# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

# ROSANGELA APARECIDA WAILEMANN MANSANO

# Mecanismos Moleculares Mediadores da Citoproteção de Células Beta Pancreáticas Induzidos por Prolactina.

Versão Original da Tese Corrigida conforme Resolução CoPGr 5890.

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP.

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

20/09/2018

# ROSANGELA APARECIDA WAILEMANN MANSANO

Mecanismos Moleculares Mediadores da Citoproteção de Células Beta Pancreáticas Induzidos por Prolactina.

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

Orientadora: Profa. Dra. Leticia Labriola

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

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

```
Wailemann, Rosangela Aparecida Mansano

Mecanismos Moleculares Mediadores da Citoproteção
de Células Beta Pancreáticas Induzidos por
Prolactina. / Rosangela Aparecida Mansano
Wailemann. - São Paulo, 2018.

227 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.
Orientador: Labriola, Leticia

1. Diabetes. 2. Prolactina. 3. Ilhotas de
Langerhans. 4. Apoptose. 5. Proteínas de Choque
Térmico. I. T. II. Labriola, Leticia , orientador.
```

Aos meus pais, sem os quais nada disto seria possível.

Aos meus filhos, por todo amor e confiança.

À Maria Eduarda que trouxe sorrisos e gratidão.

#### **AGRADECIMENTOS**

Escolhi uma área competitiva, encontrei jovens brilhantes, tudo que fiz teve paixão envolvida, fui profundamente feliz, mesmo que meus cabelos estejam mais brancos. Foram 14 anos de profundas mudanças em minha vida. Amadureci, briguei comigo mesma, casei dois filhos, separei, namorei, sou vó, fiz amigos, resgatei amigos... ai se não fosse a família e os amigos. Depois de 42 anos, duas graduações, um mestrado e agora doutorado...

#### Agradecer e só agradecer!

Agradecer Prof Dr Leticia Labriola #rainha é um prazer, pois ela foi mais que orientadora. Conseguiu conduzir meu crescimento intelectual, me direcionar, me estimular, sem nunca sugerir que eu perdesse meus alicerces. Acima de tudo, obrigada por confiar em mim, mesmo em momentos tão especiais como o agora. Pessoas como você fazem muita falta em nosso mundo acadêmico e eu sou priveligiada por ser sua aluna...

Agradecer Letícia Ferreira Terra #brilhante... dividimos autorias, espaço, reagentes, protocolos, medos, sorrisos, conquistas, viagens e muita história...mesmo os caminhos bifurcando, acho que nossa vida ainda se cruzará por aí... obrigada por sua generosidade em compartilhar muito mais que experimentos...

Agradecer Ancély Ferreira dos Santos #farol... você é minha inspiração concreta, aquela que arregaça as mangas e rompe barreiras sem ser uma super mulher de quadrinhos... acompanhando sua trajetória percebo que é possível fazer ciência de qualidade sendo humana. Quando tudo escurece, o brilho do farol avisa que existe um caminho.

Agradecer a Talita Cristina Oliveira pelas longas horas de "pescaria"... eu sei e você sabe o quanto foram importantes para a obtenção de resultados incríveis tanto no meu, como no seu projeto. Você tem um

conhecimento absurdo dentro de você que precisa ser compartilhado, seja através de uma canção nova de ninar, seja em uma sala lotada de pesquisadores.

Agradecer aos Mestres Vinícius, Raquel e Fábio e aos alunos Augusto e Liliane...cada um do seu jeito me instigam à superação, quando torcem pelos resultados do western blot, contam as suas histórias de vida, rezam, dividem o trabalho, dão trabalho, atingem objetivos, e ouvem sem reclamar "Não está sendo fácil"!!!

Agradecer à Sandra e Viviane que com tanta dedicação cuidam da retaguarda do lab, tentando sempre com rapidez resolver nossos problemas de cada dia... sem vocês tudo ficaria muito mais difícil para nós.

Agradecer à Concha (Dras. Maria Fernanda Forni, Marluce da Cunha Mantovani, Raquel Cruz, Ana Cristina Lopes Barbosa, Erika Molina, Marina Trombetta)... um grupo inusitado de amigas que se suportam científica e pessoalmente, independente da hora, da distância, do trabalho, dos amores... Concha não porque nos fechamos em nós mesmas, mas porque mesmo suportando as marés, conseguimos juntas trazer a tona jóias.

Agradecer às Dras. Fernanda Marques Câmara Sodré e Mayara Klimuk Uchiyama, sempre amigas... obrigada por acreditarem sempre, sempre, sempre...mesmo quando eu não acredito. Só não posso deixar de dizer que sinto muito a falta de vocês, não tem melhor papo nerd do que o nosso!!!

Agradecer a oportunidade de compartilhar tantos momentos únicos, seja nas salas de aula, nas bancadas, nos refeitórios e congressos com pessoas que contribuíram para quem sou hoje... Obrigada pessoal da EACH, do CM, LBCM, IUPH e Nucel.

Agradecer aos muitos professores que não se cansaram de responder minhas questões, e olha que sempre foram muitas... e aos que

gentilmente abriram espaço em seus laboratórios, contribuindo assim para a realização deste trabalho...em especial aos Profs. Drs. Mari Cleide Sogayar, Lucile Maria Floeter-Winter, Bettina Malnic, Flávia C. Meotti, Alícia J. Kowaltoswski, Maurício da Silva Baptista, Pio Colepicolo Neto, Alexandre Bruni Cardoso, Giuseppe Palmisano, Dr Alvaro Elorza Godoy, Andrè-Patrick Arrigo, Stephan Lortz, Fernando R. M. Abdulkader, Walter Ribeiro Terra, Alexander Henning Ulrich, Daniela Sanchez Bassères.

Agradecer aos meus amigos da "Feijuca em Indaiatuba"... espalhados pelo Brasil, mas a um toque do celular param tudo para compartilharem as alegrias, como tenho certeza estarem fazendo com esta minha conquista e param tudo para se irmanarem nas dores de cada dia... amigos de 40 anos...amigos!

Agradecer minhas irmãs de coração Luciane, Luiza e Cida por tantas horas de comunhão...

Agradecer minha família... como é difícil traduzir em palavras o que sinto... é uma mistura de gratidão imensa por me apoiarem nas horas de nervoso, nos dias de afastamento, nos meses sem bolsa... é uma mistura de medo da perda e certeza de infinito...é um amor que transborda e se manifesta na forma de preocupação, de dedicação, de exemplo, de aprendizagem todos os dias... agradecer é pouco ao meu paizinho Wilson Edir Wailemann, à minha mãezinha Antonia Ventura Wailemann, minha irmã Denise Wailemann Okumura e meu cunhado Osamu Okumura, meus amados filhos Thaís Cristina Wailemann Mansano, Tainan Wailemann Mansano e Flávia Wailemann Okumura, e meus queridos Eduardo Jerônimo e Thamiris Cristiane Fico Mansano, minha pequenina neta Maria Eduarda Mansano Jerônimo e o nosso novo bebezinho que está chegando.

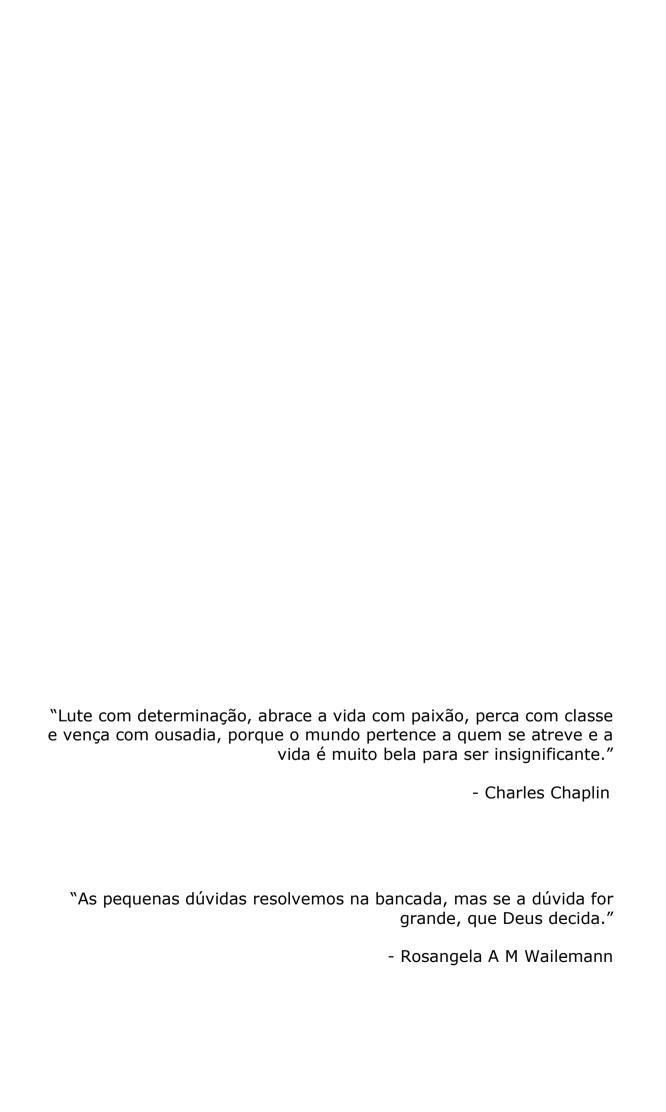
Agradecer a todos da minha família, por que se juntar dá pra lá de 100...Tem grupo "Ano Novo da Família" e "Família unida para

sempre" e mais os que não gostam de grupos (rsrs)... sinto o amor de vocês em cada sorriso, abraço e mensagem...obrigada por torcerem tanto pelo meu sucesso...amo vocês...

Agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para eu me tornar quem sou... aqueles que passaram rápido e os que ficaram, aqueles que são vizinhos, aqueles que me cuidam, aqueles parceiros de cada coisa, aquele que chegou de mansinho e se tornou um presente.

Agradecer aos pacientes e doadores que permitiram que este estudo fosse realizado.

Agradecer às agências financiadoras FAPESP (projeto 2014/2745-6), CAPES e CNPq, sem as quais seria impossível fazer ciência de qualidade neste país.



#### **RESUMO**

Wailemann, R.A.M **Mecanismos Moleculares Mediadores da Citoproteção de Células Beta Pancreáticas Induzidos por Prolactina.** 2018. 227p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A manutenção da célula de ilhotas in vitro aparece como uma estratégia atraente para aumentar o resultado do transplante de ilhotas pancreáticas. Entretanto, o destino das ilhotas em cultura é determinado pelo equilíbrio entre mediadores pró e antiapoptóticos. Nós mostramos anteriormente que os níveis de HSPB1 são aumentados pela prolactina (PRL) tanto nas células beta pancreáticas humanas quanto nas células de insulinoma murino MIN6. Além disso, mostramos que os efeitos prósobrevivência induzidos pela prolactina nas células beta pancreáticas são mediados pela HSPB1. Uma vez que o papel da HSPB1 nas células beta não foi estudado diretamente, procuramos explorar os mecanismos moleculares pelos quais a HSPB1 medeia a citoproteção da célula beta induzida pela PRL.

Para isso, células MIN6 derivadas de um insulinoma de camundongo e cultura primária de ilhotas pancreáticas murinas (I), silenciadas ou superexpressando HSPB1 foram submetidas à privação de soro e então prétratadas na presença ou na ausência de PRL (300 ng / mL) e expostos a ou citocinas (IL-1β (0,8 ng / mL), IFN-γ (4 ng / mL) e TNF-α (8 ng / mL) por 16 ou 24 h. Após esses períodos de tempo foi avaliada a viabilidade celular. De fato, as células silenciadas para HSPB1 tiveram maiores porcentagens de morte celular em comparação aos controles. No entanto, a superexpressão de HSPB1 sozinha imita os efeitos citoprotectores da Prolactina em ambas as células MIN6 e nas culturas primárias das ilhotas. Estes resultados mostram o papel fundamental da HSPB1 no efeito citoprotetor inibindo a apoptose inducida pelo tratamento com citocinas pró-inflamatórias.

Além disso, os lisados de células Min6 tratadas com citocinas na presença ou na ausência de PRL durante 6 h foram sujeitos a imunoprecipitação de HSPB1. Proteínas coimmunoprecipitadas separadas

por SDS-PAGE e posteriormente identificadas por nano-HPLC acoplado à espectrometria de massas. Células pré-tratadas com PRL apresentaram um enriquecimento de proteínas que coprescipitaram com HSPB1 relacionadas em processos de resistência ao estresse oxidativo, degradação proteica e metabolismo de carboidratos.

Células MIN6, silenciadas ou superexpressando HSPB1 foram expostas á menadiona e peróxido de hidrogênio e parâmetros oxidativos foram analisados. O silenciamento de HSPB1 promoveu células mais sensíveis ao estresse oxidativo e levou a uma redução da capacidade antioxidante, enquanto que prolactina induziu citoproteção mediada por HSPB1 contra o estresse oxidativo. A superexpressão de HSPB1, no entanto, levou a efeitos opostos. O tratamento com PRL, o silenciamento ou superexpressão de HSPB1 não mudou a expressão de enzimas antioxidantes, mas os níveis proteicos de HSPB1 estão relacionados com a modulação da razão GSH/GSSG e a atividade de G6PD.

Dado de estudos recentes reportam que o perfil respiratório das ilhotas prévias ao transplante pode predizer seu desempenho e que não se sabe nada sobre se a PRL poderia modular a função mitocondrial nas células beta; no presente projeto foi investigado se o tratamento hormonal poderia aumentar a eficiência mitocondrial das células beta. Observamos que o tratamento com citocinas pró-inflamatórias produziu uma diminuição na eficiência do consumo de oxigênio mitocondrial estar relacionado à síntese de ATP. Esses resultados foram significativamente revertidos a valores similares ao obtidos nas células submetidas Às condições de máxima viabilidade após o tratamento com PRL. Além disso, os resultados mostraram que os níveis elevados de HSPB1 medeiam este efeito, uma vez que a falta desta proteína anulou significativamente a recuperação da função mitocondrial induzida pelo tratamento hormonal.

Visto que as taxas de síntese de ATP mitocondrial são as responsáveis pela elevação na sua concentração intracelular e que esse evento está diretamente relacionado com a secreção de insulina nas células beta, analisamos se diferentes níveis proteicos de HSPB1 poderia modificar a função secretora de células beta. Para isso foram calculados os índices de estímulo da secreção de insulina em resposta ao aumento da concentração

de glicose no meio de cultura tanto em células parentais MIN6 como em culturas primárias de ilhotas pancreáticas murinas que foram submetidas ou não ao silenciamento ou superexpressão de HSPB1. Nossos resultados mostraram que nem a presença de citocinas, Prolactina, ou a ausência ou superexpressão de HSPB1 nas culturas celulares analisadas apresentaram diferença significativa em relação aos índices de estímulo da secreção e conteúdo de insulina. Esses resultados sugerem que nem a falta, nem a superexpressão de HSPB1 poderia alterar a função de célula beta.

Nós mostramos a relevância da HSPB1 em ambos os efeitos prósobrevivência da PRL contra a morte da célula beta induzida tanto por citocinas quanto por indução de estresse oxidativo. Este último efeito poderia também estar relacionado com a participação da HSPB1 na recuperação da função mitocondrial observada após o tratamento hormonal corroborando assim parte dos resultados obtidos nos experimentos de immunoprecipitação.

Finalmente, nossos resultados destacam a importância de mais estudos visando um entendimento mais profundo das funções da HSPB1 nas células beta, uma vez que elas poderiam levar à mitigação da morte da célula beta através da regulação positiva de uma via de proteção endógena, que não é dependente da modulação do sistema imunológico.

**Palavras Chaves:** Diabetes *mellitus* Tipo 1, Transplante de Ilhotas Pancreáticas, Apoptose, Proteina de Choque Térmico B1 (HSPB1), Prolactina.

#### **ABSTRACT**

Wailemann, R.A.M. Role of HSPB1 in PRL-induced cytoprotective effects on beta cells. 2018. 227p. Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The success of islet transplantation has improved lately. Unfortunately, it is still compromised by cell loss. Maintaining islet cell in vitro appears as an attractive strategy to increase the outcome of pancreatic transplantation. However, islet fate in culture is determined by the balance between pro- and anti- apoptotic mediators. We have previously shown that Heat Shock Protein B1 (HSPB1) levels are increased by prolactin (PRL) on both human pancreatic beta cells and MIN6 murine insulinoma cells. Furthermore, we have demonstrated the prolactin-induced pro-survival effects on pancreatic beta-cells are mediated by HSPB1. Since HSPB1 role in beta cells has not been directly studied, we set out to explore the molecular HSPB1 mechanisms by which mediates PRL-induced beta cell cytoprotection.

For this purpose, MIN6 insulinoma mouse cells and primary culture of murine pancreatic islets (I) wild type, HSPB1 silenced or overexpressing the chaperone were subjected to serum starvation and then pre-treated in the presence or in the absence of PRL (300 ng/mL) and exposed to or cytokines (IL-1 $\beta$  (0,8 ng/mL), IFN- $\gamma$  (4 ng/mL) and TNF- $\alpha$  (8 ng/mL)) for 16 or 24h. Then, we analyse cell viability. HSPB1silenced cells presented higher percentages of cell death compared to controls. However, the overexpression of HSPB1, independently of hormonal treatment, was able mimic the cytoprotective effects of Prolactin. These results point at the key role of HSPB1 in the cytoprotective effect against proinflammatory cytokines-induced beta cell death.

In addition, lysates from Min6 cells incubated for 6 hours in the presence of a cocktail of cytokines and/or PRL were subjected to HSPB1 immunoprecipitation. Co-precipitated proteins were identified by SDS-PAGE coupled to mass spectrometry. We found an enrichment of proteins related

to signaling pathways involved in a response against oxidative and endoplasmic reticulum stress induction. Moreover, we also identified anti-apoptotic effects and carbohydrate metabolism related proteins. Indeed, HSPB1 knockdown rendered cells more sensitive to oxidative stress and led to a reduced antioxidant capacity, while prolactin induced an HSPB1-mediated cytoprotection against ROS induced beta-cell apoptosis. One again, HSPB1 overexpression mimic PRL- induced cytoprotection. While hormonal treatment, HSPB1 silencing or overexpression did not change the expression of antioxidant enzymes; this conditions influenced reduced glutathione cell content and G6DP activity.

Since recent studies have pointed that islets respiratory profile prior to transplantation may predict their performance; we also investigated whether PRL treatment could increase beta-cell mitochondrial efficiency. We observed a cytokine-induced increase of mitochondrial oxygen consumption rate not related to ATP synthesis, which was significantly decreased upon PRL treatment. HSPB1 was a key mediator of this effect since the lack of this protein significantly abrogated PRL-induced mitochondrial function recovery.

The secretory function was then analysed in wild type MIN6 cells as well as in primary cultures of pancreatic islets either HSPB1 silenced or overexpressing the chaperone. Cells were subjected to serum starvation and then pre-treated in the presence or in the absence of PRL and exposed to cytokines for 16 or 24h. We didn't found significant differences in both glucose induced-insulin secretion and insulin content between the hormonal treatment, HSPB1 silencing or overexpression. These results suggest that neither lack, nor overexpression of HSPB1 could alter beta cell function.

Altogether our results have shown the importance of HSPB1 on PRL prosurvival effects as well as on maintenance of mitochondrial efficiency against both cytokine treatment and oxidative-stress-induced beta cell damage. These results are in accordance with the PRL-induced enrichment of HSPB1 interacting proteins displaying functions related to protein degradation, oxidative stress protection or mitochondrial carbohydrate metabolism. Finally, our results outline the importance of further studies aiming at a deeper understanding of HSPB1 functions on beta cells, since they could lead to the mitigation of beta cell death through the up-regulation of an endogenous protective pathway, which is not dependent on the modulation of the immune system.

**Key Words:** Diabetes mellitus Type 1, Pancreatic Islet Transplantation, Apoptosis, B1 Thermal Shock Protein (HSPB1), Prolactin.

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg *Micrograma* 

μL *Microlitro* 

μM Micromolar μm Micrômetro

% porcentagem

°C graus Celsius

aa Aminoácido

Ac-DEVD-AFC Substrato para Caspase 3 - Ácido acetil-L-

aspartil-L-glutamil-L-valil-L-aspártico a-(4-metil-

coumaril-7-amido)

ADA American Diabetes Association

ADP Adenosina difosfato

APAF1 Apoptotic Peptidase Activating Factor-1

ATP Adenosina trifosfato

BAD BCL-2-associated death promoter

BAK BCL2 homologous antagonist/killer

BAX BCL2 associated X protein

BCL2 B-cell lymphoma 2

BCLXL BCL extra large

BH3 BCL2 Homology Domains 3

BID BH3 interacting domain death agonist

BOK Bcl-2 related ovarian killer

BSA Bovine Serum Albumine

Caspase Cysteine-dependent aspartate-specific proteases

Cit Cytokine, Citocinas

CCK Cholecystokinin

CCCP Carbonylcyanide-3-chlorophenylhydra-zone

CD4 Cluster of Differentation 4

CD8 Cluster of Differentation 8

cDNA Complementary DNA

CEP-HU Local Institutional Ethics Committee

CHOP Cytosine Cytosine Adenosine Adenosine

Thymidine Enhancer Binding Protein (C/EBP)

Homologous Protein

cIAP cellular IAP

cm<sup>2</sup> Centímetro quadrado

Crtl Control, controle

DEX Dexamethasone

DIABLO Direct IAP-Binding Protein with Low pI

DISC Death-Inducing Signaling Complex

DM Diabetes mellitus

DM1 Diabetes mellitus tipo 1

DM2 Diabetes mellitus tipo 2

DMEM Dubelcco's Modified Eagle Médium

DMG Gestational Diabetes mellitus

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Deoxyribonucleic acid

DTT DL-Dithiothreitol

EDTA Ethylenediamine tetraacetic acid

EGTA Ethylene glycol tetraacetic acid

EPM Mean standard error

ERK1 Extracellular signal-Regulated kinase1

ERK2 Extracellular signal-Regulated kinase2

FADD Fas-Associated Death Domain

G-6-P Glicose-6-Fosfato

G6PD Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

GAPDH Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

GFP Green Fluorescent Protein

GH Growth Hormone

GLUT1 Glucose Transporter 1

GLUT2 Glucose Transporter 2

GLUT3 Glucose Transporter 3

GLUT4 Glucose Transporter 4

H Hora

HbA1c Glycated Hemoglobin

HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic

acid

HEK293 Human Embryonic Kidney 293 cells

HO Hoescht 33342

HPRT Hipoxanthine Phosphoribosyl Transferase

HMBS Hydroxymethylbilane synthase

HRP Horseradish peroxidase

HSP Heat Shock Protein

HSPB1 Heat Shock Protein Beta 1

HSTF1 Heat shock transcription factor 1

IAP Inhibitor of Apoptosis

IDF International Diabetes Federation

IEQ Islet equivelent

IFNγ Interferon-y

IL1β Interleukin -1β

INS-1 Linhagem de célula beta pancreática derivada de

um insulinoma de rato

IP3 Inositol trisphosphate

IRS Insulin Receptor Substrate

JAK2 Janus Kinase 2

JNK c-Jun N-terminal kinase

KDa quilodalton

L Litro

mA *Miliampere* 

MAPK Mitogen-activated protein kinases

MB-PDT Methylene blue photodynamic therapy

Min Minuto

MIN6 Linhagem de célula beta pancreática derivada de

um insulinoma murino

Mg Miligrama

mL *Mililitro* 

mM Milimolar

Mmol Milimol

MODY Maturity Onset Diabetes Young

MOM Mitochondrial outer membrane

MOMP Mitochondrial outer membrane permeabilization

MPT Mitochondrial permeability transition

mRNA RNA mensageiro

NF-kB Nuclear Factor kappa B

Ng Nanograma

NG Newport Green

nM Nanomolar

NO Nitric Oxide

NOD Non-obese diabetic

OCR Oxygen consumption rates

OL Oligomicina

OMS Organização Mundial de Saúde

PBS Phosphate buffered saline

PCR Polymerase Chain Reaction

PI Propidium Iodide

PI3K Phosphatidylinositol 3-kinase

PM Peso molecular

PP Pancreatic polypeptide

PRL Prolactin, Prolactina

PRLR Prolactin Receptor

PVDF Polyvinylidene difluoride

RE Retículo Endoplasmático

RNA Ribonucleic acid

RNAi RNA interference

rhPRL Recombinant Human Prolactin

ROS Reactive oxygen species.

RPMI Roswell Park Memorial Institute medium.

RRP Readily Releasable Pool

RT-PCR Reverse Transciptase Polimerase Chain Reation

s segundo

SBD Sopciedade Brasileira de Diabetes

scA Scramble A

scC Scramble C

SDS Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel

Electrophoresis

SFB Bovine Fetal Serum

shRNA short hairpin RNA

siRNA Small Interfering RNA

SMAC Second Mitochondria-derived Activator of Caspase

SNARE <u>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive</u>

factor attachment receptor

STAT1 Signal Transducer and Activator of Transcription-1

STAT3 Signal Transducer and Activator of Transcription-3

STAT5 Signal Transducer and Activator of Transcription-5

STZ Estreptozotocina

Tag Tapsigargina

tBID truncated BID

TNFa Tumor Necrosis Factor a

TNFR TNF Receptor

TRADD TNFR-Associated Death Domain

UA Unidades arbritárias

UPR Unfolded Protein Response

WB Western Blot

W Watt

WHO World Health Organization

XIAP X-linked IAP

### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Representação esquemática da anatomia pancreática 32				
Figura 2. Arquitetura de Ilhotas Pancreáticas 35				
Figura 3. Estrutura da insulina e mecanismo bifásico de secreção de insulina				
estimulada por glicose (GSIS)				
Figura 4. Ativação do receptor de insulina promove efeitos pleiotrópicos 40				
Figura 5. Diabetes mellitus				
Figura 6. Destruição de Células Beta Pancreáticas 46				
Figura 7. Modelo de Desenvolvimento de DM1				
Figura 8. Representação esquemática do transplante de ilhotas				
pancreáticas50				
Figura 9. Esquema dos principais tipos de morte celular 52				
Figura 10. Aspectos morfológicos da apoptose 54				
Figura 11. Via Intrinseca de Apoptose 56				
Figura 12. Mecanismos moleculares envolvidos na morte por apoptose $59$				
Figura 13. Fosforilação Oxidativa 60				
Figura 14. Esquema das reações e enzimas envolvidas no processo				
antioxidante celular 62				
Figura 15. Distribuição tecidual do receptor de prolactina				
Figura 16. Representação esquemática da ativação do receptor de PRL $65$				
Figura 17. Representação esquemática de estruturas de HSP27 (HSPB1),				
HSP22 (HSPB8) e aB-cristalina (HSPB5)69				
Figura 18. Níveis protéicos de HSPB1				
Figura 19. HSPB1 é um mediador do efeito citoprotetor da rhPRL em células				
MIN6				
Figura 20. HSPB1 é um mediador essencial da ação da PRL na inibição da				
apoptose de culturas primárias de ilhotas pancreáticas murinas101				
Figura 21. Confirmação da superexpressão de HSPB1102				
Figura 22. Superexpressão de HSPB1 mimetiza os efeitos citoprotetores da				
PRL				
Figura 23. Células que superexpressam HSPB1 são mais resistentes à morte				
induzida por citocinas pró-inflamatórias105				
Figura 24. Confirmação da superexpressão de HSPB1106				

Figura 25. Superexpressão de HSPB1 mimetiza os efeitos de PRL na		
citoproteção		
Figura 26. Receptor de prolactina (PRL-R) é expresso em células beta		
humanas e murinas109		
Figura 27. Ativação da expressão de HSF1 e HSPB1 após tratamento com		
PRL		
Figura 28. Imunoprecipitação de HSPB1 e Diagrama de Venn mostrando a		
distribuição do total de proteínas coprecipitadas com HSPB1113		
Figura 29. Diagrama interação das proteínas totais de células MIN6		
coprecipitadas com HSPB1114		
Figura 30. Diagrama interação das proteínas de células MIN6 coprecipitadas		
com HSPB1, após tratamento com citocinas e mantidas na presença de PRL.		
115		
Figura 31. Diagrama da interação das proteínas coprecipitadas com HSPB1		
a partir de células MIN6 tratadas com citocinas e mantidas na ausência de		
PRL		
Figura 32. Validação dos resultados do interactoma de HSPB1130		
Figura 33. Células MIN6 silenciadas para HSPB1 são mais sensíveis à		
toxicidade induzida por estresse oxidativo		
Figura 34. HSPB1 é um mediador da ação da Prolactina na inibição da		
morte de células MIN6 induzida menadiona		
Figura 35. HSPB1 tem maior capacidade de inibir a morte induzida por		
aumento de estresse oxidativo na mitocôndria do que no citosol134		
Figura 36. HSPB1 participa na modulação do equilíbrio redox celular em		
direção a um status de menor geração de ROS136		
Figura 37. A superexpressão de HSPB1 inibiu a morte de células beta e		
aumentou a sua resposta antioxidante frente ao estresse induzido por		
menadiona ou $H_2O_2$		
Figura 38. O tratamento com PRL, silenciamento ou superexpressão de		
HSPB1 não alterou a expressão de enzimas antioxidantes140		
Figura 39. A expressão de HSPB1 influencia o estado de oxidação da		
glutationa em células MIN6142		
Figura 40. Esquema dos experimentos de medição de consumo de oxigênio		
nas células MIN6143		

Figura 41. Desenho experimental para a medição da eficiência do
acoplamento da respiração mitocondrial145
Figura 42. HSPB1 é essencial para a prevenção da diminuição dos níveis de
desacoplamento devidos ao stress pela exposição a citocinas pró-
inflamatórias em células beta induzido por rhPRL146
Figura 43. HSPB1 tem um papel fundamental na recuperação da respiração
mitocondrial máxima induzida por PRL148
Figura 44. PRL poderia estar também envolvida em promover o resgate do
potencial de membrana mitocondrial diminuído pelo tratamento com
citocinas
Figura 45. Perfil de resposta secretória de Células Min6
Figura 46. Conteúdo intracelular de insulina em células MIN6154
Figura 47. Perfil de resposta secretória de Cultura Primária de Ilhotas
Pancreáticas Murinas
Figura 48. Conteúdo intracelular de insulina em culturas primárias de
Ilhotas pancreáticas murinas156
Figura 49. Mecanismo proposto da indução de HSPB1 por PRL e suas
consequências na citoproteção de células beta163
Figura 50. Modelo do papel da inibição específica do complexo II para
indução de apoptose por vários compostos pró-apoptóticos167

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição celular das Ilhotas Pancreáticas, hormônios			
secretados pelo pâncreas endócrino e suas funções			
Tabela 2. Efeitos da insulina no metabolismo de carboidratos, lipídios e			
proteínas			
Tabela 3. Dados dos doadores de Ilhotas Humanos			
Tabela 4. Lista de anticorpos primários utilizados para detecção dos níveis			
de proteínas por Western blot (WB)84			
Tabela 5. Lista de gene e controles investigados por qRTPCR 85			
Tabela 6. Proteínas identificadas por EM118			
Tabela 7. Processos biológicos em que as proteínas identificadas interagindo			
com HSPB1 estão envolvidas127			

# **SUMÁRIO**

1-INTRODUÇÃO	32
1.1-Pâncreas	32
1.1.1 Ilhotas Pancreáticas	34
1.1.2-Insulina	36
1.2-Diabetes <i>mellitus</i>	42
1.2.1 – Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	45
1.3-Transplante de ilhotas Pancreáticas	48
1.4-Morte celular	51
1.4.1-Apoptose	53
1.5- A função mitocondrial na células beta	59
1.6. Estresse Oxidativo e viabilidade de células beta	61
1.7-Prolactina e o seu papel nas células beta	63
1.8-Heat Shock Proteins	67
1.8.1- Small Heat Shock Protein (sHSP ou HSPB)	68
1.8.2- Heat Shock Protein B1 (HSPB1)	69
2- OBJETIVO GERAL	74
2.1-Estratégias	74
3-MATERIAIS E MÉTODOS	76
3.1-Culturas celulares	76
3.1.1-Isolamento e Manutenção de Ilhotas Humanas	76
3.1.2-Culturas primárias derivadas de insulinomas humanos	76
3.1.3-Isolamento e cultura de ilhotas pancreáticas murinas	77
3.1.4-Linhagens celulares.	78
3.2-Silenciamento da proteína HSPB1 murina	79
3.3- Superexpressão da proteína HSPB1 humana por transfecção plasmidial	81
3.4- Tratamentos celulares	81
3.5-Extrato protéico celular total	82

	3.6-Estudo de expressão de proteínas por Western Blot.	82
	3.7-Extração de RNA	84
	3.8-Reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa (RTPCR) e PCR quantitativo	em
	tempo real (qPCR).	85
	3.9-Ensaio de viabilidade por microscopia de fluorescência	86
	3.10-Ensaio de viabilidade por MTT.	87
	3.11-Imunoprecipitação.	87
	3.12- Análise Nano LC-MS/MS	87
	3.13-Pesquisas de banco de dados e análises de bioinformática	89
	3.14- Superexpressão de D-aminoácido oxidase (DAAO) de HSPB1	89
	3.15-Determinação do estresse oxidativo usando diacetato de diclorodihidrofluoresceína	90
	3.16-Avaliação da geração do radical superóxido intramitocondrial	90
	3.17-Quantificação de GSH e GSSG pelo sistema LC-MS / MS	91
	3.18-Ensaio da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6DP)	92
	3.19- Análise da velocidade de consumo de Oxigênio (OCR).	92
	3.20-Análise do potencial de membrana mitocondrial (ΔΨmt)	93
	3.21- Ensaios de atividade funcional nas células beta contendo HSPB1 silenciada	93
	3.22-Extração de DNA genômico	94
	3.23-Análise estatística dos dados.	95
4	-RESULTADOS	97
	4.1- HSPB1 é uma proteína chave na citoproteção de células beta induzida por PRL	97
	4.2- A superexpressão de HSPB1 mimetiza o efeito citoprotetor promovido por PRL	101
	4.3- Investigação da via de sinalização da prolactina em células beta e sua relação d	com
	HSPB1	108
	4.4-Análise do interactoma de HSPB1 em células MIN6 tratadas com citocinas na prese	nça
	ou ausência de Prolactina.	111
	4.5- HSPB1 como mediadora de citoproteção contra estresse oxidativo	130
	4.6-Estudo da importância de HSPB1 na manutenção do metabolismo mitocondrial induz	
	por PRL em células-beta	142

4.6.1-HSPB1 é um mediador da recuperação da função mitocondrial146			
4.7-HSPB1 e a função secretória de células beta	152		
5-DISCUSSÃO	158		
6-CONCLUSÃO			
7-BIBLIOGRAFIA			
ANEXO 1 – TRABALHOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS	205		
1. Artigo Publicado em 2017	206		
2. Artigo Publicado em 2018.	206		
3. Manuscrito Submetido em Agosto de 2018	208		
SÚMULA CURRICULAR209			

INTRODUÇÃO

## 1-INTRODUÇÃO

#### 1.1-Pâncreas

O pâncreas é uma glândula mista, exócrina e endócrina, com 15-25 cm de extensão. Nos seres humanos está localizado no abdômen superior e está dividido anatomicamente em três partes principais: cabeça, corpo e cauda (**Figura 1**). Ricamente irrigado e inervado, sua composição tecidual está diretamente relacionada com sua função.

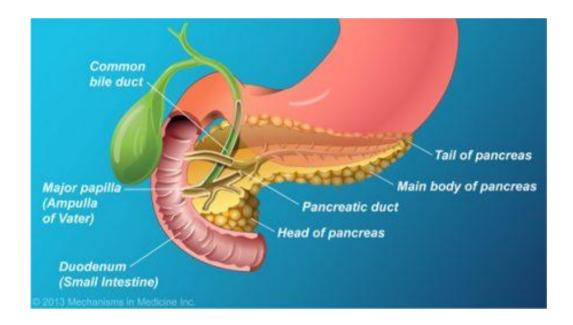


Figura 1. Representação esquemática da anatomia pancreática.

Glândula dos sistemas digestório e endócrino localizado atrás do estômago e composto por três partes: cabeça, corpo e cauda. Destaque para o ducto pancreático que percorre todo o comprimento da glândula e termina na segunda porção do duodeno (Âmpola de Vater) (animação disponível em http://www.mechanismsinmedicine.com/site/index/websites - acesso em 20/04/2018).

O pâncreas exócrino é composto principalmente pelo tecido acinar. É responsável por produzir o suco pancreático composto por íons, bicarbonato de sódio e enzimas digestivas que são coletados pelos ductos que confluem para o ducto pancreático, cuja porção final é comum ao ducto da glândula biliar e desemboca na segunda porção do duodeno através do Esfincter de

Oddi. Estas enzimas são secretadas em grande parte na forma inativa de pró-enzimas e têm função proteolítica (quimiotripsinogênio, tripsinogênio, pró-elastase, pró-carboxipeptidade A e B), lipolítica (lipase e pró-fosfolipase A) e amilolítica (amilase). Os peptídios secretina, colecistocinina (CCK) e gastrina são os principais reguladores da secreção destas enzimas digestivas (Molina, 2004).

**Tabela 1.** Composição celular das Ilhotas Pancreáticas, hormônios secretados pelo pâncreas endócrino e suas funções.

Tipo Celular	Produção	Principais Funções Hormonais
	Hormonal	
A.I.C.	Character	A
Alfa	Glucagon	Aumenta a concentração de glicose e
		ácidos graxos no sangue; principal
		hormônio catabólico*.
Beta	Insulina	Regula o metabolismo de carboidratos,
		lipídeos e proteínas; regula a captação de
		glicose no sangue; principal homônio
		anabólico*.
	Amilina	Regula a glicêmica por retardar o
		esvaziamento gástrico*.
Delta	Somatostatina	No pâncreas modula negativamente a
		secreção de insulina e glucagon sob
		condições de estímulo de nutrientes;
		regula indiretamente a glicemia**.
PP	Peptídeo	Modula funções do pâncreas exócrino e
	Pancreático	endócrino, inibindo secreção de glucagon
	Pancieatico	sob condições de baixa nos nutrientes**.
Épsilon	Grelina	Regulador do apetite***.

<sup>\*</sup>Voet D, Voet JG. (2011). *Biochemistry* (4th ed.). New York: Wiley; \*\* (Brereton et al., 2015); \*\*\*(Kojima et al., 1999)

A porção endócrina é composta por grupos de células denominadas ilhotas pancreáticas que produzem e secretam hormônios importantes na manutenção da homeostase do metabolismo energético do organismo. As

ilhotas pancreáticas estão dispersas no tecido exócrino do pâncreas (Kelly, McClenaghan and Flatt, 2011) e suas células secretam hormônios diretamente em uma densa rede de capilares que envolvem as ilhotas (Fu, R. Gilbert and Liu, 2013).

#### 1.1.1 Ilhotas Pancreáticas

Em 1869, Paul Langerhans identificou as Ilhotas Pancreáticas, também conhecidas por Ilhotas de Langerhans. Anatomicamente o pâncreas é diferente entre as espécies e o mesmo acontece com a massa de ilhotas, sua estrutura e a distribuição dos cinco tipos celulares característicos que a compõe (**Tabela 1**).

Em um adulto saudável, as ilhotas pancreáticas representam entre 1 e 2% da massa total pancreática e recebem de 10 a 15% da irrigação sanguínea que chega à glândula (Molina, 2004).

Uma ideia amplamente divulgada é que ilhotas de camundongo têm uma organização definida e mais homogênea com as células beta (variação de 61% a 88%) localizadas no centro das estruturas e células alfa e delta distribuídas predominantemente na periferia da ilhota. Descrições de ilhotas humanas pareciam indicar que elas não apresentavam organização definida (Brissova et al., 2005) (Figura 2A). No entanto, estudos mais recentes indicam que há uma evidente organização entre células alfa e beta nas ilhotas humanas, a qual permite o contato das células endócrinas com os vasos sanguíneos e favorece os contatos heterólogos entre células beta-alfa e homólogos entre células beta-beta (Bosco et al., 2010) (Figura 2B), mesmo apresentando um percentual de células beta mais heterogêneo, onde as células beta compõem entre 28% a 75% do tecido endrócrino (Brissova et al., 2005). Além disso, e diferentemente do que se pensava, as ilhotas pancreáticas não têm estrutura arredondada com um centro compacto, o que representaria menor irrigação no núcleo, comprometendo a chegada de nutrientes e oxigênio em locais distantes da borda.

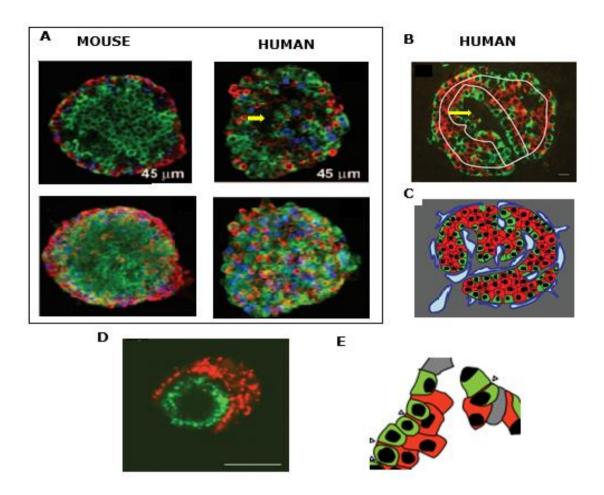


Figura 2. Arquitetura de Ilhotas Pancreáticas.

(A) Duas sessões ópticas feitas através de ilhota inteira isolada de camundongo (painel esquerdo) e humano (painel direito) foram retiradas de uma série de 15 sessões adquiridas em intervalos de 1µm na dimensão axial (z) e mostram diferenças na composição e distribuição das células que compõem ilhotas das duas espécies. A pilha das sessões ópticas foi reconstruída em 3-D e uma única projeção de 0º em relação ao eixo y é mostrada na linha de baixo. Ampliação x40; células beta em verde, células alfa em vermelho e células delta em azul. (Adaptado de Brissova et al., 2005) (B) Imunofluorescência de Ilhota pancreática humana com as células beta coradas em vermelho e células alfa em verde. Destague para a estrutura da ilhota com um canal vascular interno; barra de escala 10 µm. (C) Modelo de organização entre as células endócrinas beta (vermelho) e alfa (verde) humanas e vasos em azul. (D) Imagem mostrando uma composição de célula beta (vermelho) ao redor de célula alfa (verde) (representação de pares de células observados em diferentes preparações de 10 diferentes pâncreas). (E) Modelo de organização mostra a maioria das células beta na região interna em contato com células alfa na periferia da ilhota. As setas brancas mostram os prolongamentos citoplasmáticos das células beta entre as células alfa permitindo o acesso destas aos vasos (Adaptado de Bosco et al, 2010).

A distribuição descrita na atualidade mostra que a distribuição dos distintos tipos celulares nas ilhotas humanas permite sustentar uma irrigação similar em todos os pontos da ilhota, independente da variação do tamanho desta (**Figura 2C**) (Bosco *et al.*, 2010). A seta amarela em destaque na figura 2 indica esta mudança de paradigma, uma vez que em 2005 Brissova e colaboradores destacavam esta área como de células não betas. Somente em 2010, Bosco e colaboradores apresentam seu modelo de ilhota com vasos internos.

Ainda, ilhotas obtidas tanto da cabeça como da cauda pancreática apresentam quase 80% das células beta fazendo contatos celulares heterógolos. Nota-se nas **figuras 2D e 2E** que apesar da estrutura em sanduiche (alfa-beta-beta-alfa), células beta apresentam extensões citoplasmáticas entre as células alfa e podem assim alcançar a superfície do vaso (Bosco *et al.*, 2010).

A principal função dos hormônios secretados pelas células presentes na ilhota é a manutenção da homeostase de glicose no organismo (**Tabela 1**). Isto é mantido essencialmente pela regulação de processos anabólicos e catabólicos regulados pela produção e secreção dos hormônios insulina pelas células beta e glucagon pelas células alfa pancreáticas, respectivamente.

Neste processo é fundamental a capacidade única de resposta das células beta à variação fisiológica da glicemia, cujo aumento é o responsável pela secreção de insulina.

#### 1.1.2-Insulina

O nome insulina tem origem no latim "insula", com significado ilha, que associado ao sufixo *ina* referente à "natureza de", relaciona o hormônio ao seu local de origem nas células beta das ilhotas pancreáticas.

A relação entre as secreções pancreáticas e diabetes foi mostrada pela primeira vez em 1889 por dois fisiologistas alemães da Universidade de Estrasburgo, Oskar Minkowski e Joseph von Mering. Em 1921, o médico Frederick Banting e seu assistente Charles Best extraíram insulina de pâncreas de cachorro, no laboratório do fisiologista e bioquímico John Macleod, em Toronto, Canadá (**Figura 5B**). Este extrato aplicado em cães submetidos à pancreatectomia, os quais desenvolviam diabetes, reverteu este quadro. No final de 1921, o bioquímico James Bertram Collip

ajudou Banting e Best a purificar seu extrato. Dois anos mais tarde Best e Macleod ganharam o prêmio Nobel por esse descobrimento (disponível em <a href="https://www.sciencehistory.org/historical-profile/frederick-banting-charles-best-james-collip-and-john-macleod">www.sciencehistory.org/historical-profile/frederick-banting-charles-best-james-collip-and-john-macleod</a> acesso em 19/11/2018).

Anteriormente a esta descoberta tínhamos um quadro com 85% de morte, em 1897, dos pacientes com DM1. Esses números mudaram para cerca de 40% na era pré-insulina (1914 a 1922). A partir de então, este quadro foi radicalmente modificado, chegando a 1% em 1950 (Joslin, 1917; Marks, 1965; revisado por Schuetz et al., 2018). Erroneamente acreditouse que havia sido encontrada a cura para DM1 (Geyelin et al., 1922; revisado por Schuetz et al., 2018) e com isso foram abandonadas as pesquisas com reposição do tecido pancreático. Somente após décadas, com a associação de graves doenças crônicas com pacientes portadores de DM1 a ciência voltou-se novamente para o problema.

Insulina é transcrita na forma de preproinsulina, passa por várias mudanças pós-traducionais (pré-insulina: cadeia A, B e peptídeo C) até chegar a sua forma madura como uma molécula composta por duas cadeias: A (21 aminoácidos - aa) e B (30 aa), mantidas por 3 pontes dissulfeto (**Figura 3A**) (Weiss, Steiner and Philipson, 2014). Uma vez sofrida a última clivagem hexâmeros de insulina coordenados por dois íons de zinco, que interagem com os resíduos de histidina das moléculas (**Figura 3B**) são empacotados no Complexo de Golgi, juntamente com Peptídeo-C, em grânulos secretórios. Cabe ressaltar que a insulina humana é idêntica à insulina de porco, com exceção da mudança do aminoácido Ala B30 por Thr B30 na insulina humana, motivo este pelo qual a insulina de porco foi amplamente utilizada no início da era da insulinoterapia.

O modelo aceito hoje que explica o padrão de resposta às variações fisiológicas na concentração de glicose sanguínea com a secreção de insulina está baseado no fato de que as células beta possuem transportadores de glicose de baixa afinidade em camundongos (K<sub>m</sub> 15-20mM - GLUT2) (Vos *et al.*, 1995). Além disso, a Hexoquinase IV (Glicoquinase – GK), também de baixa afinidade, expressa preferencialmente em células beta, é responsável pela fosforilação da

molécula de glicose, e não é inibida por Glicose-6-fosfato (G-6-P) (Vos *et al.*, 1995; revisado por Nicholls, 2016b). A glicose, no citoplasma, pode ser metabolizada e oxidada através da glicólise. O aumento da razão [ATP] / [ADP] (Malaisse and Sener, 1987; Kennedy *et al.*, 1999) devido ao metabolismo de glicose na glicólise, Ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons promove o fechamento dos canais K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) (Cook and Hales, 1984; Meglasson and Matschinsky, 1986). Dependendo da espécie pode ocorrer também a entrada de Na<sup>+</sup>, atuando sinergisticamente com o evento anterior para a despolarização da membrana plasmática e consequente abertura dos canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem (Satin and Cook, 1985; Safayhi *et al.*, 1997; Rorsman *et al.*, 2000; Wang and Thurmond, 2009).

Em resposta ao aumento da concentração de cálcio intracelular ocorre o processo de exocitose dos grânulos de insulina, processo este dependente da proteína SNARE (<u>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor</u>) (Rorsman *et al.*, 2000; Wang and Thurmond, 2009). A primeira fase de secreção de insulina (SI) é rápida e dependente da via dos canais  $K_{ATP}$ . A segunda fase de secreção de insulina também requer aumento de  $Ca^{2+}$  citoplasmático e movimenta diferentes grupos de grânulos de insulina (Straub and Sharp, 2002) (**Figura 3C**).

Cabe destacar o papel fundamental do metabolismo oxidativo, em especial das mitocôndrias neste processo, visto que células beta primárias apresentam uma baixa expressão de lactato desidrogenase. Em adição, a ausência de transportadores de monocarboxilatos na membrana plasmática impede que a ativação inapropriada de secreção de insulina ocorra quando por exemplo altos níveis de lactato e piruvato estão em circulação durante o exercício intenso (Ishihara et al., 1999; Nicholls, 2016; Pullen et al., 2012).

Ainda não estão totalmente identificados os mecanismos de seleção dos grânulos que serão secretados quando a sua via de sinalização tem sido ativada em célula beta. A teoria mais aceita é de que somente 5% destes grânulos ficam disponíveis para liberação rápida (Read Releaseble Pool – RRP), enquanto que o restante precisa sofrer modificações químicas e físicas antes de serem secretados (Reserve Pool), como por exemplo, a diminuição das concentrações de ADP (Parsons *et al.*, 1995; Ren et al.,

2007). Isto explicaria o modelo bifásico de secreção de insulina (**Figura 3C**) (Henquin et al., 2006; Ren et al., 2007).

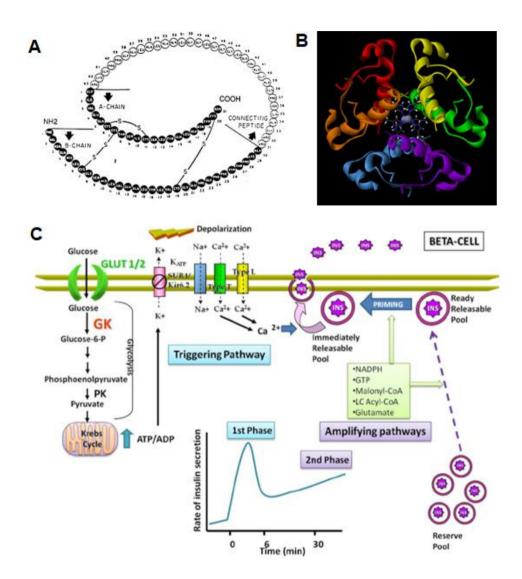


Figura 3. Estrutura da insulina e mecanismo bifásico de secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS).

(A) A molécula de pró-insulina é processada no Complexo de Golgi, onde, após duas clivagens forma peptídeo C (cadeia branca) e insulina (cadeia preta), composta por duas cadeias: A (21aa) e B (30aa), mantidas por 3 pontes dissulfeto. (Adaptado de Weiss et al., 2014). (B) Modelo de fita em 3D do hexâmetro de insulina átomos coordenado por dois de Zinco. (Disponível http://www.everystockphoto.com/photo.php?imageId=1704815 20/05/2018). (C) A captação de glicose por células beta é realizada por transportadores de glicose (GLUT2 em roedores, GLUT1 em humanos). Uma vez no citoplasma, a molécula de glicose é fosforilada por GK e pode ser metabolizada e oxidada através da glicólise. O aumento da [ATP] pela glicólise, Ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons promove o fechamento dos canais de  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ). Este evento junto com a entrada de Na<sup>+</sup>, promovem a despolarização da membrana plasmática e consequente abertura dos canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem. A primeira fase de secreção de insulina (SI) é rápida e dependente da via dos canais

de  $K_{ATP}$ . A segunda fase de SI parece ser independente de  $K_{ATP}$ , sendo que as duas requerem aumento de  $Ca^{2+}$  citoplasmático e movimentam diferentes grupos de grânulos de insulina (RRP e RP)(Straub and Sharp, 2002) (Figura adaptada de Vega-Monroy & Fernandez-Mejia, 2011).

Estudos recentes conseguiram mostrar, em ilhotas individuais intactas, que após estímulo de glicose, muitos pontos de exocitose aparecem sobre a membrana. No entanto, quanto mais prolongado o estímulo, eventos repetidos de secreção na superfície celular ocorrem em sítios preferenciais para exocitose, isto é, mais compartimentalisados os sítios se tornam. Este padrão seria revertido quando a concentração de glicose retorna aos níveis basais (Almaça *et al.*, 2015).

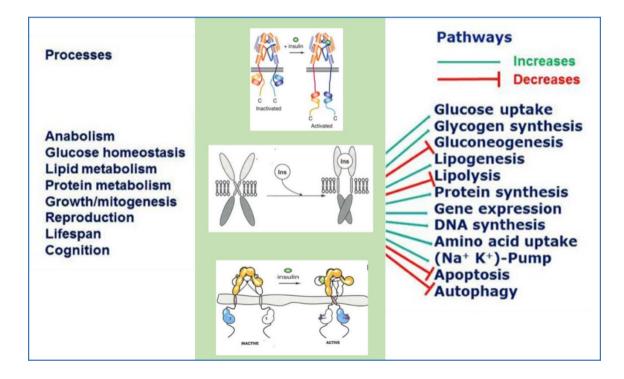


Figura 4. Ativação do receptor de insulina promove efeitos pleiotrópicos.

Múltiplos processos fisiológicos (painel esquerdo) são afetados pelos efeitos da insulina através da ativação de seu receptor, ativando ou inibindo as vias de sinalização relacionadas, influenciando principalmente em vias metabólicas intracelulares (painel direito). No painel central estão alguns modelos de mecanismos de ativação pelo ligante ao receptor tirosina quinase: modelo "ioiô" (acima), modelo de separação do domínio transmembrana induzida pelo ligante (central) e modelo de aproximação induzido pelo ligante (abaixo) (Adaptado de Meyts 2016).

