratamento com indutores de estresse de retículo. Este estudo reforça também, resultados prévios sobre a hipótese da função de indutores de estresse de retículo em promover a autofagia. Além disso, o tratamento com rhPRL aumentou os níveis de p-mTOR e levou à diminuição na formação de

autofagossomos após exposição a citocinas em células-beta. Estes resultados são relevantes para a caracterização mais aprofundada das funções dos lactogênios nessas células.

Sabendo-se da necessidade de células-beta humanas para estudos detalhados em células-beta, nosso grupo gerou linhagens celulares derivadas de insulinomas humanos que secretam hormônios e expressam marcadores com o mesmo padrão de seu tecido original. Estas linhagens foram caracterizadas comparando-as com culturas primárias de células-beta através de eletroforese bidimensional acoplada a espectrometria de massa. Cerca de 1.800 *spots* foram detectados, sendo que menos de 1% apresentou expressão diferencial. As proteínas superexpressas em ilhotas, como Caldesmon, estão envolvidas em organização do citoesqueleto, influenciando a secreção hormonal. Contrariamente, quase todas as proteínas superexpressas nas células de insulinoma, como MAGE-A2, foram descritas aqui pela primeira vez, podendo estar relacionadas à sobrevivência celular e resistência à quimioterapia. Estes resultados mostram, pela primeira vez, mudanças na expressão de proteínas relacionadas ao fenótipo alterado dos insulinomas, direcionando a pesquisa ao estabelecimento de células-beta humanas bioengenheiradas e ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para insulinomas.

Coletivamente, os dados obtidos neste estudo estendem o conhecimento molecular envolvido na citoproteção induzida por rhPRL e transformação maligna de células-beta pancreáticas, contribuindo para futuras aplicações na compreensão e no tratamento do DM1.

Palavras-chave: Células-beta pancreáticas, Diabetes mellitus, prolactina, insulinoma, apoptose, autofagia.

Abstract

Terra, L.F. **Molecular mechanisms involved in pancreatic beta-cells cytoprotection and malignant transformation.** 2013. 194p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Transplantation of pancreatic islets constitutes an alternative for type 1 diabetes (DM1); however, it is limited by the shortage of organ donors. Here, we investigated the role of recombinant human prolactin (rhPRL), shown to have beneficial effects in beta-cells, and its mechanisms of action. Apoptotic beta-cells were decreased in the presence of rhPRL, with cytoprotection involving an increase of BCL2/BAX ratio and inhibition of caspase-8, -9 and -3. This study provides new direct evidence for a protective effect of lactogens in human beta-cell apoptosis.

Taking into account the known relationship between cytokines and DM1 and recent observations suggesting a role for autophagy in the development and prevention of DM1, we investigated the connection between cytokines (IL-1 β , TNF- α and IFN- γ) and autophagy in beta-cells. Co-treatment with cytokines and rapamycin, an inducer of autophagy through inhibition of mTOR, did not increase the apoptosis levels in INS-1E cells. However, exposure to cytokines increased the levels of autophagosome formation and LC3-II/LC3-I ratio. Treatment with cytokines also led to decreased levels of phosphorylated mTOR and 4E-BP1. We demonstrated for the first time, a direct relationship between cytokines treatment and induction of autophagy in beta-cells. Lately, new evidence point to a connection between cytokine-induced beta-cell death and endoplasmic reticulum stress. In our model, we observed that decreased levels of p-mTOR and increased autophagosome formation also ensued after treatment with endoplasmic reticulum stressors. This study also supports the previous hypothesis on the function of ER stressors in inducing autophagy. Furthermore, rhPRL treatment increased the levels of p-mTOR and decreased autophagosome formation after exposure to cytokines in beta-cells. These findings are also relevant for further characterization of lactogens functions in these cells.

Considering the demand for human cells for further beta-cells studies, our group generated cell lines derived from human insulinomas which secrete hormones and express markers with the same pattern displayed by their original tissue. We set out to further characterize these lineages by comparing them to primary beta-cells using two-dimensional gel electrophoresis coupled to mass spectrometry. An average of 1,800 spots was detected with less than 1% exhibiting differential expression. Proteins upregulated in islets, such as Caldesmon, are involved in cytoskeletal organization thus influencing hormone secretion. In contrast, almost all proteins upregulated in insulinoma cells, such as MAGE-A2, first described here, could be related to cell survival and resistance to chemotherapy. Our results provide, for the first time, a molecular snapshot of the changes in expression of proteins correlated with the altered phenotype of insulinomas, prompting research towards the establishment of bioengineered human beta-cells, and the development of new therapeutic strategies for insulinomas.

Collectively, the data obtained in this study extend the molecular knowledge involved in rhPRL-induced cytoprotection and malignant transformation of pancreatic beta-cells, contributing to future applications for understanding and treatment of DM1.

Keywords: Beta-cell, Diabetes mellitus, prolactin, insulinoma, apoptosis, autophagy.

Lista de abreviaturas e siglas

μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micrometro
%	porcentagem
°C	Graus celsius
2D	bidimensional
3D	tridimensional
ACN	Acetonitrila
Ac-DEVD-AMC	<i>Acetyl- L-aspartyl- L-glutamyl- L-valyl- L-aspartic acid α-(4-methyl- coumaryl- 7- amide)</i>
Ac-IETD-AFC	<i>Acetyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-threoninyl-L-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin</i>
Ac-LEHD-AFC	<i>Acetyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-Histidyl-L-aspartyl-7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin</i>
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i> (Difosfato de adenosina)
AMP	<i>Adenosine monophosphate</i> (Monofosfato de adenosina)
AMPC	AMP cíclico
APAF1	<i>Apoptotic Peptidase Activating Factor-1</i>
Atg	<i>Autophagy-related gene</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
BAD	<i>BCL2 associated death promoter</i>
BAK	<i>BCL2 homologous antagonista/killer</i>
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCLXL	<i>BCL extra large</i>
BH	<i>BCL2 Homology Domains</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>

BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Albumina sérica bovina)
BP	Passo da Banda
BVA	Biological Variation Analysis
CALD1	Caldesmon
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
ciAP	<i>cellular IAP</i>
CID	<i>Collision-induced dissociation</i> (Dissociação induzida por colisão)
CK19	<i>Citokeratin 19</i> (Citoqueratina 19)
cm	centímetro
CMAS	<i>cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase</i> (ácido N-acetilneuramínico citidina monofosfato sintetase)
d.i.	Diâmetro interno
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio Padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
EPM	Erro Padrão da Média
ERK1	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase 1</i>
ERK2	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase 2</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FIP200	<i>Family Interacting Protein of 200 kD</i>

FKBP-12	<i>immunophilin 12-kDa FK506-binding protein</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)
GH	<i>Growth Hormone</i> (Hormônio de Crescimento)
Glut2	<i>Glucose Transporter 2</i> (Transportador de Glicose tipo 2)
GLUT4	<i>Glucose Transporter 4</i> (Transportador de Glicose tipo 4)
h	hora
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HPRT	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase</i> (Hipoxantina Fosforribosil Transferase)
IAA	Iodoacetamida
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i> (Inibidor de apoptose)
IEQ	<i>Islet equivalent</i> (Equivalentes de ilhota)
IFN- γ	<i>Interferon-γ</i>
IL-1 β	Interleucina-1 β
IMC	Índice de Massa Corporal
iNos	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
IPG	<i>Immobilized pH gradient</i> (Gradiente de pH imobilizado)
IPI	<i>International Protein Index</i> (Index internacional de proteínas)
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
kDa	quilodalton
L	litro
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>

LTQ	<i>Linear Trap Quadrupole</i>
mA	miliampere
MAC	<i>Mitochondrial apoptosis-induced channel</i>
MAGE2	<i>Melanoma Associated Antigen2</i>
MAGE-A2	<i>Melanoma Associated Antigen-A2</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCL1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
min	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
MOM	<i>Mitochondrial outer membrane</i> (Membrana externa da mitocôndria)
mRNA	RNA mensageiro
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massa)
MS/MS	Espectrometria de Massa <i>in tandem</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
m/z	Relação massa/carga
NAD	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo
NEUA	<i>N-acylneuraminate cytidyltransferase</i> (N-acilneuraminato citidiltransferase)
ng	nanograma
NG	Newport Green
nL	nanolitro
nm	nanometro
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
NR6A1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 6 Group A Member 1</i>
OTUD7A	<i>OTU domain-containing protein 7A</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>

	(Reação em Cadeia da Polimerase)
PE	<i>Phosphatidylethanolamine</i> (Fosfatidiletanolamina)
pI	Ponto isoelétrico
PI	<i>Propidium Iodide</i> (Iodeto de Propídeo)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinase)
PI3KC3	<i>Class III Phosphatidylinositol 3-kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinase classe III)
PI3P	<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i> (fosfatidilinositol 3-fosfato)
PKC	<i>Protein Kinase C</i> (Proteína Quinase C)
PKN1	<i>Protein Kinase N1</i> (Proteína Quinase N1)
PM	Peso Molecular
PRL	Prolactina
PRLR	<i>Prolactin Receptor</i> (Receptor de prolactina)
PTM	<i>Phototube Multiplier Value</i> (Valor do Fototubo Multiplicador)
PTP	<i>Permeability Transition Pore</i> (Poros de Transição de Permeabilidade)
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> (Fluoreto Polivinidileno)
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)
RIP1	<i>Receptor Interacting Protein 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
rhPRL	<i>Recombinant Human Prolactin</i> (Prolactina Humana Recombinante)

RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa)
s	segundo
SERCA	<i>sarco / endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i> (Pequenos RNA de Interferência)
SMAC	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase</i>
tBID	<i>Truncated BID</i> (BID truncado)
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i> (Ácido Trifluoroacético)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Fator-α</i>
TNFR	<i>TNF receptor</i> (Receptor de TNF)
TRADD	<i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNFR-associated fator</i>
U	Unidades
ULK	<i>UNC-51-like kinase</i>
VDAC	<i>Voltage-Dependent Anion Channel</i> (Canal de Ânion Dependente de Voltagem)
W	Watt
WB	Western Blott
XIAP	<i>X-linked IAP</i>

Lista de figuras

Figura 1: Esquema anatômico de uma ilhota pancreática.....	34
Figura 2: Representação esquemática da secreção de insulina induzida por glicose.	36
Figura 3: Representação esquemática do transporte de glicose estimulado por insulina.....	37
Figura 4: Representação esquemática da insuficiência insulínica em um indivíduo com DM1.....	39
Figura 5: Representação esquemática do transplante de ilhotas pancreáticas.....	41
Figura 6: Representação esquemática da sinalização apoptótica pelas vias extrínseca e intrínseca.....	45
Figura 7: Representação esquemática da sinalização autofágica.....	51
Figura 8: Representação esquemática das alterações causadas através da ativação do PRLR em células-beta.....	56
Figura 9: Microscopia confocal de imunofluorescência.....	61
Figura 10: Fluxograma da técnica de 2D-DIGE.....	87
Figura 11: Efeito protetor da rhPRL na morte celular induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas em células-beta humanas.....	98
Figura 12: Efeito da rhPRL na morte celular induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas em preparações individuais de células-beta humanas. ...	99
Figura 13: Efeito da rhPRL na morte celular induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas em ilhotas pancreáticas humanas.....	100
Figura 14: Efeito protetor da rhPRL na apoptose induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas em ilhotas pancreáticas humanas.....	101
Figura 15: Efeito da rhPRL na apoptose induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas em preparações individuais de ilhotas pancreáticas humanas.....	102
Figura 16: rhPRL inibe atividade de caspase após apoptose induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas.....	104
Figura 17: rhPRL inibe atividade de caspase após apoptose induzida por tratamento com citocinas mediante sua via de sinalização clássica.....	105
Figura 18: rhPRL não interfere na produção de NO após apoptose induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas.....	106
Figura 19: rhPRL aumenta a razão de mRNA entre membros anti- e pró-apoptóticos da família BCL2.....	107
Figura 20: Aumento dos níveis de expressão de proteína de membros da família BCL2 após o tratamento com rhPRL.....	108
Figura 21: Níveis de expressão proteica e de fosforilação de tirosina de P38	109
Figura 22: Tratamento com rapamicina não aumenta os níveis de apoptose de células INS-1E e de ilhotas de rato dispersadas.....	112
Figura 23: Aumento na formação de autofagossomos após tratamento com rapamicina e cloroquina	113
Figura 24: Aumento na formação de autofagossomos após tratamento com citocinas.	114
Figura 25: Tratamento com citocinas causa um aumento da relação LC3-II/LC3-I em células-beta	115

Figura 26: Diminuição dos níveis de p-mTOR e p-4E-BP1 após o tratamento com citocinas.	116
Figura 27: Diminuição dos níveis de p-mTOR após o tratamento com indutores de estresse de retículo	118
Figura 28: Diminuição da expressão de MCL1 em células INS-1E após o tratamento com rapamicina e diferentes combinações de citocinas	119
Figura 29: Diminuição dos níveis de apoptose induzida por citocinas e taspigargina em células INS-1E após o tratamento com rhPRL.....	120
Figura 30: Aumento dos níveis de p-mTOR após o tratamento com rhPRL.....	121
Figura 31: Tratamento com citocinas causa um aumento da relação LC3-II/LC3-I, enquanto que o tratamento com rhPRL causa uma reversão deste quadro em culturas primárias de ilhotas humanas.....	122
Figura 32: Exemplo de perfis de expressão de proteínas obtidos por 2D-DIGE	123
Figura 33: Perfis de expressão de proteínas dos géis analíticos obtidos por 2D-DIGE	125
Figura 34: Localização das proteínas selecionadas para identificação por MS.....	126
Figura 35: Quantificação da abundância relativa dos <i>spots</i> em extratos de células de insulinooma APM e de ilhotas pancreáticas.....	127
Figura 36: Log da abundância normalizada do <i>spot</i> 285 no controle interno, culturas primárias de ilhotas humanas e culturas de células APM, respectivamente.	128
Figura 37: Comparação da expressão dos níveis de expressão proteica de GAPDH, CALD-1 e MAGE-A	131
Figura 38: Via de sinalização de mTOR.....	146
Figura 39: Hipótese do mecanismo pelo qual a PRL inibe apoptose e autofagia... ..	148

Lista de tabelas

Tabela 1: Efeitos da insulina no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas.	37
Tabela 2: Liberação de insulina, pró-insulina e peptídeo-C e conteúdo de insulina. (Dados de Labriola; Peters <i>et al.</i> , 2009).....	60
Tabela 3: Informações dos doadores de ilhotas humanas utilizados neste estudo..	71
Tabela 4: Informações das linhagens de insulinomas humanos utilizadas neste estudo.....	74
Tabela 5: Sequência dos iniciadores para genes humanos utilizados neste estudo.	81
Tabela 6: Caracterização dos perfis obtidos por 2D-DIGE.	124
Tabela 7: Proteínas identificadas por MS.	129

Sumário

1. Introdução	31
1.1. <i>Pâncreas</i>	33
1.1.1. <i>Ilhotas de Langerhans</i>	33
1.2. <i>Insulina</i>	34
1.3. <i>Diabetes mellitus</i>	38
1.3.1. <i>Transplante de ilhotas pancreáticas</i>	40
1.3.2. <i>O papel das citocinas</i>	42
1.4. <i>Apoptose</i>	43
1.5. <i>Autofagia</i>	48
1.5.1. <i>Autofagia em células-beta pancreáticas</i>	52
1.6. <i>Células-beta e gravidez</i>	53
1.6.1. <i>Prolactina</i>	54
1.7. <i>Modelos de células-beta pancreáticas</i>	57
1.7.1. <i>Insulinomas</i>	58
1.7.1.1. <i>Linhagens celulares humanas derivadas de insulinomas humanos desenvolvidas em nosso laboratório</i>	59
2. Objetivos	63
2.1. <i>Objetivo geral</i>	65
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	65
3. Material e Métodos	69
3.1. <i>Isolamento e cultura primária de ilhotas humanas</i>	71
3.2. <i>Cultura de células INS-1E</i>	73
3.3. <i>Isolamento e cultura de ilhotas de rato</i>	73
3.4. <i>Isolamento e culturas primárias de insulinomas humanos</i>	73
3.5. <i>Tratamentos celulares</i>	75
3.6. <i>Ensaio de morte celular por citometria de fluxo</i>	76
3.7. <i>Viabilidade celular por Hoescht (HO) e PI</i>	77
3.8. <i>Ensaio de atividade de caspase-3</i>	78
3.9. <i>Ensaio de atividade de caspase-8 e -9</i>	79
3.10. <i>Determinação dos níveis de Óxido Nítrico (NO) presentes no sobrenadante de culturas celulares</i>	80
3.11. <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR) e de transcriptase reversa (RT-PCR) e PCR quantitativo em tempo real (qPCR)</i>	80
3.12. <i>Extrato proteico total das linhagens de insulinomas humanos e de culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas</i>	82
3.13. <i>Ensaio de Western Blot (WB) para amostras de insulinomas humanos e de culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas</i>	82
3.14. <i>Ensaio de WB para amostras de células INS-1E</i>	84
3.15. <i>Análises estatísticas</i>	86
3.16. <i>Imunofluorescência</i>	86
3.17. <i>2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) e espectrometria de massa (MS)</i>	87
3.17.1. <i>Marcação e comparação das amostras através de fluoróforos correspondentes</i>	88
3.17.2. <i>Geração dos perfis proteicos utilizando géis analíticos bidimensionais</i>	89
3.17.3. <i>Análises estatísticas</i>	90

3.17.4.	<i>Determinação de peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI) experimentais</i>	91
3.17.5.	<i>Geração e coloração dos géis preparativos</i>	91
3.17.6.	<i>Processamento das proteínas e MS</i>	91
3.17.7.	<i>Análise da MS e identificação</i>	92
4.	Resultados	95
4.1.	<i>rhPRL promove a sobrevivência de células-beta humanas através da inibição das vias intrínscas e extrínscas da apoptose</i>	97
4.1.1.	<i>rhPRL protege culturas primárias de células-beta humanas de morte induzida por privação de soro e por citocinas</i>	97
4.1.2.	<i>rhPRL inibe a atividade de caspase sem interferir na produção de NO</i> ..	103
4.1.3.	<i>rhPRL altera o balanço entre proteínas anti- e pró-apoptóticas da família BCL2</i>	106
4.1.4.	<i>rhPRL induz uma fosforilação rápida e transiente de p38</i>	109
4.2.	<i>Citocinas induzem autofagia em células-beta via bloqueio de mTOR, enquanto rhPRL é capaz de reverter o processo iniciado tanto por citocinas quanto por indutores de estresse de retículo</i>	110
4.2.1.	<i>Rapamicina não aumenta os níveis de apoptose em células-beta</i>	110
4.2.2.	<i>Citocinas causam um aumento na formação de autofagossomos em células INS-1E</i>	112
4.2.3.	<i>Citocinas causam diminuição nos níveis de mTOR fosforilado e 4E-BP1 fosforilado em células INS-1E</i>	115
4.2.4.	<i>Estresse de retículo causa uma diminuição nos níveis de mTOR fosforilado em células INS-1E</i>	117
4.2.5.	<i>Tratamento com rapamicina diminui os níveis de MCL1 em células INS-1E</i>	118
4.2.6.	<i>Tratamento com rhPRL causa diminuição na porcentagem de apoptose em células INS-1E</i>	119
4.2.7.	<i>rhPRL é capaz de restaurar os níveis de mTOR fosforilado após o tratamento com citocinas e com indutores de estresse de retículo em células INS-1E</i>	120
4.2.8.	<i>O tratamento com citocinas induz um aumento da razão LC3-II/LC3-I em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas e o tratamento com rhPRL uma diminuição</i>	122
4.3.	<i>Novas proteínas encontradas como sendo diferencialmente expressas em culturas primárias de ilhotas humanas e insulinomas humanos</i>	123
4.3.1.	<i>Comparação de perfis de expressão proteica de células de insulinomas humanos e de ilhotas pancreáticas humanas normais</i>	123
4.3.2.	<i>Proteínas identificadas por MS</i>	128
4.3.3.	<i>Confirmação dos perfis de expressão por WB</i>	129
5.	Discussão	133
6.	Conclusões	159
7.	Perspectivas	163
8.	Referências bibliográficas	167
	Súmula curricular	195
	Artigos publicados	205

1. Introdução

1.1. *Pâncreas*

O pâncreas é uma glândula anexa ao sistema digestivo, sendo composto por dois tipos principais de tecidos: a porção endócrina, composta pelas ilhotas de Langerhans e a porção exócrina, composta pelos ácinos, e envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo. As células dos ácinos repousam sobre uma lâmina basal que é envolta por fibras reticulares e uma rica rede de capilares sanguíneos.

O pâncreas exócrino humano produz, além de íons, enzimas e pró-enzimas digestivas, como o tripsinogênio, quimiotripsinogênio, carboxipeptidase, ribonuclease, desoxiribonuclease, triacilglicerol lipase, fosfolipase A2, elastase e amilase. O controle da secreção pancreática é feito principalmente pelos hormônios secretina, colecistoquinina e gastrina, produzidos por células enteroendócrinas dispostas entre as células epiteliais do duodeno. Essa secreção é recolhida pelos ductos que confluem para o ducto pancreático, também denominado ducto de Wirsung, que desemboca no ducto colédoco.

O pâncreas endócrino do ser humano contém de 1 a 2 milhões de ilhotas de Langerhans, que secretam hormônios diretamente na corrente sanguínea.

1.1.1. *Ilhotas de Langerhans*

As ilhotas pancreáticas, ou ilhotas de Langerhans, foram descritas pela primeira vez por Paul Langerhans, em 1869, como formações anatômicas diferentes do restante do tecido, sem conexão direta com os ductos, formando “ilhas celulares”, imersas no parênquima pancreático.

As ilhotas constituem 1-2% da massa do pâncreas, sendo, cada uma delas, de aproximadamente 0,3 mm de diâmetro e altamente vascularizadas, recebendo de 10-15% do fluxo sanguíneo pancreático.

As ilhotas são compostas por diferentes tipos celulares (Figura 1): as células-alfa, que secretam glucagon e correspondem a 18-20% da massa da ilhota; as células-beta, secretoras de insulina, amilina e peptídeo-C (73-75% da massa da ilhota); as células-delta, secretoras de somatostatina (4-6% da massa da ilhota); as células PP, que secretam polipeptídeo pancreático (1% da massa da ilhota); e as células-épsilon, secretoras de grelina (<1% da massa da ilhota). A citoarquitetura das ilhotas difere entre as espécies, sendo que, em humanos, não há uma disposição definida das células na ilhota.

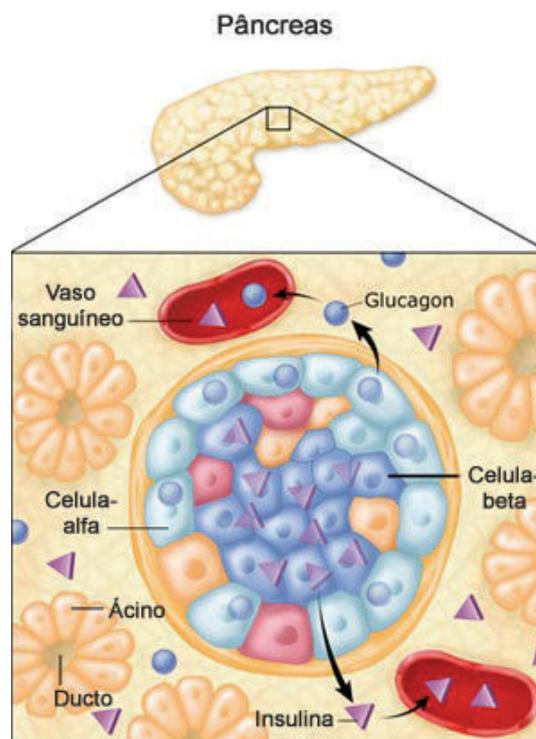


Figura 1: Esquema anatômico de uma ilhota pancreática. O pâncreas é composto por dois tipos principais de tecidos: o exócrino, composto pelos ácinos e o endócrino, composto pelas ilhotas de Langerhans. As ilhotas por sua vez são compostas por diferentes tipos celulares sem uma organização definida (Adaptado de UCSF Diabetes Education Online, disponível em <http://dtc.ucsf.edu/>).

1.2. *Insulina*

A molécula de insulina, formada por 51 aminoácidos organizados em duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes de dissulfeto, é sintetizada como pré-pró-insulina. Esse pré-pró-hormônio é clivado no retículo endoplasmático para formar a

pró-insulina, a qual, por sua vez, é clivada no complexo de Golgi, formando a insulina e o peptídeo-C, que são empacotados em grânulos de secreção e, posteriormente, secretados conjuntamente.

Esses grânulos contêm hexâmeros de insulina, os quais são mantidos por um íon de zinco que interage com resíduos de histidina das seis moléculas, sendo estocados até sua liberação. Aproximadamente 5% desses grânulos estão prontos para serem liberados rapidamente quando ocorre um aumento da concentração de glicose na corrente sanguínea (Neher, 1998). Após a captação de glicose pelo transportador de glicose tipo 2 (GLUT2), esse açúcar é metabolizado, o que leva a um aumento da razão ATP/ADP. Esse aumento inativa o canal de potássio dependente de ATP, o que causa uma despolarização na membrana, ocasionando a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e permitindo um influxo de íons de cálcio (Ca^{2+}). O aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} leva à liberação da insulina presente nos grânulos prontos para liberação (Figura 2). Os outros 95% dos grânulos precisam ser modificados para ficarem disponíveis para liberação imediata, o que pode ser causado pela diminuição das concentrações de ADP (Parsons; Coorsen *et al.*, 1995). A existência desses dois conjuntos de grânulos é utilizada para explicar o padrão bifásico de secreção de insulina.

A ligação da insulina ao seu receptor do tipo tirosina-quinase dispara uma autofosforilação. O receptor ativado catalisa a fosforilação de diversos substratos, os chamados IRS (*Insulin Receptor Substrate*). Os IRS, por sua vez, facilitam a interação do receptor com outros substratos, ativando diversas vias de sinalização, principalmente a da *fosfatidilinositol 3-quinase* (PI3K) e das *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK). Os efeitos da insulina no organismo podem ser divididos em: precoces, intermediários e tardios.

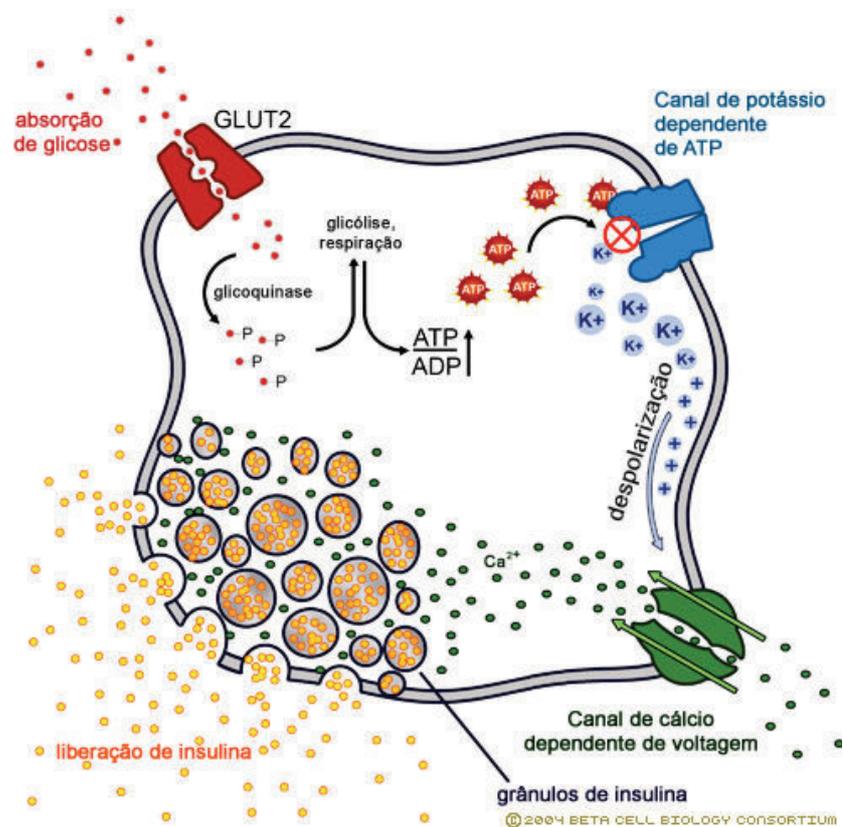


Figura 2: Representação esquemática da secreção de insulina induzida por glicose. A secreção de insulina pelas células-beta é disparada por um aumento nos níveis sanguíneos de glicose. Após a captação de glicose por GLUT2, seu metabolismo causa um aumento na razão ATP/ADP. Este aumento inativa o canal de potássio dependente de ATP, causando uma despolarização na membrana, e consequentemente abrindo os canais de cálcio dependentes de voltagem, permitindo um influxo de Ca^{2+} . O aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} leva à liberação de insulina. (Adaptado de Beta Cell Biology Consortium, disponível em http://www.betacell.org/content/articlepanelview/article_id/1/panel_id/2)

Entre os efeitos precoces está o transporte de glicose para o interior das células, processo mediado através do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4). Cerca de 90% desse transportador está sequestrado intracelularmente, mas a ligação de insulina ao seu receptor causa seu recrutamento à membrana, estimulando a entrada de glicose na célula (Figura 3).

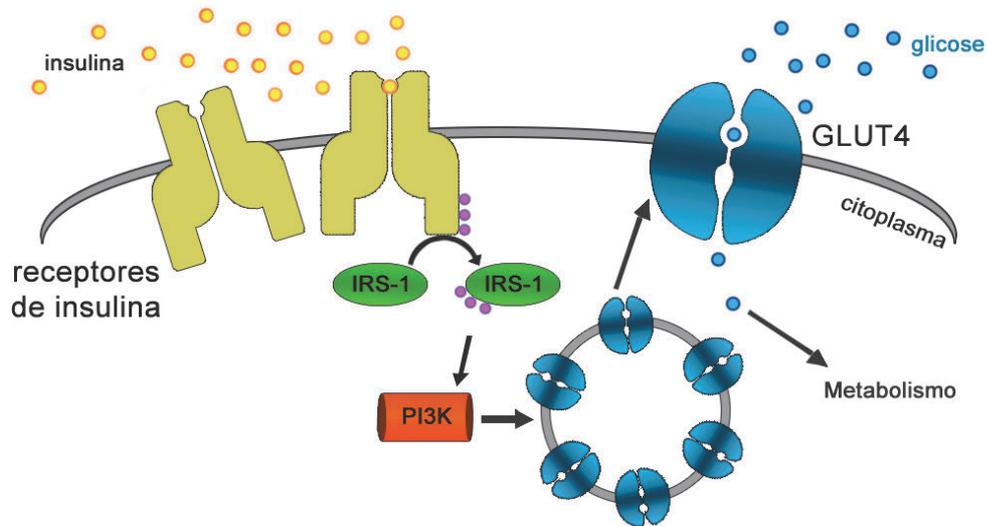


Figura 3: Representação esquemática do transporte de glicose estimulado por insulina. A ligação de insulina em seus receptores, leva ao recrutamento de GLUT4 para a membrana celular, possibilitando que a glicose seja transportada para dentro das células efetivamente, causando uma diminuição na glicemia.

A insulina também é responsável por modular a fosforilação de enzimas envolvidas em processos metabólicos, estimulando e inibindo diversas vias (Tabela 1) e, mais tardiamente, medeia efeitos mitogênicos e de crescimento celular através das vias de MAPK.

Tabela 1: Efeitos da insulina no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas.

Efeitos metabólicos	Insulina estimula	Insulina inibe
Metabolismo de carboidratos	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte de glicose através da membrana celular no tecido adiposo e músculo • Glicólise no músculo e tecido adiposo • Síntese de glicogênio no músculo e fígado 	<ul style="list-style-type: none"> • Quebra de glicogênio no músculo e fígado • Glicogenólise e gliconeogênese no fígado
Metabolismo de lipídios	<ul style="list-style-type: none"> • Síntese de ácidos graxos e triacilglicerol nos tecidos • Captação de triacilglicerídeos do sangue para o tecido adiposo e músculo • Síntese de colesterol no fígado 	<ul style="list-style-type: none"> • Lipólise no tecido adiposo • Oxidação de ácidos graxos no músculo e fígado • Cetogênese
Metabolismo de proteínas	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte de aminoácidos para os tecidos • Síntese de proteínas no músculo, tecido adiposo, fígado e outros tecidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Degradação de proteína no músculo • Formação de uréia

1.3. *Diabetes mellitus*

O crescimento vertiginoso do número de pacientes diabéticos no Mundo tem levado a se considerar o Diabetes mellitus (DM) como um grave problema de Saúde Pública. Estima-se que o diabetes, que, atualmente, acomete 347 milhões de pacientes, seja a sétima principal causa de morte em 2030 (Danaei; Finucane *et al.*, 2011).

A classificação atual do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento. A classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde e pela Associação Americana de Diabetes, e recomendada pela Sociedade Brasileira de Diabetes, inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), causado pela destruição autoimune das células-beta; DM tipo 2 (DM2), caracterizada por defeitos na ação e na secreção de insulina; DM gestacional, classificada como qualquer intolerância a glicose com início ou diagnóstico durante a gestação, mas que na maioria dos casos é revertida após o parto; e outros tipos específicos de DM, que são formas menos comuns do DM cujos defeitos ou processos causadores podem ser identificados, como, por exemplo, defeitos genéticos na função das células-beta. Existem ainda duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares.

A incidência de pacientes que apresentam DM1 tem crescido constantemente em países desenvolvidos desde a década de 50 até o presente, com a estimativa alarmante de que dobrará em crianças de até 5 anos até 2020 (Patterson; Dahlquist *et al.*, 2009). O DM1, caracterizado pela destruição autoimune das células-beta, apresenta um forte componente inflamatório, que provoca uma deficiência absoluta na produção de insulina, impedindo o recrutamento de GLUT4 para a membrana das

células, o que causa uma dificuldade na absorção de glicose, levando conseqüentemente a um nível elevado e constante desse açúcar no sangue (Figura 4). Essa destruição autoimune ocorre quando numa inflamação local das ilhotas pancreáticas (insulinitis) elas são infiltradas por macrófagos e linfócitos, os quais secretam uma variedade de citocinas, às quais as células-beta são extremamente sensíveis (Nielsen; Karlsen *et al.*, 1999; Nielsen; Sparre *et al.*, 2004).

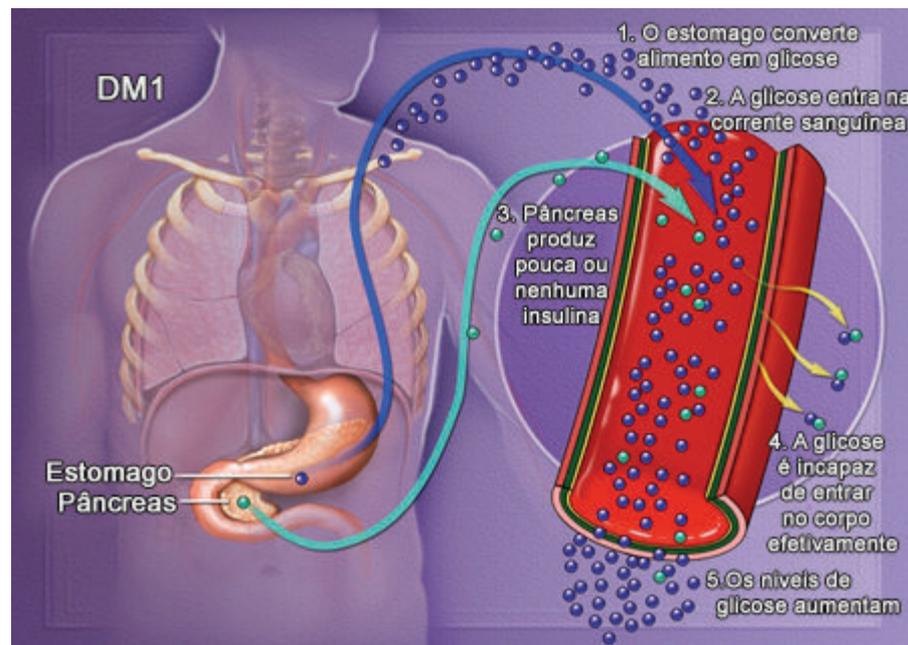


Figura 4: Representação esquemática da insuficiência insulínica em um indivíduo com DM1. Após a destruição autoimune das células-beta, o pâncreas passa a produzir pouca ou nenhuma insulina, a glicose então é incapaz de entrar nas células efetivamente, causando um aumento na glicemia (Adaptado de Clinical Islet Transplantation Consortium, disponível em <http://www.citisetstudy.org/islet.html>).

Devido à deficiência absoluta na produção de insulina, os pacientes portadores de DM1 requerem administração de doses diárias de insulina exógena para manutenção de níveis normais de glicose na corrente sanguínea. Para corrigir adequadamente a glicemia, a insulinoterapia exige rigidez na aderência ao tratamento, para atrasar, ou até mesmo impedir, o aparecimento de complicações, como retinopatia, nefropatia, neuropatia e doenças cardiovasculares, que surgem devido à descompensação metabólica frequentemente presente no organismo

(Group, 1993). Episódios de hipoglicemia e ganho de peso são outras consequências da administração contínua de insulina exógena (Kido; Burks *et al.*, 2000; Dong e Woo, 2001). Há pacientes denominados “hiperlábeis”, que mesmo com a administração do hormônio a partir de injeções subcutâneas, são sujeitos a variações amplas e frequentes da glicemia, e continuam a apresentar eventos hipoglicêmicos preocupantes e muitas vezes fatais (Group, 1993; Adverse events and their association with treatment regimens in the diabetes control and complications trial, 1995; Hypoglycemia in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1997). Nesses casos, o transplante de tecido produtor de insulina é uma terapia a ser considerada.

1.3.1. *Transplante de ilhotas pancreáticas*

Visando o controle mais fisiológico da glicemia e a melhoria na qualidade de vida de pacientes diabéticos hiperlábeis, o transplante de ilhotas pancreáticas surgiu como um avanço clínico no controle glicêmico (Gleason; Gonzalez *et al.*, 2000; Kido; Burks *et al.*, 2000; Shapiro; Lakey *et al.*, 2000; Dong e Woo, 2001). As ilhotas são isoladas do pâncreas de doadores cadavéricos, sendo transplantadas para o fígado do paciente diabético receptor (Figura 5). Esse tipo de transplante é menos invasivo do que o transplante de pâncreas órgão sólido, apresentando menos efeitos colaterais, decorrentes de complicações cirúrgicas, e melhor resposta terapêutica (Kido; Burks *et al.*, 2000).

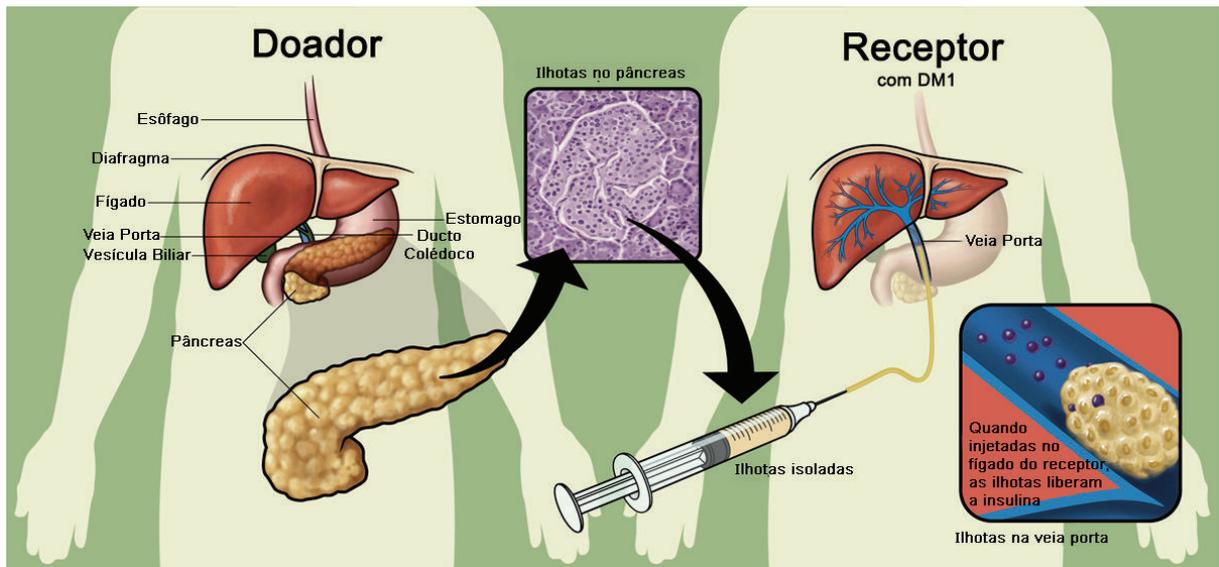


Figura 5: Representação esquemática do transplante de ilhotas pancreáticas. As ilhotas são isoladas do pâncreas de doadores de órgãos e infundidas na veia porta do fígado do paciente diabético receptor. (Adaptado de Naftanel e Harlan, 2004)

O transplante de ilhotas sofreu um enorme avanço após a publicação dos resultados do Protocolo de Edmonton de regime de imunossupressão, levando à insulino-independência em 90% dos pacientes com DM1 transplantados após um ano (Shapiro; Lakey *et al.*, 2000; Ryan; Lakey *et al.*, 2001; Markmann; Deng *et al.*, 2003; Froud; Ricordi *et al.*, 2005). Contudo, posteriormente, foram apresentados diversos estudos mostrando uma deterioração gradual do perfil metabólico, levando à necessidade de reintrodução de insulina exógena: apenas 10% dos pacientes que receberam ilhotas mantiveram-se independentes de insulina após 5 anos (Desai; Goss *et al.*, 2003; Froud; Ricordi *et al.*, 2005; Ryan; Paty *et al.*, 2005). Apesar da causa desse declínio na insulino-independência após o transplante de ilhotas permanecer obscuro, alguns acreditam que pode estar refletindo uma toxicidade associada ao uso a longo prazo de drogas imunossupressoras, incluindo a rapamicina, em células-beta.

Uma das maiores dificuldades do transplante de ilhotas é a baixa disponibilidade de pâncreas provenientes de doadores de órgãos, além da baixa sobrevida dessas

células após o transplante e dos efeitos colaterais ligados à imunossupressão (Ryan; Paty *et al.*, 2005; Kaminitz; Stein *et al.*, 2007; Wenzlau; Juhl *et al.*, 2007). Além disso, quando colocadas em cultura, tanto a massa de células-beta quanto a secreção de insulina pelas células das ilhotas são reduzidas, gradativamente, dificultando a expansão do número de ilhotas em cultura para posterior transplante em pacientes diabéticos hiperlábeis. Por isso, é importante compreender os mecanismos envolvidos na proliferação e diferenciação das células-beta a fim de desenvolver protocolos para aumentar o número disponível dessas células para transplante, ou ainda, para permitir a indução da regeneração da massa endógena de células-beta de pacientes com DM1 recém-diagnosticados e DM2 dependentes de insulina (Galsgaard; Nielsen *et al.*, 1999; Gleason; Gonzalez *et al.*, 2000).

1.3.2. O papel das citocinas

Durante a *insulinitis*, macrófagos ativados e células-T liberam citocinas como interleucina-1 β (IL-1 β), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) e *interferon- γ* (IFN- γ) na vizinhança das células-beta, contribuindo para a disfunção e apoptose dessas células (Eizirik e Mandrup-Poulsen, 2001; Kaminitz; Stein *et al.*, 2007). A expressão de TNF- α e IL-1 β já foi observada no pâncreas de pacientes no começo de DM1 e em modelos animais desta doença (Eizirik e Mandrup-Poulsen, 2001; Kaminitz; Stein *et al.*, 2007; Uno; Imagawa *et al.*, 2007), levando ao desenvolvimento de ensaios clínicos baseados no uso de bloqueadores de TNF- α (Mastrandrea; Yu *et al.*, 2009) ou IL-1 β (Pickersgill e Mandrup-Poulsen, 2009) para a prevenção de DM1. Exposição *in vitro* de células-beta humanas ou de roedores a uma combinação dessas citocinas, mas não a uma destas citocinas isoladamente, desencadeia a

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

1.4. Apoptose

A apoptose é um suicídio programado de mecanismo intrínseco que resulta na fragmentação controlada das células em corpos apoptóticos, os quais são então reconhecidos e englobados por células do entorno e fagócitos, de modo que além de limitar um dano celular direto devido à liberação de conteúdo citoplasmático, este conteúdo não dispara uma inflamação através do contato com neutrófilos, macrófagos e outras células do sistema imune (Duprez; Wirawan *et al.*, 2009).

Duas famílias principais de proteínas conservadas participam deste processo: a família *B-cell lymphoma 2* (BCL2), responsável pela integridade da mitocôndria (Youle e Strasser, 2008), e as *cysteine-aspartic-acid-proteases*, ou caspases, que medeiam a fase de execução da apoptose (Fuentes-Prior e Salvesen, 2004).

Doze caspases foram identificadas nos seres humanos como pertencendo às subfamílias de caspases apoptóticas e inflamatórias. As caspases apoptóticas podem ser divididas em iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e -10) e executoras (caspase-3, -6 e -7). As caspases possuem essencialmente uma cisteína e requerem um aspartato no sitio de clivagem de seu substrato. Elas são expressas como zimógenos, sendo ativadas sob estímulos específicos (Salvesen e Riedl, 2008). Em mamíferos, a apoptose ocorre essencialmente através de duas vias: a intrínseca e a extrínseca, com um ponto de convergência mediado pela proteína *BH3 interacting domain death agonist* (BID) (Duprez; Wirawan *et al.*, 2009).

A via intrínseca (Figura 6) é ativada por uma variedade de estímulos, como: dano ao DNA e citotoxicidade, agindo pela mitocôndria, controlada pelos membros da

família BCL2, que possui proteínas pró- e anti-apoptóticas (Youle e Strasser, 2008). Essas proteínas possuem domínios altamente conservados chamados de *BCL2 Homology Domains* (BH), que são essenciais para suas interações e atividades. Muitas destas proteínas possuem os domínios BH1-3, mas algumas possuem apenas o BH3, sendo chamadas de proteínas *BH3-only*. Durante o estresse celular, proteínas *BH3-only* são ativadas e antagonizam os efeitos anti-apoptóticos de BCL2 e *BCL extra large* (BCLXL), também conhecido como BCL2L1, desinibindo as proteínas pró-apoptóticas *BCL2 associated X protein* (BAX) e *BCL2 homologous antagonist/killer* (BAK), conseqüentemente levando à formação de um poro na membrana externa da mitocôndria (MOM) e ao extravasamento de citocromo c e de outras proteínas pró-apoptóticas.

O mecanismo responsável pela liberação dos mediadores de morte celular do espaço intermembranas da mitocôndria ainda é sujeito à discussão. Primeiramente, acreditava-se que a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) da membrana interna causaria um inchaço do espaço da matriz mitocondrial, que causaria a ruptura de MOM e liberaria citocromo c, entre outros, para o citosol (Skulachev, 1996; Marzo; Brenner *et al.*, 1998; Kroemer e Reed, 2000). Contudo, mostrou-se recentemente que uma abertura contínua do PTP está envolvida com necrose e isquemia, e não com apoptose (Baines; Kaiser *et al.*, 2005; Basso; Fante *et al.*, 2005; Nakagawa; Shimizu *et al.*, 2005). Além disso, a liberação de citocromo c pode ocorrer na ausência de despolarização mitocondrial e sem perda da integridade de MOM. Estas observações sugerem que, ao invés de uma ruptura, deve ocorrer um processo mais seletivo, como a formação de um poro em MOM (Liu; Kim *et al.*, 1996; Pavlov; Priault *et al.*, 2001; Wei; Zong *et al.*, 2001; De Giorgi; Lartigue *et al.*, 2002; Guo; Pietkiewicz *et al.*, 2004).

Contudo, alguns estudos subsequentes não confirmaram a formação de um poro VDAC/BAX (Rostovtseva; Antonsson *et al.*, 2004) ou uma interação direta entre estas duas proteínas (Mikhailov; Mikhailova *et al.*, 2001). Já foi demonstrado também, que BCLXL favorece o estado aberto do VDAC (Vander Heiden; Chandel *et al.*, 2000; Vander Heiden; Li *et al.*, 2001) e que BID truncado (tBID) leva a um fechamento irreversível de VDAC (Rostovtseva; Antonsson *et al.*, 2004). Entretanto, nenhuma interação direta do VDAC tanto com tBID quanto com BCLXL foi demonstrada até o momento.

Outros estudos mostram que com o estímulo apoptótico, BAX sofre mudanças conformacionais, sendo translocado para a MOM onde é inserido e oligomerizado, formando o *mitochondrial apoptosis-induced channel* (MAC) (Wolter; Hsu *et al.*, 1997; Goping; Gross *et al.*, 1998; Antonsson; Montessuit *et al.*, 2001; Cartron; Arokium *et al.*, 2005), responsável pelo extravasamento de citocromo c e de outras proteínas pró-apoptóticas, como as *second mitochondria-derived activator of caspases* (SMAC). BAK, por sua vez, está inserido na MOM de células normais, e sua ativação também envolve mudanças conformacionais e oligomerização (Griffiths; Dubrez *et al.*, 1999; Wei; Lindsten *et al.*, 2000; Mikhailov; Mikhailova *et al.*, 2003). Não se sabe ao certo como este atua na formação do MAC, mas sabe-se que em células deficientes para BAX, BAK é capaz de desencadear a liberação de citocromo c, parecendo ter uma função redundante em relação a BAX (Wei; Zong *et al.*, 2001). BCLXL é encontrado tanto em membranas intracelulares como em forma solúvel no citosol. Esta forma solúvel de BCLXL é translocada para a mitocôndria durante a apoptose (Hsu; Wolter *et al.*, 1997). BCL2 e BCLXL heterodimerizam com BAX, e a superexpressão de ambos protege as células de apoptose induzida por diversos estímulos. Essas descobertas indicam que ambas estas proteínas anti-

apoptóticas são funcionalmente redundantes (Chao; Linette *et al.*, 1995). Inclusive, a superexpressão de BCL2 inibe tanto a ativação quanto a oligomerização de BAX (Antonsson; Montessuit *et al.*, 2001; Mikhailov; Mikhailova *et al.*, 2001).

