



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA - TRINDADE -
FLORIANÓPOLIS - SC

FLÁVIA DA SILVA WAGNER

**MUDANÇAS FUNCIONAIS DA ILHOTA PANCREÁTICA DE CAMUNDONGOS EM
DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO COMO GUIA PARA
MELHORAR A MATURAÇÃO DAS CÉLULAS DO TIPO BETA ORIGINADAS A
PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS PLURIPOTENTES**

Florianópolis

2023

FLÁVIA DA SILVA WAGNER

**MUDANÇAS FUNCIONAIS DA ILHOTA PANCREÁTICA DE CAMUNDONGOS EM
DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO COMO GUIA PARA
MELHORAR A MATURAÇÃO DAS CÉLULAS DO TIPO BETA ORIGINADAS A
PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS PLURIPOTENTES**

Dissertação submetida ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Gustavo Jorge dos Santos, Dr.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wagner, Flávia da Silva
MUDANÇAS FUNCIONAIS DA ILHOTA PANCREÁTICA DE
CAMUNDONGOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO COMO
GUIA PARA MELHORAR A MATURAÇÃO DAS CÉLULAS DO TIPO BETA
ORIGINADAS A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS PLURIPOTENTES
/ Flávia da Silva Wagner ; orientador, Gustavo Jorge dos
Santos, 2023.
58 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas,
Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Diabetes Mellitus. 3.
Secreção de insulina. 4. Maturação de célula beta
pancreática. 5. Transplante de hPSCs-beta. I. dos Santos,
Gustavo Jorge. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas. III. Título.

FLÁVIA DA SILVA WAGNER

**MUDANÇAS FUNCIONAIS DA ILHOTA PANCREÁTICA DE CAMUNDONGOS EM
DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO COMO GUIA PARA MELHORAR A
MATURAÇÃO DAS CÉLULAS DO TIPO BETA ORIGINADAS A PARTIR DE
CÉLULAS-TRONCO HUMANAS PLURIPOTENTES**

O presente trabalho em nível de Mestre foi avaliado e aprovado, em 30 de junho de 2023,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Fernanda Barbosa Lima, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Laureane Nunes Masi, Dra.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiologia pelo Programa de
Pós-Graduação.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Gustavo Jorge dos Santos, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023.

Dedico aos meus pais e a minha irmã que não medem esforços para me auxiliar e apoiar a minha carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer aos meus pais e a minha irmã, pelo apoio e pela ajuda de sempre. Com certeza o suporte emocional que eles me deram fizeram muita diferença para eu concluir esse trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Gustavo J. dos Santos, pelos ensinamentos, incentivos e pela confiança depositada no meu trabalho. Sua humanidade e seu amor pela ciência são admiráveis e me incentivam a continuar.

Ao meu amigo e parceiro de trabalho, Robson Barth, que logo que eu cheguei me acolheu e desde então, não saiu do meu lado. Obrigada por todos os conselhos, ajuda, pela contribuição nesta pesquisa e pelo apoio em momentos difíceis.

A Larissa, Tamires, Gabriela e ao Flaviano que além de colegas de laboratório, com o passar do tempo nos tornamos amigos. Que vivenciaram e vibraram comigo a cada etapa vencida deste trabalho, como também fora dele.

Aos meus colegas do IBM Lab (*Islet Biology and Metabolism Lab*), especialmente ao Henrique, que me auxiliaram nesta pesquisa e conviveram comigo nesse período.

As minhas amigas de infância, Rafaela e Stéfani, que mesmo distantes sempre me apoiam e me incentivam a alcançar meus objetivos.

A minha madrinha Maria Nilta e aos demais familiares que torcem por mim.

Aos colegas, Morgana, Luma e Jonata, que seguiram comigo essa jornada acadêmica, compartilhando momentos e experiências da vida na pesquisa.

Aos professores do Programa, por todos os ensinamentos e os momentos de troca de conhecimento. Vocês contribuíram para meu amadurecimento científico.

Ao LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia) pela disponibilidade e contribuição dos equipamentos necessários para a realização dessa pesquisa.

Aos professores, Carla Inês Tasca, Rodrigo Bainy Leal, Marcelo Farina e Daniel Santos Mansur, por disponibilizarem equipamentos e assim, fazer com que essa pesquisa fosse concluída.

À banca, pelo aceite de me arguir e pelas contribuições feitas com o intuito de melhorar esse trabalho. Obrigada professoras, Dra. Laureane Massi e Dra. Fernanda Barbosa Lima.

Ao LiDoc (Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas), ao professor Alex Rafacho, como também ao LENEC (Laboratório de Estudos de Neuroendocrinologia e Comportamento), aos professores Fernanda Barbosa Lima e Wagner Luiz Reis, e aos discentes, por serem prestativos e cederem alguns materiais necessários.