Uma vez secretada, a insulina age nos tecidos alvos com efeitos pleiotrópicos, ligando-se a um receptor glicoproteico transmembrana pertencente à superfamília dos receptores com atividade de tirosina quinase. Após a ligação da insulina no domínio extracelular (2 subunidades alfa), ocorrem mudanças conformacionais no domínio intramembrana e no intracelular (2 subunidades beta) que permite primeiro a fosforilação dos resíduos de tirosina presentes neste último (**Figura 4**), e depois a fosforilação de substratos protéicos intracelulares, como o substrato do receptor de insulina (IRS). IRSs funcionam como ancoradouro, facilitando a ativação de diversas vias de sinalização, como fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) e Mitogen-activated protein kinases (MAPK) (Molina, 2004; Meyts, 2016).

Tabela 2. Efeitos da insulina no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas.

Efeitos	Insulina estimula	Insulina inibe
metabólicos  Metabolismo de  Carboidratos	<ul> <li>Transporte de glicose através da membrana celular no tecido adiposo e músculo.</li> <li>Glicólise no músculo e tecido adiposo;</li> </ul>	<ul> <li>Degradação de glicogênio no músculo;</li> <li>Glicogenólise e gliconeogênese no</li> </ul>
	<ul> <li>Síntese de glicogênio principalmente no fígado e no músculo.</li> </ul>	fígado.
Metabolismo de Lipídios	<ul> <li>Síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis nos tecidos;</li> <li>Captação de triacilglicerol do sangue para o tecido adiposo e músculo;</li> <li>Síntese de colesterol no fígado.</li> </ul>	<ul> <li>Lipólise no tecido adiposo;</li> <li>Oxidação de ácidos graxos no músculo e fígado;</li> <li>Cetogênese.</li> </ul>
Metabolismo de Aminoácidos	<ul> <li>Transporte de aminoácidos para os tecidos;</li> <li>Síntese de proteínas nos tecidos.</li> </ul>	<ul> <li>Degradação de proteínas no músculo; formação de uréia.</li> </ul>

(Adaptado de Molina, 2004)

Os efeitos anabólicos de insulina no organismo podem ser caracterizados como precoces, de médio e longo prazo. Um exemplo de efeitos precoces é a translocação dos receptores de glicose (GLUT4) do citoplasma para a membrana em tecidos periféricos (ex. músculo) imediatamente após a ligação de insulina ao receptor (Molina, 2004).

Entre os efeitos de médio prazo temos a regulação e modulação da síntese de enzimas envolvidas em diversos processos metabólicos, ativando ou inibindo estes processos (**Figura 4, Tabela 2**). Ainda, podem ser considerados efeitos tardios da sinalização induzida por insulina, os processos de crescimento e diferenciação celular (Molina, 2004; Meyts, 2016).

A desregulação de qualquer destes processos nas células beta podem estar associados à intolerância a glicose e diabetes.

### 1.2-Diabetes mellitus

A primeira e mais antiga descrição de Diabetes foi encontrada no Papiro de Ebers, descoberto por Gerg Ebers no Egito (**Figura 5A**). Datado de 1550 AC, neste tratado médico está caracterizada uma doença com emissão frequente e abundante de urina. No século II DC, na Grécia antiga, Araeteus designou o nome de diabetes que significa "passar através de um sifão", referente à poliúria característica da doença. Apesar de médicos indianos suporem que a urina era doce, somente no século XVII é que Willis comprova de fato experimentando-a e comprovando que era "doce como mel", daí vem o nome *mellitus*, dado por Cullen no século XVIII (Tschiedel, 2014).

Segundo a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS),

"Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica devida à não produção de insulina suficiente pelo pâncreas e/ou quando não há uma efetiva resposta do organismo em relação à insulina produzida."

Neste contexto estabelece-se um quadro de hiperglicemia, o que pode acarretar graves complicações crônicas, como por exemplo, neuropatias, nefropatia, retinopatia, doenças cardiovasculares, amputação de extremidades e morte (WHO/IDF, 2006).

O número de adultos com DM quase quadruplicou entre 1980 e 2014, passando de 108 milhões (WHO, 2018) para 415 milhões (Ogurtsova et al., 2017) neste período. Somente em 2015, 5 milhões de mortes foram atribuídas direta ou indiretamente à DM, com um gasto global em saúde, relacionado ao diabetes, estimado em 673 bilhões de dólares. A previsão é de que em 2040 teremos 642 milhões de pessoas com DM (Ogurtsova et al., 2017). Estes dados estabelecem um quadro de epidemia mundial, com grandes desafios para o serviço público de saúde.

A classificação do diabetes se divide em dois grandes grupos: Diabetes tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2). DM2 compreende cerca de 75% a 85% dos portadores de diabetes e DM1 entre 10% a 15%, caracterizados pela ausência ou presença, respectivamente, de anticorpos contra antígenos de células beta pancreáticas e idade no diagnóstico (crianças e adolescentes No entanto, um outro grupo de pacientes com diabetes para DM1). autoimune latente em adultos (LADA) vem crescendo (<10% dos portadores de diabetes) (Ahlqvist et al., 2018). Este grupo inicialmente apresenta características fenotípicas similares aos pacientes com DM2, mas com o tempo a doença se torna similar ao DM1, com destruição autoimune das células beta. Neste grupo estão presentes anticorpos contra ácido glutâmico descaboxilase (GADA) (Tuomi et al., 1993; Ahlqvist et al., 2018). Além disso, o avanço de técnicas como sequenciamento gênico tem permitido o diagnóstico de outras formas mais raras de diabetes monogênicas, por exemplo, ligadas à deficiência monogênica, como a Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY). Por exemplo nos indivíduos portadores de MODY tipo 2 ocorre alteração no gene da GK, ou a DM2 associada à mutações do DNA mitocondrial (Reis and Velho, 2002; Ahlqvist et al., 2018). Ainda, não podemos deixar de citar a diabetes gestacional, caracterizada por um quadro de intolerância a carboidratos com início durante o período gestacional (Massucatti et al. 2012). Diante de recentes estudos, uma nova classificação para diabetes que envolva um diagnóstico que possa identificar os pacientes com maior risco de complicações baseado

em informações dos mecanismos da doença permitiria uma escolha de terapias mais eficientes (Ahlqvist *et al.*, 2018).

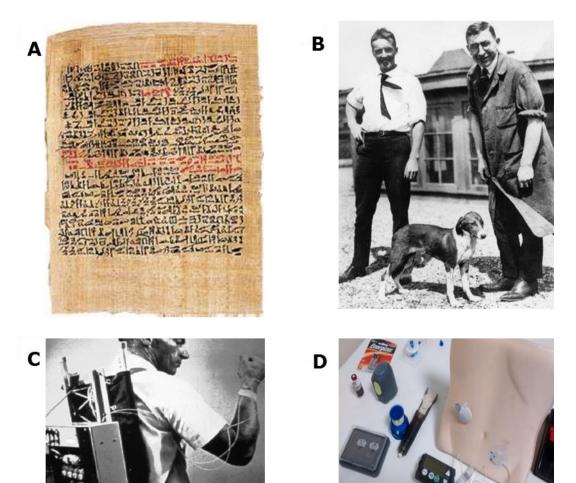


Figura 5. Diabetes mellitus.

(A) No Papiro de Ebers, datado de aproximadamente 1550 AC, foi encontrada a referência mais antiga à uma doença caracterizada por emissão frequente e abundante de urina (disponível em <a href="https://pt.wikipedia.org/wiki/Papiro Ebers">https://pt.wikipedia.org/wiki/Papiro Ebers</a>). (B) Frederick Banting e Charles Best identificaram e extrairam a insulina em 1921 e juntamente com o fisiologista John Macleod e o bioquímico James Collip receberam o prêmio Nobel em 1923 por seus achados. Até então, os pacientes estavam fadados a uma vida de extremas restrições e frequentemente iam a óbito por agudas da doenca (disponível complicações http://www.claudiagurgel.com/parte-1---pequena-histoacuteria-do-tratamento-dadiabetes.html) (C) Dr. Arnold Kadish, com o modelo da primeira bomba de insulina portátil década 1960) (início da de (disponível https://walterminicucci.com.br/noticias/167-a-primeira-bomba-de-insulina-portatil (D) Avanço da insulinoterapia com detectores de glicemia e bombas de insulina automatizadas (disponível em:http://bloq.adj.org.br/o-uso-da-bomba-de-infusaode-insulina-em-criancas-e-adolescentes/) (acesso em 02/07/2018).

## 1.2.1 - Diabetes mellitus tipo 1

No DM1, também conhecido como insulino dependente ou diabetes infantil ou juvenil, ocorre a destruição das células beta presentes nas ilhotas pancreáticas, sendo assim caracterizada pela deficiência na produção de insulina (**Figura 6A e B**) e consequente elevação da glicemia de forma crônica (Lukić, Stosić-Grujicić and Shahin, 1998; Todd, 2010). Estes eventos geram um distúrbio endócrino-metabólico, sendo mais frequente na infância (90% dos casos) (WHO DIAMOND PROJECT GROUP 1990; Cavalcante et al. 1995; apud Gomes et al., 1996; Scott et al. 1997) e é considerado um importante problema de saúde pública dada às complicações relacionadas à doença. Neste contexto a Finlândia tem se destacado pelo grande aumento de novos casos de DM1 (Karvonen et al., 1993) e o Brasil está em terceiro lugar no mapa mundial de crianças com menos de 14 anos com DM1 (IDF-Diabetes Atlas, 2017).

Várias são as teorias que tentam explicar o gatilho que desencadeia o processo de destruição da célula beta dentro da ilhota. O que todas têm em comum é o componente autoimune da doença. No início, ocorre um processo inflamatório local nas ilhotas pancreáticas, denominado insulite, no qual Linfócitos T desempenham um papel importante. Há infiltração de macrófagos e linfócitos responsáveis pela secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias, muito tóxicas para células beta (**Figura 6C**) (Nielsen *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2004; Eizirik, Colli and Ortis, 2009; Thomas *et al.*, 2009; Wikstrom *et al.*, 2012).

Tanto este processo inicial, como a exarcebação do processo podem estar associados com fatores genéticos, como mutações no gene HLA (Auwera *et al.*, 1995; Balda and Pacheco-Silva, 1999), epigenéticos e ambientais, como infecções virais (**Figura 6D**) ou contato precoce com componentes da dieta como leite de vaca e proteínas do trigo (Akerblom and Knip, 1998; Van Belle, Coppieters and Von Herrath, 2011)(**Figura 7A-B**). Além dessas hipóteses, não podemos deixar de citar a teoria hipoalergênica, na qual a diminuição de doenças infecciosas, associado a melhores condições de higiene e saúde em países desenvolvidos está

associado ao aumento de doenças autoimune, como DM1 (Bach and Chatenoud, 2012).

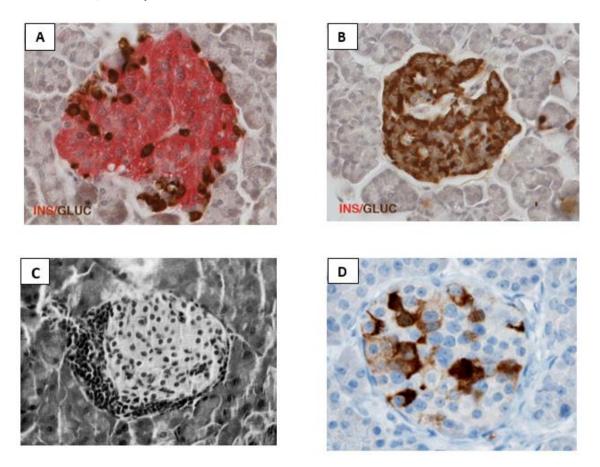


Figura 6. Destruição de Células Beta Pancreáticas.

Comparação de Ilhota pancreática normal (A) e Ilhota pancreática de paciente com crônica DM1 (B), na qual as células beta foram destruídas por uma reação autoimmune e consequente atrofia da ilhota. Células beta foram marcadas para insulina (vermelho) e células alfa para glucagom (marrom) (adaptado de Veld & Smeets, 2015). C). Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas de camundongo NOD com destaque para o inflitrado inflamatório mononuclear que promoverá a destruição autoimune da célula beta dentro da ilhota (Balda and Pacheco-Silva, 1999). D) Estrutura de enterovirus marcada em marrom está localizada em células beta dentro da ilhota pancreática (Imagem: Laiho & Oikarinen. University of Tampere led by Heikki Hyöty Submitted in 18/07/20017).

Uma vez clinicamente detectado o DM1, aproximadamente 80-90% das células beta já foram destruídas. O processo pré-clínico pode ser longo e uma vez iniciado o processo inflamatório, este retroalimenta-se, dificultando a identificação do gatilho (**Figura 7C-F**). Esta identificação dos eventos iniciadores se torna ainda mais difícil se considerarmos que alguns agentes atuam de forma rápida e não deixam rastros moleculares e outros

podem depender de múltiplas combinações, as quais variam de paciente para paciente.

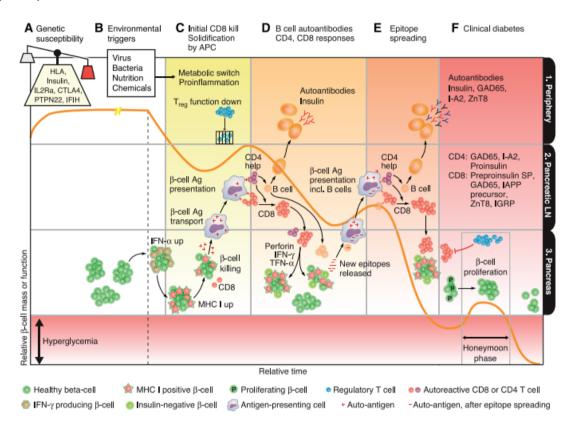


Figura 7. Modelo de Desenvolvimento de DM1.

A figura representa os diversos estágios por que passa a massa de célula beta ou sua função (linha laranja), com ênfase nas diferentes fases imunológicas (colunas) durante o desenvolvimento do DM1. As linhas delimitam regiões anatômicas importantes. Uma vez que a linha laranja entra em regiões vermelhas o indivíduo é diagnosticado com DM1. No início, em um indivíduo com suscetibilidade genética (A1) em concordância com a ocorrência de um ou mais evento ambientais (B1) pode levar a um processo inflamatório que atingirá as células beta pancreáticas (C3). No pâncreas, como resultado da inflamação, há uma superregulação de IFN-a e então, MHC classe I (C3) em células beta. Isto faz com que estas células sofram o ataque de linfócitos T CD8<sup>+</sup> com especificidade para antígenos no pâncreas (C3). Como consequência, após a liberação de antígenos de células beta, estes são coletados e apresentados aos linfonodos (LN) pancreáticos por células apresentadoras de antígenos (APC) (C3), desencadeando um ambiente próinflamatório no tecido periférico que favorece uma resposta de células T efetoras ao invés de células T reguladoras (Treg) (C1). Tanto a apresentação de antígenos de células beta, como a presença de linfócitos CD8+ iniciam a maturação de células B (D2), que passam a expressar anticorpos antiínsulina (D1). Além disso, Células T CD8 autorreativas são estimuladas a proliferar (D2) e migrar para o pâncreas (D3). Inicia-se então, uma segunda onda de morte de células beta, mediada pela liberação de perforina, granzima, TNF-α, INF-γ, os quais provocam estresse que leva à diminuição da produção de insulina (pseudoatrofia). Ainda mais antígenos são liberados e acontecem novas apresentaçãos de antígenos por APCs aos LN (D3-D2), levando a maturação e migração de células B (D3) em um processo denominado epitope spreading. A repetição sucessiva do processo leva à severa redução tanto da massa como de células beta funcionais (E3). Apesar do quadro que orienta para a morte celular, ocorre a ativação de uma fase denominada "lua

de mel", na qual há o estímulo de proliferação de células beta, o que resgata temporariamente parte da massa dessas células. Eventualmente Tregs podem desempenhar seu papel regulador, promovendo flutuações entre resposta pró-inflamatórias mais ou menos atenuadas, permitindo assim um relativo aumento da secreção de insulina (linha laranja) (F3). DM1 é diagnosticado quando há somente 10-30% de células beta sobreviventes (Adaptado de Van Belle et al. 2011).

A ação efetiva de células do sistema imune durante todo o desenvolvimento do DM1 pode ser constatado visto que infiltrados destas células e anticorpos anti-célula beta foram encontrados em diversos estudos (Eizirik, Colli and Ortis, 2009; Van Belle, Coppieters and Von Herrath, 2011) (**Figura 6C**). Cabe ressaltar que os eventos que antecedem o diagnóstico de DM1 precisam ser melhor entendidos. A **figura 7** mostra um resumo do que se conhece atualmente.

Importante levarmos em conta que, até o momento, além da insulinoterapia, não há terapias alternativas para o DM1. O desenvolvimento de vacinas que se mostraram promissoras em animais, se mostraram ineficazes em testes clínicos em humanos ou não tem sido ainda testadas em modelos humanos (Nicholas, Odumosu and Langridge, 2011; Hankaniemi *et al.*, 2017).

As estratégias de tratamento envolvem doses diárias de insulina com o objetivo de minimizar as complicações crônicas citadas anteriormente. No entanto, mesmo com o avanço da insulinoterapia (**Figura 5C e 5D**) essa estratégia se mostra ineficaz para algumas pessoas que apresentam a síndrome de inconsciência hipoglicêmica conservadoramente intratável. Para estas, chamadas de hiperlábeis, a indicação é o transplante total de órgão ou o transplante de ilhotas pancreáticas (Choudhary *et al.*, 2015; Voglová *et al.*, 2017).

### 1.3-Transplante de Ilhotas Pancreáticas

Inicialmente os pacientes hiperlábeis com indicação para o transplante só contavam com a modalidade de transplante de órgão sólido (PTx), o qual poderia ser simultâneo de pâncreas e rim, pâncreas após rim e a menos utilizada pâncreas isolado. No entanto, não só a falta de doadores representa um problema grave, mas a constante busca na melhora de

técnicas cirúrgicas, protocolos de imunossupressão e cuidados multidisciplinares envolvidos no procedimento. Por ser altamente invasivo, agravado pelo quadro hiperglicêmico crônico do paciente, as taxas de óbito por complicações durante e no pós-operatório são obstáculos a serem ultrapassados (Raduan, 2018).

O primeiro transplante de ilhotas pancreáticas (ITx) foi feito em 1972, quando Paul E. Lacy reverteu o diabetes em roedores. No histórico do ITx, representa um grande marco, quando em 2000 Shapiro e colaboradores reportaram sete pacientes transplantados consecutivamente, os quais tornaram-se insulinoindependentes por 1 ano, utilizando o Protocolo de Edmonton (Shapiro et al., 2000; Merani and Shapiro, 2006). A partir de então progressos em todas as frentes vêm sendo conquistados. Estes vão desde o desenvolvimento de novos coquetéis de enzimas para digestão do tecido pancreático, melhoras nas técnicas de isolamento, como por exemplo, com a Câmara de Ricordi (Ricordi et al., 1988), otimização tanto dos protocolos clínicos quanto os esquemas de imunossupressão, até o meio de transporte do órgão. Assim, o transplante de ilhotas surgiu como um avanço clínico para esses pacientes (Gleason et al., 2000; Kido et al., 2000; Shapiro et al., 2000; Dong and Woo, 2001).

Na figura 8 podemos observar um esquema resumido com o passo a passo do isolamento das ilhotas. Uma vez isoladas, estas são infundidas na veia porta do receptor. O fígado é o primeiro órgão a receber a insulina secretada e também capaz de acomodar o volume de infusão, assim um candidato natural para o implante, com altas taxas de sucesso alcançadas (Walsh et al., 1982; Shapiro et al., 2000; McCall and Shapiro, 2012; Bruni and Gala-lopez, 2014). Outros locais de implante estão sendo estudados, omento, tecido subcutâneo, submucossa gástrica, como intramuscular, medula óssea, câmara anterior dos olhos, além de dispositivos de encapsulamento (Krogh et al., 2001; O'Sullivan et al., 2010; Bruni and Gala-lopez, 2014; Schuetz et al., 2018).

ITx é um procedimento muito menos invasivo que não requer cirurgia nem anestesia geral. Ainda mais, o paciente não entra em contato com o tecido exócrino, como no PTx, evitando o contato com as enzimas digestivas produzidas e secretadas pelos ácinos (Ichii and Ricordi, 2009).

Uma análise retrospectiva comparando os 10 anos de ITx com dados dos PTx indicam que ITx é uma alternativa viável para o PTx, com uma taxa de aproximadamente 55% dos transplantados insulinoindependentes após 5 anos de ITx, menores taxas de complicações, além de que quase 100% dos pacientes não apresentam os sintomas relacionados à síndrome de inconsciência hipoglicêmica conservadoramente intratável (Voglová *et al.*, 2017). Contudo, a escassez de doadores, a baixa sobrevida das ilhotas após o ITx e efeitos colaterais relacionados à imunossupressão representam ainda limitações do procedimento (Ryan *et al.*, 2005; Kaminitz *et al.*, 2007; Wenzlau *et al.*, 2007).

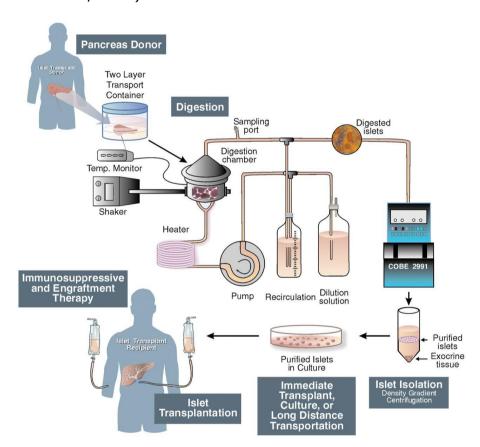


Figura 8. Representação esquemática do transplante de ilhotas pancreáticas.

As ilhotas são isoladas do pâncreas de doadores cadáveres. Através de um processo enzimático e mecânico faz-se a digestão do tecido exócrino. O próximo passo é fazer várias lavagens do tecido, separação e purificação do tecido endócrino (ilhotas pancreáticas) através de um mecanismo de gradiente de densidade. Uma vez isoladas, verifica-se a viabilidade das ilhotas que podem ser utilizadas para o transplante ou pesquisa. No transplante as ilhotas são infundidas na veia porta do fígado do paciente diabético receptor (Adaptado deMerani & Shapiro 2006).

Muitos países estão empenhados em superar estas limitações através da organização de centros avançados de transplante de ilhotas humanos, realizando a captação de ilhotas humanas tanto para pesquisa, como para a utilização em ITx. Destacam-se o Canadá, Reino Unido, Bélgica, Suíça, França, Paises Baixos, Itália, Austrália e Coréia do Sul. Embora os EUA não utilize ainda o ITx como procedimento médico, este país se destaca pelo maior número de centros de transplante de ilhotas (disponível em citregistry.org (acesso em 1/9/2018)).

Além disso, vários campos de estudo estão avançando, na tentativa de minimizar estas dificuldades, como a diferenciação de células tronco embrionárias ou reprogramação de células somáticas (iPSC) em células produtoras de insulina, assim como a estimulação da diferenciação de células alfa em beta, por exemplo, e proliferação desta última, além de descelularização do pâncreas e repopulação do mesmo (Voglová *et al.*, 2017). No entanto, apesar de promissoras, até essas técnicas se mostrarem seguras ainda enfrentam-se barreiras não só científicas, como éticas e de custo. Juntamente com a inibição da morte celular, estes ainda constituem importantes desafios a serem vencidos.

## 1.4-Morte celular

A morte celular continua sendo um paradoxo, uma vez que nas suas várias formas desempenham um papel essencial na vida. Até poucos anos atrás distinguíamos morte celular em dois tipos: acidental, cujo processo era denominado necrose e morte celular programada, denominada apoptose (Fink and Cookson, 2005).

Entretanto, com o avanço do entendimento dos mecanismos de morte celular, novos tipos de morte programada estão sendo identificados. Ainda, processos classificados anteriormente como apoptóticos estão sendo redefinidos.

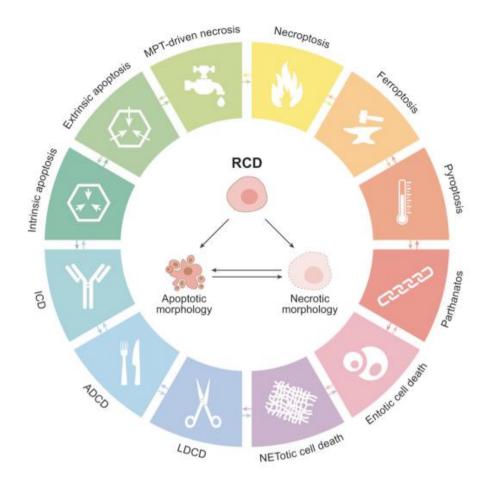


Figura 9. Esquema dos principais tipos de morte celular.

Mudanças desfavoráveis irreversíveis no microambiente extra e/ou intracelular podem desencadear cascatas de transdução de muitos sinais que levam à morte celular regulada. Muitos mecanismos moleculares estão sendo desvendados, mostrando que há considerável integração entre esses tipos. Para entender esses processos deve-se ainda ser levado em conta o perfil imunomodulatório de padrões que variam entre anti-inflamatórios e tolerogênicos à pró-inflamatórios e imunogênicos. ADCD: morte celular dependente de autofagia (autophagy-dependent cell death), ICD: morte celular imunogêncica (immunogenic cell death), LDCD: morte celular dependente de lisossomo (lysosome-dependent cell death), MPT: transição da permeabilidade mitocondrial (mitochondrial permeability transition) (Adaptado de Galluzzi & Vitale 2018).

Em 2018 o Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular (Nomenclature Committee on Cell Death - NCDD) publicou as recomendações atuais para a classificação dos processos de morte já descritos, segundo uma interpretação das perspectivas morfológicas, bioquímicas e funcionais (**Figura 9**) (Galluzzi and Vitale, 2018). Paralelamente avançam os estudos sobre a morte de células beta pancreáticas, visto sua importância para o entendimento da patogenia em

DM e consequente desenvolvimento de alvos terapêuticos (Rojas *et al.*, 2018).

No DM1, embora possa ocorrer na célula beta a ativação de mecanismos de necrose regulada denominada necroptose quando não há suficientes estímulos apoptóticos (Lee et al., 2012; Rojas et al., 2018), os principais mecanismos de morte identificados indicam a apoptose como aquele majoritariamente responsável pela morte de célula beta tanto em humanos como em murinos (Mizuno et al., 1998; Mandrup-Poulsen, 2001; Eizirik et al., 2008; Terra et al., 2011; Rojas et al., 2018).

# 1.4.1-Apoptose

O termo Apoptose, que vem do grego "apoptosis" e significa cair (como "a folha que cai de uma árvore") e foi usado pela primeira vez em 1972, quando Kerr, Wyllie e Currie descreveram um tipo de morte celular natural, em oposição à morte celular violenta que induz inflamação (Kerr, Wyllie and Currie, 1972).

Morte celular apoptótica ocorre predominantemente durante o desenvolvimento e também está relacionada tanto na regulação do sistema imune, como na resposta deste ao estímulo de doenças. Mesmo assim, cerca de 10 milhões de células sofrem apoptose diariamente em um ser humano adulto saudável (Curtin and Cotter, 2003). Este mecanismo é essencial para preservar a homeostase do organismo, controlar tamanho de órgãos e tecidos, além de controlar o número de células imunológicas após a erradicação de patógenos (Los, Wesselborg and Schulze-osthoff, 1999).

Neste processo de morte programada (PMCP) as células sofrem muitas alterações como condensação da cromatina, perda de contatos com as células vizinhas e encolhimento. Há a formação de bolhas na membrana plasmática, que antecedem os corpos apoptótico. Estes por sua vez, funcionam como pacotes do conteúdo celular, como parte do citosol, DNA e organelas intactas, evitando o extravasamento (**Figura 10A**). Este quadro nos permite inicialmente distinguir a morfologia nuclear de células envolvidas em morte por apoptose de outros tipos de morte, utilizando um

marcador nuclear fluorescente como Iodeto de Propídeo (PI) (**Figura 10B**). Mesmo sendo ainda amplamente empregado, este método apresenta limitações e o NCDD insiste na necessidade de uma definição baseada também em aspectos genéticos, bioquímicos, farmacológicos e funcionais (Galluzzi and Vitale, 2018).

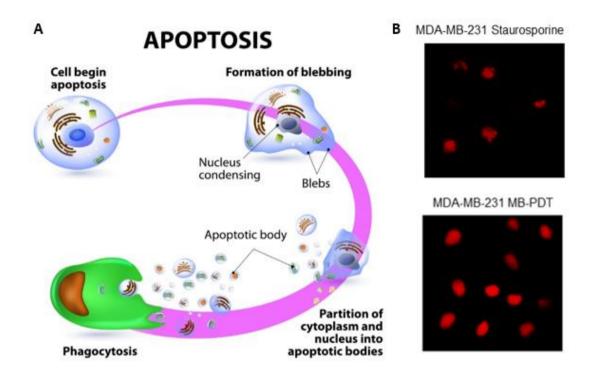


Figura 10. Aspectos morfológicos da apoptose.

(A) As células apoptóticas sofrem alterações como condensação da cromatina, perda de contatos com as células vizinhas e encolhimento. Há a formação de bolhas na membrana plasmática e formação dos corpos apoptóticos. Estes por sua vez, funcionam como pacotes do conteúdo celular, como parte do citosol, DNA e organelas intactas. (Disponível em: http://monsystemeimmunitaire.fr/apoptose-oumort-cellulaire-programmee/, 20/05/2018). aces-so em (**B**) Núcleos representativos de células MDA-MB-231 tratadas com estaurosporina, que desencadeia morte por apoptose (acima), ou após Terapia fotodinâmica utilizando azul de metileno como fotossensibilizador (MB-PDT), que desencadeia morte por necrose regulada (abaixo), corados com iodeto de propídeo (vermelho)(dos Santos, Terra, Wailemann et al. 2017).

Um evento inicial importante, mas não específico, é a exposição de fosfolipídeos fosfatidilserina no lado externo da membrana plasmática, que atua como sinalizador para células do sistema imune (p.e. Macrófagos), que

desencadeiam a fagocitose (Elmore, 2007; Ghavami *et al.*, 2009). Assim, como não há contato citoplasmático direto com células do sistema imune, acredita-se que o PMCP não induz uma reação inflamatória. No entanto, há indícios que em alguns casos a morte celular por apoptose não passa despercebida pelo sistema imune (Casares *et al.*, 2005; Rawson *et al.*, 2007; Tenev *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2010; revisado por Yatim, Cullen and Albert, 2017).

Os mecanismos moleculares clássicos envolvidos neste PMCP são denominados via intrínseca e via extrínseca apoptóticas, ambos envolvidos na morte de células beta pancreáticas durante o desenvolvimento de DM1.

A via intrínseca pode ser ativada por uma série de fatores microambientais que provocam estresse celular. Entre eles se encontram a deficiência de fatores de crescimento, o dano no DNA, o estresse de Retículo Endoplasmático (RE), o aumento não regulado de espécies reativas de oxigênio (ROS), o estresse na replicação, as alterações na rede do citoesqueleto ou os defeitos mitóticos (Nuñez *et al.*, 1990; Brumatti, Salmanidis and Ekert, 2010; Roy *et al.*, 2013; Roos, Thomas and Kaina, 2016; Pihán, Carreras-Sureda and Hetz, 2017; Vitale *et al.*, 2017; Galluzzi and Vitale, 2018).

Como há gasto de energia neste processo, alguma integridade de membranas e atividade metabólica permanece inicialmente, afim de ativar, por exemplo, vias de recrutamento de macrófagos e sinalização para fagocitose.

A família de proteínas BCL2 é importante na regulação desta via, pois modula a formação de poros na membrana externa da mitocôndria (MOMP), o que permite o extravasamento de proteínas pró-apoptóticas, como Citocromo-C e o Segundo ativador de caspases (SMAC). Composta por proteínas que possuem entre um a quatro domínios homólogos à BCL2 (BH), os membros da família BCL2 podem ser classificados como:

- -Pró-apoptóticos: BAX (BCL2 associado a X), BAK (BCL2 antagonist/killer 1), BOK (regulador de apoptose da família BCL2) e BH3-only;
- Antiapoptóticos: BCL2 e BCLxL (BCL extra large) (Figura 11A).

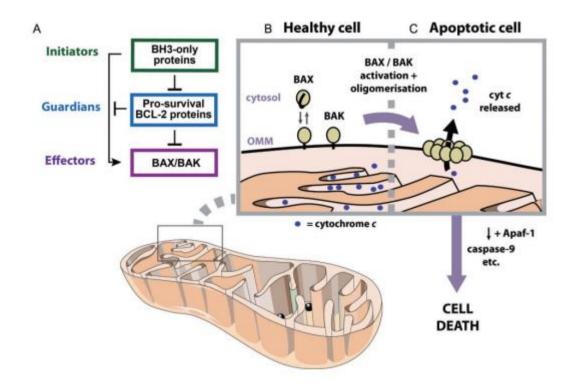


Figura 11. Via Intrinseca de Apoptose.

Apoptose é um tipo de morte celular programada, na qual a mitocôndria desempenha papel fundamental, como parte de uma via denominada mitocondrial ou intrínseca. Um importante ponto de regulação é o balanço entre as interações dos membros pró- e antiapoptóticos da família de proteínas BCL2 (A e B). Em células saudáveis, proteínas antiapoptóticas da família BCL2 são responsáveis pelo sequestro de efetores pró-apoptóticos, como BAK e BAX, além de proteínas da família BH3-only, mantendo a integridade de MOM. B) Em resposta ao estímulo apoptótico, ocorre ativação de proteínas BH3-only, que ativam BAX/BAK, liberandos-as também da interação com proteínas antiapoptóticas. A partir desse momento uma série de mudanças conformacionais em BAX/BAK levam à oligomerização destes e a posterior formação de MOMPs (poros na membrana externa mitocondrial). C) Com a formação do poro, citocromo-C (juntamente com outros fatores apoptóticos) é liberado para o citosol e liga-se aos Fatores de ativação de peptidases apoptóticas 1 (APAF1) e com a pró-caspase 9 formando o Apoptossomo, responsável por clivar Caspases-9, ativando assim, a cascata de caspases que finalmente leva morte celular (adaptado de Roy et al., 2013).

Revisado recentemente pelo NCCD (Galluzzi and Vitale, 2018), em situações de estresse, ocorre a ativação de BAK e de BAX na membrana externa mitochondrial (MOM). Em situações fisiológicas BAK e BAX podem transitar entre o cytosol e MOM em conformação inerte (Cheng et al., 2003; Edlich et al., 2011; Schellenberg et al., 2013; Naghdi, Várnai and Hajnóczky, 2015; Todt et al., 2015; Garner et al., 2016). No processo de ativação, BAX e BAK formam, em geral, homodímeros ativos, regulados direta ou indiretamente por membros pró-apoptóticos desta família, como

as proteínas BH3-only (PUMA - BCL2 binding component 3; BIM - BCL2-interacting mediator of cell death e NOXA (phorbol-12-myristate-13-acetateinduced protein 1) e BID (BH3 interacting domain death agonist) (**Figura 11**) (Gavathiotis *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2011).

Os membros pró-sobrevida da família BCL2 estão permanentemente presentes na MOM e inibem a ação direta de BAX e BAK por estarem fisicamente ligados a estes, impedindo assim que ocorra a oligomerização. Podem ainda sequestrar proteínas BH3-only de forma indireta. Com o estímulo de estresse e ativação da via de morte, ocorre o desligamento dos membros antiapoptóticos, homodimerização e oligomerização dímero-pordímero dos membros pró-apoptóticos. Neste processo acontece o desligamento das proteínas reguladoras, alteração da permeabilidade e formação de MOMPs, além de dissipação no potencial da membrana interna mitocondrial (ΔΨm) (Tait and Green, 2010; Galluzzi, Kepp and Kroemer, 2016; revisado por Galluzzi and Vitale, 2018).

Uma vez que MOM esta permeabilizada, fatores pró-apoptóticos são liberados do espaço intermembrana mitocondrial para o citosol, para iniciar entre outras coisas a ativação de uma cascata de Caspases (*cysteine-aspartatic proteases*). Um grupo de Citocromo-C liga-se aos Fatores de ativação de peptidases apoptóticas 1 (APAF1) e com a pró-caspase 9 formando o Apoptossomo. Nessa situação, APAF1 é responsável por clivar e ativar Caspases-9. Caspase-9 clivada e responsável por ativar caspases efetoras, como a Caspase-3, a qual inicia uma série de proteólises, promovendo os passos finais da apoptose (**Figura 12**) (Li *et al.*, 1997; revisado por Galluzzi and Vitale, 2018).

Cabe destacar que recentemente tem sido mostrado a presença e ativação de BAX, BAK e especialmente BOK na membrana do RE, regulados por BCL2. Estas funcionam como nas mitocôndrias, permeabilizando a membrana do RE frente a uma situação de aumento de estresse no RE. No entanto, ainda não se conhece a real função deste evento e sua relação com a apoptose (Wang *et al.*, 2011; Pihán, Carreras-Sureda and Hetz, 2017).

SMAC, no citosol, liga-se a uma série de proteínas Inibidoras de Apoptose (IAP),como o *X-linkedIAP* (XIAP), que em células saudáveis está

associado às Caspases-9, -3 e -7, inativando-as, e ao *cellular IAP* (cIAP) 1 e 2, que inibem proteínas da via extrínseca (Lacasse, Mahoney *et al.*, 2008), facilitando, assim, a ativação de ambas as vias apoptóticas (**Figura 12**).

Na via extrínseca, a ativação ocorre dependente de mudanças extracelulares, via ativação de receptores de morte (FASR - também conhecido como CD95 ou APO; e a superfamília de TNFR - Tumor Necrosis Factor Receptor), que necessitam de ligantes específicos (FASL; TNFL) (Wajant, 2002; Mehlen and Bredesen, 2011; Aggarwal, Gupta and Kim, 2012; Gibert and Mehlen, 2015; Riahi et al., 2016). Além desses, esta via também pode ser ativada por receptores de dependência, como por exemplo os receptores de neurotrofinas TrkA and TrkC, cuja ativação ocorre quando a concentração de seus ligantes específicos caem abaixo de um limite (Gibert and Mehlen, 2015; revisado por Galluzzi and Vitale, 2018).

Uma vez que há a ligação do ligante aos receptores de morte, estes são ativados e regulam a ativação e função de Caspase 8, que pode diretamente promover a ativação de Caspases efetoras (pe. Caspases-3) ou clivar BID, tornando-o truncado e ativo (tBID). tBID transportado para a MOM funciona como uma proteína BH3-only , ativando a via de permeabilização de MOM e sinergisticamente amplificando o sinal apoptótico (**Figura 12**). Estudos mostram que BID pode ser um regulador importante na apoptose de células beta induzida por perforinas e granzina B e sua ausência previne a morte destas células (Estella *et al.*, 2006).

Em células beta, durante o processo de insulite, células do sistema imune produzem citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1β, fator de necrose tumoral (TNF)-α e interferon (IFN)-γ, responsáveis por induzir a via de apoptose celular através da ativação de receptores responsáveis pela modulação de uma rede de genes sob controle dos fatores de transcrição fator nuclear kappa B (NF-κB) e o transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT-1) (Eizirik *et al.*, 2003). Mecanismos dependentes de NF-κB envolvem a produção de Óxido Nítrico (NO) e quimiocinas, além da depletação de cálcio do retículo endoplasmático (RE). Estes eventos geram estresse de RE e formação de MOMPs, culminando com a ativação da cascata de caspases e apoptose (Cnop *et al.*, 2005).

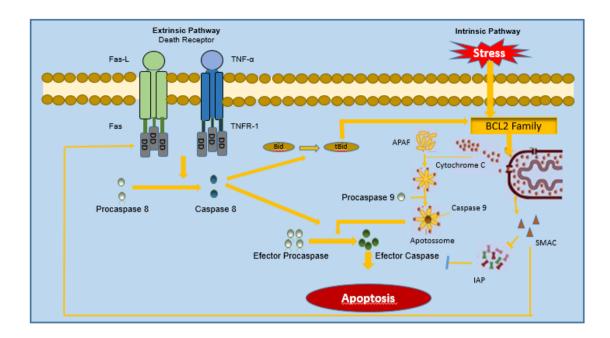


Figura 12. Mecanismos moleculares envolvidos na morte por apoptose.

Vários estímulos podem ser iniciadores do processo apoptótico: liberação de granzimas e perforinas por células T-citotóxicas, interações com os receptores da família TNF e FAS, lesões por radicais livres, toxinas ou radiação, deficiência do fornecimento de fatores de crescimento e hormônios; a razão entre a ação de membros da família BCL-2 pode determinar o início da apoptose. Uma vez que o citocromo c é liberado da mitocôndria, uma cascata de caspases é ativada, determinando a morte celular. Na apoptose, processo que envolve consumo de ATP e síntese de proteínas, não ocorre extravasamento de material, a célula se fragmenta em corpos apoptóticos, que são fagocitados por células vizinhas. (Figura do Acervo do Laboratório de Mecanismos de Morte Celular –LMMC).

#### 1.5- A função mitocondrial na células beta.

A integridade mitocondrial tem grande relevância em células beta. Mitocôndrias de células beta servem como integradoras dos níveis de nutrientes (glicose) e geram sinais para a secreção de insulina, sendo o ATP o principal (Wikstrom et al., 2012). A cadeia de transporte de elétrons é capaz de formar um gradiente de protóns que podem retornar à matriz mitocondrial por duas vias principais: o domínio Fo da ATPsintase (mecanismo acoplado à cadeia transportadora de elétrons, a qual é responsável pela formação do gradiente de prótons) ou através de não envolvem a síntese de ATP mecanismos que desacoplados) (Brand et al., 1999). Nesse caso, o consumo de oxígênio não está acoplado à produção de ATP (Figura 13).

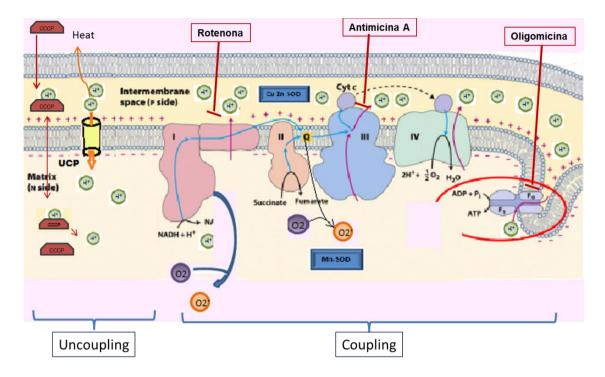


Figura 13. Fosforilação Oxidativa.

A Cadeia transportadora de elétrons é composta por quatro complexos (I- (NADHcoenzima Q oxidorredutase; II- Succinato- coenzima Q oxidorredutase; IIIcoenzima Q-Citocromo-c-oxidorredutase; IV- Citocromo-c oxidase), os quais recebem elétrons de NADH e FADH2, são responsáveis pela formação do gradiente de prótons no espaço intermebrana mitocondrial. No Complexo IV, o oxigênio é o último aceptor de elétrons. Esse gradiente de potencial eletroquímico formado pela diferente concentração de prótons é usado pela ATP sintase para a síntese de ATP via o seu domínio Fo e possibilita a síntese de ATP, permitindo assim, o acoplamento da síntese de ATP ao transporte de elétrons pela cadeia respiratória. O desacoplamento pode ocorrer quando prótons são transportados para a matriz passando por proteínas desacopladoras (UCPs). Neste processo não há a síntese de ATP, mas há dissipação de energia na forma de calor. Compostos químicos como CCCP (Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona) ou o DNP (2,4-Dinitrofenol) são ionóforos que promovem o desacoplamento. Há inumeros inibidores da cadeia, como Rotenona que inibe o Complexo I ou Antimicina A que inibe o Complexo III. Oligomicina pode inibir a porção FO da ATPsintase. Além disso, elétrons podem escapar da cadeia transportadora e dar origem a espécies reativas de oxigênio. As enzimas superóxido dismutases (SODs) fazem parte do sistema antioxidante celular (Adaptado de http://mundodabioguimica.blogspot.com/2014/06 20/06/2018 e Lehniger Principles of Biochemistry, Fifth Edition-© 2008 W. H. Freeman and Company).

O nível de descoplamento é um importante fenômeno biológico que reflete a eficiência bioenergética deste sistema. Para tanto, o consumo de oxigênio é sem dúvidas um dos parâmetros bioenergéticos mais informativos (Will *et al.*, 2007). No complexo IV o oxigênio é consumido em forma proporcional à extrusão de prótons. Portanto, o consumo de oxigênio

(respiração mitocondrial) reflete diretamente o fluxo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons.

Atualmente há muitas evidências que implicam a disfunção mitocondrial na insuficiência secretora de células beta, que envolvem por exemplo, mudanças na atividade de enzimas metabólicas e alteração da estrutura da organela (Mulder and Ling, 2009).

Recentemente tem sido mostrado que o perfil da respiração mitocondrial de ilhotas pancreáticas humanas, prévia ao transplante em animais modelo, poderia servir como um preditor do resultado do transplante. Resultados recentes mostraram uma correlação positiva entre uma boa função mitocondrial e sucesso no transplante (Sweet *et al.*, 2005, 2008; Papas *et al.*, 2007; Wikstrom *et al.*, 2012).

#### 1.6. Estresse Oxidativo e viabilidade de células beta.

Devido ao ambiente rico em elétrons e oxigênio da mitocôndria, muitas são as reações dentro do metabolismo aeróbio que podem formar espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Seja por vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons ou formado pela enzima NADPH oxidase, O<sub>2</sub> pode ser reduzido ao ânion radical superóxido (O<sub>2</sub>•··). Este radical pode ser dismutado pela superóxido dismutase (SOD) à peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Reações que envolvem Ferro (II) e Cobre (I) catalisam a formação do radical hidroxila (HO•) a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O HO• é o radical mais reativo encontrado *in vivo*. Ele é capaz de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e DNA (Barbosa, De Medeiros and Augusto, 2006) (**Figuras 13 e 14**).

Apesar de óxido nítrico (NO\*) ter papel essencial como molécula neurotransmissora e vasorreguladora, em excesso pode inibir a citocromo-c oxidase (Complexo IV), levando a um maior escape de elétrons. São várias as enzimas responsáveis por manter a homeostase redox nas células. Os principais mecanismos antioxidantes estão descritos na **figura 14**.

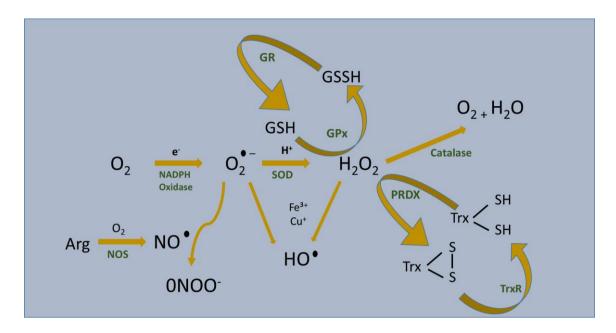


Figura 14. Esquema das reações e enzimas envolvidas no processo antioxidante celular.

Várias enzimas estão envolvidas na eliminação de peróxido de hidrogênio  $(H_2O_2)$  celular: catalase, glutationa peroxidase (GPx) e peroxirredoxinas (PRDX), as quais atuam em conjunto com as SODs. A catalase dismuta  $H_2O_2$  a água e oxigênio. A glutationa peroxidase remove  $H_2O_2$ em uma reação acopladaà oxidação de glutationa (GSH) ao dímero GSSG. Este processo é complementado pela enzima glutationa redutase (GR), a qual recicla GSSG a GSH. Já as peroxirredoxinas utilizam a proteína tiorredoxina (Trx) (a qual contém dois grupos tióis) como substrato. A tiorredoxina redutase (TrxR), converte a tiorredoxina oxidada de volta a sua forma reduzida. A NO Sintase (NOS) é uma enzima envolvida na produção de espécies reativas de nitrogênio. (adaptada de Barbosa et al. 2006).

Quando existe um desbalanço redox, isto pode implicar em dano de biomoléculas (DNA, proteínas e lipídios), que se não for reparado, pode levar à apoptose ou necrose celular.

Citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, TNF-a and IFN-γ induzem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) em células beta pancreáticas, levando por fim, à morte de células beta (Lenzen, 2008; Souza *et al.*, 2008). Além disso, citocinas pró-inflamatórias também modulam as vias apoptóticas por regularem a expressão e/ou atividade de enzimas antioxidantes, como a Manganês Superóxido Dismutase (MnSOD) e, em menor grau, catalase, além de fatores de transcrição, como STAT1 e NF-kB (Souza *et al.*, 2008; Ortis *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 2011).

## 1.7-Prolactina e o seu papel nas células beta.

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico, secretado pela adeno hipófise, constituída por uma cadeia de 198 aminoácidos, com peso molecular de 23 kDa (Lewis, Singh and Seavey, 1971), e tem estrutura similar a dos hormônios de crescimento (GH) e lactogênio placentário. Mais conhecida por controlar a secreção de leite durante o período de lactação, hoje sabemos que este hormônio tem ação sistêmica, incluindo seu efeito na reprodução tanto do ser humano quanto de outros mamíferos (Mathers et al. 1998; revisado por Verna et al. 2005). Além disso, atua de modo sinérgico com a progesterona e o estrogênio na promoção do crescimento e do funcionamento das glândulas mamárias e outros tecidos (Lewis et al. 1971; revisado por Verna et al. 2005). O receptor de PRL é um receptor expresso em diversos tecidos (Fagerberg et al., 2014)(Figura 15).

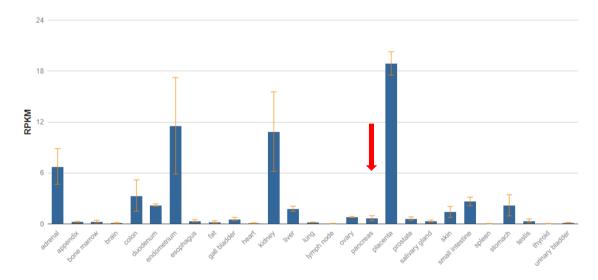


Figura 15. Distribuição tecidual do receptor de prolactina.

RNA-seq foi realizado a partir de amostras de 27 diferentes tecidos de 95 indivíduos humanos, a fim de determinar a especificidade tecidual de todos os genes codificadores de proteínas. O gráfico apresenta os resultados para o Receptor de Prolactina (PRL-R). A seta vermelha mostra resultado relativo ao pâncreas. RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) (Fagerberg et al., 2014; disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5618#gene-expression - acesso em 13/06/2018).

Parece que na ilhota pancreática, dependendo do organismo estudado, somente células beta possuem o receptor de prolactina (PRL-R)

(Weinhaus *et al.*, 2000; Brelje *et al.*, 2002). Além disso, tanto ilhotas como várias linhagens derivadas de insulinomas murinos e humanos expressam o receptor de prolactina (Galsgaard *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2001; Wailemann et al., 2018).

A sinalização dependente de PRL ocorre na forma de dimerização do receptor de membrana induzida pelo ligante. O receptor de PRL (PRL-R) não apresenta atividade intrínseca de tirosina quinase, no entanto, o processo de dimerização leva à ativação da tirosina quinase associada a ele, Janus Kinase (JAK). Modificações conformacionais induzidas no PRL-R após a ligação do hormônio promovem a ativação e autofosforilação das JAKs. Uma vez ativadas, estas quinases catalizam a fosforilação do PRL-R, assim como o recrutamento e a fosforilação de proteínas da família Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) (Nielsen et al., 2001). A proteína Janus kinase 2(JAK2) foi identificada como a principal quinase associada com o PRL-R (Rui, Kirken and Farrar, 1994; Han et al., 1997). Eventos de splicing alternativo podem originar diferentes isoformas do PRL-R, as quais podem modular efeitos tanto endócrinos como autócrinos da PRL, em tecidos normais e câncer. Os fatores de transcrição associados a esta via (JAK/STAT) após fosforilados, dimerizam e são translocados para o núcleo, associados ou não a outros fatores. No núcleo, ligam-se a sequências consenso específicas do DNA nos promotores dos genes-alvo, assim regulando a transcrição (Schindler and Darnell, 1995) (Figura 16).

Muitos estudos mostram a ativação e caracterização desta via em células beta de roedores (Stout, Svensson and Sorenson, 1997; Brelje *et al.*, 2002, 2004) e em ilhotas pancreáticas humanas com aumento dos níveis proteicos e ativação de JAK2, STATs 1, 3 e 5 na presença de PRL (Labriola et al., 2007b).

Estudos demonstram que o tratamento de células beta com PRL em concentrações que se correspondem com as encontradas no plasma de mulheres durantes o terceiro trimestre da gravidez podem induzir um aumento da secreção de insulina, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Brelje *et al.*, 1989, 1993; Weinhaus, Stout and Sorenson, 1996; Nielsen *et al.*, 2001; Weinhaus *et al.*, 2007). Em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas, o tratamento com PRL induz o aumento do número de células

beta, bem como da produção, estocagem e liberação basal de insulina (Labriola et al. 2007a).

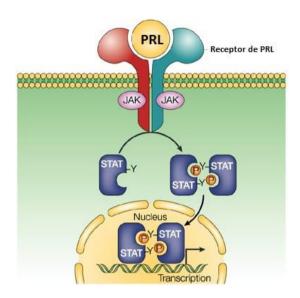


Figura 16. Representação esquemática da ativação do receptor de PRL.

Após PRL se ligar ao receptor de prolactina (PRLR), este dimeriza, o que leva à fosforilação da proteína Janus Kinase 2 (JAK2), constitutivamente associada ao receptor. Este processo leva à fosforilação, dimerização e translocação nuclear de proteínas da família Signal transducer and activator of transcription (STAT). Estes dímeros, ligam-se a sequências consenso específicas do DNA nos promotores de genes-alvo, regulando assim a sua transcrição (Adaptado de Shuai & Liu 2003).