O citocromo c liberado se associa a *apoptotic peptidase activating factor 1* (APAF1) e ATP, recrutando a pró-caspase-9 e ativando-a, formando o complexo denominado apoptossomo (Riedl e Salvesen, 2007), que é capaz de clivar e ativar as caspases efetoras, -3, -6 e -7.

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

Já a via extrínseca é induzida após estimulação dos receptores de morte pertencentes à família do receptor de TNF (TNFR). A sinalização induzida por TNFR leva à formação do Complexo I, que é composto por TNFR1, *TNFR-associated death domain* (TRADD), *TNFR-associated fator 2* (TRAF2) e *receptor interacting protein 1* (RIP1). A endocitose de TNFR, pela formação desse complexo, é seguida pela formação do Complexo II. Esse complexo, composto por *Fas-associated death domain* (FADD) e, apenas no Complexo II, por TRADD, é capaz de recrutar e ativar as caspases-8 e -10 (Peter e Krammer, 2003; Wilson; Dixit *et al.*, 2009), levando à ativação das caspases efetoras -3, -6 e -7.

As IAPs CIAP1 e CIAP2 inibem a apoptose interagindo com TRAF2, mediando a ubiquitinação de RIP1, que resulta em induzir a ativação de NF- κ B (Lacasse; Mahoney *et al.*, 2008), um fator de transcrição, que é então translocado para o núcleo onde ativa a transcrição de diversos genes anti-apoptóticos.

O ponto de conversão de ambas as vias ocorre através da proteína *BH3-only* denominada BID. A caspase-8 ativada é capaz de clivar BID gerando sua versão truncada, tBID, que por sua vez interage com BAX, levando à sua inserção na membrana mitocondrial (Duprez; Wirawan *et al.*, 2009).

1.5. Autofagia

A autofagia é um sistema fisiológico conservado de degradação intracelular projetado para a degradação de proteínas citoplasmáticas e organelas disfuncionais após seu sequestro para os autofagossomos. Esse processo é fortemente regulado e tem um papel importante no crescimento celular, no desenvolvimento e na homeostase, onde ajuda a manter o balanço entre a síntese, degradação e reciclagem de componentes celulares (Levine e Klionsky, 2004; Levine e Kroemer, 2008). A autofagia é induzida dinamicamente por privação de nutrientes para fornecer os aminoácidos necessários para a célula, ajudando o organismo a se adaptar (Kuma; Hatano *et al.*, 2004). Esse processo é rapidamente induzido após privação de nutrientes em leveduras (Tsukada e Ohsumi, 1993) e em camundongos recém-nascidos (Kuma; Hatano *et al.*, 2004), mostrando que é uma estratégia básica de sobrevivência em todos os eucariotos. O papel fisiológico da autofagia foi estudado em diversos organismos e o conhecimento atual indica que a autofagia está envolvida não apenas na adaptação à privação de nutrientes, mas também no controle de qualidade de proteínas intracelulares e organelas, para manter as funções celulares, o desenvolvimento, crescimento, remoção de micróbios intracelulares, apresentação de antígenos e proteção contra doenças (Hara; Nakamura *et al.*, 2006; Komatsu; Waguri *et al.*, 2006; Levine, 2007; Nakai; Yamaguchi *et al.*, 2007; Virgin e Levine, 2009; Mizushima; Yoshimori *et al.*, 2010;

Levine; Mizushima *et al.*, 2011), removendo componentes desnecessários, redundantes ou gastos. Inclusive, a existência de níveis basais de autofagia constitutiva parece adequada para manter a qualidade de proteínas e organelas (Mizushima e Hara, 2006). Assim, a autofagia pode ser considerada como um mecanismo de proteção celular.

Contudo, a ativação da autofagia também pode levar a uma forma de morte celular não-apoptótica chamada de morte celular programada tipo 2, ou morte celular autofágica (Tsujimoto e Shimizu, 2005). Essa forma de morte celular ainda permanece principalmente como uma definição morfológica (associada a abundantes autofagossomos), uma vez que nenhuma evidência está disponível de que haja um mecanismo específico de morte autofágica (Tsujimoto e Shimizu, 2005; Kroemer e Levine, 2008). Em todo caso, parece concebível que a autofagia possa promover morte celular através de uma degradação alterada de constituintes celulares, dependendo do contexto celular e ambiental (Levine e Yuan, 2005).

Além do papel fisiológico da autofagia, já foi sugerido que a desregulação deste processo possui papéis importantes em uma variedade de doenças (Levine e Kroemer, 2008), particularmente naquelas que aumentam o estresse celular.

Apesar de um grupo de genes envolvidos neste processo ter sido identificado (*autophagy-related gene*, Atg), muito ainda é desconhecido sobre este evento que ocorre frequentemente no desenvolvimento, tumorigênese, neurodegeneração e outros processos fisiológicos e patológicos. Duas vias relativamente bem estabelecidas que regulam a autofagia, envolvem o *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), mas, aparentemente, elas tem pouco *crosstalk* entre si. Uma inibição da atividade de mTOR ou uma diminuição nos níveis

de IP3 podem ambos induzir autofagia (Kondo; Kanzawa *et al.*, 2005; Criollo; Maiuri *et al.*, 2007).

A via clássica de sinalização da autofagia ocorre através de mTOR (Figura 7), uma quinase importante em controlar a tradução e a progressão do ciclo celular, assim como regular negativamente a autofagia. Em resposta a privação de nutrientes ou pelo tratamento com rapamicina, a proteína mTOR está pouco fosforilada e sua atividade é inibida, conseqüentemente, o complexo ULK-ATG13-FIP200 é ativado, levando à indução da formação do fagossomo (Jung; Jun *et al.*, 2009). Isto requer a nucleação de vesículas, que é iniciada pela formação do complexo da fosfatidilinositol 3-quinase classe III (PI3KC3). Nesse complexo, Beclin-1, também conhecida por ATG6, serve de plataforma para a ligação de PI3KC3 e outros membros desse complexo, que regulam positivamente a atividade dessa quinase (Pattingre; Espert *et al.*, 2008). A formação desse complexo leva à geração de PI3P. Conseqüentemente, outras proteínas ATG que medeiam a alongação de vesículas são recrutadas e dois sistemas de conjugação estão implicados nesse processo. Primeiramente, é formado um complexo multimérico constituído por ATG12-ATG5-ATG16 (Mizushima; Kuma *et al.*, 2003); em segundo lugar, LC3, também denominado ATG8, é lipidizado por sua ligação com fosfatidiletanolamina (PE). Enquanto o *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3), ou LC3-I, está localizado no citoplasma, LC3-PE, mais comumente denominado LC3-II, se liga especificamente a membranas do autofagossomo. Finalmente, seu conteúdo é degradado por hidrolases provenientes de sua fusão com lisossomos.

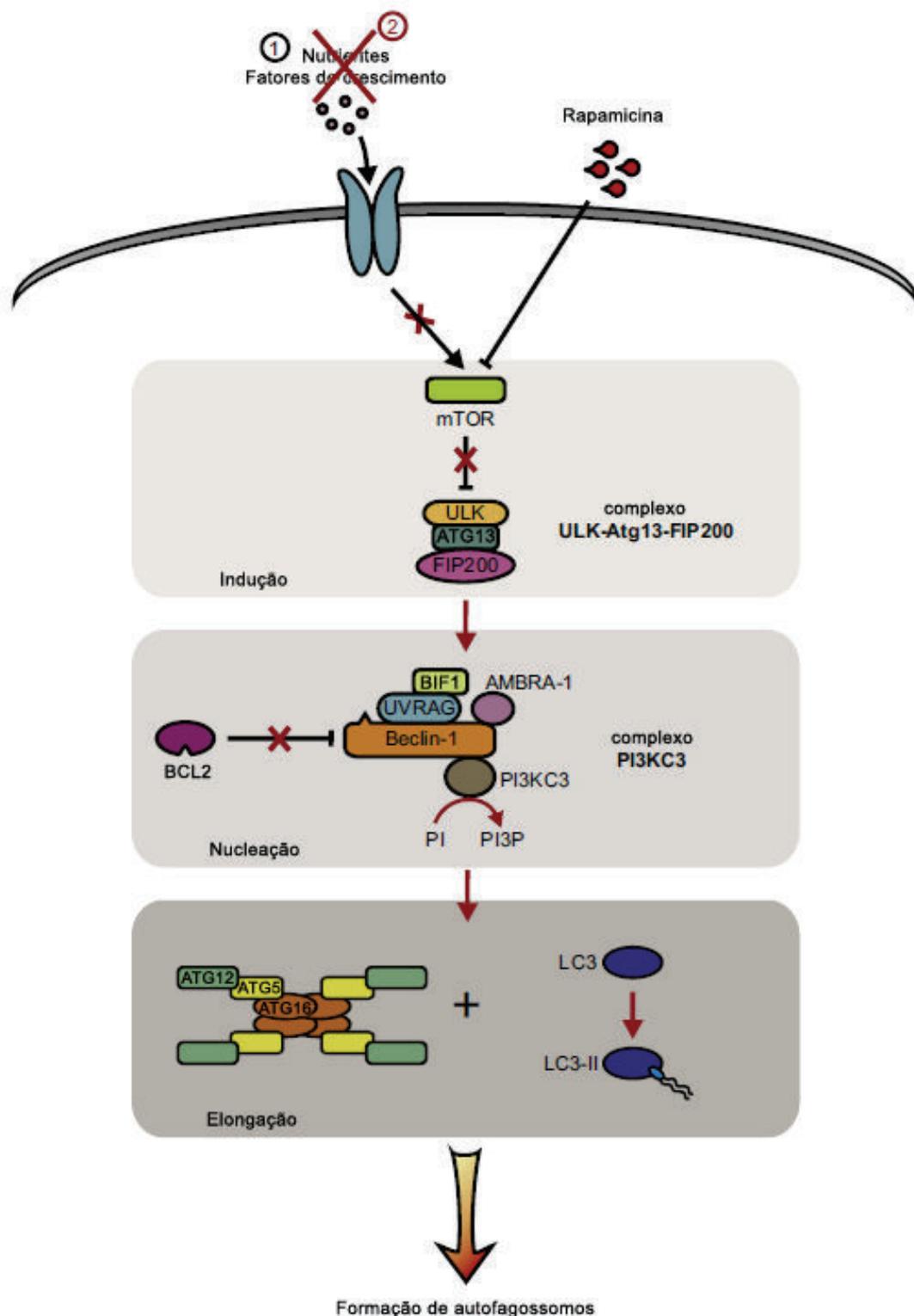


Figura 7: Representação esquemática da sinalização autofágica. Na presença de nutrientes e fatores de crescimento (1) mTOR é ativado, levando à inibição da autofagia. Privação de nutrientes ou fatores de crescimento (2), ou ainda o tratamento com rapamicina, leva à inibição de mTOR e ativação do complexo ULK-ATG13-FIP200, que induz a formação de autofagossomos. Primeiramente ocorre a nucleação de vesículas, que requer a montagem do complexo PI3KC3. A geração subsequente de PI3P leva ao recrutamento de outras proteínas ATG e à elongação da vesícula. Durante este processo, um complexo multimérico constituído por ATG12-ATG5-ATG16 é formado, e LC3 é lipidizado (LC3-II). BCL2 é capaz de inibir a autofagia através de uma ligação direta a Beclin-1. (Adaptado de Duprez; Wirawan *et al.*, 2009).

É importante notar que cada vez mais pontos de ligação entre essa via e a via apoptótica têm sido encontrados. Por exemplo, BCL2, entre outros membros anti-apoptóticos da mesma família, reprime a autofagia por se ligar a Beclin-1 e inibir o processo autofágico (Patingre; Tassa *et al.*, 2005). Durante a privação de nutrientes, BCL2 é fosforilado, diminuindo sua afinidade por Beclin-1, permitindo o recrutamento dos membros do complexo PI3KC3, estimulando a autofagia (Wei; Patingre *et al.*, 2008).

1.5.1. *Autofagia em células-beta pancreáticas*

O papel da autofagia em diabetes ainda é bastante obscuro, contudo, observações recentes sugerem que a autofagia pode ter uma função importante no desenvolvimento e prevenção do diabetes.

Já foi descrito que agregados de proteínas ubiquitinadas são formados em células-beta durante o estresse oxidativo associado com hiperglicemia, sendo sua formação regulada por autofagia (Kaniuk; Kiraly *et al.*, 2007). Como o acúmulo de agregados proteicos pode danificar células, esses dados sugerem que a autofagia pode contribuir para a regulação da sobrevivência e morte de células-beta.

Recentemente foi mostrado que o tratamento de células INS-1E, derivadas de insulinoma de rato, assim como de ilhotas de rato e humanas, com palmitato aumenta a formação de vacúolos autofágicos nessas células (Martino; Masini *et al.*, 2012). Esses efeitos foram mantidos por até 24 h de incubação e associados com um declínio na sobrevivência celular correlacionada tanto com a concentração de palmitato como com o tempo de incubação.

Entretanto, ainda não foi demonstrada uma relação direta entre autofagia e a morte de células-beta e nenhum estudo até hoje mostra uma relação de citocinas,

tão conhecidamente relacionadas com o desenvolvimento do DM1, com a indução de autofagia em células-beta.

1.6. Células-beta e gravidez

Mudanças nas ilhotas durante a gravidez foram observadas desde 1930 (Cramer, 1933), nos anos 60 foi constatado que havia um aumento na secreção de insulina tanto após estímulo com glicose, quanto em jejum (Spellacy; Goetz *et al.*, 1965).

Diversos estudos mostram que a massa de ilhotas pancreáticas aumenta aproximadamente duas vezes durante a gravidez tanto por hipertrofia como por hiperplasia (Costrini e Kalkhoff, 1971; Green e Taylor, 1972; Hubinont; Dufrane *et al.*, 1985; Moes; Schuiling *et al.*, 1993; Weinhaus; Stout *et al.*, 1996). Ainda não há informações sobre a existência de neogênese durante a gravidez (Sorenson e Brelje, 2009).

Há evidências também de um aumento na secreção de insulina induzida por glicose, ocorrendo um deslocamento na curva da secreção de insulina em resposta à indução por glicose (Green e Taylor, 1972), assim como uma diminuição no limiar de secreção de insulina induzida por glicose (Parsons; Brelje *et al.*, 1992).

Um ou mais dos hormônios que são aumentados durante a gravidez deveria ser o responsável por estas mudanças. De inúmeros testes realizados *in vitro* e *in vivo* para comparar os efeitos de hormônios, apenas a prolactina (PRL), classicamente descrita pela sua função na lactação, e o lactogênio placentário, que também atua através do receptor de prolactina (PRLR), induzem as mesmas mudanças nas ilhotas quando comparadas com aquelas observadas durante a gravidez (revisado em Sorenson e Brelje, 1997).

1.6.1. *Prolactina*

Sabe-se que, nas ilhotas pancreáticas, as células-beta são as únicas que expressam o PRLR (Polak; Scharfmann *et al.*, 1990; Sorenson e Stout, 1995; Freemark; Driscoll *et al.*, 1997; Brelje; Svensson *et al.*, 2002), apoiando a hipótese de que as mudanças moleculares que parecem ser responsáveis pelas alterações observadas nas células-beta durante a gravidez esteja relacionada à ativação do PRLR. Além disso, camundongos fêmeas deficientes para PRLR apresentam, somente durante a gravidez, uma diminuição na taxa de absorção de glicose e na secreção de insulina induzida por glicose quando comparadas com camundongas selvagens (Huang; Snider *et al.*, 2009).

O PRLR ativa a *Janus kinase 2* (JAK2) levando à fosforilação, dimerização, e translocação nuclear da proteína *Signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5) que se liga a sequências consenso específicas do DNA nos promotores dos genes-alvo, assim regulando a transcrição (Schindler e Darnell, 1995). Essa via já foi demonstrada e sua ativação foi caracterizada em células-beta de roedores por outros grupos (Stout; Svensson *et al.*, 1997; Brelje; Svensson *et al.*, 2002; Brelje; Stout *et al.*, 2004), e em células humanas pelo nosso grupo (Labriola; Montor *et al.*, 2007).

Já foi demonstrado que o tratamento com PRL que leva a um aumento da secreção de insulina, uma característica da gravidez, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Brelje; Allaire *et al.*, 1989; Brelje; Scharp *et al.*, 1993; Weinhaus; Stout *et al.*, 1996; Weinhaus; Stout *et al.*, 2007). Resultados do nosso laboratório mostraram que o tratamento de células-beta humanas com rhPRL causa um aumento na produção e na estocagem de insulina, com liberação adequada de insulina em resposta a

estímulos fisiológicos (Labriola; Montor *et al.*, 2007). O metabolismo de glicose é central para a secreção de insulina, uma vez que é o aumento da relação ATP/ADP, resultante da glicólise, que leva ao aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, desencadeando a liberação de insulina (Figura 2). Há evidências de que o fator crucial para o aumento na sensibilidade à glicose durante a gravidez é devido a um aumento da atividade da glicoquinase, sensor crítico de glicose, e, conseqüentemente, de seu metabolismo. O RNA mensageiro (mRNA), a proteína e a atividade enzimática da glicoquinase estão aumentados na gravidez, o que também foi reproduzido em ensaios *in vitro* pelo tratamento com PRL (Sorenson e Brelje, 2009). Interessantemente, a extensão do aumento da glicoquinase durante a gravidez corresponde àquele esperado para atingir a redução do limiar de liberação de insulina induzida por glicose obtida neste período. Além disso, a região situada a montante do promotor da glicoquinase contém diversos sítios de ligação de STAT5, sugerindo seu envolvimento nesse processo (Sorenson e Brelje, 2009). STAT5 está envolvida no aumento da secreção de insulina também por ser responsável pela transcrição de Glut2 e de insulina (Figura 8), aumentando assim tanto a captação de glicose, quanto a produção desse hormônio (Sorenson e Brelje, 2009). STAT5 causa ainda um aumento na transcrição do próprio PRLR (Sorenson e Brelje, 2009).

Já foi observado também que a PRL é um fator de crescimento potente, assim como um fator insulínico para células-beta de roedores (Nielsen; Linde *et al.*, 1989; Nielsen; Galsgaard *et al.*, 2001). Resultados prévios do nosso laboratório demonstraram um efeito benéfico do tratamento com PRL humana recombinante (rhPRL) na proliferação de culturas primárias de ilhotas humanas, levando a uma expansão final de células produtoras de insulina de três vezes em quatro dias (Labriola; Montor *et al.*, 2007).

A regulação de Ciclina D2 é importante para o crescimento de células-beta, e parece ser alvo da regulação de PRL por intermédio de STAT5 (Friedrichsen; Galsgaard *et al.*, 2001; Kushner; Ciemerych *et al.*, 2005; Friedrichsen; Neubauer *et al.*, 2006). O mesmo ocorre com *B-cell lymphoma 6* (BCL6), que é responsável por diminuir os níveis de inibidores do ciclo celular (Karnik; Chen *et al.*, 2007). Consequentemente, um aumento na expressão de ambas estas proteínas causada por STAT5 levaria a um aumento da divisão celular (Figura 8), mais uma vez apoiando a hipótese de que a expansão de células-beta durante a gravidez é regulada por PRL.

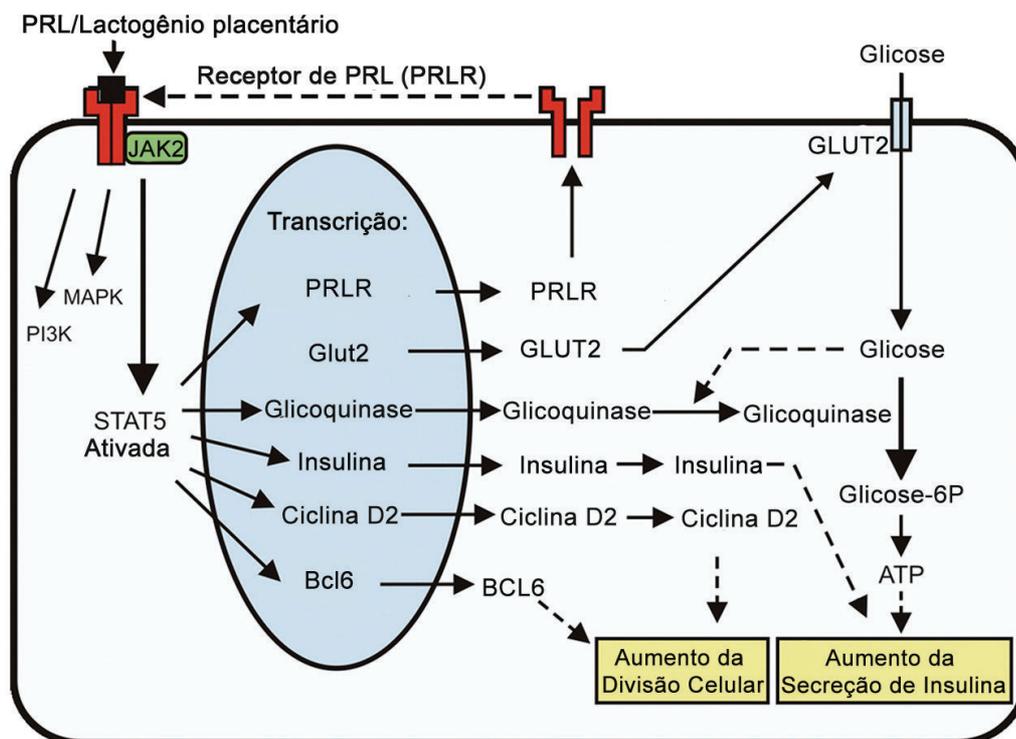


Figura 8: Representação esquemática das alterações causadas através da ativação do PRLR em células-beta. Durante a gravidez, ocorre um aumento na massa de ilhotas e a secreção de insulina se torna progressivamente mais sensível à estimulação com glicose. Isso ocorre devido à ativação de STAT5 que leva a um aumento na transcrição de PRLR, Glut2, glicoquinase, insulina, ciclina D2 e Bcl6 (Adaptado de Sorenson e Brelje, 2009).

Relatos prévios mostraram ainda, que culturas primárias de células-beta de rato, quando tratadas com PRL, apresentam expressão reduzida de genes relacionados com a apoptose e transcrição aumentada de genes relacionados com maior

sobrevivência (Bordin; Amaral *et al.*, 2004). Além disso, células INS-1 tratadas com uma combinação de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , na presença de hormônio de crescimento (GH), que é da mesma família, sendo estruturalmente similar a PRL, sinalizando também pela via JAK/STAT, apresentaram uma diminuição na taxa de apoptose (Jensen; Galsgaard *et al.*, 2005).

Outros estudos mostraram que a PRL foi capaz de induzir a proteção de morte celular de células INS-1 e de culturas primárias de células-beta de camundongo induzida tanto por estreptozotocina, que causa necrose e apoptose através de dano ao DNA, ativação de poli-ADP-ribose polimerase e depleção de NAD⁺ (Fujinaka, 2007), quanto por dexametasona, que induz a via intrínseca da apoptose (Weinhaus; Bhagroo *et al.*, 2000; Fujinaka; Takane *et al.*, 2007).

Contudo, até o presente momento, os mecanismos envolvidos nos efeitos citoprotetores da prolactina em células-beta só foi analisado em modelos animais (Jensen; Galsgaard *et al.*, 2005; Fujinaka; Takane *et al.*, 2007).

1.7. Modelos de células-beta pancreáticas

Um dos maiores obstáculos na pesquisa do diabetes, e de células-beta como um todo, é a falta de um bom modelo de células-beta pancreáticas humanas, não apenas pela dificuldade em obtê-las, como também em cultivá-las por longos períodos de tempo (Adcock; Austin *et al.*, 1975; Gragnoli, 2008). Para tanto, linhagens celulares de insulinoma de roedores têm sido amplamente utilizadas tanto para estudos de mecanismos fisiológicos e patofisiológicos envolvidos no metabolismo de glicose, como para estabelecer modelos *in vitro* para o dano causado em células-beta durante o DM1 (Gylfe e Hellman, 1986; Meglasson; Manning *et al.*, 1986; Hill; Oberwetter *et al.*, 1987; Trautmann e Wollheim, 1987;

Frodin; Sekine *et al.*, 1995; Verspohl; Tollkuhn *et al.*, 1995). No entanto, estudos comparando as sequências localizadas a montante do, ou flanqueando o sítio de transcrição do gene de insulina em diferentes espécies levou à conclusão de que os promotores de roedores são bastante diferentes daqueles de humanos (Hay e Docherty, 2006). Além disso, a formação de óxido nítrico, descrita como sendo um importante mediador da morte de células-beta induzida por citocinas em roedores, não afeta a morte de células-beta induzida por citocinas em ilhotas humanas (Eizirik; Sandler *et al.*, 1994; Eizirik; Flodstrom *et al.*, 1996). As vias de transdução de sinal induzidas pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α são diferentes (Ortis; Pirot *et al.*, 2008; Ortis; Naamane *et al.*, 2010), e embora ambas estejam presentes durante a inflamação da ilhota, elas parecem surgir em períodos de tempo distintos (Eizirik; Colli *et al.*, 2009). Apesar das linhagens de roedores constituírem importantes ferramentas para o estudo do DM, essas diferenças importantes na resposta induzida por citocinas em roedores e humanos recomendam cuidado quando se tenta traduzir diretamente os resultados obtidos em roedores para a etiologia e terapia do DM humano. Apenas algumas linhagens de células-beta humanas foram descritas, com número alto de passagens em cultura resultando em perda de secreção de insulina (Macfarlane; Chapman *et al.*, 1999; Gartner; Koc *et al.*, 2006).

1.7.1. *Insulinomas*

Os insulinomas são os neoplasmas endócrinos pancreáticos mais comuns, constituindo aproximadamente 17% de todos os tumores neuroendócrinos do trato digestivo (Buchanan; Johnston *et al.*, 1986). São tumores raros, tendo uma prevalência de um em um milhão de pessoas ao ano e uma incidência de quatro

pacientes por um milhão de pessoas ao ano (Boden, 1989; Oberg e Eriksson, 2005; Tucker; Crotty *et al.*, 2006). A maioria dos insulinomas origina-se esporadicamente, em indivíduos com média de idade de 50 anos, sendo normalmente pequenos (menos de 2 cm), solitários e quase sempre benignos (mais de 90% dos casos) (Proye, 1987; Boden, 1989; Oberg e Eriksson, 2005). Apesar disso, aproximadamente 6% dos tumores tornam-se malignos, estando associados com a invasão local dos tecidos adjacentes ou com a presença de metástase no fígado e nos linfonodos (Broder e Carter, 1973; Boden, 1989). A principal manifestação clínica do insulinoma é a hipoglicemia, a qual é ocasionada por secreção descontrolada de insulina pelo tumor (Oberg e Eriksson, 2005).

Para o tratamento do insulinoma, o método de escolha é a ablação do tumor (Menegaux; Schmitt *et al.*, 1993; Oberg e Eriksson, 2005). O principal problema enfrentado pelos cirurgiões consiste na localização exata destes tumores no pré- e, principalmente, no intra-operatório, pois nenhuma técnica de imagem mostra-se suficientemente segura (Machado; Jukemura *et al.*, 1998; Tucker; Crotty *et al.*, 2006). Devido ao fato de serem tumores raros, o conhecimento sobre as mudanças genéticas associadas à iniciação e progressão desses tumores ainda é muito limitado.

1.7.1.1. Linhagens celulares humanas derivadas de insulinomas humanos desenvolvidas em nosso laboratório

Em nosso laboratório, foram estabelecidas e caracterizadas culturas de longo prazo de células-beta humanas (Labriola; Peters *et al.*, 2009). Culturas primárias *ex vivo* obtidas de insulinomas humanos independentes, denominados APM e CPR, e de um caso de nesidioblastose humana (VGA), foram cultivados até a passagem de

número 20 (aproximadamente 20 semanas), apresentando um tempo de dobramento similar (40 h). Todas as linhagens mantêm um padrão de crescimento expansivo principalmente em forma de monocamada, porém, foi observado também a formação de agrupamentos celulares em todas as culturas, mostrando que estas apresentam comportamento similar àquele de uma cultura aderida de ilhotas pancreáticas humanas enriquecidas de células-beta. Entre outros resultados obtidos, foi observado que essas células produzem e secretam insulina e peptídeo-C humano, mas nenhuma delas mostrou um aumento da secreção de insulina induzida por glicose (Tabela 2). É importante mencionar que as linhagens celulares foram monitoradas periodicamente, desde o começo das culturas primárias e a cada três passagens celulares, para a secreção e conteúdo de insulina, assim como para a secreção de insulina induzida por glicose, para garantir a funcionalidade destas populações de células-beta.

Tabela 2: Liberação de insulina, pró-insulina e peptídeo-C e conteúdo de insulina. (Dados de Labriola; Peters *et al.*, 2009)

	VGA	APM	CPR	Células-beta
Liberação de insulina (ng/ng DNA)	$5 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-2} \pm 3 \times 10^{-3}$	$9 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}$	$9 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-5}$
Conteúdo de insulina (ng/ng DNA)	$< 3 \times 10^{-7}$	$< 3 \times 10^{-7}$	$< 3 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4}$
Liberação de pró-insulina (pmol/ng DNA)	$8 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-5}$	$3 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$	N.D.
Liberação de peptídeo-C (ng/ng DNA)	$5 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$
Secreção de insulina induzida por glicose (índice de estimulação)*	1	1	1	>3

* Índice de estimulação = Secreção de insulina (20 nM de glicose) : liberação de insulina (2,8 nM de glicose) : N.D.: não detectado

Através de ensaios de imunofluorescência (Figura 9) verificamos que as culturas de APM, CPR e VGA expressam marcadores de células endócrinas, como Cromogranina A, insulina, peptídeo-C, Glut2 e PDX-1, enquanto que nenhuma

marcação positiva para marcadores de células do pâncreas exógeno, como desmina, vimentina e citoqueratina 19 (CK19) foi detectada, confirmando a natureza de células-beta dessas culturas (Labriola; Peters *et al.*, 2009).

Como conclusão, podemos afirmar que essas três linhagens de células-beta humanas mantêm as características antigênicas e o perfil de secreção de insulina dos tumores originais. Com o intuito de acrescentar mais informações sobre as características desse tipo celular, seria interessante que essas linhagens fossem mais profundamente analisadas e caracterizadas de modo a desvendar as diferenças de expressão proteica entre culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas enriquecidas de células-beta e essas linhagens derivadas de insulinomas humanos.

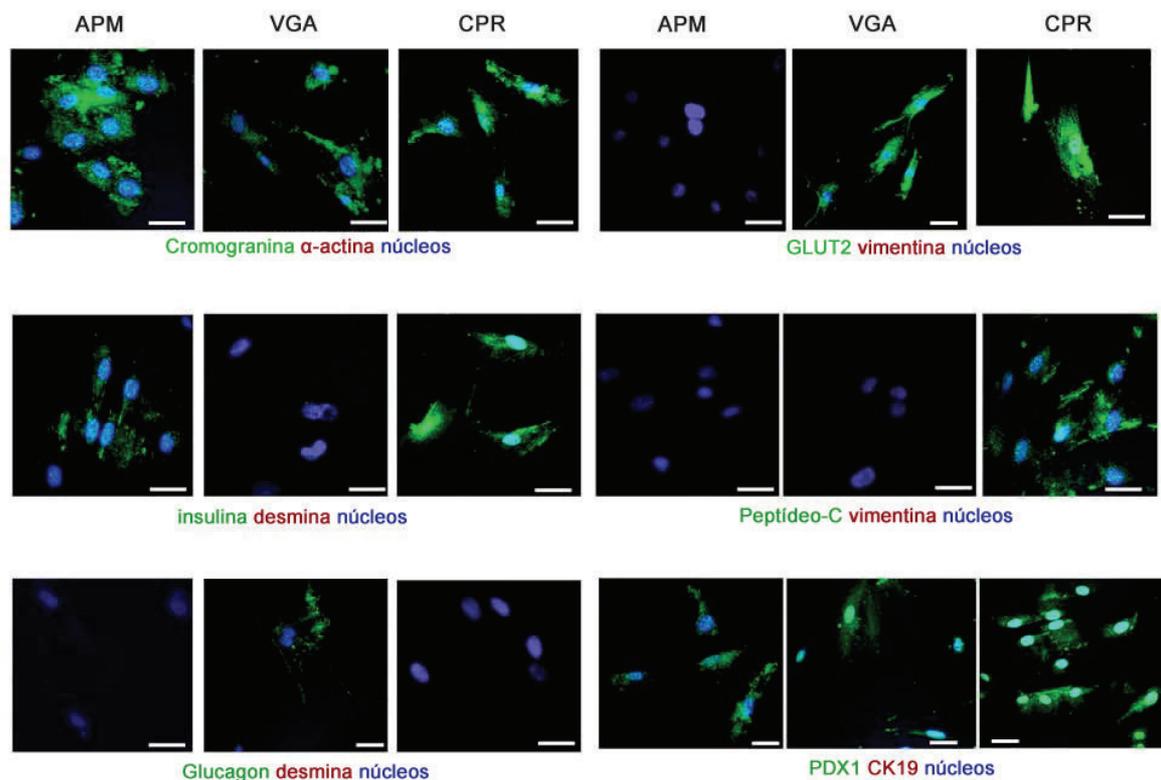


Figura 9: Microscopia confocal de imunofluorescência. Após fixação e permeabilização, as células foram marcadas com anticorpos contra Cromogranina A (verde) e α -actina (vermelho), insulina (verde) e desmina (vermelho), glucagon (verde) e desmina (vermelho), GLUT2 (verde) e vimentina (vermelho), peptídeo-C (verde) e vimentina (vermelho) ou PDX1 (verde) e CK19 (vermelho). Em todos os casos, os núcleos foram corados com DAPI (azul). As imagens mostram campos representativos. Barra: 50 μ m. (Adaptado de Labriola; Peters *et al.*, 2009)

2. Objetivos

2.1. *Objetivo geral*

O objetivo geral deste trabalho é estudar os mecanismos moleculares envolvidos na fisiologia e na citoproteção de células-beta pancreáticas, visando ao aumento do conhecimento necessário para o desenvolvimento de estratégias que permitam aumentar a massa necessária de células beta para o tratamento do DM1 através do transplante de ilhotas com maior sucesso.

2.2. *Objetivos específicos*

2.2.1. Explorar o papel da rhPRL na sobrevivência de células-beta humanas, identificando novos alvos moleculares de sua ação.

2.2.1.1. Avaliar a taxa de morte celular de células-beta humanas privadas de soro ou tratadas com uma combinação de citocinas pró-inflamatórias na presença ou ausência de rhPRL.

2.2.1.2. Analisar a indução de apoptose em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas mantidas nas condições descritas em 2.2.1.1.

2.2.1.3. Avaliar a atividade de Caspase-3, -8 e -9 em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas mantidas nas condições descritas em 2.2.1.1.

2.2.1.4. Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) em culturas primárias de ilhotas pancreáticas mantidas nas condições descritas em 2.2.1.1.

2.2.1.5. Analisar os níveis de expressão de mRNA dos genes pró- e anti-apoptóticos *BCL2*, *BAX* e *BCLXL* em culturas primárias de

ilhas pancreáticas humanas mantidas nas condições descritas em 2.2.1.1.

2.2.1.6. Analisar os níveis de expressão proteica de *BCL2* e *BAX* em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas mantidas nas condições descritas em 2.2.1.1.

2.2.1.7. Avaliar a cinética de fosforilação de p38 após o tratamento das culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas com rhPRL.

2.2.2. Analisar se citocinas induzem autofagia em células-beta pancreáticas e se a rhPRL é capaz de reverter este quadro.

2.2.2.1. Avaliar a toxicidade da rapamicina em células INS-1E e em culturas primárias de ilhotas de rato.

2.2.2.2. Avaliar a formação de autofagossomos, analisando a expressão de LC3-I e -II em células INS-1E tratadas com citocinas e indutores de estresse de retículo endoplasmático.

2.2.2.3. Avaliar os níveis de mTOR fosforilado e de 4E-BP1 fosforilado em células INS-1E tratadas com diferentes combinações de citocinas.

2.2.2.4. Avaliar os níveis de mTOR fosforilado em células INS-1E tratadas com diferentes indutores de estresse de retículo endoplasmático.

2.2.2.5. Avaliar a expressão de MCL1 em células-beta tratadas com citocinas e rapamicina.

- 2.2.2.6. Analisar a indução de apoptose em células INS-1E tratadas com diferentes combinações de citocinas na presença ou ausência de rhPRL.
- 2.2.2.7. Analisar a influência do tratamento com rhPRL nos níveis de mTOR fosforilado em células INS-1E tratadas com diferentes combinações de citocinas e indutores de estresse de retículo endoplasmático.
- 2.2.2.8. Analisar a influência do tratamento com rhPRL nos níveis de LC3-I e -II em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas mantidas nas condições descritas em 2.2.1.1.
- 2.2.3. Comparar os perfis de expressão protéica diferencial obtidos através da comparação de extratos protéicos de linhagens celulares de insulinomas humanos desenvolvidas em nosso laboratório e de culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas.
 - 2.2.3.1. Comparar os perfis de expressão protéica através de géis bidimensionais.
 - 2.2.3.2. Identificar os *spots* diferencialmente expressos por espectroscopia de massa.
 - 2.2.3.3. Validar os resultados obtidos através de Western blot.

3. Material e Métodos

3.1. Isolamento e cultura primária de ilhotas humanas

Pâncreas humanos de doadores adultos apresentando morte cerebral (idade média 43 ± 2 anos, $n=25$) foram removidos de acordo com as regulamentações brasileiras e o Comitê de Ética Institucional local (CEP-HU). A Tabela 3 mostra a caracterização dos doadores. As ilhotas pancreáticas foram isoladas após perfusão ductal do pâncreas e digestão tecidual com Liberare HI (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, Estados Unidos) ou Colagenase (NB1 Premium Grade e Protease Neutra NB; Serva Electrophoresis, Heidelberg, Alemanha) de acordo com o método de Ricordi (Ricordi; Lacy *et al.*, 1988) com modificações (Shapiro; Lakey *et al.*, 2000).

Tabela 3: Informações dos doadores de ilhotas humanas utilizados neste estudo.

Número do isolamento	Idade	Sexo	IMC (Kg/m ²) *	Isquemia fria (h) **	Pureza (%) ***
1	46	F	35	9	60
2	48	F	19	7	90
3	49	F	25	8	60
4	58	F	25	6	80
5	34	M	25	6	80
6	57	M	25	21	75
7	52	F	23	7	90
8	21	M	37	8	80
9	49	M	26	5	60
10	56	F	24	8	95
11	33	F	29	9	90
12	49	F	24	9	95
13	31	F	22	10	80
14	34	F	25	7	60
15	55	M	28	8	90
16	50	F	25	8	90
17	21	M	37	9	80
18	34	M	24	6	80
19	46	M	21	9	70
20	48	F	19	7	80
21	49	F	25	7	60
22	56	F	24	9	95
23	33	F	29	8	85
24	37	M	25	6	95
25	46	F	25	8	85
Média±EPM	43±2		26±1	8±1	80±2

F, feminino M, masculino

* Índice de Massa Corporal

** Período durante o qual o pâncreas foi mantido no gelo, desde o momento em que foi coletado, até o momento do início do isolamento.

*** Porcentagem de ilhotas na massa total de células pancreáticas após o isolamento de ilhotas.

A purificação das ilhotas foi realizada utilizando-se um gradiente de densidade contínuo de Ficoll em um processador celular (COBE 2991; Gambro, Lakewood, CO, Estados Unidos). As preparações de ilhotas utilizadas neste estudo mostraram viabilidade superior a 80% e pureza de $80\pm 2\%$ (Tabela 3), como determinado por marcação com Newport Green DCF (NG; Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos), um indicador de Zn^{2+} fluorescente excitável, comumente utilizado para identificar células-beta produtoras de insulina de ilhotas pancreáticas humanas, devido ao seu alto conteúdo intracelular de Zn^{2+} (Ichii; Inverardi *et al.*, 2005). A viabilidade celular foi avaliada através do método fluorescente de *live/dead*, baseado na incorporação de diacetato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), pelas células vivas, ou iodeto de propídeo (PI; Sigma-Aldrich), pelas células mortas.

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

Em todos os casos, o meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias. Quando as culturas atingiram 90% de confluência, as células foram destacadas com solução contendo 0,025% de tripsina e 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), lavadas e ressuspensas em meio fresco. Estas culturas apresentam cerca de 85%

de células-beta, segundo resultados prévios do laboratório (Maria-Engler; Correa-Giannella *et al.*, 2004; Labriola; Ferreira *et al.*, 2007).

3.2. *Cultura de células INS-1E*

A linhagem de células-beta de rato INS-1E, um subclone da linhagem INS-1, que é mais sensível a glicose (Janjic; Maechler *et al.*, 1999), foi mantida em meio RPMI 1640 suplementado com Glutamax-1 (11 mM de glicose) (Gibco, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 5% de SFB, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid [HEPES], 100 U/mL penicilina, 100 U/mL estreptomicina, 1 mM piruvato de sódio, 50 µM 2-mercaptoetanol.

3.3. *Isolamento e cultura de ilhotas de rato*

Ratos Wistar machos (Charles River Laboratories, Bruxelas, Bélgica) foram mantidos e manipulados de acordo com as diretrizes da regulamentação belga para cuidados de animais e todos os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética local. As ilhotas de rato foram isoladas por digestão com colagenase, seguida de pescagem sob um estereomicroscópio. As ilhotas foram dispersas e mantidas em meio Ham F-10 (Lonza, Basel, Suíça) suplementado com 10 mM glicose, 5% SFB inativado e 0,5% albumina sérica bovina (BSA) de 20 a 48 horas para recuperação antes de qualquer tratamento.

3.4. *Isolamento e culturas primárias de insulinomas humanos*

Culturas primárias *ex-vivo* de insulinomas humanos independentes (denominados: APM e CPR) e de uma amostra de nesídeoblastose (denominada: VGA) foram obtidas após ressecção cirúrgica e processamento tecidual (Labriola;

Peters *et al.*, 2009). As amostras de tecido tumoral foram obtidas pelo Prof. Dr. Marcel Machado no Hospital das Clínicas da FM-USP, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após digestão sequencial destas amostras com colagenase, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura em meio CMRL 1066 (Mediatech-Cellgro) suplementado com ITS (10 mg/L insulina; 5,5 mg/L transferrina; 0,0067 mg/L selenito de sódio; 2 mg/L etanolamina; Gibco), 100 unidades/mL estreptomicina/ampicilina, 10% SFB e glicose (concentração final 11mM) e incubadas por 24 a 48 horas. Em todos os casos o meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias. Quando as culturas atingiram 90% de confluência, as células foram destacadas com 0,025% de tripsina e 1 mM de EDTA, lavadas e ressuspensas em meio fresco. As culturas foram mantidas a 37°C sob atmosfera húmida. Informações sobre as preparações destas linhagens celulares derivadas de insulinomas humanos utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4: Informações das linhagens de insulinomas humanos utilizadas neste estudo.

Linhagem Celular	Passagem
	7
	10
	11
	13
APM	14
	15
	16
	19
	20
	22
VGA	14
	18
CPR	9
	11

3.5. *Tratamentos celulares*

Previamente a qualquer tratamento celular, as células provenientes de culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas foram privadas de soro por 24 h em meio CMRL 1066 suplementado com 0,1% SFB. No dia seguinte, as células foram pré-tratadas por 30 min com rhPRL (200 ng/mL), produzida em nosso laboratório utilizando-se um sistema de expressão heteróloga em células de insetos (Lawson; Sensui *et al.*, 1982; Pereira; Pouliquen *et al.*, 2001; Sapin; Le Galudec *et al.*, 2001), e então incubadas por 24 ou 48 h em CMRL suplementado com 0,5% SFB na presença ou ausência de um coquetel de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL) (Peprotech, Cidade do México, México). A via JAK2 foi bloqueada através da pré-incubação das células por 1 h com 10 μ M do inibidor farmacológico específico AG490 (Tocris, Ellisville, MO, Estados Unidos).

No caso das células da linhagem celular INS-1E, derivada de insulinoma de rato, as células foram incubadas por 2, 4, 8, 16 ou 24 horas com diferentes combinações de citocinas (TNF- α , 1000 U/mL; IFN- γ , 36 ng/mL; IL-1 β 10 U/ μ L) ou indutores de estresse de retículo (tunicamicina, 10 μ g/mL; taspigargina 100 nM) (Sigma-Aldrich). A via de mTOR foi bloqueada através da incubação por rapamicina com 20 nM de rapamicina (Cell Signaling, Danvers, MA, Estados Unidos) e a fusão de autofagossomos a lisossomos foi bloqueada através da incubação com 10 μ M de cloroquina por 16 horas (Sigma).

No caso das ilhotas de rato dispersas, as células foram incubadas por 16 h com diferentes combinações de citocinas (TNF- α , 1000 U/mL; IFN- γ , 500 U/mL; IL-1 β 50 U/mL) ou indutor de estresse de retículo (tunicamicina, 10 μ g/mL; Sigma-Aldrich). A via de mTOR foi bloqueada através da incubação por rapamicina com 20 nM de rapamicina.

3.6. Ensaio de morte celular por citometria de fluxo

Após os devidos tratamentos celulares de 24 ou 48 horas, aproximadamente 1.10^6 células de culturas primárias de ilhotas humanas foram coletadas utilizando-se uma solução de tripsina 0,025%; EDTA 1 mM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), sedimentadas, lavadas em tampão fosfato-salino (PBS) gelado e centrifugadas à 1.000g por 3 minutos (Labriola; Peters *et al.*, 2009).

A morte de células-beta foi analisada através da dupla marcação com PI e NG. As células sedimentadas foram resuspendidas em uma solução 1 μ M de NG e coradas no escuro por 1 h a 37°C. Após centrifugação por 3 minutos a 1.000 g, foi adicionado um tampão contendo PI (50 μ g/mL PI; 0,1% citrato de sódio; 0,1% Triton X-100). As células foram mantidas no escuro a 4°C até o momento da citometria. A morte relativa das células-beta foi calculada pela análise da fluorescência do PI nos picos anteriores do histograma em relação ao pico de G0/G1 (células vivas), numa população previamente selecionada de células positivas para NG (50.000 células foram contadas em cada experimento, com três ou mais experimentos independentes realizados em duplicata para cada preparação de ilhotas).

Anexina-V, uma proteína que se liga a fosfolípido dependente de Ca^{2+} , que possui uma alta afinidade por fosfatidilserina, é capaz de identificar células apoptóticas através da sua interação com fosfatidilserina expostas na superfície externa destas células, uma vez que a externalização deste fosfolípido ocorre em estágios iniciais da apoptose. Portanto, com o intuito de avaliar a porcentagem de eventos apoptóticos precoces, foi medida a exposição de fosfatidilserina vs. permeabilização da membrana através de citometria de fluxo pela dupla marcação das células com PI e Anexina-V acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Anexina-V-FITC; ICB, São Paulo, Brasil). Após a coleta das células, estas foram

lavadas com PBS gelado, e, em seguida, com tampão de ligação (10 mM HEPES; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂; pH 7,4). Após sedimentação, as células foram resuspendidas e incubadas no escuro com Anexina-V-FITC (1:500 em tampão de ligação) por 15 min a temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas em tampão de ligação e, em seguida, um tampão isotônico de PI (10 µg/mL de PI em PBS) foi adicionado. 50.000 células foram contadas em cada experimento independente (n≥3) realizados em duplicada para cada preparação de ilhota. O total de morte celular foi quantificado através da soma da quantidade de células positivas para PI e para Anexina-V.

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

3.7. Viabilidade celular por Hoescht (HO) e PI

1.10⁴ células INS-1E ou 3.10⁴ ilhotas de rato dispersas foram plaqueadas e mantidas em meio apropriado conforme descrito nas seções 3.2 e 3.3 até a realização dos devidos tratamentos celulares. A porcentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas foi determinada através da marcação por 15 min com os ligantes de DNA PI (5 µg/mL) e HO 33342 (5 µg/mL; Sigma-Aldrich) (Cardozo; Ortis *et al.*, 2005). As células foram examinadas sob microscópio de fluorescência invertido (Axiovert 200, Carl Zeiss, Zaventem, Bélgica e Nikon Corporation, Tokyo, Japão). Um mínimo de 500 células foi contado em cada condição experimental por dois observadores independentes, sendo um sem conhecimento das identidades das amostras, com resultados apresentando uma similaridade superior a 90%. Os resultados foram apresentados como porcentagem de apoptose, sendo importante

ressaltar que os níveis de necrose foram extremamente baixos durante os experimentos e não mudaram significativamente entre as condições experimentais. Este método é quantitativo e já foi validado para uso em células INS-1E por comparação sistemática com microscopia eletrônica, ativação de caspase-3 e clivagem de DNA (Hoorens; Van De Castele *et al.*, 1996; Kutlu; Cardozo *et al.*, 2003; Rasschaert; Ladriere *et al.*, 2005; Cunha; Hekerman *et al.*, 2008; Moore; Colli *et al.*, 2009).

3.8. *Ensaio de atividade de caspase-3*

Aproximadamente 1.10^6 células de ilhotas pancreáticas humanas foram coletadas por raspagem da monocamada com um policial, centrifugadas por três minutos a 3.000g e o sedimento celular foi ressuspensionado em tampão de lise contendo inibidores de protease (10 mM HEPES; 50 mM NaCl; 2 mM EDTA; 5mM dithiothreitol [DTT]; 0,1% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate [CHAPS]; 1 mM protease inhibitor mix - GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) a 4°C. O lisado celular foi centrifugado a 4°C e 12.000g por 30 minutos. As concentrações de proteína foram determinadas nas frações de sobrenadante através do ensaio colorimétrico de Bradford (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos). Os ensaios foram realizados utilizando substrato específico, na presença ou ausência de 1 μ M do inibidor de caspase ZVAD-CHO (Calbiochem, La Jolla, CA, Estados Unidos) como controle da especificidade da atividade de caspase. A reação foi realizada a 37°C pela incubação de 100 μ g de proteína total com o substrato de caspase-3 (50 μ M; Acetyl- L-aspartyl- L-glutamyl- L-valyl- L-aspartic acid α -(4-methyl- coumaryl- 7- amide) [Ac-DEVD-AMC]) (ICB) em 200 μ L de tampão de reação (50 mM HEPES; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM DTT; 0,1%

CHAPS; 10% sucrose; pH 7,4). A atividade de protease foi monitorada a cada 30 s durante um total de 30 min em um comprimento de onda de excitação de 380 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm utilizando-se um espectrofluorômetro de placas de 96 poços (Spectra MAX Gemini XS; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos). A atividade relativa de caspase-3 foi determinada através da comparação da atividade observada em cada período de tempo com os valores da curva padrão determinada pelos valores de atividade de diversas caspases-3 recombinantes (unidades/mg de proteína total; Calbiochem; $n \geq 3$ experimentos independentes, realizados em triplicada para cada preparação).