E a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), o CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo fomento da pesquisa.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota (Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica. Independente da etiologia, o DM reduz o número de células β e, qualquer forma de DM seria beneficiada com um tratamento que promova a regeneração de células β . Uma técnica promissora é o desenvolvimento de células β a partir de células-tronco humanas pluripotentes (*hPSC*), denominadas *hPSC- β* . O que limita essa técnica é a geração de *hPSC- β* viáveis para o transplante em humanos, pois elas não chegam em um estágio de maturação suficiente para secretar insulina, e conseqüentemente, não podem ser utilizadas na remissão do DM. Para desenvolver metodologias que culminem na maturação das *hPSC- β* é necessário compreender como a maturação acontece em células β pancreáticas durante o desenvolvimento e conhecer quais os elementos e os fatores internos e externos envolvidos. Acredita-se que a capacidade secretória de insulina estimulada pela glicose seja alcançada devido às alterações em fatores de transcrição, nas vias AMPK e mTORC, na atividade mitocondrial e na maquinaria de processamento e exocitose da insulina durante a maturação. Dessa forma, investigamos as alterações funcionais, transcricionais e metabólicas que ocorrem durante a maturação das células β pancreáticas de camundongos C57 nos estágios neonatos 3, 9 e 20 dias após o nascimento e adultos (45-60 dias). Depois do isolamento das ilhotas nos períodos já citados, incubamos as ilhotas em meio RPMI por 24h e depois analisamos a expressão gênica, proteica e realizamos a secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS). Os dados foram analisados no *software Graph Prism 8*. Observamos maior expressão de mRNA de MAFA, PAX6, INS, GLUT2, GCK que são importantes para identidade, maturação e função de células β pancreática em ilhotas de adultos (ilhota madura), como também vimos que maior expressão de ERO1 ao decorrer da maturação e expressão elevada da PDIA6 durante todo o desenvolvimento. Esses dois últimos genes codificam proteínas abundantes do retículo endoplasmático (RE). Verificamos que a proliferação é maior em ilhotas de neonatos (ilhotas imaturas), com a expressão do Ki67. A GSIS foi maior em células β maduras, demonstrando uma maior eficiência na secreção de insulina. Porém, encontramos maior secreção de insulina em ilhotas imaturas em relação ao conteúdo total e mesmo tendo uma secreção basal aumentada, para uma secreção de 50% do conteúdo total, essas precisam de um estímulo maior de glicose. Dessa forma concluímos que os fatores de transcrição importantes na identidade e para a maturidade da célula β pancreática são aumentados a partir do 9º dia após o nascimento, mas diferente disso, a GSIS eficiente é alcançada somente após o 20º dia após o nascimento.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus; Transplante de *hPSC- β* ; Maturação de célula β pancreática; Secreção de insulina; medicina regenerativa.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a multiple etiology metabolic syndrome characterized by Chronic hyperglycemia. Regardless of its etiology, DM reduces pancreatic β cell numbers, and any type of DM would benefit from a treatment that promotes β cell regeneration. (So, any treatment that promotes β cell regeneration would benefit every type of DM.) One promising technique is the development of β cell derived from human pluripotent stem cells (hPSC) described as hPSC- β . The limiting factor on this approach, is the viable generation of hPSC- β necessary for human transplantation, due to the inability on reaching a maturation state enough in order to secrete insulin, and so, being unable to reverse the DM state. In order to develop strategies that reach hPSC- β maturation, the comprehension of how the maturation process occurs throughout its development and point which elements and all possible factors involved. It is to believe that glucose stimulated insulin secretion capacity would be achieved due to alterations in transcription factors, AMPK and mTOR pathways, mitochondrial activity and in the insulin processing machinery and its exocytosis during maturation. Thus, we investigate functional, transcriptional and metabolic alterations throughout pancreatic β cell maturation of C57 mice, during newborn stages P3, P9, and P20 and adults (45-60 days). After isolation, islets were incubated in RPMI medium for 24 hours, and then we analyzed genetic and proteic expression and glucose stimulated insulin secretion (GSIS). Data was analyzed with the GraphPad Prism 8. We observed an increased mRNA expression of MAFA, PAX6, INS, GLUT2 and GCK, these being crucial to identity, maturation and β cell function, and also, it was showed increased ERO1 expression in mature β cells and increased PDIA6 expression as well. These last cited genes are responsible for coding proteins abundantly in the endoplasmic reticulum (RE). Data showed that proliferation was increased in immature cells through Ki67 expression, and GSIS was increased in mature β cells, attesting an efficiency in insulin secretion. Therefore, our research presented a higher insulin secretion on immature β cells in relation to the total content, even showing an increased baseline secretion. In order to secret about 50% of it's total content, immature cells need an increased glucose stimuli. In conclusion, our data showed that transcription factors essential for β cell identity and its maturation are increased from the 9^o day after birth, but other than that, an efficient GSIS is only achieved from the 20^o day after birth.

Keywords: Diabetes Mellitus; hPSC- β transplantation; Pancreatic β cell maturation; Insulin secretion; regenerative medicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental.....	26
Figura 2 - Dados da expressão de mRNA de genes relacionados à identidade e maturação nas ilhotas de camundongos C57 neonatos (P3 e P9) e adultos (P45-P60).....	34
Figura 3 - Dados da expressão de mRNA de genes relacionados à função das células β pancreáticas de camundongos C57 neonatos (P3 e P9) e adultos (P45-P60).....	36
Figura 4 - Dados da expressão de mRNA de genes relacionados à proliferação das células β pancreáticas de camundongos C57 neonatos (P3 e P9) e adultos (P45-P60).....	37
Figura 5 - GSIS de ilhotas de camundongos C57 neonatos (P3 e P20) e adultos (P45-P60).....	38
Figura 6 - Dados da GSIS de ilhotas de camundongos C57 neonatos (P3 e P20) e adultos (P45-P60) em concentrações crescentes de glicose (2,8, 5,6, 8,4, 11,2 e 16,8mM).....	39
Figura 7 - Dados da expressão proteica de S6Rib total e fosforilada de ilhotas de camundongos C57 neonatos (P3 e P9) e adultos (P45-P60) em concentrações de 2,8 e 16,8mM de glicose.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências das bases nitrogenadas dos primers na pesquisa.....	30
Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados na pesquisa.....	32
Tabela 3 - Anticorpos secundários utilizados na pesquisa.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP	Proteína 1 de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 4E
µL	Microlitro
µg	Micrograma
°C	Graus célsius
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de 5'-adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de Cálcio dihidratado
C57	Linhagem camundongo Black-C57
C57BL/6J	Linhagem camundongo Black-C57
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas
CDKIs	Inibidores de quinases dependentes de ciclinas
cDNA	DNA complementar
CFS	Centro de Ciências Fisiológicas
CG	Complexo de Golgi
CO ₂	Gás carbônico
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>Mellitus</i> do tipo 1
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> do tipo 2
ELISA	kit <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERO1	Retículo Endoplasmático Oxidoredutase 1 Alfa
ERP46	Proteína 46 do retículo endoplasmático
Erry	Receptor gama relacionado ao estrogênio
EZH2	Intensificador do homólogo zeste 2
FFA1	Receptor 1 de ácidos graxos livres
FGF10	Fator de crescimento de fibroblasto 10
GCG	Glucagon
GCK	Glicoquinase
GLUT2	Transportador de glicose do tipo 2
GRP94	Proteína regulada por glicose 94
GSIS	Secreção de insulina estimulada pela glicose

HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HDAC1	Histona Desacetilase 1
HEPES	Ácido Etanossulfónico
HFD	<i>High-fat diet</i>
HK	Hexoquinase
HNF1alfa	Fator nuclear 1 alfa do hepatócito
HNF1beta	Fator nuclear 1 beta do hepatócito
hPSCs	Células-tronco humanas pluripotentes
hPSC-β	Célula do tipo β
IER3IP1	Proteína 1 de Interação de Resposta Precoce Imediata 3
INS1	Insulina
KCl	Cloreto de potássio
KI67	Marcador de proliferação Ki-67
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KRBH	Krebs—Ringer Buffer balanceado com HEPES
LDTFs	Fatores de transcrição determinantes de linhagens
MAFA	MAF BZIP Fator de Transcrição A
MAFB	MAF BZIP Fator de Transcrição B
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio
mM	Milimolar
M	Molar
mL	Mililitro
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
mRNA	RNA mensageiro
mTORC1	Quinase alvo mamífero da rapamicina
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	Fosfato de sódio dibásico
NFATC1	Fator Nuclear de Células T Ativadas 1
NGN3	Neurogenina 3
NKX6.1	Proteína Homeobox NK-6 Homólogo A
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
P3	Período neonatal três dias após o nascimento
P9	Período neonatal nove dias após o nascimento