O uso de PRL em culturas primárias de ilhotas de camundongos e em células de insulinoma de rato INS-1 promoveu a citoproteção contra morte induzida por estreptozotocina (STZ), um composto que causa necrose nas células beta, e por Dexametazona (DEX), ativador da via intrínseca da apoptose (Weinhaus *et al.*, 2000; Fujinaka *et al.*, 2007).

Apesar de PRL ser capaz de ativar várias vias de sinalização, somente quando houve a inibição de JAK2 com AG490 a citoproteção induzida por PRL foi completamente perdida em INS1 quando tratadas com DEX. Estes resultados foram confirmados por siRNA contra JAK2 (Fujinaka *et al.*, 2007). O uso de inibidores específicos para as proteínas PI3K (inibidor Wortmannin), *Extracellular signal-Regulated kinase1/2 -* ERK1/2 (inibidor PD98059) não inibiram o efeito citoprotetor do hormônio. Ainda,

investigando a via JAK/STAT em cultura primária de ilhotas pancreáticas de camundongo que expressam uma variante de STAT5a truncada, que bloqueia a via de sinalização de STAT5, o efeito citoprotetor da PRL também foi perdido após indução de morte das células beta com DEX. Através de siRNA para  $Bcl-x_L$  foi percebido que esta proteína é necessária, ao menos em parte, para a mediação do efeito citoprotetor de PRL em células INS-1 tratadas com DEX (Fujinaka *et al.*, 2007).

Resultados prévios do nosso laboratório descreveram pela primeira vez em ilhotas humanas, tanto a ativação de JAK2, STAT 1, 3 e 5 induzida por Prolactina recombinante humana (rhPRL), quanto os significativos efeitos benéficos da ação de rhPRL na proliferação e função secretória de culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas (Labriola *et al.* 2007a). Ainda, nosso grupo tem mostrado que o aumento da sobrevivência destas células induzido pela ação da PRL está envolvido, ao menos em parte, com a inibição da via de morte celular controlada por membros da família de genes BCL2 (Terra *et al.*, 2011).

Mostramos também que células MIN6, provenientes de insulinoma murino, tratadas com PRL apresentam proporção significativamente menor de núcleos fragmentados após o tratamento com citocinas pró-inflamatórias, quando comparado com as células controle (Mansano, 2013; Wailemann et al., 2018). Nas culturas pré-tratadas com PRL, proteínas pró-apoptóticas (Smac, Caspases -8, -9 e -3, Bax) tiveram sua expressão ou ativação diminuídas e proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL) tiveram sua expressão aumentada quando induzidas à morte por um coquetel de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, INF-γ e TNF-α) que, de acordo com a literatura, possuem alta atividade citotóxica em células beta (Mizuno et al., 1998; Ortis et al., 2008; Kim and Lee, 2009; Terra et al., 2011). Ainda, a via canônica da PRL (JAK2/STAT) está envolvida no processo de citoproteção em células MIN6, uma vez que sua inibição pelo inibidor farmacológico de JAK2, AG490, promoveu o desaparecimento deste efeito (Mansano, 2013; Wailemann et al., 2018). Estes resultados validaram o modelo de células MIN6, pois foram similares aos obtidos em cultura primária de ilhotas humanas (Terra et al., 2011)

Os mecanismos envolvidos na ação da prolactina em células beta, ainda não foram completamente elucidados. No entanto, a partir de um estudo de expressão proteica comparativa, por eletroforese bidimensional acoplada a espectroscopia de massa, entre ilhotas humanas, provenientes de doadores adultos, mantidas na presença ou ausência de rhPRL, foram gerados dados sobre o padrão do perfil de expressão proteica diferencial destas células nestes dois contextos. Dentre as proteínas que apresentaram expressão diferencial, encontra-se a HSPB1, uma proteína que pertence à família das pequenas proteínas de choque térmico ("Small Heat Shock Proteins" ou sHSPs) (Labriola et al. 2007b). Cabe salientar que esta proteína possui efeitos anti-apoptóticos no contexto de diversos tipos de células tumorais (Landry et al., 1989; Concannon, Gorman and Samali, 2003).

#### 1.8-Heat Shock Proteins

A família de proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein – HSP) é composta por um grande número de proteínas que tem sua expressão e ativação aumentadas frente ao estresse celular. Este estresse pode ser causado por uma variedade de fatores como temperaturas elevadas, redução na suplementação de oxigênio, agentes infecciosos, substâncias tóxicas ou mediadores inflamatórios (Van Montfort, Slingsby and Vierling, 2001; Haslbeck *et al.*, 2005; Acunzo, Katsogiannou and Rocchi, 2012). Claramente isso reflete uma resposta celular direcionada ao reparo de danos induzido por estas condições (Van Noort *et al.*, 2012).

HSPs são altamente conservadas e estão presentes em todas as células de todos os organismos. HSPs são também conhecidas como chaperonas (do francês *chaperone*, "dama de companhia"), desempenham um papel fundamental no dobramento/desdobramento de proteínas, formação de complexos proteicos, transporte e separação de proteínas destinadas aos compartimentos subcelulares corretos, sinalização e controle do ciclo celular, proteção contra estresse e, mais recentemente descrita, a sua função de participar do processo de apresentação de antígenos (Li and Srivastava, 2004).

Por tradição estas HSPs têm sido classificadas em diferentes famílias de acordo com seu peso molecular aproximado: hsp10, hsp 27, hsp40, hsp60, hsp70, hsp90, entre outras. Para as HSPs humanas recomenda-se que o termo "HSP" seja usado para referir-se a proteínas de choque térmico em geral, incluindo pequenas e grandes HSPs. Enquanto que para a família das pequenas HSPs (short HSPs (sHSPs)) como a HSP27 fosse adotado o termo de família HSPB (Van Noort *et al.*, 2012). Assim, pela nova nomenclatura HSPB1 representa tanto HSP27 humana, como HSP25 murina.

# 1.8.1- Small Heat Shock Protein (sHSP ou HSPB)

Pequenas proteínas de choque térmico (sHSPs ou HSPBs - 20 a 40KDa) estão presentes de procariontes a mamíferos (Arrigo and Mehlen, 1994), sendo a mais difundida família de chaperonas moleculares. O genoma humano codifica dez membros da família das sHSPs (HspB1– HspB10), com diferenças no tamanho e na sequência das regiões N- e C-terminal. sHSPs compartilham um domínio homólogo com a proteína a-cristalina dos olhos de vertebrados, além de um motivo hidrofóbico WDPF e sítios de fosforilação não tão conservados. (**Figura 17**) (Acunzo *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2010).

Mesmo não sendo altamente conservadas, HSPBs mantém as seguintes características estruturais e funcionais: baixa massa molecular de 17 a 28,4 KDa; domínio a-cristalino conservado com aproximadamente 90 resíduos; capacidade de formar grandes oligômeros; estrutura quaternária dinâmica e indução por condições de estresse (Acunzo, Katsogiannou and Rocchi, 2012). Em alguns modelos, sua expressão é regulada por estrógenos e progesterona (Ciocca et al., 1983).

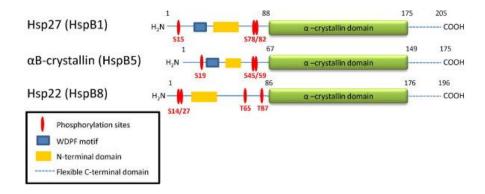


Figura 17. Representação esquemática de estruturas de HSP27 (HSPB1), HSP22 (HSPB8) e αB-cristalina (HSPB5).

Indicação do domínio N-terminal, o domínio flexivel C-terminal, domínio WDPF (região rica em Prolina e Fenilalanina envolvida no processo de oligomerização com regiões hidrofóbicas do domínio a-cristalino) e o domínio cristalino, tão bem quanto os sítios de fosforilação em Serina (S) e Treonina (T) (Thériault *et al.*, 2004; adaptado de Acunzo et al., 2012).

Ao contrário das HSPs, as sHSPBs ou HSPBs são chaperonas ATP-independentes, capazes de formar complexos oligoméricos de até 800 KDa, resultado da interação de domínios α-cristalinos de unidades distintas, formando hetero ou homodímeros, que são a base molecular do complexo oligomérico (Lentze and Narberhaus, 2004; Acunzo, Katsogiannou and Rocchi, 2012). Além de sua função como chaperonas, ainda desempenham um papel fundamental na sobrevivência celular, pois têm sua expressão aumentada em condições que desencadeiam apoptose (Li and Srivastava, 2004; Haslbeck *et al.*, 2005; Catherine Paul *et al.*, 2010; Acunzo, Katsogiannou and Rocchi, 2012).

### 1.8.2- Heat Shock Protein B1 (HSPB1)

HSPB1 foi descrita em 1980 quando culturas de células HeLa, cultivadas em alta temperatura, apresentaram a produção de uma desconhecida proteína com peso molecular de 27 KDa (Hickey and Weber, 1982). HSPB1 é expresso em todos os tecidos humanos, principalmente em músculo cardíaco, esquelético e liso (Sugiyama *et al.*, 2000). A regulação da transcrição de genes de choque térmico é mediada pelo ativador transcricional Heat shock transcription factor (HSTF ou HSF). Este fator está

constitutivamente localizado no citoplasma e no núcleo de células não estressadas na forma de monômero e sem atividade de ligação com o DNA. Através de um desconhecido sinal gerado durante o estresse, HSTF1 tornase ativado, localizado no núcleo em estado triméricoque e capaz de se ligar a elementos de resposta (*stress response elements- SRE*) no DNA (Huang *et al.*, 1997).

A estrutura primária da HPSB1 é altamente homóloga a outros membros da família de sHSP, contendo o conservado domínio α-cristalino e diferindo nas regiões C- e N-terminais. A proteína humana apresenta sítios de fosforilação caracterizados pelas Serinas 15, 78 e 82, além da Treonina 143, o que permite diferentes padrões de fosforilação e oligomerização, importantes para a função destas proteínas (**Figura 17**).

Quando na forma de grandes oligômeros, HSPB1 possui atividade chaperona, prevenindo agregação de proteínas parcialmente desnaturadas ou impropriamente dobradas que serão ou processadas por HSPs ATP-dependentes (Bryantsev *et al.*, 2007), degradadas pela ubiquitina via proteassomo (McDonough and Patterson, 2003) ou pela via autofágica (Nivon *et al.*, 2009) (revisado por Catherine Paul *et al.*, 2010).

Entre as vias de morte celular, HSPB1 participa principalmente na regulação de apoptose. De fato, esta proteína pode prevenir apoptose por proteção celular contra choque térmico, efetores de apoptose, estresse oxidativo e isquemia, de forma indireta inibindo a formação de MOMP ou direta, por exemplo, sequestrando citocromo-C, quando liberado no citosol em modelos tumorais (Garrido *et al.*, 1999, 2006; Bruey, Ducasse, *et al.*, 2000; Arrigo, 2007).

Em um estudo de sobrevivência celular, Landry e colaboradores (1989) foram os primeiros a demonstrar a relação entre HSPB1 e a termorresistência. Mais tarde, o efeito citoprotetor desta proteína foi demonstrado contra vários efetores apoptóticos (Mehlem, Schulze-Osthoff and Arrigo, 1996), que atuam por diferentes vias. Em modelos tumorais sabe-se que HSPB1 tem sua expressão e atividade aumentadas e isto está relacionado à inibição de apoptose (Concannon, Gorman and Samali, 2003). Ainda, a superexpressão desta proteína em modelos tumorais expostas a

estímulos citotóxicos como estresse oxidativo tem papel citoprotetor (Huot et al. 1991; Préville et al. 1999; Mehlen et al. 1993). Pequenos oligômeros podem ainda ser importantes para a manutenção da integridade do citoesqueleto (Lavoie *et al.*, 1995; Huot *et al.*, 1996; Mounier and Arrigo, 2002; Goldbaum *et al.*, 2009; C Paul *et al.*, 2010; Acunzo, Katsogiannou and Rocchi, 2012).

Já foi demonstrado que a proteção dos transplantes de pulmão por HSPB1 contra a rejeição crônica é baseada na inibição da apoptose e na defesa do citoesqueleto contra a destruição, proteção dos vasos sanguíneos e na modulação dos genes antioxidantes (Santana-Rodríguez *et al.*, 2012). Mesmo que esteja bem descrito que o estresse oxidativo está diretamente implicado na morte das células beta, atualmente não há dados mostrando um efeito restaurador da PRL na homeostase redox das células beta e se a HSP estaria relacionada a ela.

Existem poucos relatos na literatura sobre o papel de HSPB1 nas ilhotas pancreáticas. Dai e colaboradores (2009) mostraram que ilhotas pancreáticas de camundondo superexpressando HSPB1 são mais resistentes à morte quando estes são tratados com doses de STZ (Dai *et al.*, 2009). Mais, Mastrocola e colaboradores (2012) mostraram que houve um aumento significativo na expressão de HSPB1 no hipocampo de animais diabéticos. Este efeito ocorre em paralelo com o aumento na expressão e atividade de iNOS e de SOD. Como esses efeitos ocorrem em um mesmo tipo celular, o autor sugere um papel citoprotetor mediado por HSPB1 contra estresse oxidativo induzido por diabetes e morte neuronal. Além disso, nosso laboratório mostrou o aumento da expressão desta proteína em ilhotas pancreáticas humanas na presença de prolactina (Labriola et al. 2007b).

No intuito de entender os mecanismos de citoproteção mediados por PRL em células beta, utilizamos uma linhagem de células MIN6 silenciadas para HSPB1. Foi possível determinar que o silenciamento de HSPB1 inibiu a citoproteção induzida por PRL. (Mansano, 2013; Wailemann *et al.*, 2018). O aumento nos níveis de proteínas antiapoptóticas e diminuição dos níveis e ativação de proteínas pró-apoptóticas observado em células controle quando pré-tratadas com o hormônio e um coquetel de citocinas pró-

inflamatórias foi abolido nas células silenciadas para HSPB1(Mansano, 2013; Wailemann *et al.*, 2018). Estes resultados mostram que HSPB1 seria uma proteína chave na citoproteção induzida por PRL.

Além disso, a cinética dos níveis de expressão de HSPB1 e HSTF1 foi estudada em culturas de ilhotas pancreáticas humanas, mostrando que enquanto HSTF1 apresenta um aumento significativo nos níveis proteicos após 10min de tratamento com PRL, HSPB1 alcançou seu nível máximo após 2h do tratamento hormonal (Mansano, 2013). Adicionalmente, foi detectado um aumento significante nos níveis de fosforilação de STAT1 e de p38, após 10min, atingindo o pico de fosforilação após 30min do tratamento com PRL (Labriola, *et al.*, 2007b). No geral, esses resultados podem nos levar a propor a hipótese de que, ao se ligar ao seu receptor, a PRL seria capaz de induzir uma ativação rápida e transitória de uma resposta de estresse, incluindo o aumento da via de sinalização de HSF1.

Diante deste panorama, entender efetivamente os mecanismos moleculares mediadores da citoproteção de células beta pancreáticas induzidos por Prolactina, com especial atenção ao papel de HSPB1 neste contexto é de extrema relevância. Não existem ainda reporters em modelos de células beta sobre se HSPB1 estaria envolvida em outros processos celulares, como metabolismo e a sua função secretória. Visto que quanto mais viáveis e funcionais as ilhotas pancreáticas estiverem, maior será o sucesso do transplante de ilhotas, este projeto visa também a elucidar esses pontos.

**Objetivos** 

#### 2- OBJETIVO GERAL

Estudar o papel da HSPB1 em células beta pancreáticas como uma das mediadoras dos efeitos do hormônio lactogênico prolactina (PRL).

#### 2.1-Estratégias

- Superexpressar em células MIN6 (MIN6-se) e reexpressar em células MIN6 silenciada (MIN6-shse) HSPB1 humana.
- Silenciar e Superexpressar HSPB1 em cultura primária de Ilhotas pancreáticas murinas (I-sh e I-se).
- Encontrar possíveis mediadores da função de HSPB1 via estudo do interatoma.
- Verificar o perfil de secreção de insulina frente a estímulos de baixa e alta glicose.

**Materiais e Métodos** 

#### **3-MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1-Culturas celulares

#### 3.1.1-Isolamento e Manutenção de Ilhotas Humanas

Pâncreas humanos de doadores com morte cerebral (idade média entre  $43 \pm 4$  anos, n = 6). Os dados dos doadores estão incluídos na **Tabela 3** e foram removidos de acordo com os regulamentos brasileiros e o comitê de ética institucional local. Ilhotas pancreáticas foram isoladas de acordo com o método automatizado de Ricordi *et al.*(1988) com modificações (Shapiro *et al.*, 2000). As culturas primárias de ilhotas (viabilidade:  $78 \pm 4\%$ ; pureza: e  $90 \pm 4\%$ ) foram mantidas por 24-48 h em meio CMRL 1066 (5,6 mmol / L de glicose) (Mediatech-Cellgro, Miami, FL, EUA) suplementada com 100 unidades / mL de penicilina (Affymetrix, Cleveland, OH, EUA) e 5% SFB (vol / vol) (Cultilab, Campinas, Brasil).

Tabela 3. Dados dos doadores de Ilhotas Humanos.

Isolamento	Idade	Gênero	IMC	Isquemia Fria (h)	Pureza (%)
1	48	M	19	7	90
2	52	M	23	7	90
3	33	M	29	9	90
4	55	Н	28	8	90
5	33	M	29	8	85
6	37	Н	25	6	95
Mean±SEM	43±4		26±2	8±1	90±1

M, Mulher; H, Homem;

IMC: Índice de Massa Corporal

#### 3.1.2-Culturas primárias derivadas de insulinomas humanos.

Culturas primárias de dois insulinomas (células APM e CPR) e de uma nesidioblastose (células VGA) humanos foram obtidas de pacientes independentes após ressecção cirúrgica e processamento tecidual conforme

anteriormente descrito (Labriola *et al.*, 2009). As células foram mantidas em meio CMRL 1066 suplementado com ITS (10 mg / L de insulina, 5,5 mg / L de transferrina, 0,0067 mg / L de selenito de sódio, 2 mg / L de etanolamina; GIBCO Corporation, Carlsbald, CA, EUA), estreptomicina (100 unidades / mL; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), ampicilina (100 U / mL; todas da Sigma-Aldrich) e 10% SFB (Terra *et al.*, 2013).

#### 3.1.3-Isolamento e cultura de ilhotas pancreáticas murinas.

Foram utilizados camundongos machos BALB/c, oriundos do biotério da Faculdade de Medicina (Universidade de São Paulo - USP) e mantidos em gaiolas (365x207x140mm) no Biotério do Instituto de Química, USP. O isolamento de ilhotas pancreáticas foi realizado conforme a técnica descrita em Ricordi & Rastellini 2000, com algumas modificações. Brevemente, após animal com ketamina (0,1)anestesia do mq/q do Vetanarcol<sup>®</sup>/Konig) e xilazina (0,01 mg/g - Kensol<sup>®</sup>/Konig), através de uma incisão abdominal, o pâncreas é exposto e são infundidos pelo ducto pancreático 3 mL de solução 0,75mg/mL de Liberase RI (Sigma) em tampão salino de Hanks. O pâncreas é então removido cirurgicamente, incubado a 37°C por 20 minutos para que ocorra a digestão do tecido. Após esse período de tempo o material digerido é passado através de um filtro de poro 500µm. As ilhotas foram separadas do restante do tecido pancreático através de processo de handpicking realizado com auxílio de lupa estereoscópica. Para padronizar a massa de ilhotas, um equivalente ilhota (IE) foi considerado como ilhotas com 100-125µm de diâmetro. A cultura das ilhotas foi realizada em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% SFB, 2 mM glutamina, 100U/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina e HEPES (25mM) (ácido 4- (2-hidroxietil)-1-piperazineetane-sulfônico) a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal do Instituto de Química da Universidade de São Paulo em 11/03/2016 (processo n º 42/2016) e seguem todos os regulamentos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Após a separação do tecido exócrino, as ilhotas foram plaqueadas de acordo com o desenho experimental e mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% SFB, 2 mM glutamina, 100U/mL penicilina,  $100\mu g/mL$  estreptomicina e HEPES (25mM) a 37°C em incubadora com umidade controlada e ambiente contendo 5% de  $CO_2$  até dispersarem espontaneamente.

#### 3.1.4-Linhagens celulares.

A linhagem derivada de um insulinoma murino MIN6, responsiva ao aumento de glicose com consequente liberação de insulina(Ishihara et al., 1993) foi mantida em meio de cultura RPMI (desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) com suplementação de 10% de SFB, L-glutamina (2mM) (Sigma), 100U/mL de Ampicilina, 100U/mL de Estreptomicina, 10mM HEPES (ácido 4- (2hidroxietil)-1-piperazineetane- sulfônico) (Sigma), em estufa a 37°C, com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias de cultivo. Ao atingirem, aproximadamente, 80% da densidade de saturação, as células foram destacadas com solução contendo 1mg/mL de tripsina e 1mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), lavadas e ressuspendidas em meio fresco. Os estoques celulares foram mantidos nos respectivos meios de cultura com concentração final de 40% de SFB e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) estéril e armazenadas a -80°C.

Com a finalidade de verificar o papel da chaperona HSPB1 no contexto do diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), foram geradas culturas celulares silenciadas (Mansano, 2013) ou superexpressando a chaperona HSPB1 (Wailemann et al., 2018). Então, culturas celulares derivadas de culturas primárias de ilhotas pancreáticas murinas dispersas (I) e de insulinoma de camundongo MIN6 parental silenciadas para HSPB1 (I-sh HSPB1 e MIN6-shHSPB1) ou controles que expressam um shRNA não específico (I-sc1, MIN6-sc1 e -sc2). Além de culturas superexpressando (I-oeHSPB1, MIN6-oeHSPB1, MIN6-oHSPB1) ou reexpressando HSPB1 humana (MIN6-shHSPB1-oeHSPB1) ou vetor vazio (MIN6-Vec), mais culturas celulares que expressam a proteína *Green Fluorescent Protein* (I-GFP e

MIN6-GFP) (obtidas como descrito abaixo) foram utilizadas como controle e mantidas como descrito acima.

Células derivadas de rim embrionário humano 293T (ATCC#CRL-3216) foram mantidas em meio DMEM (Life Technologies) suplementado com 10% SFB, 100unidade/mL de antibiótico (Ampicilina/Estreptomicina), 10 mmol/L de HEPES.

As linhagens celulares foram periodicamente submetidas à PCR, bem como aos testes de contaminação por micoplasma utilizando marcação com Hoechst 33342 (HO) -  $10\mu g/mL$ , e foram utilizadas apenas se os resultados dos testes fossem negativos.

#### 3.2-Silenciamento da proteína HSPB1 murina

Para a inibição da expressão de HSPB1 foi utilizada a metodologia de RNA de interferência, por meio da transdução de células MIN6 com vetores lentivirais, detentores de sequências siRNA específicas para a inibição desta proteína, seguindo o protocolo descrito por Tiscornia e colegas (Tiscornia et al. 2006a; Tiscornia et al. 2006b). Uma mistura de três a cinco sequências de siRNA distintas e específicas foram usadas para a inibição de HSPB1. Como controle, foram geradas células transduzidas com a sequência de siRNA scramble (scramble A, scramble B, scramble C, scramble D e scramble- eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)).

Os vetores de expressão para as sequências HSPB1 siRNA (m): SC-35598 e siRNA SC-35598A, SC-35598B, SC-35598C e SC- eGFP utilizados, fazem parte do sistema siRNA - Santa Cruz Biotechnology, INC (Santa Cruz, CA, USA). Os vetores de expressão para a sequência shRNA scramble D faz parte do sistema Mission® shRNA (SigmaAldrich), os vetores estruturais (pMDL, pRev and pVSVG) fazem parte do sistema descrito por Tiscornia e colegas (2006b). Com este intuito, foram geradas as partículas virais recombinantes, por meio de transfecção da linhagem empacotadora HEK 293T. Para cada uma das construções de interesse, no primeiro dia foram plaqueadas 1 x 10<sup>6</sup> células 293T por poço de 34,8mm de diâmetro, em meio de cultura DMEM 10%Hyclone SFB (Thermo Scientific). Após 24h, o

meio de cultura de cada poço foi trocado (1,5mL de DMEM 10% Hyclone SFB). Duas soluções foram preparadas: a) em 250µL de meio de cultura DMEM sem soro adicionou-se 10uL de Lp200 (Lipofectamina, Invitrogen) ou 15,3 µL Polietilenoimina, Linear (PEI, Linear; Sigma-Aldrich). A solução ficou incubada por 5min a temperatura ambiente. b) em 250µL de meio de cultura DMEM sem soro adicionou-se 0,7µg do vetor estrutural pMDL (0,96µL), 0,275µg do vetor estrutural pREV (0,356µL), 0,385µg do vetor estrutural pVSVG (0,386µL) e 1,1 µg do vetor de interesse. As duas soluções foram misturadas e incubadas por 20min a temperatura ambiente. Após este tempo, 5µL da mistura foi adicionada ao respectivo poço com células 293T. Após 5h, o meio de cultura destas células foi trocado por DMEM 10% Hyclone SFB. As coletas de meio contendo as partículas virais foram realizadas após 24h, 48h, 72h e 96h. As alíquotas foram conservadas em ultrafreezer a -80°C. Para a infecção, 5x10<sup>4</sup> células MIN6 foram plaqueadas em poços de 6,4mm de diâmetro (triplicata por tipo de shRNA), em meio RPMI contendo 10% SFB sem antibiótico e com polibreno (10µg/mL). As multiplicidades de infecção (MOI) utilizadas foram: MIN6shHSP25 4,4, MIN6-sh-scrambleA 4,6, MIN6sh-scrambleB 1, MIN6shscrambleC 3,4), com polibreno (10µg/mL), por 16h em culturas derivadas das células MIN6 de modo que o volume final de cada poço foi de 200µl e mantidas na estufa a 37°C. Após esse período, foi feita a troca de meio para RPMI 10% SFB. Após a recuperação das células estas foram transferidas para garrafas com área de 25 cm<sup>2</sup> e mantidas em cultura até atingirem confluência de 70%. Um mínimo de duas seleções das células transduzidas foram realizadas pela adição de 6 μg/mL de puromicina por 7 dias. O protocolo de padronização está descrito em Mansano (2013).

Culturas primárias de ilhotas pancreáticas murinas foram isoladas e plaqueadas, em poços de 6,4mm de diâmetro (triplicata), em meio RPMI contendo 10% SFB. Após as ilhotas estarem dispersas foram tranduzidas utilizando vírus na diluição1:10(v/v), em meio RPMI livre de antibiótico, contendo polibreno (10µg/mL) por 20 min, mantidas na incubadora a 37°C. Após esse período, foi feita a troca de meio para RPMI 10% SFB. Após 24 h da transdução foram feitos os tratamentos como descrito no item 3.2.

# 3.3- Superexpressão da proteína HSPB1 humana por transfecção plasmidial

A transfecção de *pEGFP-hsp27 plasmid* (17444 ISHO; Addgene, Cambridge, MA, USA) (Voss *et al.*, 2007) foi realizada usando o carregador lipídico Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). O complexo Lipideo-DNA foi formado em Opti-MEM (Invitrogen) em uma proporção de 0.2 µl of Lipofectamina para 400 ng de plasmídeo, a temperatura ambiente por 20 minutos e depois adicionado às células em meio livre de antibiótico por 16h. A eficiência da superexpressão foi validada por Western blot (WB). Os experimentos foram realizados 24h depois de realizada a transfecção nas diferentes linhagens celulares utilizadas.

#### 3.4- Tratamentos celulares

Para os experimentos com rhPRL, as células foram mantidas em meio RPMI suplementado como descrito acima, até atingirem 70% de confluência e, posteriormente, privadas de soro (0,1% SFB) por 24h, pré-tratadas ou não com PRL (300 ng/mL; Peprotech, México DF, México) por 30 min, e mantidas por 16h para Ilhotas pancreáticas e 24h para MIN6 em meio RPMI contendo 0,1% SFB no caso da morte induzida por privação de soro. Para o caso da apoptose induzida por citocinas, além de rhPRL, as células foram incubadas, com TNFa (8ng/mL), INFy (4ng/mL) e IL-1 $\beta$ (0,8 ng/mL) (Peprotech, México DF, México) pelos tempos indicados na seção resultados e nas legendas das respectivas figuras. Também foi utilizado o indutor de estresse do retículo endoplasmático Tapsigargina (TAG – 75 nM; Sigma Aldrich) por 24h. Células mantidas em RPMI suplementado com 10% SFB foram usadas como controles positivos de viabilidade.

Para os experimentos relacionados com estresse oxidativo, as células foram plaqueadas em diferentes concentrações de acordo com o desenho experimental, por 24h como descrito acima. Os tratamentos com coquetel de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , 0,8 ng / mL; TNFa, 8 ng / mL; IFN- $\gamma$ , 4 ng / mL) foram mantidos por 6 h. Tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 - 100  $\mu$ M; Merck, Darmstadt, Alemanha) ou menadiona (0 - 20  $\mu$ M, Sigma-Aldrich) foram realizados em solução de Krebs-Ringer por 2 h. Incubações com D-

alanina (0 - 20 mM, Sigma-Aldrich) por 24 h em meio RPMI. Os tratamentos com PRL (300 ng / mL) foram iniciados 30 minutos antes da adição de citocinas ou indutores de estresse oxidativo e mantidos durante a duração do tratamento.

#### 3.5-Extrato protéico celular total

Dois métodos foram utilizados para obtenção dos extratos proteicos totais.

- (A) Para obtenção do extrato celular protéico total, foi feita a coleta das células em monocamada por raspagem a 4°C com PBSA (Phosphate-Buffered Saline), na presença de um coquetel de inibidores de protease (04.693116001, Roche) e de fosfatase (p5726, Sigma Aldrich). O extrato celular foi centrifugado a 0,8xg durante 3min a 4°C, e o precipitado foi ressuspendido em tampão de lise (10mM de tris pH 7,5; 150mM de NaCl; 5mM de EDTA; 1mM de EGTA; 1% de NP-40; 0,1% de SDS; contendo o coquetel de inibidores de proteases e de fosfatases) a 4°C. Este lisado foi centrifugado a 13400xG por 30 min a 4°C para clarificação e as proteínas presentes no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).
- (B) Após o teste de viabilidade, os poços foram lavados com PBSA gelado (1x) e depois foram acrescentados 40μL da solução de lise (HEPES (10mM); SDS (1%); MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (1,5mM); KCL (10mM); DTT (1mM); NP-40 (0,1%) e H<sub>2</sub>O) incubados em gelo por 20 min sob agitação. Os poços foram então raspados com uma ponteira de pipeta automática e o extrato celular foi coletado.

O material está armazenado à -80°C.

#### 3.6-Estudo de expressão de proteínas por Western Blot.

Uma quantidade de 100µg de proteínas totais das provenientes dos lisados proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida homogêneo (7,5; 8; 10 ou 12%). As amostras foram desnaturadas em banho seco a 99°C por 5 min em tampão de amostra 5X (TrisHCL 50mM pH 6.8; SDS 2% m/v; glicerol 10% v/v; betamercaptoetanol 5% v/v; Azul de bromofenol 0,3% m/v) e logo após aplicadas ao gel de poliacrilamida. As proteínas fracionadas após o SDS-PAGE foram eletrotransferidas dos géis para membranas de PVDF (Fluoreto de polivinilideno) ativadas em metanol, por transferência úmida, em tampão de transferência contendo 0,3% de Tris-Cl (p/v), Glicina 1,44% (p/v), SDS 0,1% (v/v) e metanol 20% (v/v), a 300mA, 4°C por 2h. As membranas foram bloqueadas em uma solução de bloqueio (PBSA contendo 5% de leite desnatado ou 5% de BSA contendo 0,1% de Tween 20 ou Bloqueio Vegetal (Starting Block (PBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific)) contendo 0,05% de Tween 20), a 4°C durante 18h. Após esse período as membranas foram lavadas com PBSA contendo 0,1% de Tween 20, 3 vezes por 10 min cada vez. Após as lavagens, as mesmas foram incubadas por 2h, ou por mais 18h, sob agitação e a temperatura ambiente ou a 4°C, respectivamente, com uma solução de anticorpo primário. Nos ensaios de Western blot, foram utilizados os anticorpos descritos na tabela 4.

Após este período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min cada com PBSA contendo 0,1% de Tween 20 e, então, incubadas por 1h a temperatura ambiente com anticorpo secundário apropriado, conjugado à peroxidase HRP (horseradish peroxidase) (Vector Laboratories ou Life Technologies). Em seguida, as membranas foram lavadas 2 vezes por 10 min cada com PBSA contendo 0,1% de Tween 20 e 1 vez por 10 min com PBSA e reveladas através do sistema quimioluminescente (kit ECL Plus de GE Healthcare, Freiburg, Germany)/ kit Immobilon®substrates de Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Como controle, após a remoção dos anticorpos, as membranas foram retestadas com anticorpos normalizadores (anti-actina; anti-alfa-tubulina; anti-betatubulina). A densitometria quantitativa foi realizada usando o Chemilux Imager (Intas Science Imaging, Göttingen, Alemanha) e o software ImageJ (National Institutes of Health). A densidade volumétrica das bandas

quimioluminescentes foi calculada como densidade óptica integrada × mm² após correção de fundo.

Tabela 4. Lista de anticorpos primários utilizados para detecção dos níveis de proteínas por Western blot (WB).

Anticorpo	Nº de	
·	catálogo	Fabricante
rabbit polyclonal anti-catalase rabbit polyclonal antibody for the detection of the	100-4151 600-401-	Rockland
FLAG conjugated DAAO protein	383	Rockland
rabbit polyclonal anti-Hsp27	ab5579	Abcam
mouse monoclonal [G3.1] anti- HSP27	ab2790	Abcam
mouse monoclonal anti-HSP27 F4	sc-13132	Santa Cruz Biotechnology
mouse monoclonal anti-HSF1	sc-17757	Santa Cruz Biotechnology
mouse monoclonal anti-beta-tubulin antibody	sc-5274	Santa Cruz Biotechnology
mouse monoclonal anti-alpha-tubulin clone B-5-1-2	T5168	Sigma-Aldrich
rabbit polyclonal anti-p62	P0067	Sigma-Aldrich
rabbit polyclonal anti-PRL-R	sc-20992	Santa Cruz Biotechnology
goat polyclonal anti-actin	sc-1615	Santa Cruz Biotechnology
mouse monoclonal anti-peroxiredoxin1 (3G5)	LF-MA0214	AbFRONTIER
mouse monoclonal anti- GAPDH A3	sc-137179	Santa Cruz Biotechnology

- monoclonalanti-GFP desenvolvido e cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Frederico Gueiros Filho (Universidade de São Paulo, SP, BR); \*
- anticorpos anti-CuZnSOD e anti-MnSOD foram obtidos de rabbit antiserum diluídos.
   (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca, USA; Abcam, Cambridge, United Kingdom; Rockland, Limerick, PA, USA; AbFRONTIER, Korea, Republic of South Korea).

#### 3.7-Extração de RNA.

Células da linhagem MIN6 foram plaqueadas e mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB até atingirem 70% de confluência e tratadas como citado no item 3.2. Os meios das placas foram removidos, as células foram lavadas com PBSA. A extração de RNA foi feita ou utilizando o Pure Link® RNA Mini Kit (ambion – Life Technologies) conforme descrito pelo fabricante, ou seguindo o seguinte protocolo: a homogeneização foi feita adicionando-se TRIZOL (Invitrogen) (0,7mL/10cm²) a cada placa de cultura, as células foram lisadas através da passagem pela ponteira. Cada amostra foi colocada num tubo que foi incubado a temperatura ambiente

por 5 min, visando permitir a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. A separação foi feita adicionando-se clorofórmio (0,2mL por 1,0mL de TRIZOL) a cada amostra, mantendo os tubos, primeiro, em agitação por 30 seg, depois, incubando-os a temperatura ambiente por 3 min. As amostras foram centrifugadas a 12.000xG por 15 min, a 4°C. A fase aquosa, que contém o RNA, foi transferida para novos tubos. A precipitação do RNA foi feita colocando-se álcool isopropílico (0,5mL por 1,0mL de TRIZOL) a cada amostra e incubando-as por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000xG por 10 min, a 4°C. Os precipitados contendo o RNA foram lavados com etanol 75%,centrifugados a 7.500xG por 5 min, a 4°C, secos a temperatura ambiente, por 15 min e ressuspensos em 0,03mL de H<sub>2</sub>O DEPC autoclavada, incubando-as a 60°C em Banho Maria. As amostras foram quantificadas em NanoDrop 1000 (Uniscience do Brasil) e armazenadas a -80°C.

# 3.8-Reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa (RTPCR) e PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

DNA complementar (cDNA) foi gerado a partir de 4 µg/amostra de RNA obtida como descrito no item 3.7. Inicialmente tratamos cada amostra com DNase utilizando o *RQ1 RNase-Free DNase Kit* (Promega Corporation # M198A, USA). A seguir fizemos uma reação de transcriptase reversa utilizando o *High-Capacity cDNA Rerverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific #4368814, USA) seguindo as orientações dos fabricantes.

Tabela 5. Lista de gene e controles investigados por qRTPCR.

Gene	Taqman Gene Expression Assay ID	Número de acesso
Hsf1	Mm 01201402_m1	15499
Hprt	Mm 03024075_m1	15452
LaminB		16906

Para os experimentos de amplificação por qPCR quantitativo foi utilizado o sistema *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Neste sistema não

estão disponíveis as sequências de primers. Na tabela 5 então os códigos do gene e respectivos controles utilizados.

Todas as reações quantitativas foram realizadas em triplicata (n=3 experimentos independentes). A expressão relativa de um gene alvo foi determinada em comparação a um gene referência, obtida pela fórmula(Pfaffl, 2001):

Utilizamos, para cada primer, a eficiência do qPCR (Ef) de um ciclo na fase exponencial designada pelo fabricante. 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.

#### 3.9-Ensaio de viabilidade por microscopia de fluorescência.

A viabilidade das células foi avaliada através de coloração dupla com iodeto de propídeo (PI; 5μg/mL) e Hoechst 33342 (HO; 10μg/mL) (Cardozo et al., 2005), determinando a proporção de células totais (azul) e mortas (vermelhas) observadas ao microscópio de fluorescência. A taxa de morte foi determinada utilizando o programa de análise fotográfica *ImageJ*, utilizando a ferramenta *Merge Channels* para sobrepor as fotos com cada marcador. Um mínimo de 4 experimentos independentes com 4 imagens foram registradas e um mínimo de 500 células foram contadas por tratamento. 6x10<sup>4</sup> células da linhagem MIN6 ou o equivalente a 10 ilhotas dispersas foram plaqueadas por poço de placa de 24 poços RPMI contendo glutamina (2mM) (Sigma), suplementado com 10% SFB, 100 unidade/mL de antibiótico (Ampicilina/Estreptomicina) e 10μM HEPES. No dia seguinte

ao plaqueamento, as culturas foram privadas de soro (0,1% SFB) por 24h e incubadas por 24h em meio RPMI contendo 0,1% SFB, inicialmente prétratadas ou não com rhPRL (300 ng/mL) por 30 min e incubadas com TNFa (8 ng/mL), INFy (4 ng/mL) e IL-1 $\beta$  (0,8 ng/mL).

#### 3.10-Ensaio de viabilidade por MTT.

Para os experimentos envolvendo ROS, 2x10<sup>4</sup> células foram plaqueadas por poço de placas de 96 poços, em 100 μL de meio de cultura, como descrito no item 3.4, 24h antes dos respectivos tratamentos. A viabilidade foi avaliada, então, por ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich) (Mosmann, 1983), em quadruplicatas.

#### 3.11-Imunoprecipitação.

Para o estudo do interactoma de HSPB1, foram realizados ensaios de imunoprecipitação (Labriola *et al.*, 2007a). Assim, extratos totais de células MIN6 (1 mg de proteínas celulares totais) expostos às citocinas por 6 h na presença ou ausência de PRL foram incubados com 4 µg de anticorpo monoclonal anti-HSPB1 de camundongo (ab2790, Abcam). Posteriormente, os imunocomplexos foram capturados com proteína G sepharose (Sigma-Aldrich) como descrito anteriormente (Labriola *et al.*, 2007a). As *beads* foram lavadas três vezes com tampão de lise, fervidas por 10 min em tampão de amostra e submetidas a SDS-PAGE. As proteínas foram eletrotransferidas para membranas de PVDF ou excisadas dos géis, cortadas em pequenos pedaços e transferidas para tubos de polipropileno de baixa ligação às proteínas (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

#### 3.12- Análise Nano LC-MS/MS.

Os peptídios derivados os ensaios da imunoprecipitação foram obtidos a partir da digestão em gel, como descrito anteriormente (Terra *et al.*, 2013). As fatias de gel foram lavadas 3 vezes durante 15 min cada com

acetonitrila (ACN) a 50%, 25 mM de bicarbonato de amônio (NH4HCO3) e desidratadas com ACN a 100% durante 5 min seguido por centrifugação a vácuo. As fatias de gel foram reidratadas e os peptídeos foram submetidos à redução das ligações dissulfeto com DTT (10 mM), NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (100 mM) por 1 h a 56 °C. As cisteínas livres foram alquiladas utilizando Iodoacetamida (55 mM), NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (100 mM) durante 45 min no escuro e depois lavadas duas vezes durante 15 min cada com NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (100 mM). Então, as fatias de gel foram desidratadas com ACN 100% por 5 min seguido por centrifugação a vácuo e reidratação em tampão de digestão contendo Trypsin Gold grau de espectrometria de massa (Promega, Madison, WI, EUA), incubadas por 1 h à temperatura ambiente e depois durante a noite a 37 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de baixa ligação à proteinas e os peptídeos trípticos foram extraídos das fatias de gel utilizando ACN a 50%, ácido trifluoroacético (TFA) a 5% durante 30 min. Os peptídios foram dessalinizados utilizando colunas Zip Tip C18 (Millipore, Billerica, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras contendo os peptídeos foram ressuspensas em 0,1% de ácido fórmico (FA) antes da análise utilizando um sistema EASY-nLC (Thermo Scientific) acoplado a espectômetro de massa LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Os peptídeos foram carregados em uma coluna Acclaim PepMap C18 (2 cm x 100 fim de diâmetro interno; 5 µM) (Thermo, Alemanha) e separados sobre coluna Acclaim PepMap C18 (15 cm x 75 μΜ de diâmetro interno; 3 µm) e separados com um gradiente de 100% de fase móvel A (0,1% FA) a 34% de fase B (0,1% FA, 95% ACN) durante 60 min, 34% -95% em 10 min e 5 min a 95% a um fluxo constante de 250 nL / min. O LTQ-Orbitrap Velos foi operado em modo íon positivo com aquisição dependente de dados. A varredura completa foi adquirida no Orbitrap com uma resolução de 60.000 FWHM na faixa de massa de 400-1200 m / z. Íons peptídicos foram fragmentados por CID MS / MS usando uma energia de colisão normalizada de 35. Os 20 peptídeos mais abundantes foram selecionados para MS / MS e dinamicamente excluídos por um período de 30 s. Todos os dados brutos foram acessados no software Xcalibur (Thermo Scientific).

#### 3.13-Pesquisas de banco de dados e análises de bioinformática.

Os dados brutos foram pesquisados usando a plataforma Proteome Discoverer (Thermo Scientific). Pesquisas de banco de dados foram realizadas usando o algoritmo SEQUEST incorporado no programa. Os parâmetros de pesquisa foram definidos para: precisão MS 10 ppm, precisão MS / MS 0,5 Da, digestão com tripsina com duas clivagens perdidas foi permitida, fixada modificação carbamidometil de cisteína e modificação variável de metionina oxidada. Os espectros de massa em série dos experimentos MS / MS foram pesquisados contra o banco de dados não-redundante Uniprot Mus musculus, baixado em abril de 2016. Proteínas e peptídeos foram aceitos em FDR (*False Discovery Rate*) menores que 1%. Proteínas com dois peptídeos foram consideradas para análises posteriores. O número de peptídeos identificados na presença ou ausência de PRL foi relatado. Os mapas de interação proteína-proteína e análise do processo biológico de Ontologia Gene foram realizados usando o software STRING (https://string-db.org/).

### 3.14- Superexpressão de D-aminoácido oxidase (DAAO) de HSPB1.

O cDNA de HSPB1 humano e o cDNA da variante citosólica e mitocondrial da D-aminoácido oxidase de Rhodotorula gracilis (rgDAAO, gentil presente de Rajiv R. Ratan, Instituto de Pesquisa Médica Burke, White Plains, NY, EUA) foram subclonados no vector de expressão lentiviral pLVX-IRES-Neo de Clontech (Mountain View, CA, EUA). As partículas lentivirais foram preparadas como descrito anteriormente em detalhe (Zufferey *et al.*, 1998): 4 x 10<sup>6</sup> células 293T foram transfectadas através de precipitação com fosfato de cálcio com o plasmídeo de empacotamento pPAX2 (11,25 μg), o plasmídeo envelope pcDNA-MDG (3,75 μg), e o plasmídeo de transferência pLVX-IRES-Neo com o cDNA de Cyto-DAAO, Mito-DAAO ou HSPB1 humano (15 μg). Após 48 h, o meio de cultura contendo vírus foi coletado e centrifugado por 5 min a 700xG para remover células destacadas e restos celulares; depois o sobrenadante foi filtrado através de filtros de 0,22 μm (Millipore). As células MIN6 foram infectadas com o sobrenadante

viral purificado durante 5-6 h e depois o sobrenadante viral foi substituo por meio fresco. As células transduzidas foram selecionadas com 500  $\mu$ g / mL de Geneticina (Calbiochem, La Jolla, CA, Estados Unidos).

### 3.15-Determinação do estresse oxidativo usando diacetato de diclorodihidrofluoresceína.

Para a detecção do estresse oxidativo geral, 20.000 células foram plaqueadas em placas pretas de 96 poços e cultivadas por 24 h. Em seguida, as células foram pré-incubadas com 10 µM de diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFDA-H2; Life Technologies) durante 40 min a 37 °C. O meio contendo a sonda química foi descartado e soluções de tratamento foram adicionadas. Após uma incubação de 2 h, as placas foram analisadas a excitação / emissão de 480/520 nm utilizando o leitor de microplacas Synergy Mx (BioTek, Winooski, VT, EUA). A detecção de ROS pelo uso de DCFDA-H2 é dependente de sua oxidação para o derivado fluorescente estável diclorofluoresceína e sua acumulação subsequente na célula. Cada experimento foi realizado em quadruplicatas; os dados foram expressos como a porcentagem de formação de ROS em células não tratadas normalizadas pelo ensaio MTT como uma correção de densidades de células plaqueadas diferentemente, uma vez que não houve diferença na viabilidade durante o tempo do experimento.

# 3.16-Avaliação da geração do radical superóxido intramitocondrial.

A geração de radicais superóxido dentro das mitocôndrias foi avaliada usando MitoSOX Red (Life Technologies) (Robinson *et al.*, 2006). Células MIN6, MIN6-Sc e MIN6-shHSPB1 foram plaqueadas a uma densidade de 7 x  $10^5$  células por de placas de 6 poços e incubadas com os tratamentos indicados. Em seguida, as células foram tripsinizadas e recolhidas por centrifugação a 700 x g durante 5 min. Os sedimentos celulares foram suspensos em meio de cultura contendo 5 mM de MitoSOX Red e incubados durante 30 min a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e

analisadas por citometria de fluxo (CyFlow ML, Sysmex, Kobe, Japão) utilizando o canal FL-3. Os dados foram analisados pelo software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

#### 3.17-Quantificação de GSH e GSSG pelo sistema LC-MS / MS.

GSH e GSSG foram quantificados por LC-MS / MS como descrito anteriormente (Carroll et al., 2016) com modificações. Brevemente, placas com área de 60cm2, de culturas celulares confluentes foram colhidas em 160 μL of PBS e 18μL de tampão de extração (2% de ácido tricloroacético (TCA); 1,0 mM de ácido pentacético dietilenotriamina (DTPA) e 2µL de padrão interno (N-acetil-cisteína, 2,0µg / mL) foram adicionados às amostras. As amostras foram incubadas em gelo durante 15 min e depois submetidas a agitação durante 45 s e incubadas em gelo durante 15 min novamente. O pH das amostras foi ajustado para 2,0 misturando o lisado da amostra com 200 µl de fase móvel A (0,75 mM formiato de amônio, 0,01% de ácido fórmico, 1% de metanol) e os debris celulares foram removidos por centrifugação a 5000 xG, 4 °C por 10 min. Os sobrenadantes foram coletados e injetados no sistema LC-MS / MS. O método cromatográfico foi desenvolvido em um sistema Nexera UPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) usando uma coluna analítica Kinetex C18 (100 mm x 2,10 mm, 2,6 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) eluiu com uma fase móvel de 0,75 mM de formato de amônio / 0,01% de ácido fórmico / 1% de metanol (A) e metanol (B) a 0,2 mL / min. A eluição foi iniciada com 1% de B, mantida durante 5 min e seguida por um passo de gradiente a 80% de 5 a 6 min. Então, a porcentagem de B foi mantida em 80% por 4 min e foi restaurada para 1% de 10 a 11 min. Após este tempo, a coluna foi equilibrada a 1% B de 11 a 20 min. A temperatura da coluna foi ajustada a 25 °C e o volume de injeção foi de 10 µL. A análise foi realizada em um espectrômetro de massas Triple-TOF 6600 (AB Sciex, Framingham, MA, EUA) acoplado à fonte de ionização por electrospray (ESI), operado em modo positivo. Os dados do tipo MRM pós-adquiridos foram utilizados para quantificação de GSH 308,0911→179,0462), GSSG (MH)<sup>+</sup>  $(m/z 613,1592 \rightarrow$  $(MH)^+$  (m/z)355,0741), GSSG (MH)<sup>++</sup> (m/z 307,0863  $\rightarrow$ 177,0328) e padrão interno NAC (m/z 164,0 → 76,0215) foram completados com energias de colisão para

cada transição individual (22 V, GSH; 32 V, GSSG; 25 V, NAC) e 80 V de DP para todos os analitos. A temperatura da fonte foi de 450 °C e a tensão de *spray* foi ajustada para 5500 V. Com o software Multiquanti (3.0, AB Sciex), as concentrações foram avaliadas pelas razões GSH / NAC e (GSSG / NAC)<sub>totais</sub> plotados contra os valores calculados pela curva padrão.

# 3.18-Ensaio da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6DP).

A determinação da atividade da G6DP foi realizada por um método espectrofotométrico de acordo com Glock e McLean (Glock and McLean, 1953), exceto que o cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) foi utilizado como receptor de elétrons como descrito anteriormente (Santos and Terra, 1984). Os 100 μL de meio reacional continham tampão Tris-HCl (50 mM pH: 7,4); MgCl2 (3,6 mM), glicose-6-fosfato (1,5 mM), adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) (0,12 mM), Triton X-100(1,4% v/v) 1-metossulfato de metoxifenazina (PMS) (0,32mM) e INT 0,2 mM. Cada experimento foi realizado em duplicatas. O meio reacional de glucose-6-fosfato desidrogenase foi incubado a 37 °C durante 1 h e lido a cada 2 min a 500 nm num leitor de microplacas SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

#### 3.19- Análise da velocidade de consumo de Oxigênio (OCR).

6x10<sup>4</sup> células MIN6, MIN6-HSP25, MIN6-Sc foram plaqueadas em poços de uma placa V7 com 24 poços (Seahorse Biosecience, CA, USA), previamente preparadas com uma cobertura de colágeno no fundo do poço. Além disso, a tampa da placa V7, que contem os sensores, foi incubada por 24h com a solução de calibração em estufa sem CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após 24h de plaqueamento as células foram tratadas como mencionado no item 3.2 de materiais e métodos. 1h antes do experimento o meio de cultura foi trocado por RPMI 0,1% SFB ausente de Bicarbonaro de Sódio e as células foram mantidas na incubadora á 37°C. As células foram então submetidas à medição do consumo de oxigênio em distintas condições, utilizando um XF24 extracellular flux analyser (Seahorse Bioscience, North Billerica, USA).

Até o tempo de 24 min foram obtidos os pontos correspondentes ao consumo basal de  $O_2$  (OCR). No tempo 32 minutos, foi adicionado Oligomicina (OL) (1,3 uM) para a obtenção dos OCR não relacionados à produção de ATP; aos 48 minutos foi adicionado o agente desacoplador CCCP (1uM) para obter os dados de Máximo OCR e no tempo 88 minutos foram adicionadas Rotenona (1 uM) e Antimicina A (1uM) a fim de obter os OCR não relacionados com a respiração mitocondrial. Este protocolo foi baseado no protocolo desenvolvido anteriormente no laboratório liderado pelo Dr. Orian Shirihai na Boston Medicine School of Boston University (Wikstrom et al., 2012).

#### 3.20-Análise do potencial de membrana mitocondrial (ΔΨmt).

A fim de analisarmos se HSPB1 poderia modular o potencial da membrana interna mitocondrial, as células foram plaqueadas em  $\mu$ -Placas de 24 poços (1,9 cm²) com fundo de vidro (cat n° 82406; IBIDI GmbH, Martinsried, Germany) em RPMI 10% SFB, e mantidas em incubadora a 37°C com atmosfera contendo 5%  $CO_2$  e umidade controlada. As células foram incubadas 30 minutos antes da captação das imagens de fluorescência com 10 nM de TMRE (" non-quenching mode") com objetiva de 60X com óleo de imersão em Leica DMI8 microscope. O potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ mt) foi determinado usando uma sonda fluorescente tetrametilrodamina-etil-ester (TMRE) (Life Technologies). Os dados foram quantificados com o software Image J FIJI (Molecular Devices) (Ruiz et al., 2016).