3.9. *Ensaio de atividade de caspase-8 e -9*

Aproximadamente 1.10^6 células de ilhotas pancreáticas humanas foram coletadas por raspagem da monocamada com um policial e manipuladas para extração proteica como descrito no item 3.8. A atividade de caspase foi quantificada através de um ensaio fluorimétrico utilizando-se substratos específicos (BioVision Research Products, Mountain View, CA, Estados Unidos). As reações foram iniciadas a 37°C, incubando-se 50 µg de proteína total com um substrato específico de caspase (50 µM 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin, Acetyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-threoninyl-L-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin [Ac-IETD-AFC] ou 50 µM Acetyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-Histidyl-L-aspartyl-7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin [Ac-LEHD-AFC] para caspase-8 e -9, respectivamente), de acordo com instruções do fabricante. A atividade de protease foi avaliada em um comprimento de onda de excitação de 400 nm e um comprimento de onda de emissão de 505 nm, utilizando-se um espectrofluorômetro de placas de 96 poços (Spectra MAX Gemini XS). A porcentagem de aumento da atividade de caspase-8 e

-9 foi determinada através da comparação dos resultados com os controles ($n \geq 3$ experimentos independentes, realizados em triplicada para cada preparação).

3.10. *Determinação dos níveis de Óxido Nítrico (NO) presentes no sobrenadante de culturas celulares*

Meio condicionado de culturas primárias de ilhotas humanas contendo 1.10^6 células foi coletado e mantido a -20°C até a determinação de NO. Níveis totais de nitrito/nitrato foram quantificados utilizando um kit de acordo com as instruções do fabricante (BioVision). Primeiramente, todo o nitrato presente foi convertido a nitrito através da adição de nitrato redutase às amostras, as quais foram então incubadas a 37°C por 2 h. Em seguida, as amostras foram incubadas com uma sonda 2,3-diaminonaftaleno, reagindo com o nitrito. As amostras foram incubadas por 4 h a temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência foi avaliada em um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 450 nm utilizando-se um espectrofluorômetro de placas de 96 poços (Spectra MAX M2; Molecular Devices). A porcentagem de aumento do conteúdo de NO presente no sobrenadante das culturas foi determinada através da comparação dos resultados com os controles ($n \geq 3$ experimentos independentes, realizados em triplicada para cada preparação de ilhotas).

3.11. *Reação em cadeia da polimerase (PCR) e de transcriptase reversa (RT-PCR) e PCR quantitativo em tempo real (qPCR)*

Células foram coletadas e ácido ribonucleico (RNA) total foi preparado como previamente publicado (Sogayar; Camargo *et al.*, 2004), com mínimas modificações. DNA complementar (cDNA) foi gerado através de amostras de RNA, utilizando-se

SuperScript (Invitrogen). Os iniciadores utilizados para os experimentos de amplificação por qPCR quantitativo foram desenhados utilizando-se o *software* Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) conectado ao termociclador *real-time PCR-system* (Applied Biosystems). As reações de qPCR foram quantificadas utilizando um reagente fluorescente (SYBR Green; Applied Biosystems) (Lekanne Deprez; Fijnvandraat *et al.*, 2002). Todas as reações quantitativas foram realizadas em triplicata (n=4 experimentos independentes). A expressão relativa de um gene alvo foi determinada em comparação a um gene referência (Pfaffl, 2001). Para cada iniciador, a eficiência do qPCR (E) de um ciclo na fase exponencial foi calculada de acordo com a equação: $E=10$ (Rasmussen; Ekelund *et al.*, 2001). Para garantir que os níveis de expressão de mRNA eram devidos a uma amplificação específica, todos os resultados de qPCR utilizados neste trabalho foram considerados apenas quando o limiar de amplificação foi atingido até o ciclo 30. As sequências dos iniciadores utilizados estão listadas na Tabela 5.

Tabela 5: Sequência dos iniciadores para genes humanos utilizados neste estudo.

Gene	Sequência do iniciador
<i>BAX</i>	F: 5'CAAGAAGCTGAGCGAGTGTC3' R: 5'GAAGTTGCCGTCTGCAAACA3'
<i>BCL2</i>	F: 5'CTGGGATGCCTTTGTGGAA3' R: 5'CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA3'
<i>BCLXL</i>	F: 5'CAGACCCAGTGAGTGAGCAG3' R: 5'CCGGTTGCTCTGAGACATTT3'
<i>HPRT*</i>	F: 5'GAAGTCTTGCTCGAGATGTGA3' R: 5'TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT3'

* também conhecido como *HPRT1*. F, *forward*. R, *reverse*.

3.12. *Extrato proteico total das linhagens de insulinomas humanos e de culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas*

Para obtenção do extrato proteico total, as culturas foram lavadas com PBS gelado e coletadas por raspagem da monocamada com um policial, centrifugadas por 3 min a 3.000 g e o sedimento celular foi ressuscitado em tampão de lise contendo inibidores de protease (10mM Tris [pH 7,5]; 150mM NaCl; 5mM EDTA; 1mM EGTA; 1mM DTT; 1% NP-40; 0,1% SDS; 1% deoxicolato; 1 mM protease inhibitor mix - GE Healthcare; 0,1% phosphatase inhibitor cocktail 2 – Sigma Aldrich) a 4°C. O lisado celular foi centrifugado a 4°C e 12.000 g por 30 minutos. As concentrações de proteína foram determinadas nas frações de sobrenadante através do ensaio colorimétrico de Bradford (BioRad). O sobrenadante foi armazenado a -70°C.

3.13. *Ensaio de Western Blot (WB) para amostras de insulinomas humanos e de culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas*

Extratos totais de proteína foram preparados como descrito no item 3.12. Quantidades iguais (100 µg) de proteína de cada extrato foram solubilizadas em tampão de amostra (60 mM Tris-HCl [pH 6,8]; 2% Dodecil Sulfato de Sódio [SDS]; 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 5% 2-mercaptoetanol) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7,5% ou 12%. Excepcionalmente, para a quantificação dos níveis de expressão da proteína caldesmon, fitas com gradiente de pH imobilizado (IPG) de 11cm, pH 4-7NL, foram reidratadas durante 16h a temperatura ambiente em 250 µL de amostra solubilizada em tampão de reidratação (De-Streak solution; 0,5% IPG – GE Healthcare). As fitas reidratadas

foram eletrofocalizadas utilizando-se de um sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). As fitas focalizadas foram armazenadas a -70°C , ou diretamente utilizadas para segunda dimensão. O equilíbrio das fitas após a eletrofocalização foi realizado em duas etapas: redução (10% Tris-Cl pH 8,8; 6M Uréia; 30% glicerol, 0,07M SDS; 1% p/v DTT), seguida por alquilação (10% Tris-Cl pH 8,8; 6M Uréia; 30% glicerol, 0,07M SDS; 4% iodoacetamida e traços de azul de bromofenol). Cada etapa foi realizada em 10 min com agitação. Para a segunda dimensão, as proteínas eletrofocalizadas foram fracionadas em géis de poliacrilamida 8% contendo SDS (15 X 12,5; MidiVertigel2 – Apelex, Lisses, França). Cada gel foi carregado com uma única fita.

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, por transferência úmida, em tampão de transferência (0,3% Tris; 1,44% Glicina, 0,1% SDS; 20% metanol) a 4°C , 300 mA por 2 h. As membranas foram então bloqueadas incubando-as em uma solução de bloqueio (PBSA; 5% leite desnatado em pó; 0,1% Tween 20), a 4°C por 18 horas.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos: policlonal de coelho anti-BAX (2772), policlonal de coelho anti-BCL2 (2876), policlonal de coelho anti-p38 (9212) e monoclonal de camundongo anti-fosfo-p38 (9216) (todos da Cell Signaling) e monoclonal de camundongo anti-GAPDH (sc-137179), monoclonal de camundongo anti-L-caldemon (sc-25339) e monoclonal de camundongo anti-MAGE-A (sc-71539) (todos da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos). Após este período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 min cada com uma solução de lavagem (PBSA; 0,1% Tween 20) e, então, incubadas com anticorpo secundário apropriado, conjugado a peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos). Em seguida, as

membranas foram lavadas 2 vezes de 10 min cada com solução de lavagem e 1 vez de 10 min com PBSA e reveladas com sistema quimioluminescente (ECL Plus; GE Healthcare ou Immobilon; Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos).

Como controle, as membranas foram testadas, novamente, com anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -tubulina (sc-5274; Santa Cruz). Para tanto, entre os dois experimentos que utilizaram a mesma membrana de nitrocelulose, foi feita uma fase de remoção dos anticorpos numa solução de *stripping* (62,5 mM Tris-Cl [pH 6,8]; 2% SDS; 100 mM β -mercaptoetanol), a 60°C, por 30 min. A membrana foi lavada por 15 min em PBSA e então re-incubada com solução de bloqueio e incubada com o novo anticorpo primário.

Após a revelação, a intensidade das bandas obtidas foi analisada por densitometria quantitativa, utilizando-se um *scanner* (Scanjet 3500; Hewlett Packard, São Paulo, Brasil) e o *software* Image Quant 5.2 (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido). A densidade das bandas quimioluminescentes e, após a correção do fundo, a expressão diferencial foi analisada dividindo-se os valores das densitometrias dos anticorpos primários específicos pelos valores de tubulina dos mesmos extratos proteicos.

3.14. *Ensaio de WB para amostras de células INS-1E*

$1,5 \cdot 10^4$ células foram plaqueadas e, após dois dias em cultura, foram realizados os tratamentos descritos no item 3.5. As células foram lavadas uma vez com PBS gelado e lisadas em tampão de lise (10 mM HEPES; 1% SDS; 1,5 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 10 mM KCl; 1 mM DTT; 0,1% NP-40) e adicionado tampão de amostra (60 mM Tris-HCl [pH 6,8]; 2% SDS; 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 5% 2-mercaptoetanol). Quantidades iguais de proteína foram resolvidas por SDS-PAGE 6-

12% e transferidas para uma membrana de Fluoreto Polivinidileno (PVDF) por transferência úmida, em tampão de transferência (0,3% Tris; 1,44% Glicina, 0,1% SDS; 20% metanol) a 4°C, 300 mA por 2 h. As membranas foram então bloqueadas incubando-as em uma solução de bloqueio (PBSA; 5% BSA; 0,1% Tween 20), a temperatura ambiente por 1 h.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 16 h com os seguintes anticorpos: monoclonal de coelho anti-Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) (5536), monoclonal de coelho anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4) (2855) (todos da Cell Signaling), policlonal de coelho anti-Mcl-1 (3035; BioVision). Após este período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes de 5 min cada com uma solução de lavagem (PBSA; 0,1% Tween 20) e, então, incubadas com anticorpo secundário apropriado, conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich). Em seguida, as membranas foram lavadas 2 vezes de 10 min cada com solução de lavagem e 1 vez de 10 min com PBSA e reveladas com sistema quimioluminescente (Immobilon ou Super Signal, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos).

Como controle, as membranas foram testadas novamente com anticorpo monoclonal anti- α -Tubulina Clone B-5-1-2 (T5168; Sigma-Aldrich) ou monoclonal de coelho anti-mTOR (7C10) (2983; Cell Signaling), quando apropriado. Quando necessário, entre os dois experimentos que utilizaram a mesma membrana de PVDF, foi feita uma fase de remoção dos anticorpos numa solução de *stripping* (25mM glicina; 1% SDS; pH 2), a temperatura ambiente por 30 min. A membrana foi lavada quatro vezes por 10 min em solução de lavagem (PBSA; 0,1% Tween 20) e então re-incubada com solução de bloqueio e incubada com o novo anticorpo primário.

Após a revelação, a intensidade das bandas obtidas foi analisada por densitometria quantitativa, utilizando-se o software ImageJ (National Institute of Health [NIH]). A densidade das bandas quimioluminescentes e, após a correção do fundo, a expressão diferencial foi analisada dividindo-se os valores das densitometrias dos anticorpos primários específicos pelos valores de controle de dos mesmos extratos proteicos.

3.15. Análises estatísticas

Todos os resultados foram analisados para distribuição gaussiana e passaram o teste de normalidade. As diferenças estatísticas entre as médias dos grupos experimentados foram testadas através do teste-t de Student não pareado de duas caudas com correção de Welch para diferentes variâncias, quando necessário, ou através de One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

3.16. Imunofluorescência

Células INS-1E foram crescidas em lâminas de vidro de cultura (BD Biosciences), fixadas por 15 min em paraformaldeído 4%, lavadas com PBS e permeabilizadas por 5 min em PBS com Triton X-100 0,1%. As lâminas foram então bloqueadas utilizando PBS com soro de cabra 5% e incubadas por 16 h com anticorpo anti-LC3B (2775; Cell Signaling). Na manhã seguinte, as culturas foram lavadas com PBS e incubadas por 1 h com o anticorpo conjugado a Alexa Fluor 555 apropriado (Invitrogen). Após lavagens as células foram marcadas com HO, as lâminas foram

montadas e fotografadas utilizando um microscópio de fluorescência (Axio Imager, Carl Zeiss, Zaventem, Bélgica).

3.17. 2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) e espectrometria de massa (MS)

O 2D-DIGE é uma variação da eletroforese em gel bidimensional convencional, que oferece a possibilidade de incluir um controle interno de modo que todas as mostras, inclusive aquelas que foram corridas em outro gel, possam ser facil e precisamente comparadas (Figura 10).

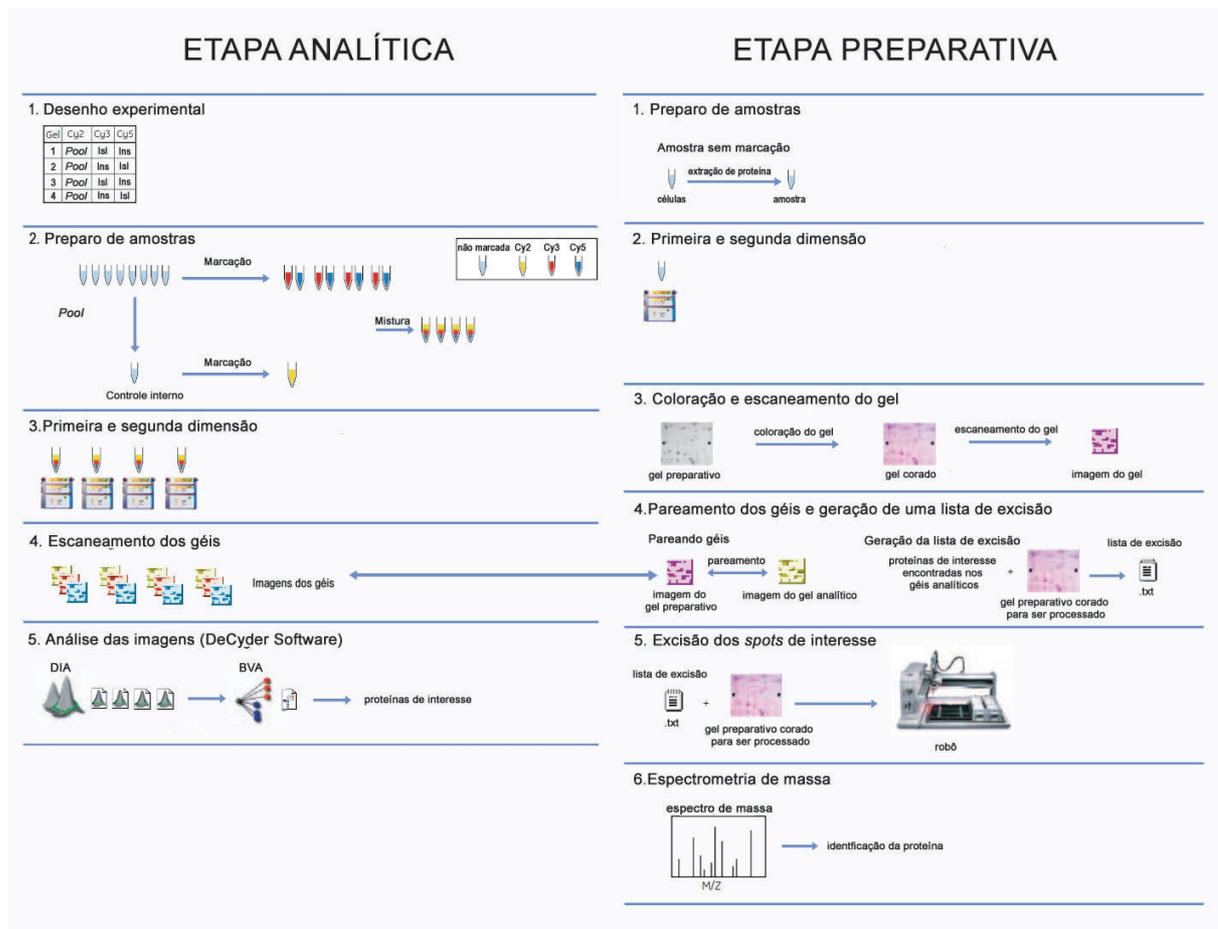


Figura 10: Fluxograma da técnica de 2D-DIGE . Em uma primeira etapa analítica, as diferentes amostras são marcadas com fluoróforos distintos, sendo realizadas as primeira e segunda dimensões. Os géis são escaneados e analisados, gerando uma lista de proteínas de interesse. Uma segunda etapa preparativa é necessária, onde é carregada uma amostra com uma mistura de todas aquelas utilizadas na etapa analítica, em uma maior quantidade, para permitir a identificação das proteínas por MS. Mais detalhes nas seções 3.17.1 - 3.17.7 (Adaptado do manual de instruções de GE Healthcare).

3.17.1. *Marcação e comparação das amostras através de fluoróforos correspondentes*

Previamente à etapa de marcação, alíquotas de proteína foram tratadas com o 2D Clean-up kit (GE Healthcare), seguindo instruções do fabricante e a concentração das proteínas foi determinada utilizando Bradford, como previamente descrito. As proteínas foram ressuspendidas em solução de reidratação para focalização isoeétrica (8M Uréia; 2% CHAPS; 13 mM DTT). O pH das amostras foi ajustado para 8,5 utilizando-se NaOH. Logo após, 50ug de proteína de cada amostra foram marcadas utilizando-se, como fluoróforos, as Cianinas desenvolvidas para o DIGE (GE Healthcare), ou seja, Cy3 e Cy5, seguindo-se as indicações do fabricante. Para o caso do padrão interno, foi utilizado um extrato proteico contendo quantidades iguais de proteínas de todos os extratos utilizados como amostras a serem comparadas, o qual foi marcado com o fluoróforo Cy2. A reação de marcação foi realizada durante 30 min a 4°C no escuro e o excesso de fluoróforo foi eliminado acrescentando-se uma solução contendo 1mM de lisina. Uma vez marcadas, as amostras a serem comparadas foram misturadas e dissolvidas no tampão de amostra (De-Streak solution; 0,5% IPG – GE Healthcare).

Quatro experimentos independentes foram realizados, utilizando-se de extratos proteicos correspondendo a diferentes passagens das culturas de insulinooma humanos, comparando-as a quantidades iguais de proteína de quatro culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas distintas. Com o intuito de eliminar qualquer marcação preferencial não específica, uma marcação reversa também foi realizada, na qual para dois experimentos as amostras de insulinooma humanos foram marcadas com Cy3 e as amostras provenientes de culturas primárias de ilhotas humanas com Cy5, enquanto que para os outros dois experimentos, as

amostras de insulinoma humanos foram marcadas com Cy5 e as amostras provenientes de culturas primárias de ilhotas humanas com Cy3. O controle interno aplicado em todos os géis analíticos contém uma mistura de quantidades iguais de proteína de todas as amostras.

3.17.2. Geração dos perfis proteicos utilizando géis analíticos bidimensionais

Fitas IPG de 24 cm, pH 3-10 linear, foram reidratadas durante 16 h a temperatura ambiente em 450 µL da mistura de amostras solubilizadas no tampão de reidratação (De-Streak solution; 0,5% IPG – GE Healthcare).

No dia seguinte, as fitas reidratadas foram eletrofocalizadas utilizando-se um sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) a 300 V constante por 3 h, seguido de 600 V em gradiente por 3 h, 1000 V gradiente por 3h, 8000 V gradiente por 3 h, 8000 V constante por 5 h e 300 V constante por até 2 h. As fitas focalizadas foram armazenadas a -70°C, ou diretamente utilizadas para segunda dimensão.

O equilíbrio das fitas após a eletrofocalização foi realizado em duas etapas: redução (10% Tris-Cl pH 8,8; 6M Uréia; 30% glicerol, 0,07M SDS; 1% p/v DTT), seguida por alquilação (10% Tris-Cl pH 8,8; 6M Uréia; 30% glicerol, 0,07M SDS; 4% iodoacetamida e traços de azul de bromofenol). Cada etapa foi realizada em 10 min sob agitação. Para a segunda dimensão, as proteínas eletrofocalizadas foram fracionadas em géis de poliacrilamida 12,5% contendo SDS (20 X 25 X 0,1 cm; Ettan Dalt Six - GE Healthcare). Cada gel foi carregado com uma única fita. Os géis prosseguiram a 20°C, em corrente constante de 5 W/gel por 45 min, seguido de 17 W/gel até o final da corrida.

Após a segunda dimensão, os géis foram lavados e escaneados utilizando-se o Typhoon 9400 gel Imager (GE Healthcare) e lasers em três comprimentos de onda de excitação diferentes (532nm para o Cy3; 633nm para o Cy5 e 488nm para o Cy2), com filtros específicos para os comprimentos de onda de emissão de cada fluoróforo (580nm - passo da banda [BP]: 30nm para o Cy3; 670nm-BP: 30 para o Cy5 e 520nm-BP:40nm para o Cy2). Os géis foram escaneados com uma resolução de 100 μm e o valor do fototubo multiplicador (PTM) foi fixado em um valor que garantiu a maior intensidade dos pixels. Para a análise das imagens, foi utilizado o programa DeCyder™ Version 6.5 (GE Healthcare), seguindo-se as recomendações do fabricante.

3.17.3. *Análises estatísticas*

As diferenças estatísticas entre as médias das razões de proteínas de ambos os grupos (cultura primária de ilhotas pancreáticas humanas e culturas de insulinomas humanos) foram testadas através do teste-t de Student não pareado, automaticamente gerado pelo módulo Biological Variation Analysis (BVA) do DeCyder V6.5, considerando-se como estatisticamente relevante $p < 0,05$.

Este programa gera uma razão do volume do *spot* de cada proteína da amostra com o volume do *spot* da mesma proteína do controle e normaliza estas razões de um modo que a razão do volume do pico modelo em cada gel seja zero. Um algoritmo, que normaliza o volume das razões de cada *spot* através das replicatas contra a menor razão do volume do mesmo *spot*, foi aplicado de modo a gerar uma abundância relativa dos *spots* padronizados. Os valores de abundância relativa foram então submetidos à análise estatística.

3.17.4. *Determinação de peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI) experimentais*

Valores de PM para proteínas individuais nos géis foram interpoladas de controles do SDS-PAGE (Invitrogen), que consistem em múltiplas proteínas com peso molecular conhecido variando de 15 a 170 kDa. O pI foi calculado diretamente, através da interpolação do pI no gradiente linear das fitas IPG (pH: 3-10).

3.17.5. *Geração e coloração dos géis preparativos*

Alíquotas de proteína foram tratadas com o 2D Clean-up kit (GE Healthcare), seguindo instruções do fabricante. As proteínas foram ressuspendidas em solução de reidratação para focalização isoelétrica (8M Uréia; 2% CHAPS; 13 mM DTT) e a concentração das proteínas foram determinadas utilizando Bradford, como previamente descrito. Uma mistura de todas as amostras (500 – 2000 µg de proteínas totais) foi carregada em fitas de 24 cm, pH 3-10L. A primeira e segunda dimensões foram realizadas nas mesmas condições aplicadas para os géis analíticos. O corante Deep Purple (GE Healthcare) foi utilizado para corar o gel de acordo com instruções do fabricante.

3.17.6. *Processamento das proteínas e MS*

Os *spots* de interesse foram excisados dos géis por um robô (GE Healthcare), cortados em pedaços menores e transferidos para tubos de polipropileno de baixa aderência (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os fragmentos de gel foram lavados três vezes de 15 min cada com Acetonitrila (ACN) 50%; 25 mM de bicarbonato de sódio (NH₄HCO₃) e desidratadas com ACN 100% por 5 min seguido de centrifugação a vácuo, sendo então reidratados e submetidos à redução de pontes dissulfeto com 10 mM DTT; 100 mM NH₄HCO₃ por 1 h a 56°C. As cisteínas livres

foram então alquiladas com 55 mM Iodoacetamida (IAA); 100 mM NH_4HCO_3 por 45 min no escuro e então lavados duas vezes de 15 min cada com 100 mM NH_4HCO_3 . Os fragmentos de géis foram desidratados com ACN 100% por 5 min seguido de centrifugação a vácuo e reidratados em tampão de digestão contendo tripsina Gold Mass Spectrometry Grade (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), incubados por 1 h a temperatura ambiente e então durante a noite a 37°C.

O sobrenadante foi transferido para tubos de baixa aderência e os peptídeos tripticos foram extraídos dos fragmentos de gel com ACN 50%; Ácido Trifluoroacético (TFA) 5% por 30 min.

Os peptídeos foram dessalinizados utilizando-se colunas C18 Zip Tip (Millipore) de acordo com instruções do fabricante.

3.17.7. *Análise da MS e identificação*

As amostras que levaram à identificação de caldesmon, 14-3-3, NR6A1, dermcidin e OTUD7A foram analisadas por um *nanoflow HPLC* (EasynLC - Proxeon Biosystem, Odense, Dinamarca) acoplado *online* via uma fonte de íon nanoelectrospray (Proxeon Biosystem) a um espectrômetro de massa LTQ (Linear Trap Quadrupole) - Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Misturas peptídicas foram carregadas em uma coluna de fase reversa C18 (15 cm de comprimento, 100 μm de diâmetro interno [d.i.], empacotada manualmente com uma resina RepoSil-Pur C18-AQ 3 μm) em tampão A (0,1% ácido fórmico) e eluídas com um gradiente linear de 2 a 40% de tampão B (90% ACN e 0,1% ácido fórmico) a uma velocidade de fluxo de 250 nL/min por 20 min. Após cada amostra, a coluna foi lavada com 90% tampão B e reequilibrada com tampão A.

Os espectros de massa foram adquiridos no modo de íons positivos, aplicando-se um desvio automático dependente de dados entre varredura de MS e

aquisição de espectro de massa *in tandem* (MS/MS). As amostras foram analisadas adquirindo uma varredura de MS em uma faixa de relação massa/carga (m/z) de 300 a 2000 no Orbitrap, seguido de MS/MS dos cinco íons mais intensos no LTQ. O valor alvo no LTQ-Orbitrap foi de 1.000.000 íons por varredura a uma resolução de 60.000 e uma m/z de 400 utilizando-se de *mass locks* para recalibração e consequente aumento da precisão da massa dos íons precursores. A fragmentação no LTQ foi realizada por dissociação induzida por colisão (CID) com um valor alvo de 20.000 íons. O limiar de seleção dos íons foi estabelecido em 5.000 contagens. Os íons selecionados sequenciados foram dinamicamente excluídos por 30 s.

A listagem de picos (arquivos mgf) foi extraída dos dados não processados através do programa Proteome Discoverer 1.2 (Thermo Scientific). As pesquisas em banco de dados foram realizadas utilizando-se do programa de busca MASCOT (Versão 2.1.0 e 2.2.04, Matrix Science, Boston, MA, Estados Unidos). Os parâmetros de busca foram estabelecidos para: Precisão de MS 10 pp; precisão de MS/MS 0,5 Da; digestão por tripsina com permissão para duas clivagens perdidas, modificação carboamidometil fixa de cisteína e modificação variável de metionina oxidada. O espectro de massa *in tandem* dos experimentos de MS/MS foram buscados no index internacional de proteínas (IPI) humano não-redundante, baixado em Abril de 2010. As pesquisas foram realizadas seguindo-se um requerimento de dois peptídeos únicos para identificação de proteínas, com um limiar dos *scores* individuais dos íons no Mascot de 95% de significância. Pesquisas feitas pelo Mascot dos dados contra um banco de dados *decoy* resultou em uma taxa de falsa identificação de menos de 1%, com nenhuma proteína tendo sido identificada com os limites das significâncias aplicados. Todas as identificações foram validadas manualmente e o PM e pl das proteínas foi considerado para validação.

As amostras que levaram à identificação de GAPDH, MAGE, NEUA e PKN1 tiveram seus peptídeos eluídos em colunas analíticas C18 (100 mm de comprimento, 75 μ m d.i.) (Waters, Milford, MA, Estados Unidos) utilizando um gradiente de 54 min com uma velocidade de fluxo de 400 nL/min onde o solvente A era 0,5% ácido fórmico e o solvente B 0,5% ácido fórmico em ACN. O gradiente foi 0-80% ACN em 0,5% ácido fórmico por 45 min. Um espectrômetro de massa LTQ XL (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para aquisição do espectro. A voltagem do *spray* foi fixada em 2,5 kV e o instrumento foi operado em um modo dependente de dados, em que cada varredura completa de MS foi adquirida na faixa de m/z de 300-1600 seguido de aquisição de MS/MS utilizando CID dos dez íons mais intensos da varredura de MS. Uma exclusão dinâmica de picos foi aplicada para evitar que a mesma m/z fosse selecionada nos 120 s seguintes.

A listagem de picos (arquivos mgf) foi extraída dos dados não processados através da plataforma Trans-Proteomic Pipeline (Keller; Eng *et al.*, 2005) e os arquivos mgf correspondentes foram pesquisados pelo Mascot (Versão 2.1.0 e 2.2.04) no IPI humano não-redundante. Derivados de IAA de cisteínas e oxidação da metionina foram especificados no Mascot como modificações fixas e variáveis, respectivamente. As pesquisas foram realizadas com um requerimento de dois peptídeos únicos para identificação de proteínas, com um limiar dos *scores* individuais dos íons no Mascot de 95% de significância. Pesquisas feitas pelo Mascot dos dados contra um banco de dados *decoy* resultou em uma taxa de falsa identificação de menos de 1%, com nenhuma proteína tendo sido identificada com os limites das significâncias aplicadas. Todas as identificações foram validadas manualmente e o PM e pl das proteínas foi considerado para validação.

4. Resultados

4.1. *rhPRL promove a sobrevivência de células-beta humanas através da inibição das vias intrínseca e extrínseca da apoptose*

4.1.1. *rhPRL protege culturas primárias de células-beta humanas de morte induzida por privação de soro e por citocinas*

Para demonstrar diretamente o efeito pró-sobrevivência dos lactogênios e identificar os mecanismos envolvidos nesse processo, nós primeiramente estudamos a proporção de núcleos fragmentados de células-beta em culturas primárias de ilhotas humanas. Para tanto, essas culturas foram carenciadas para soro com 0,1% SFB por 24 h. As culturas foram então pré-tratadas com rhPRL (200 ng/mL) ou veículo por 30 minutos e tratadas por 24 ou 48 horas na presença ou ausência de um coquetel de citocinas (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ). Essa abordagem foi escolhida, uma vez que já foi descrito que a privação de soro, bem como o tratamento com citocinas, induz morte celular principalmente por apoptose nas células-beta (Mizuno; Yoshitomi *et al.*, 1998; Ortis; Pirot *et al.*, 2008; Kim e Lee, 2009). É importante reforçar que, durante o tratamento de 24 ou 48 horas, as células foram mantidas em 0,5% de SFB.

Através de citometria de fluxo, primeiramente analisamos a proporção de células-beta hipodiplóides após dupla marcação com PI e NG. Como mostrado na Figura 11, células tratadas com rhPRL apresentaram proporção significativamente ($p < 0,05$) menor de núcleos fragmentados de células-beta tanto após privação de soro, como após o tratamento com citocinas, quando comparado com culturas controles, a partir de 24 h (privação de soro: tratamento com rhPRL $63,7 \pm 2\%$ do controle, tratamento com citocinas: rhPRL $70,1 \pm 5\%$ do controle) e mais proeminente em 48 h (privação

de soro: tratamento com rhPRL $54,8 \pm 1\%$ do controle, tratamento com citocinas: rhPRL $62,1 \pm 4\%$ do controle).

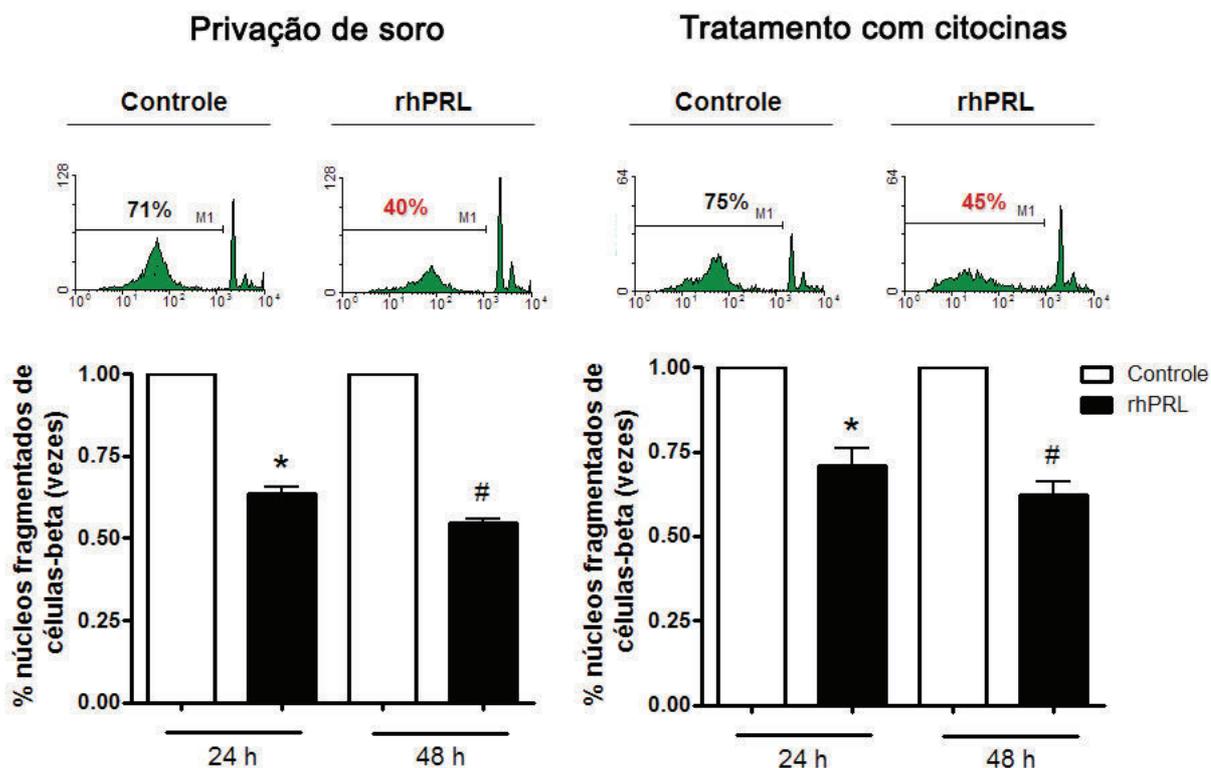


Figura 11: Efeito protetor da rhPRL na morte celular induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas em células-beta humanas. As células foram submetidas a privação de soro ou tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL). 24 ou 48 h após o tratamento, a quantidade de núcleos fragmentados de células-beta foi analisado por citometria de fluxo (células hipodiplóides com marcação positiva para NG). Resultados representativos estão apresentados nos painéis superiores, os painéis inferiores mostram a porcentagem de núcleos fragmentados de células-beta após 24 ou 48 h de tratamento para células controle ou tratadas com rhPRL, conforme indicado, os resultados são médias \pm EPM; n=4 experimentos independentes; *p<0,05 para diferenças comparadas com a situação controle de 24 h que foi fixada em 1; #p<0,05 para diferenças comparadas com a situação controle de 48 h que foi fixada em 1. A coluna da esquerda mostra células privadas de soro, enquanto a coluna da direita células tratadas com citocinas.

É importante notar que como controle da viabilidade das células antes da indução de morte celular, a porcentagem de células com marcação positiva para PI foi analisada em suspensões celulares em condições isotônicas (o mesmo tampão utilizado para os experimentos com PI e Anexina-V). Todas as preparações usadas apresentaram aproximadamente 10% de células com marcação positiva pra PI antes da indução de morte celular.

Na Figura 12 são apresentados os dados não processados obtidos para cada preparação de ilhotas, mostrando que mesmo com uma resposta maior ou menor aos tratamentos para indução de morte celular, todas as preparações responderam com o mesmo padrão ao tratamento com rhPRL, apresentando uma diminuição na porcentagem de núcleos fragmentados.

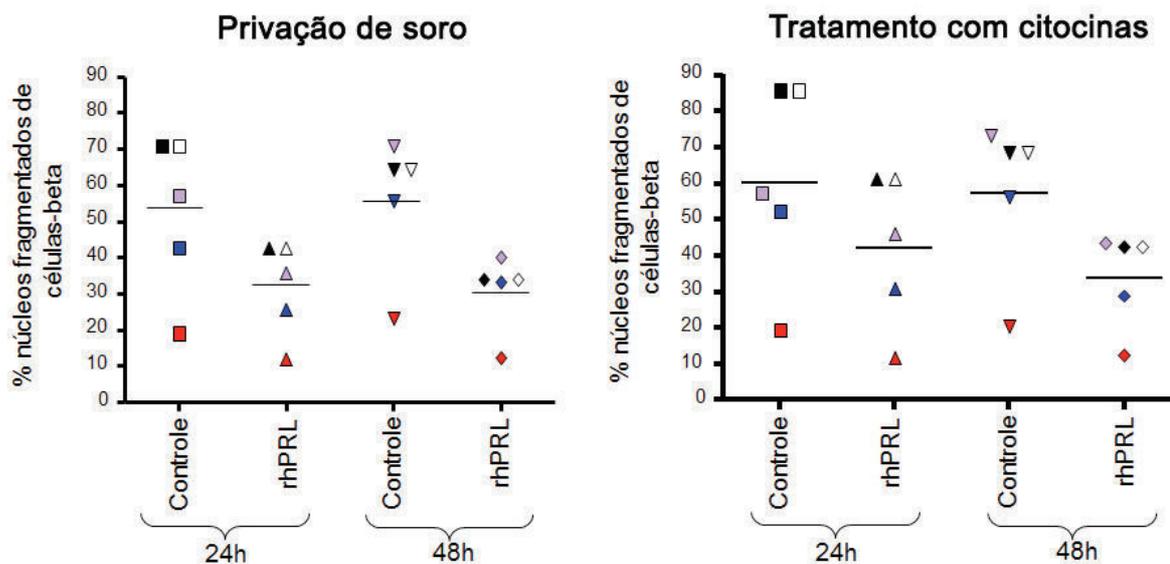


Figura 12: Efeito da rhPRL na morte celular induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas em preparações individuais de células-beta humanas. As células foram submetidas à privação de soro ou tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL). 24 ou 48 h após o tratamento, a quantidade de núcleos fragmentados de células-beta foi analisado por citometria de fluxo (células hipodiplóides com marcação positiva para NG). A figura mostra dados não processados obtidos para cada preparação de ilhotas (a mesma cor indica que células da mesma preparação de ilhotas isoladas foram utilizadas). Os resultados estão apresentados em um gráfico de dispersão, a barra horizontal representa a média de 5 experimentos independentes. Todos os dados passaram no teste de normalidade, a coluna da esquerda mostra células privadas de soro, enquanto a coluna da direita, células tratadas com citocinas.

Vale ainda ressaltar que esta proteção causada pela rhPRL é exclusiva para células-beta, uma vez que não somente o receptor de prolactina está presente apenas nas células-beta e em mais nenhuma célula da ilhota pancreática, como também que quando analisadas todas as células da ilhota, e não apenas as células positivas para a marcação com NG, a diferença na proporção de núcleos fragmentados entre as células tratadas com rhPRL e as células controle diminui drasticamente em ambos os tempos testados, tanto após privação de soro (24 h:

tratamento com rhPRL 94,2±10% do controle, 48 h: rhPRL 69,9±5% do controle), como após o tratamento com citocinas (24 h: tratamento com rhPRL 84,2±3% do controle, 48 h: rhPRL 80,5±8% do controle), quando comparado com células controles (Figura 13).

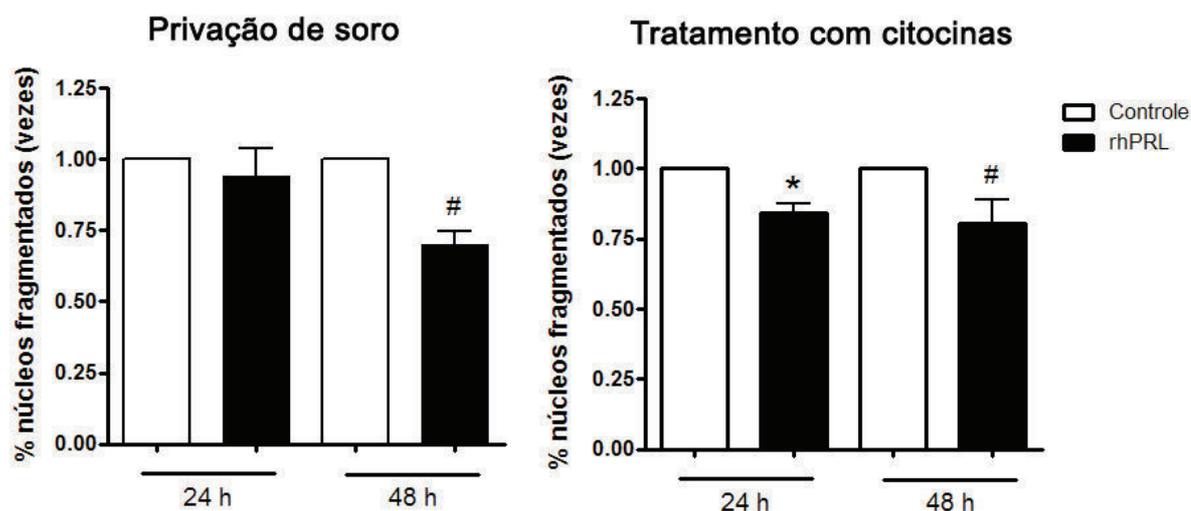


Figura 13: Efeito da rhPRL na morte celular induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas em ilhotas pancreáticas humanas. As células foram submetidas à privação de soro ou tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL). 24 ou 48 h após o tratamento, a quantidade de núcleos fragmentados de células-beta foi analisado por citometria de fluxo (células hipodiplóides). Resultados mostram a porcentagem de núcleos fragmentados das células de ilhota humanas após 24 ou 48 h de tratamento para células controle ou tratadas com rhPRL, conforme indicado. Os resultados são médias±EPM; n=4 experimentos independentes; *p<0,05 para diferenças comparadas com a situação controle de 24 h que foi fixada em 1; #p<0,05 para diferenças comparadas com a situação controle de 48 h que foi fixada em 1. A coluna da esquerda mostra células privadas de soro, enquanto a coluna da direita, células tratadas com citocinas.

Quando se analisou os eventos precoces de apoptose através da dupla marcação com PI e Anexina-V, como mostrado na Figura 14, foi observado que após o tratamento com rhPRL as células apresentaram uma menor taxa de externalização de fosfatidilserina em ambas as condições de indução de morte celular quando comparadas com células controle (privação de soro: tratamento com rhPRL 37,6±10% do controle, tratamento com citocinas: rhPRL 41,2±9% do controle; p<0,05). Ainda é possível verificar que a característica citoprotetora da rhPRL é exclusiva para células em apoptose precoce, pois quando analisadas as células com

marcação positiva para PI, ou seja, as células necróticas ou em apoptose tardia, o tratamento com o lactogênio não surtiu efeito algum (Figura 14).

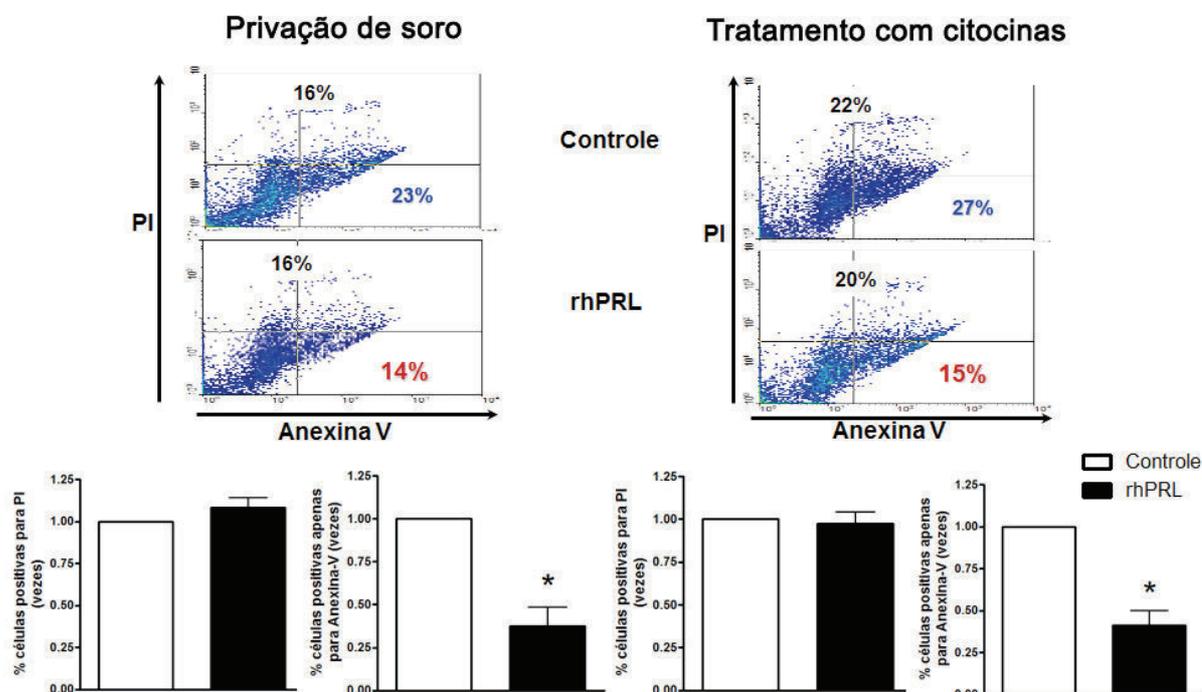


Figura 14: Efeito protetor da rhPRL na apoptose induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas em ilhotas pancreáticas humanas. As células foram submetidas à privação de soro ou tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL). 48 h após o tratamento, as células foram analisadas por citometria de fluxo para marcação com PI e Anexina-V-FITC. Resultados representativos estão apresentados nos painéis superiores (a % nos quadrantes superiores representa a somatória de células em necrose e apoptose tardia, ou seja, células com marcação positiva para IP; a % no quadrante da direita inferior indica apenas células em apoptose precoce, ou seja, com marcação positiva para Anexina-V e negativa para PI). Os panéis inferiores mostram a porcentagem de células apoptóticas ou positivas para marcação com PI após 48 h de tratamento para células controle ou tratadas com rhPRL, conforme indicado. Os resultados são médias \pm EPM; n=4 experimentos independentes; *p<0,05 para diferenças comparadas com a situação controle que foi fixada em 1. A coluna da esquerda mostra células privadas de soro, enquanto a coluna da direita, células tratadas com citocinas.

Na Figura 15, apresenta-se os dados não processados obtidos para cada preparação de ilhotas, mostrando que mesmo com uma resposta maior ou menor aos tratamentos para indução de morte celular, todas as preparações responderam com o mesmo padrão ao tratamento com rhPRL, quando analisadas as células com marcação positiva para Anexina-V, apresentando uma diminuição na porcentagem de externalização de fosfatidilserina. É possível observar ainda, que o mesmo não acontece para as células com marcação positiva para PI, sendo que amostras da

mesma preparação de ilhotas apresentaram a mesma resposta para os tratamentos de indução de morte celular, contudo, não responderam ao tratamento com rhPRL.

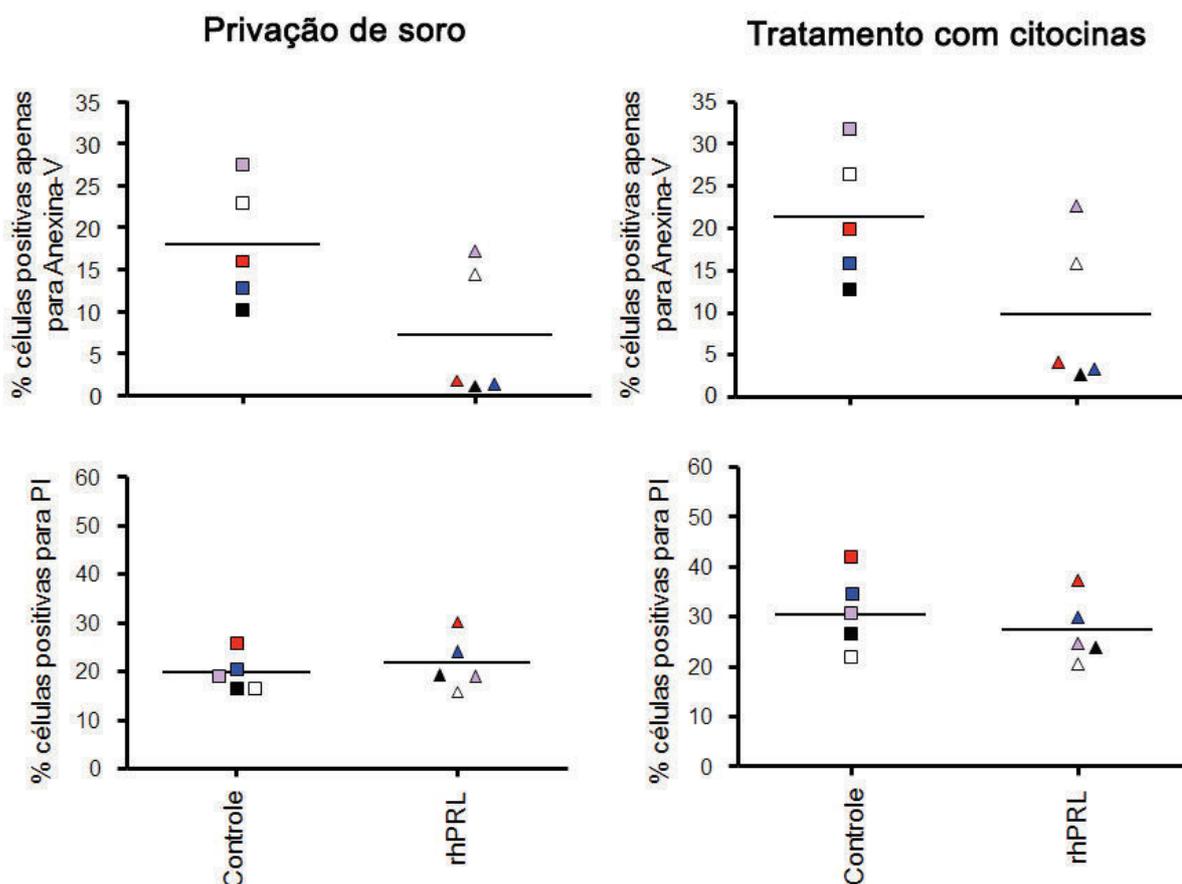


Figura 15: Efeito da rhPRL na apoptose induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas em preparações individuais de ilhotas pancreáticas humanas. As células foram submetidas à privação de soro ou tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL). 48 h após o tratamento, as células foram analisadas por citometria de fluxo para marcação com PI e Anexina-V-FITC. A figura mostra dados não processados obtidos para cada preparação de ilhotas (a mesma cor indica que células da mesma preparação de ilhotas isoladas foram utilizadas). Os resultados estão apresentados em um gráfico de dispersão, a barra horizontal representa a média de 5 experimentos independentes. Todos os dados passaram no teste de normalidade, a coluna da esquerda mostra células privadas de soro, enquanto a coluna da direita, células tratadas com citocinas.