P14	Período neonatal quatorze dias após o nascimento
P18	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2C
P19	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
P20	Período neonatal vinte dias após o nascimento
P21	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
P27	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B
P45-60	Período adulto quarenta e cinco a sessenta dias após o nascimento
P57	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1C
PDIA6	Proteína Dissulfeto Isomerase Família A Membro 6
PDGFRA	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas tipo alfa
PDH1	Piruvato desidrogenase
PDK	Piruvato desidrogenase quinase 1
PDX1	Proteína Homeobox 1 pancreático e duodenal
PGC-1alfa	Coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
RIPA	Tampão para ensaio de radioimunoprecipitação
RE	Retículo endoplasmático
RPMI	Meio Gibco Roswell Park Memorial Institute
s6K	Proteína ribossômica S6 quinase beta-1
S6rib	Proteína ribossomal S6
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SEM	Erro padrão da média
SDTFs	Fatores de transcrição dependentes de sinais
SOX9	Fator de transcrição SRY-Box 9
TBST	Solução salina tamponada com tris (TBS) e polissorbato 20
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UPR	Resposta de proteína desdobrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 METODOLOGIA.....	24
3.1 ANIMAIS.....	24
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
3.3 ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS DE CAMUNDONGOS C57BL/6.....	26
3.4 CULTURA DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	28
3.5 SECREÇÃO DE INSULINA.....	28
3.6 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE CDNA E PCR EM TEMPO REAL.....	29
3.7 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E <i>WESTERN-BLOT</i>	31
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4 RESULTADOS.....	34
4.1 EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO IMPORTANTES NA IDENTIDADE E MATURAÇÃO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS E ESPECIFICAMENTE DE CÉLULAS β	34
4.2 EXPRESSÃO DOS GENES ASSOCIADOS À FUNÇÃO DA CÉLULA β PANCREÁTICA.....	35
4.3 EXPRESSÃO DOS GENES ASSOCIADOS À PROLIFERAÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	36
4.4 SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA PELA GLICOSE.....	37
4.5 FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA RIBOSOMAL S6 (S6RIB).....	39
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica associada a alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. A sua incidência está aumentando na população mundial, em 2021 haviam 536,6 milhões de pessoas, de 20 a 79 anos, convivendo com essa doença e, as estimativas para o ano de 2045 são que 783,2 milhões de indivíduos estarão com diabetes. Dentro da classificação mundial, o Brasil está na 6ª colocação, com 15,7 milhões de pessoas diabéticas (1). Apesar da melhoria da qualidade e da expectativa de vida dos diabéticos hoje, os gastos públicos relacionados com essa patologia são enormes e ela ainda gera complicações fatais (2).

Há diferentes tipos de DM, os poligenéticos como o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) e o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e os monogenéticos, como o *MODY* (que vem da sigla *Maturity Onset Diabetes of the Young*). O DM1, que representa 10-20% dos casos, é causado por um ataque autoimune às células β decorrente de uma predisposição genética e fatores ambientais, como infecções virais e dieta. O DM2 que acomete a maior parte da população diabética, em torno de 80-90%, é ocasionado por uma disfunção na célula β e está muito associado à resistência à insulina, obesidade, dieta, estilo de vida, alteração da depuração da insulina e idade (3-4). Já o *MODY*, que acomete cerca de 1 a 5% da população diabética dentro da classificação do DM2, é ocasionado por mutações em um gene específico relacionado com a sobrevivência, maturação e/ou a função da célula produtora de insulina (5). Apesar de terem etiologias diferentes, a longo prazo qualquer tipo de DM leva à disfunção e/ou morte das células β pancreáticas e conseqüentemente, há um aumento da concentração da glicose sanguínea (6-7), destacando o papel central dessa célula no desenvolvimento desta síndrome.

Essa patologia atinge indivíduos de várias idades, e esses, estão sujeitos a conviver com complicações como a macroangiopatia, microangiopatia, nefropatias, neuropatias, os riscos para amputações de membros inferiores, mortalidade e morbidade (8-9). Sabe-se que atualmente os tratamentos mais utilizados no DM1 são as infusões diárias de insulina exógena e no DM2 são os usos de hipoglicemiantes orais, em ambos, o tratamento é realizado juntamente com uma dieta saudável e com a realização de atividade física. Apesar da comunidade

científica ter se esforçado e investido no desenvolvimento de técnicas para transplantes de ilhota pancreáticas e/ou de células β em pacientes diabéticos, existem problemas metodológicos que acabam dificultando esse processo, como a escassez de doadores de ilhotas frente às 340-750 milhões de células de ilhota necessárias para a realização de transplantes. (10).

Independente da classificação etiológica, a fisiopatologia do DM1, DM2 e do MODY é comum. Por trás de qualquer um dos tipos de DM, reside a redução no número e/ou na eficiência da função da célula β . Sendo assim, qualquer tratamento que promova a regeneração e ou a substituição dessas células terá efeito benéfico para os indivíduos diabéticos e, essa possibilidade de remissão do DM justifica o intenso esforço da comunidade científica em desenvolver novas fontes de células produtoras de insulina para terapias de reposição/regeneração celular (11).

Uma alternativa em potencial para reposição de células β pancreáticas é a produção de células β produtoras de insulina (hPSCs- β) a partir de células-tronco humanas pluripotentes (hPSCs). Apesar de conhecermos as vias pelas quais células pluripotentes se diferenciam em células β e conseguirmos promover essa diferenciação *in vitro*, as células β originais são altamente especializadas e requerem um processo de maturação bastante complexo (12). Os atuais protocolos, desenvolvem hPSCs- β a partir da suplementação do meio de cultura com fatores de crescimento como o fator de crescimento de fibroblasto 10 (FGF10), activina A e outras pequenas moléculas. Ao final do processo, essas células expressam fatores de identidade e maturação de célula β pancreática, como NKX6.1, INS1 e 2, PDX1 e, apesar de apresentarem uma secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS), a capacidade secretória dessas células é menor em relação àquela apresentada por células *naive* (13-14). Quando implantadas em um organismo, as hPSC- β promovem temporariamente a remissão do quadro de hiperglicemia em camundongos, pois os protocolos que dispomos hoje são ineficazes na confecção de células completamente maduras e com características de células β naturais. Essa ineficácia pode ser explicada pelo fato de que dentre as células hPSC- β algumas podem apresentar a característica de serem células poli-hormonais, ou ainda, pelo fato dessas células apresentarem menor expressão e/ou falta de alguns marcadores específicos de célula β e diferenças na morfologia dos grânulos de insulina, bem como pouca interação da vasculatura humano-receptor e dinâmica da GSIS pouco eficiente (13, 15-16), assemelhando-se com célula β imaturas. Em suma, o sucesso

de células hPSCs- β serem usadas como fonte de célula secretora de insulina em pacientes diabéticos esbarra na sua imaturidade e, desenvolver processos que melhorem a maturação dessa fonte de célula β é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento/cura do DM.