### 3.21- Ensaios de atividade funcional nas células beta contendo HSPB1 silenciada.

O efeito do silenciamento e superexpressão de HSPB1 sobre a funcionalidade das células beta foi avaliado por comparação dos níveis de secreção de insulina tanto nas células silenciadas como nas células controle que expressam níveis normais da proteína. Para tanto, 7,5 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> MIN6, MIN6-Sc e MIN6-shHSPB1, MIN6-oHSPB1, MIN6-Vec ou o

equivalente a 5 a 7 Ilhotas pancreáticas murinas dispersas normais (I), silenciadas para HSPB1, seu controle (I-shHSPB1 e I-Sc, respectivamente) ou superexpressando HSPB1 e seu controle (I-oeHSPB1 e I-GFP) foram mantidas por 24h em meio RPMI 10% SFB. Após esse período de tempo, o meio de cultura foi retirado e 500µl de solução 5,6mM de glicose em Krebs Buffer (25mM HEPES, 115mM NaCl, 24mM NaHCO3, 5mM KCl, 1mM MgCl2.6H2O, 2,5mM CaCl2.2H2O) 0,2%BSA por 30min a 37°C em Banho Maria. Após este tempo, 470µl de solução foram descartados e o mesmo volume de solução final 2,8mM de glicose em Krebs Buffer 0,2%BSA (baixa glicose) foi acrescentado por 1h a 37°C em Banho Maria. Em seguida, 470µl do meio condicionado foram retirados e armazenados em tubo plástico a -20°C e o mesmo volume de solução final 16,7mM de glicose em Krebs Buffer 0,2%BSA (alta glicose) foi acrescentado por 1h a 37°C em Banho Maria. A seguir, 470µl do meio condicionado foram retirados e armazenados em tubo plástico a -20°C e omesmo volume de solução álcool-ácida (17H2O:52EtOH:1HCl) e armazenada por 24h a -20°C. A capacidade de células beta secretarem insulina em resposta a altas concentrações de glicose é avaliada por incubação estática das células em condições de baixa (2,8mM) e alta concentração de glicose (16,7mM) no meio condicionado por ELISA (Mercodia, Estocolomo, Suécia) e expresso como a razão entre os valores normalizados obtidos na situação de alta concentração e aqueles obtidos durnate a incubação com baixa concentração de glicose (SI). Além disso, também foi dosado por ELISA, o conteúdo intracelular de insulina proveniente dos extratos alcoólicos ácidos de células normalizado pelo conteúdo de DNA total medido por absorbância a 260nm (Labriola et al. 2007a).

#### 3.22-Extração de DNA genômico.

A fim de normalizar o Ensaio Funcional, o DNA genômico foi extraído de cada amostra armazenada por no mínimo 24h a -20°C. Para tanto, foi retirado 470µl da solução álcool-ácida e armazenada em um tubo plástico (1,5ml) para leitura do conteúdo de insulina celular. Em seguida foram adicionados 300µl de solução tampão de citrato (16,4mM Ácido Citrico; 0,15M NaCl; 2,7mM EDTA dissódico; pH 7,4). Após a solubilização,

as suspensões foram centrifugadas a 1500xG por 10min à 4°C. O sobrenadante foi coletado e reservado. O processo foi repetido e o sobrenadante coletado em um segundo tubo. A concentração da DNA foi calculada pela medida da sua absorbância DNA 260nm e a pureza determinada pela absorbância da solução a 280nm.

#### 3.23-Análise estatística dos dados.

Todos os resultados foram analisados para distribuição gaussiana e passaram o teste de normalidade com o auxílio do programa computacional GraphPad Prism versão 6.0. 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. As diferenças estatísticas tanto para encaixe de curvas de produção de ROS para crescimento exponencial, como as curvas de  $EC_{50}$  foram calculadas pelo teste F de soma dos quadrados extra. Um valor de p<0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

### **RESULTADOS**

#### 4-RESULTADOS

Estabelecemos anteriormente, como modelo celular, a linhagem de insulinoma murino MIN6 como a mais indicada para iniciar os estudos dos efeitos da prolactina sobre a apoptose, por serem células que possuem um fenótipo bastante similar aquele das células beta normais dos camundongos. Cabe destacar que a utilização, fosforilação e o transporte de glicose, assim como a resposta secretória, estão bem caracterizados nesta linhagem celular (Ishihara et al., 1993). Além disso, as mesmas vias de citoproteção ativadas em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas parecem ser ativadas em cultura de células MIN6, como mostramos acima (Terra et al., 2011; Mansano, 2013; Wailemann et al., 2018), indicando que o modelo escolhido é pertinente para a realização deste estudo.

## 4.1- HSPB1 é uma proteína chave na citoproteção de células beta induzida por PRL.

Primeiramente foi confirmado o silenciamento da proteína HSPB1, as células MIN6, MIN6-shHSPB1, MIN6-Sc1 e -Sc2 foram mantidas por 24h em meio de cultura 0,1% SFB. Posteriormente, os níveis proteicos de HSBP1 foram detectados por Western blot.

Os resultados mostrados na **figura 18A** indicam que as células silenciadas para a proteína HSPB1, MIN6-shHSPB1, apresentaram uma diminuição de 81 ± 3% na expressão desta proteína quando comparadas com as células MIN6. Esta diminuição foi ainda maior quando comparada com as células transduzidas com as sequências controle shRNAs (MIN6-Sc1 and MIN6-Sc2).

Com o intuito de verificarmos se os mecanismos envolvidos na citoproteção de células MIN6 também estavam envolvidos nas células beta murinas normais, estabelecemos o protocolo de isolamento de ilhotas pancreáticas murinas como descrito em Materiais e Métodos. Ilhotas pancreáticas murinas isoladas e dispersas foram transduzidas com

partículas virais contendo a sequência específica para shRNA-HSPB1 murino (Si-mHSPB1) ou sequências controle de infecção e de especificidade (shRNA-scrambles-eGreen Fluorescent Protein (-eGFP) e -Sc-1, respectivamente), conforme descrito em Materiais e Métodos. Após a transdução, as células foram mantidas em cultura com meio RPMI acrescido de 10% de SFB por 24h. A culturas celulares foram então mantidas por 24h em meio de cultura 0,1% SFB. Posteriormente, as proteínas totais foram extraídas e no mínimo 100µg de extrato proteico foram utilizados em ensaios de western blot (Wb).

Foi confirmada a diminuição significativa da expressão de HSPB1 em Ilhotas silenciadas para HSPB1 (I-shHSPB1). Houve uma inibição de  $54\pm2\%$  (n=3 experimentos independentes, p<0,05) em relação ao valor obtido nas culturas primárias não silenciadas (**Figura 18B**).

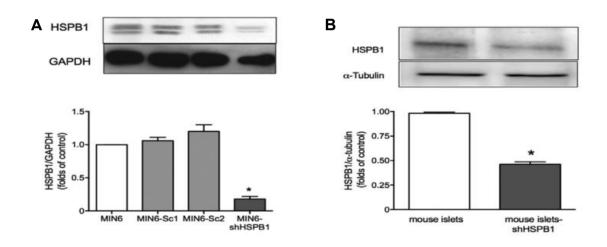


Figura 18. Níveis protéicos de HSPB1.

Células MIN6 (**A**) ou culturas primárias de ilhotas pancreáticas murinas (**B**) foram transduzidas com partículas virais contendo a sequência específica para shRNA-HSPB1 murino (Si-mHSPB1) ou sequências controle de especificidade (-Sc1 e Sc2). Proteínas totais foram extraídas das células mantidas na presença de meio de cultura contendo 0,1%SFB por 24h. e Os níveis protéicos HSPB1 foram analisados por western blot. Foram utilizados 100µg de proteínas totais extraídas de cada tipo celular. Os níveis proteicos de HSPB1 foram normalizados pelos níveis de GAPDH (**A**) ou a-tubulina (**B**). Os immunoblots mostrados são resultados representativos. Os valores estão expressos em vezes relativo ao obtido nas células MIN6 parentais ou das culturas primárias controles. \*: p<0.05 vs. n= 3 experimentos independentes.

Após a confirmação do silenciamento de HSPB1, células MIN6, MIN6-Sc1, MIN6-Sc2 e MIN6 shHSPB1 foram carenciadas com 0,1%SFB por 24h e tratadas com um coquetel de citocinas pró-inflamatórias (TNF (8ng/mL), INF $\gamma$  (4ng/mL) e IL-1 $\beta$  (0,8 ng/mL)) por 24h na ausência ou presença de rhPRL (300ng/mL) por 30min.

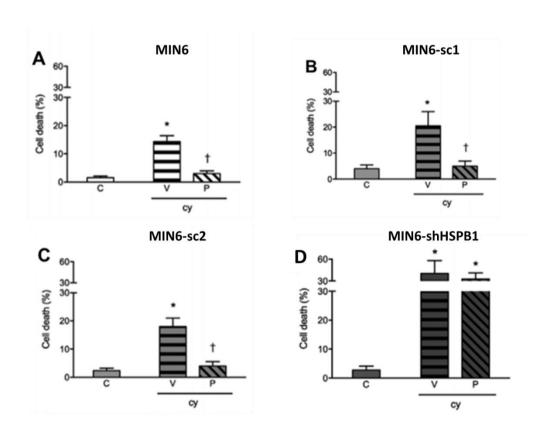


Figura 19. HSPB1 é um mediador do efeito citoprotetor da rhPRL em células MIN6.

Células MIN6 parentais ( $\bf A$ ), MIN6 expressando um shRNA não relevante MIN6-sc1 ( $\bf B$ ) e MIN6-sc2 ( $\bf C$ ) ou silenciadas para HSPB1 (MIN6-shHSPB1) ( $\bf D$ ) foram tratadas por 24h, com os indutores de morte celular TNF (8ng/mL), INF $\gamma$  (4ng/mL) e IL-1 $\beta$  (0,8 ng/mL), na presença ou ausência de rhPRL (300ng/mL) e posteriormente marcadas com HO e PI. Para cada condição e cada tipo celular, a porcentagem de células mortas foi analisada por microscopia de fluorescência. Para cada experimento independente foram contados um mínimo de 500 núcleos totais por condição. \*:p<0,05 vs c; †: P<0,05 vs Cy+V. Os resultados estão apresentados como a média da porcentagem de morte celular  $\pm$  EPM; n=4 experimentos independentes. C: células controle (RPMI contendo 0,1% SFB); V: veículo; P: Prolactina; Cy:Citocinas.

O número de células mortas foi determinado por microscopia de fluorescência conforme indicado na seção de materiais e métodos. Os resultados apresentados na figura 19 mostram que tanto as células MIN6 (Figura 19A) como as culturas controles MIN6-Sc1 (Figura 19B) e MIN6-Sc2 19C) tratadas PRL apresentaram (Figura com proporção significativamente menor (p<0,05) de morte celular após o tratamento com citocinas. Mostramos também que o efeito citoprotetor induzido por PRL foi abolido em células silenciadas para HSPB1 (Figura 19D) confirmando então as respostas observadas em Mansano, 2013. Dado que ambas células controle MIN6-Sc1 e -Sc2 não apresentaram diferenças estatísticas entre elas, em todos os experimentos seguintes foi usado somente a sequência controle MIN6-Sc1 (agora referido como MIN6-Sc), junto com as células MIN6 e MIN6-shHSPB1.

Com o intuito de verificarmos a viabilidade celular em culturas primárias de ilhotas murinas, estas foram isoladas, dispersas, transduzidas e mantidas como descrito acima. As células foram submetidas aos mesmos tratamentos que a células MIN6 e morte celular foi avaliada após 24h do tratamento com as citocinas.

Os resultados apresentados na **figura 20** mostram que não houve diminuição significativa de morte em células de ilhotas pancreáticas murinas dispersas silenciadas para HSPB1(I-shHSPB1) tratadas com PRL, quando comparada com as células controle (Figura 20D). No entanto, tanto ilhotas pancreáticas murinas (I) (Figura 20B), como as culturas de células transduzidas com a sequência controle (I- Sc) (Figura 20C) tratadas com PRL apresentaram proporção significativamente menor de morte celular (p<0,05) após o tratamento com o coquetel de citocinas, quando comparado com as células controle.

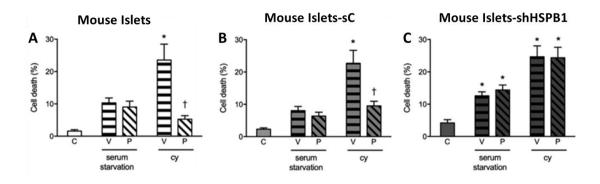


Figura 20. HSPB1 é um mediador essencial da ação da PRL na inibição da apoptose de culturas primárias de ilhotas pancreáticas murinas.

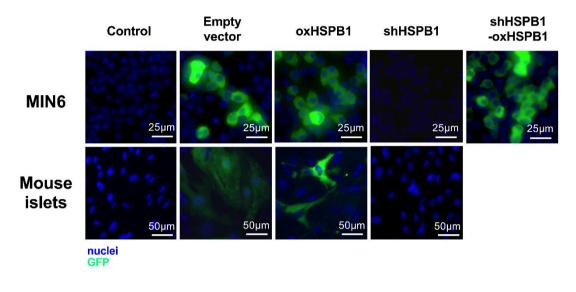
As células foram mantidas em meio de cultura RPMI acrescido de 10% de SFB por 24h. A seguir, essas culturas foram mantidas em meio de cultura suplementado com 10%SFB (c) carenciadas para soro (0,1% SFB) por 24 h e então pré-tratadas na ausência (V) ou presença de rhPRL (P) (300ng/mL) por 30 minutos e incubadas por 24h h na presença ou ausência de um coquetel de citocinas pró-inflamatórias (cy) (TNF-a (8ng/mL), INF- $\gamma$  (4ng/mL) e IL-1 $\beta$  (0,8 ng/mL)). A porcentagem de células mortas para I (A), I-Sc (B) e I-shHSPB1 (C) foi analisada por microscopia de fluorescência. Para cada experimento independente foram contados um mínimo de 500 núcleos totais por condição. \*:p<0,05 vs c; †: P<0,05 vs cy+V. Os resultados estão apresentados como a média da porcentagem de morte celular  $\pm$  EPM; n=5 experimentos independentes.

Em nenhum dos tipos celulares observamos diferença na porcentagem de morte entre as células tratadas na presença ou não de rhPRL e mantidas sob privação de soro (Figura 20). Em conjunto os resultados obtidos mostraram que HSPB1 é um mediador chave na inibição da apoptose de células normais promovida pelo tratamento hormonal.

# 4.2- A superexpressão de HSPB1 mimetiza o efeito citoprotetor promovido por PRL

No intuito avaliar se o fato de aumentar os níveis da chaperona eram suficientes para promover a citoproteção da células tratadas com citocinas, foi realizada a superexpressão de HSPB1 utilizando um vetor de expressão em mamíferos da HSPB1 **humana** fusionada à GFP (hHSPB1) ou somente com GFP (vetor vazio) (Addgene, USA), como descrito em Materiais e Métodos. Esse procedimento foi realizado tanto nas culturas primárias de ilhotas pancreáticas murinas dispersas como em células MIN6 e MIN6-

shHSPB1. O fato do vetor de expressão em mamíferos conter a sequência para HSPB1 humana é importante pois tornou possível resgatar o silenciamento, visto que o silenciamento foi feito utilizando a técnica de siRNA para HSPB1 murina. Após a transfecção, as células foram mantidas em cultura em meio RPMI suplementado com 10% de SFB por 24h.



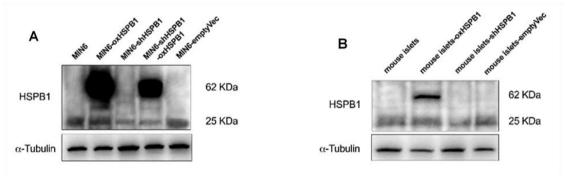


Figura 21. Confirmação da superexpressão de HSPB1.

As culturas de células MIN6 parentais, superexpressando HSBP1 humano (-oxHSPB1), silenciadas para HSPB1 murino (-shHSPB1) e silenciadas para HSPB1 murino e resgatadas pela superexpressão do homólogo humano (-shHSPB1-oxHSPB1) e expressando GFP (empty vec – ev) (Linha superior do painel e (**A**))e culturas primárias de ilhotas, superexpressando (-oxHSPB1), silenciadas para HSPB1 murino (-shHSPB1) e expressando GFP (empty vec – ev) (em verde) (linha inferior do painel) e (**B**) foram mantidas em condições de cultura com privação de SFB por 48h. Em seguida foram coradas com HO (azul) e observadas por microscopia de fluorescência. Os níveis proteicos de HSPB1 foram detectados por Western blot. Foram utilizados 100μg de proteínas totais extraídas de cada tipo celular. Como controle foi usado Wb anti-α-tubulina. n= 3 experimentos independentes.

Para a confirmação do perfil de expressão de HSPB1, as culturas foram mantidas sob privação de soro (0,1%SFB) por 48h. Posteriormente, foram marcadas com HO e analisadas por microscopia de fluorescência. No painel superior da Figura 21, foi verificada a eficiência das transfecções observando a fluorescência de GFP. Além disso, proteínas totais foram extraídas e submetidas a ensaios de western blot usando um anticorpo anti-HSPB1. Nas figuras representativas (n≥3 experimentos independentes) apresentadas foi possível detectar a banda de HSPB1 endógena em 27KDa em todas as amostras testadas. No entanto, somente nas culturas de células MIN6 superexpressando (MIN6-oxHSPB1), MIN6 reexpressando hHSPB1 (MIN6-shHSPB1-oxHSPB1) (Figura 21A) e Ilhotas Murinas superexpressando hHSPB1 (I-oxHSPB1) (Figura 21B) podemos observar a banda de HSPB1 humana acoplada à GFP em 62KDa. mesmas amostras foram submetidas à ensaios de western blot usando anti-GFP. Os resultados obtidos mostraram que somente nas culturas transfectadas com o vetor de expressão para hHSPB1 foi detectada a banda na altura de 62KDa (dados não mostrados).

Além disso, após a transfecção as células foram carenciadas com 0,1%SFB por 24h e tratadas com uma combinação de citocinas pró-inflamatórias na presença ou na ausência de PRL por 24 h (MIN6) ou 16h (Ilhotas).

Tanto em células MIN6 (**Figura 22A**), como em culturas primárias de ilhotas pancreáticas murinas dispersas (**Figura 22B**), a superexpressão de HSPB1, por si só, exerceu o mesmo efeito observado em células tratadas com PRL considerando que houve significante redução na porcentagem de morte celular após o tratamento com citocinas. No entanto, a superexpressão desta proteína e o tratamento com o hormônio concomitantemente não resultou em efeito aditivo ou sinergístico na inibição da morte celular.

A superexpressão de HSPB1 em células MIN6 silenciadas para HSPB1 (MIN6-shHSPB1) (Figura 22C) levou a restauração da citoproteção após o tratamento com citocinas.

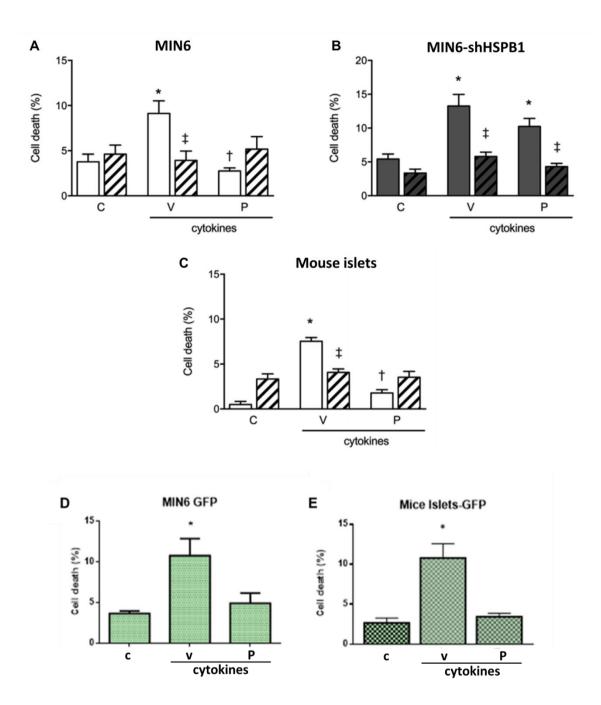


Figura 22. Superexpressão de HSPB1 mimetiza os efeitos citoprotetores da PRL.

Células MIN6 (**A**), MIN6-shHSPB1 (**B**), Ilhotas pancreáticas murinas (**C**), MIN6-eGFP (**D**) e Ilhotas pancreáticas murinas-eGFP (**E**) que superexpressam (barras diagonais) ou não HSPB1, foram privadas de soro (C) e posteriormente tratadas com uma combinação de citocinas (cy) na presença (P; 300 ng/ml)ou na ausência de rhPRL(V). Para cada condição e cada tipo celular, a porcentagem de células mortas foi analisada por microscopia de fluorescência. Para cada experimento independente foram contados um mínimo de 500 núcleos totais por condição.\*: p < 0.05vs C; †p < 0.05 P vs V do respectivo tratamento; ‡p < 0.05 barras diagonais vs respectivo tratamento sem superexpressão de HSPB1. Resultados expressos como média  $\pm$ SEM; MIN6: n = 3; Ilhotas: n=3 experimentos independentes

Cabe destacar que foram utilizadas células expressando GFP (MIN6-GFP e Ilhotas-GFP), como controle da superexpressão. Essas células apresentaram um padrão de resposta, quando tratadas com citocinas, na presença ou na ausência de PRL, semelhante às respectivas culturas de células parentais (**Figura 22D-E**).

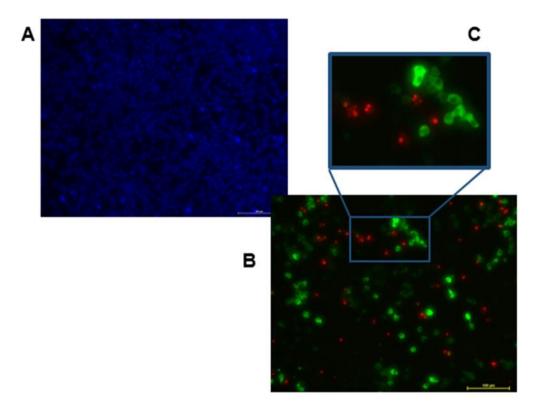


Figura 23. Células que superexpressam HSPB1 são mais resistentes à morte induzida por citocinas pró-inflamatórias.

Células MIN6 que superexpressam ou não HSPB1, foram privadas de soro por 24h e posteriormente tratadas com uma combinação de citocinas por 24h. **A**) núcleos de células totais marcados com fluoróforo Hoestch 33342 (HO) em azul. **B**) O mesmo campo mostrado em A com a sobreposição de imagens de núcleos das células mortas marcadas com e Iodeto de Propídeo (PI) em vermelho e células expressando HSPB1 e eGFP (verde). **C)** ampliação de uma região de B. Aumento 100x.

A superexpressão de HSPB1 humana inibiu significativamente a morte celular induzida por citocinas pró-inflamatórias em todos os tipos celulares quando comparadas com seus respectivos controles. Mesmo quando nem todas as células passaram a expressar HSPB1 humana e quando a intensidade de expressão não parece ser homogênea, como pode ser observado comparando-se o total de núcleos célulares marcados com HO

(**Figura 23A**) com as células expressando eGFP (verde) em diferentes intensidades na **Figura 23B**. É interessante ressaltar que nas fotos, a maior parte dos núcleos marcados com PI (vermelho) não se sobrepõe às células superexpressando HSPB1 (verde) (**Figura 23B**). Ampliando-se uma região desta figura podemos observar com a marcação de PI, imagens características de núcleos apoptóticos (vermelho – **Figura 23C**). Estes resultados contribuem para reforçar o resultado de que o aumento dos níveis proteicos de HSPB1 é suficiente para a inibição da apoptose de células beta induzida por citocinas pró-inflamatórias.

Além disso, a partir do vetor *pEGFP-hsp27 plasmid (17444 ISHO;* addgene, Cambridge, MA, USA) novas construções foram feitas em nosso laboratório, nas quais obtivemos os vetores denominados pLV*neo* HSPB1 e pLV *neo*-IRIS-vazio, que contêm ou não a sequência de HSPB1, respectivamente. Com estes vetores produzimos partículas lentivirais contendo ou não a sequência da HSPB1 humana, sem a fusão com GFP, e após transdução das partículas virais conforme descrito em materiais e métodos, obtivemos as linhagens de células MIN6 que superexpressam HSPB1 (MIN6-oHSPB1) e vetor vazio (MIN6-Vec) de forma estável. Os níveis proteicos de HSPB1 foram detectados por Western blot (**Figura 24**).

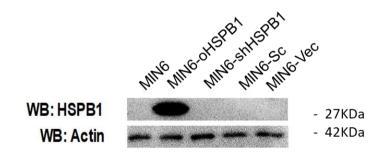


Figura 24. Confirmação da superexpressão de HSPB1.

Níveis proteicos de HSPB1 humana normalizados pelos níveis de actina nas linhagens celulares MIN6 parentais, MIN6-oHSPB1, que expressam de forma estável HSPB1, MIN6-shHSPB1, silenciadas para HSPB1, e as linhagens controle para o silenciamento e para a superexpressão, MIN6-Sc e MIN6-Vec, respectivamente. Estas linhagens foram mantidas em condições de cultura com privação de SFB por 48h. Os níveis proteicos de HSPB1 foram detectados por Western blot. Foram utilizados 100µg de proteínas totais extraídas de cada tipo celular. n= 3 experimentos independentes.

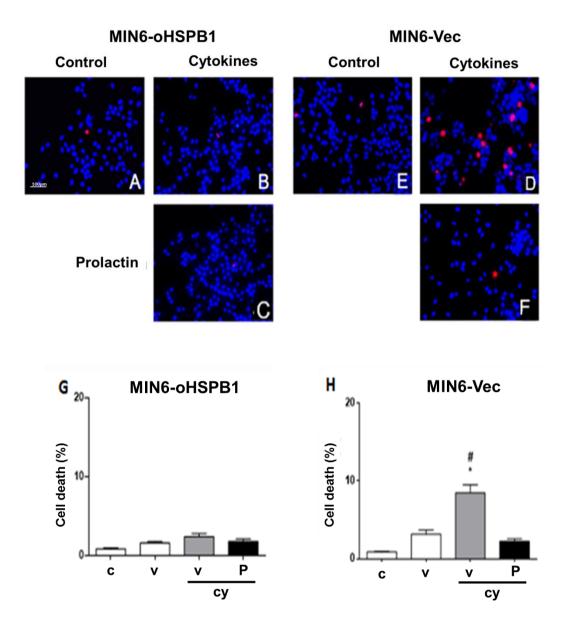


Figura 25. Superexpressão de HSPB1 mimetiza os efeitos de PRL na citoproteção.

**A-F)** Sobreposição de imagens de núcleos das células, totais e mortas marcadas com fluoróforo Hoestch 33342 (HO) em azul e Iodeto de Propídeo (PI), respectivamente. Aumento 100x. **G-H)** Histograma com a porcentagem de morte por tipo celular. Linhagens celulares de expressam HSPB1 humana (MIN6-oHSPB1-A-C e G) ou vetor vazio (MIN6-Vec - D-F e H), foram privadas de soro (v = 0.1%SFB) ou não (controle = c) e posteriormente tratadas com uma combinação de citocinas (cy) na presença ou na ausência de rhPRL (P; 300 ng/ml). Para cada condição e cada tipo celular, a porcentagem de células mortas foi analisada por microscopia de fluorescência. \*: p<0.001 vs. respectivo P; #: p<0.001 vs. Controle (C). Para cada experimento independente foram contados um mínimo de 500 núcleos totais por condição. Resultados expressados como média ±SEM; (n = 3 experimentos independentes).

A fim de confirmar que essa construção era capaz de promover os mesmos efeitos que os observados quando a HSPB1-GFP foi expressa de forma transitória, foi analisada a viabilidade celular das linhagens MIN6-OHSPB1 e seu controle MIN6-Vec. Estas linhagens foram carenciadas com 0,1%SFB por 24 h e tratadas com uma combinação de citocinas pró-inflamatórias na presença ou na ausência de PRL (300ng/ml) por 24 h. Os resultados obtidos confirmaram que da mesma forma que nos modelos anteriormente utilizados, o fato de aumentar a expressão de HSPB1 humana de forma estável, mimetiza o efeito citoprotetor induzido pela prolactina tanto para o caso da privação de soro quanto para o caso da morte induzida pelas citocinas em células MIN6 (Figura 25A-C e G), mostrando o papel fundamental do incremento de HSPB1 na citoproteção de celas beta. O mesmo não acontece nas células controle (Figura 25E-F e H).

## 4.3- Investigação da via de sinalização da prolactina em células beta e sua relação com HSPB1.

Resultados prévios de nosso laboratório mostraram que a proteína antiapoptótica HSPB1 teve os níveis de expressão aumentados tanto em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas isoladas a partir de pâncreas de doador humano com morte cerebral e mantidas em cultura e tratadas com rhPRL (300ng/ml) (Labriola *et al.*, 2007b), quanto em células MIN6, quando estas foram tratadas com rhPRL (300 ng/mL) em relação aos controles utilizados (Mansano, 2013; Wailemann *et al.*, 2018).

A fim de dar robustez aos nossos resultados, verificamos por Western blot os níveis proteicos dos receptores de Prolactina (PRL-R) em lisados provientes dessas culturas. Assim, foram utilizados iguais quantidades de proteínas totais obtidas a partir de lisados de: culturas primária de ilhotas pancreáticas humanas altamente enriquecidas em células beta; linhagens celulares derivadas de culturas primárias de insulinomas *humanos* (APM em dois lotes diferentes e CPR) e de uma nesideoblastose humana (VGA) (Labriola *et al.*, 2009). Como controle de expressão de PRL-R foram utilizados extratos proteicos de células epiteliais mamárias humanas não

tumorais MFC-10A (ATCC CRL-10317<sup>™</sup>) (**Figura 26A**). Como controle de especificidade do anticorpo secundário, as membranas foram incubadas somente com o anticorpo anti-rabbit conjugado HRP (horseradish peroxidase) (**Figura 26B**). Além disso, extratos proteicos de células MIN6 mantidas em meio de cultura carenciado de soro (0,1% SFB) por 24 h, na presença ou ausência de PRL por 24h (**Figura 26C**). Os resultados permitiram a deteccção de bandas específicas que variam entre 40kDa a 90kDa e que correspondem às isoformas curtas, intermediárias e longas do PRL-R, cujas presença variam entre os diversos tipos celulares.

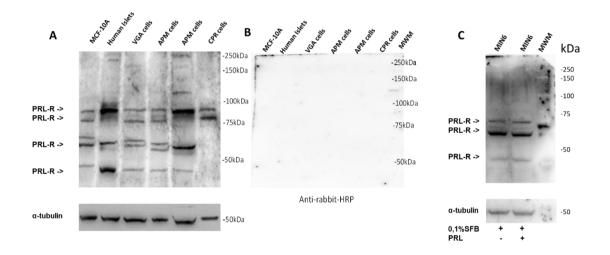


Figura 26. Receptor de prolactina (PRL-R) é expresso em células beta humanas e murinas.

Os níveis proteicos do PRL-R, tanto de isoformas longas, intermediárias como curtas, foram analisados por Western blot. (♠) Extratos proteicos obtidos a partir de lisados de: células MFC-10A, linhagem de células epiteliais mamárias humanas não tumorais (ATCC CRL-10317™); culturas primárias de ilhotas pancreáticas altamente enriquecidas em células beta; culturas de linhagens celulares derivadas de insulinomas *humanos* (APM, dois lotes diferentes foram mostrados e CPR) e culturas de linhagem derivadas culturas primárias de uma nesidioblastose humana (VGA). (♠) Teste de inespecificidade do anticorpo secundário utilizado. (♠C) Extratos proteicos obtidos a partir de células MIN6 mantidas em meio de cultura carenciado de soro (0,1% SFB) por 24 h, na presença ou ausência de PRL por 24h.

Uma vez que demonstramos a presença do receptor de PRL, foi possível também estudar, em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas mantidas em cultura em meio CMRL suplementado com 0,5% SFB e tratadas com rhPRL (300 ng/ml), a cinética de aumento dos níveis protéicos do Fator de Transcrição de Heat Shock-1 (*Heat Shock Transcription Factor-1* - HSTF1) (Mansano, 2013; Wailemann *et al.*, 2018).

O tratamento com rhPRL induziu um rápido aumento na expressão de HSTF1, com nível máximo em 10min e perdurando com nível aumentado até 2h após o tratamento. Além disso, o tratamento com rhPRL também induziu uma rápida fosforilação de p38 e de STAT1, com início aos 10min e atingindo seu nível máximo em 30min, com posterior declínio. Mostramos que a incubação com rhPRL induziu um aumento na expressão de HSPB1 após 2h do tratamento.

A literatura não reporta nenhuma demonstração da relação entre a ação da PRL e a indução do mRNA ou da proteína HSPB1 em qualquer modelo de mamíferos. A fim de verificarmos se em nosso modelo murino também haveria a indução de HSTF1 e de HSPB1 compatível com nossos estudos até o momento, investigamos a cinética de expressão do mRNA ou proteína tanto de HSTF1 como HSPB1. Os resultados mostraram que tanto células MIN6, como culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas e murinas expostas à PRL por diferentes períodos de tempo (0, 10 min, 30 min e 2h) apresentaram o pico de expressão de HSTF1 em 10 min após o tratamento hormonal (**Figuras 27D-F**), enquanto que HSPB1 apresentou o aumento do nível protéico só após 2h de tratamento com PRL (**Figura 27A-C**). Cabe destacar que esse nível permanceu alto ao menos 48 horas quando comparado com as células controle (Labriola *et al.*, 2007b; Mansano, 2013; Wailemann *et al.*, 2018)

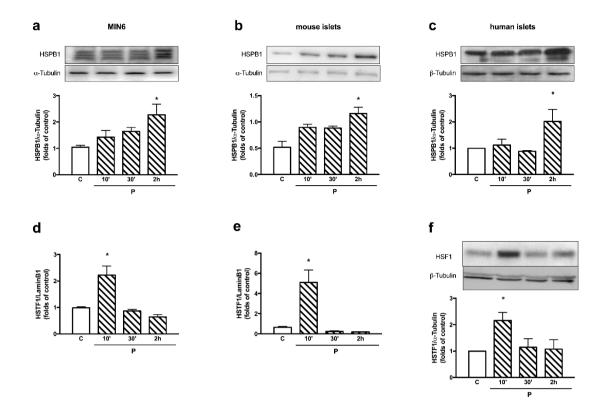


Figura 27. Ativação da expressão de HSF1 e HSPB1 após tratamento com PRL.

Células MIN6 (**A e D**), culturas primárias de ilhotas pancreáticas murinas (**B e E**) e humanas (**C e F**) foram expostas à PRL (P) por diferentes períodos de tempo (0, 10 min, 30 min e 2h). A expressão de HSF1 (**A-C**) e HSPB1 (**D-F**) foram analisadas por qRT-PCR (D e E) ou western blot (A-C e F). Os immunoblots mostrados são resultados representativos e os histogramas correspondentes mostram os resultados de todos os experimentos independentes realizados e estão expressados como média  $\pm$ SEM; n = 3 experimentos independentes. \*:p < 0.05 vs controle (c).

# 4.4-Análise do interactoma de HSPB1 em células MIN6 tratadas com citocinas na presença ou ausência de Prolactina.

HSPB1 foi descrita como uma chaperona envolvida em diversos mecanismos de estresse celular. Além disso, exerce função antiapoptótica e está relacionada com processos de citoproteção em diversos modelos e, como mostramos, é fundamental para o efeito citoprotetor mediado por PRL em células beta(Wailemann *et al.*, 2018). Essas diferentes funções ocorrem devido a capacidade de HSPB1 formar oligômeros de diferentes tamanhos e interagir direta ou indiretamente com muitas proteínas clientes, tais como: Citocromo-C, Caspase-3, FADD, proteína integrante da família dos

receptores de morte (Bruey, Ducasse, et al., 2000; Samali et al., 2001; C Paul et al., 2010; Arrigo, 2013).

Na tentativa de melhor entender os mecanismos moleculares que antecedem o papel citoprotetor induzido por prolactina e mediado por HSPB1, e sabendo que nesse modelo o pico de atividade das caspases-3 e -9 acontece após 9 h de tratamento com citocinas pró-inflamatórias; (Mansano, 2013; Wailemann et al., 2018), foi realizada a incubação de células MIN6 com o coquetel de citocinas pró-inflamatórias (TNFα (8ng/mL), INF $\gamma$  (4ng/mL) e IL-1 $\beta$ (0,8 ng/mL) por 6h na presença ou na ausência de rhPRL (300 ng/mL). A partir dos lisados dessas amostras, HSPB1 foi imunoprecipitada utilizando anticorpo anti HSPB1 (Figura 28A). As proteínas coimunopreciptadas foram digeridas com tripsina espectrometria de massa e posteriormente identificadas por nanoHPLCacoplado a espectrometria de massas (CEFAP- Instituto de Ciências Biomédicas -USP, São Paulo, SP). Um total 130 proteínas clientes de HSPB1 foram identificadas sendo que algumas delas apresentaram um padrão específico de interação com HSPB1 para cada condição.

Salientamos que a maior parte delas, 60 (46,2%) apareceram representadas em ambas as condições. Um pequeno número de 21 (16.2%) proteínas foi identificado exclusivamente no caso das células tratadas com as citocinas e o veículo. Entretanto, na presença de PRL, mais do que o dobro de proteínas coprecipitou em relação ao tratamento com citocinas sozinha: 49 proteínas (37,7%) (**Figura 28B**).

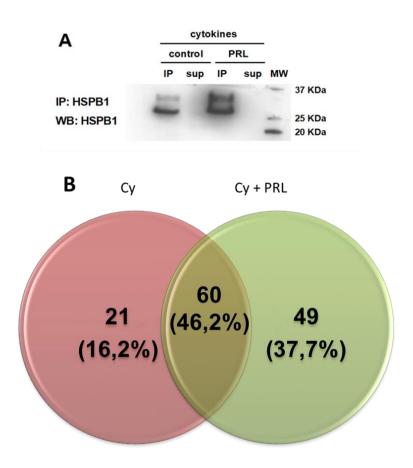


Figura 28. Imunoprecipitação de HSPB1 e Diagrama de Venn mostrando a distribuição do total de proteínas coprecipitadas com HSPB1.

(**A**) Extratos proteicos totais de células MIN6 expostas a um coquetel de citocinas (IL-1 $\beta$ , 0.8 ng/mL; TNFa, 8 ng/mL; IFN- $\gamma$ , 4 ng/mL) por 6h na presença ou ausência de (300 ng/mL) foram submetidas à imunoprecipitação (IP). Immunoblot de HSPB1 da IP e do sobrenadante (sup). As proteínas coprecipitadas foram posteriormente identificadas por nano-HPLC-MS/MS. (**B**) No diagrama de Venn está apresentado o número de proteínas diferentes obtidas em cada condição, assim como o número de proteínas que foram identificadas nas duas condições de tratamento.

Para iniciarmos a classificação de toda a informação obtida, utilizamos o software STRING. O mesmo permite a elaboração de mapas de interação entre proteínas baseado em **dados experimentais** obtidos por diferentes técnicas e em diferentes modelos. Os resultados das **figuras 29**, **30 e 31** apresentam os dados obtidos através da análise utilizando esta plataforma. Assim, cada linha que une duas proteínas (representadas como círculos com as siglas do nome dentro) mostra uma evidência experimental de interação entre elas. Quanto mais linhas de cores diferentes liquem duas

proteínas ou mais espessa esta linha de união, mais evidências experimentais se têm da interação entre elas.

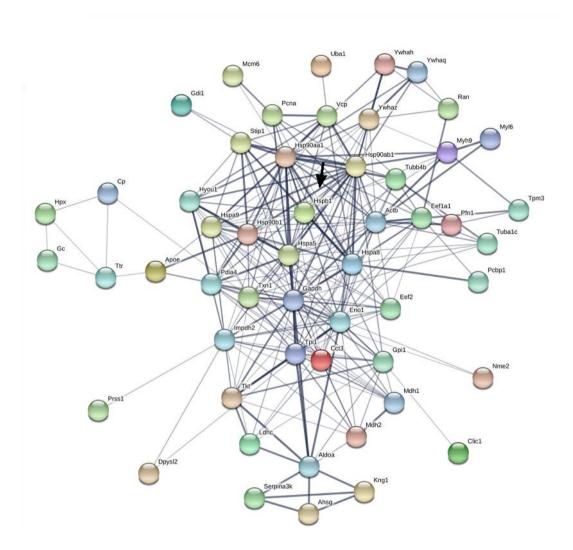


Figura 29. Diagrama interação das proteínas totais de células MIN6 coprecipitadas com HSPB1.

Células MIN6 foram privadas de soro e posteriormente tratadas com uma combinação de citocinas na presença ou na ausência de rhPRL (300 ng/ml) ou veículo (cy) por 6h. Extratos proteicos totais das células foram submetidas à imunoprecipitação. As proteínas coprecipitadas foram posteriormente identificadas por nano-HPLC-MS. No gráfico estão representadas somente aquelas proteínas para as quais é encontrada evidência experimental de interação. A espessura da linha que liga duas proteínas (círculos coloridos com as siglas correspondentes às proteínas indicadas do lado direito dos mesmos) está diretamente relacionada com a quantidade de evidências experimentais que existem para aquela interação. A seta vermelha indica a HSPB1.

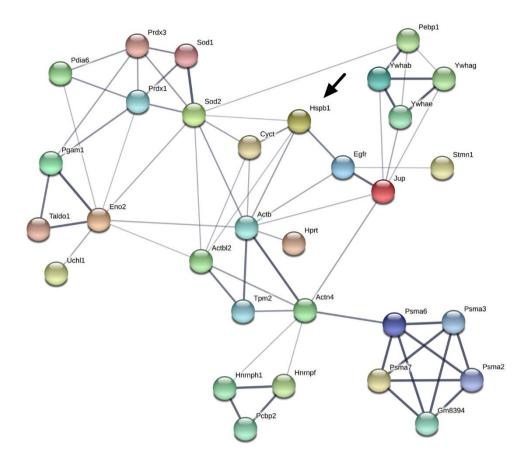


Figura 30. Diagrama interação das proteínas de células MIN6 coprecipitadas com HSPB1, após tratamento com citocinas e mantidas na presença de PRL.

Células MIN6 foram privadas de soro e posteriormente tratadas com uma combinação de citocinas na presença de rhPRL (300ng/mL) por 6h. Extratos protéicos totais das células foram submetidas à imunoprecipitação. As proteínas coprecipitadas foram posteriormente identificadas por nano-HPLC-MS. No gráfico representadas somente aquelas proteínas para as quais é encontrada evidência experimental de interação. Cada linha colorida que liga duas proteínas (círculos coloridos com as siglas correspondentes às proteínas indicadas do lado direito dos mesmos) representa uma evidência experimental que foi reportada para aquela interação. Quanto maior é o número de linhas, maiores evidências experimentais da interação. A seta vermelha indica a HSPB1.

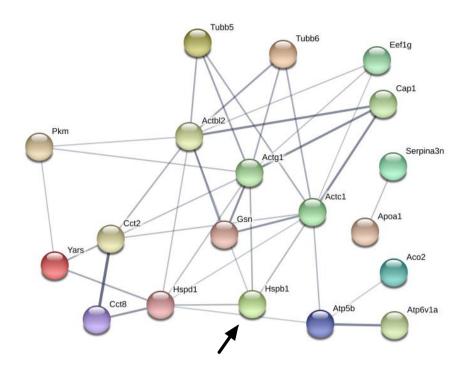


Figura 31. Diagrama da interação das proteínas coprecipitadas com HSPB1 a partir de células MIN6 tratadas com citocinas e mantidas na ausência de PRL.

Células MIN6 foram privadas de soro e posteriormente tratadas com uma combinação de citocinas na ausência de rhPRL por 6h. Extratos proteicos totais das células foram submetidas à imunoprecipitação. As proteínas coprecipitadas foram posteriormente identificadas por nano-HPLC-MS. No gráfico estão representadas somente aquelas proteínas para as quais é encontrada evidência experimental de interação. A espessura da linha que liga duas proteínas (círculos coloridos com as siglas correspondentes às proteínas indicadas do lado direito dos mesmos) está diretamente relacionada com a quantidade de evidências experimentais que existem para aquela interação. A seta vermelha indica a HSPB1.

Estes resultados mostraram que PRL induz interações diretas ou indiretas de HSPB1 com proteínas envolvidas em diversos processos celulares, como inibição da apoptose (ex. citocromo-C, 14-3-3), homeostase redox (ex. superóxido dismutase 1 e 2, peroxiredoxina 1 e 3), metabolismo de carboidratos (ex. malato desidrogenase) e proteínas envolvidas no controle de qualidade proteico (ex. subunidades do sítio catalítico do proteassomo, GRP78, enzima modificadora similar a ubiquitina). A lista completa das proteínas identificadas está inclusa na **Tabela 6**. Ainda, as proteínas identificadas após o tratamento com

citocinas na presença de PRL foram organizadas em função dos processos biológicos que podem estar envolvidas (**Tabela 7**).

### Tabela 6. Proteínas identificadas por EM.

Extratos de proteínas totais de células MIN6 tratadas com uma combinação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β; TNF-α; IFN-γ) por 6 h na presença ou ausência de PRL (300 ng / mL) foram imunoprecipitadas com um anticorpo anti-HSPB1 e subsequentemente as proteínas imunoprecipitadas foram idenficadas pela EM. As proteínas identificadas foram subdivididas em proteínas imunoprecipadas com HSPB1 em ambas as condições de tratamento, somente quando as células foram expostas a citocinas e somente quando as células também foram mantidas na PRL.

#### **Both conditions**

Accession	Description	Score	Coverage	#	# Unique	# Peptides	MW [kDa]	calc.
				Proteins	Peptides			pl
P28798	Granulins OS=Mus musculus GN=Grn PE=1 SV=2 - [GRN_MOUSE]	8,37	5,26	2	2	2	63,4	6,80
P10639	Thioredoxin OS=Mus musculus GN=Txn PE=1 SV=3 - [THIO_MOUSE]	7,10	20,95	1	2	2	11,7	4,92
Q5SX49	Profilin OS=Mus musculus GN=Pfn1 PE=2 SV=1 - [Q5SX49_MOUSE]	7,69	27,68	2	2	2	11,8	4,88
Q01768	Nucleoside diphosphate kinase B OS=Mus musculus GN=Nme2 PE=1 SV=1 - [NDKB_MOUSE]	16,41	28,29	5	3	3	17,4	7,50
Q60605	Myosin light polypeptide 6 OS=Mus musculus GN=Myl6 PE=1 SV=3 - [MYL6_MOUSE]	27,28	27,81	6	4	4	16,9	4,65
P68510	14-3-3 protein eta OS=Mus musculus GN=Ywhah PE=1 SV=2 - [1433F_MOUSE]	9,53	14,63	1	4(PRL)/ 3(cy)	4(PRL)/ 3(cy)	28,2	4,89
P63101	14-3-3 protein zeta/delta OS=Mus musculus GN=Ywhaz PE=1 SV=1 - [1433Z_MOUSE]	17,90	17,96	3	3	3	27,8	4,79
P62827	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Mus musculus GN=Ran PE=1 SV=3 - [RAN_MOUSE]	8,07	14,81	3	3	3	24,4	7,49
P68254-2	Isoform 2 of 14-3-3 protein theta OS=Mus musculus GN=Ywhaq - [1433T_MOUSE]	7,12	10,70	4	4(PRL)/ 2(cy)	5(PRL)/2 (CY)	27,7	4,93
P08249	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mdh2 PE=1 SV=3 - [MDHM_MOUSE]	36,03	39,35	1	10(PRL)/ 3(cy)	10(PRL)/3 (CY)	35,6	8,68
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Mus musculus GN=Aldoa PE=1 SV=2	48,32	29,67	8	8	8	39,3	8,09

	- [ALDOA_MOUSE]							
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Gapdh PE=1 SV=2 - [G3P_MOUSE]	55,20	28,23	7	8	8	35,8	8,25
P60710	Actin, cytoplasmic 1 OS=Mus musculus GN=Actb PE=1 SV=1 - [ACTB_MOUSE]	32,94	21,07	18	6	6	41,7	5,48
P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Mdh1 PE=1 SV=3 - [MDHC_MOUSE]	13,35	11,68	2	3 3(CY) (PRL)/	3(PRL)/ 3(CY)	36,5	6,58
P60335	Poly(rC)-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Pcbp1 PE=1 SV=1 - [PCBP1_MOUSE]	15,29	11,80	4	1	3	37,5	7,09
P17918	Proliferating cell nuclear antigen OS=Mus musculus GN=Pcna PE=1 SV=2 - [PCNA_MOUSE]	13,53	18,01	1	3(PRL)/ 2(CY)	3(PRL)/ 2(CY)	28,8	4,77
D3Z6I8	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Mus musculus GN=Tpm3 PE=2 SV=1 - $[D3Z618\_MOUSE]$	10,72	17,00	25	2	3	28,7	4,79
Q9Z1Q5	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Mus musculus GN=Clic1 PE=1 SV=3 - [CLIC1_MOUSE]	6,81	12,45	1	2(PRL)/1(CY)	2(PRL)/ 1(CY)	27,0	5,17
G3UWN5	Apolipoprotein E (Fragment) OS=Mus musculus GN=Apoe PE=3 SV=1 - [G3UWN5_MOUSE]	6,63	9,91	4	2(PRL)/1(CY)	2(PRL)/ 1(CY)	26,4	6,15
D3YVR7	L-lactate dehydrogenase (Fragment) OS=Mus musculus GN=Ldhc PE=2 SV=1 - [D3YVR7_MOUSE]	9,08	8,94	9	2	2	25,2	8,32
Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Mus musculus GN=Vcp PE=1 SV=4 - [TERA_MOUSE]	58,20	21,71	7	13	13	89,3	5,26
P11499	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Mus musculus GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=3 - [HS90B_MOUSE]	38,08	17,96	6	5	11	83,2	5,03
G3X9T8	Ceruloplasmin OS=Mus musculus GN=Cp PE=4 SV=1 - [G3X9T8_MOUSE]	41,31	12,64	5	10(PRL)/ 7(cy)	10(PRL)/7(cy)	121,0	5,85
P08113	Endoplasmin OS=Mus musculus GN=Hsp90b1 PE=1 SV=2 - [ENPL_MOUSE]	33,20	11,97	2	7	9	92,4	4,82
Q02053	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Mus musculus GN=Uba1 PE=1 SV=1 - [UBA1_MOUSE]	28,32	10,21	1	7(PRL)/5(CY)	8(PRL)/ 5(CY)	117,7	5,66
P58252	Elongation factor 2 OS=Mus musculus GN=Eef2 PE=1 SV=2 - [EF2_MOUSE]	18,85	9,91	1	7	7	95,3	6,83
1								

P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Mus musculus GN=Hsp90aa1 PE=1 SV=4 - [HS90A_MOUSE]	20,06	10,64	5	2	6	84,7	5,01
P97311	DNA replication licensing factor MCM6 OS=Mus musculus GN=Mcm6 PE=1 SV=1 - [MCM6_MOUSE]	8,91	4,14	1	3	3	92,8	5,45
P07309	Transthyretin OS=Mus musculus GN=Ttr PE=1 SV=1 - [TTHY_MOUSE]	15,19	21,77	1	3(PRL)/ 1(CY)	3(PRL)/ 1(CY)	15,8	6,16
Q9JKR6	Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Mus musculus GN=Hyou1 PE=1 SV=1 - [HYOU1_MOUSE]	6,30	3,10	2	2(PRL)/1(CY)	2(PRL)/1(CY)	111,1	5,19
Q8VDD5	Myosin-9 OS=Mus musculus GN=Myh9 PE=1 SV=4 - [MYH9_MOUSE]	7,31	1,38	1	2	2	226,2	5,66
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus GN=Hspa8 PE=1 SV=1 - [HSP7C_MOUSE]	158,32	45,98	8	23	25	70,8	5,52
P20029	78 kDa glucose-regulated protein OS=Mus musculus GN=Hspa5 PE=1 SV=3 - [GRP78_MOUSE]	70,70	33,13	1	16(PRL)/ 6(CY)	18(PRL)/8(CY)	72,4	5,16
P38647	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspa9 PE=1 SV=3 - [GRP75_MOUSE]	12,97	8,39	1	4	4	73,4	6,07
P07759	Serine protease inhibitor A3K OS=Mus musculus GN=Serpina3k PE=1 SV=2 - [SPA3K_MOUSE]	9,75	10,05	1	2	2	46,8	5,16
P23953	Carboxylesterase 1C OS=Mus musculus GN=Ces1c PE=1 SV=4 - [EST1C_MOUSE]	12,80	5,78	5	3	3	61,0	5,06
P08003	Protein disulfide-isomerase A4 OS=Mus musculus GN=Pdia4 PE=1 SV=3 - [PDIA4_MOUSE]	5,68	4,86	1	2	2	71,9	5,31
E9Q1Z0	Protein 4732456N10Rik OS=Mus musculus GN=4732456N10Rik PE=3 SV=1 - [E9Q1Z0_MOUSE]	18,36	8,18	7	2	5	58,2	8,25
Q91X72	Hemopexin OS=Mus musculus GN=Hpx PE=1 SV=2 - [HEMO_MOUSE]	46,46	25,00	1	8	8	51,3	7,80
Q60864	Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Mus musculus GN=Stip1 PE=1 SV=1 - [STIP1_MOUSE]	29,58	18,23	1	8	8	62,5	6,80
O08677-2	Isoform LMW of Kininogen-1 OS=Mus musculus GN=Kng1 - [KNG1_MOUSE]	12,93	10,19	5	4	4	47,9	6,09
Q504P4	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus GN=Hspa8 PE=2 SV=1 - [Q504P4_MOUSE]	13,25	8,61	9	4	4	68,7	5,52
O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Mus musculus GN=Dpysl2 PE=1	7,12	5,07	7	2	2	62,2	6,38