É importante notar que, tanto na Figura 14 quanto na Figura 15, as células analisadas não foram marcadas também com NG, portanto, foram analisadas todas as células da ilhota, e não somente as células-beta, o que poderia estar levando à subestimativa dos efeitos benéficos da rhPRL nessas células, já que esta atua somente nas células-beta, como mostrado anteriormente (Figura 13).

4.1.2. *rhPRL inibe a atividade de caspase sem interferir na produção de NO*

Para alcançar um maior entendimento sobre os mecanismos moleculares que estão por trás dos efeitos citoprotetores da rhPRL em células-beta humanas, foi examinado o efeito desse tratamento na atividade de caspase-8 e caspase-9, envolvidas nas vias extrínscica e intrínscica da apoptose, respectivamente. Complementariamente, a atividade de caspase-3, enzima central em ambas as vias induzidas por apoptose, também foi avaliada. Como mostrado na Figura 16, o tratamento com prolactina reduziu significativamente as atividades de todas as caspases medidas ($p < 0,05$). Quando comparadas com células controle, as células tratadas com prolactina mostraram uma atividade de caspase-3 bastante reduzida, em ambas as condições de indução de morte celular (privação de soro: tratamento com rhPRL $37 \pm 4\%$ do controle, tratamento com citocinas: rhPRL $16 \pm 2\%$ do controle). É importante notar que o tratamento com rhPRL exerceu um maior nível de inibição de caspase-9 (privação de soro: tratamento com rhPRL $58 \pm 7\%$ do controle, tratamento com citocinas: rhPRL $38 \pm 11\%$ do controle) do que caspase-8 (privação de soro: tratamento com rhPRL $81 \pm 6\%$ do controle; tratamento com citocinas: rhPRL $70 \pm 2\%$, do controle).

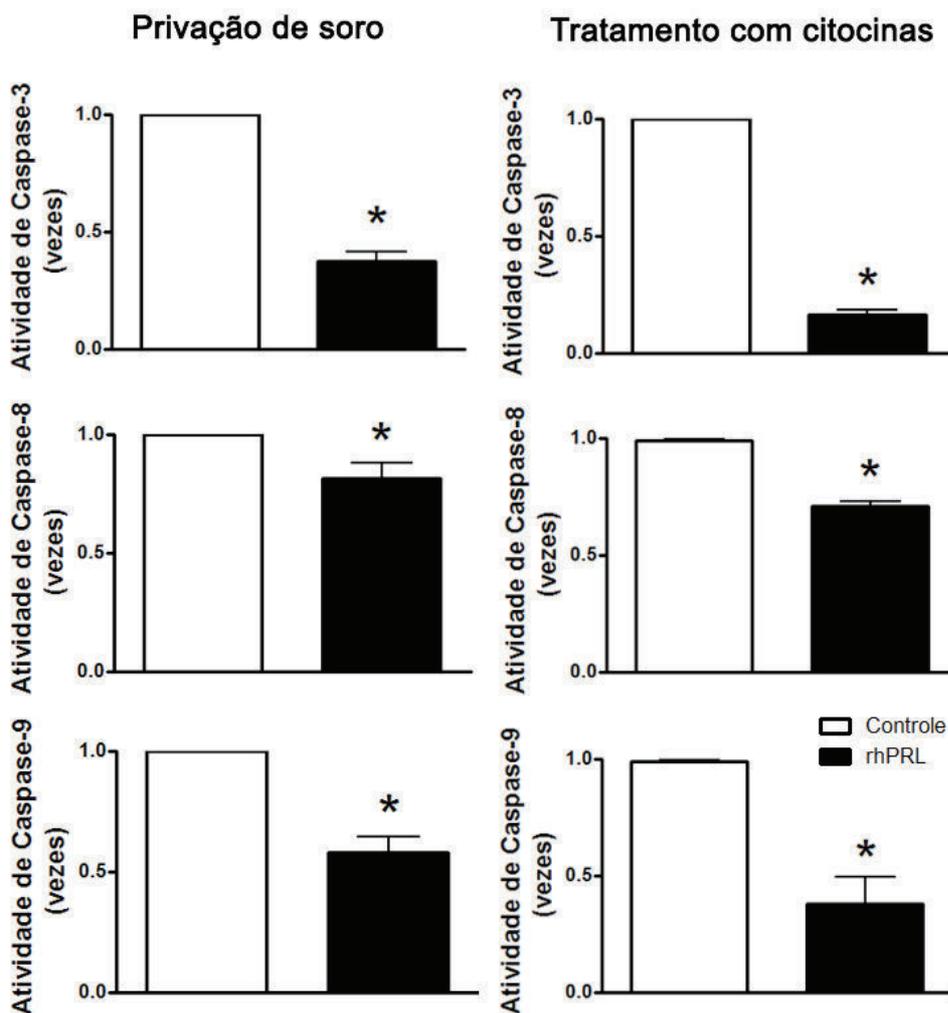


Figura 16: rhPRL inibe atividade de caspase após apoptose induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas. As células foram submetidas à privação de soro ou tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL). 48 h após o tratamento, as células foram coletadas em um tampão apropriado. A atividade de caspase-3, caspase-8 e caspase-9 foram medidas por um ensaio fluorimétrico utilizando um substrato específico. Os resultados foram normalizados relativo ao conteúdo proteico total e são médias \pm EPM; $n \geq 3$ experimentos independentes realizados em triplicata; * $p < 0,05$ para diferenças comparadas com a situação controle que foi fixada em 1. A coluna da esquerda mostra células privadas de soro, enquanto a coluna da direita, células tratadas com citocinas.

Do mesmo modo, a Figura 17 mostra que a via de sinalização clássica da prolactina está diretamente envolvida neste fenômeno, uma vez que o bloqueio da ativação de JAK2 pelo seu inibidor farmacológico específico AG490 aboliu os efeitos citoprotetores obtidos pelo tratamento hormonal após o tratamento com citocinas, em relação à atividade de caspase-8 (tratamento com AG490 97 \pm 2% do controle e rhPRL+AG490 103 \pm 3% do controle) e -9 (tratamento com AG490 81 \pm 3% do controle

e rhPRL+AG490 $88\pm 2\%$ do controle). Coletivamente, estes resultados mostram que a rhPRL diminuiu a apoptose de células-beta humanas através da inibição de caspase-8, -9 e -3. Adicionalmente, uma via de sinalização intacta de lactogênio é necessária para mediar esse fenômeno.

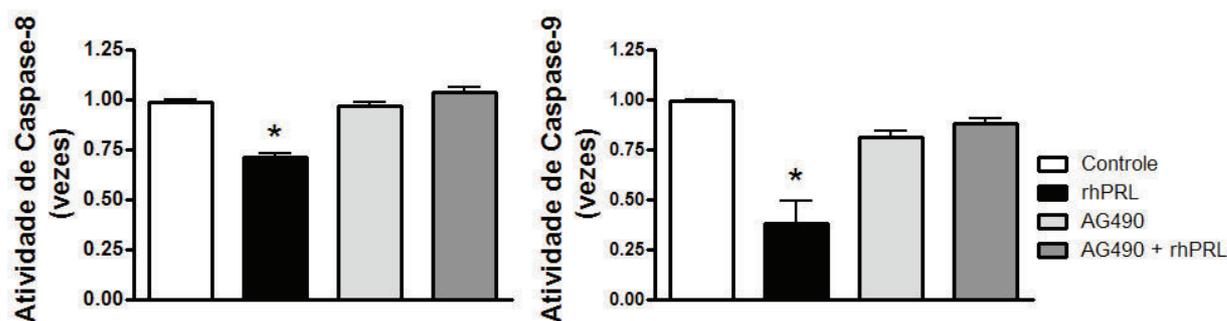


Figura 17: rhPRL inibe atividade de caspase após apoptose induzida por tratamento com citocinas mediante sua via de sinalização clássica. As células foram tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL) e na presença ou ausência de AG490 (10 μ mol/L). 48 h após o tratamento, as células foram coletadas em um tampão apropriado. A atividade de caspase-8 e caspase-9 foram medidas por um ensaio fluorimétrico utilizando um substrato específico. Os resultados foram normalizados relativo ao conteúdo proteico total e são médias \pm EPM; $n\geq 3$ experimentos independentes realizados em triplicata; * $p<0,05$ para diferenças comparadas com a situação controle que foi fixada em 1.

Uma vez que os efeitos citotóxicos do coquetel de citocinas também poderiam ser exercidos por um aumento na produção de NO, foram medidos os níveis desse composto tóxico no meio condicionado destas culturas primárias. Embora as células tenham produzido mais NO na presença de citocinas do que quando privadas de soro, nenhuma alteração nesse perfil foi observada após o tratamento com prolactina (Figura 18). Portanto, a inibição da produção de NO não parece fazer parte do efeito anti-apoptótico da rhPRL.

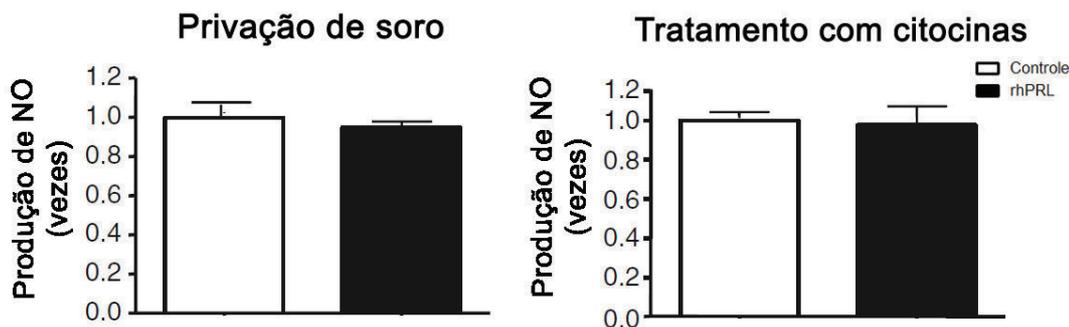


Figura 18: rhPRL não interfere na produção de NO após apoptose induzida por privação de soro e por tratamento com citocinas. As células foram submetidas à privação de soro ou tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL). 48 h após o tratamento, as células foram coletadas em um tampão apropriado. A produção de NO foi medida no sobrenadante de uma fração de células mantidas nas condições acima através de um ensaio fluorimétrico. Os resultados foram normalizados relativo ao conteúdo proteico total e são médias \pm EPM; n=3 experimentos independentes realizados em triplicata; a situação controle que foi fixada em 1. A coluna da esquerda mostra células privadas de soro, enquanto a coluna da direita, células tratadas com citocinas.

4.1.3. rhPRL altera o balanço entre proteínas anti- e pró-apoptóticas da família BCL2

Como já foi previamente descrito que o efeito do GH humano na apoptose induzida por citocinas de células-beta murinas envolve o balanço entre proteínas pró- e anti-apoptóticas da família BCL2 (Jensen; Galsgaard *et al.*, 2005; Fujinaka; Takane *et al.*, 2007), além da maior diminuição da atividade de caspase-9 observada em nossas condições de cultivo celular, foi decidido estudar mais profundamente os níveis de algumas moléculas-chave da via intrínseca de apoptose. A análise foi focada, particularmente, nos genes *BCL2*, *BCLXL* e *BAX*. Como mostrado na Figura 19, o tratamento com rhPRL levou a um aumento da razão de mRNA entre genes anti-apoptóticos e pró-apoptóticos. Diferentemente de resultados mostrados previamente de tratamento de lactogênios em modelos murinos (Fujinaka; Takane *et al.*, 2007), o tratamento hormonal induziu significativamente apenas a relação de mRNA de *BCL2/BAX* (privação de soro: tratamento com rhPRL 3,3 \pm 1,0 vezes o controle após 24 h e rhPRL 2,8 \pm 0,7 vezes o controle após 48 h, tratamento com citocinas: rhPRL 4,8 \pm 0,9 vezes o controle e rhPRL 3,9 \pm 1,3 vezes o controle após 48

h) mas não a relação de *BCLXL/BAX* (privação de soro: tratamento com rhPRL 1,8±0,7 vezes o controle após 24 h e rhPRL 2,0±0,6 vezes o controle após 48 h, tratamento com citocinas: rhPRL 1,6±0,4 vezes o controle após 24 h e rhPRL 1,4±0,3 vezes o controle após 48 h) em culturas primárias de ilhotas humanas tanto sob privação de soro quanto sob tratamento com citocinas.

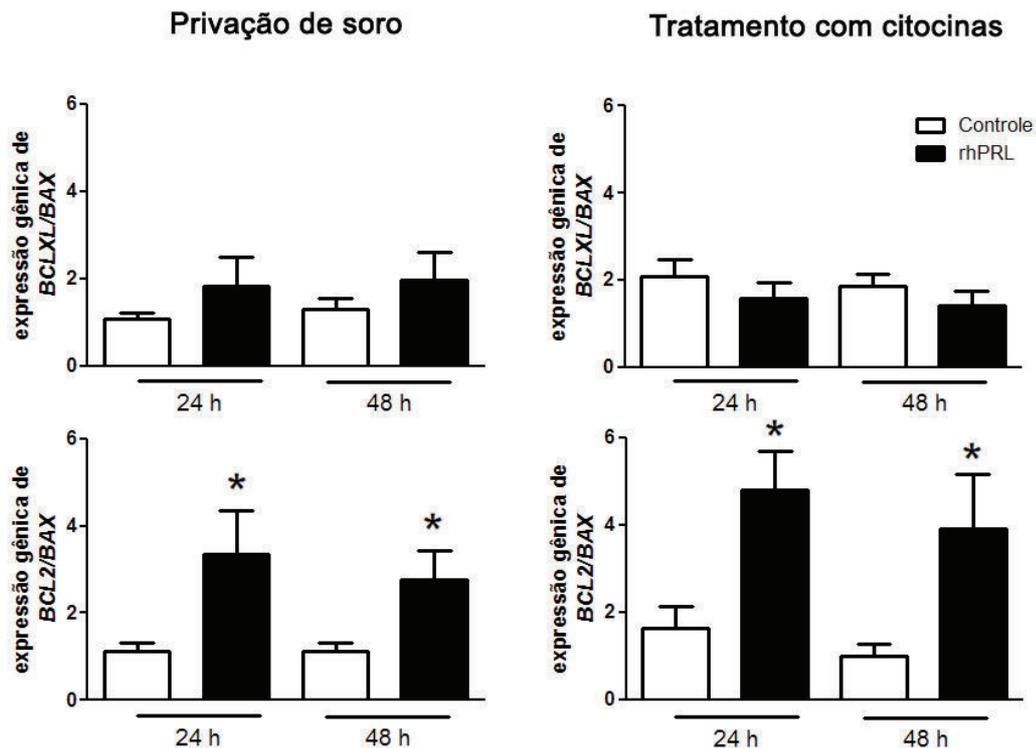


Figura 19: rhPRL aumenta a razão de mRNA entre membros anti- e pró-apoptóticos da família BCL2. Análise de qPCR de células submetidas à privação de soro ou tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL) foi realizada após 48 h de tratamento. Os painéis superiores mostram os resultados para *BCLXL* e *BAX*, enquanto os inferiores para *BCL2* e *BAX*. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os resultados de densitometria são médias±EPM; n=3 experimentos independentes realizados em triplicata; *p<0,05 para diferenças comparadas com a situação controle. A coluna da esquerda mostra células privadas de soro, enquanto a coluna da direita, células tratadas com citocinas.

Esses resultados foram confirmados também por análise de *immunoblotting* mostrando que os níveis proteicos apresentam um padrão similar àqueles obtidos para mRNA (Figura 20). Na realidade, enquanto os níveis proteicos de BCL2 aumentaram em níveis similares após ambas as condições de indução de morte celular (privação de soro: tratamento com rhPRL 4,1±0,5 vezes o controle, tratamento com citocinas: rhPRL 3,8±0,7 vezes o controle), os níveis de BAX foram

significativamente reduzidos pelo tratamento hormonal apenas nas células tratadas com citocinas (privação de soro: tratamento com rhPRL $0,75 \pm 0,02$ vezes o controle, tratamento com citocinas: rhPRL $0,03 \pm 0,005$ vezes o controle). Esses resultados podem ser explicados devido ao maior nível de mRNA de *BCL2/BAX* observados após o tratamento com rhPRL sob apoptose induzida por citocinas.

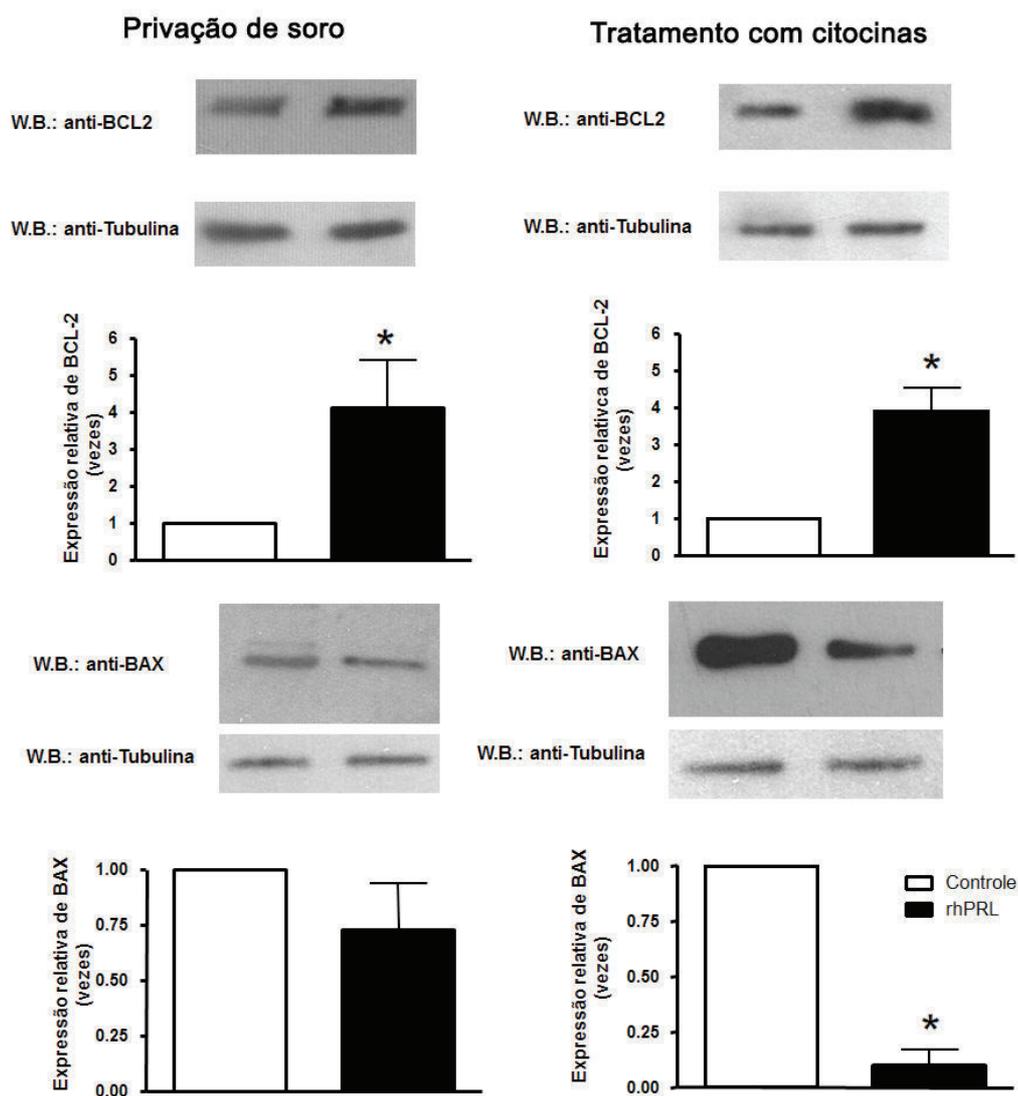


Figura 20: Aumento dos níveis de expressão de proteína de membros da família BCL2 após o tratamento com rhPRL. Análise de WB de BCL2 (painéis superiores) e BAX (painéis inferiores) de células submetidas à privação de soro ou tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL) foi realizada após 48 h de tratamento. Os resultados são médias \pm EPM; n=4 experimentos independentes; *p<0,05 para diferenças comparadas com a situação controle que foi fixada em 1. A coluna da esquerda mostra células privadas de soro, enquanto a coluna da direita, células tratadas com citocinas.

4.1.4. *rhPRL induz uma fosforilação rápida e transiente de p38*

Sabe-se que a ligação da rhPRL ao seu receptor ativa diversas vias de sinalização, contudo, não se sabe qual dessas vias poderia estar mediando o efeito citoprotetor causado pela rhPRL em células-beta humanas. Alguns trabalhos recentes mostraram que p38 pode estar regulando um aumento da sobrevivência de células INS-1 (Ehses; Casilla *et al.*, 2003). Foi investigada então, a cinética da ativação de p38 após o tratamento destas células com rhPRL. Como mostrado na Figura 21, o tratamento com rhPRL induziu uma rápida fosforilação de p38, começando aos 10 min e atingindo seu nível máximo em 30 min, retornando a níveis basais após 2 h.

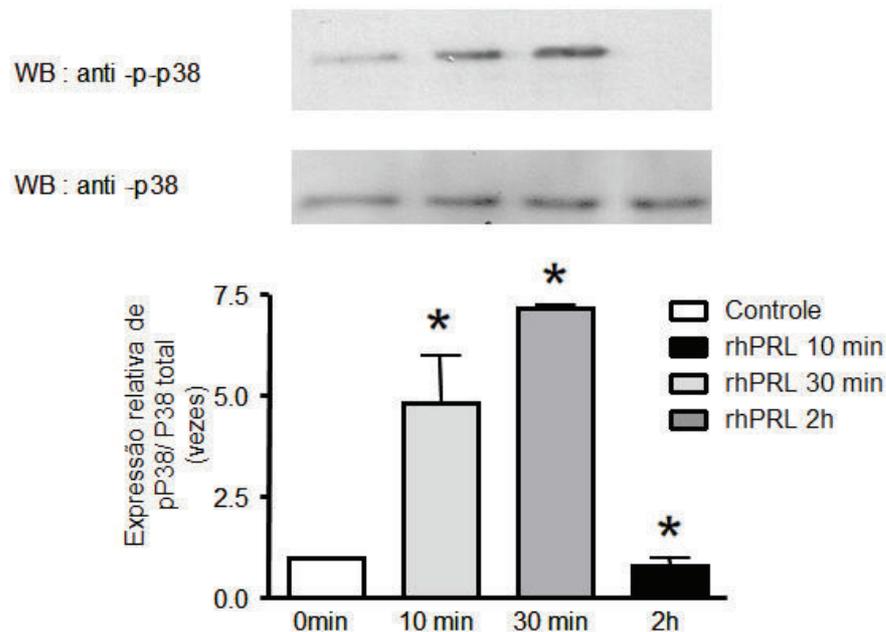


Figura 21: Níveis de expressão proteica e de fosforilação de tirosina de P38. Culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas, cultivadas em meio CMRL suplementado com 0,5% SFB, foram tratadas com rhPRL (200 ng/mL). Por 10 min, 30 min ou 2 h. As células foram lisadas e os níveis de p-p38 foram analisados por WB. O anticorpo foi removido das membranas e elas foram re-incubadas com um anticorpo anti-P38 para confirmar que níveis similares de proteínas foram carregados nos géis. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os resultados de densitometria são médias±EPM; n=3 experimentos independentes; *p<0,05 para diferenças comparadas com a situação controle que foi fixada em 1.

4.2. Citocinas induzem autofagia em células-beta via bloqueio de mTOR, enquanto rhPRL é capaz de reverter o processo iniciado tanto por citocinas quanto por indutores de estresse de retículo.

4.2.1. Rapamicina não aumenta os níveis de apoptose em células-beta

Durante a insulinitis, dependendo do momento, do grau de inflamação das ilhotas, das células do sistema imune presentes, e da resposta das células pancreáticas ao ataque imune, tanto a composição de citocinas e quanto suas respectivas concentrações podem variar (Eizirik; Colli *et al.*, 2009). Isso pode explicar a razão do bloqueio de TNF- α ou IL-1 β em estágios diferentes do período pré-diabético ser mais ou menos eficaz na prevenção do diabetes em modelos animais (Eizirik e Mandrup-Poulsen, 2001; Thomas; McKenzie *et al.*, 2009), sugerindo que a contribuição das diferentes citocinas e suas vias de sinalização podem variar entre diferentes pacientes com DM1. Por isso é importante entender, separadamente, como as citocinas atuam. Para isso, nesta parte trabalho, na qual se tentou entender o papel das citocinas na ativação de autofagia, optou-se por utilizar duas combinações de citocinas distintas, sendo elas IL-1 β + IFN- γ e TNF- α + IFN- γ .

A rapamicina, também conhecida como sirolimus, é um fungicida com funções imunossupressoras, ligando-se ao seu receptor intracelular, a *immunophilin 12-kDa FK506-binding protein* (FKBP-12). Esse complexo liga-se a mTOR, inibindo-o (Augustine; Bodziak *et al.*, 2007). A utilização de rapamicina como controle positivo de inibição da via de mTOR e, conseqüentemente, da ativação da autofagia, requer uma avaliação se o simples uso dessa droga levaria a um aumento na morte celular, e se sua combinação com citocinas causaria um efeito sinérgico amplificando a

apoptose causada por essas citocinas, uma vez que o tratamento com rapamicina estaria induzindo a autofagia nessas células.

Como mostrado na Figura 22, o tratamento com rapamicina no período de tempo e concentração utilizados (20 nM por 48 h) não causou um aumento nos níveis de apoptose tanto em células controle (controle: $3,1 \pm 0,4\%$ de células apoptóticas; rapamicina: $4,2 \pm 1,4\%$), quanto em células que passaram por um tratamento de indução de morte celular com tapsigargina (tapsigargina: $25,7 \pm 3,8\%$ de células apoptóticas; tapsigargina + rapamicina: $27,1 \pm 5,3\%$), inibidor não-competitivo da classe de enzimas *sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} ATPase (SERCA), conseqüentemente, indutor de estresse de retículo endoplasmático, ou com uma combinação das citocinas IL-1 β e IFN- γ (citocinas: $15,9 \pm 3,2\%$ de células apoptóticas; citocinas + rapamicina: $20,4 \pm 4,3\%$) ou de TNF- α e IFN- γ (citocinas: $18,2 \pm 1,6\%$ de células apoptóticas; citocinas + rapamicina: $20,3 \pm 5,6\%$).

Para testar se esta manutenção nos níveis de morte celular após o tratamento com rapamicina não ocorreu devido a uma possível insensibilidade à estes compostos por parte das células INS-1E, ilhotas de rato foram isoladas, dispersadas e então submetidas aos mesmos estímulos de indução de morte celular na presença ou ausência de rapamicina. Como se pode observar na Figura 22, o tratamento com rapamicina também não causou um aumento significativo ($p > 0,05$) nos níveis de apoptose em ilhotas dispersas, tanto na situação controle (controle: $20,0 \pm 2,0\%$ de células apoptóticas; rapamicina: $16,8 \pm 0,4\%$), quanto nas células que passaram pelos distintos tratamentos de indução de morte celular (tapsigargina: $40,7 \pm 0,5\%$ de células apoptóticas; tapsigargina + rapamicina: $50,2 \pm 1,5\%$; IL-1 β + IFN- γ : $23,7 \pm 2,8\%$; IL-1 β + IFN- γ + rapamicina: $31,0 \pm 3,9\%$; TNF- α + IFN- γ : $37,0 \pm 0,9\%$; TNF- α + IFN- γ + rapamicina: $34,8 \pm 2,0\%$).

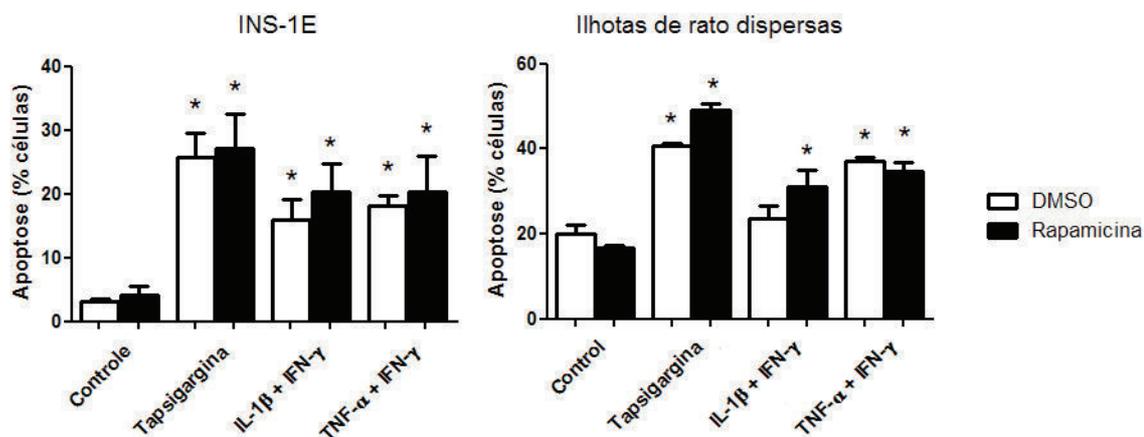


Figura 22: Tratamento com rapamicina não aumenta os níveis de apoptose de células INS-1E e de ilhotas de rato dispersadas. Células INS-1E foram tratadas com tapsigargina (100 nM) ou com uma combinação de TNF- α (1000 U/mL) e IFN- γ (36 ng/mL) ou IL-1 β (10 U/ μ L) e IFN- γ (36 ng/mL) por 16 horas na presença ou ausência de rapamicina (20nM) conforme indicado. Ilhotas de rato dispersadas foram tratadas com tapsigargina (100 nM) ou com uma combinação de TNF- α (1000 U/mL) e IFN- γ (500 U/mL) ou IL-1 β (50 U/ μ L) e IFN- γ (500 U/mL) por 24 horas na presença ou ausência de rapamicina (20nM) como indicado. $n \geq 4$ * $p < 0,05$ para diferenças comparadas tanto com DMSO quanto com rapamicina.

4.2.2. Citocinas causam um aumento na formação de autofagossomos em células INS-1E

Para investigar se o tratamento com citocinas está de fato induzindo autofagia em células-beta, células INS-1E foram analisadas por imunofluorescência com um anticorpo anti-LC3, classicamente utilizado como marcador de autofagia. Quando há ativação da via autofágica, ocorre a conversão de LC3-I em LC3-II e sua translocação do citoplasma para a membrana de autofagossomos, causando uma alteração na marcação para esta proteína.

A Figura 23 mostra um tratamento de células INS-1E com rapamicina e cloroquina, que bloqueia a fusão dos autofagossomos com os lisossomos levando ao acúmulo desses. Após o tratamento com rapamicina, e, em maior evidência, após o tratamento com cloroquina, é possível observar uma diferença no padrão da marcação de LC3, de dispersa no citoplasma, para a formação de aglomerados pontilistas.

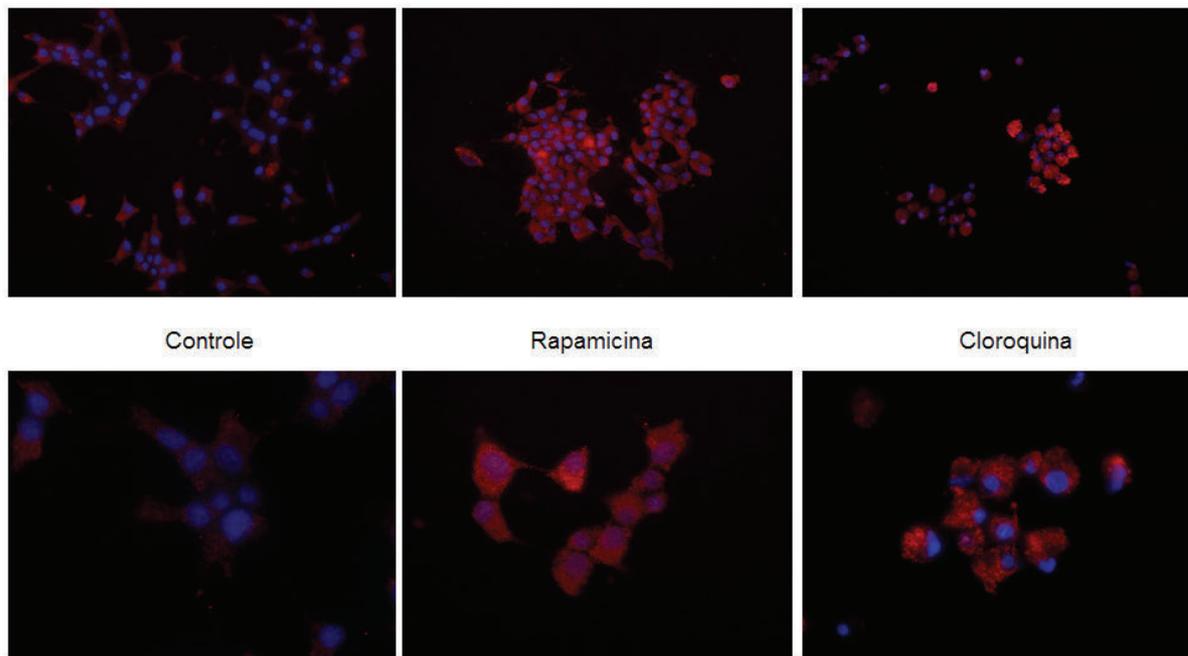


Figura 23: Aumento na formação de autofagossomos após tratamento com rapamicina e cloroquina. Campos representativos de células INS-1E tratadas com rapamicina (20 nM) ou cloroquina (10 μ M), marcadas com anti-LC3 e HO e analisadas por microscopia de fluorescência. n=2. Aumento: 200x (painéis superiores) e 1000x (painéis inferiores). Azul: Hoescht, Vermelho: LC3.

Células INS-1E foram então tratadas com rapamicina (48 horas) ou uma combinação de IL-1 β e IFN- γ por 16 ou 24 horas. Como mostra a Figura 24, é possível observar que após o tratamento com citocinas, existe uma alteração marcante no padrão de marcação do mesmo, assim como acontece quando essas células são tratadas com rapamicina. Essa alteração mostra que o tratamento com citocinas induz um aumento na formação de autofagossomos.

A Figura 25 mostra que o tratamento tanto com a combinação de IL-1 β e IFN- γ ($1,2 \pm 0,1$), quanto com TNF- α e IFN- γ ($1,1 \pm 0,2$) leva a um aumento da razão LC3-II/LC3-I em células INS-1E quando comparadas com células controle ($0,2 \pm 0,1$) assim como foi observado após o tratamento com rapamicina ($0,8 \pm 0,2$).

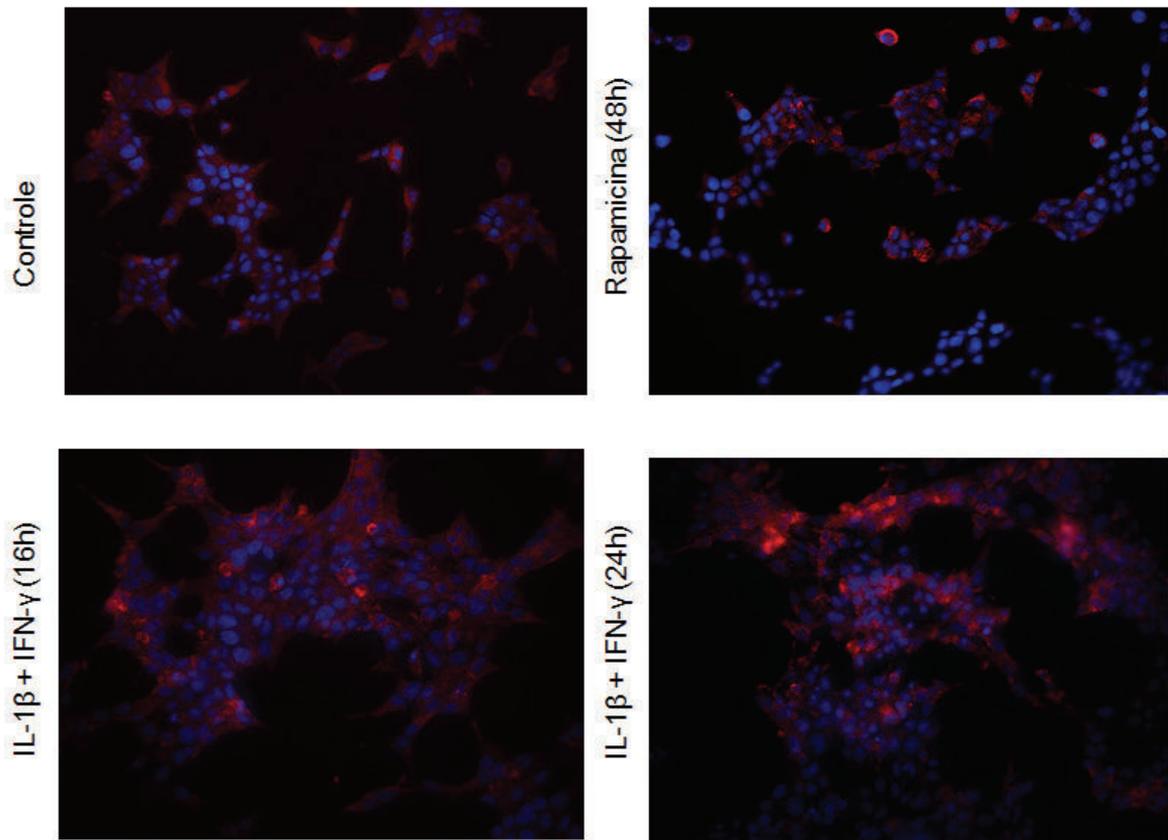


Figura 24: Aumento na formação de autofagossomos após tratamento com citocinas. Campos representativos de células INS-1E foram tratadas com rapamicina (20 nM) ou com uma combinação de IL-1 β (10 U/ μ L) e IFN- γ (36 ng/mL) pelos períodos indicados), marcadas com anti-LC3 e HO e analisadas por microscopia de fluorescência. n=3. Aumento: 200x. Azul: Hoescht, Vermelho: LC3.

Com o aumento dos estudos mostrando uma ligação do estresse de retículo endoplasmático com a ação de citocinas em células-beta, e conseqüentemente, com a doença DM1 (Oyadomari; Takeda *et al.*, 2001; Wang; Zhao *et al.*, 2007; Shao; Lawrence *et al.*, 2010; Allagnat; Cunha *et al.*, 2011), e sabendo-se que o estresse de retículo pode levar ao acúmulo de proteínas mal enoveladas, foi testado se o estresse de retículo levaria à ativação da autofagia em células-beta. Células INS-1E foram tratadas com compostos indutores de estresse de retículo, como tapsigargina ou tunicamicina, um inibidor das N-acetilglicosamina transferases, impedindo a síntese de glicoproteínas. Conforme pode ser observado na Figura 25, o tratamento resultou em um aumento da razão LC3-II/LC3-I (tapsigargina: $1,1\pm 0,2$; tunicamicina: $1,3\pm 0,1$).

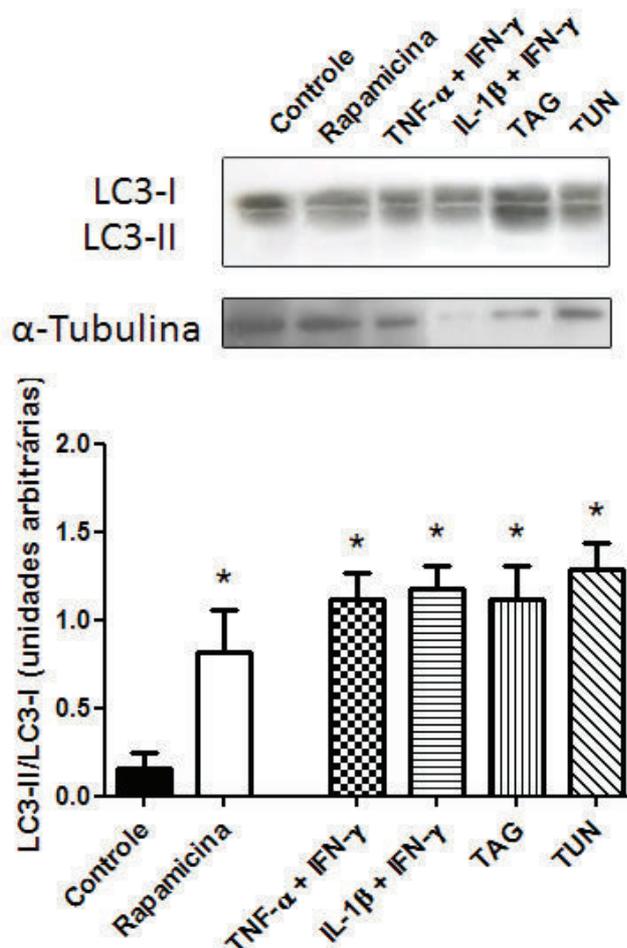


Figura 25: Tratamento com citocinas causa um aumento da relação LC3-II/LC3-I em células-beta. Análise de WB de LC3 de células INS-1E tratadas com rapamicina (20nM) ou com uma combinação de TNF- α (1000 U/mL) e IFN- γ (36 ng/mL), IL-1 β (10 U/ μ L) e IFN- γ (36 ng/mL), TAG (100 nM) ou TUN (10 μ g/mL). Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os histogramas correspondentes são resultados de densitometria apresentados como médias \pm EPM; n=3 experimentos independentes. *p<0,05 para diferenças comparadas com o controle.

4.2.3. Citocinas causam diminuição nos níveis de mTOR fosforilado e 4E-BP1 fosforilado em células INS-1E

Como mostra a Figura 26, o tratamento tanto com a combinação de IL-1 β e IFN- γ , quanto com TNF- α e IFN- γ , foi capaz de reduzir significativamente os níveis de fosforilação de mTOR a partir de 4 h de tratamento (para IL-1 β + IFN- γ : controle: 3,1 \pm 0,6; rapamicina: 0,3 \pm 0,1; 4 h: 1,1 \pm 0,4; 8 h: 0,5 \pm 0,1; 16 h: 0,5 \pm 0,1; 24 h: 0,3 \pm 0,1; para TNF- α + IFN- γ : controle: 3,0 \pm 0,5; rapamicina: 0,4 \pm 0,2; 4 h: 0,9 \pm 0,3; 8 h: 1,1 \pm 0,1; 16 h: 0,7 \pm 0,3; 24 h: 0,8 \pm 0,3).

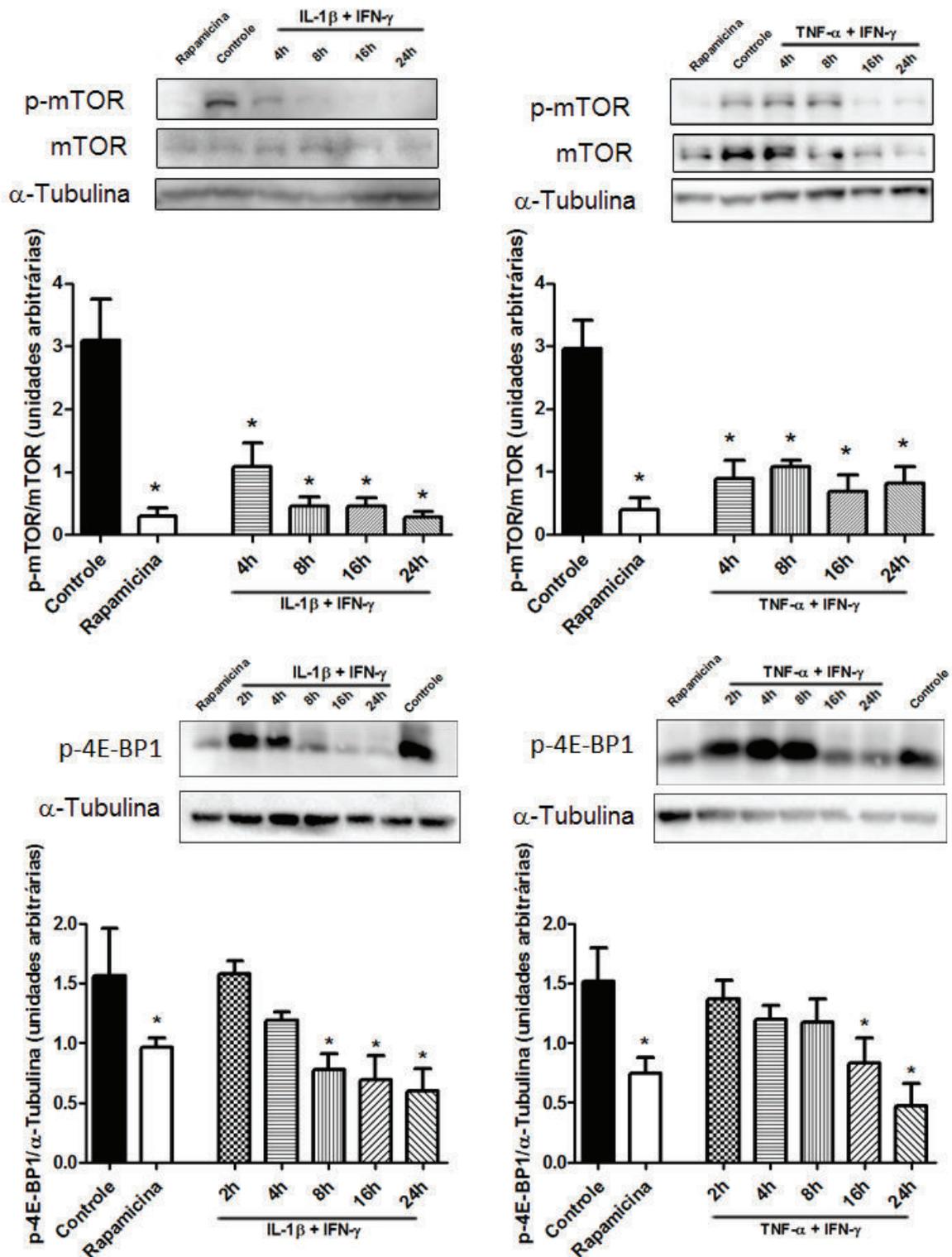


Figura 26: Diminuição dos níveis de p-mTOR e p-4E-BP1 após o tratamento com citocinas. Análise de WB de p-mTOR (painéis superiores) e p-4E-BP1 (painéis inferiores) de células INS-1E tratadas com rapamicina (20nM) ou com uma combinação de TNF- α (1000 U/mL) e IFN- γ (36 ng/mL), coluna da direita, ou IL-1 β (10 U/ μ L) e IFN- γ (36 ng/mL), coluna da esquerda, pelos tempos indicados. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os resultados de densitometria são médias \pm EPM; n=4 experimentos independentes; *p<0,05 para diferenças comparadas com o controle.

É possível verificar também, que o tratamento com IL-1 β e IFN- γ foi capaz de reduzir os níveis de 4E-BP1 fosforilado, um produto da ativação de mTOR, a partir de 8 h de tratamento (controle: $1,6\pm 0,4$; rapamicina: $1,0\pm 0,1$; 2 h: $1,6\pm 0,1$; 4 h: $1,2\pm 0,1$; 8 h: $0,8\pm 0,1$; 16 h: $0,7\pm 0,2$; 24 h: $0,6\pm 0,2$), enquanto que, para a combinação de TNF- α e IFN- γ , esta redução só foi estatisticamente significativa a partir de 16 h (controle: $1,5\pm 0,3$; rapamicina: $0,7\pm 0,1$; 2 h: $1,4\pm 0,2$; 4 h: $1,2\pm 0,1$; 8 h: $1,2\pm 0,2$; 16 h: $0,8\pm 0,2$; 24 h: $0,5\pm 0,2$).

Em conjunto, esses dados mostram que citocinas inibem a via de mTOR em células-beta, reforçando a indicação que elas de fato induzem autofagia nessas células.

4.2.4. *Estresse de retículo causa uma diminuição nos níveis de mTOR fosforilado em células INS-1E*

Com o intuito de avaliar se a indução de estresse de retículo endoplasmático levaria à indução de autofagia via inibição da via de mTOR, células INS-1E foram tratadas com tapsigargina ou tunicamicina. Na Figura 27, é possível observar que o tratamento tanto com tapsigargina quanto com tunicamicina levou à diminuição dos níveis de fosforilação de mTOR (para tapsigargina: controle: $1,7\pm 0,3$; rapamicina: $0,2\pm 0,1$; 4 h: $1,6\pm 0,2$; 8 h: $1,0\pm 0,2$; 16 h: $0,9\pm 0,2$; 24 h: $0,8\pm 0,1$; para tunicamicina: controle: $2,0\pm 0,2$; rapamicina: $0,02\pm 0,01$; 2 h: $1,2\pm 0,5$; 4 h: $0,6\pm 0,1$; 8 h: $0,7\pm 0,6$; 16 h: $0,6\pm 0,2$; 24 h: $0,6\pm 0,2$).