Para desenvolver metodologias que culminem na maturação das hPSC- β é necessário compreender como a maturação de células β naturais acontece durante o desenvolvimento e, conhecer quais os elementos e os fatores internos e externos envolvidos. No período embrionário as células se diferenciam e se proliferam, já a maturação ocorre principalmente no período pós-natal, onde há modulação de diversas vias de sinalização em decorrência de uma alteração no suprimento de oxigênio e de nutrientes (17-18). A principal alteração nesse sentido se dá na modificação de uma dieta rica em gordura (leite materno) para uma dieta rica em carboidratos. Sabe-se que após o desmame há uma alteração na expressão gênica e proteica das células β , enquanto as células β embrionárias e neonatais apresentam uma maior expressão de genes ligados a vias de diferenciação, proliferação, migração e adesão celular, as células β maduras de adultos expressam em maior quantidade genes relacionados com a biossíntese e a secreção de insulina (19).

A secreção de insulina em células β maduras acontece, principalmente, em resposta a um aumento na concentração da glicose sanguínea. Devido a esse aumento, a glicose é transportada para o meio intracelular através dos transportadores de glicose do tipo 2 (GLUT2), fosforilada pela glicoquinase (GCK) e metabolizada na via da glicólise, sendo transformada em piruvato. Na mitocôndria, o piruvato é convertido em Acetil-CoA pela piruvato desidrogenase 1 (PDH1) e entra no ciclo do ácido cítrico e na fosforilação oxidativa induzindo a formação de ATP. Com isso, a razão ATP/ADP aumenta, promovendo o fechamento dos canais de K^+ sensíveis ao ATP, o que aumenta a concentração de íons positivos no meio intracelular e altera o potencial de repouso da célula causando a despolarização da membrana. Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem se abrem devido a despolarização e há influxo de Ca^{2+} na célula, que estimula o movimento dos grânulos de insulina até a membrana e, finalmente a exocitose desse hormônio (20-21). Em células β imaturas a secreção de insulina está aumentada mesmo em condições basais de glicose e não se observa um incremento da secreção em condições estimulatórias de glicose, mostrando que essas células imaturas

apresentam uma sensibilidade diminuída à glicose, sendo este o principal fator funcional de diferença entre uma célula β imatura e uma madura. Assim, considera-se uma célula β madura, aquela capaz de secretar insulina de maneira proporcional à concentração de glicose e de suprimir essa secreção na ausência de glicose (22-23). Alguns motivos já são especulados para explicar essa imaturidade funcional, como a expressão reduzida de fatores de transcrição de maturação, metabolismo da glicose deficiente, baixa atividade mitocondrial e baixo influxo de Ca^{2+} (24-25), porém mais investigações devem ser feitas para entender como a alteração metabólica e funcional ocorre.

Uma vez que a demanda de nutrientes modula o metabolismo celular e que para um funcionamento normal e eficiente é necessário que as células ajustem as vias pelas quais obtém-se ATP (via glicolíticas ou da fosforilação oxidativa - OXPHOS), acredita-se que ao decorrer da maturação o metabolismo das células β pancreáticas mude de um metabolismo predominantemente glicolítico para um metabolismo baseado na OXPHOS. Assim, do ponto de vista energético, com essa mudança, a célula β pancreática madura seria metabolicamente mais eficiente, produzindo mais ATP em comparação com a célula não madura. Uma outra evidência dessa alteração no metabolismo pode ser observada na alteração da atividade da PDH1 (20, 26-27). Na maturação, os níveis de expressão de piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1) são elevados, e essa enzima inibe a PDH1, o que automaticamente inibiria a fosforilação oxidativa, porém, acredita-se que altos níveis de glicose inibam a atividade da PDK1 promovendo uma maior produção de energia através da fosforilação oxidativa, e isso explica também a melhor responsividade ao GSIS (28).

Sabe-se que também há uma alteração da sinalização de mTORC1 para AMPK durante a maturação. Em um cenário com grande oferta de nutrientes, a sinalização de mTORC1 é ativada, enquanto que em condições basais de glicose a atividade da AMPK é acionada. A AMPK age inibindo as reações de consumo de ATP e ao mesmo tempo facilita aquelas associadas à geração de ATP, que de maneira aguda ativa glicólise ou, cronicamente, aciona vias que aumentam a biogênese e a função mitocondrial (29-30). Além disso, sabe-se que a mTORC1 está ativa no início do desenvolvimento da célula β , atuando na sinalização de proliferação celular, na regulação positiva de genes imaturos e que estabelece um perfil de metilação do DNA a fim de facilitar a resposta à glicose, mesmo que no

período inicial a célula β secreta insulina de forma constitutiva. Já a AMPK, apresenta maior atividade após o desmame, com o aumento da concentração de glicose, e sua atividade acaba reprimindo a sinalização da mTORC1, favorecendo outras vias de sinalização relacionadas à aquisição da capacidade de GSIS pelas células β pancreáticas e conseqüentemente, a maturação por completo (31-32).

Pouco se conhece sobre a adaptação funcional e/ou metabólica da célula β frente às mudanças ambientais para que haja uma secreção de insulina adequada. Acredita-se que os sinais ambientais, como glicose e hormônios, modulam as atividades dos chamados fatores de transcrição dependentes de sinais (SDTFs) e, esses por sua vez, influenciam na ação dos fatores de transcrição determinantes de linhagens (LDTFs). Através da ativação desses fatores, a célula β adquire capacidade para a expressão de transportadores de glicose, como o GLUT2, canais iônicos, enzimas atuantes no processamento de insulina, enzimas do metabolismo da glicose e na maquinaria exocitótica (33-34). Alguns SDTFs já explorados foram o NFATc1 e o MAFA, que agem indiretamente no aumento da expressão de GLUT2, da glicoquinase (GCK) e na supressão da atividade de enzimas hexoquinases, como a HK1, HK2 e HK3 (35-36). Outro SDTF conhecido é o Erry, ativado por Pgc-1 α e regulado positivamente pela atividade da AMPK, que atua na regulação de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial, ao tráfego de grânulos de insulina e no processo de exocitose. O Erry também contribui para o aumento da expressão de genes da OXPHOS, da biossíntese de ATP, do transporte de cátions e da cadeia de transporte de elétrons. Com isso, podemos ver que a atribuição dos fatores de transcrição e do metabolismo baseado na OXPHOS é de suma importância na responsividade da célula β à glicose (28).