	SV=2 - [DPYL2_MOUSE]							
F6Q609	T-complex protein 1 subunit gamma (Fragment) OS=Mus musculus GN=Cct3 PE=3 SV=1 - [F6Q609_MOUSE]	4,49	5,86	4	2	2	34,4	5,63
E9Q2D1	Actin, cytoplasmic 1 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Actb PE=2 SV=1 - [E9Q2D1_MOUSE]	4,69	19,44	16	1	2	11,4	4,93
P40142	Transketolase OS=Mus musculus GN=Tkt PE=1 SV=1 - [TKT_MOUSE]	22,33	14,61	1	6	6	67,6	7,50
P68372	Tubulin beta-4B chain OS=Mus musculus GN=Tubb4b PE=1 SV=1 - [TBB4B_MOUSE]	66,81	39,78	5	3	14	49,8	4,89
P68373	Tubulin alpha-1C chain OS=Mus musculus GN=Tuba1c PE=1 SV=1 - [TBA1C_MOUSE]	32,97	24,28	6	8	8	49,9	5,10
P10126	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Mus musculus GN=Eef1a1 PE=1 SV=3 - [EF1A1_MOUSE]	21,98	11,69	4	5	5	50,1	9,01
P17182	Alpha-enolase OS=Mus musculus GN=Eno1 PE=1 SV=3 - [ENOA_MOUSE]	27,59	16,36	13	4	5	47,1	6,80
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Mus musculus GN=Ahsg PE=1 SV=1 - [FETUA_MOUSE]	34,86	27,83	1	5	5	37,3	6,51
Q9QWK4	CD5 antigen-like OS=Mus musculus GN=Cd5l PE=1 SV=3 - [CD5L_MOUSE]	14,63	11,65	2	4	4	38,8	5,16
P21614	Vitamin D-binding protein OS=Mus musculus GN=Gc PE=1 SV=2 - [VTDB_MOUSE]	15,44	11,76	1	4	4	53,6	5,50
P06745	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Mus musculus GN=Gpi PE=1 SV=4 - $[\text{G6PI\_MOUSE}]$	7,92	5,38	2	2	2	62,7	8,13
P50396	Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS=Mus musculus GN=Gdi1 PE=1 SV=3 - [GDIA_MOUSE]	6,62	5,37	2	2	2	50,5	5,08
P24547	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 OS=Mus musculus GN=Impdh2 PE=1 SV=2 - [IMDH2_MOUSE]	6,51	5,06	1	2	2	55,8	7,28
P07759	Serine protease inhibitor A3K OS=Mus musculus GN=Serpina3k PE=1 SV=2 - [SPA3K_MOUSE]	7,56	7,89	1	2	2	46,8	5,16
J3QK03	Protein Ighv6-5 OS=Mus musculus GN=Ighv6-5 PE=4 SV=1 - [J3QK03_MOUSE]	11,81	27,27	2	1	2	11,1	5,12
Н7ВХС3	Triosephosphate isomerase OS=Mus musculus GN=Tpi1 PE=2 SV=1 - [H7BXC3_MOUSE]	17,11	24,55	2	3	3	18,0	5,58
•								

Q9Z1R9	MCG124046 OS=Mus musculus GN=Prss1 PE=2 SV=1 - [Q9Z1R9_MOUSE]	7,41	8,13	1	1	1	26,1	4,94			
	Cy only										
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pl			
Q00623	Apolipoprotein A-I OS=Mus musculus GN=Apoa1 PE=1 SV=2 - [APOA1_MOUSE]	8,02	4,92	1	2	2	30,6	5,73			
P68033	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Mus musculus GN=Actc1 PE=1 SV=1 - [ACTC_MOUSE]	47,85	25,99	8	1	9	42,0	5,39			
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Actbl2 PE=1 SV=1 - [ACTBL_MOUSE]	21,31	19,95	1	1	4	42,0	5,49			
Q99KI0	Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Aco2 PE=1 SV=1 - [ACON_MOUSE]	12,32	7,05	1	4	4	85,4	7,93			
Q8VDM4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Mus musculus GN=Psmd2 PE=1 SV=1 - [PSMD2_MOUSE]	7,89	2,97	2	2	2	100,1	5,17			
P13020-2	Isoform 2 of Gelsolin OS=Mus musculus GN=Gsn - [GELS_MOUSE]	4,88	2,74	2	2	2	80,7	5,76			
P63038	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspd1 PE=1 SV=1 - [CH60_MOUSE]	27,86	18,50	2	10	10	60,9	6,18			
Q91WQ3	TyrosinetRNA ligase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Yars PE=2 SV=3 - [SYYC_MOUSE]	17,03	12,69	2	6	6	59,1	7,01			
P52480	Pyruvate kinase PKM OS=Mus musculus GN=Pkm PE=1 SV=4 - [KPYM_MOUSE]	13,97	12,43	2	4	4	57,8	7,47			
P99024	Tubulin beta-5 chain OS=Mus musculus GN=Tubb5 PE=1 SV=1 - [TBB5_MOUSE]	9,21	8,33	8	3	3	49,6	4,89			
P50516-2	Isoform 2 of V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Mus musculus GN=Atp6v1a - [VATA_MOUSE]	10,82	7,07	3	3	3	55,6	5,91			
Q922F4	Tubulin beta-6 chain OS=Mus musculus GN=Tubb6 PE=1 SV=1 - [TBB6_MOUSE]	31,72	17,67	3	1	6	50,1	4,89			
G3X8T9	Serine (Or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N, isoform CRA_a OS=Mus musculus GN=Serpina3n PE=3 SV=1 - [G3X8T9_MOUSE]	12,37	11,24	8	3	4	46,7	5,82			
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5b PE=1 SV=2 - [ATPB_MOUSE]	8,42	7,37	1	3	3	56,3	5,34			

B1ATY1	Actin, cytoplasmic 2 OS=Mus musculus GN=Actg1 PE=2 SV=1 - [B1ATY1_MOUSE]	13,68	20,92	17	3	3	16,7	6,76	
P40124	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Cap1 PE=1 SV=4 - [CAP1_MOUSE]	5,55	6,33	2	2	2	51,5	7,52	
Q9D8N0	Elongation factor 1-gamma OS=Mus musculus GN=Eef1g PE=1 SV=3 - $[{\sf EF1G\_MOUSE}]$	5,80	5,49	1	2	2	50,0	6,74	
P80314	T-complex protein 1 subunit beta OS=Mus musculus GN=Cct2 PE=1 SV=4 - [TCPB_MOUSE]	2,69	2,99	1	2	2	57,4	6,40	
H3BL49	T-complex protein 1 subunit theta OS=Mus musculus GN=Cct8 PE=2 SV=1 - [H3BL49_MOUSE]	5,12	4,50	5	2	2	53,0	5,50	
E9Q1Z0	Protein 4732456N10Rik OS=Mus musculus GN=4732456N10Rik PE=3 SV=1 - [E9Q1Z0_MOUSE]	18,36	8,18	7	2	5	58,2	8,25	
Q9Z1F9	SUMO-activating enzyme subunit 2 OS=Mus musculus GN=Uba2 PE=2 SV=1 - [SAE2_MOUSE]	4,20	2,35	1	1	1	70,5	5,24	

Cy+PRL only

# Peptides Accession Description Score Coverage # # Unique MW [kDa] calc. **Proteins** Peptides рl P54227 Stathmin OS=Mus musculus GN=Stmn1 PE=1 SV=2 - [STMN1\_MOUSE] 2 2 17,3 5,97 5.64 14,77 4 G3UWG1 MCG115977 OS=Mus musculus GN=Gm10108 PE=3 SV=1 - 4,63 23,81 2 2 2 11,7 9,64 [G3UWG1\_MOUSE] (cytochrome c) F8VPN3 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Mus musculus GN=Gm5160 PE=3 2,29 15.65 2 2 2 16,3 6.77 SV=2 - [F8VPN3\_MOUSE] P62259 14-3-3 protein epsilon OS=Mus musculus GN=Ywhae PE=1 SV=1 - 18,29 20,78 3 29,2 4,74 [1433E\_MOUSE] Q61990-2 Isoform 2 of Poly(rC)-binding protein 2 OS=Mus musculus GN=Pcbp2 - 15,63 13,29 6 1 3 34,9 8,00 [PCBP2\_MOUSE] P06728 Apolipoprotein A-IV OS=Mus musculus GN=Apoa4 PE=2 SV=3 - 8,59 5,82 2 2 45,0 5,47 [APOA4\_MOUSE] Q02257 Junction plakoglobin OS=Mus musculus GN=Jup PE=1 SV=3 -2 2 81,7 8.60 3.49 6.14 [PLAK\_MOUSE] 2 Q93092 Transaldolase OS=Mus musculus GN=Taldo1 PE=1 SV=2 6.36 6.82 1 2 37,4 7,03

	[TALDO_MOUSE]							
D3Z7K0	Ubiquitin thioesterase OTUB1 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Otub1 PE=2 SV=1 - [D3Z7K0_MOUSE]	7,01	28,42	3	2	2	11,2	7,33
A2AIM4	Tropomyosin beta chain OS=Mus musculus GN=Tpm2 PE=2 SV=1 - [A2AIM4_MOUSE]	6,61	10,21	20	1	2	33,0	4,69
P57780	Alpha-actinin-4 OS=Mus musculus GN=Actn4 PE=1 SV=1 - [ACTN4_MOUSE]	6,26	3,62	4	3	3	104,9	5,41
E9Q5F4	Actin, cytoplasmic 1 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Actb PE=2 SV=1 - $[E9Q5F4\_MOUSE]$	6,91	11,70	16	3	3	29,4	5,11
Q8BHN3	Neutral alpha-glucosidase AB OS=Mus musculus GN=Ganab PE=1 SV=1 - [GANAB_MOUSE]	8,11	3,39	3	2	2	106,8	6,06
P49717	DNA replication licensing factor MCM4 OS=Mus musculus GN=Mcm4 PE=2 SV=1 - [MCM4_MOUSE]	7,11	2,90	1	2	2	96,7	7,20
P31254	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 Y OS=Mus musculus GN=Uba1y PE=2 SV=2 - [UBA1Y_MOUSE]	7,77	2,55	1	1	2	118,0	5,55
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Actbl2 PE=1 SV=1 - [ACTBL_MOUSE]	4,41	7,71	1	1	2	42,0	5,49
E9PYF1	Aminopeptidase B OS=Mus musculus GN=Rnpep PE=2 SV=1 - [E9PYF1_MOUSE]	5,61	3,76	2	2	2	68,0	5,50
P50247	Adenosylhomocysteinase OS=Mus musculus GN=Ahcy PE=1 SV=3 - [SAHH_MOUSE]	10,21	9,03	1	3	3	47,7	6,54
P17183	Gamma-enolase OS=Mus musculus GN=Eno2 PE=1 SV=2 - [ENOG_MOUSE]	12,19	6,45	9	1	2	47,3	5,11
O35737	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Mus musculus GN=Hnrnph1 PE=1 SV=3 - [HNRH1_MOUSE]	6,75	7,35	4	1	2	49,2	6,30
Q91XL1	Leucine-rich HEV glycoprotein OS=Mus musculus GN=Lrg1 PE=2 SV=1 - [Q91XL1_MOUSE]	7,67	7,89	1	2	2	37,4	6,61
Q9Z2X1-2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Mus musculus GN=Hnrnpf - [HNRPF_MOUSE]	7,89	8,61	5	1	2	43,7	5,48
P23506	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase OS=Mus musculus GN=Pcmt1 PE=1 SV=3 - [PIMT_MOUSE]	15,20	17,18	7	4	4	24,6	7,65
1								

P12246	Serum amyloid P-component OS=Mus musculus GN=Apcs PE=1 SV=2 - [SAMP_MOUSE]	14,20	14,29	1	2	2	26,2	6,35
Q9R0P9	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 OS=Mus musculus GN=Uchl1 PE=1 SV=1 - [UCHL1_MOUSE]	13,03	17,49	1	2	2	24,8	5,24
D3YX79	Proteasome subunit alpha type OS=Mus musculus GN=Gm8394 PE=3 SV=1 - [D3YX79_MOUSE]	9,73	17,01	2	3	3	26,4	4,89
Q922R8	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Mus musculus GN=Pdia6 PE=1 SV=3 - [PDIA6_MOUSE]	4,30	3,41	1	1	1	48,1	5,14
E9Q0F0	Protein Krt78 OS=Mus musculus GN=Krt78 PE=2 SV=1 - [E9Q0F0_MOUSE]	7,23	1,31	1	2	2	112,2	7,97
O70435	Proteasome subunit alpha type-3 OS=Mus musculus GN=Psma3 PE=1 SV=3 - [PSA3_MOUSE]	7,20	10,20	1	2	2	28,4	5,44
Q9Z2U0	Proteasome subunit alpha type-7 OS=Mus musculus GN=Psma7 PE=1 SV=1 - [PSA7_MOUSE]	6,67	10,08	2	2	2	27,8	8,46
P61982	14-3-3 protein gamma OS=Mus musculus GN=Ywhag PE=1 SV=2 - [1433G_MOUSE]	6,64	8,91	2	1	2	28,3	4,89
Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Mus musculus GN=Pgam1 PE=1 SV=3 - [PGAM1_MOUSE]	6,27	12,20	2	2	2	28,8	7,18
P49722	Proteasome subunit alpha type-2 OS=Mus musculus GN=Psma2 PE=1 SV=3 - [PSA2_MOUSE]	5,98	5,98	1	1	1	25,9	7,43
P00493	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase OS=Mus musculus GN=Hprt1 PE=1 SV=3 - [HPRT_MOUSE]	5,58	11,47	1	2	2	24,6	6,68
Q9QUM9	Proteasome subunit alpha type-6 OS=Mus musculus GN=Psma6 PE=1 SV=1 - [PSA6_MOUSE]	5,37	9,35	3	2	2	27,4	6,76
A2A5N1	14-3-3 protein beta/alpha (Fragment) OS=Mus musculus GN=Ywhab PE=2 SV=1 - [A2A5N1_MOUSE]	4,80	13,84	4	1	2	18,3	5,48
D6RHS6	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Pebp1 PE=2 SV=1 - [D6RHS6_MOUSE]	3,70	10,29	3	1	1	14,8	5,08
Q62348	Translin OS=Mus musculus GN=Tsn PE=1 SV=1 - [TSN_MOUSE]	3,33	5,26	1	1	1	26,2	6,44
Q9Z1Q5	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Mus musculus GN=Clic1 PE=1 SV=3 - [CLIC1_MOUSE]	6,81	12,45	1	2	2	27,0	5,17
E9PZC4	Flavin reductase (NADPH) OS=Mus musculus GN=Blvrb PE=2 SV=1 -	3,15	8,33	3	1	1	13,4	7,24

	[E9PZC4_MOUSE]							
B1AXW5	Peroxiredoxin-1 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Prdx1 PE=2 SV=1 - $[B1AXW5\_MOUSE]$	3,04	6,47	5	1	1	18,9	7,33
P09671	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial OS=Mus musculus GN=Sod2 PE=1 SV=3 - [SODM_MOUSE]	2,85	6,31	1	1	1	24,6	8,62
P20108	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Prdx3 PE=1 SV=1 - [PRDX3_MOUSE]	2,28	4,28	1	1	1	28,1	7,58
Q9WVF5	Epidermal growth factor receptor OS=Mus musculus GN=Egfr PE=2 SV=1 - [Q9WVF5_MOUSE]	4,29	2,75	2	1	1	72,9	7,01
P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Mus musculus GN=Sod1 PE=1 SV=2 - [SODC_MOUSE]	3,46	8,44	1	1	1	15,9	6,51
O08529	Calpain-2 catalytic subunit OS=Mus musculus GN=Capn2 PE=2 SV=4 - [CAN2_MOUSE]	2,60	1,86	1	1	1	79,8	4,96
Q9D9N5	Calcium and integrin-binding family member 4 OS=Mus musculus GN=Cib4 PE=2 SV=1 - [CIB4_MOUSE]	0,00	21,08	1	1	1	21,6	4,67
E9PUQ8	Protein Dgkd OS=Mus musculus GN=Dgkd PE=2 SV=1 - [E9PUQ8_MOUSE]	0,00	0,82	1	1	1	135,1	7,81
O35219-3	Isoform 3 of Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2 OS=Mus musculus GN=Kcnh2 - [KCNH2_MOUSE]	2,51	1,59	1	1	1	90,1	7,94

Tabela 7. Processos biológicos em que as proteínas identificadas interagindo *com HSPB1 estão envolvidas,* somente na condição da presença de citocinas e PRL.

Extratos de proteínas totais de células MIN6 tratadas com uma combinação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β; TNF-α; IFN-γ) por 6 h na presença de PRL (300 ng / mL) foram imunoprecipitadas com um anticorpo anti-HSPB1 e proteínas imunoprecipitadas foram subsequentemente idenficadas pela EM. As proteínas foram distribuídas em processos biológicos da Gene Ontology com o software STRING.

#pathway ID	pathway description	observed count	gene	false discovery rate	matching proteins in the network
GO.0042743	hydrogen peroxide metabolic process	6		1.5e-07	Apoa4,Cyct,Prdx1,Prdx3,Sod1,Sod2
GO.0019430	removal of superoxide radicals	4		6.96e-05	Apoa4,Prdx1,Sod1,Sod2
GO.0071451	cellular response to superoxide	4		9.55e-05	Apoa4,Prdx1,Sod1,Sod2
GO.0010499	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process	4		0.000349	Psma2,Psma3,Psma6,Psma7
GO.0009056	catabolic process	14		0.000434	Apoa4,Blvrb,Eno2,Hprt,Pcbp2,Pgam1,Prdx1,Prdx3,Psma2,Psma3,Psma6,Psma7,Ube1y1,Uchl1
GO.0034614	cellular response to reactive oxygen species	5		0.00123	Apoa4,Prdx1,Prdx3,Sod1,Sod2
GO.0051881	regulation of mitochondrial membrane potential	4		0.00123	Clic1,Prdx3,Sod1,Sod2
GO.0070527	platelet aggregation	4		0.00123	Actb,Clic1,Hspb1,Pdia6
GO.0072593	reactive oxygen species metabolic process	5		0.00123	Apoa4,Cyct,Prdx1,Prdx3,Sod1
GO.0044248	cellular catabolic process	12		0.00165	Apoa4,Blvrb,Hprt,Pcbp2,Prdx1,Prdx3,Psma2,Psma3,Psma6,Psma7,Ube1y1,Uchl1
GO.0042744	hydrogen peroxide catabolic process	3		0.00186	Apoa4,Prdx1,Prdx3
GO.1901575	organic substance catabolic process	12		0.00186	Apoa4,Blvrb,Eno2,Hprt,Pcbp2,Pgam1,Psma2,Psma3,Psma6,Psma7,Ube1y1,Uchl1
GO.0001895	retina homeostasis	4		0.00526	Actb,Hspb1,Prdx1,Sod1
GO.0009611	response to wounding	7		0.00683	Actb,Clic1,Hspb1,Pdia6,Pebp1,Sod1,Sod2

GO.0019941	modification-dependent protein catabolic process	7	0.00686	Pcbp2,Psma2,Psma3,Psma6,Psma7,Ube1y1,Uchl1
GO.0030168	platelet activation	4	0.00807	Actb,Clic1,Hspb1,Pdia6
GO.0042391	regulation of membrane potential	6	0.00807	Clic1,Kcnh2,Prdx3,Sod1,Sod2,Ywhae
GO.0051248	negative regulation of protein metabolic process	10	0.00807	Apcs,Apoa4,Egfr,Hspb1,Otub1,Pebp1,Prdx3,Uchl1,Ywhab,Ywha e
GO.0016337	single organismal cell-cell adhesion	7	0.0113	Actb,Apoa4,Clic1,Egfr,Hspb1,Jup,Pdia6
GO.1902175	regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway	3	0.0113	Hspb1,Sod1,Sod2
GO.0044257	cellular protein catabolic process	7	0.0121	Pcbp2,Psma2,Psma3,Psma6,Psma7,Ube1y1,Uchl1
GO.0065009	regulation of molecular function	15	0.0168	Apcs,Apoa4,Cyct,Hspb1,Jup,Pebp1,Prdx3,Psma6,Sod1,Sod2,Tpm2,Uchl1,Ywhab,Ywhae,Ywhag
GO.0006979	response to oxidative stress	6	0.0205	Apoa4,Pebp1,Prdx1,Prdx3,Sod1,Sod2
GO.0044710	single-organism metabolic process	18	0.0249	Apoa4,Blvrb,Cyct,Egfr,Eno2,Ganab,Gm4737,Hprt,Kcnh2,Otub1, Pebp1,Pgam1,Prdx1,Prdx3,Rnpep,Sod1,Sod2,Taldo1
GO.0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	6	0.0325	Pcbp2,Psma2,Psma3,Psma6,Psma7,Uchl1
GO.0044237	cellular metabolic process	27	0.0325	Apoa4,Blvrb,Cyct,Eno2,Ganab,Gm4737,Hnrnpf,Hnrnph1,Hprt,Kcnh2,Otub1,Pcbp2,Pcmt1,Pdia6,Pebp1,Pgam1,Prdx1,Prdx3,Psma2,Psma3,Psma6,Psma7,Rnpep,Sod1,Taldo1,Tsn,Ube1y1
GO.0050665	hydrogen peroxide biosynthetic process	2	0.0347	Sod1,Sod2
GO.0006950	response to stress	15	0.0423	Actb,Actn4,Apcs,Apoa4,Capn2,Clic1,Hspb1,Otub1,Pcbp2,Pdia6,Pebp1,Prdx1,Prdx3,Sod1,Uchl1
GO.0043161	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	5	0.0423	Pcbp2,Psma2,Psma3,Psma6,Psma7
GO.0007596	blood coagulation	4	0.0454	Actb,Clic1,Hspb1,Pdia6
GO.0019693	ribose phosphate metabolic process	5	0.0481	Cyct,Eno2,Hprt,Pgam1,Taldo1

A fim de validar estes resultados, a presença de algumas proteínas foi avaliada por western blot após ser realizada a imunoprecipitação com anticorpo anti-HSPB1. A presença das seguintes proteínas foi analisada nos imunoprecipitados e nos seus respectivos sobrenadantes:

- Actina: é uma proteína globular que forma microfilamentos do citoesqueleto que foi identificada em ambas condições de tratamento (**Figura 32A**).
- p62: é uma proteína sinalizadora do processo de controle de qualidade de proteínas que apresenta um domínio de ligação à ubiquitina que não coprecipitou com HSPB1 em nenhuma das condições testadas (**Figura 32B**).
- Peroxirredoxina 1 (PRDX1): pertence a família de enzimas antioxidantes que atua como sequestradora de peróxido em células de mamíferos. Identificamos esta proteína somente na condição de células tratadas com PRL (**Figura 32C**).

Resulta importante salientar que na nossa análise fomos capazes de identificar mais proteínas que interagem com HSPB1 do que reportado na bibliografia até agora. Nós reportamos 130 proteínas diferentes enquanto que a última revisão sobre o tema conseguiu mostrar 69 proteínas diferentes (Arrigo, 2013).

A partir destes resultados mostrou-se ainda mais evidente a necessidade de analisar outros mecanismos essenciais nas células beta, nos quais HSPB1 poderia ter participação.

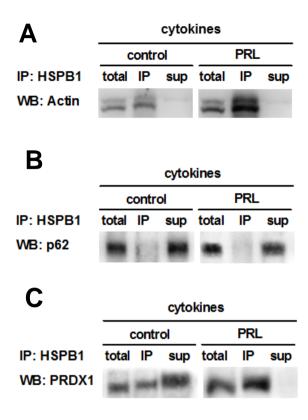


Figura 32. Validação dos resultados do interactoma de HSPB1.

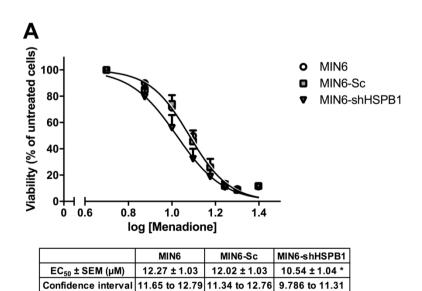
Extratos proteicos totais foram obtidos de células MIN6 carenciadas com 0,1% SFB por 24h e tratadas com o coquetel de citocinas pro-inflamatórias por 6h na ausência (control) ou na presença de rhPRL (PRL). Posteriormente foi avaliada, por western blot , a presença das proteínas ( $\bf A$ ) Actina, ( $\bf B$ ) PRDX1 e ( $\bf C$ ) p62 no extrato total, no imunoprecipitado e no seu respectivo sobrenadante. n = 3 experimentos independentes.

### 4.5- HSPB1 como mediadora de citoproteção contra estresse oxidativo.

Visto que várias proteínas relacionadas com detoxificação de peróxidos e diminuição de estresse oxidativo intracelular foram encontradas no interactoma de HSPB1 nas células MIN6 submetidas ao tratamento conjunto de citocinas pró-inflamatórias e PRL, conforme demonstrado no item anterior, e que uma das principais causas da apoptose de células beta no DM1 é decorrente do aumento do estresse oxidativo induzido pelas células do sistema imune, mostrou-se extremamente relevante analizar se HSPB1 tem envolvimento em processos redox nas células beta.

Estes estudos foram realizados em colaboração com a Dra. Leticia Ferreira Terra (LMMC, IQ-USP) e o Dr. Stephan Lortz (MHU, Hannover, Alemanha), Para tanto, verificamos se células silenciadas para HSPB1 apresentavam sensibilidade diferente em processos envolvendo estresse oxidativo. Os resultados relacionados a este específico papel de HSPB1 estão apresentados abaixo e descritos em Terra, Wailemann et al (manuscrito submetido– anexo 1).

Inicialmente testamos a sensibilidade para ROS em células MIN6, MIN6-Sc e MIN6-shHSPB. Primeiro, 1,2 x 10<sup>4</sup> células de cada tipo célular foram plaqueadas e mantidas por 24h em meio RPMI 10%SFB. As culturas foram submetidas a um tratamento com concentrações crescentes de (0 - 20)μM), composto químico gerador intramitocondrial, ou o  $H_2O_2(0 - 100 \mu M)$ , por 2h. O meio de cultura foi trocado e a viabilidade celular foi avaliada no dia seguinte por ensaio de MTT. Os resultados mostraram que células MIN6 silenciadas para HSPB1 são mais sensíveis para ROS, uma vez que apresentaram significativamente mais baixo EC<sub>50</sub> de 10,5  $\mu$ M para Menadiona (**Figura 33A**) e 27,8  $\mu$ M para  $H_2O_2$  (**Figura 33B**) (p<0,05), o que representa cerca de 20% menos que as respectivas células controle. Estes resultados indicam que, no nosso modelo, a presença de HSPB1 está relacionada com um aumento da resistência contra toxicidade induzida por ROS.



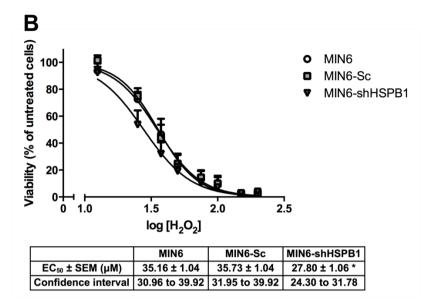


Figura 33. Células MIN6 silenciadas para HSPB1 são mais sensíveis à toxicidade induzida por estresse oxidativo.

Células MIN6, MIN6-Sc, and MIN6-shHSPB1 foram tratadas com concentrações crescentes de Menadiona (0 – 20  $\mu$ M) ou de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 – 100  $\mu$ M), por 2h. Após esse período de tempo, o meio de cultura foi trocado e a viabilidade foi avaliada no dia seguinte por ensaio de MTT. Resultados expressos como média ±SEM; \*p<0,05 vs. outros tipos celulares; n = 6 experimentos independentes.

Nosso próximo passo foi analisar se PRL poderia proteger células MIN6 contra a perda de viabilidade frente ao estresse oxidativo. Assim, células MIN6, MIN6-Sc e MIN6-shHSPB1 foram plaqueadas e mantidas por 24h em meio RPMI 10%SFB. As culturas celulares foram logo pré-tratadas com rhPRL (300ng/ml), por 30min e incubadas com concentrações crescentes de Menadiona (0 – 20  $\mu$ M), por 2h. Após esse período de tempo, o meio de cultura foi trocado, mantendo somente o tratamento hormonal até o dia seguinte, quando a viabilidade foi avaliada por ensaio de MTT.

Nossos resultados mostram que PRL protegeu tanto as células MIN6 (p<0,05) (**Figura 34A**), como MIN6-Sc (p<0,05) (**Figura 34B**), contra a toxicidade induzida por Menadiona em relação aos respectivos controles, mas não células MIN6-shHSPB1 (**Figura 34C**). Estes dados indicaram que o efeito citoprotetor da PRL frente à morte induzida por indutores de estresse oxidativo seria também mediado por HSPB1, uma vez que este efeito foi perdido nas células silenciadas para essa chaperona.

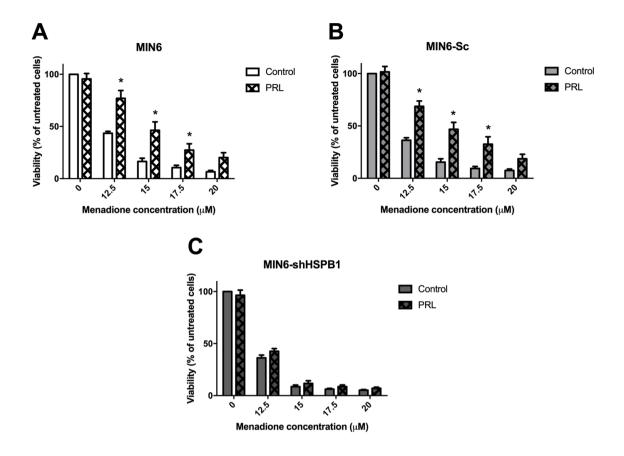


Figura 34. HSPB1 é um mediador da ação da Prolactina na inibição da morte de células MIN6 induzida menadiona.

Células MIN6 (**A**), MIN6-Sc (**B**) , e MIN6-shHSPB1 (**C**) foram expostas a concentrações crescientes de menadiona (0 – 20  $\mu$ M) e mantidas ou não com rhPRL (300 ng/mL), por 2 h. Então, o meio de cultura foi trocado e a viabilidade foi avaliada no dia seguinte por ensaio de MTT. \*p<0,05 PRL vs controle do respectivo tratamento; n = 3 experimentos independentes.

Depois, procuramos identificar se ROS geradas em diferentes compartimentos intracelulares modificariam o efeito citoprotetor mediado pela presença de HSPB1. Para tanto, foram geradas células que expressam variantes citosólicas ou mitocondriais de D-aminoácido oxidase (DAAO), conforme descrito na seção de matérias e métodos, com o objetivo de usar uma forma alternativa de gerar estresse oxidativo em diferentes compartimentos celulares de forma específica. Estas enzimas participam da reação de deaminação de D-aminoácidos produzindo seus correspondentes iminoácidos, além de amônia e peróxido de hidrogênio como subprodutos (Haskew-Layton *et al.*, 2010).

Essa abordagem experimental foi utilizada em células MIN6. Foram plaqueadas 2x10<sup>4</sup> células por poço e infectadas com as partículas virais por 5-6h. Posteriormente o meio foi trocado e as culturas selecionadas com Geneticina (500μg/mL). A confirmação da expressão de DAAO em todas as linhagens celulares foi realizada por western blot e está mostrada na **figura 35A**. Uma vez confirmado o sucesso da superexpressão das duas variantes das enzimas , células MIN6, MIN6-Sc e MIN6-shHSPB1 foram incubadas com concentrações crescentes de um dos seus substratos , D-Alanina (0 – 20 mM), por 24h e posteriormente foi avaliada a viabilidade celular por ensaios de MTT.

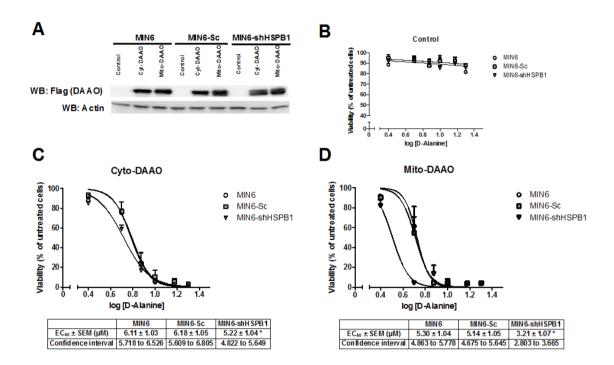


Figura 35. HSPB1 tem maior capacidade de inibir a morte induzida por aumento de estresse oxidativo na mitocôndria do que no citosol.

(A) Confirmação da expressação das isoformas citossólicas ou mitocondriais de DAAO em células MIN6, MIN6-Sc e MIN6-shHSPB1 por western blot. (B) Células controle que não superexpressam nenhuma DAAO ou que superexpressam (C) a variante citosólica ou (D) mitochondrial de DAAO foram expostas a um aumento da concentração (0 – 20 mM) de D-Alanina por 24h. Após esse período de tempo, a viabilidade foi avaliada por ensaio de MTT. Resultados expressos como média  $\pm$ SEM; \*p<0,05; n = 3 experimentos independentes.

A viabilidade das células controle não apresentou mudanças significativas com a suplementação do meio com D-Alanina em nenhuma das três linhagens (**Figura 35B**). Estes resultados mostraram que nenhuma das linhagens é particularmente sensível ao aumento da concentração do aminoácidos na ausência de superexpressão das DAAO.

Os resultados obtidos, mostraram que o  $EC_{50}$  de células silenciadas para HSPB1 que expressam a variante citosólica de DAAO, foi 15% menor que o  $EC_{50}$  das células controle (p<0,05) (**Fig. 35C**). Quando o mesmo tipo de experimento foi realizado nas células MIN6-shHSPB1 que expressam a variante mitochondrial de DAAO, a diminuição do  $EC_{50}$  foi muito maior, cerca de 40% quando comparado com as células controle (p<0,05) (**Figura 35D**). Esses achados indicam que HSPB1 seria mais relevante para a proteção contra estresse oxidativo produzido na mitocôndria do que contra aquele produzido no citosol.

A fim de entender se HSPB1 poderia proteger células beta da apoptose ao evitar o acúmulo de ROS, foi quantificada a fluorescência de DCFb 2',7'-dichlorofluorescein (H2DCF-DA) em células MIN6, MIN6-Sc e MIN6-shHSPB1 incubadas na presença ou ausência de indutores de estresse oxidativo. Essa molécula é lipofílica e não fluorescente, após atravessar a membrana plasmática é deesterificada a dicloroflouresceína (H2DCF) e pode ser oxidada ao DCF (2',7'-dichlorofluorescein) por um processo que envolve ROS (Karlsson et al., 2010), podendo assim, ser utilizado como indicador de estresse oxidativo geral já que o último composto apresenta a capacidade de emitir fluorescência em um comprimento de onda específico. Células MIN6, MIN6-Sc e MIN6-shHSPB1 foram plaqueadas em placas pretas de 96 poços (2x10<sup>4</sup> células/poço) e cultivadas por 24 h. Em seguida, as células foram pré-incubadas com 10 µM de DCFDA-H2 durante 40 min a 37 °C. O meio contendo a sonda química foi descartado e soluções de tratamento foram adicionadas. Após uma incubação de 2 h, a intensidade da fluorescência emitida em cada condição por cada tipo celular foi analisada e normalizada pela fluorescência das células não submetidas ao tratamento indutor de estresse oxidativo. Os resultados obtidos indicam que o silenciamento de HSPB1 em células MIN6 promoveu um aumento significativo de acúmulo de ROS após a incubação com menadiona

(p<0,05). Por exemplo, para uma concentração intermediária de menadiona utilizada (14  $\mu$ M), a fluorescência de DCF encontrada foi 154,15% e 156,71% para células MIN6 e MIN6-Sc, respectivamente, enquanto que para MIN6-shHSPB1, 214,14%, quando comparadas com as células não tratadas (**Figura 36A**).

No entanto, não conseguimos com este ensaio monitorar ROS especificamente dentro da mitocôndria, visto que no interior celular DCF é um composto hidrofílico, que não atravessa a membrana interna desta organela. Para avaliar a geração de ROS em mitocôndrias, fizemos um ensaio de flurescência utilizando *mitochondria-targeted hydroethidine* (MitoSOX Red), o qual após entrar seletivamente na mitocôndria é oxidado por especificamente superóxido. Essa forma oxidada da sonda é capaz de emitir fluorescência.

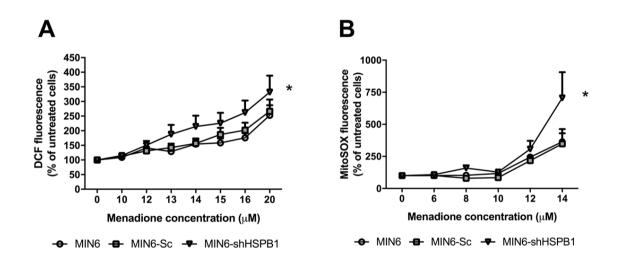


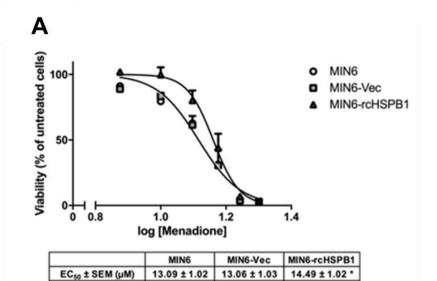
Figura 36. HSPB1 participa na modulação do equilíbrio redox celular em direção a um status de menor geração de ROS.

(A) Células MIN6, MIN6-Sc, and MIN6-shHSPB1 pré-incubadas com DCFDA- $H_2$  foram expostas a concentrações crescentes de menadiona (0 - 20  $\mu$ M) por 2h. Após esse período de tempo, a intensidade da fluorescência emitida pela sonda foi avaliada. Os valores foram normalizados pelos valores obtidos em ensaios de MTT realizados imediatamente após o término do período de geração de estresse oxidativo. (B) Células MIN6, MIN6-Sc and MIN6-shHSPB1 foram expostas a concentrações crescentes de menadiona (0 - 20  $\mu$ M) por 2h e incubadas com MitoSOX. Após esse período de tempo, a intensidade da fluorescência emitida pela sonda foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média  $\pm$ SEM; \*p<0,05; n = 4 experimentos independentes.

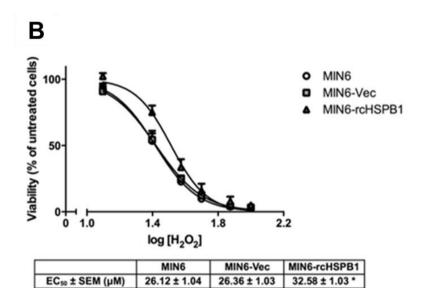
Células MIN6, MIN6-Sc e MIN6-shHSPB1 foram plaqueadas em de placas de 6 poços (7 x 10<sup>5</sup> células/poço) e incubadas com os tratamentos indicados. Em seguida, as células foram tripsinizadas e recolhidas por centrifugação a 700 x G durante 5 min. AS células foram ressuspendidas em meio de cultura contendo MitoSOX Red (5 mM) e incubadas durante 30 min a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo. Interessantemente, assim como observado nos usando DCF, células MIN6 silenciadas apresentaram um sinal na fluorescência de MitoSOX mais alto auando comparado com a intensidade obtida para as células controle não tratadas (p<0,05). Se compararmos os resultados obtidos para uma concentração intermediária de menadiona (14 µM), a intensidade da fluorescência de MitoSOX foi 363.7% e 347.7% para células MIN6 e MIN6-Sc, enquanto que para MIN6-shHSPB1, 705.4% comparado com as células não tratadas (Figura 36B).

A seguir os resultados sobre a relevância de HSPB1 na modulação do estresse oxidativo foram confirmados utilizando uma linhagem de células MIN6 que superexpressam HSPB1 humana (não fusionada à GFP)(MIN6-oHSPB1) e uma linhagem controle que expressa o vetor vazio (MIN6-Vec) de forma estável. A confirmação da superexpressão foi mostrada na figura 24.

Células MIN6, MIN6-Vec e MIN6-oHSPB1 foram plaqueadas (2 x  $10^4$  /poço) e mantidas por 24h em meio RPMI 10%SFB e logo incubadas com soluções contendo concentrações crescentes de Menadiona (0 –  $20~\mu$ M) ou  $H_2O_2$  (0 –  $100~\mu$ M) por 2h para checar se a superexpressão de HSPB1 apresentaria um efeito contrário ao observado com o silenciamento sobre a viabilidade. o meio de cultura foi então trocado e a viabilidade foi avaliada no dia seguinte por ensaio de MTT. Como esperado, a superexpressão de HSPB1 levou a um aumento significante do  $EC_{50}$  tanto para o tratamento com menadiona ( $14.5~\mu$ M vs.  $13.1~\mu$ M para as células controle, **Figura 37A**), como para  $H_2O_2$  ( $32.6~\mu$ M vs.  $26.2~\mu$ D para as células controle, **Figura 37B**).



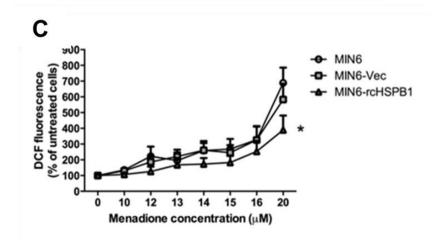
Confidence interval 12.48 to 13.71 12.35 to 13.80 13.97 to 15.01



26.36 ± 1.03

24.93 to 27.89

30.44 to 34.95



Confidence interval 24.29 to 28.11

Figura 37. A superexpressão de HSPB1 inibiu a morte de células beta e aumentou a sua resposta antioxidante frente ao estresse induzido por menadiona ou  $H_2O_2$ .

As células MIN6, MIN6-Vec e MIN6-oHSPB1 foram expostas a concentrações crescentes de ( $\bf A$ ) menadiona (0-20 mM) ou ( $\bf B$ ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-100 mM) durante 2 h. Após esse período de tempo, o meio de cultura foi trocado e as células foram mantidas na incubadora. A viabilidade celular foi avaliada no dia seguinte pelo ensaio de MTT. ( $\bf C$ ) As células pré-incubadas com DCFDA-H<sub>2</sub> foram expostas a concentrações crescentes de menadiona durante 2 h, e depois a fluorescência foi quantificada. Ensaios de MTT foram realizados imediatamente após o término da geração de ROS para normalização dos valores de intensidade de fluorescência obtidos. Os resultados são representados como média±SEM; n = 4 experimentos independentes; \* p <0,05.

Para avaliar a expressão de ROS em células MIN6-oHSPB1, nós analisamos o estado oxidativo global por fluorescência de DCF. Assim, células MIN6, MIN6-Vec e MIN6-oHSPB1 foram plaqueadas (2X10<sup>4</sup> células /poço) e cultivadas em placas pretas de 96 poços por 24 h. Em seguida, as células foram pré-incubadas com 10 µM de DCFDA-H2 durante 40 min a 37 °C. O meio contendo a sonda química foi descartado e soluções contendo os indutores de estresse oxidativo foram adicionados. Ao contrário do que foi visto com células MIN6-shHSPB1, células MIN6-oHSPB1apresentaram menores níves de estresse oxidativo em relação aos valores obtidos nas condições controle. Como exemplo, em uma concentração intermediária de menadiona (14µM), a fluorescência de DFC aumentou em média 258.72% em células MIN6, 260.93% em células MIN6-Vec e 173.10% em células MIN6-oHSPB1 comparadas com células não tratadas (Figura 37C), indicando que o aumento na expressão de HSPB1 resultou em menor acúmulo de ROS e aumento na capacidade antioxidante comparada com as células MIN6 e MIN6-Vec.

Nosso desafio, então, foi entender quais os mecanismos pelos quais HSPB1 poderia mediar mudanças tanto nos níveis de ROS, como na viabilidade celular. Para tanto, a expressão de enzimas antioxidantes chaves que poderiam estar envolvidas neste processo foram investigadas (**Figura 14**).

Os níveis protéicos de CuZnSOD, MnSOD e catalase foram monitorados em células MIN6 tratadas com rhPRL (300ng/mL) por 0, 6 e 24h (**Figura 38 A-C**). Além disso, os níveis das mesmas enzimas foram

avaliados em células MIN6, MIN6-Sc, MIN6-shHSPB1, MIN6-Vec e MIN6oHSPB1 mantidas em cultura por 24h (Figura 38 D-F). Nenhuma diferença foi observada nos níveis de expressão de CuZnSOD (com localização citoplasmática e no espaço intermembrana mitocondrial), MnSOD (com matriz mitocondrial) localização na ou catalase (localizada nos PRL, peroxissomos), independentemente do tratamento com ou silenciamento ou superexpressão de HSPB1 (Figura 38).

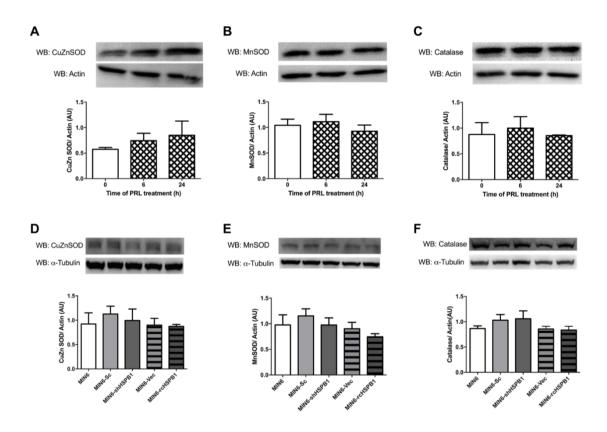


Figura 38. O tratamento com PRL, silenciamento ou superexpressão de HSPB1 não alterou a expressão de enzimas antioxidantes.

A expressão de CuZnSOD, MnSOD e catalase foi analisada por Western blotting. Os *immunoblots* mostrados são resultados representativos e os histogramas correspondentes contém todos os resultados obtidos para as densitometrias das bandas correspondentes à CuZnSOD ( $\bf A$ ,  $\bf D$ ), MnSOD ( $\bf B$ ,  $\bf E$ ) e catalase ( $\bf C$ ,  $\bf F$ ) em células MIN6 mantidas na presença ou ausência de PRL (300 ng / ml) durante os tempos indicados ( $\bf A$ - $\bf C$ ) ou em células MIN6, MIN6-Sc, MIN6-shHSPB1, MIN6-Vec e MIN6-oHSPB1 ( $\bf D$ - $\bf F$ ). Todos os resultados apresentados correspondem às médias dos valores obtidos  $\pm$  SEM ( $\bf n$  = 3 experimentos independentes).

O níveis de GSH e GSSG foram também monitorados no nosso modelo. Células MIN6, MIN6-Sc, MIN6-shHSPB1, MIN6-Vec e MIN6-oHSPB1

foram plaquedas em placas com área de 60cm<sup>2</sup>. As quantidades de GSH e GSSG foram dosadas em lisados provientes de culturas de células confluentes por HPLC-MS conforme descrito na seção de materiais e métodos.

A razão GSH/GSSG, um marcador de capacidade antioxidante das células MIN6 foi aproximadamente 50% menor em células silenciadas para HSPB1 (p<0,05) quando comparadas com as células parentais. Isto foi possível, tanto pela diminuição dos níveis de GSH, quanto pelo aumento nos níveis de GSSG encontrados (**Figura 39A-C**).

Cabe ressaltar que estes efeitos foram diametralmente opostos aos observados em células superexpressando HSPB1. Estas últimas apresentaram um aumento de mais de 50% na razão GSH/GSSG, decorrente de um aumento de GSH e uma tendência de diminuição no conteúdo de GSSG. Estes resultados confirmam a participação de HSPB1 no aumento da capacidade antioxidante de células beta.

A reação de redução de GSSG por glutationa redutase (GR) depende da oxidação da coenzima NADPH a NADP+, (*Dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate*), cofator da reação. Uma das principais enzimas responsável pela redução de NADP+ a NADPH é a Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD). Assim, a atividade desta enzima nos diferentes tipos celulares foi avaliada conforme descrito em Materiais e Métodos e os valores obtidos foram normalizados pelo número de células.

Os resultados obtidos mostraram que células silenciadas para HSPB1 apresentaram aproximadamente 40% menos atividade de G6PD (**Figura 39D**). Isto poderia indicar que a regeneração de glutationa está sendo, de alguma forma, prejudicada por baixos níveis de HSPB1 em células beta.

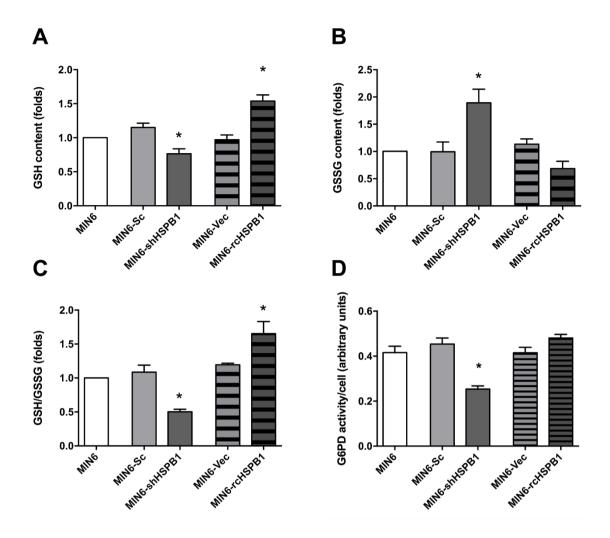


Figura 39. A expressão de HSPB1 influencia o estado de oxidação da glutationa em células MIN6.

Os níveis de GSH e GSSG foram quantificados por LC-MS / MS em células MIN6, MIN6-Sc, MIN6-shHSPB1, MIN6-Vec e MIN6-oHSPB1. Os resultados das concentrações de ( $\bf A$ ) GSH e ( $\bf B$ ) GSSG foram normalizados pelo número de células e estão representados como vezes os respectivos valores obtidos nas células MIN6 parentais. ( $\bf C$ ) As razões GSH / GSSG estão representadas como vezes a respeito dos valores obtidos nas células MIN6. ( $\bf D$ )A atividade da G6PD foi normalizada pela contagem de células. Os resultados são representados como média; n = 3 experimentos independentes; \*: p <0,05 vs os valores obtidos nas células MIN6.

# 4.6-Estudo da importância de HSPB1 na manutenção do metabolismo mitocondrial induzido por PRL em células-beta.

Visto a importância da integridade desta organela para a manutenção da homeostase celular, sendo essencial para a função e consequente eficiência do transplante de ilhotas pancreáticas, avaliamos tanto os níveis de respiração basal quanto a eficiência bioenergética das

células beta em nossos modelos através de medições de consumo de oxigênio em células intactas seguindo a metodologia descrita pelo grupo do Dr. Orian Shirihai (Wikstrom *et al.*, 2012). Na **figura 40** está esquematizado o protocolo de tratamento com os diferentes moduladores da respiração mitocondrial a fim de permitir a obtenção dos diferentes parâmentros avaliados nos protocolos de indução de morte na presença ou na ausência de PRL nas células MIN6 parentais, MIN6-Sc ou nas células MIN6 silenciadas para HSPB1.

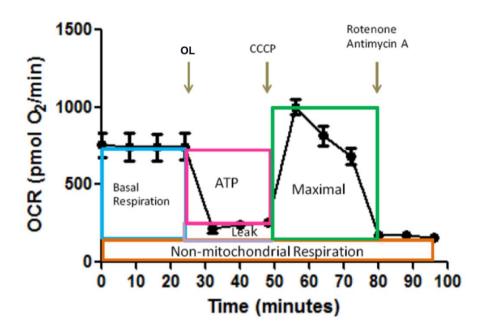


Figura 40. Esquema dos experimentos de medição de consumo de oxigênio nas células MIN6.

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços específicas para medição de consumo de oxigênio no oxímetro Seahorse XF24 e mantidas por 24h em meio com 10%SFB usando HEPES como tampão. Após este período o meio de cultura foi trocado por RPMI 0.1% SFB sem bicarbonato de sódio, e as culturas foram mantidas em estufa livre de  $CO_2$ , por 1h a  $37^{\circ}C$ . As células foram então submetidas à medição do consumo de oxigênio em distintas condições. Até o tempo de 24 min foram obtidos os pontos correspondentes ao consumo basal de O<sub>2</sub> (OCR). No tempo 32 minutos, foi adicionado Oligomicina (OL) (1,3 uM) para a obtenção dos OCR não relacionados à produção de ATP; aos 48 minutos foi adicionado o agente desacoplador CCCP (1uM) para obter os dados de Máximo OCR e no tempo 88 minutos foram adicionadas Rotenona (1 uM) e Antimicina A (1uM) a fim de obter os OCR não relacionados com a respiração mitocondrial. Na figura estão mostrados os resultados correspondentes a um experimento representativo realizado com células MIN6 mantidas na condição de máxima viabilidade (10% SFB). Na figura estão representadas as áreas correspondentes aos distintos parâmetros analisados. A respiração não-mitocondrial é o primeiro parâmetro que se usa para subtrair de todos os demais valores obtidos.

No intuito de entender se a presença de HSPB1 é importante para a manutenção da velocidade de consumo de oxigênio (OCR) nas condições de máxima viabilidade, células MIN6, MIN6-Sc e MIN6-shHSPB1 foram plaqueadas em placas de 24 poços específicas para medição de consumo de oxigênio no oxímetro Sea Horse XF24 e mantidas por 24h em meio com 10%SFB sem bicarbonato de sódio, usando HEPES como tampão. Após este período de tempo, o meio de cultura foi trocado por RPMI 0,1% SFB sem bicarbonato de sódio, e as culturas foram mantidas em estufa livre de CO<sub>2</sub>, por 1h a 37°C. Então, seguimos o protocolo descrito na figura 45.