Cabe ainda salientar que o tratamento com tunicamicina atingiu o bloqueio efetivo da via de mTOR em períodos de tempo mais curtos do que os observados no tratamento com tapsigargina.

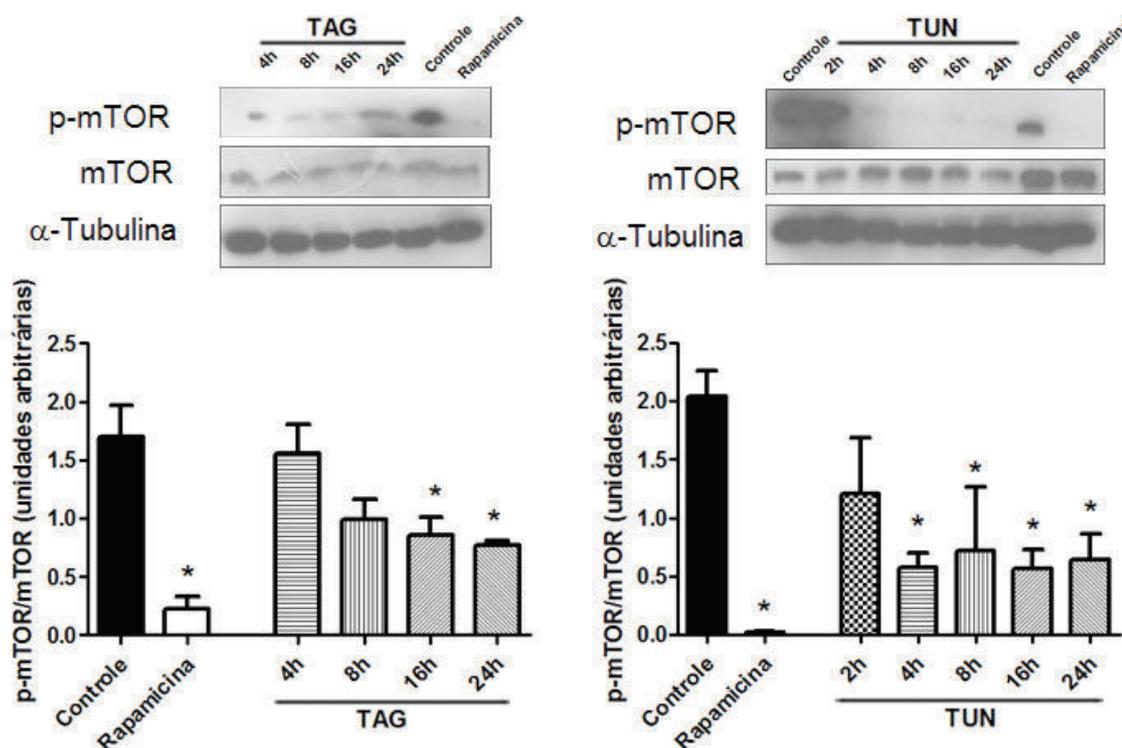


Figura 27: Diminuição dos níveis de p-mTOR após o tratamento com indutores de estresse de retículo. Análise de WB de p-mTOR de células INS-1E tratadas com rapamicina (20nM) ou com tapsigargina (100 nM), coluna da esquerda, ou tunicamicina (10 μ g/mL), coluna da direita, pelos tempos indicados. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os resultados de densitometria são médias \pm EPM; n=2 experimentos independentes; *p<0,05 para diferenças comparadas com o controle.

4.2.5. Tratamento com rapamicina diminui os níveis de MCL1 em células INS-1E

Recentemente, foi sugerido através de diversos experimentos, que a inibição da expressão de *Myeloid cell leukemia sequence 1* (MCL1), membro anti-apoptótico da família BCL2, é um evento crucial e precoce na apoptose de células-beta (Allagnat; Cunha *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que a via de mTOR promove a sobrevivência de células tumorais através da tradução de MCL1 (Mills; Hippo *et al.*, 2008). Foi investigado então, se a via de mTOR também regula MCL1. Os resultados da Figura 28 mostram que tratamento de células INS-1E com IL-1 β e IFN- γ e com TNF- α e IFN- γ levou à diminuição, já após 16 h de tratamento, na expressão de MCL1, como previamente demonstrado (Allagnat; Cunha *et al.*, 2011). Interessantemente, o tratamento com rapamicina também levou à diminuição

significativa da expressão de MCL1 (para IL-1 β + IFN- γ : controle: 2,1 \pm 0,3; rapamicina: 0,6 \pm 0,2; 2 h: 1,5 \pm 0,1; 4 h: 1,0 \pm 0,1; 8 h: 0,7 \pm 0,1; 16 h: 0,5 \pm 0,2; 24 h: 0,4 \pm 0,2; para TNF- α + IFN- γ : controle: 1,5 \pm 0,3; rapamicina: 0,4 \pm 0,1; 2 h: 1,1 \pm 0,3; 4 h: 1,3 \pm 0,4; 8 h: 1,3 \pm 0,1; 16 h: 0,6 \pm 0,1; 24 h: 0,6 \pm 0,2).

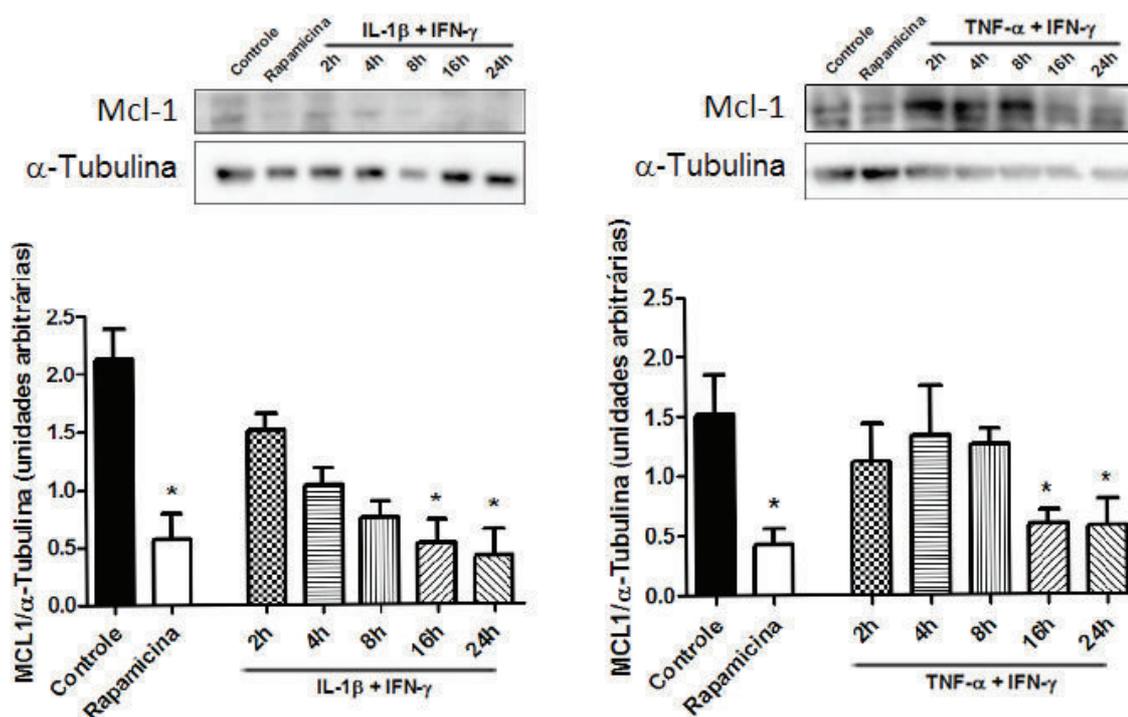


Figura 28: Diminuição da expressão de MCL1 em células INS-1E após o tratamento com rapamicina e diferentes combinações de citocinas. Análise de WB de MCL1 de células INS-1E tratadas com rapamicina (20nM) ou com uma combinação de TNF- α (1000 U/mL) e IFN- γ (36 ng/mL) ou IL-1 β (10 U/ μ L) e IFN- γ (36 ng/mL) pelos tempos indicados. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os resultados de densitometria são médias \pm EPM; n=4 experimentos independentes; *p<0,05 para diferenças comparadas com o controle.

4.2.6. Tratamento com rhPRL causa diminuição na porcentagem de apoptose em células INS-1E

Para confirmar que a rhPRL age nas células INS-1E da mesma forma que nas culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas, essas células foram estimuladas com diferentes combinações de citocinas, na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL). Como se pode observar na Figura 29, a rhPRL foi capaz de reduzir a porcentagem de células apoptóticas tanto em células tratadas com a combinação de IL-1 β e IFN- γ quanto com a de TNF- α e IFN- γ , tratadas ou não com

rapamicina (controle: $3,7 \pm 0,8\%$ de células apoptóticas, rhPRL: $2,5 \pm 0,2\%$; IL- 1β + IFN- γ : $18,2 \pm 5,5\%$; IL- 1β + IFN- γ + rhPRL: $6,9 \pm 2,9\%$; TNF- α + IFN- γ : $19,7 \pm 2,5\%$, TNF- α + IFN- γ + rhPRL: $4,8 \pm 1,4\%$; rapamicina: $6,8 \pm 1,8\%$, rapamicina + rhPRL: $2,6 \pm 0,5\%$; IL- 1β + IFN- γ + rapamicina: $21,1 \pm 3,5\%$; IL- 1β + IFN- γ + rapamicina + rhPRL: $4,3 \pm 1,9\%$; TNF- α + IFN- γ + rapamicina: $20,7 \pm 4,3\%$; TNF- α + IFN- γ + rapamicina + rhPRL: $6,3 \pm 3,0\%$).

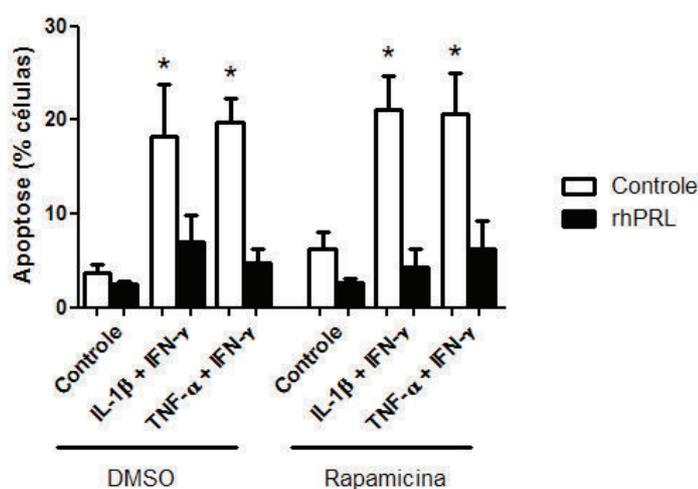


Figura 29: Diminuição dos níveis de apoptose induzida por citocinas e tapsigargina em células INS-1E após o tratamento com rhPRL. Células INS-1E foram tratadas com tapsigargina (100 nM) ou com uma combinação de TNF- α (1000 U/mL) e IFN- γ (36 ng/mL) ou IL- 1β (10 U/ μ L) e IFN- γ (36 ng/mL) por 16 h na presença ou ausência de rapamicina (20 nM) e de rhPRL (200 ng/mL) como indicado. * $p < 0,05$ para diferenças comparadas tanto com DMSO quanto com rapamicina.

4.2.7. *rhPRL é capaz de restaurar os níveis de mTOR fosforilado após o tratamento com citocinas e com indutores de estresse de retículo em células INS-1E*

É possível observar na Figura 30, que o cotratamento com rhPRL foi capaz de restaurar os níveis de fosforilação de mTOR em células INS-1E após todos os tratamentos testados: IL- 1β e IFN- γ , TNF- α e IFN- γ , tapsigargina e tunicamicina (controle: $1,6 \pm 0,2$; rapamicina: $0,1 \pm 0,3$; IL- 1β e IFN- γ : $0,8 \pm 0,1$; IL- 1β e IFN- γ + rhPRL: $2,3 \pm 0,6$; TAG: $0,4 \pm 0,1$; TAG + rhPRL: $1,5 \pm 0,2$; TUN: $0,2 \pm 0,2$; TUN + rhPRL: $1,3 \pm 0,1$).

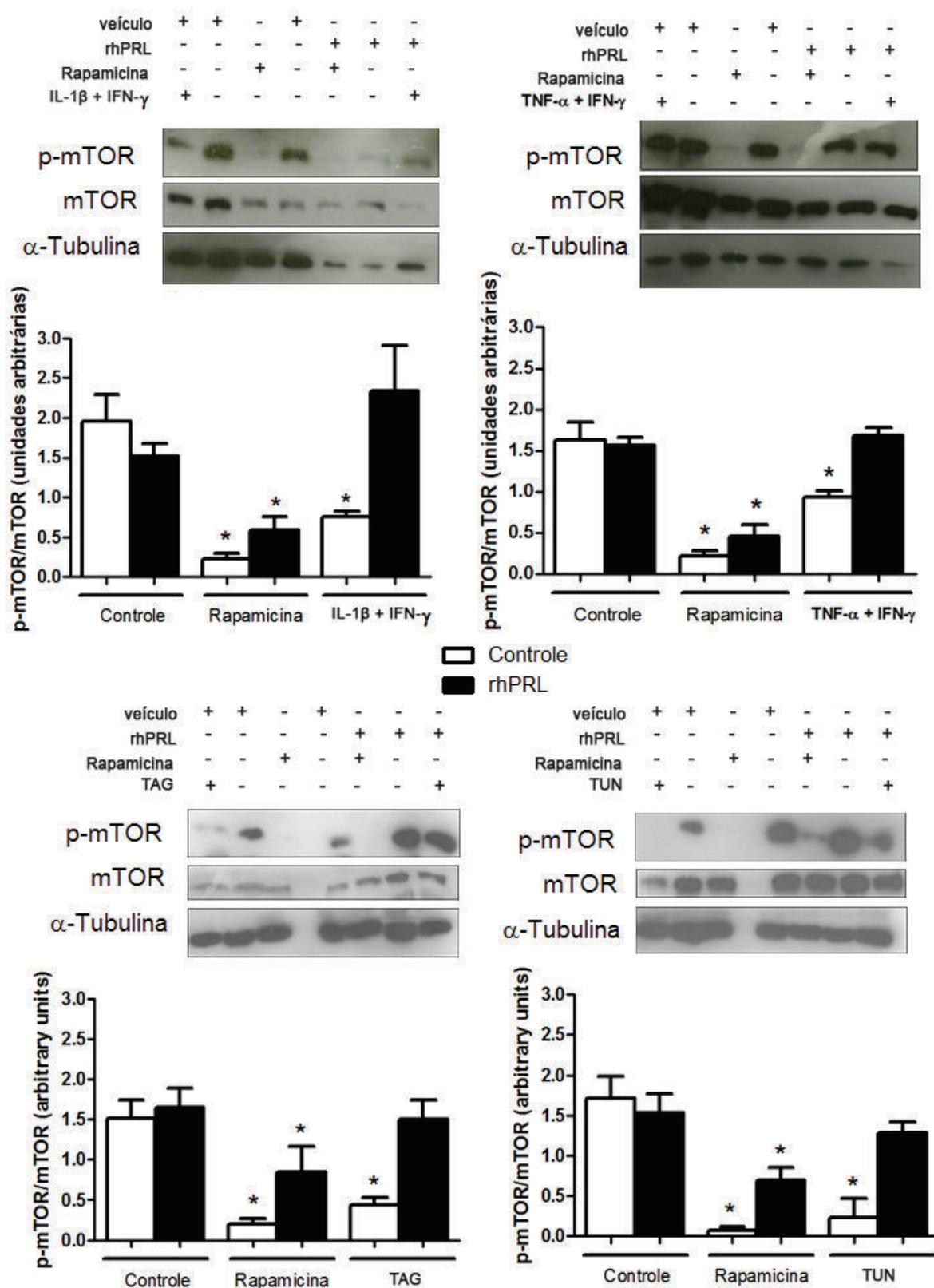


Figura 30: Aumento dos níveis de p-mTOR após o tratamento com rhPRL. Análise de WB de p-mTOR de células INS-1E tratadas com rapamicina (20nM por 48 horas) ou com uma combinação de TNF- α (1000 U/mL) e IFN- γ (36 ng/mL), IL-1 β (10 U/ μ L) e IFN- γ (36 ng/mL), taspigargina (100 nM) ou tunicamicina (10 μ g/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL). Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os resultados de densitometria são médias \pm EPM; n=3 experimentos independentes; *p<0,05 para diferenças comparadas com o controle.

4.2.8. O tratamento com citocinas induz um aumento da razão LC3-II/LC3-I em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas e o tratamento com rhPRL uma diminuição.

Resultados preliminares indicam que, em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas, o tratamento com uma combinação de citocinas induz um aumento da relação LC3-II/LC3-I ainda mais proeminente que aquele causado pela privação de soro (Figura 31). Esses resultados também sugerem que o tratamento com rhPRL é capaz de diminuir essa razão, tanto em células privadas de soro (controle: $1,3 \pm 0,1$; rhPRL: $0,8 \pm 0,1$), quanto em células tratadas com uma combinação de citocinas (controle: $1,6 \pm 0,1$; rhPRL: $0,9 \pm 0,4$).

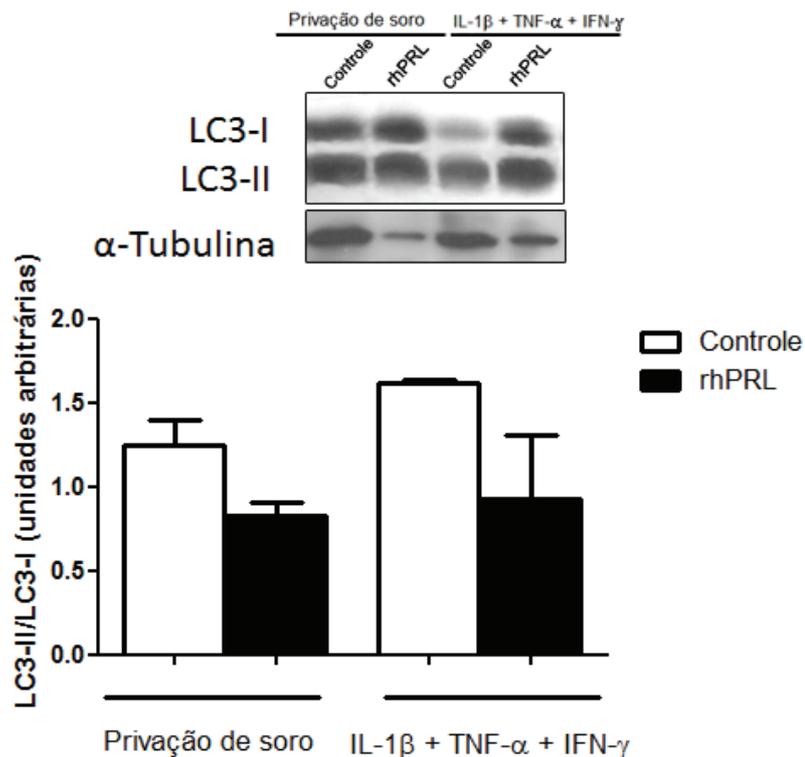


Figura 31: Tratamento com citocinas causa um aumento da relação LC3-II/LC3-I, enquanto que o tratamento com rhPRL causa uma reversão deste quadro em culturas primárias de ilhotas humanas. Análise de WB de culturas primárias de ilhotas humanas submetidas à privação de soro ou tratadas com uma combinação de citocinas (IL-1 β , 0,4 ng/mL; TNF- α , 4 ng/mL; IFN- γ , 2 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (200 ng/mL) foi realizada após 48 h de tratamento. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os histogramas correspondentes são resultados de densitometria apresentados como médias \pm EPM; n=2 experimentos independentes.

4.3. *Novas proteínas encontradas como sendo diferencialmente expressas em culturas primárias de ilhotas humanas e insulinomas humanos*

4.3.1. *Comparação de perfis de expressão proteica de células de insulinomas humanos e de ilhotas pancreáticas humanas normais*

A Figura 32 mostra um perfil representativo obtido de um dos géis analíticos. É importante ressaltar que a alta resolução e a alta reprodutibilidade do padrão 2D obtidos levaram a uma alta proporção de proteínas pareadas.

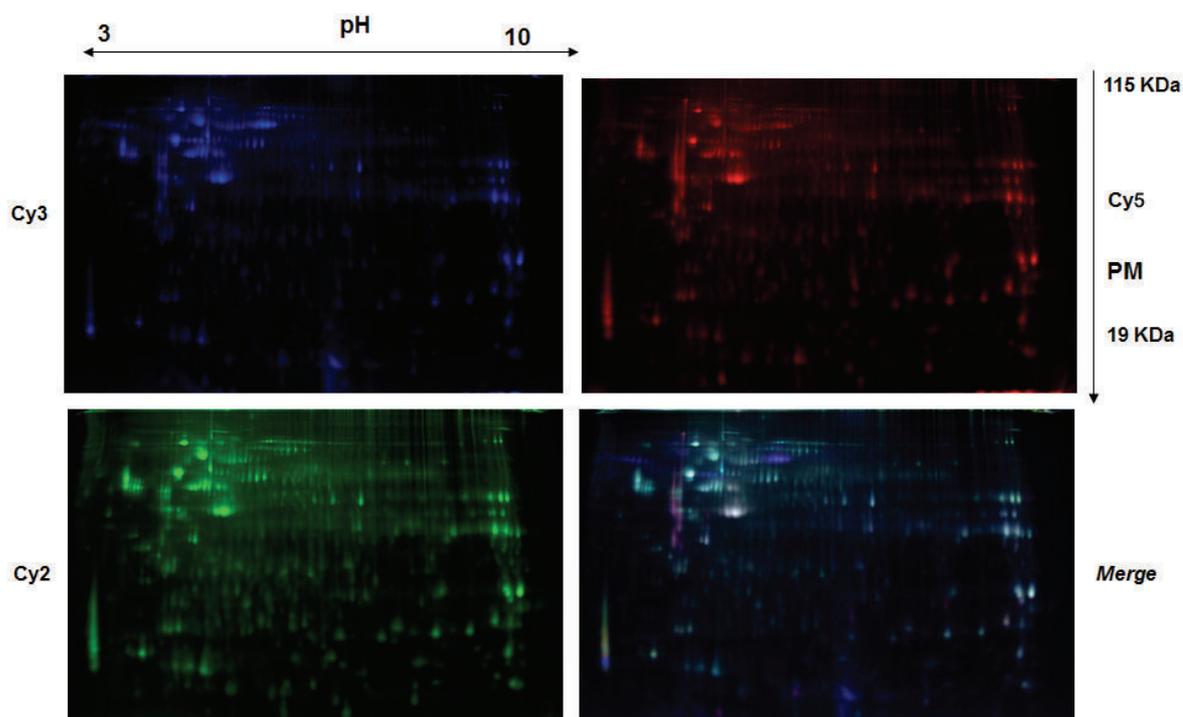


Figura 32: Exemplo de perfis de expressão de proteínas obtidos por 2D-DIGE. Exemplo do perfil de um gel analítico de extratos proteicos totais de uma cultura primária de ilhotas pancreáticas humanas (marcada com Cy5), de uma passagem da linhagem celular derivada de um insulinoma humano APM (Cy3) e de uma mistura de todos os extratos proteicos utilizados em todos os géis (Cy2). As imagens são o resultado do fracionamento de 50 µg de extrato proteico total. O marcador de PM (vertical) e o gradiente de pH da primeira dimensão (horizontal) estão representados na figura.

Uma média de 1.800 proteínas foi detectada nos géis analíticos, com aproximadamente 60% das proteínas estando presentes em todos os géis (Tabela

6). Para analisar a similaridade das amostras, os quatro pares de amostras foram comparados através do programa DeCyder V6.5 (GE Healthcare), como descrito em Material e Métodos.

Tabela 6: Caracterização dos perfis obtidos por 2D-DIGE.

Gel	Spots	Pares identificados		Spots diferencialmente expressas		
		Total	% de proteínas totais	Total	% dos pares identificados	
01	Ins	1.737	1.111	63,9	11	1
	Isl					
	Pool					
02	Ins	1.758	1.125	64,0	11	1
	Isl					
	Pool					
03	Ins	1.876	1.058	56,04	7	0,4
	Isl					
	Pool					
04	Ins	1.838	1.638	89,1	11	0,7
	Isl					
	Pool					

Ins: 50 µg de extrato proteico de células APM (insulinoma humano) marcado com Cy5

Isl: 50 µg de extrato proteico de cultura primária de ilhotas pancreáticas marcado com Cy5

Ins: 50 µg de extrato proteico de células APM (insulinoma humano) marcado com Cy3

Isl: 50 µg de extrato proteico de cultura primária de ilhotas pancreáticas marcado com Cy3

Pool: 50 µg de uma mistura de todos os extratos proteicos usados em todos os géis marcada com Cy2

Na Figura 33 é possível observar que o gel 03 apresentou uma distorção do lado esquerdo. Embora isto não tenha interferido nas análises, o gel 04 foi escolhido como gel mestre, por apresentar o segundo maior número de proteínas, para que os outros géis fossem pareados a ele e a análise estatística pudesse ser realizada. Aproximadamente 64% (1.111) das proteínas presentes no gel 01 foram pareadas ao gel mestre, enquanto 64% (1.125) daquelas presentes no gel 02 e 56% (1.058) das presentes no gel 03 foram igualmente pareadas (Tabela 6).

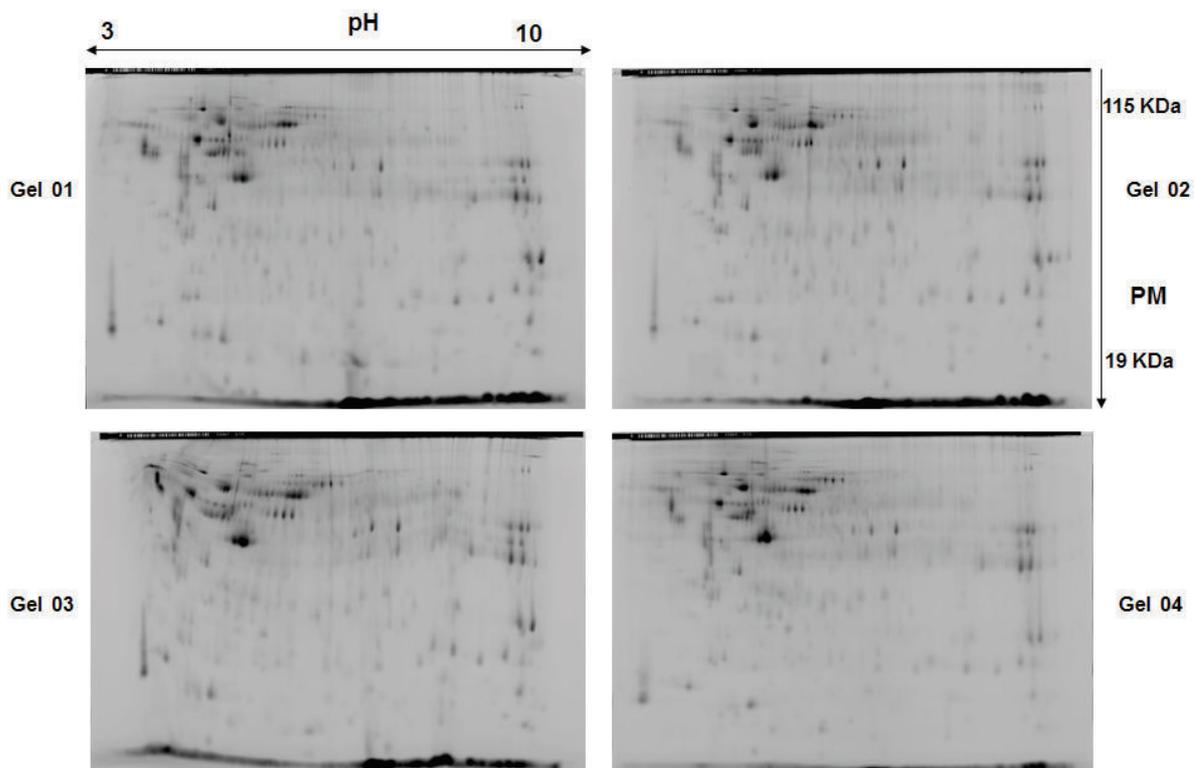


Figura 33: Perfis de expressão de proteínas dos géis analíticos obtidos por 2D-DIGE. Perfis de extratos proteicos totais de culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas e de diferentes passagens da linhagem celular APM derivada de um insulinoma humano. As imagens correspondem ao fracionamento de 50 µg de proteínas de uma mistura de todos os extratos proteicos utilizados em todos os géis marcada com Cy2. O marcador de PM (vertical) e o gradiente de pH da primeira dimensão (horizontal) estão representados nesta figura.

Aplicando o teste-t de Student não pareado, gerado pelo módulo BVA do DeCyder V6.5, e considerando como estatisticamente relevante $p < 0,05$, fomos capazes de identificar 11 proteínas diferencialmente expressas entre insulinomas e culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas (1% de todas as proteínas detectadas; Tabela 6), oito das quais mostraram expressão aumentada de ao menos duas vezes o desvio padrão (DP) em amostras de insulinoma e três que apresentaram expressão diminuída quando comparadas com as amostras de ilhotas.

A Figura 34 mostra um gel bidimensional (2D) no qual estão indicadas todas as proteínas excisadas, sendo elas nove proteínas diferencialmente expressas (setas) e oito não diferencialmente expressas.

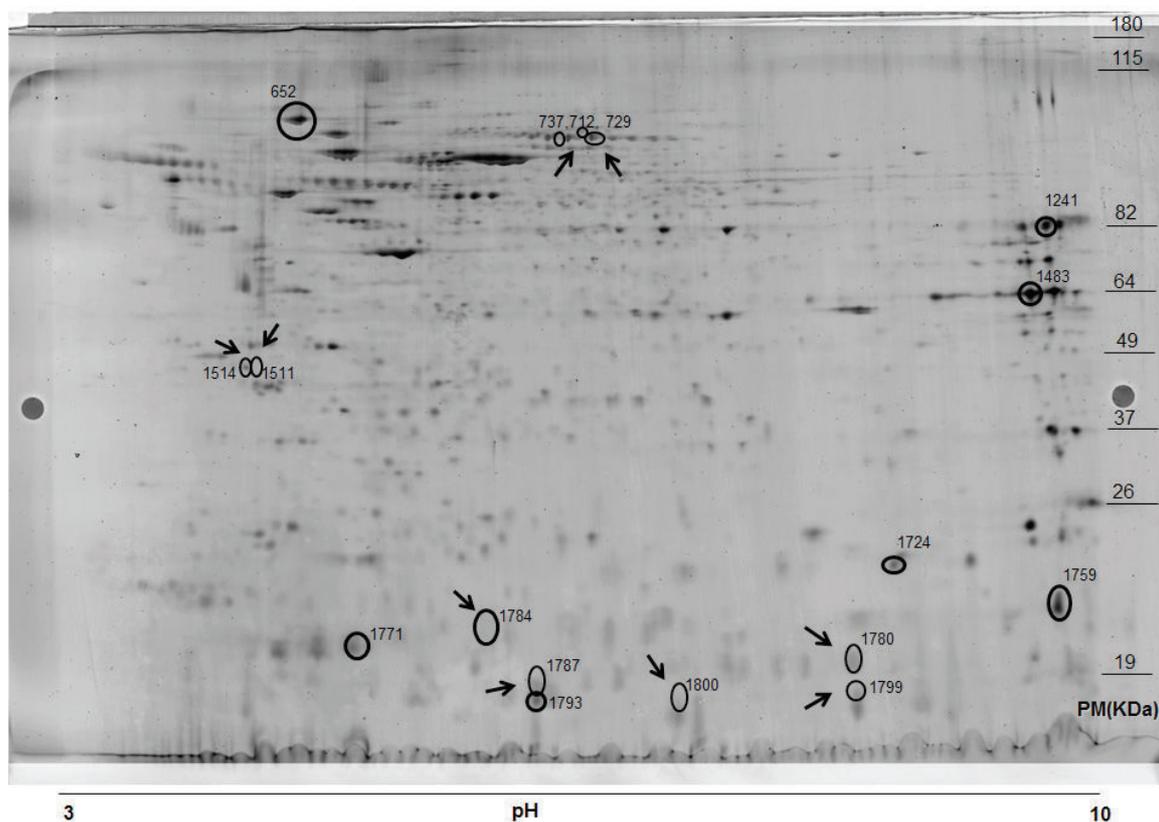


Figura 34: Localização das proteínas selecionadas para identificação por MS. Exemplo do perfil de um gel preparativo com 500 μg de extratos proteicos de células APM e de culturas primárias de ilhotas pancreáticas coradas com Deep Purple®. As setas indicam proteínas diferencialmente expressas.

A Figura 35 exemplifica os dados numéricos utilizados para a quantificação dos níveis proteicos, apresentados aqui como gráficos tridimensionais (3D), de alguns *spots*: 1799 e 1780 (diferencialmente expressos) e 1724 e 1241 (não diferencialmente expressas).

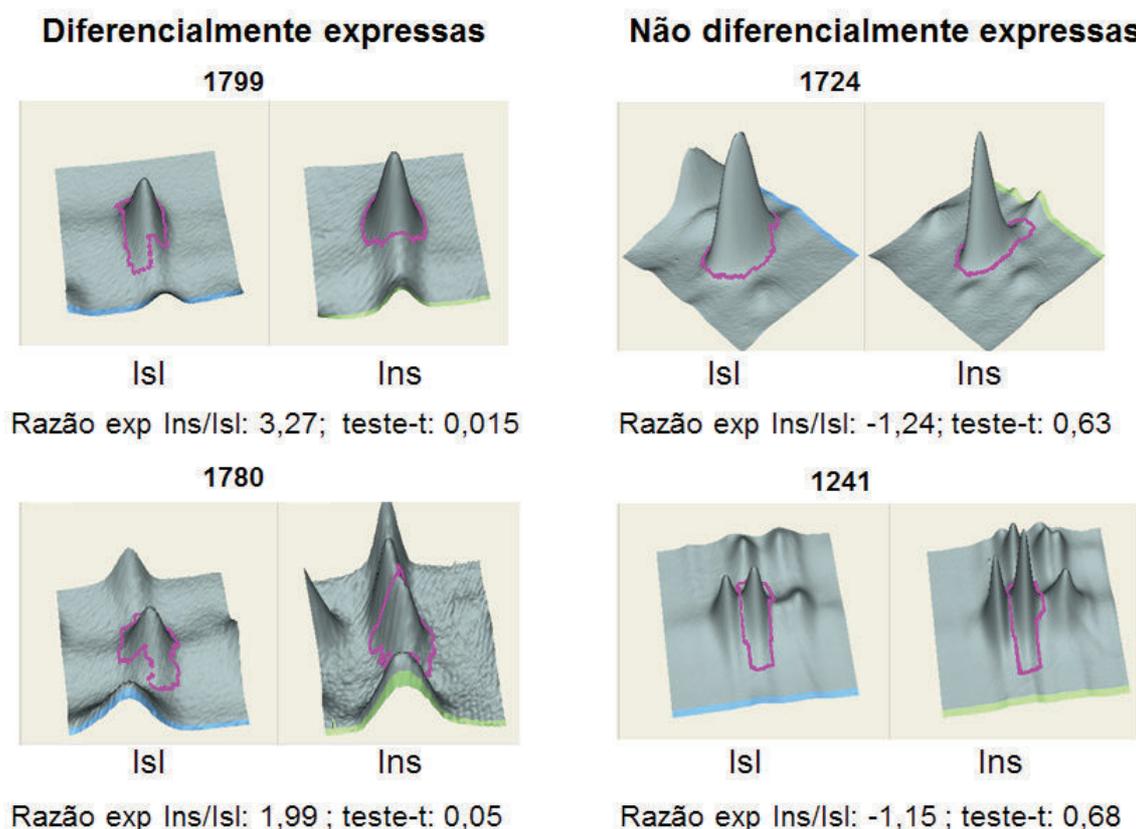


Figura 35: Quantificação da abundância relativa dos spots em extratos de células de insulinoma APM e de ilhotas pancreáticas. Representações 3D de spots apresentando expressão diferencial ou não. Os dados são apresentados como valores médios de expressão relativa e o valor de p do teste-t de todos os géis analíticos (n=4). Valores positivos da razão Ins/Isl representam expressão aumentada em células APM quando comparadas com ilhotas humanas, enquanto valores negativos representam expressão aumentada nas ilhotas humanas.

Deve ser levado em conta que a grande dispersão entre os valores quando se comparam células de diferentes doadores e as similaridades encontradas entre a linhagem de insulinoma APM e as culturas de ilhotas podem ter contribuído para o número reduzido de proteínas diferencialmente expressas. A Figura 36 mostra um exemplo do padrão de dispersão do spot 285, cuja análise estatística acusou $p=0,17$, portanto não diferencialmente expresso entre as culturas de células APM e as culturas primárias de ilhotas humanas. Neste gráfico é possível observar, que a dispersão na abundância relativa desta proteína nas culturas de células APM é baixa, enquanto que nas culturas primárias esta dispersão é bastante significativa,

podendo ter sido de fato responsável pela caracterização desta proteína como não diferencialmente expressa.

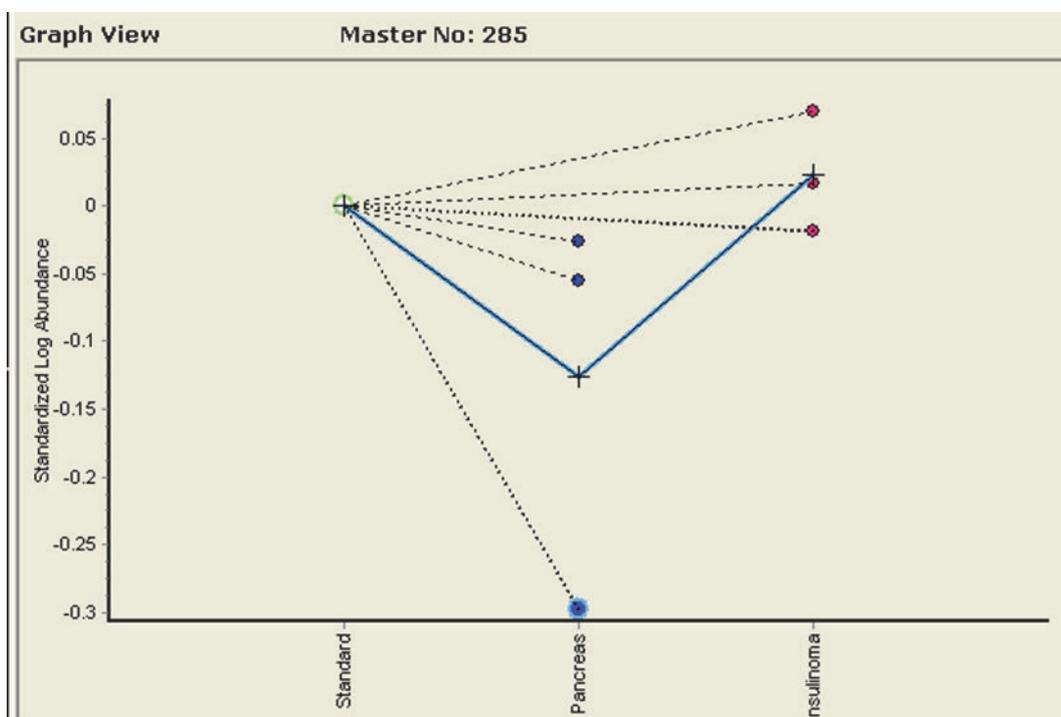


Figura 36: Log da abundância normalizada do *spot* 285 no controle interno, culturas primárias de ilhotas humanas e culturas de células APM, respectivamente.

4.3.2. Proteínas identificadas por MS

Dezessete proteínas, das quais nove são diferencialmente expressas, foram excisadas de géis preparativos (um total de 8) e nove foram identificadas por MS, representando uma taxa de sucesso de 53%. É importante mencionar que muitas das proteínas não identificadas apresentam uma baixa abundância, estando presentes apenas em géis marcados com fluoróforos, e não em géis corados com Coomassie. Além disso, algumas possuem um baixo PM, o que pode ter contribuído fortemente para esta baixa taxa de sucesso na identificação.

A Tabela 7 mostra as proteínas identificadas, juntamente com informações a respeito do número de acesso, a relação de expressão entre insulinomas e ilhotas

(razão ins/isl), valor de p, PM e pl teóricos e experimentais, o score de identificação e a cobertura da sequência.

Tabela 7: Proteínas identificadas por MS.

Spot	Grupo	Proteína	Número de acesso	Razão		PM (kDa)		pl		Score	Cobertura (%)
				Ins/isl *	Teste-t (valor p)	Teór.	Exp.	Teór.	Exp.		
712 §	isl	CALD-1	Q05682	-1,49	0,017	93,8	108	5,6	6,4	173	28,3
729 §	isl	NR6A1	Q15406	-2,01	0,05	52,1	106	6,47	6,5	34	1,32
737 #	adj	PKN1	Q16512	-1,66	0,46	104,7	105	6,0	6,34	36	1
1483 #	n. dif	NEUA	Q8NFW8	-1,09	0,82	49,0	59	8,1	9,5	40	1
1511 #	ins	MAGEA2	P43356	3,84	0,036	60,6	53	5,0	4,24	43	7
1514 §	ins	14-3-3ζ	P63104	4,23	0,037	93,3	53	5,6	4,20	173	28,3
1724 #	n. dif	GAPDH	P04406	-1,19	0,63	36	27	8,6	8,5	505	33
1800 §	ins	Dermcidin	P81605	3,09	0,015	11,3	17	6,54	7,1	41	20
1780 §	ins	OTUD7A	Q8TE49	1,99	0,05	100,6	20	8,4	8,2	20	1,51

Proteínas identificadas por LTQ XL (Thermo)

§ Proteínas identificadas por LTQ-Orbitrap XL (EasynLC; Proxeon Biosystem)

* A razão média foi calculada pelo módulo BVA do programa DeCyder™ (GE Healthcare), indicando a razão padronizada do volume entre dois grupos ou populações. Os valores são mostrados entre $-\infty$ a -1 para diminuições em expressão e de $+1$ to $+\infty$ para aumentos na expressão. Valores positivos na razão Ins/Isl representam uma expressão maior nas células APM quando comparadas com as ilhotas humanas, enquanto valores negativos representam um aumento na expressão em ilhotas humanas. Apesar do parâmetro da razão média ser apresentado desta forma, as análises estatísticas são baseadas no log da medida real da razão.

O grupo de proteínas não diferencialmente expressas foi selecionado para assegurar a variação de pl e PM. Para a maioria das proteínas para as quais o PM ou pl teórico não corresponderam perfeitamente aos dados experimentais, o desvio poderia ser relacionado a mudanças pós-traducionais, como fosforilação e/ou glicosilação destas proteínas, de acordo com a literatura. As proteínas restantes não apresentaram uma identificação confiável.

4.3.3. Confirmação dos perfis de expressão por WB

Para validar os dados obtidos pela eletroforese em gel 2D e MS, foram confirmados os perfis de expressão e a identidade de três proteínas diferentes através de WB. Foram escolhidas as proteínas caldesmon e MAGE-A2,

pertencentes ao grupo de proteínas diferencialmente expressas, que estão mais expressas nas culturas primárias de ilhotas humanas e nas culturas de insulinooma humano, respectivamente, e GAPDH, do grupo de proteínas não diferencialmente expressas.

MAGE-A2 foi detectada na cultura primária de células-beta, contudo, nas culturas de insulinooma humano APM, foi observado um aumento significativo (cinco vezes) nos níveis desta proteína (ilhotas $0,27 \pm 0,03$; APM $1,3 \pm 0,1$; $p < 0,05$; Figura 37). Além disso, como esta foi a primeira vez que esta proteína foi encontrada em células de insulinooma, a expressão de MAGE-A foi investigada em outras duas linhagens de insulinooma humano também estabelecidas pelo nosso grupo (Labriola; Peters *et al.*, 2009). Interessantemente, foi visto que a linhagem VGA, derivada de uma nesidioblastose humana, não apresentou diferença alguma nos níveis proteicos de MAGE-A quando comparadas com ilhotas normais em cultura ($0,058 \pm 0,004$; $p > 0,05$). Por outro lado, a linhagem CPR, que, como as células APM, também é derivada de um insulinooma humano, apresentou um aumento (23 vezes) nos níveis proteicos de MAGE-A ($6,04 \pm 0,05$; $p < 0,05$; Figura 37).

Em estudos proteômicos prévios, caldesmon foi detectado em dois *spots* pertencentes a uma linha horizontal de *spots*, e também apresentou mais de duas isoformas em géis 2D (Labriola; Ferreira *et al.*, 2007). Uma vez que nesse estudo nem todas as isoformas estavam diferencialmente expressas, o WB com o anticorpo anti-caldesmon foi realizado a partir de géis 2D. Realmente, caldesmon foi detectado como dois *spots* em uma linha horizontal, com o *spot* ácido apresentando uma diminuição de 30 vezes nos níveis proteicos nas culturas de insulinooma humano, quando comparada com as culturas de ilhotas pancreáticas humanas (ilhotas 17 ± 4 , APM $0,6 \pm 0,1$; $p < 0,05$), enquanto o *spot* básico não mostrou diferença alguma nos

níveis proteicos (ilhas 31 ± 11 , APM $2,5\pm 0,5$; $p>0,05$). Além disso, foi observada uma diminuição de 16 vezes na expressão total de caldesmon na linhagem APM (Figura 37).

A presença de GAPDH foi detectada em culturas primárias de ilhotas humanas sem alteração alguma nos níveis proteicos, quando comparados com culturas de insulinoma humano (Figura 37), validando os resultados obtidos pela abordagem do 2D-DIGE.

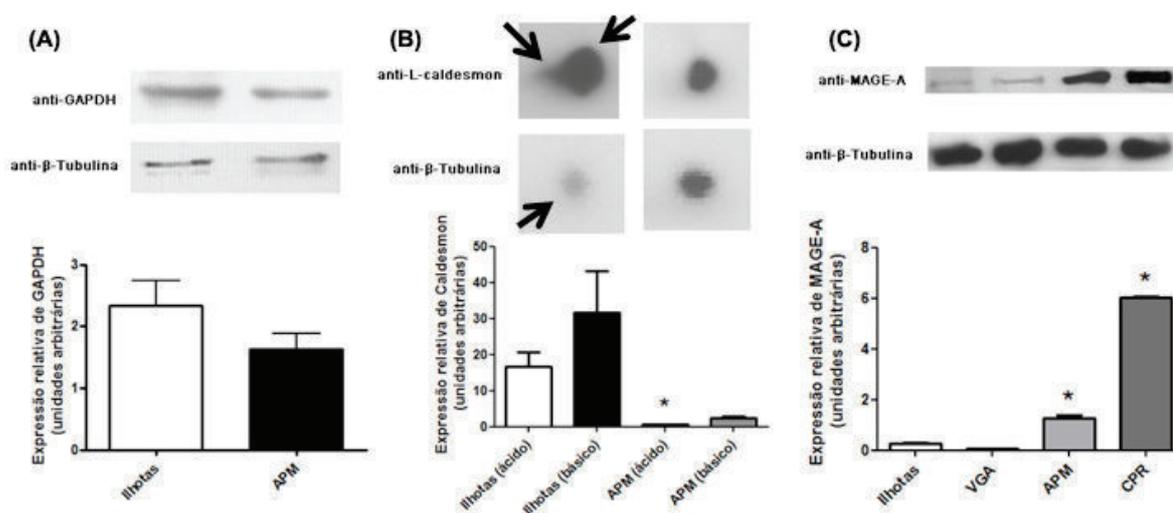


Figura 37: Comparação da expressão dos níveis de expressão proteica de GAPDH, CALD-1 e MAGE-A. Culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas e linhagens derivadas de insulinomas humanos APM, CPR e VGA foram mantidas em meio CMRL contendo 10% SFB. As células foram lisadas e os níveis de GAPDH (A), CALD-1 (B) ou MAGE-A (C) foram analisados por WB após eletroforese em gel de poliacrilamida 1D (A e C) ou 2D (B) com o anticorpo apropriado. O anticorpo foi removido das membranas e as mesmas foram reincubadas com um anticorpo anti-β-tubulina para confirmar que níveis similares de proteínas foram carregados nos géis. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os histogramas correspondentes são resultados de densitometria apresentados como médias±EPM; n=3 experimentos independentes; * $p<0,05$ para diferenças comparadas com a situação controle. As setas indicam os *spots* ácido e básico de CALD-1.

5. Discussão

O principal objetivo no tratamento do diabetes é o aumento da função, proliferação e sobrevivência das células-beta pancreáticas. Uma correlação significativa entre a massa de células-beta e um transplante de ilhotas bem sucedido já foi amplamente estabelecido (Ichii; Inverardi *et al.*, 2005). Uma vez que as células-beta são particularmente suscetíveis a condições de estresse durante o processo de isolamento do parênquima pancreático, uma citoproteção específica para células-beta poderia ajudar no desenvolvimento de novas e eficientes estratégias para aumentar a eficiência das ilhotas no transplante.