O envolvimento do retículo endoplasmático (RE) e das enzimas que promovem o dobramento das proteínas é pouco estudado no tocante ao processo de maturação. O RE é responsável pelo dobramento de proteínas em suas formas terciárias e/ou quaternárias, bem como o enovelamento e o transporte das proteínas para as vesículas do Complexo de Golgi para a secreção no meio extracelular. Já é conhecido que a disfunção do RE pelo acúmulo de proteínas malformadas ou pelo desbalanço do metabolismo do Ca²⁺ pode desencadear uma resposta denominada resposta de proteína desdobradas (UPR). Caso a UPR se mantenha ativa ao longo do tempo, pode ativar vias de apoptose celular, o que leva a diminuição da massa de célula beta e como resultado, redução na massa funcional desse tipo celular. Esse

tipo de resposta ao estresse é comum no desenvolvimento dos diferentes tipos de DM (37-38). Com isso, torna-se interessante estudar mais sobre as isomerases, as chaperonas e até mesmo verificar como os sensores de estresse de RE são expressos ao longo da maturação a fim de verificar como a maquinaria de tradução da célula beta se comporta nesse processo.

Por fim, já é conhecida a capacidade de plasticidade da célula β pancreática, pois elas apresentam uma alta proliferação durante o início do desenvolvimento e ao longo da maturação essa proliferação é diminuída, porém em circunstâncias de gravidez ou obesidade, tanto em roedores quanto em humanos, há proliferação da massa de célula β a fim de garantir as demandas metabólicas. Dessa forma, em células β imaturas a proliferação é maior e discute-se na literatura que isso deve acontecer devido a atividade da mTORC1 e sua via de sinalização, com a fosforilação da proteína ribossômica S6 quinase beta-1 (s6K) e da proteína 1 de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 4E (4E-BP), a fim de promover maior expressão de ciclinas D1 e D2 e das CDKs como a CDK4 e CDK6, em roedores e em humanos, respectivamente. Essas sinalizações promovem a transcrição de outras ciclinas (A, E e B) e outras CDKs (Cdk1 e Cdk2) que estimulam ainda mais o ciclo celular mitótico (39-42). Existem proteínas (p19, p27, p57, p18, p21) denominadas inibidores de quinases dependentes de ciclina (CKIs) e elas bloqueiam a sinalização das ciclinas com as CDKs, atuando negativamente no ciclo celular (43). Alguns fatores de transcrição e/ou outras proteínas podem influenciar na expressão ou não das CKIs durante o desenvolvimento e por isso, interferir no processo de proliferação. Há alguns genes já pesquisados, como o HDAC1, Pdgfra e Ezh2 (44-46), porém há poucas informações sobre a atuação desses e outros fatores e o mecanismo dos mesmos durante a maturação da célula β pancreática.

Diante do exposto, o questionamento que impulsionou a realização deste trabalho consiste na ideia de que é necessário explorar mais os eventos e os mecanismos funcionais e metabólicos que ocorrem durante a maturação da célula β pancreática. Ainda, com dados discrepantes na literatura sobre o exato período da maturação da célula beta pancreática e quais são os fatores que tornam as hPSCs- β eficientes para a GSIS, se torna necessário encontrar de fato quando a maturação acontece. Sendo assim, objetivamos a) traçar a sequência de eventos que ocorrem durante a maturação de células β , bem como mostrar em qual estágio de desenvolvimento ocorre e b) quais genes são alterados na mudança de um

metabolismo baseado na glicólise para um metabolismo baseado na fosforilação oxidativa e na maquinaria do processamento da insulina, e com isso fornecer informações para que novos protocolos de diferenciação e maturação das hPSCs- β sejam feitos a fim de oferecer novos alvos terapêuticos para o tratamento de DM ou até mesmo sua cura. Hipotetizamos que durante a maturação, as células β pancreáticas aumentam a expressão de genes como INS, UCN3, GLUT2, GCK, PAX6, MAFA, PDIA6, principalmente a partir do 9º dia de vida, acompanhado de uma melhora na sensibilidade à glicose e na secreção de insulina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as alterações funcionais e transcricionais que ocorrem durante a maturação das células β pancreáticas de camundongos C57.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o isolamento de ilhotas pancreáticas de modelos de camundongos C57 nos estágios P3, P9, P20 e adultos (P45-60).
- Analisar e comparar a expressão dos genes UCN3, MAFA, GLUT2, P57, P18, PAX6, PAX4 e Insulina em ilhotas de camundongos nos estágios P3, P9 e adultos (P45-60).
- Comparar a GSIS das ilhotas de camundongos nos estágios P3, P20 e adultos (P45-60).
- Analisar e comparar a expressão proteica da AMPK e mTORC em ilhotas de camundongos nos estágios P3, P9 e adultos (P45-60).

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Os animais utilizados na pesquisa foram camundongos da linhagem C57BL/6J gerados no biotério setorial de camundongos do Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS). Inicialmente, dois casais de C57BL/6J provenientes do “Biotério multiusuário de roedores para estudos na área de neuroquímica” foram fornecidos pelo Prof. Dr. Eduardo Gasnhar Moreira. O professor Eduardo é coordenador do Projeto “Associação entre restrição alimentar e Fármaco hipoglicemiante ao tratamento da obesidade e comorbidades: estudo não clínico” aprovado sob protocolo 7361231120. A partir dessas matrizes então, geramos os animais que foram usados no presente trabalho. Todos os procedimentos realizados foram de acordo com a Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, como também, todas as normas éticas descritas na Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016 e descritas no Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo animais do CIOMS foram seguidas. O estudo foi aprovado pela CEUA/UFSC – nº de protocolo 2465200522 - anexo A). Utilizamos camundongos fêmeas e machos de idades variadas, com disponibilidade de água e ração padrão durante todo o período experimental, que foi de acordo com dieta comercial. A iluminação do ambiente foi padrão com ciclo claro/escuro de 12 horas e a temperatura era mantida em torno de 23°C, podendo alterar em 2°C.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para atingir os nossos objetivos foi analisada e comparada a maturação funcional de ilhotas pancreáticas em 4 estágios de desenvolvimento diferentes: P3, P9, P20 e P45-60 (adultos). O design dos grupos aconteceu de forma semelhante, mas será descrito separadamente para um melhor entendimento:

Animais P3: Uma fêmea e um macho de camundongos c57bl/6 foram separados para a cópula. A partir de então, acompanhamos os animais diariamente a fim de identificar se as fêmeas estariam prenhas (crescimento do abdômen), e se isso constatado, havia separação do camundongo macho e da fêmea. Após a separação, a fêmea foi ainda acompanhada diariamente para identificar o dia do

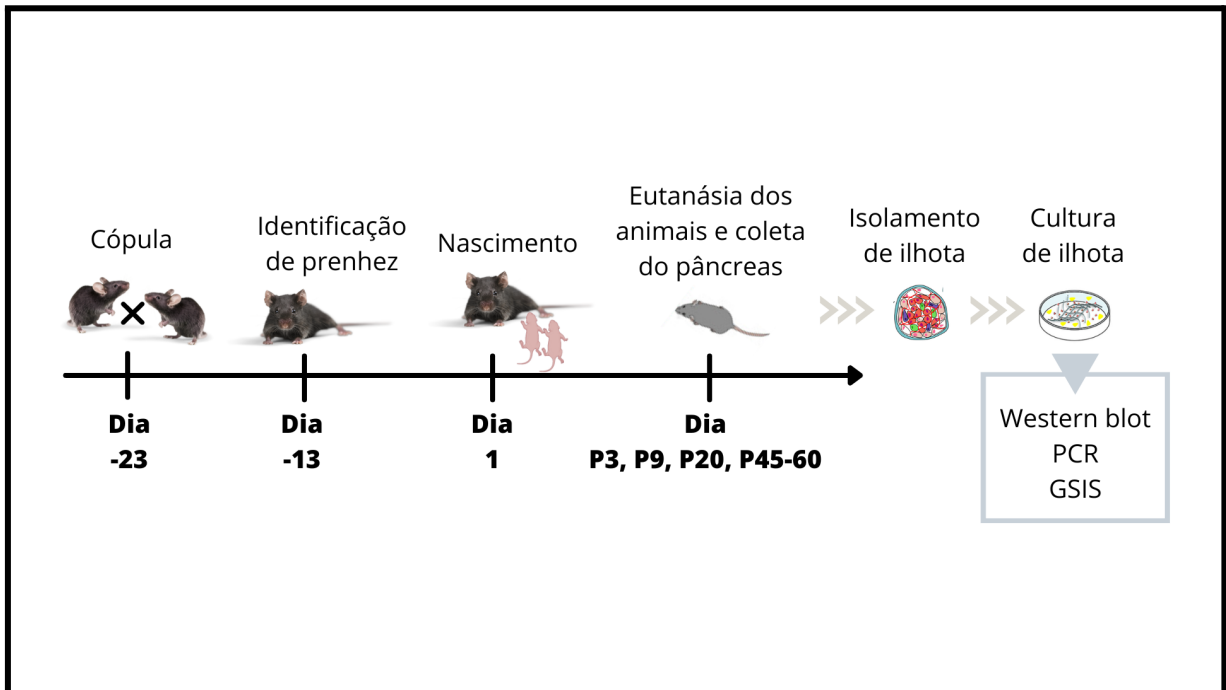
nascimento, esse foi considerado o P1. No 3º dia (P3) os filhotes eram recolhidos, sedados com isoflurano e logo em seguida eutanasiados através de decapitação com tesoura afiada. O design experimental para o grupo P3 pode ser observado na FIG. 1A.

Animais P9: Uma fêmea e um macho de camundongos c57bl/6 foram separados para a cópula. A partir de então, todos os dias acompanhamos os animais para verificar se as fêmeas estariam prenhas (crescimento do abdômen), e se isso constatado, havia separação do macho e da fêmea. Após a separação, a fêmea foi ainda acompanhada diariamente para identificar o dia do nascimento, esse foi considerado o P1. No 9º dia (P9) após o parto coletamos os animais. Os filhotes eram sedados com isoflurano e a eutanasia foi realizada através de decapitação com tesoura afiada. O design experimental para o grupo P9 pode ser observado na FIG. 1B.

Animais P20: Uma fêmea e um macho de camundongos c57bl/6 foram separados para a cópula. A partir de então, todos os dias acompanhamos os animais para verificar se as fêmeas estariam prenhas (crescimento do abdômen), e se isso constatado, havia separação do macho e da fêmea. Após a separação, a fêmea foi ainda acompanhada diariamente para identificar o dia do nascimento, esse foi considerado o P1. No 20º dia (P20), um dia antes do desmame, os camundongos foram coletados e sedados com isoflurano para a realização da eutanasia, que foi feita através de decapitação com tesoura afiada. O design experimental para o grupo P20 pode ser observado na FIG. 1C.

Animais P45-60: Uma fêmea e um macho de camundongos c57bl/6 foram separados para a cópula. A partir de então, todos os dias acompanhamos os animais para verificar se as fêmeas estariam prenhas (crescimento do abdômen), e se isso constatado, havia separação do macho e da fêmea. Após a separação, a fêmea foi ainda acompanhada diariamente para identificar o dia do nascimento, esse foi considerado o P1. No 21º dia (P21) os animais foram desmamados e colocados em caixas com no máximo 5 animais do mesmo sexo. A partir do 45º dia os mesmos estavam disponíveis para serem utilizados nos experimentos, isso até completarem o 60º dia de vida, após isso os mesmos eram utilizados para novos casais. Antes do isolamento de ilhotas pancreáticas, os animais foram sedados com isoflurano e eutanasiados por deslocamento cervical. O design experimental para o grupo P45-60 pode ser observado na FIG. 1D.

Figura 1 - Delineamento experimental.