HSPB1 parece muito importante para a manutenção dos níveis de consumo de oxigênio (OCR) basal já nas condições de máxima viabilidade (10% SFB) (Figura 41A) (p<0,05). Por esse motivo, e a fim de permitir a comparação dos diferentes parâmetros analizados entre os diferentes tipos celulares, os resultados apresentados a partir deste momento foram sempre referidos ao valor de respiração basal obtido para cada tipo celular. Ao relativizar as medidas obtidas dessa forma, foi possível observar um perfil de OCR relativo similar entre os diferentes tipos celulares analisados nas condições de máxima viabilidade (Figura 41B). A partir desses dados foi analisada a porcentagem do consumo de oxigênio relativo que está associada (respiração acoplada) ou não (respiração não acoplada) à síntese de ATP em cada condição de tratamento em cada tipo celular. O desenho experimental está indicado na figura 40.

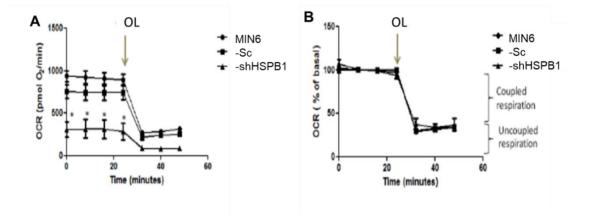


Figura 41. Desenho experimental para a medição da eficiência do acoplamento da respiração mitocondrial.

Inicialmente são gravados os pontos iniciais correspondentes às condições basais, posteriormente se registram as medições correspondentes aos valores de OCR após a injeção de oligomicina (1,3 uM). Os valores finais obtidos representam a respiração que não está acoplada à síntese de ATP (desacoplamento). A) valores absolutos de OCR após a subtração dos valores correspondentes à respiração não mitocondrial para as células MIN6 parentais, expressando o shRNA scramble (Sc) ou silenciada para HSPB1(shHSPB1) (\*: p<0.05). B) valores relativos de OCR nas condições basais para cada tipo celular após a subtração dos valores correspondentes à respiração não mitocondrial para as células MIN6 parentais, expressando o shRNA scramble (Sc) ou silenciada para HSPB1(shHSPB1). Resultados mostrando os dados de um experimento representativo com valores de OCR absolutos e relativos nas condições de máxima viabilidade (10% SFB);(n=2 experimentos independentes realizados em quadruplicata).

Os dados apresentados na **figura 42** mostram os valores relativos de OCR não acoplados à síntese de ATP nos distintos tipos celulares (também chamado de *proton leak* ou vazamento de prótons). Podemos inferir que esse valor permanece similar em culturas de células MIN6, MIN6-Sc e MIN6-shHSPB1 quando mantidas em meio RPMI contendo 10 ou 0,1%SFB. No entanto, na presença de um coquetel de citocinas pró-inflamatórias pode ser observado um aumento da porcentagem da fração da respiração não acoplada à síntese de ATP em todas as linhagens estudadas (p<0,05). Estes valores são revertidos aos valores basais na presença de PRL no caso das culturas celulares MIN6 e MIN6-Sc, mas não para células MIN6 silenciadas para HSPB1 (p<0,05). Este resultado está indicando a importância desta proteína para a manutenção do metabolismo mitocondrial basal e para a eficiência da respiração mitocondrial em células beta induzidos por PRL. Um aumento no nível do desacoplamento relativo está

associado a uma menor eficiência na síntese de ATP, principal indutor da secreção de insulina (**Figura 42**).

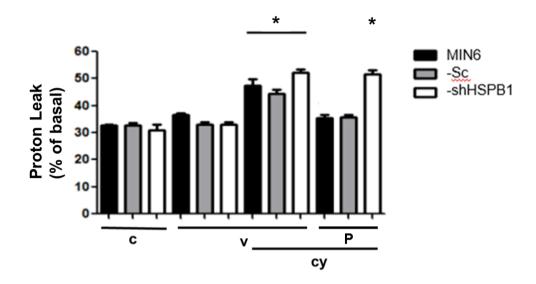


Figura 42. HSPB1 é essencial para a prevenção da diminuição dos níveis de desacoplamento devidos ao stress pela exposição a citocinas próinflamatórias em células beta induzido por rhPRL.

As células foram mantidas em meio de cultura contendo 10%SFB (C) ou submetidas à privação de soro (v) por 24h. Células incubadas na presença de baixas concentrações de SFB foram incubadas na presença de PRL (P, 300ng/mL) ou na ausência do hormônio e posteriormente expostas a uma combinação de citocinas TNFα (8ng/mL), INFγ (4ng/ML) e IL-1β(0,8ng/mL) (cy). A fração relativa ao valor basal do OCR não envolvida na síntese de ATP (uncoupled fraction of respiration) foi medida utilizando-se o equipamento Sea Horse X24 conforme especificado nas figuras 44 e 45 e na seção materiais e métodos, em células MIN6 (preto), Min6-Sc (Sc;cinza) e silenciadas para HSPB1 (shHSPB1; branco). Os resultados foram normalizados relativos à media dos correspondentes valores de respiração basal para cada tipo celular. Os resultados estão mostrados como médias±EPM; n≥2 experimentos independentes realizados em quadruplicata. \* vs. controle:p<0,05.

### 4.6.1-HSPB1 é um mediador da recuperação da função mitocondrial.

Tem sido discutido na literatura que a diferença entre a respiração máxima e a respiração basal mitocondrial celular indicam a capacidade de reserva mitocondrial, sendo importante por estar relacionada com a capacidade de lidar com uma demanda energética aumentada ocasionada por estresse celular (Hill *et al.*, 2012). Com o intuito de avaliar a capacidade

máxima de respiração mitocondrial em nossos modelos realizamos medições de consumo de oxigênio em células intactas seguindo a metodologia descrita pelo grupo do Dr. Orian Shirihai (Wikstrom et al., 2012). O valor de consumo máximo de oxigênio é obtido a partir de experimentos de medida de velocidade de consumo de oxigênio em células expostas a um desacoplador da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial com a produção de ATP pela ATPsintase, como o FCCP (carbonil cianeto trifluoro-metoxi-fenilhidrazona) ou o CCCP (carbonil cianeto metoxi-cloropfenilhidrazona).

A figura 43A mostra o desenho experimental. Após a adição do desacoplador há uma retomada de OCR (dados relativos à respiração basal de cada tipo celular) que atinge sua taxa máxima. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com citocinas pró-inflamatórias diminui significativamente o valor de consumo máximo de oxigênio de todos os tipos celulares comparados com os respectivos controles (p<0,05) (figura 43B). Além disso, o tratamento com prolactina foi capaz de induzir um aumento significativo nesses valores mesmo na presença das citocinas nas células MIN6 e MIN6-Sc (figura 43B). No caso das células silenciadas para HSPB1, não só o efeito da PRL foi completamente abolido mas o valor de capacidade respiratória máxima foi sensivelmente piorado também nas células mantidas em condições de máxima viabilidade (meio de cultura suplementado com 10%SFB), mostrando que HSPB1 pode ter um papel essencial na fisiologia mitocondrial (figura 43A e B).

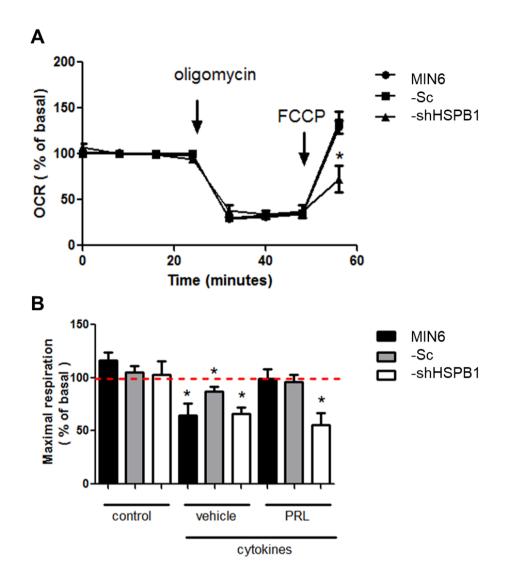


Figura 43. HSPB1 tem um papel fundamental na recuperação da respiração mitocondrial máxima induzida por PRL.

Células MIN6 expressando um shRNA inespecífico (Sc) ou silenciadas (shHSPB1) foram A) plaqueadas em placas de 24 poços específicas para medição de consumo de oxigênio no oxímetro Sea Horse XF24 e mantidas por 24h em meio com 10%SFB usando HEPES como tampão. Após esse período foram submetidas à medição do consumo de oxigênio em distintas condições. Até o tempo de 24 min foram obtidos os pontos correspondentes ao consumo basal de O2 (OCR). Aos 32 minutos foi adicionado Oligomicina (1,3 uM) para a obtenção dos OCR não relacionados à produção de ATP; aos 48 minutos foi adicionado o agente desacoplador CCCP (1uM) para obter os dados de Máximo OCR e no tempo 88 minutos foram adicionadas rotenona (1 uM) e antimicina A (1uM) a fim de obter os OCR não relacionados com a respiração mitocondrial. Na figura, o valor de respiração máximo correspondente ao último ponto mostrado nas curvas de valor de velocidade de consumo de oxigênio (os valores de consumo de oxigênio não relacionados com a respiração mitocondrial já foram subtraídos dos valores obtidos) realizado com células MIN6 mantidas na condição de máxima viabilidade (10% SFB). \*: p<0.05 vs. Min6. Resultados expressados como média ±SEM; (n = 3 experimentos independentes). B) Células privadas de soro foram mantidas em meio de cultura suplementado com 0.1% SFB (control). Algumas células foram posteriormente tratadas com uma combinação de citocinas na presença ou na

ausência de rhPRL (P; 300 ng/ml) ou veículo (V) e submetidas ao mesmo tipo de experimento para medir a velocidade de consumo de oxigênio utilizando o Seahorse. \*: p<0.05 vs. MIN6 control. \*: p<0.05 vs. MIN6 10%FBS. Resultados expressados como média  $\pm$ SEM; (n = 3 experimentos independentes).

Como mencionado anteriormente, em todos os resultados apresentados foi subtraído os valores de OCR não relacionados com o consumo de oxigênio pela CTE. Estes foram obtidos com a inibição do complexo I e II simultaneamente usando Rotenona (1 uM) e Antimicina A (1uM) como os respectivos inibidores específicos. Tal inibição farmacológica inibe o transporte de elétrons e o consumo de oxigênio pela Cadeia Transportadora de Elétrons. Assim, o consumo de O<sub>2</sub> restante pode ser atribuído à oxidases presentes na célula (Hill *et al.*, 2012).

Como vimos, a ausência de HSPB1 interfere com o correto metabolismo mitocondrial basal das células beta e com a eficiência bioenergética da mitocôndria no que se refere tanto ao acoplamento da cadeia de transporte de elétrons (consumo de oxigênio) com a fosforilação oxidativa (síntese de ATP), quanto com a capacidade de respiração máxima mitocondrial. Este desbalanço encontrado indicaria uma menor capacidade das células silenciadas em suportar situações de estresse celular.

A fim de entender melhor o que acontece com a mitocôndria neste contexto, iniciamos a análise do potencial de membrana mitocondrial (ΔΨmt) em colaboração com o Dr. Alvaro Elorza Godoy, professor associado da Universidade Andrés Bello, Santiago, Chile. ΔΨmt é um indicador da função e fisiologia mitocondrial. O potencial de membrana mitocondrial é gerado pela cadeia de transporte de elétrons, a qual é composta por complexos I-IV, responsáveis pela formação do gradiente de prótons no espaço intermembrana mitocondral. No complexo IV é consumido o oxigênio. A síntese de ATP pela ATP Sintase está diretamente acoplado a este processo, dado que fornece a força próton-motriz que permite a atividade da sintase (**Figura 13**).

A fim de analisar o  $\Delta\Psi$ mt de células beta nas condições do DM1, plaqueamos células MIN6 em poços de 1,9 cm² com fundo de vidro. As culturas foram carenciadas (0,1% SFB) e tratadas com um coquetel de citocinas pró-inflamatórias, por 3h e 6h na presença ou ausência de rhPRL.

Após, utilizando o éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE) como sonda para detectar potencial de membrana interna mitocondrial, analisamos a intensidade de fluorescência emitida por este composto em condições "nonquenching".

Os resultados preliminares obtidos até o momento mostrariam que em cultura de células MIN6 o tratamento com citocinas pró-inflamatórias diminui significativamente o  $\Delta\Psi$ mt após 3h (p<0,05) de tratamento e este efeito permanece após 6h (p<0,05) em relação ao controle. No entanto, o tratamento prévio com PRL estaria inibindo o efeito deletério das citocinas em ambos os tempos de tratamento. (**Figura 44B**).

Mais ainda, nas células MIN6 em baixa confluência apresentam filopódios na tentativa de restaurar o contato célula-célula, importante para esta linhagem celular. Cabe ressaltar que nas células tratadas com PRL, além de aumentar o ΔΨmt, foram detectadas células apresentando longos filopódios, o que não foi observado nas células tratadas somente com citocinas. Além disso, intensa fluorescência de TMRE foi observada na extremidade dos filapódios (**Figura 44A** – seta vermelha) mostrando que essas células estão viáveis e possivelmente com motilidade similar à das células normais.

Em conjunto estes resultados confirmam que parte do efeito citoprotetor da PRL estaria relacionado com uma recuperação ou impedimento de efeitos deletérios das citocinas em relação à função mitocondrial, o que é importante para o normal funcionamento das células beta. Além disso, HSPB1 pareceria desempenhar uma função fundamental na ação da PRL sobre o consumo de oxigênio mitocondrial, pois na sua ausência o efeito benéfico do tratamento hormonal é perdido.

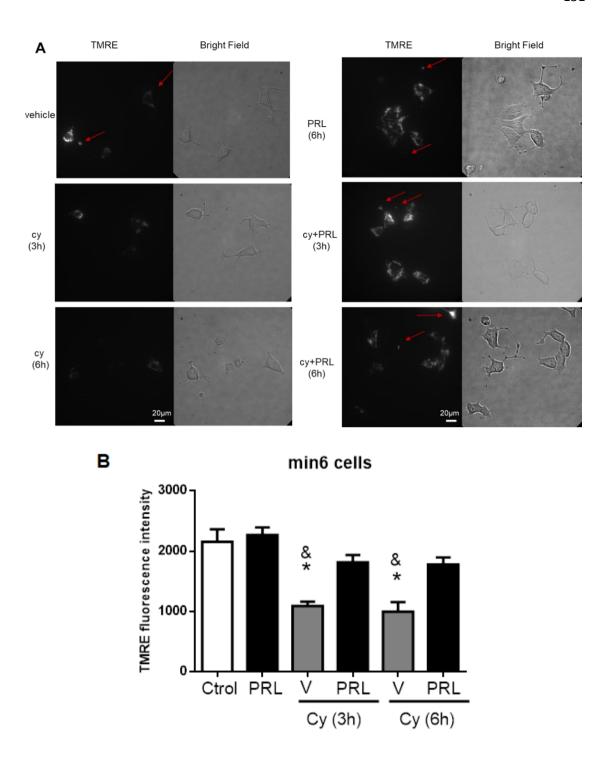


Figura 44. PRL poderia estar também envolvida em promover o resgate do potencial de membrana mitocondrial diminuído pelo tratamento com citocinas.

Células MIN6 foram plaqueadas em poços de 1,9 cm² com fundo de vidro e tratadas ou não com citocinas pró-inflamatórias, por 3h e 6h na presença ou ausência de PRL. (**A**) Mitocôndrias foram coradas com TMRE no modo "nonquenching" (10nM) e visualizadas por microscopia de fluorescência. Aumento 600x. A seta vermelha mostra intensa fluorescência em filopódios. (**B**) Quantificação do  $\Delta\Psi$ mt de células mantidas na ausência (Ctrol) ou na presença de prolactina (PRL) e logo incubadas (Cy) ou não com citocinas durante 3 ou 6 horas.. (\*p<0,05 vs. ctrol; & p<0,05 vs. Ao respectivo tratamento com PRL).

### 4.7-HSPB1 e a função secretória de células beta.

É bem sabido que nas células beta, a função mitocondrial está diretamente relacionada com a sua correta função secretória, pois o aumento da concentração de ATP, proveniente principalmente das mitocôndrias neste tipo celular, tem um papel essencial no mecanismo de sinalização envolvido na secreção de insulina (Maechler and Wollheim, 2000; Wikstrom *et al.*, 2012; revisado por Nicholls, 2016).

Dado que a ausência de HSPB1 piorou os índices da respiração mitocondrial (Figuras **41, 42 e 43**) mesmo na ausência de estresse nas células MIN6, decidimos estudar a influência de HSPB1 na função secretória das células MIN6. Para tanto, células MIN6, MIN6-sc e MIN6-shHSPB1, MIN6-oHSPB1, MIN6-Vec (7,5 x 10<sup>4</sup>células/cm²) ou o equivalente de 5 a 7 Ilhotas pancreáticas murinas dispersas normais (I), silenciadas para HSPB1 e seu controle (I-shHSPB1 e I-Sc, respectivamente) ou superexpressando HSPB1 e seu controle (I-oeHSPB1 e I-GFP) foram mantidas por 24 h em meio RPMI 10% SFB. Após esse período de tempo, foi avaliada a função secretória das células beta assim como o conteúdo intracelular de insulina normalizado pelo conteúdo total de DNA (Labriola *et al.* 2007a).

E relação à capacidade de células beta secretarem insulina em resposta a altas concentrações de glicose, as célular foram submetidas a incubação estática em condições de baixa (2,8mM) e alta concentração de glicose (16,7mM) e a concentração de insulina no meio condicionado foi dosada por ELISA (Mercodia). O índice de estímulo (SI) foi definido como a razão [insulina secretada]<sub>alta</sub>/[insulina liberada] baixa.

Os resultados obtidos mostraram que independente do tratamento e do tipo celular, o SI de células MIN6 apresentaram o mesmo perfil. Somente no caso das células oHSPB1 apresentaram um menor SI quando submetidas ao tratamento com citocinas, independentemente da presença de PRL. (**Figura 45**).

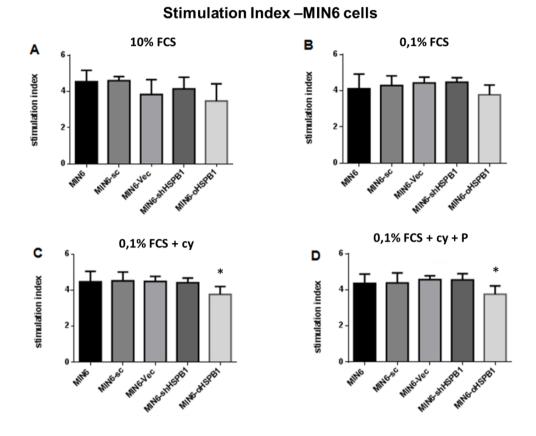


Figura 45. Perfil de resposta secretória de Células Min6.

Ensaio funcional de células MIN6 parentais, MIN6 silenciadas(-shHSPB1) ou não(-Sc) para mHSPB1, superexpressando hHSPB1 (-oHSPB1) ou vetor vazio (-Vec) cultivadas em: meio de cultura acrescido de 10% de SFB ( $\bf A$ ); carenciado (0,1% SFB) ( $\bf B$ ); carenciado e tratado com citocinas pró-inflamatórias na ausência ( $\bf C$ -cy) ou presença de PRL ( $\bf D$ -P). Stimulation Index: (Concentração de insulina secretada em meio contendo 16,7mM de glicose) / (Concentração de insulina secretada em meio contendo 2,8mM de glicose). Resultados apresentados como média  $\pm$  SEM (n=3 experimentos independentes); \*: p<0.05 vs. Min6).

A única diferença observada no conteúdo intracelular de insulina foi detectada nas células MIN6 parentais quando carenciadas com 0,1% SFB. Nessa condição foi possível observar um aumento no conteúdo intracelular de insulina nas células parentais em relação aos outros tipos celulares (p<0,05) (**Figura 46B**). Precisaremos repetir este experimento para o controle de células superexpressando HSPB1 (MIN6-Vec).

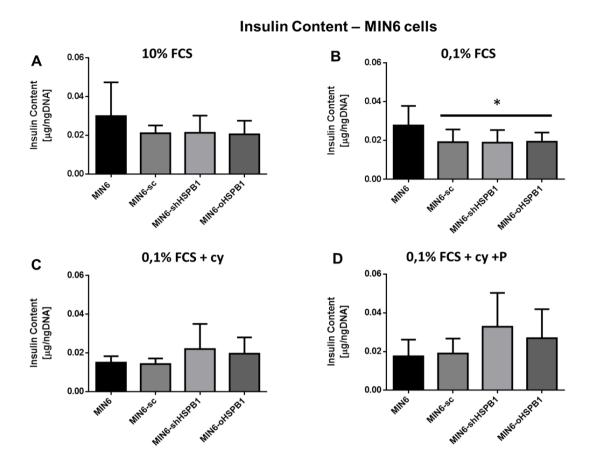


Figura 46. Conteúdo intracelular de insulina em células MIN6.

Conteúdo total de insulina de células MIN6 parentais, MIN6 silenciadas (-shHSPB1) ou não(-Sc) para mHSPB1 ou superexpressando hHSPB1 (-oHSPB1), cultivadas em: meio de cultura acrescido de 10%de SFB ( $\bf A$ ); carenciado (0,1% SFB) ( $\bf B$ ); carenciado e tratado com citocinas pró-inflamatórias na ausência ( $\bf C$  - cy) ou presença de PRL ( $\bf D$  - P). Os dados estão normalizados pelo conteúdo total de DNA por amostra. Resultados apresentados como média  $\pm$  SEM (n=3 experimentos independentes). \*: p<0.05 vs. MIN6

Quando analisamos o SI de cultura primária de ilhotas pancreáticas murinas, os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas para nenhum tipo celular sob nenhuma condição de cultura estudada (**Figura 47**).

#### Stimulation Index - Islets

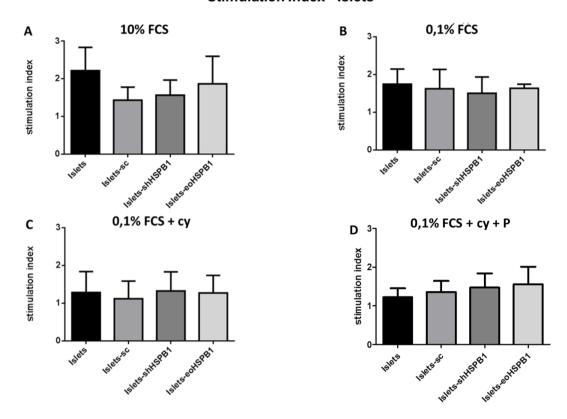


Figura 47. Perfil de resposta secretória de Cultura Primária de Ilhotas Pancreáticas Murinas.

Ensaio funcional de culturas primárias de ilhotas pancreáticas, Ilhotas silenciadas (-shHSPB1) ou não(-Sc) para mHSPB1, ou superexpressando hHSPB1 (-oeHSPB1) cultivadas em: meio de cultura acrescido de 10% de SFB ( $\bf A$ ); carenciado (0,1% SFB) ( $\bf B$ ); carenciado e tratado com citocinas pró-inflamatórias na ausência ( $\bf C$ -cy) ou presença de PRL ( $\bf D$ -P). Stimulation Index: (Concentração de insulina secretada em meio contendo 16,7mM de glicose) / (Concentração de insulina secretada em meio contendo 2,8mM de glicose). Resultados apresentados como média  $\pm$  SEM (n=3 experimentos independentes).

Interessantemente, culturas primárias de ilhotas pancreáticas murinas silenciadas para mHSPB1 (Islets-shHSPB1) apresentaram um conteúdo de insulina maior que os outros tipos celulares (p<0,05) na condição de cultura de máxima viabilidade. Nenhuma outra diferença foi detectada no conteúdo intracelular de insulina entre os diferentes tipos celulares analisados independentemente do tratamento ao qual foram submetidos (**Figura 48**). Precisaremos repetir este experimento para o controle de células superexpressando HSPB1 (Ilhotas-GFP).

#### Α 10% FCS 0,1% FCS 0.15 0.15 Insulin Content [μg/ngDNA] Insulin Content [µg/ngDNA] 0.10 0.10 0.05 0.05 Beese and FRE Estate String Part 0.00 0.00 D C 0,1% FCS + cy0,1% FCS + cy +P 0.15-0.15 -Insulin Content [μg/ngDNA] Insulin Content [µg/ngDNA] 0.10 0.10 0.05 0.05

**Insulin Content - Islets** 

Figura 48. Conteúdo intracelular de insulina em culturas primárias de Ilhotas pancreáticas murinas.

0.00

0.00

Islets shiften

Conteúdo total de insulina de culturas primárias de ilhotas murinas (Islets), Ilhotas silenciadas (-shHSPB1) ou não(-Sc) para mHSPB1 ou superexpressando hHSPB1 (-oeHSPB1), cultivadas em: meio de cultura acrescido de 10%de SFB ( $\bf A$ ); carenciado (0,1% SFB) ( $\bf B$ ); carenciado e tratado com citocinas pró-inflamatórias na ausência ( $\bf C$  - cy) ou presença de PRL ( $\bf D$  - P). Os dados forma normalizados pelo total de DNA de cada amostra. Resultados apresentados como média  $\pm$  SEM (n=3 experimentos independentes).

Em conjunto os resultados obtidos tanto para as células MIN6 como nas culturas primárias de ilhotas murinas não apontaram grandes alterações nem na resposta secretória nem no contéudo de insulina induzidas por Prolactina ou pela modulação dos níveis proteicos de HSPB1.

# <u>Discussão</u>

### 5-DISCUSSÃO

A falta de doadores humanos de pâncreas, a dificuldade em obter e manter culturas primárias de células beta por longos períodos, sem que percam suas principais características morfofisiológicas, representam os principais obstáculos para o transplante de ilhotas pancreáticas isoladas, assim como, para o desenvolvimento de pesquisas que se propõem entender os mecanismos moleculares envolvidos no DM1(Adcock *et al.*, 1975; Gragnoli, 2008; Terra *et al.*, 2013; Schuetz *et al.*, 2018). Acrescentase a isso o fato de que mesmo com o refinamento das técnicas de isolamento, purificação das ilhotas pancreáticas e seleção criteriosa tanto dos doadores como receptores de pâncreas, há massiva morte do enxerto, por apoptose, no período imediatamente pós-transplante (Emamaullee and Shapiro, 2006; Bruni and Gala-lopez, 2014). Assim, a citoproteção específica para células beta poderia ajudar no desenvolvimento de novas e eficientes estratégias para aumentar a viabilidade de ilhotas para transplante.

Neste sentido, linhagens de células derivadas de insulinomas de roedores, representam uma alternativa amplamente utilizada tanto para o estudo de mecanismos fisiológicos e patofisiológicos que envolvem o metabolismo de glicose como para o estabelecimento de modelos *in vitro* envolvendo os danos em células beta que ocorrem no DM1(Gylfe and Hellman, 1986; Meglasson and Matschinsky, 1986; Hill, Oberwetter and Boyd, 1987; Trautmann and Wollheim, 1987; Frödin *et al.*, 1995; Verspohl, Tollkühn and Kloss, 1995).

No presente trabalho foi possível mostrar que PRL promoveu em células produtoras de insulina de camundongo as mesmas propriedades citoprotetoras (Wailemann et al., 2018) já descritas para cultura de ilhotas humanas (Yamamoto et al., 2010; Terra et al., 2011). Assim, foi possível validar não apenas o modelo murino, mas também demonstrar que a indução de HSPB1 é um evento essencial necessário para mediar a ação citoprotetora da PRL, contra o tratamento com citocinas pró-inflamatórias, em células beta de camundongo, inibindo tanto a via intrínseca, como

extrínseca da apoptose. Interessantemente, foi mostrado que a ausência de HSPB1 impediu o aumento dos níveis da proteína antiapoptótica BCL2, bem como a inibição das caspases, -8 e -9 e -3 induzidas pelo tratamento hormonal (Wailemann *et al.*, 2018).

A atividade reduzida da caspase-8 poderia ser em parte devida à capacidade da HSPB1 de interagir com a proteína FAS / APO-1, pois já foi demonstrado que a superexpressão de HSPB1 leva a uma interação aumentada com essas proteínas resultando na inibição da via extrínseca da apoptose em células de fibroblastos L929 murinos (Mehlen et al., 1996). É importante notar que algumas das citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela destruição das células beta agem através da ligação aos seus respectivos receptores acoplados ao FAS / APO-1, que promovem a ativação consecutiva da iniciadora caspase-8. Curiosamente, a inibição da ativação da caspase-8 também inibiria a sinalização t-BID e, assim, a conversa cruzada com a via intrínseca da apoptose. HSPB1 também pode mediar a inibição da via de apoptose intrínseca interferindo em diferentes etapas. Demonstrou-se que esta proteína inibe a apoptose induzida pelo etoposídeo prevenindo a atividade desencadeada pelo citocromo c e dATP da caspase-9, a jusante da liberação do citocromo c em modelos de leucemia (Garrido et al., 1999; Bruey, Paul, et al., 2000). Adicionalmente, a participação da HSPB1 na inibição de apoptose através da inibição da liberação de citocromo c da mitocôndria ou seu següestro no citosol anulando a formação do apoptossomo foi relatado na linhagem de células Jurkat (Samali et al., 2001). De fato, resultados recentes do interactoma de HSPB1 realizados por nosso grupo mostraram que o citocromo c só foi detectado como proteína-cliente de HSPB1 quando células MIN6 foram incubadas a presença de PRL e citocinas. Cabe destacar que a coimunopreciptação de HSPB1 foi realizada após 6h de tratamento com citocinas pró-inflamatórias. Este tempo foi escolhido, justamente por ser anterior aos eventos de máxima atividade de caspase-3, o qual se dá em nosso modelo, após 9h de tratamento com o coquetel de citocinas. Como a permeabilização da membrana mitocondrial e a consequente liberação do citocromo c são rigidamente reguladas pelos membros da família BCL2 (Adams and Cory, 1998; Mehmeti, Lenzen and Lortz, 2011), nossos resultados podem explicar a função chave da citoproteção de HSPB1, induzida pelo tratamento hormonal, na inibição da atividade de caspase-3 impelido por citocinas. A interação de HSPB1 com o citocromo c e caspase-3, também foi demonstrada por experimentos de coprecipitação em diferentes modelos, indicando duas interações independentes (Pandey *et al.*, 2000; Concannon, Orrenius and Samali, 2001). Os resultados obtidos mostraram que a falta de HSPB1 bloqueou a inibição induzida por PRL da atividade de caspase-3 e que o resgate de células silenciadas murinas pela superexpressão de HSPB1 humana promoveu proteção celular significativa contra a apoptose ativada por citocinas pró-inflamatórias em células beta. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Voss et al. em células de monócitos humanos (Voss *et al.*, 2007) e destacam a importância de aumentar os níveis de HSPB1 para induzir a citoproteção de células beta contra citocinas pró-inflamatórias.

A HSPB1 provavelmente poderia atuar nas células beta como uma proteína sensora com a capacidade de interagir com diferentes alvos proteicos, permitindo montar uma resposta antiapoptótica protetora, como mostrado em outros tipos de células (revisado por Catherine Paul et al., 2010). Embora existam vários relatos mostrando que a regulação positiva de HSPB1 protege diferentes tecidos, como músculo, nervo ou rim, há apenas um abordando o papel de HPSB1 em beta células de modelos animais de DM1 (Calabrese et al., 2003; Najemnikova, Rodgers and Locke, 2007; Dai et al., 2009; Mastrocola et al., 2012; Pourhamidi et al., 2014). Os autores relataram que camundongos superexpressando esta chaperona são mais resistentes à morte da célula beta induzida pela Estreptozotocina, mas nenhuma confirmação experimental dos mecanismos que levaram às suas observações foi apresentada em seu estudo (Dai et al., 2009). Como já mostramos que a PRL inibe a morte celular induzida pela privação de soro ou exposição a citocinas em ilhotas humanas e que o hormônio também é capaz de induzir níveis de HSPB1 nesse modelo, propusemos que essa chaperona também poderia exercer um importante efeito citoprotetor em células beta humanas.

Reforçando esses achados, a superexpressão de HSPB1 humana (hHSPB1) em células beta murinas seja em uma construção acoplada à GFP

ou não, mimetizou o uso de PRL, o que indica, aparentemente, que todo o efeito citoprotetor visto na presença do hormônio está intrinsicamente relacionado com HSPB1 (Wailemann *et al.*, 2018). Este efeito foi observado independentemente de hHSPB1 estar ou não acoplada à GFP.

A análise dos dados aqui apresentados e de resultados prévios de nosso laboratório têm mostrado o efeito citoprotetor de rhPRL em cultura primária de ilhotas pancreáticas tanto humanas como murinas, além dos efeitos deste hormônio sobre JAK2 e STAT5, 3 e 1 (Labriola et al., 2007a; Labriola et al., 2007b; Terra et al., 2011). Na literatura encontramos resultados que mostram que lactogênios promovem a sobrevivência (Fujinaka et al., 2007) e citoproteção (Jensen et al., 2005; Kondegowda et al., 2012) de células betas pancreáticas através da ativação da via de sinalização JAK2/STAT5. Também está descrito que a ativação de Heat Shock Factor (HSF) precede a um rápido aumento na síntese de chaperonas após células serem submetidas a diferentes estressores (Pirkkala, Nykänen and Sistonen, 2001; Trinklein et al., 2004). Em concordância com os dados da literatura, nós também mostramos que o tratamento com PRL é capaz de aumentar os níveis proteicos de HSF1 anterior (10min) à observação do pico de máxima indução nos níveis HSPB1 (2h) em cultura primária de ilhotas humanas, similar ao observado em células MIN6 e ilhotas murinas. Desde que a inibição de JAK2 utilizando o composto AG490 aboliu o aumento dos níveis tanto de mRNA de hspb1, como a inibição de apoptose em células beta induzida pelo tratamento com PRL, percebemos a importância da via canônica da PRL na indução da resposta ao estresse, a qual orienta para a citoproteção deste tipo celular (Mansano, 2013; Wailemann et al., 2018).

Em modelos diferentes, tanto a ativação de STAT1 como p38 foram reportadas como necessárias para a ativação de HSF1 e posterior indução de HSPB1, como agente de resposta ao estresse celular e inibição de morte celular (Ehses et al., 2003; Yokota et al., 2003). Resultados prévios de nosso laboratório mostraram que o tratamento com PRL promove um rápido e transiente aumento na ativação tanto de STAT1 como p38 em culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas com pico de expressão em 10 min (Labriola et al., 2007a) Ainda, em rim, a expressão de HSPB1 e

HSP90, mas não αβ-cristalina e HSP70, diminuiram 26% e 50% respectivamente, em camundongos *knockout* para *Hsf1*, comparados com camundongos wild-type (Yan *et al.*, 2005). Recentemente tem sido discutido o importante papel regulatório na expressão de chaperonas em resposta ao estresse e possível alvo terapêutico de HSF1 em células beta, no ambiente do DM2. Glicolipotoxicidade promove a acetilação de HSF1, a qual inibe sua atividade de ligação com DNA e diminui a expressão de genes alvos. A restauração da atividade de HSF1 permite que células beta sejam protegidas contra apoptose mediada por estresse de RE (Purwana *et al.*, 2017).

Juntos esses resultados podem suportar a hipótese de que após a ligação ao seu receptor em células beta, PRL é capaz de induzir um rápido e transiente aumento nos níveis de proteínas envolvidas na resposta ao estresse. Este aumento inclui a ativação de HSF1, STAT1 e p38, conduzindo para os eventos que levam ao aumento de expressão e ativação de HSPB1 e proteção de células beta contra apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias. Na **figura 49** mostramos um modelo dos eventos que podem ocorrer na células beta, mediados pelo aumento da expressão de HSPB1, que culminam na inibição de apoptose.

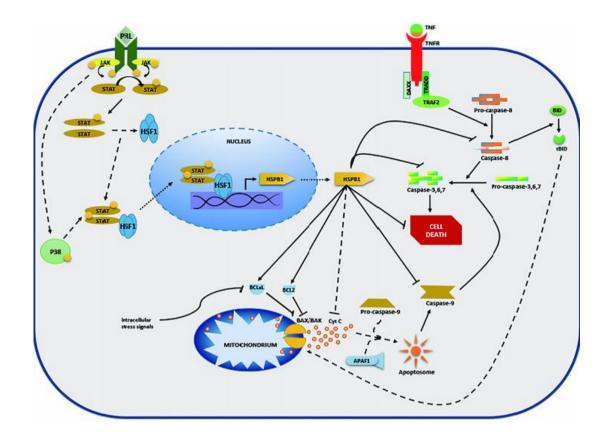


Figura 49. Mecanismo proposto da indução de HSPB1 por PRL e suas consequências na citoproteção de células beta.

Após ligar-se ao receptor, PRL é capaz de induzir uma rápida e transiente ativação de resposta ao estresse, a qual inclui aumento nos níveis de ativação de HSF1, STAT1 e p38. Juntos estes eventos poderiam orientar para a ativação de expressão de HSPB1 e proteção de células beta contra apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias. (....): translocação; (-----): necessidade de experimentos suplementares para confirmação (Wailemann *et al.*, 2018).

Mesmo sabendo da ação de HSPB1 direta ou indiretamente sobre os inúmeros clientes das vias intrínseca e extrínseca da apoptose, tínhamos evidências de que HSPB1 poderia estar envolvida em outros eventos anteriores à ativação desta via. Isto poderia causar uma diminuição na ativação ou mesmo a ausência de sinalização apoptótica. Resultados do nosso grupo mostraram que o tratamento com prolactina foi capaz de proteger células beta da morte por apoptose contra tratamento com Tapsigargina (TAG), um estressor de retículo endoplasmático, utilizado como controle de morte, visto a toxicidade deste composto sobre a viabilidade celular (Gomes, 2016; Wailemann *et al.*, 2018). No entanto, o silenciamento de HSPB1 em células MIN6 aboliu o efeito citoprotetor promovido pelo tratamento com PRL. Estes resultados nos levaram a

questionar se HSPB1 poderia estar envolvida em eventos citoprotetores anteriores à ativação da via apoptótica, uma vez que a resposta a proteínas mal dobradas (UPR - Unfolded Protein Response) é uma via de citoproteção inicial, ativada no retículo endoplasmático (RE), bem conservada e presente de leveduras a humanos (Martínez & Chrispeels, 2003). Em células beta, apoptose mediada por estresse de RE desempenha um papel fundamental para a perda da massa de células beta e contribui para o desenvolvimento de diabetes (Yamaguchi et al., 2008). Resultados de nosso laboratório mostram que em células MIN6, a ausência de HSPB1 promove uma mudança no perfil de ativação de proteínas da via de UPR, culminando por uma antecipação do pico de ativação de CHOP, proteína fundamental para ativação da via apoptótica mediada por estresse de RE, comparado com controle (Gomes, 2016). Isto pode indicar que os níveis de HSPB1 aumentados pelo tratamento com PRL exercem um retardo da ativação das vias de morte ativadas tanto por citocinas como por TAG, ambos descritos como causadores de estresse de retículo. Esse tempo extra poderia proporcionar o resgate celular frente ao insulto, tanto através de restauração de proteínas mal dobradas, através da função de chaperona de HSPB1, como por ação direta sobre a ativação/inibição de proteínas anti-/pró-apoptóticas.

Além disso, a capacidade de formação de oligômeros de HSPB1 parece ser importante para o papel anti-apoptótico desta proteína. Como citamos anteriormente, em camundongos que superexpressam HSPB1 humana ocorre citoproteção de células beta após diabetes induzida por STZ. Em explicado pela formação de heterodímeros parte isto (hHSPB1/mHSPB1 - humana/murina), os quais estabilizam mHSPB1 endógeno, aumentando seu conteúdo celular (Dai et al., 2009). Esta capacidade de sHSPs formarem dímeros (aproximadamente 50kDa), primeiramente, até grandes oligômeros (800kDa) acontece graças a presença do domínio homólogo a alfa-cristalina. Já a possibilidade de atuar em diversas funções dentro e fora da célula depende tanto do seu tamanho, com do padrão de fosforilação. hHSPB1 (ou HSP27) possui três sítios de fosforilação representados pelas serinas -15, -78, -82 localizados no Nterminal. Já mHSPB1 (ou HSP25) apresenta dois sítios, serina -15 e -86. A troca de uma única cisteína no domínio a-cristalino de HSPB1 inibe a formação de dímeros, sua atividade chaperona e habilidade de interagir com polipeptídeos (Diaz-Latoud *et al.*, 2005; Arrigo, 2017). Grandes oligômeros de HSPB1 estão relacionados com a recuperação ao choque térmico (Arrigo and Welch, 1987). Estruturas maiores que 400 kDa não fosforiladas estão associadas à presença de estresse oxidativo. Já pequenos oligômeros estão mais associados a polipeptídeos alterados por estresse (Paul *et al.*, 2010; revisado por Arrigo, 2017).

Analisando os dados obtidos após a análise da coimunoprecipitação de HSPB1 podemos ver que em células MIN6 tratadas com um coquetel de citocinas, somente quando na presença de PRL, identificamos a interação direta ou indireta de HSPB1 com proteínas que estão relacionadas com a inibição da apoptose como Citocromo c. Como mencionado anteriormente, este resultado é muito coerente, quando pensamos que o tempo escolhido para imunopreciptação de HSPB1 foi anterior a execução da apoptose. Podemos pensar que, com o estresse promovido pelas citocinas, houve o estímulo para formação do poro mitocondrial e liberação de citocromo-c, mas somente as culturas que estavam preparadas para este estresse, através do tratamento prévio com PRL, com o consequente aumento da expressão e ativação através de mudanças no perfil de fosforilação e oligomerização de HSPB1, puderam ativar os mecanismos que retardam a execução da apoptose e promovem a citoproteção em nosso modelo.

Outro processo celular que aparece regulado pela PRL está envolvido na degradação de proteínas via proteassomo. Este processo se vê evidenciado pela modulação hormonal da interação entre HSPB1 com quatro proteínas que compõem o sítio catalítico do proteossomo (Psma 2, 3, 7 e 10). Recentes relatos mostram evidências de que HSPB1 é capaz de aumentar a estabilidade das proteínas que compõem o proteassomo. Ainda, foi reportado recentemente que esta chaperona permite aumentar a capacidade do complexo de degradar proteínas em situações de estresse de retículo endoplasmático ocasionado através da resposta à proteínas com enovelamento incorreto (UPR) (Arrigo, 2013).

O grupo do Prof. Eizirik tem descrito recentemente a expressão de marcadores de estresse de RE em pacientes portadores de DM1, mostrando

que o ataque do sistema imune é capaz de ativar proteínas relacionas com UPR e finalmente com apoptose em células beta (Marhfour *et al.*, 2012). Uma importante proteína de integração e ativação da UPR foi identificada copreciptada com HSPB1. Proteína regulada por glicose-78 (Glucose-regulated protein-78 - GPR78 ou BiP) é uma chaperona de RE que desempenha papel chave no dobramento e controle de qualidade de proteínas no lumem do RE.

Além disso, sabe-se que um complexo multiproteico está envolvido na degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Está descrito que a superexpressão de HSPB1 promove aumento de atividade proteassomal, ligando-se à subunidade 26S do proteassoma. Ainda, diminui o número de proteínas ubiquitinadas, como I-KBa fosforilada e ubiquitinada, ligando-se a esta e direcionando-a para degradação via sistema ubiquitinaproteassoma (Parcellier et al., 2003). Identificamos a enzima modificadora ubiquitina entre as proteínas que coimunoprecipitaram com similar a HSPB1, fortalecendo nossas evidências que HSPB1 também pode estar envolvida no sistema de degradação proteica via sistema ubiquitinaproteassoma em células beta. Estes resultados instigaram nosso grupo a uma investigação mais profunda, que está sendo levada a cabo pelo doutorando Vinícius de Morais Gomes, sobre o papel de HSPB1 no efeito citoprotetor de PRL contra estresse de RE, via UPR, promovido por um coquetel de citocinas pró-inflamatórias tanto em células MIN6, como em Ilhotas pancreáticas murinas. Mais, se este efeito conta com a ativação do sistema ubiquitina-proteassoma.

Além de ativar a via apoptótica, o tratamento com citocinas próinflamatórias induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de
nitrogênio (RNS) levando a morte de células beta (Lenzen, 2008; Souza et
al., 2008). Lemarie e colaboradores (2011) apresentaram um modelo que
indica como a ativação de receptores de morte por TNFa (via extrínseca)
entre outras drogas, promove a acidificação tanto do citosol, como da
matriz mitocondrial, levando à dissociação das subunidades que formam o
Complexo II (CII) da Cadeia de Transporte de elétrons, culminando na
inibição e desacoplamento de CII, produção de superóxido e apoptose
(Figura 50). Publicações anteriores mostraram, em diversos modelos

tumorais, que a superexpressão de HSPB1 inibe a morte destas células expostas a diversos estímulos citotóxicos, como o estresse oxidativo (EO)(Huot *et al.*, 1991b; Mehlen *et al.*, 1993). Uma revisão recente menciona que a interação entre HSPB1 e SOD promove o aumento da estabilidade desta última e portanto proporciona aumento da resistência da célula à situações de EO (Arrigo, 2013).

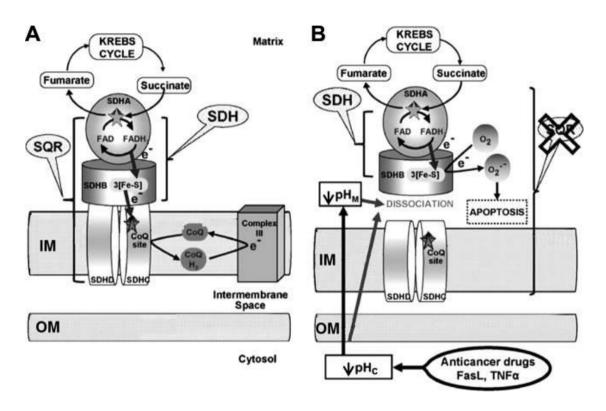


Figura 50. Modelo do papel da inibição específica do complexo II para indução de apoptose por vários compostos pró-apoptóticos.

(A) Em células saudáveis, o complexo II serve para direcionar elétrons derivados do ciclo de Krebs para a cadeia respiratória. A oxidação mediada por Succinato desidrogenase A (SDHA) de succinato a fumarato pela atividade da succinato desidrogenase (SDH), como parte do ciclo de Krebs, proporciona elétrons ao complexo II. Eles são transferidos para os centros de ferro-enxofre da subunidade SDHB e, finalmente, para o local de redução CoQ na interface entre SDHC e SDHD, as duas subunidades transmembrana do complexo II. A reação succinato CoQ oxidoredutase (SQR) compreende, além disso, a transferência dos elétrons para CoQ. (B) Compostos pró-apoptóticos, tais como várias drogas anticâncer, FasL ou TNF-a, induzem a acidificação intracelular (pHi) e mitocondrial (pHm). Essas alterações de pH levam à dissociação das subunidades SDHA / B do complexo II e, finalmente, à inibição parcial da atividade SQR, sem qualquer comprometimento da reação SDH. Esta inibição específica leva ao desacoplamento do complexo II, produção de superóxido e apoptose (adaptado de Lemarie et al., 2011).

Além disso, células beta têm relativamente baixos níveis de enzimas reguladoras do estado redox e detoxificantes de radicais livres como glutationa redutase, glutationa peroxidase, catalase e tiorredoxinas, sendo então vulneráveis a danos e destruição (Newsholme, Gaudel and McClenaghan, 2010; revisado por Nicholls, 2016), principalmente pelo aumento do metabolismo mitocondrial, aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular e aumento do sistema NADPH oxidase.

Em células silenciadas para HSPB1, mesmo em condições de máxima viabilidade, a OCR não mitocondrial, relativa às reações envolvendo  $O_2$  por oxidases é muito menor que em células controle (p<0,05) (dados não mostrados). Este fato pode ser devido a uma ainda mais baixa expressão e/ou atividade das oxidases na ausência de HSPB1. Juntos, estes dados nos levaram a hipotetisar se HSPB1 poderia estar envolvida em mecanismos de citoproteção contra EO em células beta. Esta pergunta originou um manunscrito que está submetido em revista indexada (Terra, Wailemann *et al.*, manuscrito submetido - **anexo 1**), onde mostramos a importância de HSPB1 para os efeitos de sobrevivência de células beta contra morte celular induzida por ROS.

Pouco se sabe sobre as interações de HSPB1 com as proteínas descritas neste trabalho no modelo de células beta. Entretanto, nossos achados mostrados até aqui vêm corroborando os resultados de nossa análise da imunoprecipitação (IP) de HSPB1 e estão em concordância com o que está descrito na literatura para outros modelos. Nesse sentido, mostramos que Prdx1 coprecipitou com HSPB1 em células tratadas com citocinas e PRL, mas não com citocinas isoladamente, sinalizando a importância do aumento de expressão desta proteína para homeostase redox de células beta. Como controle, investigamos também a proteína p62, um marcador do fluxo autofágico e que não foi identificada em nossos experimentos de IP. A banda desta proteína somente foi detectada no sobrenadante em ambas condições validando os resultados da análise do interactoma de HSPB1.

Sabemos da importância mitocondrial como peça fundamental na via intrínseca apoptótica e mostramos a relação de HSPB1 em inibir apoptose tanto por processos a montante como a jusante da formação do MOMP em

células beta (Wailemann et al., 2018). Além disso, lembramos que o metabolismo oxidativo é essencial para a sobrevivência celular devido à síntese de adenosina trifosfato (ATP), a qual é fundamental na regulação da secreção de insulina em resposta ao aumento da disponibilidade de glicose em células beta.

Assim, no intuito de investigar as relações entre o tratamento com PRL, com consequente aumento de HSPB1 (Labriola et~al., 2007b; Wailemann et~al., 2018), e o efeito de proteção contra estresse oxidativo, o qual pode induzir apoptose em células beta, nós analisamos se PRL poderia promover aumento na viabilidade após tratamento com menadiona. Mostramos que o tratamento com PRL foi capaz de promover uma citoproteção significativa contra a menadiona, exceto em células silenciadas para HSPB1. Além disso, o knockdown de HSPB1 em células MIN6 tornou essas células mais suscetíveis ao estresse oxidativo induzido pelo tratamento com menadiona e  $H_2O_2$ , mostrando que esse aumento de viabilidade induzido por PRL é mediado por HSPB1.

A fim de confirmar o papel de HSPB1 na citoproteção de células beta contra EO, utilizamos células MIN6 superexpressando HSPB1 (MIN6-oHSPB1) e, como esperado, a superexpressão sozinha mimetizou os efeitos do tratamento com PRL, conferindo maior resistência às células MIN6 contra OE induzido por menadiona e  $H_2O_2$ .

Ressaltamos que não somente células MIN6 silenciadas para HSPB1 apresentaram mais alta fluorescência derivada de ROS, em relação às células controle, como em células MIN6 superexpressando HSPB1 houve menor nível de conteúdo oxidante intracelular entre todas as linhagens estudadas. Estes resultados corroboram os dados mostrados na literatura para outros modelos nos quais HSPB1 participa da resposta celular não só frente ao estresse térmico, mas também frente ao estresse oxidativo (Mehlem, Schulze-Osthoff and Arrigo, 1996; Samali et al., 2001; Arrigo et al., 2005). No entanto, permanece pouco estudado como HSPB1 contribui para esta resposta antioxidante. Se pensarmos que a produção de ROS mitocondrial gerado por células silenciadas para HSPB1 superexpressando DAAO mitocondrial promoveu uma diminuição de 40% na viabilidade comparada com células controle, enquanto a geração de ROS citosólico em

células silenciadas para HSPB1 superexpressando DAAO citosólico houve uma queda de aproximadamente 15%, podemos supor que o efeito citoprotetor de HSPB1 contra EO é mais potente na mitocôndria.

Como vimos, a síntese de HSPs é regulada por HSF1 (Pirkkala et al., 2001; Trinklein et al., 2004). Em concordância com os resultados mostrados no presente trabalho (Wailemann et al., 2018) foi reportado que células de rim de camundongos knockout para Hsf1 apresentaram diminuição na expressão de HSPB1 e HSP90, além de um aumento de 40% na taxa de geração de superóxido mitocondrial, comparado com células de camundongos normais. Esse mesmo trabalho mostrou o aumento na abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial, o que induziu uma maior mudança no potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) (Yan et al., 2005). Os dados presentes na literatura demonstram que células induzidas ao acúmulo de HSPs tornam-se mais tolerantes aos insultos citotóxicos, um fenômeno denominado "termotolerância" (Concannon, Gorman and Samali, 2003). Interessantemente, evidências recentes têm mostrado que um significante "pool" de HSPB1 está localizado na fração mitocondrial de células termotolerantes Jurkat (Samali et al., 2001), talvez desempenhando um papel similar a BCL-2. Estes resultados sugerem que HSPB1 também pode exercer efeitos diretos sobre a mitocôndria.

Além disso, diversas doenças metabólicas, como por exemplo Diabetes, estão relacionadas com a disfunção mitocondrial, principalmente quando pensamos que esta organela não só é geradora, mas também alvo de ROS (Malaguti *et al.*, 2014). Cabe destacar que nossos resultados não mostraram diferença nos níveis de expressão de enzimas antioxidantes MnSOD (matriz mitocondrial) e CuZnSOD (citoplasmática e espaço intermembranas mitocondrial) em nenhuma das linhagens testadas ou sob quaisquer tratamentos. Em esclerose lateral amiotrófica (ALS), a interação de HSPB1 com CuZnSOD previne a formação de grandes agregados citotóxicos (Yerbury *et al.*, 2013). Esse fenômeno foi capaz de prevenir a sua inativação, levando a um aumento da citoproteção (Shinder *et al.*, 2001). Assim, em células beta estas enzimas poderiam promover um aumento da resistência celular contra EO, ao menos em parte, por interações com HSPB1, por mecanismos que não envolvem aumento de

expressão, mas aumento de estabilidade, visto também que está descrito que HSPB1 pode atuar aumentando a meia vida ou a ativação/inibição de proteínas (Paul *et al.*, 2010; Arrigo, 2013).