Resultados prévios do nosso grupo mostraram um efeito benéfico do tratamento com prolactina em células-beta humanas, tanto em sua função como na proliferação (Labriola; Montor *et al.*, 2007). O presente estudo foi focado no papel deste hormônio lactogênico na sobrevivência de células-beta. É vastamente aceito que a apoptose é o passo final e mais importante na progressão até a morte celular de células-beta (Rabinovitch; Suarez-Pinzon *et al.*, 1994; Mandrup-Poulsen, 1996). Recentemente foi mostrado também, que o tratamento com PRL em ilhotas humanas melhorou o enxerto e a função das células transplantadas por aumentar a revascularização e a sobrevivência celular (Johansson; Olerud *et al.*, 2009; Yamamoto; Mita *et al.*, 2010). No presente trabalho, a morte celular programada foi induzida em células-beta humanas através de duas abordagens distintas: privação de soro (Galli e Fratelli, 1993; Mizuno; Yoshitomi *et al.*, 1998) e tratamento com citocinas (Suk; Kim *et al.*, 2001; Allagnat; Cunha *et al.*, 2011). Foram então avaliadas as características-chave de algumas das principais vias de apoptose em células-beta e não só foram validadas as propriedades de citoproteção específicas da rhPRL para as culturas primárias de células-beta humanas como previamente descrito (Yamamoto; Mita *et al.*, 2010), como também foi demonstrado, pela primeira vez em

células humanas, que este efeito envolve, ao menos em parte, níveis aumentados da proteína anti-apoptótica BCL2, inibição das caspases iniciadoras (caspase-8 e -9), e da caspase efetora (caspase-3). Estes resultados estão de acordo com outros já publicados (Emamaullee; Davis *et al.*, 2008), os quais mostraram que a prevenção da apoptose por um inibidor de caspases melhora significativamente a função e longevidade de ilhotas humanas num modelo de camundongos diabéticos.

A prolactina e o lactogênio placentário, atuando através de um receptor comum (receptor de prolactina), ativam diversas vias de sinalização, incluindo a de JAK2/STAT5, PI3K/AKT, *Extracellular signal-Regulated Kinase 1 e 2* (ERK1 e ERK2), cálcio intracelular e adenilato ciclase/AMPC/p38. Contudo, não se sabe qual dessas vias é responsável pela mediação do efeito protetor da prolactina nas células-beta humanas. Interessantemente, relatos recentes relacionam a regulação de p38 com a sobrevivência de células INS-1, uma linhagem proveniente de insulinoma de rato (Ehse; Casilla *et al.*, 2003), levando à investigação da cinética de ativação de p38 após tratamento com prolactina. Os resultados mostraram uma fosforilação rápida e transitória de p38 após o tratamento com rhPRL, porém mais experimentos devem ser realizados para estabelecer se esta ativação transitória também está relacionada à sobrevivência de células-beta humanas induzida por prolactina.

Um Relato prévio mostrou que os lactogênios exercem seu efeito pró-sobrevivência através da via JAK2/STAT5 tanto em uma linhagem celular de insulinoma de rato quanto em culturas primárias de células-beta de rato. Sabendo-se que a PRL ativa as vias de JAK2/STAT, PI3K e MAPK, foram utilizados os inibidores de cada uma dessas vias (AG490, Wortmannin e PD98059, respectivamente) tendo sido verificado que apenas quando tratadas com AG490 a citoproteção foi completamente perdida em INS-1 tratadas com dexametasona (Fujinaka; Takane *et*

al., 2007). Já em células-beta de camundongo tratadas com dexametasona, o efeito citoprotetor de PRL é perdido quando a transcrição mediada por STAT5 é impedida (Fujinaka; Takane *et al.*, 2007). Do mesmo modo, os resultados deste trabalho, que utilizou AG490, um inibidor específico para JAK2 (Meydan; Grunberger *et al.*, 1996; Wang; Kirken *et al.*, 1999), também mostraram que esta via é responsável pela inibição de caspase-9 e caspase-8 induzida por rhPRL.

Um trabalho prévio de outro grupo (Jensen; Galsgaard *et al.*, 2005) também relatou um aumento na razão da expressão de mRNA de *Bclxl/Bax* após tratamento hormonal tanto de células INS-1, quanto de culturas primárias de células-beta de rato. Além disso, através da utilização de pequenos RNA de interferência (siRNA) específicos para *Bclxl*, foi demonstrado que o aumento da expressão de *Bclxl* induzido por lactogênios é necessária para mediar seu efeito protetor em células INS-1 contra a morte celular induzida por dexametasona (Fujinaka; Takane *et al.*, 2007). Além disso, foi mostrado que a superexpressão de *BCL2* em ilhotas pancreáticas humanas protege células-beta da morte induzida por citocinas (Rabinovitch; Suarez-Pinzon *et al.*, 1999).

No presente estudo, foi mostrado que a rhPRL, ao contrário do que havia sido demonstrado em células de rato, induz um aumento significativo na razão dos níveis tanto de mRNA quando de proteína de *BCL2/BAX* em culturas primárias de ilhotas humanas. É importante ressaltar que, no caso da prevenção da apoptose induzida por citocinas, o aumento desta relação foi causado não somente pelo aumento da expressão de *BCL2*, como também pela diminuição dos níveis proteicos de *BAX* após o tratamento com rhPRL. Uma vez que a permeabilização da membrana mitocondrial e conseqüente liberação de citocromo c são fortemente regulados por membros da família *BCL2* (Adams e Cory, 1998; Mehmeti; Lenzen *et al.*, 2011),

estes resultados podem explicar a maior inibição da atividade de caspase-3 que foi detectada após o tratamento com rhPRL na morte induzida por citocinas. Corroborando esta idéia, relatos prévios mostraram que os membros da família BCL2 regulam o VDAC, sendo possível assim, controlar as mudanças mitocondriais associadas à apoptose, que são centrais na determinação da morte ou sobrevivência celular (Shimizu; Narita *et al.*, 1999). De fato, acredita-se que os membros anti-apoptóticos da família BCL2 interagem com o VDAC, fechando-o e então, inibindo a liberação de citocromo c e a subsequente ativação do apoptosomo, um complexo formado por caspase-9, citocromo c e o APAF1 (Shimizu; Narita *et al.*, 1999). Relacionado a este fenômeno, resultados prévios do nosso laboratório já haviam mostrado um aumento na forma acídica (fechada) dessa proteína após o tratamento com rhPRL em células-beta humanas (Labriola; Ferreira *et al.*, 2007). Estes resultados, juntamente com o aumento dos níveis da proteína BCL2 induzido por rhPRL descrito aqui, podem levar a níveis mais baixos de citocromo c citoplasmáticos e, conseqüentemente, à menor ativação de caspase-9 detectada após o tratamento hormonal em ambas as condições de morte celular.

Citocinas (particularmente IL-1 β) induzem a expressão de *inducible nitric oxide synthase* (*Inos*, também conhecida como *Nos2*) e, conseqüentemente, a produção de NO em células-beta de rato (Eizirik; Flodstrom *et al.*, 1996; Rabinovitch e Suarez-Pinzon, 1998). O NO prejudica a função das células-beta, podendo levar à morte celular por causar dano ao DNA e inibição da aconitase no ciclo do ácido cítrico, resultando em uma fosforilação oxidativa deficiente. Entretanto, o papel do NO na apoptose de células-beta induzida por citocinas é bastante controverso. Uma redução parcial na produção de NO, que leva a morte em células-beta de roedores mas não de humanos, foi encontrada quando células INS-1 foram tratadas

concomitantemente com GH, TNF- α e IFN- γ , sugerindo então, que o efeito protetor causado pelo GH foi parcialmente explicado pela inibição da produção de NO (Sekine; Fukumoto *et al.*, 2001). Contudo, Jensen e colaboradores utilizando as mesmas células, não mostraram correlação alguma entre a produção de NO e a morte de células-beta, sugerindo que GH e prolactina podem proteger as células-beta em um ponto além do nível de produção de NO, indicando, por sua vez, que STAT5 pode proteger contra a morte de células-beta induzida por NO (Jensen; Galsgaard *et al.*, 2005). Os resultados apresentados aqui estão de acordo com os de Jensen e colaboradores, visto que não foi observado efeito algum nos níveis de produção do óxido nítrico em ilhotas humanas sob o tratamento de rhPRL, quando comparadas com a situação controle. É digno de nota que resultados prévios do nosso laboratório mostraram um aumento dos níveis proteicos de aconitase mitocondrial em culturas primárias de ilhotas humanas tratadas com rhPRL, dando a entender que rhPRL pode estar restaurando a fosforilação oxidativa prejudicada pelo NO (Labriola; Ferreira *et al.*, 2007). Da mesma forma, recentemente foi demonstrado que a adição de rhPRL a culturas de ilhotas humanas confere um efeito citoprotetor a células tratadas com S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine, um doador sintético de NO (Yamamoto; Mita *et al.*, 2010). Coletivamente, estes resultados indicam que prolactina pode aumentar a sobrevivência de células-beta por diversas vias de morte celular.

Entretanto, a importância de outros mecanismos indutores de morte celular, como o estresse de retículo endoplasmático, também foi implicado na morte de células-beta (Cardozo; Ortis *et al.*, 2005; Seo; Kim *et al.*, 2008). Apesar de não haver atualmente descrição direta alguma da prolactina agindo como um inibidor de estresse de retículo em células-beta, resultados prévios do nosso laboratório

mostraram que o tratamento com rhPRL aumenta os níveis de três proteínas envolvidas com o funcionamento de chaperonas e/ou dobramento de proteínas, sendo elas: serpina H2, *heat shock protein 27* e *glucose-related protein* (Labriola; Ferreira *et al.*, 2007). Estes resultados, em conjunto, sugerem que a produção destas proteínas induzidas por rhPRL poderia estar associada com a sobrevivência celular, por interferir com o estresse de retículo.

A autofagia de células-beta é um assunto pouco explorado até o momento, de modo que não havia ainda sido mostrado qualquer tipo de correlação entre o tratamento com citocinas e a indução de autofagia nessas células, mesmo com o amplo conhecimento sobre o papel das citocinas no desenvolvimento do diabetes e na morte de células-beta. Para tanto, o presente trabalho, focou-se numa primeira avaliação se o tratamento com citocinas nessas células ativa a via autofágica.

A maioria dos trabalhos que defendem a toxicidade da rapamicina no transplante de ilhotas está relacionada a efeitos colaterais desta droga no paciente, mas não nas células da ilhota (Berney e Secchi, 2009). Os efeitos da rapamicina nas ilhotas envolvem a indução de diminuição na expressão e liberação de VEGF por essas células, particularmente pelas células endoteliais (Cantaluppi; Biancone *et al.*, 2006; Cross; Richards *et al.*, 2007; Laugharne; Cross *et al.*, 2007). É importante notar que o efeito de VEGF como sendo um fator anti-apoptótico para células da ilhota já foi mostrado (Cross; Richards *et al.*, 2007; Laugharne; Cross *et al.*, 2007), sendo que seu efeito angiogênico facilita a revascularização dessas células (Cantaluppi; Biancone *et al.*, 2006).

Alguns estudos apontam ainda, para um possível efeito anti-proliferativo da rapamicina em células-beta, o que seria concebível, uma vez que o efeito imunossupressor da rapamicina está baseado na parada do ciclo celular de células

T na fase G1 para S, via inibição de mTOR. No entanto, enquanto alguns estudos mostram que o tratamento com rapamicina impediu células ductais humanas de se expandir (Bussiere; Lakey *et al.*, 2006), outros não observaram o mesmo efeito no tratamento com rapamicina, na ausência de combinação com outras drogas (Gao; Ustinov *et al.*, 2007). Deve ser reforçado ainda, que enquanto um efeito na proliferação de progenitores de células-beta tenha sido demonstrado, nenhuma evidência direta nas próprias células-beta foi observada. Um trabalho mais recente mostrou que a regeneração de células-beta foi completamente inibida em animais tratados com rapamicina em combinação com tacrolimus (Nir; Melton *et al.*, 2007). De qualquer forma, esses estudos, coletivamente, não apontam a autofagia como sendo a causa da toxicidade causada pela rapamicina.

Um artigo recente demonstrou que o tratamento com rapamicina induziu um aumento na autofagia de células-beta, além de uma diminuição no metabolismo e na secreção de insulina. Esse mesmo trabalho mostrou que camundongos tratados com rapamicina intraperitonealmente apresentaram, além do efeito já observado *in vitro*, algumas poucas células positivas no ensaio de *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*, comumente chamado de TUNEL, que detecta células apoptóticas, apenas a partir de duas semanas de tratamento, e um maior nível de glicemia após um teste de tolerância a glicose a partir de 15 dias (Tanemura; Ohmura *et al.*, 2012).

Interessantemente, em nossos resultados, não observamos um aumento na apoptose causada pelo tratamento com rapamicina, ainda que tenha sido certificado que a rapamicina induz autofagia, como pode ser visto pelo aumento na formação de autofagossomos após o tratamento com essa droga. Não foi observado um aumento na apoptose induzida pela rapamicina nem quando esse composto foi

usado em combinação com citocinas e taspigargina, tanto em células INS-1E quanto em ilhotas de rato dispersas. Esse fato pode ser devido ao tempo curto de exposição, de 48 horas, dessas células à rapamicina usado nesse estudo, indicando que esse efeito deletério sobre a viabilidade das células-beta ocorre somente com o uso crônico dessa droga.

Analizando ainda a indução de autofagia, pudemos observar que o tratamento com citocinas induziu um aumento da formação de autofagossomos em células-beta. Sabe-se que as citocinas induzem a via apoptótica, principalmente a intrínseca, nessas células, alterando os níveis de membros pró- e anti-apoptóticos da família BCL2, como já demonstrado e discutido nesse trabalho. Trabalhos realizados com outras células mostram que membros da família BCL2 regulam a autofagia (Patingre; Tassa *et al.*, 2005; Maiuri; Le Toumelin *et al.*, 2007; Martin; Mitchell *et al.*, 2009). Assim, por exemplo, BCL2 e BCLXL são capazes de se ligar a Beclin-1 e inibir sua função (Patingre; Tassa *et al.*, 2005; Maiuri; Le Toumelin *et al.*, 2007), levando a um crescente conjunto de evidências de uma conexão entre apoptose e autofagia (Boya; Gonzalez-Polo *et al.*, 2005; Patingre; Tassa *et al.*, 2005; Maiuri; Le Toumelin *et al.*, 2007; Luo e Rubinsztein, 2010). Entretanto, a importância dessa relação, assim como os mecanismos pelos quais os membros da família BCL2 controlam o balanço entre esses dois processos, ainda não foi determinada. Com isso, é possível imaginar que o efeito das citocinas na indução de autofagia em células-beta possa estar relacionado com a diminuição da expressão dessas proteínas após o tratamento com as mesmas.

O tratamento com citocinas causou ainda uma diminuição nos níveis de mTOR fosforilado e de 4E-BP1 fosforilado. Interessantemente, mTOR se encontra a montante da formação do complexo que envolve Beclin-1, onde os membros da

família BCL2 estariam agindo. Com isso em mente, o tratamento com citocinas deve estar atuando por outra via na inibição de mTOR.

Diversos estudos mostraram que inflamação pode levar a um estresse de retículo endoplasmático e que isso está relacionado à patogênese de diversas doenças inflamatórias (Endo; Oyadomari *et al.*, 2005; Nagaraju; Casciola-Rosen *et al.*, 2005; Endo; Mori *et al.*, 2006; Zhang; Shen *et al.*, 2006; Shkoda; Ruiz *et al.*, 2007; Li; Wang *et al.*, 2011; Miyazaki; Kaikita *et al.*, 2011). Inclusive, já foi demonstrado que um grupo de genes cuja expressão é modificada por citocinas está relacionado com a resposta a estresse de retículo (Cardozo; Heimberg *et al.*, 2001; Cardozo; Kruhoffer *et al.*, 2001; Kutlu; Cardozo *et al.*, 2003; Ortis; Naamane *et al.*, 2010). Há ainda, um número crescente de estudos mostrando o envolvimento do estresse de retículo na morte de células-beta induzida por citocinas (Oyadomari; Takeda *et al.*, 2001; Wang; Zhao *et al.*, 2007; Shao; Lawrence *et al.*, 2010; Allagnat; Cunha *et al.*, 2011), mesmo que o papel desse estresse no desenvolvimento do DM1 permaneça obscuro. Uma vez que alterações no ambiente do retículo endoplasmático podem levar ao acúmulo de proteínas mal enoveladas, seria compreensível que o estresse de retículo levasse à ativação da autofagia, como um mecanismo de preservação das células via reciclagem de seus componentes.

Já foi demonstrado em fibroblastos embrionários de camundongo, que o tratamento com três indutores de estresse de retículo (tunicamicina, DTT ou MG132) levou à indução da autofagia através da regulação de mTOR pela inibição da via de AKT (Qin; Wang *et al.*, 2010). PERK, IRE1 e aumento da concentração de Ca^{2+} já foram implicados como iniciadores distintos da autofagia induzida por estresse de retículo, porém o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não foi elucidado (Fujita; Kouroku *et al.*, 2007; Hoyer-Hansen; Bastholm *et al.*, 2007). No presente trabalho

podemos verificar, que o tratamento com tunicamicina e taspigargina leva à diminuição nos níveis de mTOR fosforilado, mostrando que o estresse de retículo leva à indução de autofagia em células-beta. É possível supor que o mecanismo pelo qual as citocinas causam a diminuição observada nos níveis de fosforilação de mTOR seja, ao menos em parte, através da indução de estresse de retículo causado por essas proteínas.

A proteína MCL1 é degradada em resposta a sinais de morte celular e induzida por estímulos de sobrevivência (Yang-Yen, 2006), sendo que um papel importante dessa proteína é a manutenção da inatividade de BAK e BAX (Yang-Yen, 2006; Germain; Milburn *et al.*, 2008). Foi demonstrado também, que a deleção de MCL1 tanto em linhagens celulares, quanto em neurônios, leva à indução de autofagia, com a apoptose sendo ativada apenas como uma consequência tardia da autofagia persistente, através da redução nos níveis de Beclin-1 e/ou por ativação de BAX (Germain; Nguyen *et al.*, 2011). MCL1 é diminuído após a indução de autofagia por privação de nutrientes, o que não levou a um aumento na apoptose, da mesma forma que é diminuído após a indução de apenas apoptose nessas células (Mills; Hippo *et al.*, 2008; Pradelli; Beneteau *et al.*, 2010; Germain; Nguyen *et al.*, 2011), o que levou Germain e colaboradores a sugerir que MCL1 age como um sensor geral de estresse, regulando a sobrevivência através da integração de diversos sinais celulares. Interessantemente, os níveis de outras proteínas da família BCL2 não foram afetados após a privação de nutrientes (Germain; Nguyen *et al.*, 2011). É importante notar que MCL1 se localiza na mitocôndria, onde interage com Beclin-1, enquanto BCL2 interage funcionalmente com Beclin-1 no retículo endoplasmático. Visto como já foi sugerido, que tanto o retículo endoplasmático (Axe; Walker *et al.*, 2008) quanto a mitocôndria (Hailey; Rambold *et al.*, 2010) fornecem lipídeos para a

formação de autofagossomos, MCL1 poderia ser necessário para regular a via mitocondrial da formação de autofagossomos. Recentemente foi demonstrado que MCL1 é expresso em células INS-1E e ilhotas pancreáticas, tendo um papel crucial na inibição de apoptose nessas células (Allagnat; Cunha *et al.*, 2011).

No presente estudo pudemos observar que os níveis de MCL1 estão diminuídos em células-beta após o tratamento com rapamicina, indicando que nessas células MCL1 também é diminuído após a indução de autofagia, assim como após a indução de apoptose.

A rhPRL foi capaz de inibir a morte das células INS-1E após o tratamento com citocinas, como esperado pelos resultados obtidos nesse trabalho em células humanas e outros relatos prévios (Jensen; Galsgaard *et al.*, 2005; Fujinaka; Takane *et al.*, 2007). Interessantemente, a rhPRL também foi capaz de restaurar os níveis de mTOR fosforilado em células-beta após o tratamento com diferentes combinações de citocinas e indutores de estresse de retículo distintos. Esse efeito também não poderia ocorrer devido a regulação causada pela rhPRL dos membros da família BCL2. Sabe-se que a PRL ativa, além da via de JAK2/STAT, responsável pela sua regulação dos membros da família BCL2, as vias PI3K e MAPK. Sabe-se ainda, que mTOR é ativado por PI3K e MAPK (Figura 38), sugerindo que o mecanismo de restauração da ativação de mTOR por rhPRL nas células-beta esteja ocorrendo através dessas vias. Seria interessante a realização de experimentos comprobatórios, utilizando-se dos inibidores Wortmannin e PD98059 (de PI3K e MAPK, respectivamente) para confirmar essa hipótese.

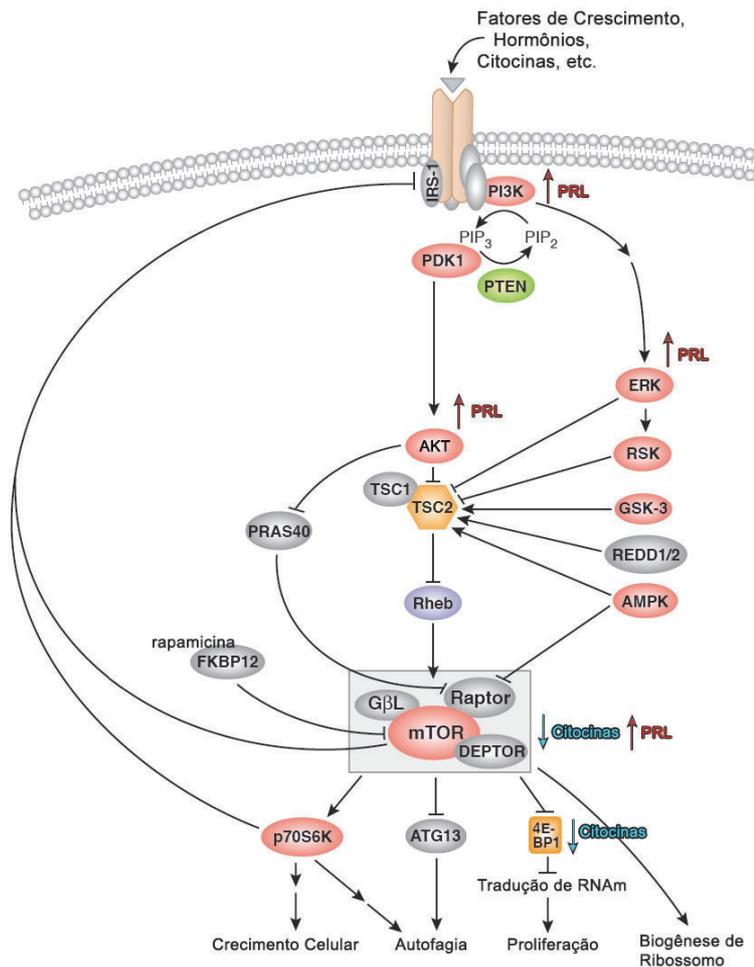


Figura 38: Via de sinalização de mTOR. Pontos de regulação conhecidos ou descobertos neste estudo para prolactina e citocinas estão representados respectivamente em vermelho e azul. Adaptado de Cell Signaling Technology.

O que permanece intrigante no que diz respeito à autofagia em células-beta, e que ainda precisa ser elucidado, é o papel desse processo após o tratamento com citocinas nessas células. Como previamente discutido, esse processo poderia estar agindo em paralelo com a apoptose, talvez com função redundante em levar a morte celular, ou contrariamente, poderia estar tentando resgatar as células de seu destino fatal.

Como discutido neste trabalho, foi mostrado anteriormente que o tratamento com rapamicina, e conseqüente indução de autofagia, poderia estar causando um efeito deletério em células-beta e uma perda de sua viabilidade. Contudo, um modelo de

células-beta deficiente em autofagia foi desenvolvido, onde especificamente essas células apresentam *knockout* para o gene *Atg7* ($Atg7^{\Delta\text{célula-beta}}$), essencial para a formação de autofagossomos (Komatsu; Waguri *et al.*, 2005). Camundongos com esse *knockout* mostraram hiperglicemia significativa, intolerância a glicose e hipoinsulinemia (Ebato; Uchida *et al.*, 2008; Jung; Chung *et al.*, 2008). Análises morfológicas mostraram diminuição na massa de células-beta, juntamente com diminuição na proliferação dessas células, levando à diminuição no conteúdo de insulina.

Experimentos *in vitro* com essas células mostraram que a liberação de insulina estimulada por glicose estava bastante atenuada quando comparada a células controle, além de ter uma resposta comprometida no aumento da concentração de Ca^{2+} induzido por glicose (Jung; Chung *et al.*, 2008). Análises de microscopia eletrônica de mudanças ultraestruturais mostraram que algumas células-beta dos camundongos $Atg7^{\Delta\text{célula-beta}}$ continham um número reduzido de grânulos de insulina. Além disso, uma maior magnificação mostrou um inchaço das mitocôndrias e distensão das cisternas do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi, mesmo em células-beta de camundongos $Atg7^{\Delta\text{célula-beta}}$ que eram aparentemente normais quando analisadas em menor magnificação (Jung; Chung *et al.*, 2008). Essas descobertas morfológicas implicam que existe uma disfunção mitocondrial e estresse de retículo, que pode levar ao mau funcionamento e à morte de células-beta quando a autofagia é inibida.

Para concluir se a indução de autofagia induzida pelo tratamento com citocinas nas células-beta de fato tem um papel de resgatar essas células da morte celular, seria interessante conduzir experimentos em células deficientes na via autofágica,

tratando-as com citocinas e analisando se a porcentagem de células apoptóticas é aumentada em relação a células controle.

O que se pode supor, no caso das citocinas, é que além de dispararem um sinal que leva à apoptose nas células-beta, o tratamento com citocinas também causaria, num primeiro momento, o aumento da autofagia, que poderia estar tentando resgatar as células do seu destino fatal, agindo como um mecanismo de *feedback* negativo. Contudo, esse mecanismo não é capaz de conter o sinal apoptótico desencadeado pelas citocinas, e as células-beta acabam entrando em apoptose. Observou-se também, que a prolactina causa uma diminuição nas taxas de apoptose e autofagia induzidas por citocinas nessas células. Poderia ser levantada a hipótese de que a prolactina estaria inibindo a apoptose em um ponto anterior ao desencadeamento da autofagia. Em outras palavras, o bloqueio do sinal apoptótico induzido pela prolactina, evitaria a ativação do mecanismo de *feedback* negativo, diminuindo as taxas de autofagia (Figura 39).

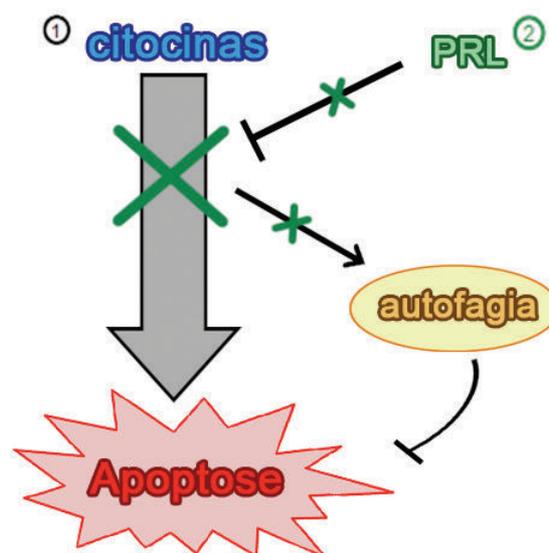


Figura 39: Hipótese do mecanismo pelo qual a PRL inibe apoptose e autofagia.

Contudo, como já mencionado, a inexistência de uma linhagem humana de células-beta para estudos *in vitro* dos mecanismos envolvidos na proliferação,

diferenciação e função secretória de células-beta é o principal obstáculo atualmente para a pesquisa na área.

Para tanto, foram estudados os mecanismos moleculares envolvidos na proliferação e na função secretória de células-beta, comparando os perfis de expressão proteica de culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas enriquecidas de células-beta e insulinomas humanos, através de 2D-DIGE e MS, com o intuito de caracterizar mais profundamente as diferenças proteômicas existentes entre culturas de ilhotas humanas normais e as linhagens de insulinoma previamente estabelecidas pelo nosso grupo (Labriola; Peters *et al.*, 2009). É importante enfatizar que foi possível identificar novas proteínas que nunca haviam sido descritas em insulinomas humanos nem em ilhotas humanas e que todas estão relacionadas com o fenótipo observado.

É notável que não apenas a maioria das proteínas tenha aparecido em todos os géis, mostrando que estes experimentos são bastante reprodutíveis, mas também que apenas 0,6% das proteínas encontradas (11 em 1.838) são diferencialmente expressas com significância estatística, o que sugere fortemente que estas células de insulinomas poderiam levar a modelos próximos de células-beta humanas. Além disso, duas das proteínas validadas apresentam um perfil de expressão oposta, portanto, poderiam ser investigadas mais profundamente como alvos moleculares para uma melhor caracterização da biologia celular destes tumores pouco estudados.

Caldesmon (CALD1) está mais expresso nas culturas primárias de ilhotas quando comparadas com as células de insulinoma. Trata-se de uma proteína que se liga a calmodulina e actina (Sobue e Sellers, 1991), cujos papéis na regulação da

contração celular, na sinalização dependente de adesão e na organização do citoesqueleto são bem documentados (Hai e Gu, 2006; Greenberg; Wang *et al.*, 2008), influenciando, conseqüentemente, o movimento de grânulos, a secreção de hormônios e a reorganização de microfilamentos.

Diversos estudos mostraram que os diferentes papéis de Ca^{2+} são mediados pela proteína Ca^{2+} -dependente calmodulina (Cheung, 1980; Lin, 1982; Moore e Dedman, 1982), que já foi detectada previamente em ilhotas (Valverde; Vandermeers *et al.*, 1979). Além disso, o tratamento de células-beta pancreáticas com um inibidor farmacológico da calmodulina inibe a liberação de insulina estimulada por glicose (Sugden; Christie *et al.*, 1979; Henquin, 1981). Outro estudo indicou que três principais proteínas ligantes de calmodulina estão, de fato, localizadas na superfície de grânulos secretores das ilhotas e que provavelmente constituem a maioria dos locais de ligação de grânulos de secreção. (Watkins e White, 1985).

Inclusive, durante a validação dos resultados obtidos neste trabalho por WB, foram encontrados dois *spots* para caldesmon, que apresentavam o mesmo PM mas pl diferentes. Este tipo de mudança no pl encontrado em géis 2D pode ser explicado por diferentes estados de fosforilação da proteína analisada. É sabido que um aumento tanto na concentração celular de cálcio, como na fosforilação de caldesmon, levam essa proteína a se dissociar da actina, resultando no enfraquecimento da maioria das propriedades de caldesmon (Huber, 1997). Este estado de fosforilação diferencial, assim como uma diminuição na expressão total de caldesmon nas células de insulinoma, quando comparadas às culturas primárias de ilhotas humanas, pode estar relacionado à falta de controle na secreção de insulina apresentada por estas células.

A fosforilação de caldesmon também já foi mostrada como sendo um passo importante no remodelamento do citoesqueleto de actina durante a mitose (Yamashiro; Yamakita *et al.*, 1990; Yamashiro; Yamakita *et al.*, 1991). Durante esta fase do ciclo celular, ambas CDK1 e MAPK/ERK modificam CALD1 na região carboxi-terminal da região ligante de actina. A fosforilação de CALD1 por CDK1 durante a mitose está implicada na desmontagem do microfilamento no início da prófase, permitindo a segregação dos cromossomos e a citocinese (Cuomo; Knebel *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que a fosforilação de caldesmon está relacionada com a proliferação. Nos resultados obtidos no presente trabalho, foi observada uma diminuição no estado de fosforilação de caldesmon na linhagem APM, quando comparada com as culturas de ilhotas pancreáticas humanas; contudo, resultados prévios do nosso grupo já mostraram que estas células de insulinooma apresentam um tempo de dobramento de aproximadamente 40 h, proliferando significativamente mais que culturas primárias de ilhotas humanas em cultura (Labriola; Peters *et al.*, 2009). Uma hipótese para este fenômeno seria que a fosforilação neste contexto estaria ocorrendo em um sítio diferente daquele correlacionado com a proliferação.

Além disso, foi observada uma diminuição significativa na expressão total de caldesmon na linhagem APM. Já foi mostrado que caldesmon regula negativamente a formação de podossomos e rosetas (Eves; Webb *et al.*, 2006; Gu; Kordowska *et al.*, 2007; Morita; Mayanagi *et al.*, 2007). Interessantemente, já foi demonstrado que sua expressão como está diminuída em diversas células transformadas e tumorigênicas (Owada; Hakura *et al.*, 1984; Novy; Lin *et al.*, 1991; Tanaka; Watanabe *et al.*, 1993; Ross; Scherf *et al.*, 2000) e como sendo inversamente correlacionada com a frequência metastática em melanomas malignos (Koganehira;

Takeoka *et al.*, 2003). Além disso, já foi mostrado que caldesmon está implicado na supressão da invasão de células malignas (Yoshio; Morita *et al.*, 2007). Mais recentemente, foi descrito um mecanismo pelo qual p53 exerce funções anti-invasivas potentes suprimindo a formação de podossomos e rosetas e a invasão celular através de um aumento na expressão de caldesmon (Mukhopadhyay; Eves *et al.*, 2009).

A *Nuclear Receptor Subfamily 6 Group A Member 1* (NR6A1) foi a segunda proteína identificada que está mais expressa nas culturas primárias de ilhotas. Essa proteína se liga à sequência consenso TCAAGGTCA e repetições diretas com 0 nucleotídeos de espaçamento. Até o momento, nenhum ligante de NR6A1 é conhecido, portanto, esta proteína ainda é classificada como um receptor órfão (Chen; Cooney *et al.*, 1994). NR6A1 já foi descrita como sendo expressa, principalmente, em células germinativas, e que pode estar relacionado com o desenvolvimento e a maturação dessas células (Chen; Cooney *et al.*, 1994; Katz; Niederberger *et al.*, 1997; Agoulnik; Cho *et al.*, 1998). No entanto, descobertas mais recentes mostram que NR6A1 também é expressa em ilhotas, assim como em outros tecidos, como cérebro, pituitária e paratireóide, embora não tanto quanto em testículos, ovário, oviduto e pulmão (Lan; Xu *et al.*, 2009), porém pouco é conhecido sobre sua possível função nestes tecidos.

A proteína *Melanoma Associated Antigen2* (MAGE2), também conhecida como *Melanoma Associated Antigen-A2* (MAGE-A2), foi descrita aqui, pela primeira vez, em insulinomas humanos, apresentando um nível de proteína aumentado em ambas as linhagens de insulinoma humano utilizadas, APM e CPR. A família MAGE-A está localizada no cromossomo X, região q28, sendo constituída de 12 membros (MAGE-

A1-12) (De Plaen; Arden *et al.*, 1994), que codificam para antígenos associados a tumor, os quais são reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos (Van Der Bruggen; Traversari *et al.*, 1991; De Plaen; Arden *et al.*, 1994). Sua expressão está restrita a células tumorais de origens distintas, incluindo melanoma, pulmão, glândula mamária, cabeça e pescoço, bexiga e carcinoma de estômago (De Smet; Courtois *et al.*, 1995; Eura; Ogi *et al.*, 1995; Inoue; Li *et al.*, 1995; Takahashi; Shichijo *et al.*, 1995; Miyashiro; Kuo *et al.*, 2001; Otte; Zafrakas *et al.*, 2001; Kufer; Zippelius *et al.*, 2002; Liang; Gonzales *et al.*, 2002; Park; Kwon *et al.*, 2002; Kienstra; Neel *et al.*, 2003; De Smet; Loriot *et al.*, 2004), o que torna membros da família MAGE-A alvos atraentes para a detecção de câncer e imunoterapia (Van Der Bruggen; Traversari *et al.*, 1991; De Plaen; Arden *et al.*, 1994). Eles são raramente encontrados em tecidos adultos normais, sendo expressos apenas em células germinativas de testículo e placenta (Chomez; De Backer *et al.*, 2001). Alguns membros desta família estão superexpressos em linhagens celulares de câncer de ovário que são resistentes a paclitaxel e doxorrubicina, um desagregador de fuso mitótico (Duan; Duan *et al.*, 2003). Interessantemente, nosso grupo já mostrou que a linhagem celular APM é resistente ao tratamento com doxorrubicina (Labriola; Peters *et al.*, 2009). Já foi descrito que o membro MAGE-A2 especificamente é capaz de interagir com sítios de transcrição de p53, conferindo resistência a agentes quimioterápicos (Monte; Simonatto *et al.*, 2006).

A proteína 14-3-3 (isoforma ζ) também foi observada como sendo mais expressa na linhagem APM. As proteínas 14-3-3 constituem uma família de moléculas que se ligam a fosfoserina e fosfotreonina. Essa família possui sete isoformas definidas: β , ε , γ , η , σ , τ , e ζ . Inicialmente, essas proteínas foram descritas como cofatores de

enzimas que afetam a atividade de um amplo raio de proteínas envolvidas em vias-chave de transdução de sinal, incluindo aquelas da proteína quinase C (PKC), função pela qual a 14-3-3 recebeu um dos muitos nomes pelos quais já foi conhecida, *PKC inhibitor-1* (Aitken, 2006). Portanto, uma desregulação na 14-3-3 já foi associada a consequências patológicas. Além da sua participação em diversas doenças neurodegenerativas e inflamatórias, as isoformas da proteína 14-3-3 já foram relacionadas com tumorigênese tanto como possíveis supressores de tumor quanto como oncogenes, tendo sido associadas ainda, com a baixa sobrevivência de pacientes com câncer (Toyo-Oka; Shionoya *et al.*, 2003; Wilker e Yaffe, 2004; Porter; Khuri *et al.*, 2006; Kilani; Maksymowych *et al.*, 2007). Em particular a 14-3-3 ζ está superexpressa em inúmeras linhagens celulares de câncer de pulmão e em tecidos de pacientes com câncer de pulmão (Qi; Liu *et al.*, 2005; Fan; Li *et al.*, 2007; Li; Zhao *et al.*, 2008; Zang; Li *et al.*, 2010), além de ter sido relacionada com sua resistência à anoikis, uma forma de morte celular programada que é induzida por células dependentes de ancoragem separando-se da matriz extracelular circundante, e promovendo, conseqüentemente, um crescimento livre de ancoragem (Li; Zhao *et al.*, 2008). Intrigantemente, como já foi descrito pelo nosso grupo, a linhagem celular APM é capaz de formar esferóides e proliferar em condição independente de ancoragem (Labriola; Peters *et al.*, 2009).

Além disso, há diversos estudos demonstrando que as proteínas 14-3-3 (Masters e Fu, 2001; Subramanian; Masters *et al.*, 2001), e especificamente a isoforma ζ (Subramanian; Masters *et al.*, 2001; Yang; Masters *et al.*, 2001) possuem papéis importantes na prevenção da apoptose por sua ligação à proteína pró-apoptótica BAD, integrando vias de sobrevivência e apoptose (Porter; Khuri *et al.*, 2006). A

liberação de BAD permite que a proteína fosfatase 2A catalize a desfosforilação da fosfoerina 112 de BAD (Chiang; Kanies *et al.*, 2003), a qual é então, translocada do citoplasma para a mitocôndria, onde pode deslocar BAX de BCLXL (Zha; Harada *et al.*, 1996), levando à apoptose. Interessantemente, a atividade promotora de crescimento da proteína BAD requer que essa proteína esteja ligada à proteína 14-3-3 (Maslyar; Aoki *et al.*, 2001).

Dermcidin também foi identificada como sendo mais expressa na linhagem APM. Esta proteína foi primeiramente identificada em glândulas sudoríparas (Schitteck; Hipfel *et al.*, 2001), contribuindo para a primeira linha de defesa da pele por constituir uma barreira constante que recobre o epitélio (Schitteck; Paulmann *et al.*, 2008; Wiesner e Vilcinskis, 2010). Contudo, posteriormente, essa proteína foi encontrada também em células neuronais e leucócitos de sangue periférico (Schitteck, 2012). Mais recentemente, diversos estudos mostraram que a dermcidin também é expressa em algumas células cancerosas ou em linhagens celulares de câncer, incluindo adenocarcinomas, carcinomas invasivos de mama, carcinoma hepatocelular, tumores gastroesofágicos, adenocarcinoma pancreático e numa linhagem celular de leucemia mielóide. Resultados prévios mostraram que a expressão de dermcidin em células de câncer de mama promove crescimento celular e sobrevivência e reduz a dependência de soro (Porter; Weremowicz *et al.*, 2003). Além disso, diversos outros estudos mostraram que a expressão de dermcidin resulta em um aumento da proliferação, sobrevivência e migração de células tumorais (Lee Motoyama; Kim-Motoyama *et al.*, 2007; Dash-Wagh; Neumann *et al.*, 2011; Shen; Qiu *et al.*, 2011).

Interessante é um trabalho recente descrevendo que dermcidin inibiu a captação de glicose em ilhotas de camundongo (Ghosh; Karmohapatra *et al.*, 2011). Além disso, estes autores demonstraram que a adição de aspirina, um inibidor conhecido da ação da dermcidin (Mukamal; Mittleman *et al.*, 1999), neutralizou este efeito na captação de glicose através da estimulação da síntese de NO. Estes resultados foram obtidos não somente *in vitro*, mas o grupo também mostrou que a administração oral de aspirina foi capaz de diminuir os níveis plasmáticos de dermcidin e restaurar os níveis de insulina. Intrigantemente, esta proteína nunca havia sido descrita em insulinomas, estando de acordo com o fato muito bem caracterizado da liberação excessiva e/ou descontrolada de insulina por células de insulinoma e nesidioblastoses (Kaczirek; Soleiman *et al.*, 2003; Wang; Xu *et al.*, 2004). Também de acordo com este fato, a linhagem APM não apresenta secreção de insulina induzida por glicose, como nosso grupo mostrou previamente (Labriola; Peters *et al.*, 2009), o que pode ser, ao menos em parte, devido aos níveis aumentados de dermcidin nestas células.

A proteína *OTU domain-containing protein 7A* (OTUD7A), uma deubiquitinase putativa (Kayagaki; Phung *et al.*, 2007), foi encontrada como sendo mais expressa nas células de insulinoma. Contudo, há pouca informação disponível sobre esta proteína atualmente.

Uma das proteínas identificadas como não sendo diferencialmente expressas foi a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), enzima da via glicolítica que catalisa a reação de oxidação do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato através da redução de nicotinamida adenosina dinucleotídeo (NAD). Vale notar que a GAPDH não é diferencialmente expressa, ela foi escolhida para identificação como

controle interno por ser abundante. Uma vez que células-beta são extremamente sensíveis aos níveis de glicose, e o aumento do balanço ATP/ADP intracelular ser o gatilho da liberação de insulina, ter como altamente expressas as proteínas pertencentes à via glicolítica era esperado.

Além da GAPDH, as outras proteínas identificadas como não sendo diferencialmente expressas foram a Proteína quinase N1 (PKN1), uma isoforma de uma família de serina/treonina quinases que exhibe semelhanças à PKC, implicada em uma variedade de funções, incluindo a organização de citoesqueleto (Mukai, 2003); e a N-acilneuraminato citidiltransferase (NEUA), também conhecida como ácido N-acetilneuramínico citidina monofosfato sintetase (CMAS), que catalisa a reação de ativação do ácido siálico, a partir de citidina trifosfato e ácido N-acetilneuramínico, convertendo-o em sua forma ativa conjugada a citidina monofosfato (CMP-N-acetilneuraminato) com a formação de difosfato, fornecendo o substrato necessário para a adição de ácido siálico em glicoproteínas e glicolipídeos (Lawrence; Huddleston *et al.*, 2001).

6. Conclusões

No presente estudo, demonstrou-se que lactogênios protegem as células-beta humanas de dois indutores distintos de morte de células-beta, corroborando dados já publicados. Esses resultados complementam e estendem o conhecimento prévio dos mecanismos moleculares envolvidos na inibição de apoptose induzida por prolactina, sendo o primeiro a demonstrar diretamente, que lactogênios medeiam seu efeito citoprotetor em células-beta humanas através do aumento da razão *BCL2/BAX* e da inibição de caspases-chave das vias extrínseca e intrínseca da apoptose, como caspase-8, -9 e -3.

Foi possível demonstrar ainda, pela primeira vez, que o tratamento com diferentes combinações de citocinas induz autofagia em células-beta, corroborando com dados já publicados em outros modelos, sugerindo que indutores de estresse de retículo também induzem autofagia nessas células. Esses resultados ampliam o conhecimento sobre o importante papel das citocinas em células-beta, podendo ajudar a compreender os efeitos dessas no desenvolvimento do DM1. Os resultados apontam também, para um efeito restaurador da prolactina nos níveis de fosforilação de mTOR após o tratamento tanto com diferentes combinações de citocinas, quanto com distintos indutores de estresse de retículo, estendendo o conhecimento sobre o mecanismo de ação de lactogênios em células-beta, onde estaria inibindo a autofagia.

Além disso, os resultados obtidos através de análise proteômica mostram um valor potencial das proteínas descobertas neste estudo, uma vez que muitas daquelas identificadas na linhagem APM nunca haviam sido descritas previamente em ilhotas humanas ou em insulinomas humanos, sendo que todas estão relacionadas com o fenótipo observado nessas células. Além de permitirem caracterizar mais profundamente essas linhagens celulares para um possível

desenvolvimento de modelos de células-beta humanas, estes resultados também contribuem para o até então escasso conhecimento da biologia molecular de insulinomas.

Coletivamente, os dados obtidos neste estudo estendem o conhecimento molecular envolvido na citoproteção e transformação maligna de células-beta pancreáticas, contribuindo para futuras aplicações na compreensão e no tratamento do DM1.

7. Perspectivas

Os dados obtidos neste trabalho permitem propor as seguintes perspectivas interessantes para a continuação deste estudo:

- Analisar se a prolactina induz citoproteção em células-beta tratadas com indutores de estresse de retículo.
- Avaliar se a citoproteção causada por prolactina em células-beta tratadas com citocinas está associada à intervenção desta no estresse de retículo.
- Avaliar se o tratamento com citocinas em células-beta deficientes na via autofágica interfere na porcentagem de células apoptóticas quando comparada com células controle.
- Analisar se outros membros da família BCL2 tem sua expressão alterada em células-beta tratadas com indutores de autofagia, como ocorre com MCL1.
- Comprovar a via através da qual a rhPRL estaria causando a restauração da ativação de mTOR nas células-beta através da utilização dos inibidores Wortmannin e PD98059.
- Avaliar a expressão de MAGEA2 em amostras de insulinomas provenientes de pacientes, determinando sua capacidade como marcador para a detecção de insulinomas.
- Analisar se a inibição de MAGE-A2 na linhagem APM a tornaria sensível ao tratamento com doxorrubicina e outros agentes terapêuticos.
- Avaliar se a inibição de 14-3-3 impediria a proliferação da linhagem APM em condições independentes de ancoragem.

- Analisar se a inibição de Dermcidin nas linhagens de insulinomas humanos leva à melhoria na secreção de insulina induzida por glicose nessas células.

8. Referências bibliográficas

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1322-1326, 1998.

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

Adverse events and their association with treatment regimens in the diabetes control and complications trial. **Diabetes Care**, v. 18, n. 11, p. 1415-1427, 1995.

AGOULNIK, I. Y.; CHO, Y.; NIEDERBERGER, C.; KIEBACK, D. G.; COONEY, A. J. Cloning, expression analysis and chromosomal localization of the human nuclear receptor gene GCNF. **FEBS Lett**, v. 424, n. 1-2, p. 73-78, 1998.

AITKEN, A. 14-3-3 proteins: a historic overview. **Semin Cancer Biol**, v. 16, n. 3, p. 162-172, 2006.

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

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

AUGUSTINE, J. J.; BODZIAK, K. A.; HRICIK, D. E. Use of sirolimus in solid organ transplantation. **Drugs**, v. 67, n. 3, p. 369-391, 2007.

AXE, E. L.; WALKER, S. A.; MANIFAVA, M.; CHANDRA, P.; RODERICK, H. L.; HABERMANN, A.; GRIFFITHS, G.; KTISTAKIS, N. T. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. **J Cell Biol**, v. 182, n. 4, p. 685-701, 2008.

BAINES, C. P.; KAISER, R. A.; PURCELL, N. H.; BLAIR, N. S.; OSINSKA, H.; HAMBLETON, M. A.; BRUNSKILL, E. W.; SAYEN, M. R.; GOTTLIEB, R. A.; DORN, G. W.; ROBBINS, J.; MOKKENTIN, J. D. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. **Nature**, v. 434, n. 7033, p. 658-662, 2005.

BASSO, E.; FANTE, L.; FOWLKES, J.; PETRONILLI, V.; FORTE, M. A.; BERNARDI, P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. **J Biol Chem**, v. 280, n. 19, p. 18558-18561, 2005.

BERNEY, T.; SECCHI, A. Rapamycin in islet transplantation: friend or foe? **Transpl Int**, v. 22, n. 2, p. 153-161, 2009.

BODEN, G. Glucagonomas and insulinomas. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 18, n. 4, p. 831-845, 1989.

- BORDIN, S.; AMARAL, M.; ANHE, G.; DELGHINGARO-AUGUSTO, V.; CUNHA, D.; NICOLETTI-CARVALHO, J.; BOSCHERO, A. Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 220, n. 1-2, p. 41-50, 2004.
- BOYA, P.; GONZALEZ-POLO, R. A.; CASARES, N.; PERFETTINI, J. L.; DESSEN, P.; LAROCLETTE, N.; METIVIER, D.; MELEY, D.; SOUQUERE, S.; YOSHIMORI, T.; PIERRON, G.; CODOGNO, P.; KROEMER, G. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 3, p. 1025-1040, 2005.
- BRELJE, T.; SVENSSON, A.; STOUT, L.; BHAGROO, N.; SORENSON, R. An immunohistochemical approach to monitor the prolactin-induced activation of the JAK2/STAT5 pathway in pancreatic islets of Langerhans. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n. 3, p. 365-383, 2002.
- BRELJE, T.; STOUT, L.; BHAGROO, N.; SORENSON, R. Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of langerhans. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4162-4175, 2004.
- BRELJE, T. C.; ALLAIRE, P.; HEGRE, O.; SORENSON, R. L. Effect of prolactin versus growth hormone on islet function and the importance of using homologous mammosomatotropic hormones. **Endocrinology**, v. 125, n. 5, p. 2392-2399, 1989.
- BRELJE, T. C.; SCHARP, D. W.; LACY, P. E.; OGREN, L.; TALAMANTES, F.; ROBERTSON, M.; FRIESEN, H. G.; SORENSON, R. L. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. **Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 879-887, 1993.
- BRODER, L. E.; CARTER, S. K. Pancreatic islet cell carcinoma. I. Clinical features of 52 patients. **Ann Intern Med**, v. 79, n. 1, p. 101-107, 1973.
- BUCHANAN, K. D.; JOHNSTON, C. F.; O'HARE, M. M.; ARDILL, J. E.; SHAW, C.; COLLINS, J. S.; WATSON, R. G.; ATKINSON, A. B.; HADDEN, D. R.; KENNEDY, T. L.; ET AL. Neuroendocrine tumors. A European view. **Am J Med**, v. 81, n. 6B, p. 14-22, 1986.
- BUSSIERE, C. T.; LAKEY, J. R.; SHAPIRO, A. M.; KORBUTT, G. S. The impact of the mTOR inhibitor sirolimus on the proliferation and function of pancreatic islets and ductal cells. **Diabetologia**, v. 49, n. 10, p. 2341-2349, 2006.
- CANTALUPPI, V.; BIANCONE, L.; ROMANAZZI, G. M.; FIGLIOLINI, F.; BELTRAMO, S.; NINNIRI, M. S.; GALIMI, F.; ROMAGNOLI, R.; FRANCHELLO, A.; SALIZZONI, M.; PERIN, P. C.; RICORDI, C.; SEGOLONI, G. P.; CAMUSSI, G. Antiangiogenic and immunomodulatory effects of rapamycin on islet endothelium: relevance for islet transplantation. **Am J Transplant**, v. 6, n. 11, p. 2601-2611, 2006.
- CARDOZO, A.; HEIMBERG, H.; HEREMANS, Y.; LEEMAN, R.; KUTLU, B.; KRUIHOFFER, M.; ORNTOFT, T.; EIZIRIK, D. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 52, p. 48879-48886, 2001.