Delineamento experimental nos estágios de desenvolvimento: 3 dias após o nascimento (P3), 9 dias após o nascimento (P9), 20 dias após o nascimento (P20) e 45-60 dias após o nascimento (P45-60).
Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS DE CAMUNDONGOS C57BL/6

Ilhotas pancreáticas de neonatos P3: primeiramente os animais foram eutanasiados por decapitação com tesoura e a dissecação do pâncreas aconteceu de forma manual. Após a dissecação, o pâncreas foi cortado entre 200-300 vezes e embebido em 3 a 4mL de solução de colagenase (Sigma-Aldrich, C9263) 0,5mg/mL de *Hank's Balanced Salt Solution* (Solução salina balanceada de hank - HBSS) ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1M]; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [1M]; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ [1M]; KH_2PO_4 [1M]; NaHCO_3 [1M]; NaCl [1M]; KCl [1M]; H_2O miliq). Para a digestão e separação da parte exócrina e endócrina, a amostra foi levada ao vórtex por 20 segundos, colocadas em banho-maria com temperatura de 37°C por 5 minutos, seguido de vórtex por mais 10 segundos e mais 1 minuto em banho-maria. Posteriormente, foi adicionado a *stop solution* (HBSS + 10% Soro Fetal Bovino (SFB)) para encerrar o processo de digestão. A etapa seguinte consistia nas lavagens, onde a amostra foi submetida a três centrifugações de 1300rpm por 5 minutos a 4°C, a primeira centrifugação foi

com a *stop solution* e as duas últimas foram somente com a solução de HBSS. Ao final das lavagens não era possível identificar as ilhotas, por causa do período de desenvolvimento dos animais, então adicionamos e homogeneizamos a amostra com o meio RPMI 1640 (Vitrocell) e deixamos na incubadora de CO₂ a 37°C por 24h.

Ilhotas pancreáticas de neonatos P9: após a eutanásia por decapitação com tesoura, a dissecação do pâncreas aconteceu de forma manual. Logo depois, o pâncreas foi cortado entre 200-300 vezes e embebido em 3 a 4mL de solução de colagenase 0,6mg/mL de HBSS. Depois, foi levado ao vórtex por 20 segundos, colocados em banho-maria com temperatura de 37°C por 5 minutos, seguido de vórtex por mais 10 segundos e mais 2 minutos em banho-maria para a digestão da parte exócrina e separação da parte endócrina. Após esse processo, foi adicionado a *stop solution* (HBSS + 10% SFB) para encerrar o processo de digestão. A etapa seguinte consistia nas lavagens, onde a amostra foi submetida a três centrifugações de 1300rpm por 5 minutos a 4°C, a primeira centrifugação foi com a *stop solution* e as duas últimas foram somente com a solução HBSS. Ao final das lavagens não era possível identificar as ilhotas, então a amostra foi colocada diretamente em meio RPMI 1640 (Vitrocell) e deixadas 24h na incubadora de CO₂ a 37°C.

Ilhotas pancreáticas de neonatos P20: antes da eutanásia os animais foram anestesiados com isoflurano e em seguida passaram pelo processo de decapitação com tesoura. A dissecação do pâncreas aconteceu de forma manual e após sua retirada, o mesmo foi cortado entre 200-300 vezes e embebido em 3 a 4mL de solução de colagenase 0,6mg/mL de HBSS. Em seguida, a amostra foi levada ao vórtex por 20 segundos, colocadas em banho-maria com temperatura de 37°C por 5 minutos, seguido de vórtex por mais 10 segundos e mais 2 minutos em banho-maria para a digestão da parte exócrina e separação da parte endócrina. Após esse processo, foi adicionado a *stop solution* (HBSS + 10% SFB) para encerrar o processo de digestão. A etapa seguinte consistia nas lavagens, onde a amostra foi submetida a três centrifugações de 1300rpm por 5 minutos a 4°C, a primeira centrifugação foi com a *stop solution* e as duas últimas foram somente com a solução de HBSS. Ao final das lavagens não era possível identificar as ilhotas, então a amostra foi colocada diretamente em meio RPMI 1640 (Vitrocell) e deixadas 24h na incubadora de CO₂ a 37°C.

Ilhotas pancreáticas de adultos: primeiramente os animais foram anestesiados com isoflurano e em seguida foram eutanasiados por deslocamento

cervical. Antes da dissecação do pâncreas, o mesmo foi inflado com 3 a 4ml de solução de colagenase 0,8mg/ml de HBSS. Após a dissecação, o pâncreas foi levado para o banho-maria com temperatura de 37°C por 17 minutos para a digestão e separação da parte exócrina e endócrina. Após esse tempo, foi adicionado a *stop solution* (HBSS + 10% SFB) para encerrar o processo de digestão. A etapa seguinte consistia nas lavagens, onde a amostra foi submetida a três centrifugações de 1300rpm por 5 minutos a 4°C, a primeira centrifugação foi com a *stop solution* e as duas últimas foram somente com a solução HBSS. Por fim, as ilhotas foram coletadas manualmente com micropipetas e colocadas em meio RPMI 1640 (Vitrocell) e deixadas 24h na incubadora de CO₂ a 37°C.

3.4 CULTURA DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

Após o procedimento de isolamento, as ilhotas coletadas de cada estágio de desenvolvimento foram mantidas em cultura celular (37°C e 5% de CO₂) por 24h. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Vitrocell) com bicarbonato de sódio, glutamina, antibiótico e antimicótico.

3.5 SECREÇÃO DE INSULINA

Após o período de 24h em meio de cultura, 20 ilhotas de cada grupo experimental foram coletadas para o experimento de GSIS. Antes da secreção iniciar, essas ilhotas foram mantidas por 40 minutos em solução descanso em estufa de 37°C, onde só continha a solução Tampão de bicarbonato de Krebs-Ringer (KRBH) balanceado com HEPES (NaCl [115 mmol/L], KCl [5 mmol/L], NaHCO₃ [24 mmol/L], MgCl₂ [1mmol/L], HEPES [10 mmol/L], CaCl₂ [2.5mmol/L] e BSA [0.1%]) sem glicose. Após isso, as ilhotas foram incubadas em estufa a 37°C por 40 minutos também em poços contendo KRBH suplementado com 2,8mM de glicose, KRBH suplementado com 5,6mM de glicose, KRBH suplementado com 8,4mM de glicose, KRBH suplementado com 11,2mM de glicose, KRBH suplementado com 16,8mM de glicose e por fim, em KRBH suplementado com KCl. No mesmo momento que as ilhotas eram trocadas de poços, 500uL do meio eram coletados e centrifugados. Desses 500uL, somente 200uL do sobrenadante eram retirados para a mensuração da insulina. No final do experimento, as ilhotas foram coletadas também e

juntamente foi adicionado 150uL de tampão RIPA (NaCl [5M]; Tris HCl pH7,4 [1M]; EDTA pH8,0 [0,5M]; NP40 [100%]; *Sodium Deoxycholate* [10%]; SDS [10%]; *Anti protease* [mini pastilhas]; *Anti phosphatase* [pastilhas]; H₂O miliq) para a mensuração do conteúdo total de insulina. Para a quantificação então, foi utilizado o *Rat/Mouse Insulin Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Kit (Sigma-Aldrich, EZRMI-13K, #3949155).