Se pensarmos que o peróxido produzido intracelularmente tem que ser rápidamente convertido numa espécie química inócua, pois este composto é altamente tóxico para as células, percebemos a importância da enzima catalase. Catalase tem o mais alto turnover conhecido (40.000.000 moléculas de  $H_2O_2$  por segundo (Nelson and Cox, 2005). Ainda, parece que esta enzima está envolvida em mecanismos de envelhecimento relacionados ao estresse oxidativo, pois ratos que superexpressam catalase (aproximadamente 50% a mais) têm maior tempo de vida em relação aos controles (Cutler, 2005).

Em células de fibrossarcoma murina L929 superexpressando HSPB1 foi analisada a taxa de consumo de  $H_2O_2$  em relação às células controle. Não houve diferença entre qualquer uma das linhagens, indicando que a expressão de HSPB1 não modifica a habilidade básica de detoxificação nestas células. Isto indica ainda que a atividade da catalase não é modificada por HSPB1 (Préville *et al.*, 1999).

No entanto, durante EO em células L929, a superexpressão de HSPB1 aumentou o *pool* de glutationa reduzida (GSH) (Préville *et al.*, 1999). GSH é um tripeptídio tiol considerado um dos mais importantes eliminadores de ROS e um vital protetor oxidante intra e extracelular. A razão de GSH com glutationa oxidada (GSSG) pode ser considerada como um marcador de desbalanço redox (Zitka *et al.*, 2012). GSH é substrato para as enzimas glutationa transferase e glutationa peroxidase (GPx), responsáveis pela detoxificação de xenobióticos e peróxidos, respectivamente (Meister and Anderson, 1983). A reação de degradação de peróxidos implica que GSH é oxidada em GSSG. A reação de redução de GSSG a GSH é catalisada por glutationa redutase (GR), a qual necessita de NADPH como cofator. A regeneração de NADP<sup>+</sup> a NADPH é realizada, em parte, na fase oxidativa da via das pentose fosfato, e catalisada pela enzima chave glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD). Intrigantemente, em células L929 foi mostrado que a expressão de HSPB1 especificamente aumentou a atividade tanto de

glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) quanto de Glutationa Redutase (GR) (Préville *et al.*, 1999; Cosentino, Grieco and Costanzo, 2011).

Além disso, em células de glioma, o aumento de HSPB1 em resposta a EO ou ao dano de DNA aumentou a atividade de G6PD. Neste modelo, HSPB1 aumenta a ligação entre G6PD e a desacetilase sirtuina-2 dependente de NAD+, levando a desacetilação e ativação de G6PD (Hongxing et al., 2016). Neste estudo nós confirmamos que o silenciamento de HSPB1 diminuiu, enquanto que a superexpressão aumentou, tanto o conteúdo de GSH quanto a razão GSH/GSSG. Mais ainda, foi observado o aumento dos níveis de GSSG em células silenciadas para HSPB1 e a diminuição da atividade de G6PD. Assim, a citoproteção de células MIN6 mediada por HSPB1 expostas a geradores de estresse oxidativo, como menadiona e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser exercida, ao menos em parte, pelo aumento nos níveis e/ou ativação de G6PD. Cabe lembrar que a via das pentose fosfato fornece um pool de pentoses, precursoras de reações de reparo de DNA e síntese de RNA, importantes em células com desbalanço de ROS (Hongxing et al., 2016). Como G6PD é citosólico, isso pode explicar a alta suscetibilidade da mitocôndria à ROS como mostrado anteriormente (Shinder et al., 2001), ou que o suporte da GSH às mitocôndrias é crucial para a resistência ao desbalanço redox e à sobrevivência das células beta.

Adicionalmente, o acúmulo de proteínas desnaturadas, por uma desregulação no balanço ROS, por exemplo, pode ativar uma resposta ao estresse, aumentando a expressão de HSPs, com a função de chaperonas moleculares. Se grandes quantidades de proteínas danificadas estão presentes, podem formar agregados, os quais servem como um sinal para a indução de apoptose. Concomitantemente, o aumento de expressão de HSPB1 facilitaria o reparo ou destruição destas proteínas, promovendo a recuperação celular. Esta habilidade de HSPB1 pode contribuir para o aumento da taxa de sobrevivência de células beta por limitar os níveis de proteínas malformadas e agregadas (Concannon, Gorman and Samali, 2003; Bryantsev *et al.*, 2007).

Juntos estes resultados contribuem para confirmar que HSPB1 desempenha um papel importante na citoproteção de células MIN6 contra o

desbalanço redox, o qual pode ser devido à diminuição de ROS por mais alta razão GSH/GSSG.

Mesmo tendo em vista o importante papel mitocondrial na síntese de ATP para células beta, nada se sabe a respeito do papel de HSPB1 como um mediador tanto da manutenção do metabolismo mitocondrial basal quanto do nível de vazamento de prótons da respiração mitocondrial induzidos por PRL neste tipo celular. Mostramos que o silenciamento de HSPB1 implicou na diminuição da respiração basal, em células MIN6, mesmo em ótimas condições de cultura, indicando que esta proteína pode ser essencial para a manutenção da homeostase mitocondrial, o que está em acordo com nossa discussão até aqui. Aprofundando nossos estudos sobre taxa de consumo oxigênio (OCR) vimos que o tratamento com citocinas promoveu maior vazamento de prótons (respiração desacoplada) da respiração mitocondrial em todas as células. No entanto, HSPB1, induzida por PRL, está envolvida na manutenção da eficiência do acoplamento da respiração mitocondrial, visto que em células MIN6 silenciadas para esta proteína o efeito do hormônio é completamente perdido. A partir de nossos resultados podemos concluir que, em primeiro lugar, a ausência de HSPB1, em células MIN6, não afeta o nível de vazamento de prótons relativo á respiração basal, nem nas condições de máxima viabilidade nem sob privação de nutrientes (privação de soro), resultado este compatível com a característica principal descrita para a família de proteínas Heat Shock Protein, cujo aumento de expressão e ativação se dá prioritariamente após estímulos de calor e estresse químico ou oxidativo em outros modelos. Em segundo lugar, todas as células parecem ser igualmente sensíveis ao tratamento com citocinas por aumentar em níveis similares a ineficiência no uso do oxigênio para sínteses de ATP. E, finalmente que, o aumento de HSPB1 promovido por PRL diminui esse desacoplamento relativo. Podemos então concluir que a presença de HSPB1 é essencial para os efeitos mitocondriais benéficos exercidos pela PRL em células MIN6.

A OCR máxima atingida após o uso do ionóforo subtraído da OCR basal representa a capacidade de reserva mitocondrial para responder à situações de estresse (Hill et al., 2012). Como o tratamento com citocinas promoveu uma diminuição da capacidade de reserva em todos os tipos

celulares, que foi revertido pelo tratamento hormonal salvo nas em células silenciadas para HSPB1, conseguimos mostrar, mais uma vez, a importância de HSPB1 na melhoria do funcionamento mitocondrial. Interessantemente, não se sabe muito a respeito de qual é o mecanismo responsável pelo desacoplamento mitocondrial em células beta.

Termogenina ou *Uncoupling Protein 1* (UCP1) é uma proteína transmembrana desacopladora encontrada em mitocôndrias do tecido adiposo marrom. Em 1997, foi descrita uma outra proteína amplamente distribuida nos tecidos, com 59% de identidade à UCP1 humana, denominada UCP2, por se pensar que exerciam a mesma função (Fleury *et al.*, 1997). Muito tem se estudado sobre esta proteína e mesmo estando presente em células beta, os resultados em relação ao papel de UCP2 na dissipação do gradiente de prótons do espaço intermembrana mitocondrial é controverso. Experimentos realizados em células beta de camundongos *knockout* para UCP2 não mostraram um aumento no nível de descoplamento mitocondrial, nem um menor conteúdo de ATP na ilhota. No entanto, houve aumento de ROS intracelular que os autores relacionam com aumento de secreção de insulina estimulada por glicose (Robson-Doucette *et al.*, 2011). Assim, o papel de UCP2 precisa ser melhor estudado (Wikstrom *et al.*, 2012; Nicholls, 2016).

Já tem sido descrito que ilhotas mais eficientes para acoplar o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons com a síntese de ATP têm melhor desempenho no momento de serem transplantadas em animais diabéticos e esse parâmetro poderia ser de utilidade para a predição do sucesso dos transplantes permitindo a utilização de uma menor quantidade de células (Papas et al., 2007; Wikstrom et al., 2012). Interessantemente, dois desenhos experimentais diferentes usados para transplantar ilhotas pancreáticas em animais diabéticos, tanto o prétratamento com PRL (500 ng/mL) por 24h antes do transplante, como a infusão de PRL ou veículo por 7 dias após o transplante, mostrou uma significativa melhoria da qualidade do enxerto de ilhotas pancreáticas murinas ou humanas isoladas, além da reversão do DM nos animais (Johansson et al., 2009).

Estes resultados nos levaram a investigar os mecanismos envolvidos na menor eficiência de acoplamento mitocondrial em células silenciadas para HSPB1. Como discutimos anteriormente, mitocôndrias são mais suscetíveis a ROS em células beta silenciadas para HSPB1. Como não mudanças na expressão de enzimas encontramos antioxidantes mitocondriais em nenhum tipo celular e nem entre os tratamentos, supomos que HSPB1 poderia estabilizar algumas destas enzimas e assim aumentar o poder antoxidante em nossos modelos. Uma outra hipótese é que haveria diferença não só na integridade, mas na quantidade de mitocôndrias em células shHSPB1 comparadas com o controle. Esta hipótese não foi testada no presente trabalho.

Em células vivas, mitocôndrias estão em um processo dinâmico de remodelamento através de eventos de fusão e fissão (Twig *et al.*, 2008; Twig, Hyde and Shirihai, 2008) o que poderia estar relacionado com quantidade de mitocôndrias dentro da célula. Foi mostrado que eventos de fusão podem formar uma rede de mitocôndrias interligadas na qual cada unidade pode trocar solutos, metabólitos e proteínas (Nakada *et al.*, 2001; Arimura *et al.*, 2004; Chen, Chomyn and Chan, 2005; Twig *et al.*, 2008). Este processo poderia permitir que mitocôndrias danificadas fossem resgatadas em sua atividade e estaria relacionado com a manutenção da homeostase mitocondrial para garantir o correto funcionamento das células (Chan, 2006; Twig *et al.*, 2008). Este é um processo de controle de qualidade mitocondrial e deve-se ao fato de que após a fissão, mitocôndrias filhas que apresentam um potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) mais baixo não reentram no ciclo fusão/fissão e são marcadas para autofagia (Twig, Hyde and Shirihai, 2008).

Nesse contexto, foi reportado que a superexpressão de HSPB1 em células L929 protegeu a morfologia e o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ m) após a exposição ao  $H_2O_2$  (Préville *et al.*, 1999). Sob condições normais de cultura, maior expressão de HSPB1 se correlacionou com um maior  $\Delta\Psi$ m, e esta situação permaneceu idêntica após o aumento do estresse oxidativo. Os autores também realizaram o fracionamento de células para testar se a manutenção de  $\Delta\Psi$ m pela HSPB1 foi resultado de uma interação direta dessa chaperona com estruturas mitocondriais e / ou

proteínas. No entanto, a ausência de HSPB1 na fração mitocondrial, independentemente da exposição ou não das células ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, levou os autores a sugerirem que a proteção do ΔΨm conferida por HSPB1 seria provavelmente resultante de efeitos indiretos dessa chaperona com proteínas ou estruturas mitocondriais. Curiosamente, Prdx3, uma proteína antioxidante mitocondrial, que foi identificada como sendo uma proteína cliente de HSPB1 apenas na presença de PRL, apresentou uma importante função na manutenção do ΔΨm durante o estresse induzido por citocinas em células de insulinoma de rato RINm5F (Wolf et al., 2010). Os resultados preliminares obtidos no presente projeto mostraram, em células MIN6 parentais, que parte do efeito citoprotetor da PRL poderia estar relacionado com uma recuperação da função mitocondrial, visto que somente nas culturas tratadas com citocinas e PRL observamos o aumento da intensidade de fluorescência de TMRE, um composto permeável à membrana celular, carregado positivamente e que prontamente se acumula em mitocôndrias ativas devido a sua relativa carga negativa (Crowley, Christensen and Waterhouse, 2016).

Como células MIN6 pré-tratadas com PRL conseguiram manter o ΔΨm, mesmo após o insulto com citocinas, similar ao das células controle, em tempos anteriores à ativação maior de caspase-3, podemos pensar que estas organelas poderiam apresentar tanto a morfologia, como a função aparentemente normal, podendo manter a OCR basal e máxima, assim como o nível de OCR acoplada similares às células não tratadas, nos tempos iniciais de tratamento. Isto não pareceria ser possível para as células tratadas com citocinas na ausência de PRL. Nessas células, talvez por formação de MOMP, ocorre a diminuição do ΔΨm, extravasamento de proteínas pró-apoptóticas e ativação dessa via de indução de morte, com ativação de caspases executoras após 9h do estímulo com citocinas próinflamatórias. Se analisarmos nossos resultados do interactoma de HSPB1, veremos que ao menos 6 proteínas relacionadas com a manutenção do potencial de membrana foram identificadas exclusivamente quando as células foram pré-tratadas com PRL e citocinas (Clic1, Kcnh2, Prdx3, Sod1, Sod2, Ywhae). Assim, mesmo sendo controverso se os mecanismos de proteção mitocondrial se dão de forma direta ou indireta, e sabendo que

nem todas essas interações poderiam não estar presentes em células intactas, podemos afirmar que HSPB1 é fundamental para este processo.

Em modelos de animais diabéticos, a secreção de insulina deficiente pode estar associada com a disfunção mitocondrial e a atividade anormal da cadeia respiratória (Maechler *et al*, 1999; Lowell and Shulman, 2005).

Como destacamos inicialmente, resultados prévios de nosso laboratório mostraram em cultura primária de ilhotas pancreáticas humanas, que o tratamento com PRL promoveu um aumento significativo tanto na expressão gênica como proteica de insulina, mas não no índice de estimulação (Stimulation Index, SI) (Labriola, et al., 2007a). Frente a estes resultados, nos perguntamos se a exposição de células beta a um coquetel de citocinas pró-inflamatórias poderia alterar o perfil secretório ou conteúdo de insulina e se HSPB1 desempenharia algum papel neste contexto. Como mostrado, HSPB1 não parece estimular vias que possam regular um aumento no conteúdo de insulina nem no índice de estímulo, tanto em células MIN6, como na cultura primária murina.

Como o principal objetivo do nosso grupo de pesquisa é melhorar a qualidade das ilhotas para o transplante de ilhotas pancreáticas, entender os mecanismos de proteção das células beta pela HSPB1 é de importância crucial para nós. Nós consequimos mostrar a relevância da HSPB1 em ambos os efeitos pró-sobrevivência da PRL contra a morte da célula beta induzida tanto por citocinas quanto por indução de estresse oxidativo. Este último efeito poderia também estar relacionado com a participação da HSPB1 na recuperação da função mitocondrial observada após o tratamento hormonal corroborando assim parte dos resultados obtidos nos experimentos de immunoprecipitação.

Não sabemos exatamente se existe uma hierarquia das vias, nas quais HSPB1 está agindo e se isso é regulado diferentemente, dependendo do estímulo que leva à superexpressão desta proteína, mas conseguimos provar pela primeira vez que esta proteína é crucial na ação citoprotetora da Prolactina em células beta.

# **CONCLUSÃO**

### 6-CONCLUSÃO

Coletivamente os resultados obtidos estendem o conhecimento sobre os mecanismos moleculares da ação de HSPB1 e contribuem para gerar estratégias eficientes para aumentar a viabilidade de células beta e assim otimizar a taxa de sucesso do transplante de ilhotas em indivíduos portadores de DM1.

## **BIBLIOGRAFIA**

#### **7-BIBLIOGRAFIA**

Acunzo, J., Katsogiannou, M. and Rocchi, P. (2012) 'Small heat shock proteins HSP27 (HspB1),??b-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd, 44(10), pp. 1622–1631. doi: 10.1016/j.biocel.2012.04.002.

Adams, J. M. and Cory, S. (1998) 'The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.', *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), pp. 1322–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9735050.

Adcock, K. et al. (1975) 'Human islet cell adenoma: metabolic analysis of the patient and of tumor cells in monolayer culture.', Diabetologia, 11(6), pp. 527-34. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/173612.

Aggarwal, B. B., Gupta, S. C. and Kim, J. H. (2012) 'Review article Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey', *Hematology*, 119(3), pp. 651–665. doi: 10.1182/blood-2011-04-325225.structurally.

Ahlqvist, E. et al. (2018) 'Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables', *Lancet Diabetes Endocrinol*, 8587(18), pp. 1–9. doi: 10.1016/S2213-8587(18)30051-2.

Akerblom, H. K. and Knip, M. (1998) 'Putative environmental factors in Type 1 diabetes.', *Diabetes/metabolism reviews*, 14(1), pp. 31–67. doi: 10.1002/(SICI)1099-0895(199803)14:1<31::AID-DMR201>3.0.CO;2-A [pii].

Almaça, J. et al. (2015) 'Spatial and temporal coordination of insulin granule exocytosis in intact human pancreatic islets', *Diabetologia*, 58(12), pp. 2810–2818. doi: 10.1007/s00125-015-3747-9.

Arimura, S. et al. (2004) 'Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution', *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 101(20), pp. 7805–7808. doi: 10.1073/pnas.0401077101.

Arrigo, A.-P. and Mehlen, P. (1994) 'Expression and function of the low molecular weight heat shock proteins', in *New York: Cold Spring Harbor Laboratory press*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, pp. 335–373.

Arrigo, A. (2017) 'Mammalian HspB1 (Hsp27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell', *Cell Stress and Chaperones*. Cell Stress and Chaperones, 1. doi: 10.1007/s12192-017-0765-1.

- Arrigo, A. P. *et al.* (2005) 'Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels.', *Antioxidants & redox signaling*, 7(3–4), pp. 414–22. doi: 10.1089/ars.2005.7.414.
- Arrigo, A. P. (2007) 'The cellular "networking" of mammalian Hsp27 and its functions in the control of protein folding, redox state and apoptosis', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 594, pp. 14–26. doi: 10.1007/978-0-387-39975-1\_2.
- Arrigo, A. P. (2013) 'Human small heat shock proteins: Protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: An update1.', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 587(13), pp. 1959–1969. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.011.
- Arrigo, A. P. and Welch, W. J. (1987) 'Characterization and purification of the small 28,000-dalton mammalian heat shock protein.', *Journal of Biological Chemistry*, 262(32), pp. 15359–15369.
- Auwera, B. van der *et al.* (1995) 'Genetic susceptibility for insulindependent diabetes mellitus in Caucasians revisited: the importance of diabetes registries in disclosing interactions between HLA-DQ and insulin gene-linked risk', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(4), pp. 2567–2573. doi: 10.1210/jcem.80.9.7673396.
- Bach, J. F. and Chatenoud, L. (2012) 'The hygiene hypothesis: An explanation for the increased frequency of insulin-dependent diabetes', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), pp. 1–10. doi: 10.1101/cshperspect.a007799.
- Balda, C. A. and Pacheco-Silva, A. (1999) 'Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1', *Rev Ass Med Brasil*, 45(2), pp. 175–180.
- Barbosa, L. F., De Medeiros, M. H. G. and Augusto, O. (2006) 'Danos oxidativos e neurodegeneração: O quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes?', *Quimica Nova*, 29(6), pp. 1352–1360. doi: 10.1590/S0100-40422006000600034.
- Van Belle, T., Coppieters, K. and Von Herrath, M. (2011) 'Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies', *Physiol Rev*, 91, pp. 79–118. doi: 10.1152/physrev.00003.2010.
- Bosco, D. et al. (2010) 'Unique Arrangement of Alpha- and Beta Cells in Human Islets of Langerhans', *Diabetes*, 59(May), pp 1202-10. doi: 10.2337/db09-1177.
- Bradford, M. M. (1976) 'A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding', *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254.

- Brand, M. D. *et al.* (1999) 'The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance', *International Journal of Obesity*, 23, pp. S4–S11. doi: 10.1038/sj.ijo.0800936.
- Brelje, T. C. *et al.* (1989) 'Effect of prolactin versus growth hormone on islet function and the importance of using homologous mammosomatotropic hormones', *Endocrinology*, 125(5), pp. 2392–2398. doi: 10.1210/endo-125-5-2392.
- Brelje, T. C. *et al.* (1993) 'Effect of Homologous Placental Islets: Implication for Placental Function Pregnancy \*', *Endocrinology*, 132(2), pp. 879–887.
- Brelje, T. C. *et al.* (2002) 'An immunohistochemical approach to monitor the prolactin-induced activation of the JAK2/STAT5 pathway in pancreatic islets of langerhans', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50(3), pp. 365–383. doi: 10.1177/002215540205000308.
- Brelje, T. C. *et al.* (2004) 'Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of Langerhans', *Endocrinology*, 145(9), pp. 4162–4175. doi: 10.1210/en.2004-0201.
- Brereton, M. F. *et al.* (2015) 'Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination?', *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 63(8), pp. 575–591. doi: 10.1369/0022155415583535.
- Brissova, M. et al. (2005) 'Assessment of Human Pancreatic Islet Architecture and Composition by Laser Scanning Confocal Microscopy', *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53(9), pp. 1087–1097. doi: 10.1369/jhc.5C6684.2005.
- Bruey, J. M., Paul, C., et al. (2000) 'Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo.', *Oncogene*, 19(42), pp. 4855–63. doi: 10.1038/sj.onc.1203850.
- Bruey, J. M., Ducasse, C., et al. (2000) 'Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c.', *Nature cell biology*, 2(9), pp. 645–52. doi: 10.1038/35023595.
- Brumatti, G., Salmanidis, M. and Ekert, P. (2010) 'Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals.', *Send to Cell Mol Life Sci.*, 67(10), pp. 1619–30. doi: 10.1007/s00018-010-0288-8.
- Bruni, A. and Gala-lopez, B. (2014) 'Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges', pp. 211–223.
- Bryantsev, A. L. et al. (2007) 'Regulation of stress-induced

- intracellular sorting and chaperone function of Hsp27 (HspB1) in mammalian cells', *Biochemical Journal*, 407(3), pp. 407–417. doi: 10.1042/BJ20070195.
- Calabrese, V. et al. (2003) 'Redox regulation of heat shock protein expression in aging and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: A nutritional approach', *Amino Acids*, 25(3–4), pp. 437–444. doi: 10.1007/s00726-003-0048-2.
- Cardozo, A. K. *et al.* (2005) 'Cytokines Downregulate the Sarcoendoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca2□, Leading to Induction of Reticulum Pump Ca2□ ATPase 2b and Deplete Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic \*-Cells', *Diabetes*, 54, pp. 452–461.
- Carroll, D. et al. (2016) 'Simultaneous quantitation of oxidized and reduced glutathione via LC-MS/MS: An insight into the redox state of hematopoietic stem cells.', *Free radical biology & medicine*, 97, pp. 85–94. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.005.
- Casares, N. *et al.* (2005) 'Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death', *The Journal of Experimental Medicine*, 202(12), pp. 1691–1701. doi: 10.1084/jem.20050915.
- CAVALCANTE, L.F. GONÇALVES, M. M. et al. (1995) 'Aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1 do ambulatório de Diabetes do HUPE-UERJ', in 9° Congresso da Associação Latino-Americana de Diabetes / 10° Congresso Brasileiro de Diabetes (resumo).
- Chan, D. C. (2006) 'Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development', *Cell*, 125(7), pp. 1241–1252. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.010.
- Chen, H., Chomyn, A. and Chan, D. C. (2005) 'Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction', *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), pp. 26185–26192. doi: 10.1074/jbc.M503062200.
- Cheng, E. H.-Y. *et al.* (2003) 'VDAC2 Inhibits BAK Activation and Mitochondrial Apoptosis', *Science*, 301(5632), pp. 513–517. doi: 10.1126/science.1083995.
- Choudhary, P. et al. (2015) 'Evidence-Informed Clinical Practice Recommendations for Treatment of Type 1 Diabetes Complicated by Problematic Hypoglycemia', 38(June), pp. 1016–1029. doi: 10.2337/dc15-0090.
- Ciocca, D. R. *et al.* (1983) 'Distribution of an estrogen-induced protein with a molecular weight of 24,000 in normal and malignant human tissues and cells.', *Cancer research*, 43(3), pp. 1204–1210.
- Cnop, M. et al. (2005) 'Mechanisms of pancreatic beta-cell death in

- type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities', *Diabetes*, 54 Suppl 2(6), pp. S97-107. doi: 10.2337/diabetes.54.suppl\_2.S97.
- Concannon, C. G., Gorman, A. M. and Samali, A. (2003) 'On the role of Hsp27 in regulating apoptosis', 8(1), pp. 61–70.
- Concannon, C. G., Orrenius, S. and Samali, A. (2001) 'Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both procaspase-3 and cytochrome c.', *Gene expression*, 9(4–5), pp. 195–201. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11444529.
- Cook, D. L. and Hales, C. N. (1984) 'Intracellular ATP directly blocks K+ channels in pancreatic B-cells.', *Nature.*, 311(5983), pp. 271–3.
- Cosentino, C., Grieco, D. and Costanzo, V. (2011) 'ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair', *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 30(3), pp. 546–555. doi: 10.1038/emboj.2010.330.
- Crowley, L. C., Christensen, M. E. and Waterhouse, N. J. (2016) 'Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining', *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(12), p. pdb.prot087361. doi: 10.1101/pdb.prot087361.
- Curtin, J. F. and Cotter, T. G. (2003) 'Defects in death-inducing signalling complex formation prevent JNK activation and Fasmediated apoptosis in DU 145 prostate carcinoma cells', pp. 1950–1957. doi: 10.1038/sj.bjc.6601393.
- Cutler, R. G. (2005) 'Oxidative Stress and Aging: Catalase Is a Longevity Determinant Enzyme', *Rejuvenation Research*, 8(3), pp. 138–140. doi: 10.1089/rej.2005.8.138.
- Dai, H. et al. (2011) 'Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization', *Journal of Cell Biology*, 194(1), pp. 39–48. doi: 10.1083/jcb.201102027.
- Dai, T. et al. (2009) 'Heat shock protein 27 overexpression mitigates cytokine-induced islet apoptosis and streptozotocin-induced diabetes', Endocrinology, 150(7), pp. 3031–3039. doi: 10.1210/en.2008-0732.
- Diaz-Latoud, C. *et al.* (2005) 'Substitution of the Unique Cysteine Residue of Murine Hsp25 Interferes with the Protective Activity of This Stress Protein Through Inhibition of Dimer Formation', *Antioxidants & Redox Signaling*. Mary Ann Liebert, Inc, 7(3–4), pp. 436–445. Available at: http://doi.org/10.1089/ars.2005.7.436.
- Dong, H. and Woo, S. L. (2001) 'Hepatic insulin production for type 1 diabetes', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12(10), pp. 441–446. doi: 10.1016/S1043-2760(01)00491-X.
- Edlich, F. et al. (2011) 'Bcl-xL retrotranslocates Bax from the

- mitochondria into the cytosol', *Cell*, 145(1), pp. 104–116. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.034.
- Ehses, J. A. *et al.* (2003) '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*, 144(10), pp. 4433–45. doi: 10.1210/en.2002-0068.
- Eizirik, D. *et al.* (2003) 'Use of microarray analysis to unveil transcription factor and gene networks contributing to \_ cell dysfunction and apoptosis.', *Ann N Y Acad Sci.*, 1005, pp. 55–74.
- Eizirik, D. L. *et al.* (2008) 'Use of a systems biology approach to understand pancreatic  $\beta$  -cell death in Type 1 diabetes', pp. 321–327. doi: 10.1042/BST0360321.
- Eizirik, D. L., Colli, M. L. and Ortis, F. (2009) 'The role of inflammation in insulitis and B-cell loss in type 1 diabetes', *Nature Reviews Endocrinology*, 5(4), pp. 219–226. doi: 10.1038/nrendo.2009.21.
- Elmore, S. (2007) 'Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death', *Toxicologic Pathology*, 35(4), pp. 495–516. doi: 10.1080/01926230701320337.
- Emamaullee, J. and Shapiro, A. (2006) 'Interventional strategies to prevent beta-cell apoptosis in islet transplantation', *Diabetes*, 55(7), pp. 1907–1914. doi: 10.2337/db05-1254.
- Estella, E. *et al.* (2006) 'Granzyme B-mediated death of pancreatic  $\beta$ -cells requires the proapoptotic BH3-only molecule bid', *Diabetes*, 55(8), pp. 2212–2219. doi: 10.2337/db06-0129.
- Fagerberg, L. *et al.* (2014) 'Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based', *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(2), pp. 397–406. doi: 10.1074/mcp.M113.035600.
- Fink, S. L. and Cookson, B. T. (2005) 'Apoptosis , Pyroptosis , and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells', *INFECTION AND IMMUNITY*, 73(4), pp. 1907–1916. doi: 10.1128/IAI.73.4.1907.
- Fleury, C. *et al.* (1997) 'Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia', *Nature Genetics*, 15(3), pp. 269–272. doi: 10.1038/ng0397-269.
- Frödin, M. *et al.* (1995) 'Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1.', *The Journal of biological chemistry*, 270(14), pp. 7882–9. Available at:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7713882.
- Fu, Z., R. Gilbert, E. and Liu, D. (2013) 'Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes', *Current Diabetes Reviews*, 9(1), pp. 25–53. doi: 10.2174/157339913804143225.
- Fujinaka, Y. *et al.* (2007) 'Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation', *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), pp. 30707–30717. doi: 10.1074/jbc.M702607200.
- Galluzzi, L., Kepp, O. and Kroemer, G. (2016) 'Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control', *Microbial Cell*, 3(3), pp. 101–108. doi: 10.15698/mic2016.03.483.
- Galluzzi, L. and Vitale, I. (2018) 'Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018', *Cell Death & Differentiation*. doi: doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4.
- Galsgaard, E. D. *et al.* (2001) 'Expression of dominant-negative STAT5 inhibits growth hormone- and prolactin-induced proliferation of insulin-producing cells', *Diabetes*, 50(SUPPL. 1), pp. 5–6.
- Garner, T. P. et al. (2016) 'An Autoinhibited Dimeric Form of BAX Regulates the BAX Activation Pathway', *Mol Cell.*, 63(3), pp. 485–497. doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.010.An.
- Garrido, C. et al. (1999) 'HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9.', FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 13(14), pp. 2061–70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10544189.
- Garrido, C. et al. (2006) 'Heat shock proteins 27 and 70: Anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties', *Cell Cycle*, 5(22), pp. 2592–2601. doi: 10.4161/cc.5.22.3448.
- Gavathiotis, E. *et al.* (2008) 'BAX Activation is Initiated at a Novel Interaction Site Evripidis', *Nature*, 455(7216), pp. 1076–1081. doi: 10.1038/nature07396.BAX.
- Geyelin, H. R. *et al.* (1922) 'The use of insulin in juvenile diabetes', *J Metab Research*, 2(Nov-Dec), pp. 767–791. Available at: https://insulin.library.utoronto.ca/islandora/object/insulin%3AT10025
- Ghavami, S. et al. (2009) 'Apoptosis and cancer: Mutations within caspase genes', *Journal of Medical Genetics*, 46(8), pp. 497–510. doi: 10.1136/jmg.2009.066944.
- Gibert, B. and Mehlen, P. (2015) 'Dependence receptors and cancer:

- Addiction to trophic ligands', *Cancer Research*, 75(24), pp. 5171–5175. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3652.
- Gleason, C. E. *et al.* (2000) 'Determinants of glucose toxicity and its reversibility in the pancreatic islet beta-cell line, HIT-T15', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279(5), pp. E997-1002.
- Glock, G. E. and McLean, P. (1953) 'Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver.', *The Biochemical journal*, 55(3), pp. 400–8.
- Goldbaum, O. *et al.* (2009) 'The small heat shock protein HSP25 protects astrocytes against stress induced by proteasomal inhibition', *Glia*, 57(14), pp. 1566–1577. doi: 10.1002/glia.20870.
- Gomes, Marília de Brito Aguiar, L. G. K. de and Marques, Eduardo Pereira Sarno, Euzenir Nunes Chacra, A. R. (1996) 'Estudo comparativo de variáveis epidemiológicas em casos múltiplos e esporádicos de Diabetes Mellitus do tipo tipo 1', *Arq Bras Endocrinol Metabol*; 40(2), pp. 113–116.
- Gomes, V. de M. (2016) Estudo da função de HSPB1 na citoproteção induzida pela prolactina em células beta pancreáticas. University of São Paulo. Available at: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-18082016-074927/pt-br.php.
- Gragnoli, C. (2008) 'The CM cell line derived from liver metastasis of malignant human insulinoma is not a valid beta cell model for in vitro studies', *Journal of Cellular Physiology*, 216(2), pp. 569–570. doi: 10.1002/jcp.21453.
- Green, D. R. et al. (2010) 'IMMUNOGENIC AND TOLEROGENIC CELL DEATH', NIH Public Access, 9(5), pp. 1–25. doi: 10.1038/nri2545.IMMUNOGENIC.
- Gylfe, E. and Hellman, B. (1986) 'Glucose-stimulated sequestration of Ca2 + in clonal insulin-releasing cells', *Biochemical Journal*, 233, pp. 865–870.
- Han, Y. et al. (1997) 'JAK2 and STAT5, but not JAK1 and STAT1, Are Required for Prolactin- Induced beta -Lactoglobulin Transcription', Molecular Endocrinology, 11(June), pp. 1180-1188.
- Hankaniemi, M. M. *et al.* (2017) 'Optimized production and purification of Coxsackievirus B1 vaccine and its preclinical evaluation in a mouse model', *Vaccine*. Elsevier Ltd, 35(30), pp. 3718–3725. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.05.057.
- Haskew-Layton, R. E. et al. (2010) 'Controlled enzymatic production of astrocytic hydrogen peroxide protects neurons from oxidative

- stress via an Nrf2-independent pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), pp. 17385–17390. doi: 10.1073/pnas.1003996107.
- Haslbeck, M. *et al.* (2005) 'Some like it hot: The structure and function of small heat-shock proteins', *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(10), pp. 842–846. doi: 10.1038/nsmb993.
- Henquin, J. C. *et al.* (2006) 'In Vivo and In Vitro Glucose-Induced Biphasic Insulin Secretion in the Mouse', *Diabetes*, 55(2), pp. 441–451. doi: 10.3851/IMP2443.
- Hickey, E. D. and Weber, L. A. (1982) 'Modulation of Heat-Shock Polypeptide Synthesis in HeLa Cells during Hyperthermia and Recovery', *Biochemistry*, 21(7), pp. 1513–1521. doi: 10.1021/bi00536a008.
- Hill, B. G. *et al.* (2012) 'Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy', *Biol Chem.*, 393(12), pp. 1485–1512. doi: 10.1515/hsz-2012-0198.Integration.
- Hill, R. S., Oberwetter, J. M. and Boyd, A. E. (1987) 'Increase in cAMP levels in beta-cell line potentiates insulin secretion without altering cytosolic free-calcium concentration.', *Diabetes*, 36(4), pp. 440–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2434378.
- Hongxing, Y. *et al.* (2016) 'HSPB1 Enhances SIRT2-Mediated G6PD Activation and Promotes Glioma Cell Proliferation', *PLoS ONE*, 11(10), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0164285.
- Huang, J. *et al.* (1997) 'Heat shock transcription factor 1 binds selectively in vitro to ku protein and the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), pp. 26009–26016. doi: 10.1074/jbc.272.41.26009.
- Huot, J. et al. (1991a) 'Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein.', Cancer research, 51(19), pp. 5245–5252.
- Huot, J. *et al.* (1991b) 'Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein.', *Cancer research*, 51(19), pp. 5245–5252. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1913647.
- Huot, J. et al. (1996) 'HSP27 Phosphorylation-mediated Resistance against Actin Fragmentation and Cell Death Induced by Oxidative Stress HSP27 Phosphorylation-mediated Resistance against Actin Fragmentation and Cell Death Induced by Oxidative Stress1', pp. 273–279.
- Ichii, H. and Ricordi, C. (2009) 'Current status of islet cell

transplantation', *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 16(2), pp. 101–112. doi: 10.1007/s00534-008-0021-2.

International Diabetes Federation (2017) *IDF DIABETES ATLAS Eighth edition 2017*. Available at: www.diabetesatlas.org.

Ishihara, H. *et al.* (1993) 'Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets', *Diabetologia*, 36(11), pp. 1139–1145. doi: 10.1007/BF00401058.

Ishihara, H. et al. (1999) 'Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in  $\beta$  cells', J. Clin. Invest, 104, pp. 1621–1629.

KERR, J and Currie, A. (1972) 'Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide- Ranging Implications in Tissue Kinetics', *Journal of Internal Medicine*, 258(6), pp. 479–517. doi: 10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x.

J.Malaisse, W. and Sener, A. (1987) 'Glucose-induced changes in cytosolic ATP content in pancreatic islets', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 927(2), pp. 190–195.

Jensen, J. et al. (2005) '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.', *The Journal of endocrinology*, 187(1), pp. 25–36. doi: 10.1677/joe.1.06086.

Joslin, E. P. (1917) THE TREATMENT OF DIABETES MELLITUS. 2nd edn. Edited by L. & Febiger. New York, NY.

Kaminitz, A. *et al.* (2007) 'The vicious cycle of apoptotic beta-cell death in type 1 diabetes.', *Immunology and cell biology*, 85(8), pp. 582–9. doi: 10.1038/sj.icb.7100093.

Karlsson, M. et al. (2010) 'What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show?', *Biochemical Journal*, 428(2), pp. 183–190. doi: 10.1042/BJ20100208.

Karvonen, M. et al. (1993) 'A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus', *Diabetologia*, 36(10), pp. 883–892. doi: 10.1007/BF02374468.

Kelly, C., McClenaghan, N. H. and Flatt, P. R. (2011) 'Role of islet structure and cellular interactions in the control of insulin secretion', *Islets*, 3(2), pp. 41–47. doi: 10.4161/isl.3.2.14805.

Kennedy, H. J. et al. (1999) 'Glucose Generates Sub-plasma

Membrane ATP Microdomains in Single Islet <sup>1</sup>√ -Cells', 274(19), pp. 13281–13291.

Kido, Y. *et al.* (2000) 'Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2', *Journal of Clinical Investigation*, 105(2), pp. 199–205. doi: 10.1172/JCI7917.

Kim, H. *et al.* (2009) 'Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis Hyungjin', *Mol Cell.*, 36(3), pp. 487–499. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.030.Stepwise.

Kim, K. and Lee, M. (2009) 'Recent progress in research on beta-cell apoptosis by cytokines.', *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 14(Jan 1), pp. 657–64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273093.

Kojima, M. et al. (1999) 'Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach', *Nature*, 402, pp. 656–660.

Kondegowda, N. G. *et al.* (2012) 'Lactogens protect rodent and human beta cells against glucolipotoxicity- induced cell death through Janus kinase-2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) signalling', *Diabetologia*, 55(6), pp. 1721–1732. doi: 10.1007/s00125-012-2501-9.

Krogh, K. et al. (2001) 'Microencapsulation and tissue engineering as an alternative treatment of diabetes', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, pp. 691–697.

Labriola, L., Montor, W. R., *et al.* (2007) 'Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures.', *Molecular and cellular endocrinology*, 263(1–2), pp. 120–33. doi: 10.1016/j.mce.2006.09.011.

Labriola, L., Montor, W. R., *et al.* (2007) 'Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 263(1–2), pp. 120–133. doi: 10.1016/j.mce.2006.09.011.

Labriola, L. *et al.* (2007) 'Prolactin-induced changes in protein expression in human pancreatic islets', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264(1–2), pp. 16–27. doi: 10.1016/j.mce.2006.10.004.

Labriola, L. *et al.* (2009) 'Generation and characterization of human insulin-releasing cell lines', *BMC Cell Biol*, 10, p. 49. doi: 10.1186/1471-2121-10-49.

Landry, J. *et al.* (1989) 'Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells', *Journal of Cell Biology*, 109(1), pp. 7–15. doi: 10.1083/jcb.109.1.7.

- Lavoie, J. N. *et al.* (1995) 'Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27.', *Molecular and cellular biology*, 15(1), pp. 505–516.
- Lee, E.-W. et al. (2012) 'The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis', BMB Reports. doi: 10.5483/BMBRep.2012.45.9.186.
- Lemarie, A. *et al.* (2011) 'Specific disintegration of complex II succinate: Ubiquinone oxidoreductase links pH changes to oxidative stress for apoptosis induction', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 18(2), pp. 338–349. doi: 10.1038/cdd.2010.93.
- Lentze, N. and Narberhaus, F. (2004) 'Detection of oligomerisation and substrate recognition sites of small heat shock proteins by peptide arrays', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(2), pp. 401–407. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.043.
- Lenzen, S. (2008) 'Oxidative stress: the vulnerable  $\beta$ -cell', *Biochemical Society Transactions*, 36(3), pp. 343–347. doi: 10.1042/BST0360343.
- Lewis, U., Singh, R. and Seavey, B. (1971) 'HUMAN PROLACTIN: ISOLATION AND SOME PROPERTIES', *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATION*, 44(5), pp. 1169–1176.
- Li, P. et al. (1997) 'Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade', Cell, 91(4), pp. 479–489. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80434-1.
- Li, Z. and Srivastava, P. (2004) 'Heat-Shock Proteins', *Current Protocols in Immulology*, 58(1), p. A.1T.1-A.1T.6. doi: 10.1002/0471142735.ima01ts58.
- Los, M., Wesselborg, S. and Schulze-osthoff, K. (1999) 'The Role of Caspases in Development , Immunity , and Apoptotic Signal Transduction: Lessons from Knockout Mice', 10, pp. 629–639.
- Lukić, M. L., Stosić-Grujicić, S. and Shahin, a (1998) 'Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes.', *Developmental immunology*, 6(1–2), pp. 119–28. doi: 10.1155/1998/92198.
- Maechler, P. and Wollheim, C. B. (2000) 'Mitochondrial signals in glucose-stimulated insulin secretion in the beta cell.', *The Journal of physiology*, 529 Pt 1(April), pp. 49–56. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00049.x.
- Malaguti, C. et al. (2014) 'Oxidative stress and susceptibility to mitochondrial permeability transition precedes the onset of diabetes in autoimmune non-obese diabetic mice', Free Radical Research,

48(12), pp. 1494–1504. doi: 10.3109/10715762.2014.966706.

Mandrup-Poulsen, T. (2001) 'beta-cell apoptosis: stimuli and signaling.', *Diabetes*, 50 Suppl 1(February), pp. S58-63. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11272204.

Mansano, R. A. W. (2013) Estudo do papel da proteína HSP27/25 na ação da prolactina humana recombinante em células beta pancreáticas. Universidade de São Paulo. doi: DOI10.11606/D.46.2013.tde-22102013-112950.

Marhfour, I. et al. (2012) 'Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes', *Diabetologia*, 55(9), pp. 2417–2420. doi: 10.1007/s00125-012-2604-3.

Marks, H. H. (1965) 'LONGEVITY AND MORTALITY OF DIABETICS', Am J Public Health Nations Health, 55, pp. 416–423.

Martínez, I. M. and Chrispeels, M. J. (2003) 'Genomic Analysis of the Unfolded Protein Response in Arabidopsis Shows Its Connection to Important Cellular Processes', *The Plant Cell*, 15(February), pp. 561–576. doi: 10.1105/tpc.007609.homolog.

Massucatti, L. A., Pereira, R. A. and Maioli, T. U. (2012) 'PREVALÊNCIA DE DIABETES GESTACIONAL EM UNIDADES DE SAÚDE BÁSICA', Revista de Enfermagem e Atenção à Saúde, 1, pp. 70–79.

Mastrocola, R. *et al.* (2012) 'Hippocampal heat shock protein 25 expression in streptozotocin-induced diabetic mice', *Neuroscience*. IBRO, 227, pp. 154–162. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.038.

Mathers, W. et al. (1998) 'Menopause and tear function: the influence of prolactin and sex hormones on human tear production.', Cornea, 17(4), pp. 353–358.

McCall, M. and James Shapiro, A. M. (2012) 'Update on islet transplantation', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), pp. 1–16. doi: 10.1101/cshperspect.a007823.

McDonough, H. and Patterson, C. (2003) 'CHIP: A link between the chaperone and proteasome systems', *Cell Stress and Chaperones*, 8(4), pp. 303–308. doi: 10.1379/1466-1268(2003)008<0303:CALBTC>2.0.CO;2.

Meglasson, M. and Matschinsky, F. (1986) 'Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion.', *Diabetes Metab Rev.*, 2(3-4), pp. 163–214.

Mehlem, P., Schulze-Osthoff, K. and Arrigo, a (1996) 'Small Stress Proteins as Novel Regulators of Apoptosis', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(28), pp. 16510–16514.

Mehlen, P. et al. (1993) 'Analysis of the resistance to heat and

hydrogen peroxide stresses in COS cells transiently expressing wild type or deletion mutants of the Drosophila 27-kDa heat-shock protein.', *European journal of biochemistry / FEBS*, 215(2), pp. 277–284. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18032.x.

Mehlen, P. et al. (1996) 'Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death.', *Embo J*, 15(11), pp. 2695–2706.

Mehlen, P. and Bredesen, D. E. (2011) 'Dependence Receptors: From Basic Research to Drug Development', *Science Signaling*, 4(157), p. mr2. doi: 10.1126/scisignal.2001521.

Mehmeti, I., Lenzen, S. and Lortz, S. (2011) 'Modulation of Bcl-2-related protein expression in pancreatic beta cells by pro-inflammatory cytokines and its dependence on the antioxidative defense status.', *Molecular and cellular endocrinology*, 332(1–2), pp. 88–96. doi: 10.1016/j.mce.2010.09.017.

Meister, A. and Anderson, M. E. (1983) 'Glutathione', *Annual Review of biochemistry*, 52, pp. 711–760. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.

Merani, S. and Shapiro, A. (2006) 'Current status of pancreatic islet transplantation.', *Clin Sci (Lond)*, 110(6), pp. 611–25. doi: 10.1042/CS20050342.

Meyts, P. De (2016) 'The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network', *Endotext*. Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK378978/.

Mizuno, N. *et al.* (1998) 'Altered bcl-2 and bax expression and intracellular Ca2+ signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose-induced insulin secretion.', *Endocrinology*, 139(3), pp. 1429–39. doi: 10.1210/endo.139.3.5798.

Molina, P. E. (2004) *Endocrine Physiology*. Edited by Lange Physiology Books. McGraw Hill.

Van Montfort, R., Slingsby, C. and Vierling, E. (2001) 'Structure and function of small heat-shock protein/ alpha-crytallin family of molecular chaperonas', *Advances Protein Chemistry*, 59, pp. 105–156.

Moore, F. et al. (2011) 'STAT1 is a master regulator of pancreatic {beta}-cell apoptosis and islet inflammation.', *The Journal of biological chemistry*, 286(2), pp. 929-41. doi: 10.1074/jbc.M110.162131.

Mosmann, T. (1983) 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.', *Journal* 

of immunological methods, 65(1-2), pp. 55-63.

Mounier, N. and Arrigo, A.-P. (2002) 'Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact?', *Cell stress*  $\{\&\}$  *chaperones*, 7(2002), pp. 167-176. doi: 10.1379/1466-1268(2002)007<0167:ACASHS>2.0.CO;2.

Mulder, H. and Ling, C. (2009) 'Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta-cells in Type 2 diabetes', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 297(1–2), pp. 34–40. doi: 10.1016/j.mce.2008.05.015.

Naghdi, S., Várnai, P. and Hajnóczky, G. (2015) 'Motifs of VDAC2 required for mitochondrial Bak import and tBid-induced apoptosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(41), pp. E5590–E5599. doi: 10.1073/pnas.1510574112.

Najemnikova, E., Rodgers, C. D. and Locke, M. (2007) 'Altered heat stress response following streptozotocin-induced diabetes.', *Cell stress & chaperones*, 12(4), pp. 342–352. doi: 10.1379/CSC-292.1.

Nakada, K. *et al.* (2001) 'Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA', *Nature Medicine*, 7(8), pp. 934–940. doi: 10.1038/90976.

Nakazaki, M. et al. (1995) 'Involvement of ATP-sensitive K+ channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells.', *Diabetes*, 44(8), pp. 878–83. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7621991.

Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th edn. Edited by W. H. Freeman.

Newsholme, P., Gaudel, C. and McClenaghan, N. H. (2010) 'Nutrient Regulation of Insulin Secretion and  $\beta$ -Cell Functional Integrity', *Adv Exp Med Biol.*, 654, pp. 91–114. doi: 10.1007/978-90-481-3271-3\_6.

Nicholas, D., Odumosu, O. and Langridge, W. H. R. (2011) 'Autoantigen Based Vaccines for Type 1 Diabetes', *Discov Med*, 11(59), pp. 293–301.

Nicholls, D. G. (2016a) 'THE PANCREATIC -CELL: A BIOENERGETIC PERSPECTIVE', *Physiol Rev*, 96, pp. 1385–1447. doi: 10.1152/physrev.00009.2016.

Nicholls, D. G. (2016b) 'The Pancreatic  $\beta$ -Cell: A Bioenergetic Perspective.', *Physiological reviews*, 96(4), pp. 1385–447. doi: 10.1152/physrev.00009.2016.

Nielsen, J. H. *et al.* (2001) 'Regulation of -Cell Mass by Hormones and Growth Factors', *Diabetes*, 50, pp. 25–29. doi:

10.2337/diabetes.50.2007.S25.

Nielsen, K. et al. (1999) 'Beta-cell maturation leads to in vitro sensitivity to cytotoxins.', *Diabetes*, 48(12), pp. 2324–32. Available at: http://diabetes.diabetesjournals.org/content/48/12/2324.

Nielsen, K. *et al.* (2004) 'Gene expression profiles during beta cell maturation and after IL-1beta exposure reveal important roles of Pdx-1 and Nkx6.1 for IL-1beta sensitivity.', *Diabetologia*, 47(12), pp. 2185–99. doi: 10.1007/s00125-004-1578-1.

Nielsen, K. et al. (2004) 'Protein expression changes in a cell system of beta-cell maturation reflect an acquired sensitivity to IL-1 $\beta$ ', Diabetologia, 47(1), pp. 62–74. doi: 10.1007/s00125-003-1277-3.

Nivon, M. *et al.* (2009) 'Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock.', *Autophagy*, 5(6), pp. 766–83. doi: 10.4161/auto.8788.

Van Noort, J. M. et al. (2012) 'The link between small heat shock proteins and the immune system', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(10), pp. 1670–1679. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.010.

Nuñez, G. et al. (1990) 'Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines', *J Immunol.*, 144(9), pp. 3602–10.

O'Sullivan, E. S. *et al.* (2010) 'Rat islet cell aggregates are superior to islets for transplantation in microcapsules', *Diabetologia*, 53(5), pp. 937–945. doi: 10.1007/s00125-009-1653-8.

Ogurtsova, K. *et al.* (2017) 'IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040', *Diabetes Research and Clinical Practice*. Elsevier B.V., 128, pp. 40–50. doi: 10.1016/j.diabres.2017.03.024.

Ortis, F. et al. (2008) 'Induction of nuclear factor- $\kappa B$  and its downstream genes by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells', *Diabetologia*, 51(7), pp. 1213–1225. doi: 10.1007/s00125-008-0999-7.

Ortis, F. et al. (2010) 'Cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary beta-cells.', *Diabetes*, 59(2), pp. 358–74. doi: 10.2337/db09-1159.

Pandey, P. et al. (2000) 'Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3.', *Oncogene*, 19(16), pp. 1975–1981. doi: 10.1038/sj.onc.1203531.

Papas, K. K. et al. (2007) 'Human Islet Oxygen Consumption Rate and DNA Measurements Predict Diabetes Reversal in Nude Mice', Am

- *J Transplant.*, 7(3), pp. 707–713. doi: 10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.
- Parcellier, A. *et al.* (2003) 'HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation.', *Molecular and cellular biology*, 23(16), pp. 5790–802. doi: 10.1128/MCB.23.16.5790.
- Paul, C. *et al.* (2010) 'Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27)', *Experimental Cell Research*, 316(9), pp. 1535–52. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.03.006.
- Paul, C. et al. (2010) 'Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27)', Experimental Cell Research. Elsevier Inc., 316(9), pp. 1535–1552. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.03.006.
- Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.', *Nucleic acids research*, 29(9), p. e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Pihán, P., Carreras-Sureda, A. and Hetz, C. (2017) 'BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise', *Cell Death Differ*, 24(9), pp. 1478–87. doi: 10.1038/cdd.2017.82.
- Pirkkala, L., Nykänen, P. and Sistonen, L. (2001) 'Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond.', *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(7), pp. 1118–1131. doi: 10.1096/fj00-0294rev.
- Pourhamidi, K. et al. (2014) 'HSP27 concentrations are lower in patients with Type 1 Diabetes and correlate with large nerve fiber dysfunction', *Diabetes Care*, 37(3), pp. 49–50. doi: 10.2337/dc13-1780.
- Préville, X. et al. (1999) 'Mammalian Small Stress Proteins Protect against Oxidative Stress through Their Ability to Increase Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity and by Maintaining Optimal Cellular Detoxifying Machinery', Experimental Cell Research, 247(1), pp. 61–78. doi: 10.1006/excr.1998.4347.
- Pullen, T. J. et al. (2012) 'Overexpression of Monocarboxylate Transporter-1 (Slc16a1) in Mouse Pancreatic b -Cells Leads to Relative Hyperinsulinism During Exercise', *Diabetes*, 61, pp. 1719–1725. doi: 10.2337/db11-1531.
- Purwana, I. *et al.* (2017) 'HSF1 acetylation decreases its transcriptional activity and enhances glucolipotoxicity-induced apoptosis in rat and human beta cells', *Diabetologia*. Diabetologia, 60(8), pp. 1432–1441. doi: 10.1007/s00125-017-4310-7.