- CARDOZO, A. K.; KRUIHOFFER, M.; LEEMAN, R.; ORNTOFT, T.; EIZIRIK, D. L. Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 909-920, 2001.
- CARDOZO, A. K.; ORTIS, F.; STORLING, J.; FENG, Y. M.; RASSCHAERT, J.; TONNESEN, M.; VAN EYLEN, F.; MANDRUP-POULSEN, T.; HERCHUELZ, A.; EIZIRIK, D. L. Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca²⁺ ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca²⁺, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 452-461, 2005.
- CARTRON, P. F.; AROKIUM, H.; OLIVER, L.; MEFLAH, K.; MANON, S.; VALLETTE, F. M. Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria. **J Biol Chem**, v. 280, n. 11, p. 10587-10598, 2005.
- CHAO, D. T.; LINETTE, G. P.; BOISE, L. H.; WHITE, L. S.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. **J Exp Med**, v. 182, n. 3, p. 821-828, 1995.
- CHEN, F.; COONEY, A. J.; WANG, Y.; LAW, S. W.; O'MALLEY, B. W. Cloning of a novel orphan receptor (GCNF) expressed during germ cell development. **Mol Endocrinol**, v. 8, n. 10, p. 1434-1444, 1994.
- CHEUNG, W. Y. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. **Science**, v. 207, n. 4426, p. 19-27, 1980.
- CHIANG, C. W.; KANIES, C.; KIM, K. W.; FANG, W. B.; PARKHURST, C.; XIE, M.; HENRY, T.; YANG, E. Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for BAD-mediated apoptosis. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 18, p. 6350-6362, 2003.
- CHOMEZ, P.; DE BACKER, O.; BERTRAND, M.; DE PLAEN, E.; BOON, T.; LUCAS, S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. **Cancer Res**, v. 61, n. 14, p. 5544-5551, 2001.
- COSTRINI, N. V.; KALKHOFF, R. K. Relative effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion. **J Clin Invest**, v. 50, n. 5, p. 992-999, 1971.
- CRAMER, W. Changes in the islets of Langerhans in pregnancy and in other conditions. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 23, n., p. 127-U110, 1933.
- CRIOLLO, A.; MAIURI, M. C.; TASDEMIR, E.; VITALE, I.; FIEBIG, A. A.; ANDREWS, D.; MOLGO, J.; DIAZ, J.; LAVANDERO, S.; HARPER, F.; PIERRON, G.; DI STEFANO, D.; RIZZUTO, R.; SZABADKAI, G.; KROEMER, G. Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 5, p. 1029-1039, 2007.
- CROSS, S. E.; RICHARDS, S. K.; CLARK, A.; BENEST, A. V.; BATES, D. O.; MATHIESON, P. W.; JOHNSON, P. R.; HARPER, S. J.; SMITH, R. M. Vascular

endothelial growth factor as a survival factor for human islets: effect of immunosuppressive drugs. **Diabetologia**, v. 50, n. 7, p. 1423-1432, 2007.

CUNHA, D. A.; HEKERMAN, P.; LADRIERE, L.; BAZARRA-CASTRO, A.; ORTIS, F.; WAKEHAM, M. C.; MOORE, F.; RASSCHAERT, J.; CARDOZO, A. K.; BELLOMO, E.; OVERBERGH, L.; MATHIEU, C.; LUPI, R.; HAI, T.; HERCHUELZ, A.; MARCHETTI, P.; RUTTER, G. A.; EIZIRIK, D. L.; CNOP, M. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 14, p. 2308-2318, 2008.

CUOMO, M. E.; KNEBEL, A.; PLATT, G.; MORRICE, N.; COHEN, P.; MITTNACHT, S. Regulation of microfilament organization by Kaposi sarcoma-associated herpes virus-cyclin.CDK6 phosphorylation of caldesmon. **J Biol Chem**, v. 280, n. 43, p. 35844-35858, 2005.

DANAIEI, G.; FINUCANE, M. M.; LU, Y.; SINGH, G. M.; COWAN, M. J.; PACIOREK, C. J.; LIN, J. K.; FARZADFAR, F.; KHANG, Y. H.; STEVENS, G. A.; RAO, M.; ALI, M. K.; RILEY, L. M.; ROBINSON, C. A.; EZZATI, M. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 31-40, 2011.

DASH-WAGH, S.; NEUMANN, J. R.; VEITINGER, S.; GROTE-WESTRICK, C.; LANDGRAF, P.; PAPE, H. C.; KREUTZ, M. R.; VON HOLST, A.; WAHLE, P. The survival promoting peptide Y-P30 promotes cellular migration. **Mol Cell Neurosci**, v. 48, n. 3, p. 195-204, 2011.

DE GIORGI, F.; LARTIGUE, L.; BAUER, M. K.; SCHUBERT, A.; GRIMM, S.; HANSON, G. T.; REMINGTON, S. J.; YOULE, R. J.; ICHAS, F. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. **FASEB J**, v. 16, n. 6, p. 607-609, 2002.

DE PLAEN, E.; ARDEN, K.; TRAVERSARI, C.; GAFORIO, J. J.; SZIKORA, J. P.; DE SMET, C.; BRASSEUR, F.; VAN DER BRUGGEN, P.; LETHE, B.; LURQUIN, C.; ET AL. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. **Immunogenetics**, v. 40, n. 5, p. 360-369, 1994.

DE SMET, C.; COURTOIS, S. J.; FARAONI, I.; LURQUIN, C.; SZIKORA, J. P.; DE BACKER, O.; BOON, T. Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene. **Immunogenetics**, v. 42, n. 4, p. 282-290, 1995.

DE SMET, C.; LORIOT, A.; BOON, T. Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 11, p. 4781-4790, 2004.

DESAI, N. M.; GOSS, J. A.; DENG, S.; WOLF, B. A.; MARKMANN, E.; PALANJIAN, M.; SHOCK, A. P.; FELICIANO, S.; BRUNICARDI, F. C.; BARKER, C. F.; NAJI, A.; MARKMANN, J. F. Elevated portal vein drug levels of sirolimus and tacrolimus in islet transplant recipients: local immunosuppression or islet toxicity? **Transplantation**, v. 76, n. 11, p. 1623-1625, 2003.

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

DUAN, Z.; DUAN, Y.; LAMENDOLA, D. E.; YUSUF, R. Z.; NAEEM, R.; PENSON, R. T.; SEIDEN, M. V. Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 7, p. 2778-2785, 2003.

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

EBATO, C.; UCHIDA, T.; ARAKAWA, M.; KOMATSU, M.; UENO, T.; KOMIYA, K.; AZUMA, K.; HIROSE, T.; TANAKA, K.; KOMINAMI, E.; KAWAMORI, R.; FUJITANI, Y.; WATADA, H. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. **Cell Metab**, v. 8, n. 4, p. 325-332, 2008.

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

EIZIRIK, D.; SANDLER, S.; WELSH, N.; CETKOVIC-CVRLJE, M.; NIEMAN, A.; GELLER, D.; PIPELEERS, D.; BENDTZEN, K.; HELLERSTRÖM, C. Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 5, p. 1968-1974, 1994.

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

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

EIZIRIK, D. L.; FLODSTROM, M.; KARLSEN, A. E.; WELSH, N. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 39, n. 8, p. 875-890, 1996.

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

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

ENDO, M.; OYADOMARI, S.; SUGA, M.; MORI, M.; GOTOH, T. The ER stress pathway involving CHOP is activated in the lungs of LPS-treated mice. **J Biochem**, v. 138, n. 4, p. 501-507, 2005.

ENDO, M.; MORI, M.; AKIRA, S.; GOTOH, T. C/EBP homologous protein (CHOP) is crucial for the induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced inflammation. **J Immunol**, v. 176, n. 10, p. 6245-6253, 2006.

ESKES, R.; DESAGHER, S.; ANTONSSON, B.; MARTINOU, J. C. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 3, p. 929-935, 2000.

EURA, M.; OGI, K.; CHIKAMATSU, K.; LEE, K. D.; NAKANO, K.; MASUYAMA, K.; ITOH, K.; ISHIKAWA, T. Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. **Int J Cancer**, v. 64, n. 5, p. 304-308, 1995.

EVES, R.; WEBB, B. A.; ZHOU, S.; MAK, A. S. Caldesmon is an integral component of podosomes in smooth muscle cells. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 9, p. 1691-1702, 2006.

FAN, T.; LI, R.; TODD, N. W.; QIU, Q.; FANG, H. B.; WANG, H.; SHEN, J.; ZHAO, R. Y.; CARAWAY, N. P.; KATZ, R. L.; STASS, S. A.; JIANG, F. Up-regulation of 14-3-3zeta in lung cancer and its implication as prognostic and therapeutic target. **Cancer Res**, v. 67, n. 16, p. 7901-7906, 2007.

FREEMARK, M.; DRISCOLL, P.; MAASKANT, R.; PETRYK, A.; KELLY, P. A. Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development. **J Clin Invest**, v. 99, n. 5, p. 1107-1117, 1997.

FRIEDRICHSEN, B.; GALSGAARD, E.; NIELSEN, J.; MOLDRUP, A. Growth hormone- and prolactin-induced proliferation of insulinoma cells, INS-1, depends on activation of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5). **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 136-148, 2001.

FRIEDRICHSEN, B. N.; NEUBAUER, N.; LEE, Y. C.; GRAM, V. K.; BLUME, N.; PETERSEN, J. S.; NIELSEN, J. H.; MOLDRUP, A. Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. **J Endocrinol**, v. 188, n. 3, p. 481-492, 2006.

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

FROUD, T.; RICORDI, C.; BAIDAL, D. A.; HAFIZ, M. M.; PONTE, G.; CURE, P.; PILEGGI, A.; POGGIOLI, R.; ICHII, H.; KHAN, A.; FERREIRA, J. V.; PUGLIESE, A.; ESQUENAZI, V. V.; KENYON, N. S.; ALEJANDRO, R. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. **Am J Transplant**, v. 5, n. 8, p. 2037-2046, 2005.

FUENTES-PRIOR, P.; SALVESEN, G. S. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. **Biochem J**, v. 384, n. Pt 2, p. 201-232, 2004.

- FUJINAKA, Y.; TAKANE, K.; YAMASHITA, H.; VASAVADA, R. C. Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 42, p. 30707-30717, 2007.
- FUJITA, E.; KOUROKU, Y.; ISOAI, A.; KUMAGAI, H.; MISUTANI, A.; MATSUDA, C.; HAYASHI, Y. K.; MOMOI, T. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). **Hum Mol Genet**, v. 16, n. 6, p. 618-629, 2007.
- GALLI, G.; FRATELLI, M. Activation of apoptosis by serum deprivation in a teratocarcinoma cell line: inhibition by L-acetylcarnitine. **Exp Cell Res**, v. 204, n. 1, p. 54-60, 1993.
- GALSGAARD, E.; NIELSEN, J.; MOLDRUP, A. Regulation of prolactin receptor (PRLR) gene expression in insulin-producing cells. Prolactin and growth hormone activate one of the rat prlr gene promoters via STAT5a and STAT5b. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 26, p. 18686-18692, 1999.
- GAO, R.; USTINOV, J.; KORSGREN, O.; OTONKOSKI, T. Effects of immunosuppressive drugs on in vitro neogenesis of human islets: mycophenolate mofetil inhibits the proliferation of ductal cells. **Am J Transplant**, v. 7, n. 4, p. 1021-1026, 2007.
- GARTNER, W.; KOC, F.; NABOKIKH, A.; DANEVA, T.; NIEDERLE, B.; LUGER, A.; WAGNER, L. Long-term in vitro growth of human insulin-secreting insulinoma cells. **Neuroendocrinology**, v. 83, n. 2, p. 123-130, 2006.
- GERMAIN, M.; MILBURN, J.; DURONIO, V. MCL-1 inhibits BAX in the absence of MCL-1/BAX Interaction. **J Biol Chem**, v. 283, n. 10, p. 6384-6392, 2008.
- GERMAIN, M.; NGUYEN, A. P.; LE GRAND, J. N.; ARBOUR, N.; VANDERLUIT, J. L.; PARK, D. S.; OPFERMAN, J. T.; SLACK, R. S. MCL-1 is a stress sensor that regulates autophagy in a developmentally regulated manner. **EMBO J**, v. 30, n. 2, p. 395-407, 2011.
- GHOSH, R.; KARMOHAPATRA, S. K.; BHATTACHARYYA, M.; BHATTACHARYA, R.; BHATTACHARYA, G.; SINHA, A. K. The appearance of dermcidin isoform 2, a novel platelet aggregating agent in the circulation in acute myocardial infarction that inhibits insulin synthesis and the restoration by acetyl salicylic acid of its effects. **J Thromb Thrombolysis**, v. 31, n. 1, p. 13-21, 2011.
- GLEASON, C. E.; GONZALEZ, M.; HARMON, J. S.; ROBERTSON, R. P. Determinants of glucose toxicity and its reversibility in the pancreatic islet beta-cell line, HIT-T15. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, n. 5, p. E997-1002, 2000.
- GOPING, I. S.; GROSS, A.; LAVOIE, J. N.; NGUYEN, M.; JEMMERSON, R.; ROTH, K.; KORSMEYER, S. J.; SHORE, G. C. Regulated targeting of BAX to mitochondria. **J Cell Biol**, v. 143, n. 1, p. 207-215, 1998.
- GRAGNOLI, C. The CM cell line derived from liver metastasis of malignant human insulinoma is not a valid beta cell model for in vitro studies. **J Cell Physiol**, v. 216, n. 2, p. 569-570, 2008.

- GREEN, I. C.; TAYLOR, K. W. Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of Langerhans. **J Endocrinol**, v. 54, n. 2, p. 317-325, 1972.
- GREENBERG, M. J.; WANG, C. L.; LEHMAN, W.; MOORE, J. R. Modulation of actin mechanics by caldesmon and tropomyosin. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 65, n. 2, p. 156-164, 2008.
- GRIFFITHS, G. J.; DUBREZ, L.; MORGAN, C. P.; JONES, N. A.; WHITEHOUSE, J.; CORFE, B. M.; DIVE, C.; HICKMAN, J. A. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. **J Cell Biol**, v. 144, n. 5, p. 903-914, 1999.
- GROUP, T. D. C. A. C. T. R. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 329, n. 14, p. 977-986, 1993.
- GU, Z.; KORDOWSKA, J.; WILLIAMS, G. L.; WANG, C. L.; HAI, C. M. Erk1/2 MAPK and caldesmon differentially regulate podosome dynamics in A7r5 vascular smooth muscle cells. **Exp Cell Res**, v. 313, n. 5, p. 849-866, 2007.
- GUO, L.; PIETKIEWICZ, D.; PAVLOV, E. V.; GRIGORIEV, S. M.; KASIANOWICZ, J. J.; DEJEAN, L. M.; KORSMEYER, S. J.; ANTONSSON, B.; KINNALLY, K. W. Effects of cytochrome c on the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 286, n. 5, p. C1109-1117, 2004.
- GYLFE, E.; HELLMAN, B. Glucose-stimulated sequestration of Ca²⁺ in clonal insulin-releasing cells. Evidence for an opposing effect of muscarinic-receptor activation. **Biochem J**, v. 233, n. 3, p. 865-870, 1986.
- HAI, C. M.; GU, Z. Caldesmon phosphorylation in actin cytoskeletal remodeling. **Eur J Cell Biol**, v. 85, n. 3-4, p. 305-309, 2006.
- HAILEY, D. W.; RAMBOLD, A. S.; SATPUTE-KRISHNAN, P.; MITRA, K.; SOUGRAT, R.; KIM, P. K.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 656-667, 2010.
- HARA, T.; NAKAMURA, K.; MATSUI, M.; YAMAMOTO, A.; NAKAHARA, Y.; SUZUKI-MIGISHIMA, R.; YOKOYAMA, M.; MISHIMA, K.; SAITO, I.; OKANO, H.; MIZUSHIMA, N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. **Nature**, v. 441, n. 7095, p. 885-889, 2006.
- HAY, C. W.; DOCHERTY, K. Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research. **Diabetes**, v. 55, n. 12, p. 3201-3213, 2006.
- HENQUIN, J. C. Effects of trifluoperazine and pimozide on stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. Suggestion for a role of calmodulin? **Biochem J**, v. 196, n. 3, p. 771-780, 1981.

- HILL, R. S.; OBERWETTER, J. M.; BOYD, A. E., 3RD. Increase in cAMP levels in beta-cell line potentiates insulin secretion without altering cytosolic free-calcium concentration. **Diabetes**, v. 36, n. 4, p. 440-446, 1987.
- HOORENS, A.; VAN DE CASTEELE, M.; KLOPPEL, G.; PIPELEERS, D. Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. **J Clin Invest**, v. 98, n. 7, p. 1568-1574, 1996.
- HOYER-HANSEN, M.; BASTHOLM, L.; SZYNIAROWSKI, P.; CAMPANELLA, M.; SZABADKAI, G.; FARKAS, T.; BIANCHI, K.; FEHRENBACHER, N.; ELLING, F.; RIZZUTO, R.; MATHIASSEN, I. S.; JAATTELA, M. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. **Mol Cell**, v. 25, n. 2, p. 193-205, 2007.
- HSU, Y. T.; WOLTER, K. G.; YOULE, R. J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 8, p. 3668-3672, 1997.
- HSU, Y. T.; YOULE, R. J. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. **J Biol Chem**, v. 273, n. 17, p. 10777-10783, 1998.
- HUANG, C.; SNIDER, F.; CROSS, J. C. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1618-1626, 2009.
- HUBER, P. A. Caldesmon. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 29, n. 8-9, p. 1047-1051, 1997.
- HUBINONT, C. J.; DUFRANE, S. P.; MALAISSE, W. J. Effect of pregnancy upon the activity of protein kinases A and C in rat pancreatic islets. **Horm Metab Res**, v. 17, n. 2, p. 104, 1985.
- Hypoglycemia in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. **Diabetes**, v. 46, n. 2, p. 271-286, 1997.
- ICHII, H.; INVERARDI, L.; PILEGGI, A.; MOLANO, R. D.; CABRERA, O.; CAICEDO, A.; MESSINGER, S.; KURODA, Y.; BERGGREN, P. O.; RICORDI, C. A novel method for the assessment of cellular composition and beta-cell viability in human islet preparations. **Am J Transplant**, v. 5, n. 7, p. 1635-1645, 2005.
- INOUE, H.; LI, J.; HONDA, M.; NAKASHIMA, H.; SHIBUTA, K.; ARINAGA, S.; UEO, H.; MORI, M.; AKIYOSHI, T. MAGE-1 mRNA expression in gastric carcinoma. **Int J Cancer**, v. 64, n. 1, p. 76-77, 1995.
- JANJIC, D.; MAECHLER, P.; SEKINE, N.; BARTLEY, C.; ANNEN, A. S.; WOLHEIM, C. B. Free radical modulation of insulin release in INS-1 cells exposed to alloxan. **Biochem Pharmacol**, v. 57, n. 6, p. 639-648, 1999.
- JENSEN, J.; GALSGAARD, E. D.; KARLSEN, A. E.; LEE, Y. C.; NIELSEN, J. H. STAT5 activation by human GH protects insulin-producing cells against interleukin-1beta, interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha-induced apoptosis independent of nitric oxide production. **J Endocrinol**, v. 187, n. 1, p. 25-36, 2005.

- JOHANSSON, M.; OLERUD, J.; JANSSON, L.; CARLSSON, P. O. Prolactin treatment improves engraftment and function of transplanted pancreatic islets. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1646-1653, 2009.
- JUNG, C. H.; JUN, C. B.; RO, S. H.; KIM, Y. M.; OTTO, N. M.; CAO, J.; KUNDU, M.; KIM, D. H. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. **Mol Biol Cell**, v. 20, n. 7, p. 1992-2003, 2009.
- JUNG, H. S.; CHUNG, K. W.; WON KIM, J.; KIM, J.; KOMATSU, M.; TANAKA, K.; NGUYEN, Y. H.; KANG, T. M.; YOON, K. H.; KIM, J. W.; JEONG, Y. T.; HAN, M. S.; LEE, M. K.; KIM, K. W.; SHIN, J.; LEE, M. S. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. **Cell Metab**, v. 8, n. 4, p. 318-324, 2008.
- KACZIREK, K.; SOLEIMAN, A.; SCHINDL, M.; PASSLER, C.; SCHEUBA, C.; PRAGER, G.; KASERER, K.; NIEDERLE, B. Nesidioblastosis in adults: a challenging cause of organic hyperinsulinism. **Eur J Clin Invest**, v. 33, n. 6, p. 488-492, 2003.
- KAMINITZ, A.; STEIN, J.; YANIV, I.; ASKENASY, N. The vicious cycle of apoptotic beta-cell death in type 1 diabetes. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 8, p. 582-589, 2007.
- KANIUK, N. A.; KIRALY, M.; BATES, H.; VRANIC, M.; VOLCHUK, A.; BRUMELL, J. H. Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 930-939, 2007.
- KARNIK, S. K.; CHEN, H.; MCLEAN, G. W.; HEIT, J. J.; GU, X.; ZHANG, A. Y.; FONTAINE, M.; YEN, M. H.; KIM, S. K. Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. **Science**, v. 318, n. 5851, p. 806-809, 2007.
- KATZ, D.; NIEDERBERGER, C.; SLAUGHTER, G. R.; COONEY, A. J. Characterization of germ cell-specific expression of the orphan nuclear receptor, germ cell nuclear factor. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4364-4372, 1997.
- KAYAGAKI, N.; PHUNG, Q.; CHAN, S.; CHAUDHARI, R.; QUAN, C.; O'ROURKE, K. M.; EBY, M.; PIETRAS, E.; CHENG, G.; BAZAN, J. F.; ZHANG, Z.; ARNOTT, D.; DIXIT, V. M. DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. **Science**, v. 318, n. 5856, p. 1628-1632, 2007.
- KELLER, A.; ENG, J.; ZHANG, N.; LI, X. J.; AEBERSOLD, R. A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats. **Mol Syst Biol**, v. 1, n., p. 2005 0017, 2005.
- KIDO, Y.; BURKS, D. J.; WITHERS, D.; BRUNING, J. C.; KAHN, C. R.; WHITE, M. F.; ACCILI, D. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. **J Clin Invest**, v. 105, n. 2, p. 199-205, 2000.
- KIENSTRA, M. A.; NEEL, H. B.; STROME, S. E.; ROCHE, P. Identification of NY-ESO-1, MAGE-1, and MAGE-3 in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 25, n. 6, p. 457-463, 2003.

- KILANI, R. T.; MAKSYMOWYCH, W. P.; AITKEN, A.; BOIRE, G.; ST-PIERRE, Y.; LI, Y.; GHAHARY, A. Detection of high levels of 2 specific isoforms of 14-3-3 proteins in synovial fluid from patients with joint inflammation. **J Rheumatol**, v. 34, n. 8, p. 1650-1657, 2007.
- KIM, K. A.; LEE, M. S. Recent progress in research on beta-cell apoptosis by cytokines. **Front Biosci**, v. 14, n., p. 657-664, 2009.
- KOGANEHIRA, Y.; TAKEOKA, M.; EHARA, T.; SASAKI, K.; MURATA, H.; SAIDA, T.; TANIGUCHI, S. Reduced expression of actin-binding proteins, h-caldesmon and calponin h1, in the vascular smooth muscle inside melanoma lesions: an adverse prognostic factor for malignant melanoma. **Br J Dermatol**, v. 148, n. 5, p. 971-980, 2003.
- KOMATSU, M.; WAGURI, S.; UENO, T.; IWATA, J.; MURATA, S.; TANIDA, I.; EZAKI, J.; MIZUSHIMA, N.; OHSUMI, Y.; UCHIYAMA, Y.; KOMINAMI, E.; TANAKA, K.; CHIBA, T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. **J Cell Biol**, v. 169, n. 3, p. 425-434, 2005.
- KOMATSU, M.; WAGURI, S.; CHIBA, T.; MURATA, S.; IWATA, J.; TANIDA, I.; UENO, T.; KOIKE, M.; UCHIYAMA, Y.; KOMINAMI, E.; TANAKA, K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. **Nature**, v. 441, n. 7095, p. 880-884, 2006.
- KONDO, Y.; KANZAWA, T.; SAWAYA, R.; KONDO, S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 9, p. 726-734, 2005.
- KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nat Med**, v. 6, n. 5, p. 513-519, 2000.
- KROEMER, G.; LEVINE, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 12, p. 1004-1010, 2008.
- KUFER, P.; ZIPPELIUS, A.; LUTTERBUSE, R.; MECKLENBURG, I.; ENZMANN, T.; MONTAG, A.; WECKERMANN, D.; PASSLICK, B.; PRANG, N.; REICHARDT, P.; DUGAS, M.; KOLLERMANN, M. W.; PANTEL, K.; RIETHMULLER, G. Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease. **Cancer Res**, v. 62, n. 1, p. 251-261, 2002.
- KUMA, A.; HATANO, M.; MATSUI, M.; YAMAMOTO, A.; NAKAYA, H.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y.; TOKUHISA, T.; MIZUSHIMA, N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. **Nature**, v. 432, n. 7020, p. 1032-1036, 2004.
- KUSHNER, J. A.; CIEMERYCH, M. A.; SICINSKA, E.; WARTSCHOW, L. M.; TETA, M.; LONG, S. Y.; SICINSKI, P.; WHITE, M. F. Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 9, p. 3752-3762, 2005.
- KUTLU, B.; CARDOZO, A.; DARVILLE, M.; KRUIHOFFER, M.; MAGNUSSON, N.; ORNTOFT, T.; EIZIRIK, D. Discovery of gene networks regulating cytokine-induced

dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells. **Diabetes**, v. 52, n. 11, p. 2701-2719, 2003.

LABRIOLA, L.; MONTOR, W. R.; KROGH, K.; LOJUDICE, F. H.; GENZINI, T.; GOLDBERG, A. C.; ELIASCHEWITZ, F. G.; SOGAYAR, M. C. Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. **Mol Cell Endocrinol**, v. 263, n. 1-2, p. 120-133, 2007.

LABRIOLA, L.; FERREIRA, G. B.; MONTOR, W. R.; DEMASI, M. A.; PIMENTA, D. C.; LOJUDICE, F. H.; GENZINI, T.; GOLDBERG, A. C.; ELIASCHEWITZ, F. G.; SOGAYAR, M. C. Prolactin-induced changes in protein expression in human pancreatic islets. **Mol Cell Endocrinol**, v. 264, n. 1-2, p. 16-27, 2007.

LABRIOLA, L.; PETERS, M. G.; KROGH, K.; STIGLIANO, I.; TERRA, L. F.; BUCHANAN, C.; MACHADO, M. C.; JOFFÉ, E. B. K.; PURICELLI, L.; SOGAYAR, M. C. Generation and characterization of human insulin-releasing cell lines. **BMC Cell Biol**, v. 10, n. 49, p., 2009.

LACASSE, E. C.; MAHONEY, D. J.; CHEUNG, H. H.; PLENCHETTE, S.; BAIRD, S.; KORNELUK, R. G. IAP-targeted therapies for cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6252-6275, 2008.

LAN, Z. J.; XU, X.; CHUNG, A. C.; COONEY, A. J. Extra-germ cell expression of mouse nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1 (NR6A1). **Biol Reprod**, v. 80, n. 5, p. 905-912, 2009.

LAUGHARNE, M.; CROSS, S.; RICHARDS, S.; DAWSON, C.; ILCHYSHYN, L.; SALEEM, M.; MATHIESON, P.; SMITH, R. Sirolimus toxicity and vascular endothelial growth factor release from islet and renal cell lines. **Transplantation**, v. 83, n. 12, p. 1635-1638, 2007.

LAWRENCE, S. M.; HUDDLESTON, K. A.; TOMIYA, N.; NGUYEN, N.; LEE, Y. C.; VANN, W. F.; COLEMAN, T. A.; BETENBAUGH, M. J. Cloning and expression of human sialic acid pathway genes to generate CMP-sialic acids in insect cells. **Glycoconj J**, v. 18, n. 3, p. 205-213, 2001.

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

LEE MOTOYAMA, J. P.; KIM-MOTOYAMA, H.; KIM, P.; NAKAGAMA, H.; MIYAGAWA, K.; SUZUKI, K. Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 357, n. 4, p. 828-833, 2007.

LEKANNE DEPRez, R. H.; FIJNVANDRAAT, A. C.; RUIJTER, J. M.; MOORMAN, A. F. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Anal Biochem**, v. 307, n. 1, p. 63-69, 2002.

- LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Dev Cell**, v. 6, n. 4, p. 463-477, 2004.
- LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **J Clin Invest**, v. 115, n. 10, p. 2679-2688, 2005.
- LEVINE, B. Cell biology: autophagy and cancer. **Nature**, v. 446, n. 7137, p. 745-747, 2007.
- LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27-42, 2008.
- LEVINE, B.; MIZUSHIMA, N.; VIRGIN, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 323-335, 2011.
- LI, J.; WANG, J. J.; ZHANG, S. X. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress mitigates retinal endothelial inflammation via activation of X-box binding protein 1. **J Biol Chem**, v. 286, n. 6, p. 4912-4921, 2011.
- LI, Z.; ZHAO, J.; DU, Y.; PARK, H. R.; SUN, S. Y.; BERNAL-MIZRACHI, L.; AITKEN, A.; KHURI, F. R.; FU, H. Down-regulation of 14-3-3zeta suppresses anchorage-independent growth of lung cancer cells through anoikis activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 1, p. 162-167, 2008.
- LIANG, G.; GONZALES, F. A.; JONES, P. A.; ORNTOFT, T. F.; THYKJAER, T. Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. **Cancer Res**, v. 62, n. 4, p. 961-966, 2002.
- LIN, Y. M. Calmodulin. **Mol Cell Biochem**, v. 45, n. 2, p. 101-112, 1982.
- LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, n. 1, p. 147-157, 1996.
- LUO, S.; RUBINSZTEIN, D. C. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 2, p. 268-277, 2010.
- MACFARLANE, W. M.; CHAPMAN, J. C.; SHEPHERD, R. M.; HASHMI, M. N.; KAMIMURA, N.; COSGROVE, K. E.; O'BRIEN, R. E.; BARNES, P. D.; HART, A. W.; DOCHERTY, H. M.; LINDLEY, K. J.; AYNSLEY-GREEN, A.; JAMES, R. F.; DOCHERTY, K.; DUNNE, M. J. Engineering a glucose-responsive human insulin-secreting cell line from islets of Langerhans isolated from a patient with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. **J Biol Chem**, v. 274, n. 48, p. 34059-34066, 1999.
- MACHADO, M. C.; JUKEMURA, J.; DA CUNHA, J. E.; PENTEADO, S.; BACCHELLA, T.; ABDO, E. E.; MONTAGNINI, A.; HERMAN, P.; MACHADO, M. A.; PINOTTI, H. W. [Surgical treatment of insulinoma: study of 59 cases]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 44, n. 2, p. 159-166, 1998.
- MAIURI, M. C.; LE TOUMELIN, G.; CRIOLLO, A.; RAIN, J. C.; GAUTIER, F.; JUIN, P.; TASDEMIR, E.; PIERRON, G.; TROULINAKI, K.; TAVERNARAKIS, N.; HICKMAN, J.

A.; GENESTE, O.; KROEMER, G. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. **EMBO J**, v. 26, n. 10, p. 2527-2539, 2007.

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

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

MARKMANN, J. F.; DENG, S.; HUANG, X.; DESAI, N. M.; VELIDEDEOGLU, E. H.; LUI, C.; FRANK, A.; MARKMANN, E.; PALANJIAN, M.; BRAYMAN, K.; WOLF, B.; BELL, E.; VITAMANIUK, M.; DOLIBA, N.; MATSCHINSKY, F.; BARKER, C. F.; NAJI, A. Insulin independence following isolated islet transplantation and single islet infusions. **Ann Surg**, v. 237, n. 6, p. 741-749; discussion 749-750, 2003.

MARTIN, A. P.; MITCHELL, C.; RAHMANI, M.; NEPHEW, K. P.; GRANT, S.; DENT, P. Inhibition of MCL-1 enhances lapatinib toxicity and overcomes lapatinib resistance via BAK-dependent autophagy. **Cancer Biol Ther**, v. 8, n. 21, p. 2084-2096, 2009.

MARTINO, L.; MASINI, M.; NOVELLI, M.; BEFFY, P.; BUGLIANI, M.; MARSELLI, L.; MASIELLO, P.; MARCHETTI, P.; DE TATA, V. Palmitate Activates Autophagy in INS-1E beta-Cells and in Isolated Rat and Human Pancreatic Islets. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36188, 2012.

MARZO, I.; BRENNER, C.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A.; BEUTNER, G.; BRDICZKA, D.; REMY, R.; XIE, Z. H.; REED, J. C.; KROEMER, G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. **J Exp Med**, v. 187, n. 8, p. 1261-1271, 1998.

MASLYAR, D. J.; AOKI, M.; VOGT, P. K. The growth-promoting activity of the Bad protein in chicken embryo fibroblasts requires binding to protein 14-3-3. **Oncogene**, v. 20, n. 37, p. 5087-5092, 2001.

MASTERS, S. C.; FU, H. 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. **J Biol Chem**, v. 276, n. 48, p. 45193-45200, 2001.

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

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

MEHMETI, I.; LENZEN, S.; LORTZ, S. Modulation of Bcl-2-related protein expression in pancreatic beta cells by pro-inflammatory cytokines and its dependence on the antioxidative defense status. **Mol Cell Endocrinol**, v. 332, n. 1-2, p. 88-96, 2011.

MENEGAUX, F.; SCHMITT, G.; MERCADIER, M.; CHIGOT, J. P. Pancreatic insulinomas. **Am J Surg**, v. 165, n. 2, p. 243-248, 1993.

MEYDAN, N.; GRUNBERGER, T.; DADI, H.; SHAHAR, M.; ARPAIA, E.; LAPIDOT, Z.; LEEDER, J. S.; FREEDMAN, M.; COHEN, A.; GAZIT, A.; LEVITZKI, A.; ROIFMAN, C. M. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. **Nature**, v. 379, n. 6566, p. 645-648, 1996.

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

MIKHAILOV, V.; MIKHAILOVA, M.; DEGENHARDT, K.; VENKATACHALAM, M. A.; WHITE, E.; SAIKUMAR, P. Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. **J Biol Chem**, v. 278, n. 7, p. 5367-5376, 2003.

MILLS, J. R.; HIPPO, Y.; ROBERT, F.; CHEN, S. M.; MALINA, A.; LIN, C. J.; TROJAHN, U.; WENDEL, H. G.; CHAREST, A.; BRONSON, R. T.; KOGAN, S. C.; NADON, R.; HOUSMAN, D. E.; LOWE, S. W.; PELLETIER, J. mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 31, p. 10853-10858, 2008.

MIYASHIRO, I.; KUO, C.; HUYNH, K.; IIDA, A.; MORTON, D.; BILCHIK, A.; GIULIANO, A.; HOON, D. S. Molecular strategy for detecting metastatic cancers with use of multiple tumor-specific MAGE-A genes. **Clin Chem**, v. 47, n. 3, p. 505-512, 2001.

MIYAZAKI, Y.; KAIKITA, K.; ENDO, M.; HORIO, E.; MIURA, M.; TSUJITA, K.; HOKIMOTO, S.; YAMAMURO, M.; IWAWAKI, T.; GOTOH, T.; OGAWA, H.; OIKE, Y. C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 5, p. 1124-1132, 2011.

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

MIZUSHIMA, N.; KUMA, A.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, A.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T.; NATSUME, T.; OHSUMI, Y.; YOSHIMORI, T. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 9, p. 1679-1688, 2003.

MIZUSHIMA, N.; HARA, T. Intracellular quality control by autophagy: how does autophagy prevent neurodegeneration? **Autophagy**, v. 2, n. 4, p. 302-304, 2006.

- MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; LEVINE, B. Methods in mammalian autophagy research. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 313-326, 2010.
- MOES, H.; SCHUILING, G. A.; KOITER, T. R. Arginine stimulated glucagon and insulin secretion by islets of Langerhans of pregnant and lactating rats. **Horm Metab Res**, v. 25, n. 5, p. 246-249, 1993.
- MONTE, M.; SIMONATTO, M.; PECHE, L. Y.; BUBLIK, D. R.; GOBESSI, S.; PIEROTTI, M. A.; RODOLFO, M.; SCHNEIDER, C. MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 30, p. 11160-11165, 2006.
- MOORE, F.; COLLI, M. L.; CNOP, M.; ESTEVE, M. I.; CARDOZO, A. K.; CUNHA, D. A.; BUGLIANI, M.; MARCHETTI, P.; EIZIRIK, D. L. PTPN2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates interferon-gamma-induced pancreatic beta-cell apoptosis. **Diabetes**, v. 58, n. 6, p. 1283-1291, 2009.
- MOORE, P. B.; DEDMAN, J. R. Calcium binding proteins and cellular regulation. **Life Sci**, v. 31, n. 26, p. 2937-2946, 1982.
- MORITA, T.; MAYANAGI, T.; YOSHIO, T.; SOBUE, K. Changes in the balance between caldesmon regulated by p21-activated kinases and the Arp2/3 complex govern podosome formation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 11, p. 8454-8463, 2007.
- MUKAI, H. The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC. **J Biochem**, v. 133, n. 1, p. 17-27, 2003.
- MUKAMAL, K. J.; MITTLEMAN, M. A.; MACLURE, M.; SHERWOOD, J. B.; GOLDBERG, R. J.; MULLER, J. E. Recent aspirin use is associated with smaller myocardial infarct size and lower likelihood of Q-wave infarction. **Am Heart J**, v. 137, n. 6, p. 1120-1128, 1999.
- MUKHOPADHYAY, U. K.; EVES, R.; JIA, L.; MOONEY, P.; MAK, A. S. p53 suppresses Src-induced podosome and rosette formation and cellular invasiveness through the upregulation of caldesmon. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 11, p. 3088-3098, 2009.
- NAFTANEL, M. A.; HARLAN, D. M. Pancreatic islet transplantation. **PLoS Med**, v. 1, n. 3, p. e58; quiz e75, 2004.
- NAGARAJU, K.; CASCIOLA-ROSEN, L.; LUNDBERG, I.; RAWAT, R.; CUTTING, S.; THAPLIYAL, R.; CHANG, J.; DWIVEDI, S.; MITSAK, M.; CHEN, Y. W.; PLOTZ, P.; ROSEN, A.; HOFFMAN, E.; RABEN, N. Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 6, p. 1824-1835, 2005.
- NAKAGAWA, T.; SHIMIZU, S.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, O.; OTSU, K.; YAMAGATA, H.; INOHARA, H.; KUBO, T.; TSUJIMOTO, Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. **Nature**, v. 434, n. 7033, p. 652-658, 2005.

- NAKAI, A.; YAMAGUCHI, O.; TAKEDA, T.; HIGUCHI, Y.; HIKOSO, S.; TANIKE, M.; OMIYA, S.; MIZOTE, I.; MATSUMURA, Y.; ASAH, M.; NISHIDA, K.; HORI, M.; MIZUSHIMA, N.; OTSU, K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. **Nat Med**, v. 13, n. 5, p. 619-624, 2007.
- NEHER, E. Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. **Neuron**, v. 20, n. 3, p. 389-399, 1998.
- NIELSEN, J. H.; LINDE, S.; WELINDER, B. S.; BILLESTRUP, N.; MADSEN, O. D. Growth hormone is a growth factor for the differentiated pancreatic beta-cell. **Mol Endocrinol**, v. 3, n. 1, p. 165-173, 1989.
- NIELSEN, J. H.; GALSGAARD, E. D.; MOLDRUP, A.; FRIEDRICHSEN, B. N.; BILLESTRUP, N.; HANSEN, J. A.; LEE, Y. C.; CARLSSON, C. Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. **Diabetes**, v. 50 Suppl 1, n., p. S25-29, 2001.
- NIELSEN, K.; KARLSEN, A. E.; DECKERT, M.; MADSEN, O. D.; SERUP, P.; MANDRUP-POULSEN, T.; NERUP, J. Beta-cell maturation leads to in vitro sensitivity to cytotoxins. **Diabetes**, v. 48, n. 12, p. 2324-2332, 1999.
- NIELSEN, K.; SPARRE, T.; LARSEN, M. R.; NIELSEN, M.; FEY, S. J.; MOSE LARSEN, P.; ROEPSTORFF, P.; NERUP, J.; KARLSEN, A. E. Protein expression changes in a cell system of beta-cell maturation reflect an acquired sensitivity to IL-1beta. **Diabetologia**, v. 47, n. 1, p. 62-74, 2004.
- NIR, T.; MELTON, D. A.; DOR, Y. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. **J Clin Invest**, v. 117, n. 9, p. 2553-2561, 2007.
- NOVY, R. E.; LIN, J. L.; LIN, J. J. Characterization of cDNA clones encoding a human fibroblast caldesmon isoform and analysis of caldesmon expression in normal and transformed cells. **J Biol Chem**, v. 266, n. 25, p. 16917-16924, 1991.
- OBERG, K.; ERIKSSON, B. Endocrine tumours of the pancreas. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 19, n. 5, p. 753-781, 2005.
- ORTIS, F.; PIROT, P.; NAAMANE, N.; KREINS, A. Y.; RASSCHAERT, J.; MOORE, F.; THEATRE, E.; VERHAEGHE, C.; MAGNUSSON, N. E.; CHARLOT, A.; ORNTOFT, T. F.; EIZIRIK, D. L. Induction of nuclear factor-kappaB and its downstream genes by TNF-alpha and IL-1beta has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 51, n. 7, p. 1213-1225, 2008.
- ORTIS, F.; NAAMANE, N.; FLAMEZ, D.; LADRIERE, L.; MOORE, F.; CUNHA, D.; COLLI, M.; THYKJAER, T.; THORSEN, K.; ORNTOFT, T.; EIZIRIK, D. Cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary beta-cells. **Diabetes**, v. 59, n. 2, p. 358-374, 2010.
- OTTE, M.; ZAFRAKAS, M.; RIETHDORF, L.; PICHLMEIER, U.; LONING, T.; JANICKE, F.; PANTEL, K. MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. **Cancer Res**, v. 61, n. 18, p. 6682-6687, 2001.

OWADA, M. K.; HAKURA, A.; IIDA, K.; YAHARA, I.; SOBUE, K.; KAKIUCHI, S. Occurrence of caldesmon (a calmodulin-binding protein) in cultured cells: comparison of normal and transformed cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 10, p. 3133-3137, 1984.

OYADOMARI, S.; TAKEDA, K.; TAKIGUCHI, M.; GOTOH, T.; MATSUMOTO, M.; WADA, I.; AKIRA, S.; ARAKI, E.; MORI, M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10845-10850, 2001.

PARK, J. W.; KWON, T. K.; KIM, I. H.; SOHN, S. S.; KIM, Y. S.; KIM, C. I.; BAE, O. S.; LEE, K. S.; LEE, K. D.; LEE, C. S.; CHANG, H. K.; CHOE, B. K.; AHN, S. Y.; JEON, C. H. A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers. **J Immunol Methods**, v. 266, n. 1-2, p. 79-86, 2002.

PARSONS, J. A.; BRELJE, T. C.; SORENSON, R. L. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. **Endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 1459-1466, 1992.

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

PATTERSON, C. C.; DAHLQUIST, G. G.; GYURUS, E.; GREEN, A.; SOLTESZ, G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. **Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2027-2033, 2009.

PATTINGRE, S.; TASSA, A.; QU, X.; GARUTI, R.; LIANG, X. H.; MIZUSHIMA, N.; PACKER, M.; SCHNEIDER, M. D.; LEVINE, B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 927-939, 2005.

PATTINGRE, S.; ESPERT, L.; BIARD-PIECHACZYK, M.; CODOGNO, P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. **Biochimie**, v. 90, n. 2, p. 313-323, 2008.

PAVLOV, E. V.; PRIAULT, M.; PIETKIEWICZ, D.; CHENG, E. H.; ANTONSSON, B.; MANON, S.; KORSMEYER, S. J.; MANNELLA, C. A.; KINNALLY, K. W. A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. **J Cell Biol**, v. 155, n. 5, p. 725-731, 2001.

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

PETER, M. E.; KRAMMER, P. H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. **Cell Death Differ**, v. 10, n. 1, p. 26-35, 2003.

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

- PICKERSGILL, L. M.; MANDRUP-POULSEN, T. R. The anti-interleukin-1 in type 1 diabetes action trial--background and rationale. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 25, n. 4, p. 321-324, 2009.
- POLAK, M.; SCHARFMANN, R.; BAN, E.; HAOUR, F.; POSTEL-VINAY, M. C.; CZERNICHOW, P. Demonstration of lactogenic receptors in rat endocrine pancreases by quantitative autoradiography. **Diabetes**, v. 39, n. 9, p. 1045-1049, 1990.
- PORTER, D.; WEREMOWICZ, S.; CHIN, K.; SETH, P.; KESHAVIAH, A.; LAHTI-DOMENICI, J.; BAE, Y. K.; MONITTO, C. L.; MERLOS-SUAREZ, A.; CHAN, J.; HULETTE, C. M.; RICHARDSON, A.; MORTON, C. C.; MARKS, J.; DUYAO, M.; HRUBAN, R.; GABRIELSON, E.; GELMAN, R.; POLYAK, K. A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 19, p. 10931-10936, 2003.
- PORTER, G. W.; KHURI, F. R.; FU, H. Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. **Semin Cancer Biol**, v. 16, n. 3, p. 193-202, 2006.
- PRADELLI, L. A.; BENETEAU, M.; CHAUVIN, C.; JACQUIN, M. A.; MARCHETTI, S.; MUNOZ-PINEDO, C.; AUBERGER, P.; PENDE, M.; RICCI, J. E. Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation. **Oncogene**, v. 29, n. 11, p. 1641-1652, 2010.
- PROYE, C. Surgical strategy in insulinoma of adults. Clinical review. **Acta Chir Scand**, v. 153, n. 9, p. 481-491, 1987.
- QI, W.; LIU, X.; QIAO, D.; MARTINEZ, J. D. Isoform-specific expression of 14-3-3 proteins in human lung cancer tissues. **Int J Cancer**, v. 113, n. 3, p. 359-363, 2005.
- QIN, L.; WANG, Z.; TAO, L.; WANG, Y. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. **Autophagy**, v. 6, n. 2, p. 239-247, 2010.
- RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W. L.; SHI, Y.; MORGAN, A. R.; BLEACKLEY, R. C. DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. **Diabetologia**, v. 37, n. 8, p. 733-738, 1994.
- RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W. L. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. **Biochem Pharmacol**, v. 55, n. 8, p. 1139-1149, 1998.
- RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W.; STRYNADKA, K.; JU, Q.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M.; KORBUTT, G. S.; RAJOTTE, R. V. Transfection of human pancreatic islets with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction. **Diabetes**, v. 48, n. 6, p. 1223-1229, 1999.
- RASMUSSEN, L. D.; EKELUND, F.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J.; JOHNSEN, K. Group-Specific PCR Primers to Amplify 24S a-Subunit rRNA Genes from Kinetoplastida (Protozoa) Used in Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Microb Ecol**, v. 42, n. 2, p. 109-115, 2001.

- RASSCHAERT, J.; LADRIERE, L.; URBAIN, M.; DOGUSAN, Z.; KATABUA, B.; SATO, S.; AKIRA, S.; GYSEMANS, C.; MATHIEU, C.; EIZIRIK, D. L. Toll-like receptor 3 and STAT-1 contribute to double-stranded RNA+ interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 40, p. 33984-33991, 2005.
- RICORDI, C.; LACY, P. E.; FINKE, E. H.; OLACK, B. J.; SHARP, D. W. Automated method for isolation of human pancreatic islets. **Diabetes**, v. 37, n. 4, p. 413-420, 1988.
- RIEDL, S. J.; SALVESEN, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 5, p. 405-413, 2007.
- ROSS, D. T.; SCHERF, U.; EISEN, M. B.; PEROU, C. M.; REES, C.; SPELLMAN, P.; IYER, V.; JEFFREY, S. S.; VAN DE RIJN, M.; WALTHAM, M.; PERGAMENSCHIKOV, A.; LEE, J. C.; LASHKARI, D.; SHALON, D.; MYERS, T. G.; WEINSTEIN, J. N.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. **Nat Genet**, v. 24, n. 3, p. 227-235, 2000.
- ROSTOVTSEVA, T. K.; ANTONSSON, B.; SUZUKI, M.; YOULE, R. J.; COLOMBINI, M.; BEZRUKOV, S. M. Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. **J Biol Chem**, v. 279, n. 14, p. 13575-13583, 2004.
- RYAN, E.; LAKEY, J.; RAJOTTE, R.; KORBUTT, G.; KIN, T.; IMES, S.; RABINOVITCH, A.; ELLIOTT, J.; BIGAM, D.; KNETEMAN, N.; WARNOCK, G.; LARSEN, I.; SHAPIRO, A. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. **Diabetes**, v. 50, n. 4, p. 710-719, 2001.
- RYAN, E. A.; PATY, B. W.; SENIOR, P. A.; BIGAM, D.; ALFADHLI, E.; KNETEMAN, N. M.; LAKEY, J. R.; SHAPIRO, A. M. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2060-2069, 2005.
- SALVESEN, G. S.; RIEDL, S. J. Caspase mechanisms. **Adv Exp Med Biol**, v. 615, n., p. 13-23, 2008.
- SAPIN, R.; LE GALUDEC, V.; GASSER, F.; PINGET, M.; GRUCKER, D. Elecsys insulin assay: free insulin determination and the absence of cross-reactivity with insulin lispro. **Clin Chem**, v. 47, n. 3, p. 602-605, 2001.
- SCHINDLER, C.; DARNELL, J. E., JR. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. **Annu Rev Biochem**, v. 64, n., p. 621-651, 1995.
- SCHITTEK, B.; HIPFEL, R.; SAUER, B.; BAUER, J.; KALBACHER, H.; STEVANOVIC, S.; SCHIRLE, M.; SCHROEDER, K.; BLIN, N.; MEIER, F.; RASSNER, G.; GARBE, C. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. **Nat Immunol**, v. 2, n. 12, p. 1133-1137, 2001.
- SCHITTEK, B.; PAULMANN, M.; SENYUREK, I.; STEFFEN, H. The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. **Infect Disord Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 135-143, 2008.

SCHITTEK, B. The Multiple Facets of Dermcidin in Cell Survival and Host Defense. **J Innate Immun**, v., n., p., 2012.

SEKINE, N.; FUKUMOTO, S.; ISHIKAWA, T.; OKAZAKI, T.; FUJITA, T. GH inhibits interferon-gamma-induced signal transducer and activator of transcription-1 activation and expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in INS-1 cells. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 3909-3916, 2001.

SEO, H. Y.; KIM, Y. D.; LEE, K. M.; MIN, A. K.; KIM, M. K.; KIM, H. S.; WON, K. C.; PARK, J. Y.; LEE, K. U.; CHOI, H. S.; PARK, K. G.; LEE, I. K. Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. **Endocrinology**, v. 149, n. 8, p. 3832-3841, 2008.

SHAO, C.; LAWRENCE, M. C.; COBB, M. H. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) expression by interleukin-1 beta in pancreatic beta cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 26, p. 19710-19719, 2010.

SHAPIRO, A. M.; LAKEY, J. R.; RYAN, E. A.; KORBUTT, G. S.; TOTH, E.; WARNOCK, G. L.; KNETEMAN, N. M.; RAJOTTE, R. V. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. **N Engl J Med**, v. 343, n. 4, p. 230-238, 2000.

SHEN, S. L.; QIU, F. H.; DAYARATHNA, T. K.; WU, J.; KUANG, M.; LI, S. S.; PENG, B. G.; NIE, J. Identification of Dermcidin as a novel binding protein of Nck1 and characterization of its role in promoting cell migration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 6, p. 703-710, 2011.

SHIMIZU, S.; NARITA, M.; TSUJIMOTO, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. **Nature**, v. 399, n. 6735, p. 483-487, 1999.

SHIMIZU, S.; SHINOHARA, Y.; TSUJIMOTO, Y. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. **Oncogene**, v. 19, n. 38, p. 4309-4318, 2000.

SHIMIZU, S.; IDE, T.; YANAGIDA, T.; TSUJIMOTO, Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. **J Biol Chem**, v. 275, n. 16, p. 12321-12325, 2000.

SHKODA, A.; RUIZ, P. A.; DANIEL, H.; KIM, S. C.; ROGLER, G.; SARTOR, R. B.; HALLER, D. Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 190-207, 2007.

SKULACHEV, V. P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. **FEBS Lett**, v. 397, n. 1, p. 7-10, 1996.

SOBUE, K.; SELLERS, J. R. Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. **J Biol Chem**, v. 266, n. 19, p. 12115-12118, 1991.

SOGAYAR, M. C.; CAMARGO, A. A.; BETTONI, F.; CARRARO, D. M.; PIRES, L. C.; PARMIGIANI, R. B.; FERREIRA, E. N.; DE SA MOREIRA, E.; DO ROSARIO, D. D. O. L. M.; SIMPSON, A. J.; CRUZ, L. O.; DEGAKI, T. L.; FESTA, F.; MASSIRER, K. B.; FILHO, F. C.; CAMARGO, L. P.; CUNHA, M. A.; DE SOUZA, S. J.; FARIA, M., JR.; GIULIATTI, S.; KOPP, L.; DE OLIVEIRA, P. S.; PAIVA, P. B.; PEREIRA, A. A.; PINHEIRO, D. G.; PUGA, R. D.; JE, S. D. S.; ALBUQUERQUE, D. M.; ANDRADE, L. E.; BAIA, G. S.; BRIONES, M. R.; CAVALEIRO-LUNA, A. M.; CERUTTI, J. M.; COSTA, F. F.; COSTANZI-STRAUSS, E.; ESPREAFICO, E. M.; FERRASI, A. C.; FERRO, E. S.; FORTES, M. A.; FURCHI, J. R.; GIANNELLA-NETO, D.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; GRUBER, A.; GUIMARAES, G. S.; HACKEL, C.; HENRIQUE-SILVA, F.; KIMURA, E. T.; LEONI, S. G.; MACEDO, C.; MALNIC, B.; MANZINI, B. C.; MARIE, S. K.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MENOSSI, M.; MIRACCA, E. C.; NAGAI, M. A.; NOBREGA, F. G.; NOBREGA, M. P.; OBA-SHINJO, S. M.; OLIVEIRA, M. K.; ORABONA, G. M.; OTSUKA, A. Y.; PACO-LARSON, M. L.; PAIXAO, B. M.; PANDOLFI, J. R.; PARDINI, M. I.; PASSOS BUENO, M. R.; PASSOS, G. A.; PESQUERO, J. B.; PESSOA, J. G.; RAHAL, P.; RAINHO, C. A.; REIS, C. P.; RICCA, T. I.; RODRIGUES, V.; ROGATTO, S. R.; ROMANO, C. M.; ROMEIRO, J. G.; ROSSI, A.; SA, R. G.; SALES, M. M.; SANT'ANNA, S. C.; SANTAROSA, P. L.; SEGATO, F.; SILVA, W. A., JR.; SILVA, I. D.; SILVA, N. P.; SOARES-COSTA, A.; SONATI, M. F.; STRAUSS, B. E.; TAJARA, E. H.; VALENTINI, S. R.; VILLANOVA, F. E.; WARD, L. S.; ZANETTE, D. L. A transcript finishing initiative for closing gaps in the human transcriptome. **Genome Res**, v. 14, n. 7, p. 1413-1423, 2004.

SORENSEN, R. L.; STOUT, L. E. Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis. **Endocrinology**, v. 136, n. 9, p. 4092-4098, 1995.

SORENSEN, R. L.; BRELJE, T. C. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. **Horm Metab Res**, v. 29, n. 6, p. 301-307, 1997.

SORENSEN, R. L.; BRELJE, T. C. Prolactin receptors are critical to the adaptation of islets to pregnancy. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1566-1569, 2009.

SPELLACY, W. N.; GOETZ, F. C.; GREENBERG, B. Z.; ELLS, J. Plasma Insulin in Normal Midpregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 92, n., p. 11-15, 1965.

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

SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C.; ZHANG, H.; FU, H. Functional conservation of 14-3-3 isoforms in inhibiting bad-induced apoptosis. **Exp Cell Res**, v. 271, n. 1, p. 142-151, 2001.

SUGDEN, M. C.; CHRISTIE, M. R.; ASHCROFT, S. J. Presence and possible role of calcium-dependent regulator (calmodulin) in rat islets of Langerhans. **FEBS Lett**, v. 105, n. 1, p. 95-100, 1979.

- SUK, K.; KIM, S.; KIM, Y. H.; KIM, K. A.; CHANG, I.; YAGITA, H.; SHONG, M.; LEE, M. S. IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. **J Immunol**, v. 166, n. 7, p. 4481-4489, 2001.
- TAKAHASHI, K.; SHICHIJO, S.; NOGUCHI, M.; HIROHATA, M.; ITOH, K. Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. **Cancer Res**, v. 55, n. 16, p. 3478-3482, 1995.
- TANAKA, J.; WATANABE, T.; NAKAMURA, N.; SOBUE, K. Morphological and biochemical analyses of contractile proteins (actin, myosin, caldesmon and tropomyosin) in normal and transformed cells. **J Cell Sci**, v. 104 (Pt 2), n., p. 595-606, 1993.
- TANEMURA, M.; OHMURA, Y.; DEGUCHI, T.; MACHIDA, T.; TSUKAMOTO, R.; WADA, H.; KOBAYASHI, S.; MARUBASHI, S.; EGUCHI, H.; ITO, T.; NAGANO, H.; MORI, M.; DOKI, Y. Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo. **Am J Transplant**, v. 12, n. 1, p. 102-114, 2012.
- THOMAS, H. E.; MCKENZIE, M. D.; ANGSTETRA, E.; CAMPBELL, P. D.; KAY, T. W. Beta cell apoptosis in diabetes. **Apoptosis**, v. 14, n. 12, p. 1389-1404, 2009.
- TOYO-OKA, K.; SHIONOYA, A.; GAMBELLO, M. J.; CARDOSO, C.; LEVENTER, R.; WARD, H. L.; AYALA, R.; TSAI, L. H.; DOBYNS, W.; LEDBETTER, D.; HIROTSUNE, S.; WYNshaw-BORIS, A. 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. **Nat Genet**, v. 34, n. 3, p. 274-285, 2003.
- TRAUTMANN, M. E.; WOLLHEIM, C. B. Characterization of glucose transport in an insulin-secreting cell line. **Biochem J**, v. 242, n. 3, p. 625-630, 1987.
- TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. **Cell Death Differ**, v. 12 Suppl 2, n., p. 1528-1534, 2005.
- TSUKADA, M.; OHSUMI, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, v. 333, n. 1-2, p. 169-174, 1993.
- TUCKER, O. N.; CROTTY, P. L.; CONLON, K. C. The management of insulinoma. **Br J Surg**, v. 93, n. 3, p. 264-275, 2006.
- UNO, S.; IMAGAWA, A.; OKITA, K.; SAYAMA, K.; MORIWAKI, M.; IWAHASHI, H.; YAMAGATA, K.; TAMURA, S.; MATSUZAWA, Y.; HANAFUSA, T.; MIYAGAWA, J.; SHIMOMURA, I. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n. 3, p. 596-601, 2007.
- VALVERDE, I.; VANDERMEERS, A.; ANJANEYULU, R.; MALAISSE, W. J. Calmodulin activation of adenylate cyclase in pancreatic islets. **Science**, v. 206, n. 4415, p. 225-227, 1979.
- VAN DER BRUGGEN, P.; TRAVERSARI, C.; CHOMEZ, P.; LURQUIN, C.; DE PLAEN, E.; VAN DEN EYNDE, B.; KNUTH, A.; BOON, T. A gene encoding an antigen recognized

by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. **Science**, v. 254, n. 5038, p. 1643-1647, 1991.

VANDER HEIDEN, M. G.; CHANDEL, N. S.; LI, X. X.; SCHUMACKER, P. T.; COLOMBINI, M.; THOMPSON, C. B. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 9, p. 4666-4671, 2000.

VANDER HEIDEN, M. G.; LI, X. X.; GOTTLEIB, E.; HILL, R. B.; THOMPSON, C. B.; COLOMBINI, M. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. **J Biol Chem**, v. 276, n. 22, p. 19414-19419, 2001.

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

VIRGIN, H. W.; LEVINE, B. Autophagy genes in immunity. **Nat Immunol**, v. 10, n. 5, p. 461-470, 2009.

WANG, L. H.; KIRKEN, R. A.; ERWIN, R. A.; YU, C. R.; FARRAR, W. L. JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrophostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. **J Immunol**, v. 162, n. 7, p. 3897-3904, 1999.

WANG, M.; ZHAO, X. R.; WANG, P.; LI, L.; DAI, Y.; HUANG, H.; LEI, P.; ZHU, H. F.; SHEN, G. X. Glucose regulated proteins 78 protects insulinoma cells (NIT-1) from death induced by streptozotocin, cytokines or cytotoxic T lymphocytes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 11, p. 2076-2082, 2007.

WANG, X. C.; XU, S. Y.; WU, X. Y.; SONG, H. D.; MAO, Y. F.; FAN, H. Y.; YU, F.; MOU, B.; GU, Y. Y.; XU, L. Q.; ZHOU, X. O.; CHEN, Z.; CHEN, J. L.; HU, R. M. Gene expression profiling in human insulinoma tissue: genes involved in the insulin secretion pathway and cloning of novel full-length cDNAs. **Endocr Relat Cancer**, v. 11, n. 2, p. 295-303, 2004.

WATKINS, D.; WHITE, B. A. Identification and characterization of calmodulin-binding proteins in islet secretion granules. **J Biol Chem**, v. 260, n. 8, p. 5161-5165, 1985.

WEI, M. C.; LINDSTEN, T.; MOOTHA, V. K.; WEILER, S.; GROSS, A.; ASHIYA, M.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. **Genes Dev**, v. 14, n. 16, p. 2060-2071, 2000.

WEI, M. C.; ZONG, W. X.; CHENG, E. H.; LINDSTEN, T.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; ROSS, A. J.; ROTH, K. A.; MACGREGOR, G. R.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, v. 292, n. 5517, p. 727-730, 2001.

WEI, Y.; PATTINGRE, S.; SINHA, S.; BASSIK, M.; LEVINE, B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. **Mol Cell**, v. 30, n. 6, p. 678-688, 2008.

- WEINHAUS, A. J.; STOUT, L. E.; SORENSON, R. L. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p. 1640-1649, 1996.
- WEINHAUS, A. J.; BHAGROO, N. V.; BRELJE, T. C.; SORENSON, R. L. Dexamethasone counteracts the effect of prolactin on islet function: implications for islet regulation in late pregnancy. **Endocrinology**, v. 141, n. 4, p. 1384-1393, 2000.
- WEINHAUS, A. J.; STOUT, L. E.; BHAGROO, N. V.; BRELJE, T. C.; SORENSON, R. L. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. **J Endocrinol**, v. 193, n. 3, p. 367-381, 2007.
- WENZLAU, J. M.; JUHL, K.; YU, L.; MOUA, O.; SARKAR, S. A.; GOTTLIEB, P.; REWERS, M.; EISENBARTH, G. S.; JENSEN, J.; DAVIDSON, H. W.; HUTTON, J. C. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 43, p. 17040-17045, 2007.
- WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 440-464, 2010.
- WILKER, E.; YAFFE, M. B. 14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 3, p. 633-642, 2004.
- WILSON, N. S.; DIXIT, V.; ASHKENAZI, A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. **Nat Immunol**, v. 10, n. 4, p. 348-355, 2009.
- WOLTER, K. G.; HSU, Y. T.; SMITH, C. L.; NECHUSHTAN, A.; XI, X. G.; YOULE, R. J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. **J Cell Biol**, v. 139, n. 5, p. 1281-1292, 1997.
- YAMAMOTO, T.; MITA, A.; RICORDI, C.; MESSINGER, S.; MIKI, A.; SAKUMA, Y.; TIMONERI, F.; BARKER, S.; FORNONI, A.; MOLANO, R. D.; INVERARDI, L.; PILEGGI, A.; ICHII, H. Prolactin supplementation to culture medium improves beta-cell survival. **Transplantation**, v. 89, n. 11, p. 1328-1335, 2010.
- YAMASHIRO, S.; YAMAKITA, Y.; ISHIKAWA, R.; MATSUMURA, F. Mitosis-specific phosphorylation causes 83K non-muscle caldesmon to dissociate from microfilaments. **Nature**, v. 344, n. 6267, p. 675-678, 1990.
- YAMASHIRO, S.; YAMAKITA, Y.; HOSOYA, H.; MATSUMURA, F. Phosphorylation of non-muscle caldesmon by p34cdc2 kinase during mitosis. **Nature**, v. 349, n. 6305, p. 169-172, 1991.
- YANG-YEN, H. F. Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller. **J Biomed Sci**, v. 13, n. 2, p. 201-204, 2006.
- YANG, H.; MASTERS, S. C.; WANG, H.; FU, H. The proapoptotic protein Bad binds the amphipathic groove of 14-3-3zeta. **Biochim Biophys Acta**, v. 1547, n. 2, p. 313-319, 2001.

YOSHIO, T.; MORITA, T.; KIMURA, Y.; TSUJII, M.; HAYASHI, N.; SOBUE, K. Caldesmon suppresses cancer cell invasion by regulating podosome/invadopodium formation. **FEBS Lett**, v. 581, n. 20, p. 3777-3782, 2007.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 1, p. 47-59, 2008.

ZANG, D.; LI, X.; ZHANG, L. 14-3-3zeta Overexpression and abnormal beta-catenin expression are associated with poor differentiation and progression in stage I non-small cell lung cancer. **Clin Exp Med**, v. 10, n. 4, p. 221-228, 2010.

ZHA, J.; HARADA, H.; YANG, E.; JOCKEL, J.; KORSMEYER, S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). **Cell**, v. 87, n. 4, p. 619-628, 1996.

ZHANG, K.; SHEN, X.; WU, J.; SAKAKI, K.; SAUNDERS, T.; RUTKOWSKI, D. T.; BACK, S. H.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 587-599, 2006.

Súmula curricular

Letícia Ferreira Terra

Endereço residencial: Rua Girassol, 1291 apto. 41
05433-002 - São Paulo, SP – Brasil

Endereço profissional: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 748 sala 964
05508-000 – São Paulo, SP - Brasil

Telefones: +55 11 3091-9047 (trabalho)
+55 11 3814-5010 (residencial)
+55 11 99734-8456 (celular)

Fax: +55 11 3091-3820

E-mail: leterra@iq.usp.br
leterra@gmail.com

Local/data de nascimento: São Paulo – Brasil
23.07.1986

Nacionalidade: Brasileira

RG: 34.356.014-8

CPF: 352.450.128-12

Estado civil: Solteiro

Idiomas: Português (materna)
Inglês (avançado)
Francês (avançado)
Alemão (avançado)
Espanhol (intermediário)

Formação acadêmica/titulação

2008 Doutorado em andamento em Bioquímica e Biologia Molecular.
Departamento de Bioquímica (conceito CAPES 7), Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

2004 - 2008 Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.
Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

2004 - 2007 Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

2001 - 2003 Ensino Médio (2º grau).
Colégio Palmares, São Paulo, Brasil

1993 - 2000 Ensino Fundamental (1º grau).
Colégio Palmares, São Paulo, Brasil

Projetos de pesquisa e bolsas

- 2008** Doutorado em andamento
Título de tese: Mecanismos moleculares envolvidos em citoproteção e transformação maligna de células-beta humanas produtoras de insulina.
Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas (UIPH), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.
Orientadora: Profa. Dra. Mari C. Sogayar
Co-Orientadora: Profa. Dra. Leticia Labriola
Bolsista CNPq.
- Jan – Jul 2012** Doutorado sanduíche
Laboratory of Experimental Medicine (LABOMEDEX), coordenado pelo Prof. Dr. Decio L. Eizirik, na faculdade de medicina da Universidade Livre de Bruxelas (ULB), Bruxelas, Bélgica.
Título: O papel dos membros da família Bcl-2 na morte de células-beta induzida por citocinas.
Orientadora: Dra. Alessandra K. Cardozo
Bolsista CAPES.
- Jan – Dez 2007** Iniciação científica
Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas (UIPH), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.
Título: Geração e Caracterização de Células Beta Humanas em Culturas de Longo Prazo.
Orientadora: Profa. Dra. Leticia Labriola
Bolsista CNPq.
- Jul 2005 – Dez 2006** Iniciação científica
Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.
Título: Análise funcional dos genes Mn1 e Dlk1 na transformação maligna induzida por poliomavírus.
Orientadora: Profa. Dra. Mari C. Sogayar
Bolsista CNPq.

Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **Terra, LF** ; Teixeira, PC ; Wailemann, RAM ; Zelanis, A; Palmisano, G ; Cunha-Neto, E ; Kalil, J ; Larsen, MR ; Labriola, L ; Sogayar, MC . Proteins Differentially Expressed in Human Beta-Cells-Enriched Pancreatic Islet Cultures and Human Insulinomas. *Submetido*.
2. Gomes, LR ; **Terra, LF** ; Wailemann, R ; Labriola, L ; Sogayar, MC . TGF- 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer*, v. 12, p. 26, 2012.
3. Gomes, LR ; **Terra, LF** ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Epithelial-Mesenchymal Transition: Implications in Cancer Progression and Metastasis. *Current Pharmaceutical Biotechnology (Print)*, v. 12, p. 1881-1890, 2011. *Gomes, LR and Terra, LF were equally contributing authors*.
4. **Terra, LF** ; Garay-Malpartida, MH ; Wailemann, R ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Recombinant Human Prolactin Promotes Human Beta Cell Survival Via Inhibition of Both Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Pathways. *Diabetologia (Berlin)*, v. 54, p. 1388-1397, 2011.
5. Labriola, L ; Peters, G ; Krogh, K ; Stigliano, I ; **Terra, LF** ; Buchanan, C ; Machado, MCC ; Joffé, E.B.K. ; Puricelli, L ; Sogayar, MC . Generation and characterization of human insulin-releasing cell lines. *BMC Cell Biology (Online)*, v. 10, p. 49, 2009.

Resumos publicados em anais de congressos

1. Wailemann, R ; **Terra, LF** ; Oliveira TC ; Santos AF ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Role of HSP 25/27 in PRL-induced cytoprotective effects on beta cells. In: Annual meeting of the EASD islet study group, 2012, Rostock. www.easd.org.
2. **Terra, LF** ; Teixeira, PC ; Wailemann, R ; Zelanis, A ; Palmisano, G ; Cunha-Neto, E ; Kalil, J ; Labriola, L ; Sogayar, MC . Proteomic approach to search for proteins differentially expressed between human pancreatic islets and human insulinomas. In: 48th EASD annual meeting, 2012, Berlin. *Diabetologia*. Berlin: Springer, 2012. v. 55. p. 172-173.
3. Wailemann, R ; **Terra, LF** ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Anti-apoptotic HSP27 and its transcription factor HSTF1 are up-regulated by prolactin in human pancreatic islets. In: 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro.
4. **Terra, LF** ; Wailemann, R ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Anti-apoptotic HSP27 and its transcription factor HSTF1 are up-regulated by Prolactin in Human Pancreatic Islets. In: 2nd joint AIDPIT and EPITA winter symposium, 2012, Igls. www.aidpit.easd.org, 2012.
5. **Terra, LF** ; Teixeira, PC ; Wailemann, R ; Zelanis, A ; Palmisano, G ; Cunha-Neto, E ; Kalil, J ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Proteomic Approach to Search for Proteins Differentially Expressed Between Human Pancreatic Islets and Human Insulinomas. In: 13th World Congress of IPITA International Pancreas and Islet Transplant Association, 2011, Prague. *The Review of Diabetic Studies*, 2011. v. 8. p. 77-224.
6. **Terra, LF** ; Teixeira, PC ; Wailemann, R ; Zelanis, A ; Palmisano, G ; Cunha-Neto, E ; Kalil, J ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Proteomic Approach to Search for Proteins Differentially Expressed Between Human Pancreatic Islets and Human Insulinomas. In: The annual meeting of the EASD islet study group, 2011, Natal. Program of the ISG 2011, 2011. p. 40-41.

7. **Terra, LF** ; Teixeira, PC ; Wailemann, R ; Zelanis, A ; Palmisano, G ; Cunha-Neto, E ; Kalil, J ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Proteomic Approach to Search for Proteins Differentially Expressed Between Human Pancreatic Islets and Human Insulinomas. In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu. Programa da XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011.
8. Gomes, LR ; **Terra, LF** ; Wailemann, R ; Labriola, L ; Sogayar, MC . TGF- α 1 Modulation Of Human Breast Cancer Cells Motility: MMPs/MMPs Inhibitors Homeostasis Controlled By MAPKs Crosstalk. In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu. Programa da XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011.
9. Gomes, LR ; **Terra, LF** ; Wailemann, R ; Labriola, L ; Sogayar, MC . TGF-beta 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMPs inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive human breast cancer cell. In: 102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2011, Orlando. 102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2011.
10. **Terra, LF** ; Garay-Malpartida, MH ; Wailemann, R ; Sogayar, MC ; Labriola, L. Cytoprotective effect of prolactin in human beta-cells. In: 20th meeting of the EASD Islet Study Group, 2010, Tällberg, Sweden. Program of the 20th meeting of the EASD Islet Study Group, 2010.
11. **Terra, LF** ; Garay-Malpartida, MH ; Mares-Guia, TR ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Recombinant Human Prolactin (rhPRL) Promotes Human Beta-cell Survival By Inhibiting Apoptosis. In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu. Programa da XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010.
12. Wailemann, R ; **Terra, LF** ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Recombinant Human Prolactin (rhPRL) Mediates Cytoprotection of Pancreatic Beta-Cells. In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu. Programa da XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010.
13. Labriola, L ; **Terra, LF** ; Garay-Malpartida, MH ; Mares-Guia, TR ; Sogayar, MC . Prolactin (rhPRL) promotes human beta-cell survival by inhibiting apoptosis. In: 2009 Joint Meeting of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA) and the International Xenotransplantation Association (IXA), 2009, Veneza. Xenotransplantation, 2009. v. 16. p. 286-329.
14. **Terra, LF** ; Wailemann, R ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Prolactin (rhPRL) mediated up-regulation of HSP27 and its transcription activation factor HSTF1 in human pancreatic islets. In: 2009 Joint Meeting of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA) and the International Xenotransplantation Association (IXA), 2009, Veneza. Xenotransplantation, 2009. v. 16. p. 286-329.
15. Labriola, L ; **Terra, LF** ; Wailemann, R ; Sogayar, MC . Prolactin mediates up-regulation of the anti-apoptotic protein (HSP27) in human pancreatic islets. In: EASD Islet Study Group Symposium, 2009, Steinschaler Doerfl. EASD Islet Study Group Symposium Abstracts, 2009.
16. **Terra, LF** ; Teixeira, PC ; Cunha-Neto, E ; Kalil, J ; Sogayar, MC ; Labriola, L . Proteomic Approach to Search for Proteins Differentially Expressed Between Human Pancreatic Islets and Human Insulinomas. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia. Programa da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009.
17. Labriola, L ; Stigliano, I ; Krogh, K ; **Terra, LF** ; Buchanan, C ; Machado, MCC ; Joffé, E.B.K. ; Puricelli, L ; Peters, G ; Sogayar, MC . Generation and characterization of human beta-cells long-term cultures. In: I

- Symposium mechanisms of insulin secretion: molecular and functional aspects, 2008, São Paulo. I Symposium mechanisms of insulin secretion: molecular and functional aspects abstracts, 2008.
18. Labriola, L ; **Terra, LF** ; Garay-Malpartida, MH ; Mares-Guia, TR ; Sogayar, MC . Recombinant human prolactin promotes human beta-cell survival through apoptosis inhibition. In: I Symposium mechanisms of insulin secretion: molecular and functional aspects, 2008, São Paulo. I Symposium mechanisms of insulin secretion: molecular and functional aspects abstracts, 2008.
 19. Labriola, L ; **Terra, LF** ; Garay-Malpartida, MH ; Mares-Guia, TR ; Sogayar, MC . Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival by inhibiting apoptosis. In: 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 2008, Roma. Diabetologia. Wurzburg: Springer, 2008. v. 51. p. S95-S96.
 20. Labriola, L ; **Terra, LF** ; Garay-Malpartida, MH ; Mares-Guia, TR ; Sogayar, MC . Recombinant human prolactin (rhPRL) promotes human beta-cell survival through apoptosis inhibition. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e XI Congress of the Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology, 2008, Águas de Lindóia. Programa da XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008.
 21. Labriola, L; Krogh, K ; **Terra, LF** ; Peters, G ; Machado, MCC ; Sogayar, MC . Geração e Caracterização de Células Beta Humanas em Culturas de Longo Prazo. In: 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2007, Ribeirão Preto. Resumos do 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2007.
 22. **Terra, LF** ; Rodrigues, LO ; Festa, F ; Sogayar, MC . Study of MN1 and Dlk1 genes in the Polyomavirus Middle-T oncoprotein induced transformation. In: XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology Conference, 2007, Salvador. Programa da XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2007.
 23. **Terra, LF** ; Rodrigues, LO ; Festa, F ; Sogayar, MC . Análise funcional dos genes MN1 e Dlk1 na transformação maligna induzida pela oncoproteína MT de Poliomavírus. In: 14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2006, Ribeirão Preto. Resumos do 14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2006.

Experiência acadêmica

Organização de cursos e monitoria

Disciplinas de pós-graduação

1. VII Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, junto ao departamento de Bioquímica da USP. 2012. Atividade: monitoria plena e aula prática de extração e quantificação de proteínas, atividade enzimática e citometria de fluxo.
2. Biologia Molecular da Transformação Maligna (QBQ5717), junto ao departamento de Bioquímica da USP, sob a orientação da Profa. Dra. Mari C. Sogayar. 2011. Atividade: aulas práticas de cariótipo e imunofluorescência.

3. Biologia Molecular da Transformação Maligna (QBQ5717), junto ao departamento de Bioquímica da USP, sob a orientação da Profa. Dra. Mari C. Sogayar. 2009. Atividade: monitoria plena e aulas práticas de cariótipo e imunofluorescência.
4. III Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, junto ao departamento de Bioquímica da USP. 2008. Atividade: monitoria plena e aula prática de imunofluorescência.
5. Biologia Molecular da Transformação Maligna (QBQ5717), junto ao departamento de Bioquímica da USP, sob a orientação da Profa. Dra. Mari C. Sogayar. 2007. Atividade: aula prática de cariótipo.

Disciplinas de graduação

1. Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo (QBQ0211), junto ao curso de graduação em Medicina da USP, sob a orientação dos Profs. Dr. Frederico Gueiros Filho, Dra. Leticia Labriola e Dr. Pedro S. de Araújo. Atividade: monitoria plena voluntária.
2. Biologia Molecular do Gene (QBQ0126), junto ao curso de graduação em Medicina Veterinária da USP, sob a orientação das Profas. Dra. Mari C. Sogayar e Dra. Daniela S. Basseres. 2010. Atividade: monitoria plena.

Disciplinas de ensino fundamental

1. A Caminho da Biotecnologia, curso teórico-prático/workshop ministrado para alunos do Ensino Fundamental II das escolas See-Saw/Panamby Bilangual School e Escola de Aplicação da USP, sob a orientação da Profa. Dra. Mari C. Sogayar. 2012. Atividade: monitoria plena.
2. A Caminho da Biotecnologia, curso teórico-prático/workshop ministrado para alunos do Ensino Fundamental II das escolas See-Saw/Panamby Bilangual School, Nossa Escola Perdizes e Escola de Aplicação da USP, sob a orientação da Profa. Dra. Mari C. Sogayar. 2010. Atividade: monitoria plena voluntária.

Orientações e supervisões

Iniciação científica

1. Rosangela Aparecida Wailemann Mansano (2008-2010). Estudo do Papel da Proteína HSP27/25 na Ação da Prolactina Humana Recombinante em células-beta pancreáticas (Supervisão). Bolsista FAPESP.

Participação em eventos

-
1. **ACS (American Chemistry Society) on Campus Events at the University of São Paulo**, 2012. São Paulo, Brasil. Ouvinte.
 2. **EASD Islet Study Group Symposium**, 2012. (Simpósio). Rostock, Alemanha. Ouvinte.
 3. **48th EASD Annual Meeting**, 2012. (Congresso). Berlin, Alemanha. Apresentação de painel.
 4. **II Congresso Institucional** realizado pelos Departamentos de Química Fundamental e Bioquímica, 2012. (Congresso). Guarujá, Brasil. Apresentação de painel.
 5. **XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2011. (Congresso). Foz do Iguaçu, Brasil. Apresentação de painel.
 6. **13th World Congress of IPITA International Pancreas and Islet Transplant Association**, 2011. (Congresso). Praga, República Tcheca. Apresentação de painel.

7. **XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2010. (Congresso). Foz do Iguaçu, Brasil. Apresentação de painel.
8. **2009 Joint Meeting of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA) and the International Xenotransplantation Association (IXA)**, 2009. (Congresso). Veneza, Itália. Apresentação oral.
9. **EASD Islet Study Group Symposium**, 2009. (Simpósio). Steinschaler Dörlf, Áustria. Apresentação de painel.
10. **XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2009. (Congresso). Foz do Iguaçu, Brasil. Apresentação de painel.
11. **XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2008. (Congresso). Foz do Iguaçu, Brasil. Apresentação de painel.
12. **11ª Semana Temática da Biologia**, 2008. São Paulo, Brasil. Ouvinte.
13. **15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, 2007. (Simpósio). Ribeirão Preto, Brasil. Apresentação de painel.
14. **XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology Conference**, 2007. (Congresso). Salvador, Brasil. Apresentação de painel.
15. **10ª Semana Temática da Biologia**, 2007. São Paulo, Brasil. Ouvinte.
16. **14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, 2007. (Simpósio). Ribeirão Preto, Brasil. Apresentação de painel.
17. **9ª Semana Temática da Biologia**, 2006. São Paulo, Brasil. Ouvinte.
18. **8ª Semana Temática da Biologia**, 2005. São Paulo, Brasil. Ouvinte.
19. **7ª Semana Temática da Biologia**, 2004. São Paulo, Brasil. Ouvinte.

Apresentação de seminários

1. Proteínas diferencialmente expressas entre culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas e culturas de insulinomas humanos. **Ciclo de Seminários Temáticos de Controle de Proliferação Celular e Origem de Neoplasias de 2012**, 2012. São Paulo, Brasil.
2. Prolactin (rhPRL) mediated up-regulation of HSP27 and its transcription activation factor HSTF1 in human pancreatic islets. **2009 Joint Meeting of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA) and the International Xenotransplantation Association (IXA)**, 2009. Veneza, Itália.
3. DIGE (Differential In-Gel Electrophoresis): princípios e aplicações. **Simpósio Conjunto de Proteoma Natura-NUCEL**, 2009. Cajamar, São Paulo.

Outros cursos

1. **Flow Citometry – Let's Hear It**. 2011. (Workshop). Life Technologies, São Paulo, Brasil. Carga horária: 8 horas.

2. **Apoptose.** 2008. (Curso de curta duração). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Carga horária: 12 horas.
3. **Primeiros Socorros.** 2008. (Oficina). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.
4. **Oncogenes.** 2008. (Curso de curta duração). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Carga horária: 12 horas.
5. **Imunoterapia de Tumores.** 2007. (Curso de curta duração). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Carga horária: 12 horas.
6. **Microscopia.** 2007. (Oficina). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.
7. **Biologia Forense.** 2006. (Curso de curta duração). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Carga horária: 8 horas.
8. **Embriologia.** 2006. (Curso de curta duração). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Carga horária: 8 horas.
9. **Terapia Celular e Tumores.** 2006. (Curso de curta duração). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Carga horária: 12 horas.
10. **Cultura Celular.** 2006. (Oficina). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.
11. **Antártica.** 2005. (Curso de curta duração). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Carga horária: 8 horas.
12. **Comportamento de Primatas.** 2005. (Curso de curta duração). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Carga horária: 8 horas.
13. **Adaptações Defensivas dos Insetos.** 2005. (Oficina). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.
14. **Introdução ao Comportamento Animal.** 2004. (Curso de curta duração). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Carga horária: 6 horas.

Artigos publicados

Generation and characterization of human insulin-releasing cell lines

Leticia Labriola^{†1}, Maria G Peters^{†2}, Karin Krogh¹, Iván Stigliano²,
Letícia F Terra^{1,3}, Cecilia Buchanan², Marcel CC Machado⁴, Elisa Bal de
Kier Joffé², Lydia Puricelli² and Mari C Sogayar*^{1,3}

Address: ¹Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, ²"Angel. H. Roffo" Institute of Oncology, Research Area, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, ³Instituto de Química, USP, São Paulo, Brasil and ⁴Cirurgia, Faculdade de Medicina, USP, São Paulo Brasil

Email: Leticia Labriola - labriola@iq.usp.br; Maria G Peters - mpeters@fmed.uba.ar; Karin Krogh - kkrogh@iq.usp.br; Iván Stigliano - ivansti@fmed.uba.ar; Letícia F Terra - leterra@iq.usp.br; Cecilia Buchanan - cbuch@fmed.uba.ar; Marcel CC Machado - cirurgiafigado@edu.usp.br; Elisa Bal de Kier Joffé - elisabal@fmed.uba.ar; Lydia Puricelli - lydiapur@fmed.uba.ar; Mari C Sogayar* - mcsoga@iq.usp.br

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 19 June 2009

Received: 21 January 2009

BMC Cell Biology 2009, 10:49 doi:10.1186/1471-2121-10-49

Accepted: 19 June 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/10/49>

© 2009 Labriola et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The in vitro culture of insulinomas provides an attractive tool to study cell proliferation and insulin synthesis and secretion. However, only a few human beta cell lines have been described, with long-term passage resulting in loss of insulin secretion. Therefore, we set out to establish and characterize human insulin-releasing cell lines.

Results: We generated ex-vivo primary cultures from two independent human insulinomas and from a human nesidioblastosis, all of which were cultured up to passage number 20. All cell lines secreted human insulin and C-peptide. These cell lines expressed neuroendocrine and islets markers, confirming the expression profile found in the biopsies. Although all beta cell lineages survived an anchorage independent culture, none of them were able to invade an extracellular matrix substrate.

Conclusion: We have established three human insulin-releasing cell lines which maintain antigenic characteristics and insulin secretion profiles of the original tumors. These cell lines represent valuable tools for the study of molecular events underlying beta cell function and dysfunction.

Background

A major obstacle in beta cell research has been the lack of a human pancreatic beta cell line that is functionally equivalent to primary normal or neoplastic beta cells because of difficulties in obtaining and culturing them for long periods of time [1,2]. Therefore, animal insulinoma cell lines are widely used to study both physiological and

pathophysiological mechanisms involved in glucose metabolism and to establish in vitro models for the beta cell damage occurring in type 1 diabetes [3-8]. Nevertheless, recent studies comparing sequences that lie upstream of, or flank the transcription start site of the insulin gene among different species, led to the conclusion that the rodent promoters are markedly different from the human

Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways

L. F. Terra · M. H. Garay-Malpartida ·
R. A. M. Wailemann · M. C. Sogayar · L. Labriola

Received: 25 October 2010 / Accepted: 4 February 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Aims/hypothesis Transplantation of pancreatic islets constitutes a promising alternative treatment for type 1 diabetes. However, it is limited by the shortage of organ donors. Previous results from our laboratory have demonstrated beneficial effects of recombinant human prolactin (rhPRL) treatment on beta cell cultures. We therefore investigated the role of rhPRL action in human beta cell survival, focusing on the molecular mechanisms involved in this process.

Methods Human pancreatic islets were isolated using an automated method. Islet cultures were pre-treated in the absence or presence of rhPRL and then subjected to serum starvation or cytokine treatment. Beta cells were labelled with Newport green and apoptosis was evaluated using flow cytometry analysis. Levels of BCL2 gene family members were studied by quantitative RT-PCR and western blot. Caspase-8, -9 and -3 activity, as well as nitric oxide production, were evaluated by fluorimetric assays.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00125-011-2102-z) contains supplementary material, which is available to authorised users.

L. F. Terra · M. H. Garay-Malpartida · R. A. M. Wailemann ·
M. C. Sogayar · L. Labriola
NUCEL, University of São Paulo,
São Paulo, Brazil

L. F. Terra · R. A. M. Wailemann · M. C. Sogayar ·
L. Labriola (✉)
Biochemistry Department, Chemistry Institute,
University of São Paulo,
Av. Prof. Lineu Prestes 748, Bloco 9 sup, Sala 964,
São Paulo 05508-900 SP, Brazil
e-mail: labriola@iq.usp.br

M. H. Garay-Malpartida
EACH, University of São Paulo,
São Paulo, Brazil

Results The proportion of apoptotic beta cells was significantly lowered in the presence of rhPRL under both cell death-induced conditions. We also demonstrated that cytoprotection may involve an increase of *BCL2/BAX* ratio, as well as inhibition of caspase-8, -9 and -3.

Conclusions/interpretation Our study provides relevant evidence for a protective effect of lactogens on human beta cell apoptosis. The results also suggest that the improvement of cell survival may involve, at least in part, inhibition of cell death pathways controlled by the BCL2 gene family members. These findings are highly relevant for improvement of the islet isolation procedure and for clinical islet transplantation.

Keywords Apoptosis · Diabetes · Human islets · Islet transplantation · Prolactin · Survival

Abbreviations

BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B cell CLL/lymphoma 2
JAK2	Janus kinase 2
rhPRL	Recombinant human prolactin
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
TNFR	TNF receptor
VDAC	Voltage-dependent anion channel

Introduction

Type 1 diabetes is an insulin-deficient condition resulting from the autoimmune destruction of pancreatic beta cells. Since the introduction of the Edmonton Protocol [1], pancreatic islet transplantation has become an attractive treatment for hyperlabile type 1 diabetic patients. However,

Epithelial-Mesenchymal Transition: Implications in Cancer Progression and Metastasis

L.R. Gomes^{1,2,#}, L.F. Terra^{1,2,#}, M.C. Sogayar^{1,2} and L. Labriola^{1,2,*}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Química –USP, São Paulo, Brasil; ²Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL)- PRP-USP, São Paulo, Brasil

Abstract: During the past few years, Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) has emerged as one of the most hot spots in clinical research. Its existence in human tumors can form the basis for explaining characteristics of cancer progression and metastasis, as well as certain cases of drug resistance and relapses after treatment. These cellular responses are tightly regulated by intracellular signaling pathways evoked by humoral factors that include growth factors, chemokines and cytokines. Indeed, several gene regulatory programs known to promote EMT during development have recently been discovered to play key roles in cancer progression. A deeper understanding of the cellular and molecular basis of these different programs should aid in both the development of better diagnosis methods, as well as of specific treatments for invasive cancer. In this review we set out to summarize recent novel insights into the molecular players underlying EMT and its relation with cancer progression and metastasis.

Keywords: Cancer, EMT, invasion, metastasis, MMP, NF- κ B, RTKs, TGF- β .

1. INTRODUCTION

Epithelial cells form straight contacts with neighboring cells by intercellular adhesion complexes in their lateral membrane. They display an apicobasal polarity and a basal membrane that separate them from adjoining tissues. The epithelium-mesenchymal transition (EMT) is a biological process that promotes consecutive changes in the epithelial cells phenotype, so that they can assume the characteristics of a mesenchymal cell [1-2].

There are several steps through which epithelial cells must undergo during EMT, that include the loss of cell-cell adhesion, inducing the loss of cell polarity; the disruption of the basal membrane and apical constriction; and acquisition of migratory and invasive properties [2-3]. The loss of E-cadherin function is considered one of the earliest steps, if not the starting point of EMT [4-6] and is nowadays considered as fundamental to the process. Many different signals have been identified as EMT inducers Fig. (1a), most of which function through the regulation of transcription factors of epithelial genes, as cytokeratins and E-cadherin [4]; some of them repress the activity of the E-cadherin promoter, such as Snail, Slug, Zeb, E47 and KLF8 [7-11]; and others repress E-cadherin transcription indirectly, such as Twist, Gooseoid, E2.2 and FoxC2 [12-14].

Epithelial cells are historically known for its phenotypic plasticity due to early studies of tissue regeneration [15], in mammals, but mostly in primates, there is little evidence for tissue regeneration except for the liver and some other

very specific situations [16]. This plasticity is mainly due to EMT and its reversible process, mesenchymal-epithelium transition (MET); and to transdifferentiation. This reversibility of the EMT process accounted for the replacement of the term “transformation” to “transition” in the term “epithelium-mesenchymal transition”.

EMTs are mechanisms for three distinct biological processes, what led some groups to divide them in three general subtypes according to the process they are involved [1, 15], which are: the dispersion of cells in embryos [1, 17], the formation of mesenchymal cells in injured tissues [18] and the initiation of invasive and metastatic behavior in epithelial cancers [19].

EMTs which are associated with implantation, embryo formation and organ development involve epithelial cells transitioning to mesenchymal cells and are responsible for gastrulation and neural crest definition, among others [1-2].

EMTs accountable for wound healing and tissue regeneration involve secondary epithelial or endothelial cells transitioning to fibroblasts [1]. The organism activates EMT, generally through inflammation, in order to recover tissue homeostasis. Such processes are known to assist in the post-ovulatory wound healing after each menstrual cycle [20]. EMT process tends to cease once inflammation is attenuated; however, sometimes they can continue to respond to an ongoing inflammation, which is the case in organ fibrosis, leading to the accumulation of myofibroblasts that secrete an excessive amount of collagen, forming fibers that compromises organ function, leading to its failure [1-2].

The involvement of EMT in cancer progression and metastasis, which is a process of tumor cell spread is named metastasis and it is characterized by a complex multistep cascade of events [21], has been vastly debated, mostly because of clinical observations which showed that several

*Address correspondence to this author at the Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL), Av. Prof. Lineu Prestes 748, bloco 9 sup., sala 964., (05508-900) São Paulo, SP- Brasil; Tel: /Fax: +55-11-3091-3820; E-mail: labriola@iq.usp.br

#Equally contributing authors

RESEARCH ARTICLE

Open Access

TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells

Luciana R Gomes, Leticia F Terra, Rosângela AM Wailemann, Leticia Labriola and Mari C Sogayar*

Abstract

Background: Metastasis is the main factor responsible for death in breast cancer patients. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors, known as tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), and the membrane-associated MMP inhibitor (RECK), are essential for the metastatic process. We have previously shown a positive correlation between MMPs and their inhibitors expression during breast cancer progression; however, the molecular mechanisms underlying this coordinate regulation remain unknown. In this report, we investigated whether TGF- β 1 could be a common regulator for MMPs, TIMPs and RECK in human breast cancer cell models.

Methods: The mRNA expression levels of TGF- β isoforms and their receptors were analyzed by qRT-PCR in a panel of five human breast cancer cell lines displaying different degrees of invasiveness and metastatic potential. The highly invasive MDA-MB-231 cell line was treated with different concentrations of recombinant TGF- β 1 and also with pharmacological inhibitors of p38 MAPK and ERK1/2. The migratory and invasive potential of these treated cells were examined in vitro by transwell assays.

Results: In general, TGF- β 2, T β RI and T β RII are over-expressed in more aggressive cells, except for T β RI, which was also highly expressed in ZR-75-1 cells. In addition, TGF- β 1-treated MDA-MB-231 cells presented significantly increased mRNA expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-2 and RECK. TGF- β 1 also increased TIMP-2, MMP-2 and MMP-9 protein levels but downregulated RECK expression. Furthermore, we analyzed the involvement of p38 MAPK and ERK1/2, representing two well established Smad-independent pathways, in the proposed mechanism. Inhibition of p38MAPK blocked TGF- β 1-increased mRNA expression of all MMPs and MMP inhibitors analyzed, and prevented TGF- β 1 upregulation of TIMP-2 and MMP-2 proteins. Moreover, ERK1/2 inhibition increased RECK and prevented the TGF- β 1 induction of pro-MMP-9 and TIMP-2 proteins. TGF- β 1-enhanced migration and invasion capacities were blocked by p38MAPK, ERK1/2 and MMP inhibitors.

Conclusion: Altogether, our results support that TGF- β 1 modulates the mRNA and protein levels of MMPs (MMP-2 and MMP-9) as much as their inhibitors (TIMP-2 and RECK). Therefore, this cytokine plays a crucial role in breast cancer progression by modulating key elements of ECM homeostasis control. Thus, although the complexity of this signaling network, TGF- β 1 still remains a promising target for breast cancer treatment.

Background

Breast cancer is a worldwide health problem for women, since it is the first in incidence and the second in mortality among cancer types [1]. Similarly to the majority of solid tumors, the main death factor attributed to breast cancer is the process of cell spreading

(metastasis) from primary tumor to secondary sites [2]. The metastatic process involves a complex cascade of events, including the organized breakdown of the extracellular matrix (ECM) [3-5]. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific inhibitors, known as tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) and the membrane-associated MMP inhibitor (RECK), are essential regulators of ECM degradation [6-9].

The MMPs constitute a large family of endopeptidases, which are responsible for degrading almost all

* Correspondence: mcsoga@iq.usp.br
Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, NUCEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular), Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-000, SP, Brazil

Differentially Expressed Proteins in Human Beta-Cell-Enriched Pancreatic Islet Cultures and Human Insulinomas.

Leticia F. Terra¹, Priscila C. Teixeira ², Rosangela A. M. Wailemann ¹, André Zelanis ³, Giuseppe Palmisano ^{4,5}, Edecio Cunha-Neto ², Jorge Kalil ², Martin R. Larsen ⁴, Leticia Labriola ^{#1} and Mari C.Sogayar ^{# 1,6}

¹ Instituto de Química, Departamento de Bioquímica – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil

² Instituto do Coração, Faculdade de Medicina – USP, São Paulo, Brasil

³ Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (CAT/CEPID) - Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

⁴ Biochemistry and Molecular Biology Department – University of Southern Denmark, Odense, Denmark

⁵ Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia – USP, São Paulo, Brasil

⁶ Núcleo de Terapia Celular e Molecular - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

To whom correspondence should be addressed:

Mari C. Sogayar, PhD:

mcsoga@iq.usp.br

Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo

Av. Prof. Lineu Prestes 748, bloco 9 sup., sala 964.

(05508-900) São Paulo, SP- Brasil

Phone/fax: +55-11-3091-3820

Leticia Labriola, PhD:

labriola@iq.usp.br

Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo

Av. Prof. Lineu Prestes 748, bloco 9 inf., sala 908.

(05508-900) São Paulo, SP- Brasil

Phone/fax: +55-11-3091-2039

Running title: Novel proteins in human islets and human insulinomas

Keywords: islets; insulinomas; Mass Spectrometry; Diabetes; Cell death; Hormones;

Summary

In view of the great demand for human beta-cells for physiological and medical studies, we generated cell lines derived from human insulinomas which secrete insulin, C-peptide and express islet markers. In this study, we set out to characterize their proteomes, comparing them to those of primary beta-cells using DIGE followed by MS. Proteins upregulated in human islets, like Caldesmon, are involved in cell contractility regulation, adhesion dependent signaling, and cytoskeletal organization. In contrast, almost all proteins upregulated in insulinoma cells, like MAGE2, were first described here and are related to cell survival and resistance to chemotherapy. Our data provides, for the first time, a snapshot of protein levels changes involved in key processes which could be correlated with the altered phenotype of human beta-cells. Collectively our observations prompt research towards establishing bioengineered human beta-cells providing a needed source of cultured human beta-cells for research and characterization and treatment of insulinomas.

Keywords: islets ; insulinomas; cell survival; hormones; Diabetes; Individualised medicine; cell death