- Raduan, R. A. (2018) 'Controle da hiperglicemia intra-hospitalar em pacientes críticos e não críticos', in *Diabetes na Prática Clínica*. e-BOOK 2.0. Sociedade Brasileira de Diabetes.
- Rawson, P. *et al.* (2007) 'Cross-presentation of caspase-cleaved apoptotic self antigens in HIV infection.', *Nat Med*, 13(12), pp. 1431–1439. doi: 10.1038/nm1679.
- Reis, A. F. and Velho, G. (2002) 'Bases Genéticas do Diabetes Mellitus Tipo 2', *Arq Bras Endocrinol Metab*, 46(4), pp. 426–432.
- Ren, J. et al. (2007) 'Pancreatic islet cell therapy for type I diabetes: understanding the islets for transplantation', *Journal of Translational Medicine 2007*, 15, pp. 1–15. doi: 10.1186/1479-5876-5-1.
- Riahi, Y. et al. (2016) 'Autophagy is a major regulator of beta cell insulin homeostasis', *Diabetologia*. Diabetologia, pp. 1480–1491. doi: 10.1007/s00125-016-3868-9.
- Ricordi, C. *et al.* (1988) 'Automated method for isolation of human pancreatic islets', *Diabetes*, 37(4), pp. 413–420. doi: 10.2337/diabetes.37.4.413.
- Ricordi, C. and Rastellini, C. (2000) 'Methods in pancreatic islet separation.', in *Ricordi C, ed. Methods in cell transplantation*. Austin, TX: RG Landes, pp. 433–438.
- Robinson, K. M. *et al.* (2006) 'Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes.', *PNAS*, 103(41), pp. 15038–15043. doi: 10.1073/pnas.0601945103.
- Robson-Doucette, C. A. *et al.* (2011) 'B-Cell Uncoupling Protein 2 Regulates Reactive Oxygen Species Production, Which Influences Both Insulin and Glucagon Secretion', *Diabetes*, 60(11), pp. 2710–2719. doi: 10.2337/db11-0132.
- Rojas, J. et al. (2018) 'Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy', Journal of Diabetes Research. doi: 10.1155/2018/9601801.
- Roos, W. P., Thomas, A. D. and Kaina, B. (2016) 'DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 16(1), pp. 20–33. doi: 10.1038/nrc.2015.2.
- Rorsman, P. et al. (2000) 'The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion.', News Physiol Sci., 15, pp. 72–77.
- Roy, M. et al. (2013) 'Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway', *British Journal of Pharmacology*, 15(1), pp. 49–63. doi: 10.1111/bph.12431.
- Rui, H., Kirken, R. A. and Farrar, W. L. (1994) 'Activation of receptor-

associated tyrosine kinase JAK2 by prolactin', *Journal of Biological Chemistry*, 269(7), pp. 5364–5368.

Ruiz, L. M. *et al.* (2016) 'Non-cytotoxic copper overload boosts mitochondrial energy metabolism to modulate cell proliferation and differentiation in the human erythroleukemic cell line K562', *Mitochondrion*. Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society, 29, pp. 18–30. doi: 10.1016/j.mito.2016.04.005.

Ryan, E. A. *et al.* (2005) 'Five-year follow-up after clinical islet transplantation', *Diabetes*, 54(7), pp. 2060–2069. doi: 10.2337/diabetes.54.7.2060.

Safayhi, H. *et al.* (1997) 'L-Type Calcium Channels in Insulin-Secreting Cells: Biochemical Characterization and Phosphorylation in RINm5F Cells', *Mol Endocrinol.*, 11(5), p. 619–29. doi: 10.1210/mend.11.5.9922.

Samali, A. et al. (2001)`Hsp27 protects mitochondria of stimuli.', thermotolerant cells against apoptotic Cell stress & chaperones, 6(1), 49-58. doi: 10.1379/1466pp. 1268(2001)006<0049:HPMOTC>2.0.CO;2.

Santana-Rodríguez, N. et al. (2012) 'Searching for novel molecular targets of chronic rejection in an orthotopic experimental lung transplantation model.', The Journal of heart lung transplantation: the official publication of the International Society Transplantation, Heart 31(2), pp. 213-21. doi: 10.1016/j.healun.2011.11.011.

dos Santos, A. F. *et al.* (2017) 'Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells', *BMC Cancer*. BMC Cancer, 17(1), p. 194. doi: 10.1186/s12885-017-3179-7.

Santos, C. D. and Terra, W. R. (1984) 'Plasma membrane-associated amylase and trypsin: intracellular distribution of digestive enzymes in the midgut of the cassava hornworm, Erinnyis ello', *Insect Biochemistry*, 14(5), pp. 587–594. doi: 10.1016/0020-1790(84)90015-5.

Satin, L. and Cook, D. (1985) 'Voltage-gated Ca2+ current in pancreatic B-cells', *Pflugers Arch.*, 404(4), pp. 385–7.

Schellenberg, B. *et al.* (2013) 'Bax Exists in a Dynamic Equilibrium between the Cytosol and Mitochondria to Control Apoptotic Priming', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 49(5), pp. 959–971. doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.022.

Schindler, C. and Darnell, J. J. (1995) 'Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway', *Annual Review of Biochemistry*, 64, pp. 621–651. doi:

- 10.1146/annurev.bi.64.070195.003201.
- Schuetz, C. *et al.* (2018) 'b Cell Replacement Therapy: The Next 10 Years', 102(2), pp. 215–229. doi: 10.1097/TP.000000000001937.
- Scott, C. R. et al. (1997) 'and Insulin-dependent Diabetes Mellitus at Diagnosis', *Pediatrics*, 100(1).
- Shapiro, A. M. *et al.* (2000) 'Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen.', *The New England journal of medicine*, 343(4), pp. 230–8. doi: 10.1056/NEJM200007273430401.
- Shinder, G. A. *et al.* (2001) 'Mutant Cu/Zn-Superoxide Dismutase Proteins Have Altered Solubility and Interact with Heat Shock/Stress Proteins in Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), pp. 12791–12796. doi: 10.1074/jbc.M010759200.
- Shuai, K. and Liu, B. (2003) 'Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system.', *Nature reviews. Immunology*, 3(11), pp. 900–911. doi: 10.1038/nri1226.
- Smoyer, W. E. et al. (2000) 'Ischemic acute renal failure induces differential expression of small heat shock proteins.', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 11(2), pp. 211–21. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10665928.
- Souza, K. L. A. *et al.* (2008) 'Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells', *Journal of Endocrinology*, 197(1), pp. 139–150. doi: 10.1677/JOE-07-0638.
- Stout, L., Svensson, A. and Sorenson, R. (1997) 'Prolactin regulation of islet-derived INS-1 cells: characteristics and immunocytochemical analysis of STAT5 translocation.', *Endocrinology*, 138(4), pp. 1592–1603. doi: 10.1210/endo.138.4.5089.
- Straub, S. G. and Sharp, G. W. G. (2002) 'Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion.', *Diabetes/metabolism research and reviews*, 18(6), pp. 451–63. doi: 10.1002/dmrr.329.
- Sugiyama, Y. et al. (2000) 'CELL BIOLOGY AND METABOLISM: Muscle Develops a Specific Form of Small Heat Shock Protein Complex Composed of Myogenic Differentiation Muscle Develops a Specific Form of Small Heat Shock Protein Complex Composed of MKBP / HSPB2 and HSPB3 during Myogenic D', 275(2), pp. 1095–1104.
- Sweet, I. R. et al. (2005) 'Glucose Stimulation of Cytochrome C Reduction and Oxygen Consumption as Assessment of Human Islet Quality', *Transplantation*, 80(8), pp. 1003–1011. doi:

- 10.1097/01.tp.0000178381.35014.37.
- Sweet, I. R. *et al.* (2008) 'Glucose-stimulated increment in oxygen consumption rate as a standardized test of human islet quality', *American Journal of Transplantation*, 8(1), pp. 183–192. doi: 10.1111/j.1600-6143.2007.02041.x.
- Tait, S. and Green, D. (2010) 'Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond', *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11(9), pp. 621–632. doi: 10.1038/nrm2952.
- Tenev, T. *et al.* (2007) 'The antiapoptotic activity of insect IAPs requires activation by an evolutionarily conserved mechanism', *Cell Death and Differentiation*, 14(6), pp. 1191–1201. doi: 10.1038/sj.cdd.4402118.
- Terra, L. F. *et al.* (2011) 'Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways', *Diabetologia*, 54(6), pp. 1388–1397. doi: 10.1007/s00125-011-2102-z.
- Terra, L. F. (2011) 'Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways', *Diabetologia*, 54(6), pp. 1388–1397. doi: 10.1007/s00125-011-2102-z.
- Terra, L. F. *et al.* (2013) 'Proteins differentially expressed in human beta-cells-enriched pancreatic islet cultures and human insulinomas', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 381(1–2), pp. 16–25. doi: 10.1016/j.mce.2013.07.004.
- Thériault, J. R. *et al.* (2004) 'Essential role of the NH2-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27', *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), pp. 23463–23471. doi: 10.1074/jbc.M402325200.
- Thomas, H. E. *et al.* (2009) 'Beta cell apoptosis in diabetes', *Apoptosis*, 14(12), pp. 1389–1404. doi: 10.1007/s10495-009-0339-5.
- Tiscornia, G., Singer, O. and Verma, I. M. (2006) 'Design and cloning of lentiviral vectors expressing small interfering RNAs.', *Nature protocols*, 1(1), pp. 234–240. doi: 10.1038/nprot.2006.36.
- Tiscornia, G., Singer, O. and Verma, I. M. (2006) 'Production and purification of lentiviral vectors', *Nat Protoc*, 1(1), pp. 241–245. doi: nprot.2006.37 [pii]\r10.1038/nprot.2006.37.
- Todd, J. A. (2010) 'Etiology of Type 1 Diabetes', *Immunity*, 32(4), pp. 457–467. doi: 10.1016/j.immuni.2010.04.001.
- Todt, F. et al. (2015) 'Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak', *The EMBO Journal*, 34(1), pp. 67–80. doi:

- 10.15252/embj.201488806.
- Trautmann, M. E. and Wollheim, C. B. (1987) 'Characterization of glucose transport in an insulin-secreting cell line', *Biochemical Journal*, 242(3), pp. 625–630.
- Trinklein, N. D. *et al.* (2004) 'Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation.', *Cell stress & chaperones*, 9(1), pp. 21–28. doi: 10.1379/481.1.
- Tschiedel, B. (2014) 'História do Diabetes', *Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia*, pp. 1–12. Available at: http://www.endocrino.org.br/o-que-e-diabetes/.
- Tuomi, T. et al. (1993) 'Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase Reveal Latent Autoimmune Mellitus in Adults With a Non-Insulin-Dependent Onset of Disease', 42(February), pp. 359–362.
- Twig, G. *et al.* (2008) 'Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy', *The EMBO Journal*, 27(2), pp. 433–446. doi: 10.1038/sj.emboj.7601963.
- Twig, G., Hyde, B. and Shirihai, O. S. (2008) 'Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view.', *Biochimica et biophysica acta*, 1777(9), pp. 1092–7. doi: 10.1016/j.bbabio.2008.05.001.
- Vega-Monroy, M. L. De and Fernandez-Mejia, C. (2011) 'Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes', *Type 1 Diabetes Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy InTech*, pp. 93–126. doi: 10.5772/22089.
- Veld, P. I. and Smeets, S. (2015) 'Microscopic Anatomy of the Human Islet of Langerhans', in *Islets of Langerhans*, pp. 19–33. doi: 10.1007/978-94-007-6686-0.
- Verna, C. et al. (2005) 'Efeito da hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida na glândula lacrimal: estudo experimental', Rev Bras Ginecol Obstet., 27(9), pp. 524–528.
- Verspohl, E. J., Tollkühn, B. and Kloss, H. (1995) 'Role of tyrosine kinase in insulin release in an insulin secreting cell line (INS-1).', *Cellular signalling*, 7(5), pp. 505–12. doi: 0.1016/0898-6568(95)00020-P.
- Vitale, I. *et al.* (2017) 'DNA Damage in Stem Cells', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 66(3), pp. 306–319. doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.006.
- Voglová, B. et al. (2017) 'Benefits of Islet Transplantation as an Alternative to Pancreas Transplantation: Retrospective Study of More Than 10 Ten Years of Experience in a Single Center', Rev Diabet Stud,

- 14(1), pp. 10-21. doi: 10.1900/RDS.2016.14.10.
- Vos, A. De *et al.* (1995) 'Human and Rat Beta Cells Differ in Glucose Transporter but Not in Glucokinase Gene Expression', *J Clin Invest.*, 96(November), pp. 2489–2495. doi: 10.1172/JCI118308.
- Voss, O. H. *et al.* (2007) 'Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation.', *The Journal of biological chemistry*, 282(34), pp. 25088–99. doi: 10.1074/jbc.M701740200.
- Wailemann, R. A. *et al.* (2018) 'Heat shock protein B1 is required for the prolactin-induced cytoprotective effects on pancreatic islets', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier, (May), pp. 0–1. doi: 10.1016/j.mce.2018.05.013.
- Wajant, H. (2002) 'The Fas signaling pathway: More than a paradigm', *Science*, 296(5573), pp. 1635–1636. doi: 10.1126/science.1071553.
- Walsh, T., Eggleston, J. and Cameron, J. (1982) 'Portal hypertension, hepatic infarction, and liver failure complicating pancreatic islet autotransplantation', *Surgery*, 91(4), pp. 485–7.
- Wang, X. et al. (2011) 'Bcl-2 proteins regulate ER membrane permeability to luminal proteins during ER stress-induced apoptosis', Cell Death and Differentiation, 18(1), pp. 38–47. doi: 10.1038/cdd.2010.68.
- Wang, Z. and Thurmond, D. C. (2009) 'Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins.', *Journal of cell science*, 122(Pt 7), pp. 893–903. doi: 10.1242/jcs.034355.
- Weinhaus, A. J. *et al.* (2000) 'Dexamethasone counteracts the effect of prolactin on islet function: Implications for islet regulation in late pregnancy', *Endocrinology*, 141(4), pp. 1384–1393. doi: 10.1210/en.141.4.1384.
- Weinhaus, A. J. *et al.* (2007) 'Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: A mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy', *Journal of Endocrinology*, 193(3), pp. 367–381. doi: 10.1677/JOE-07-0043.
- Weinhaus, A. J., Stout, L. E. and Sorenson, R. L. (1996) 'Islets in Vitro: Mechanisms', *Endocrinology*, 137, pp. 1640–1649.
- Weiss, M., Steiner, D. F. and Philipson, L. H. (2014) 'Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships', *Endotext*.
- Wenzlau, J. M. et al. (2007) 'The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes', *Pnas*,

- 104(43), pp. 17040-5. doi: 10.1073/pnas.0705894104.
- WHO/IDF (2006) 'Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation.', e WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland, 1, pp. 1–46.
- WHO DIAMOND PROJECT GROUP (1990) 'WHO Multinational Project for Childhood Diabetes', *Diabetes Care*, 13(10), pp. 1062–8.
- Wikstrom, J. D. *et al.* (2012) 'A novel high-throughput assay for islet respiration reveals uncoupling of rodent and human islets', *PLoS ONE*, 7(5), pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0033023.
- Will, Y. et al. (2007) 'Analysis of mitochondrial function using phosphorescent oxygen-sensitive probes', *Nature Protocols*, 1(6), pp. 2563–2572. doi: 10.1038/nprot.2006.351.
- Wolf, G. *et al.* (2010) 'Peroxiredoxin III protects pancreatic β cells from apoptosis', *Journal of Endocrinology*, 207(2), pp. 163–175. doi: 10.1677/JOE-09-0455.
- Yamaguchi, S. et al. (2008) 'ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic β Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress', *Cell Metabolism*, 7(3), pp. 269–276. doi: 10.1016/j.cmet.2008.01.008.
- Yamamoto, T. *et al.* (2010) 'Prolactin supplementation to culture medium improves beta-cell survival.', *Transplantation*, 89(11), pp. 1328–35. doi: 10.1097/TP.0b013e3181d98af1.
- Yan, L. *et al.* (2005) 'Mouse HSF1 disruption perturbs redox state and increases mitochondrial oxidative stress in kidney', *Antioxidants & redox signaling*, 7(3–4), pp. 465–471. doi: 10.1089/ars.2005.7.465.
- Yatim, N., Cullen, S. and Albert, M. L. (2017) 'Dying cells actively regulate adaptive immune responses', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 17(4), pp. 262–275. doi: 10.1038/nri.2017.9.
- Yerbury, J. J. et al. (2013) 'The small heat shock proteins abcrystallin and Hsp27 suppress SOD1 aggregation in vitro', *Cell Stress and Chaperones*, 18(2), pp. 251–257. doi: 10.1007/s12192-012-0371-1.
- Yokota, S. I. *et al.* (2003) 'Suppression of Thermotolerance in Mumps Virus-infected Cells is Caused by Lack of HSP27 Induction Contributed by STAT-1', *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), pp. 41654–41660. doi: 10.1074/jbc.M305701200.
- Zitka, O. *et al.* (2012) 'Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients', *Oncology Letters*, 4(6), pp. 1247–1253. doi: 10.3892/ol.2012.931.

Zufferey, R. *et al.* (1998) 'Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery.', *Journal of virology*, 72(12), pp. 9873–80.

WHO, disponível em http://www.who.int/diabetes/en/; acesso em 03 de Maio de 2018.

## ANEXO 1 – TRABALHOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

#### 1. Artigo Publicado em 2017.

dos Santos et al. BMC Cancer (2017) 17:194 DOI 10.1186/s12885-017-3179-7

**BMC Cancer** 

#### RESEARCH ARTICLE

**Open Access** 

# Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells



Ancély F. dos Santos, Letícia F. Terra, Rosangela A. M. Wailemann, Talita C. Oliveira, Vinícius de Morais Gomes, Marcela Franco Mineiro, Flávia Carla Meotti, Alexandre Bruni-Cardoso, Maurício S. Baptista\* and Leticia Labriola\*

#### Abstract

**Background:** Breast cancer is the main cause of mortality among women. The disease presents high recurrence mainly due to incomplete efficacy of primary treatment in killing all cancer cells. Photodynamic therapy (PDT), an approach that causes tissue destruction by visible light in the presence of a photosensitizer (Ps) and oxygen, appears as a promising alternative therapy that could be used adjunct to chemotherapy and surgery for curing cancer. However, the efficacy of PDT to treat breast tumours as well as the molecular mechanisms that lead to cell death remain unclear.

**Methods:** In this study, we assessed the cell-killing potential of PDT using methylene blue (MB-PDT) in three breast epithelial cell lines that represent non-malignant conditions and different molecular subtypes of breast tumours. Cells were incubated in the absence or presence of MB and irradiated or not at 640 nm with 4.5 J/cm². We used a combination of imaging and biochemistry approaches to assess the involvement of classical autophagic and apoptotic pathways in mediating the cell-deletion induced by MB-PDT. The role of these pathways was investigated using specific inhibitors, activators and gene silencing.

Results: We observed that MB-PDT differentially induces massive cell death of tumour cells. Non-malignant cells were significantly more resistant to the therapy compared to malignant cells. Morphological and biochemical analysis of dying cells pointed to alternative mechanisms rather than classical apoptosis. MB-PDT-induced autophagy modulated cell viability depending on the cell model used. However, impairment of one of these pathways did not prevent the fatal destination of MB-PDT treated cells. Additionally, when using a physiological 3D culture model that recapitulates relevant features of normal and tumorous breast tissue morphology, we found that MB-PDT differential action in killing tumour cells was even higher than what was detected in 2D cultures.

Conclusions: Finally, our observations underscore the potential of MB-PDT as a highly efficient strategy which could use as a powerful adjunct therapy to surgery of breast tumours, and possibly other types of tumours, to safely increase the eradication rate of microscopic residual disease and thus minimizing the chance of both local and metastatic recurrence.

Keywords: Breast cancer, Photodynamic therapy, Methylene blue, Selectivity

2. Artigo Publicado em 2018.



Contents lists available at ScienceDirect

#### Molecular and Cellular Endocrinology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce



# Heat shock protein B1 is required for the prolactin-induced cytoprotective effects on pancreatic islets

Rosangela AM. Wailemann<sup>1</sup>, Letícia F. Terra<sup>1</sup>, Talita C. Oliveira, Ancély F. Dos Santos, Vinícius M. Gomes, Leticia Labriola<sup>\*</sup>

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Faulo, Brasil

#### ARTICLEINFO

Expected:
Apoptosis
Diabetes
Human Idets
Idet transplantation
Proluction
Survival
Monor interes

#### ABSTRACT

The success of idet transplantation has improved lately. Unfortunately, it is still compromised by cell loss. We have shown that prolactin (PRL) inhibits beta-cell apoptosis and up-regulates the antiapoptotic Heat Shock Protein B1 (HSPB1) in human idets. Since its function in pancreatic islets has not been studied, we explored the role of HSPB1 in PRL-induced beta-cell survival. The significant PRL-induced cytoprotection in control cells was abrogated in HSPB1 silenced cells, overexpression of HSPB1 recovered survival. PRL-mediated inhibition of cytokine-induced caspase activities and cytokine-induced decrease of BCL-2/BAX ratio was significantly reverted in knocked-down cells. Kinetics of HSPB1 and HSP1 expression were studied in primary cultures of murine and human pancreatic idets. These findings are highly relevant for the improvement of clinical idlet transplantation success rate since our results demonstrated a key role for HSPB1 pointing it as a promising target for beta-cell cytopeotection through the up-regulation of an endogenous protective pathway.

#### 1. Introduction

Despite all the improvements on insulin analogues (Arkinson et al., 2014) and in the technology providing continuous real-time insulin delivery (Pickup and Phil, 2012), beta-cell replacement therapies continue to provide the most physiologic glucose responsiveness with tight control. Even if the success of islet transplantation has improved significantly, it is still severely compromised by a limited source of donor tissue and cell loss during the procedure (Barton et al., 2012; Kaminitz et al., 2007; Ryan et al., 2005).

Previous results have demonstrated beneficial effects of prolactin (PRL) treatment on cell-death inhibition as well as improved engratment and function of the transplanted islets (Johansson et al., 2009; Labriola et al., 2007b; Terra et al., 2011; Yamamoto et al., 2010). However, the mechanisms involved in PRL action have not been completely unveiled. We had identified that HSPB1 protein levels were increased by PRL in human pancreatic islets (Labriola et al., 2007a). HSPB1, a member of small heat shock proteins family, is up-regulated in response to cellular stressors such as cytokines and promotes

cytoprotection (Akbar et al., 2003; Bongalon et al., 2004; Mehlen et al., 1997; Merendino et al., 2002; Sateh and Kim, 1995; Smoyer et al., 2000). Regulation of Heat Shock Proteins (HSPs) is mediated by heat shock transcription factor 1(HSF1) which, upon activation, binds to heat shock element (HSE) located in the promoter region of Hsp genes and mediates their rapid transcription (Pirkkaln et al., 2001; Trinklein et al., 2001).

Little is known about the possible cytoprotective effects of HSPB1 on the context of type 1 Diabetes Mellitus (DM1). Islets from transgenic mice overexpressing human HSPB1 are more resistant to beta-cell apoptosis induced by SZ in vivo (Dai et al., 2009). Moreover, patients with DM1 present lower plasma concentration of HSPB1 which correlates with large nerve fibre dysfunction (Pourhamidi et al., 2014). Together, these data indicate relevance for HSPB1 in beta-cell and islet protection.

In this study, we investigated whether HSPB1 could mediate PRIinduced beta-cells cytoprotection by minimising cell loss during pretransplant and consequently rendering human islet transplantation more successful.

Abbreviation: AG-90, Typhostin AG-90; BAX, BCL2-associated X protein; BCL2, B cell CLL/tymphoma 2; BCLa<sub>c</sub>, BCL extra large; DM1, Type 1 diabetes realizar; PCS, Fetal cell security, BCS, Box shock demon; BSF1, Box shock posein; BSF20, BS

derived activator of caspases; STATI, Signal transfusor and activator of transcription 1; SZ, Stooptostocin; TNFs, Tumor necronic factor u

"Corresponding author. Bothemistry Department, Chemistry Institute, University of São Paulo, Av. Prof. Linea Prentes 748, Bloco 9 sup, Sala 976, São Paulo 05508-000, SP. Brasil.

E-mail address: Inbrishaff in usp for (L. Labelola).

#### 3. Manuscrito Submetido em Agosto de 2018.

**Manuscript Details** 

Manuscript number REDOX\_2018\_555 T

Title Heat Shock Protein B1 mediates prolactin-

induced beta-cell

cytoprotection against oxidative stress.

Article type Research Paper

**Abstract** 

Maintaining islet cell viability in vitro, although challenging, appears to be a strategy for improving the outcome of pancreatic islet transplantation. We have shown that prolactin (PRL) leads to beta-cell cytoprotection against apoptosis, an effect mediated by heat shock protein B1 (HSPB1). Since the role of HSPB1 in beta-cells is still unclear, we explored the molecular mechanisms by which HSPB1 mediates PRL-induced beta-cell cytoprotection. Lysates from PRL and/or cytokine-treated MIN6 beta-cells were subjected to HSPB1 immunoprecipitation followed by identification through mass spectrometry. PRL-treated cells presented an enrichment of several proteins coprecipitating with HSPB1. Of note were oxidative stress resistance-, protein degradation- and carbohydrate metabolism-related proteins. Wild type, HSPB1 silenced or overexpressing MIN6 cells were exposed to menadione and hydrogen peroxide and analysed for several oxidative stress parameters. HSPB1 knockdown rendered cells more sensitive to oxidative stress and led to a reduced antioxidant capacity, while prolactin induced an HSPB1-mediated cytoprotection against oxidative stress. HSPB1 overexpression, however, led to opposite effects. PRL treatment, HSPB1 silencing or overexpression did not change the expression of antioxidant enzymes, but HSPB1 levels are related to a modulation of GSH/GSSG ratio and G6PD activity. We have shown that HSPB1 is important for prosurvival effects against oxidative stress-induced beta-cell death. These results are in accordance with PRL-induced enrichment of HSPB1-interacting proteins related to oxidative stress protection. Finally, our results outline the importance of further studies investigating the importance of HSPB1 for beta-cell viability, since this could lead to the mitigation of beta-cell death through the up-regulation of an endogenous protective pathway.

Keywords beta-cell; diabetes; HSPB1; prolactin; oxidative stress

Taxonomy Immunoprecipitation, Mass Spectrometry, cDNA

Cloning

Corresponding Author Leticia Labriola

Corresponding Author's University of São Paulo

Institution

Order of Authors Leticia Terra, Rosangela Wailemann, Ancély Dos Santos, Vinícius Gomes, Railmara Silva, Anna Laporte, Flavia Meotti, Walter Terra, Giuseppe Palmisano, Stephan Lortz, Leticia Labriola

Suggested reviewers Thomas Linn, Andrés Trostchansky, André-Patrick Arrigo, Markus Tiedge, Fernando José Nunes Antunes

# **SÚMULA CURRICULAR**

#### Rosangela Aparecida Wailemann Mansano

Endereço residencial: Av. Sousa Bandeira, 363

03559-000 - São Paulo - Brasil

Endereço Profissional: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,

Universidade de São Paulo

Av. Prof. Lineu Prestes, 748 sala 976

05508-000 - São Paulo - SP - Brasil

+ 55 11 3091-9049 (comercial)

+ 55 11 97106-2476 (celular)

E-mail: <a href="mailto:rosangelawailemann@gmail.com">rosangelawailemann@gmail.com</a>

Local/data de São Paulo - Brasil

Nascimento: 16/08/1963

Nacionalidade: Brasileira

RG: 15.239.231-2

CPF: 198.637.428-99

Estado civil: Divorciada

Idiomas: Português (materna)

Inglês (avançado)

Espanhol (intemediário)

#### Formação acadêmica/titulação

2014 - 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.

2011-2013 Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular.

Departamento de Bioquímica (conceito CAPES 7),

Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP),

São Paulo, Brasil.

2010 -2013 Graduação em Licenciatura em Ciências da Natureza.

Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH),

Universidade de São Paulo (USP),

São Paulo, Brasil.

2006 – 2009 Graduação em Bacharelado em Ciências Moleculares.

Pró-Reitoria de Graduação.

Universidade de São Paulo (USP),

São Paulo, Brasil.

2006 – 2006 Graduação em Licenciatura em Ciências da Natureza.

Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH),

Universidade de São Paulo,

São Paulo, Brasil.

1977 – 1979 Ensino Médio (2º Grau)

Escola Estadual Infante Dom Henrique,

São Paulo, Brasil.

1969 – 1976 Ensino Fundamental (1º Grau)

Escola Estadual de 1º e 2º Graus Profº Moacir Campos,

São Paulo, Brasil.

## Projetos de pesquisa e bolsas

2014 – Doutorado

Título da Tese: Mecanismos Moleculares Mediadores de Citotoproteção de Células Beta Pancreáticas Induzidos por Prolactina.

Laboratório de Mecanismos Moleculares de Citoproteção (LMMC), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Labriola

Bolsista FAPESP.

2011 - 2013 Mestrado

Título da Dissertação: Estudo do Papel da Proteína HSP27/25 na Ação da Prolactina Humana Recombinante em Células Beta Pancreáticas. Laboratório de Mecanismos Moleculares de Citoproteção (LMMC), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

Unidade de Ilhotas Pancreáticas (UIPH), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Labriola

Bolsista CNPq.

2008 - 2010

Iniciação Científica

Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM),

Unidade de Ilhotas Pancreáticas (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. Letícia Labriola

Bolsista FAPESP.

# Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- Terra, L., Wailemann, RAM., dos Santos, AF., Gomes, VM., Silva, R., Laporte, A., Meotti, F., Terra, W., Palmisano, G., Lortz, S., Labriola, L. 'Heat Shock Protein B1 mediates prolactin-induced betacell, cytoprotection against oxidative stress'. 2018 (Submmited)
- 2. **Wailemann, R. A**, Terra, L.F. *et al.* (2018) 'Heat shock protein B1 is required for the prolactin-induced cytoprotective effects on pancreatic islets', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier, (May), pp. 0–1. doi: 10.1016/j.mce.2018.05.013.
- 3. dos Santos, A. F., Terra, L. F., Wailemann, R A. M., Oliveira, T.C.,

- Gomes, V. M., Mineiro, M. F., Meotti, F. C., Bruni-Cardoso, A., Baptista, M. S., Labriola, L. (2017) 'Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells', *BMC Cancer*. BMC Cancer, 17(1), p. 194. doi: 10.1186/s12885-017-3179-7.
- Terra, L. F, Teixeira, P. C, Wailemann, R A M, Zelanis, A., ,Palmisano, G. ,Cunha-Neto, E., Kalil, J., Larsen, M R. , Labriola, L.,Sogayar, M .(2013) 'Proteins differentially expressed in human beta-cells-enriched pancreatic islet cultures and human insulinomas.', Molecular and cellular endocrinology, 381(1-2), pp. 16-25. doi: 10.1016/j.mce.2013.07.004.
- 5. Gomes LR, Terra LF, **Wailemann RA**, Labriola L, Sogayar MC. 'TGF-beta1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells'. BMC Cancer. 2012 Jan 19;12(1):26.
- 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.

#### Dissertação

 Mansano, R. A. W. (2013). `Estudo do papel da proteína HSP27/25 na ação da prolactina humana recombinante em células beta pancreáticas.' Universidade de São Paulo. doi: DOI10.11606/D.46.2013.tde-22102013-112950.

#### Resumos publicados em Anais de congressos

dos Santos, AF; Terra, LF; Wailemann, RAM; Oliveira, TC; Gomes, VM; Pimentel, AC; Bruni-Cardoso, A; Terra, WR; Baptista, MS; Labriola, L. Regulated cell death pathways are responsible for the effects of Methylene Blue Photodynamic Therapy in Human Breast Cancer Cells. In: Cell death, inflammation and cancer EMBO workshop, 2017, Obergurgl. Abstracts of the Cell death, inflammation and cancer EMBO workshop, 2017.

- Terra, LF; Wailemann, RAM; Gomes, VM; dos Santos, AF; Oliveira, TC; Lortz, S; Labriola, L. HSPB1 mediates beta-cell cytoprotection against oxidative stress and recovery of mitochondrial function. In: 16th International Congress of IPITA International Pancreas and Islet Transplant Association, 2017, Oxford. The Review of Diabetic Studies, 2017. v. 14. p. 122-123.
- Wailemann, RAM; Gomes, VM; Terra, LF; Oliveira, TC; dos Santos, AF; Labriola, L. HSPB1 displays a pivotal role in prolactin inhibition of ER-stress-induced beta-cell death. In: 16th International Congress of IPITA International Pancreas and Islet Transplant Association, 2017, Oxford. The Review of Diabetic Studies, 2017. v. 40. p. 119.
- 4. dos Santos, AF; Terra, LF; Almeida, DRQ; Wailemann, RAM; Oliveira, TC; Gomes, VM; Pimentel, AC; Bruni-Cardoso, A; Terra, WR; Baptista, MS; Labriola, L. What is behind the cytotoxicity of MB-PDT?. In: 16th World Congress of IPA International Photodynamic Association, 2017, Coimbra. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2017.
- 5. Almeida, DRQ; dos Santos, AF; Wailemann, RAM; Terra, LF; Oliveira, TC; Gomes, VM; Baptista, MS; Labriola, L. Photodynamic Therapy Induces Significant Cell Death of Human Pancreatic Cancer Cells. In: XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. Resumos da XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017.
- 6. Gomes, VM; Wailemann, RAM; Terra, LF; Oliveira, TC; dos Santos, AF; Labriola, L. HSPB1 Protects Beta-cells Against Endoplasmic reticulum (ER) stress -induced apoptosis and Modulates the Unfolded Protein Response. In: XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. Resumos da XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017.
- 7. Terra, LF; **Wailemann, RAM**; dos Santos, AF; Gomes, VM; Palmisano, G; Lortz, S; Labriola, L. Oxidative stress-induced cell death is mediated by HSPB1 in beta-cells. In: 25th Annual Meeting of

- the European Cell Death Organization, 2017, Leuven. Program of the 25th Annual Meeting of the European Cell Death Organization, 2017.
- 8. dos Santos, AF; Terra, LF; Almeida, DRQ; Wailemann, RAM; Oliveira, TC; Gomes, VM; Pimentel, AC; Bruni-Cardoso, A; Terra, WR; Baptista, MS; Labriola, L. Photodynamic therapy using methylene blue: one shot and many ways to die. In: 25th Annual Meeting of the European Cell Death Organization, 2017, Leuven. Program of the 25th Annual Meeting of the European Cell Death Organization, 2017.
- 9. Wailemann, RAM; Terra, LF; Gomes, VM; Forni, MF; Oliveira, TC; dos Santos, AF; Palmisano, G; Labriola, L. HSPB1 mediates PRL-induced cytoprotective and metabolic beneficial effects on beta-cells. In: XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2016, São Paulo. Resumos do XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2016.
- 10.Terra, LF; **Wailemann, RAM**; Gomes, VM; Forni, MF; Oliveira, TC; dos Santos, AF; Palmisano, G; Labriola, L. HSPB1 mediates PRL action on cell death inhibition, restoration of mitochondrial function and modulation of ER stress on beta cells. In: 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), 2016, Munique. Diabetologia. Berlim: Springer, 2016. v. 59. p. S209.
- 11.Oliveira, TC; Forni, MF; dos Santos, AF; Wailemann, RAM; Terra, LF; Gimeno, ML; Fortuna, V; Perone, MJ; Sogayar, MC; Labriola, L. Mesenchymal Stem Cells Cultured As Spheroids (Msc-Sph) As Tools For Pancreatic Islet Transplantation Outcome Optimization. In: 120 Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo, 2016, São Paulo. Resumos do 120 Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo, 2016.
- 12.Terra, LF; dos Santos, AF; **Wailemann, RAM**; Oliveira, TC; Sogayar, MC; Labriola, L. Prolactin leads to a decrease in autophagy levels in cytokines and ER stressors-induced beta-cells. In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology e XLIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2015, Foz do Iguaçu. Abstracts of the 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular

- Biology and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015.
- 13.dos Santos, AF; Terra, LF; Wailemann, RAM; Gomes, VM; Oliveira, TC; Baptista, MS; Labriola, L. Methylene blue photodynamic therapy: an effective choice to fight against human breast cancer cells. In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology e XLIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2015, Foz do Iguaçu. Abstracts of the 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015.
- 14.dos Santos, AF; Terra, LF; **Wailemann, RAM**; Oliveira, TC; Baptista, MS; Labriola, L. Unveiling the molecular mechanisms involved in the cytotoxicity induced by photodynamic therapy in human breast cancer cells. In: 15th International Photodynamic Association World Congress, 2015, Rio de Janeiro. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. Amsterdam: Elsevier, 2015. v. 12. p. 349.
- 15.dos Santos, AF; Terra, LF; Wailemann, RAM; Oliveira, TC; Gomes, VM; Baptista, MS; Labriola, L. Methylene Blue Photodynamic Therapy in Breast Cancer: Unveiling the Molecular Mechanisms in Cell Death Induction. In: 23rd Conference of the European Cell Death Organization Death pathways and beyond, 2015, Genebra. Abstracts of the 23rd Conference of the European Cell Death Organization Death pathways and beyond, 2015.
- 16.Terra, LF; dos Santos, AF; Wailemann, RAM; Oliveira, TC; Gomes, VM; Sogayar, MC; Labriola, L. PRL protection of beta-cell general damage restores autophagy markers.. In: IPITA-IXA-CTS 2015 Joint Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association, the International Xenotransplantation Association, and the Cell Transplant Society, 2015, Melbourne. Transplantation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2015. v. 99. p. S258.
- 17.Oliveira, TC; Forni, MF; dos Santos, AF; **Wailemann, RAM**; Terra, LF; Gimeno, ML; Gomes, VM; Fortuna, V; Perone, MJ; Sogayar, MC; Labriola, L. Mesenchymal stem cells cultured as spheroids (msc-sph): a tool for improving pancreatic islet transplantation outcome. In:

- IPITA-IXA-CTS 2015 Joint Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association, the International Xenotransplantation Association, and the Cell Transplant Society, 2015, Melbourne. Transplantation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2015. v. 99. p. S81.
- 18. Wailemann, RAM; Terra, LF; Gomes, VM; Forni, MF; Oliveira, TC; dos Santos, AF; Nunes, LS; Palmisano, G; Labriola, L. PRL-induced cytoprotective and metabolic beneficial effects are mediated by HSPB1 on beta-cells. In: IPITA-IXA-CTS 2015 Joint Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association, the International Xenotransplantation Association, and the Cell Transplant Society, 2015, Melbourne. Transplantation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2015. v. 99. p. S259.
- 19.Terra, LF; dos Santos, AF; Bordino, AP; Oliveira, TC; Wailemann, RAM; Sogayar, MC; Labriola, L. Prolactin Decreases Authopagy Markers Levels Induced by Cytokines and ER Stressors in Beta-Cells. In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. Programa da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.
- 20.Terra, LF; Garay-Malpartida, MH; Wailemann, RAM; Teixeira, PC; Bordino, AP; dos Santos, AF; Oliveira, TC; Zelanis, A; Cunha-Neto, E; Kalil, J; Larsen, MR; Palmisano, G; Sogayar, MC; Labriola, L. Molecular mechanisms involved in cytoprotection, autophagy and malignant transformation of human beta-cells. In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. Programa da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.
- 21.dos Santos, AF; Terra, LF; Wailemann, RAM; Oliveira, TC; Stabelini, TC; Baptista, MS; Labriola, L. Photodynamic Therapy in Human Breast Cancer Cells. In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. Programa da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.

- 22. Wailemann, RAM; Terra, LF; Oliveira, TC; dos Santos, AF; Sogayar, MC; Labriola, L. Prolactin-induced Pro-survival Effects on Pancreatic Beta-Cells are Mediated by HSP25/27. In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. Programa da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.
- 23.Oliveira, TC; Forni, MF; dos Santos, AF; **Wailemann, RAM**; Terra, LF; Gimeno, ML; Fortuna, V; Perone, MJ; Sogayar, MC; Labriola, L. Mesenchymal Stem Cells Cultured as Spheroids (MSC-Sph) As a Supportive Strategy for Pancreatic Islet Transplantation. In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. Programa da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.
- 24. Wailemann, RAM; Terra, LF; Oliveira, TC; dos Santos, AF; Sogayar, MC; Labriola, L. Antiapopototic HSPB1 mediates prolactin-induced cytoprotective effects on beta cells. In: 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), 2014, Viena. Diabetologia. Berlim: Springer, 2014. v. 57. p. S193-S194.
- 25.Terra, LF; dos Santos, AF; Oliveira, TC; **Wailemann, RAM**; Sogayar, MC; Labriola, L. Autophagy in prolactin-treated betacells. In: European Cell Death Organization (ECDO) 2014 22nd Euroconference on Cell Death and Rejuvenation, 2014, Hersonissos, Crete. Programme & Book of Abstracts of ECDO 2014, 2014.
- 26.Terra, LF; dos Santos, AF; Wailemann, RAM; Oliveira, TC; Sogayar, MC; Labriola, L. Cytokines and ER Stressors-Induced Autophagy Is Reverted By Prolactin Treatment In Insulinoma Cells. In: Keystone Symposia meeting on Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System, 2014, Guarujá. Programme of the Keystone Symposia meeting on Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System, 2014.
- 27. Wailemann, RAM; Terra, LF; Oliveira, TC; dos Santos, AF; Labriola, L. Antiapopototic HSPB1 mediates prolactin-induced pro-survival effects on pancreatic beta-cells. In: European Cell Death Organization (ECDO) 2014 22nd Euroconference on Cell Death and

- Rejuvenation, 2014, Hersonissos, Crete. Programme & Book of Abstracts of ECDO 2014, 2014.
- 28.Oliveira, TC; Forni, MF; dos Santos, AF; **Wailemann, RAM**; Terra, LF; Gimeno, ML; Fortuna, V; Perone, MJ; Sogayar, MC; Labriola, L. Mesenchymal Stem Cells Cultured as Spheroids (MSC-Sph) As a Supportive Strategy for Pancreatic Islet Transplantation. In: Keystone Symposia meeting on Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System, 2014, Guarujá. Programme of the Keystone Symposia meeting on Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System, 2014.
- 29. Wailemann, RAM; Terra, LF; Oliveira, TC; dos Santos, AF; Labriola, L. HSPB1 Mediates Prolactin-induced Pro-survival Effects on Pancreatic beta-cells. In: Keystone Symposia meeting on Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System, 2014. Programme of the Keystone Symposia meeting on Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System, 2014.
- 30.dos Santos, AF; Terra, LF; **Wailemann, RAM**; Oliveira, TC; Stabelini, TC; Baptista, MS; Labriola, L. Photodynamic Therapy: a Promising Alternative to Induce Massive Cell Death in Human Breast Cancer Cells. In: European Cell Death Organization (ECDO) 2014 22nd Euroconference on Cell Death and Rejuvenation, 2014, Hersonissos, Crete. Programme & Book of Abstracts of ECDO 2014, 2014.
- 31.dos Santos, AF; Terra, LF; **Wailemann, RAM**; Oliveira, TC; Stabelini, TC; Baptista, MS; Labriola, L. Photodynamic Therapy-Induced Massive Cell Death as an Alternative Treatment for Human Breast Cancer Cells. In: Keystone Symposia meeting on Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System, 2014, Guarujá. Programme of the Keystone Symposia meeting on Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System, 2014.
- 32.Terra, LF; Teixeira, PC; **Wailemann, RAM**; Zelanis, A; Palmisano, G; Cunha-Neto, E; Kalil, J; Larsen, MR; Labriola, L; Sogayar, MC. Molecular Mechanisms Involved in Cytoprotection and Malignant Transformation of Human Beta-Cells. In: XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular, 2013, Foz do

- Iguaçu. Programa da XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013.
- 33.dos Santos, AF; Terra, LF; Wailemann, RAM; Oliveira, TC; Stabelini, TC; Baptista, MS; Labriola, L. Evaluation of the Cytotoxic Effects of Photodynamic Therapy in Two and Three Dimensions Cultures of Human Breast Cancer Cells. In: XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular, 2013, Foz do Iguaçu. Programa da XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013.
- 34.Oliveira, TC; Forni, MF; Barcala Tabarrozzi, AE; dos Santos, AF; Wailemann, RAM; Terra, LF; Perone, MJ; Sogayar, MC; Labriola, L. Multipotent Mesenchymal Stem Cells as Tools for Optimization of Human Pancreatic Islet Transplantation. In: XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular, 2013, Foz do Iguaçu. Programa da XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013.
- 35.Castillo, LF; Tascón, R; Huvelle, MAL; dos Santos, AF; Terra, LF; **Wailemann, RAM**; Oliveira, TC; Sogayar, MC; Labriola, L; Joffé, EBK; Peters, MG. Development of a human model to study the role of Glypican-3 (GPC3) on tumor progression of the mammary gland. In: 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), 2013, Washington. Cancer Research, 2013. v. 73. p. 508.
- 36. **Wailemann, RAM**; Terra, LF; Oliveira, TC; dos Santos, AF; Sogayar, MC; Labriola, L. HSP25/27 Plays a Key Function in Prolactin-Induced Cytoprotective Effects on Beta-Cells. In: 14th World Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA), 2013, Monterey. Transplantation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. v. 96. p. S101.
- 37.Terra, LF; **Wailemann, RAM**; Sogayar, MC; Labriola, L. Antiapoptotic HSP27 and its transcription factor HSTF1 are up-regulated by Prolactin in Human Pancreatic Islets. In: 2nd joint AIDPIT and EPITA winter symposium abstracts, 2012, Innsbruck. Abstracts of the 2nd joint AIDPIT and EPITA winter symposium, 2012.

- 38. Wailemann, RAM; Terra, LF; Sogayar, MC; Labriola, L. Antiapoptotic 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. 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012.
- 39.Terra, LF; Teixeira, PC; **Wailemann, RAM**; 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 Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), 2012, Berlin. Diabetologia. Berlim: Springer, 2012. v. 55. p. S172-S173.
- 40.Wailemann, RAM; Terra, LF; Oliveira, TC; Santos, AF; Sogayar, MC; Labriola, L. Role of HSP25/27 in PRL-induced cytoprotective effects on beta cells. In: EASD Islet Study Group Symposium 2012, Rostock, Germany. EASD Islet Study Group Symposium Abstract, 2012.
- 41. **Wailemann, RAM**; Terra, LF; Sogayar, MC; Labriola, L. Anti-Apoptotic HSP27 and Its Transcription Factor HSTF1 are upregulated by Prolactin in Human Pancreatic Islets. In: 10<sup>th</sup> International Congrewss on Cell Biology and 16<sup>th</sup> Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro, Brazil.
- 42.TERRA L, F.; **WAILEMANN, R. A. M.**; SOGAYAR, M. C.; 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 & 31st AIDPIT workshop, Igls, Austria. January 2012.
- 43.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.

- 44.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: EASD Islet Study Group Symposium, 2011, Rio Grande do Norte, Brazil. EASD Islet Study Group Symposium Abstracts, 2011.
- 45.Gomes, LR; Terra, LF; **Wailemann, R**; Labriola, L; Sogayar, MC. TGF-beta 1 Modulation Of Human Breast Cancer Cells Motility: MMPs/MMPs Inhibitors Homeostasis Controlled By MAPKs Crosstalk. In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu. Programa da XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011.
- 46.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 Bioquimica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu. Programa da XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011.

#### Experiência Acadêmica

Atividades Didáticas

Supervisão de Iniciação Científica

Aluno: Augusto César Zago Alves

Projeto: Estudo do papel de HSPB1 como agente citoprotetor de células beta pancreáticas (2018).

Aluno: Augusto César Zago Alves

Projeto: Funcionalidade de Células Beta Pancreáticas Mediante Estímulos de Citoproteção e Morte Celular (2017).

Aluna: Liliane Silva Nunes

Projeto: Viabilidade e Funcionalidade de Células Beta Pancreáticas Mediante Estímulos de Citoproteção e Morte Celular (2015).

Supervisão de Trabalho de Conclusão de Curso

Nunes, L. S. Viabilidade e funcionalidade de células beta pancreáticas mediante estímulos de citoproteção e morte celular. 2015. 15p. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Biomedicina. Universidade Anhanguera de São Paulo, São Paulo, 2015.

Organização de cursos e monitoria.

Disciplinas de Pós-Graduação

- 1- XI Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular,
  - 2016. Depto Bioquímica IQ USP, sob a orientação da Profa. Dra Letícia Labriola. Atividade: monitoria plena e aula prática de extração, quantificação de proteínas, Western Blot.
- 2- X Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular,
  - 2015. Depto Bioquímica IQ USP, sob a orientação da Profa. Dra Letícia Labriola. Atividade: monitoria plena e aula prática de extração, quantificação de proteínas, viabilidade celular por Imunofluorecência.
- 3- IX Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. Depto Bioquímica – IQ – USP, sob a orientação da Profa. Dra Letícia Labriola. Atividade: monitoria plena e aula prática de viabilidade celular por Imunofluorecência.
- 4- VII Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012. Depto de Bioquímica, IQ, USP, sob a orientação da

- Profa. Dra Letícia Labriola. 2012. Atividade: monitoria plena e aula prática de extração, quantificação de proteínas, atividade enzimática e citometria de fluxo.
- 5- VI Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, junto ao departamento de Bioquímica, IQ, USP, sob a orientação da Profa. Dra Mari C Sogayar 2011. Atividade: monitoria plena e aula prática de extração, quantificação de proteínas, atividade enzimática e citometria de fluxo.
- 6- Biologia Molecular da Transformação Maligna (QBQ5717), junto ao departamento de Bioquímica, IQ, USP, sob a orientação da Profa. Dra. Mari C Sogayar. 2011. Atividade: monitoria plena e aula prática de extração e quantificação de RNA.

#### Disciplinas de graduação

- 1- Monitoria Plena: QBQ0230 Bioquímica Depto Bioquímica IQ -USP Docentes Responsáveis: Maurício da Silva Baptista e Walter Ribeiro Terra -
- 2- Aulas Ministradas: QBQ0230 Bioquímica Depto Bioquímica IQ USP Docentes Responsáveis: Maurício da Silva Baptista e Walter Ribeiro Terra. Laboratório de Multimídia: Cromatografia Cinética Enzimática Introdução ao Metabolismo Banco de Dados Fotossíntese.
- 3- Monitoria Plena: QBQ0211 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo. Departamento de Bioquímica - IQ - USP, sob orientação de Prof. Dr. Frederico Gueiros Filho, Profa. Dra. Letícia Labriola.
- 4- Monitoria Plena: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (QBQ0126) Biologia Molecular. Depto Bioquímica IQ USP, sob orientação de Prof. Dr. Ronaldo Bento Quaggio, Profa. Dra. Daniela Bassères e Prof. Dr. João Carlos Setubal.

#### Disciplinas de ensino fundamental

- Monitoria Plena: A Caminho da Biotecnologia, curso teórico- prático /workshop ministrado para os alunos do Ensino Fundamental II das escolas See-Saw/Panambi Bilangual School e Escola de Aplicação da USP, sob a orientação da Profa. Dra. Mari C Sogayar. 2012.
- 2. Monitoria Plena: A Caminho da Biotecnologia, curso teórico- prático /workshop ministrado para os alunos do Ensino Fundamental II das escolas See-Saw/Panambi Bilangual School e Escola de Aplicação da USP, sob a orientação da Profa. Dra. Mari C Sogayar. 2011.
- 3. Monitoria Plena Voluntária: A Caminho da Biotecnologia, curso teórico- prático /workshop ministrado para os alunos do Ensino Fundamental II das escolas See-Saw/Panambi Bilangual School e Escola de Aplicação da USP, sob a orientação da Profa. Dra. Mari C Sogayar. 2010.

#### Participação em Eventos

- Mecanismos Moleculares Mediadores da Citoproteção de Células Beta Pancreáticas Induzida por Prolactina. Palestra no ciclo de Seminários dos Pós-Graduandos e Pós-Doutorandos de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil, Agosto, 2016.
- 2. Hspb1 mediates prl-induced cytoprotective and metabolic beneficial effects on beta-cells. Wailemann R.A.M.; Terra L.F.; Gomes V.M.; Forni M.F., Oliveira T.C.; Santos A.F.; Nunes L.S.; Palmisano G.; Labriola L. in: XVIIICongress of the Brazilian Society for Cell Biology, São Paulo, SP, Brasil, July 13th to 16th, 2016.
- 3. XI Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016. Depto Bioquímica IQ USP.
- 4. IPITA-IXA-CTS 2015 Joint Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association, the International Xenotransplantation Association, and the Cell Transplant Society,

- 2015, Melbourne. Transplantation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2015.
- 5. Terra, LF.; Wailemann, RAM; Gomes, VM; dos Santos, AF; Oliveira, TC; Forni, MF; Labriola, L. O papel da prolactina na morte celular de células-beta pancreáticas. Simpósio Interlaboratorial, IQ. 2015.
- Keystone Symposia meeting on Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System, 2014, Guarujá, São Paulo, Brasil. HSPB1 Mediates Prolactin-induced Prosurvival Effects on Pancreatic betacells.
- 7. European Cell Death Organization (ECDO) 2014 22nd Euroconference on Cell Death and Rejuvenation, 2014, Hersonissos, Creta, Grécia. Antiapopototic HSPB1 mediates prolactin-induced prosurvival effects on pancreatic beta-cells.
- EASD Islet Study Group Symposium. 2012 . Rostock, Alemanha.
   Apresentação de painel. 48<sup>th</sup> Annual Meeting EASD European Association for the Study of Diabetes. 2012. Berlin, Alemanha.
- 10<sup>th</sup> International Congress on Cell Biology. 16<sup>th</sup> Congress of the Brazilian Society for Cell Biology. 2012. Rio de Janeiro, Brasil. Apresentação de painel.
- II Congresso Institucional Química e Bioquímica, Instituto de Química – USP. 2012. Guarujá, Brasil. Apresentação de painel.
- 11. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2008. Congresso. Foz de Iguaçu, Brasil. Apresentação de painel.

#### **Prêmios Recebidos**

- 1. Prêmio Viagem do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. Outubro de 2016.
- 2. Auxílio à Viagem: Pró-Reitoria de Pós-Graduação. 2012. Universidade de São Paulo.

- 3. Prêmio Viagem do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. 2012. Departamento de Bioquímica, IQ, Universidade de São Paulo.
- Prêmio ProInt (Programa de Internacionalização na Graduação).
   2012. Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH), Universidade de São Paulo.