3.6 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E PCR EM TEMPO REAL

Para análise e comparação da expressão gênica nos diferentes estágios do desenvolvimento, as ilhotas foram coletadas após 24h no meio de cultura e cada amostra foi homogeneizada com 1mL de *TRIzol™ Reagent* (Invitrogen, 15596018) para a ruptura da membrana plasmática das células. A partir de então, seguimos com o protocolo de extração de RNA. Após a homogeneização, adicionamos 300uL de clorofórmio nas amostras e agitamos vigorosamente por 30 segundos. Em seguida, as mesmas foram incubadas por 2-3 minutos em temperatura ambiente para a separação dos lipídios, das proteínas e dos ácidos nucleicos. Também foi feita a centrifugação a 12000G por 15 minutos em temperatura de 4°C e imediatamente coletamos a parte aquosa. Junto com a parte aquosa, foi acrescentado 500uL de álcool isopropílico (Dinâmica, #1339) e os eppendorfs foram agitados lentamente. Após a agitação, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente e novamente centrifugadas a 12000G por 10 minutos. Na centrifugação o pellet de RNA é formado. Depois dessa etapa, o sobrenadante foi retirado do eppendorf e adicionamos 500uL de etanol 70%, seguido de agitação e centrifugação a 7500G por 10 minutos em temperatura de 4°C. Novamente, o sobrenadante foi removido e a amostra foi lavada com etanol absoluto (Neon, #03467) e centrifugada a 7500G por 10 minutos em temperatura de 4°C. Para finalizar a extração, o sobrenadante foi coletado e descartado, e os eppendorfs com o pellet foram deixados secando em temperatura ambiente. Para ressuspender a amostra foi adicionado 12uL de H₂O destilada, e logo após, foi feita a dosagem de RNA no espectrofotômetro *NanoDrop Lite* da *Thermo Scientific™*.

Após a dosagem do RNA, foi dado início a etapa de síntese de cDNA. Em eppendorf de 0,2mL foi adicionado 200ng de RNA diluído e 10uL do *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems™*, #4368814) que contém

buffer, *dNTP mix*, *primers* e a enzima *transcriptase reverse*. Por fim, cada amostra foi colocada no termociclador (T100 *Thermal Cycler* #1861096) e o cDNA foi produzido por meio de uma sequência de eventos configurados para mudança de temperatura e ação dos reagentes inseridos.

A preparação para o PCR aconteceu inicialmente com a produção do super *mix* que se deu pela junção do *SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, #4309155)*, de H₂O filtrada para PCR e dos *primers forward* e *reverse*, produzidos pela IDT (*Integrated DNA Technologies*), de cada gene definido anteriormente e que estão listados na tabela 1. Logo após, foi realizado o plaqueamento das amostras, então em cada poço foi adicionado 14,5uL do *mix* e 0,5uL de cDNA da amostra. Depois a placa foi colocada no equipamento *Applied Biosystems™ StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™ #4376357)*, para a quantificação.

Tabela 1 - Sequências das bases nitrogenadas dos *primers* utilizados na pesquisa.

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>
MAFA	AGGAGGAGGTCATCCGACTG	CTTCTCGCTCTCCAGAATGTG
PDX1	CCCCAGTTTACAAGCTCGCT	CTCGGTTCCATTCTGGGAAAGG
PAX4	AGGGGGACTCTTTGTGAATGG	ACCTGTGCGGTAGTAGCGT
INS1	CACTTCCTACCCCTGCTGG	ACCACAAAGATGCTGTTTGACA
P57	CGAGGAGCAGGACGAGAATC	GAAGAAGTCGTTCCGATTGGC
P18	CCTTGGGGGAACGAGTTGG	AAATTGGGATTAGCACCTCTGAG
UCN3	AAGCCTCTCCCACAAGTTCTA	GAGGTGCGTTTGGTTGTCATC
IER3IP1	GGGGAACAGACCAGGGAATC	GGCACTCTCATCACGGTTCT
PDIA6	AGCTGCACCTTCTTTCTAGCA	CAGGCCGTCCTCTGAATAAC
GCK	TGAGCCGGATGCAGAAGGA	GCAACATCTTTTACTGGCCT
HK1	CGGAATGGGGAGCCTTTGG	GCCTTCCTTATCCGTTTCAATGG

SOX9	AGTACCCGCATCTGCACAAC	ACGAAGGGTCTCTTCTCGCT
Ki67	ATCATTGACCGCTCCTTTAGGT	GCTCGCCTTGATGGTTCCT
ERO1	TTCTGCCAGGTTAGTGGTTACC	GTTTGACGGCACAGTCTCTTC
ERP46	CGCACTTCGTCATGTTCTTCG	CAGAGCACACGTCGGAATCA
GRP94	TCGTCAGAGCTGATGATGAAGT	GCGTTTAACCCATCCAACCTGAAT
Slc2a2	TCAGAAGACAAGATCACCGGA	GCTGGTGTGACTGTAAGTGGG
GAPDH	CACATTGGGGGTAGGAACAC	GCCAAAAGGGTCATCATCTC

Fonte: Elaborada pela autora.

3.7 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN-BLOT

Depois de coletadas em meio de cultura, 200-250 ilhotas foram incubadas em tampão de bicarbonato de Krebs-Ringer (KRBH) balanceado com HEPES sem glicose por 40 minutos. Após isso, as ilhotas foram passadas para o meio com o mesmo tampão, mas parte das amostras foram incubadas com tampão suplementado com 2,8mM de glicose (condições basais) e outras com suplementação de 16,8mM de glicose (condições estimulatórias) por uma hora. Depois, as ilhotas foram lisadas em tampão RIPA contendo coquetel antiprotease (Sigma-Aldrich, 04693159001) e antifosfatase (Sigma-Aldrich, 04906837001). Utilizamos também o sonicador para homogeneização da amostra. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bio-Rad, 5000205) a partir de uma curva de albumina e a absorbância foi medida na Multileitora Infinite M200 Tecan do LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia/UFSC). Em seguida, 25 µg de proteína foi aplicada em gel SDS-PAGE (Gel *resolving* 10%: 1,9mL de H₂O deionizada; 1,8mL de glicerol; 9,0mL de tampão; 4,3mL de acrilamida; 22,5µL de TEMED; e 300µL de APS 10%. Gel *stacking*: 3,45mL de H₂O deionizada; 4,5mL de tampão; 0,8mL de acrilamida; 12,5µL de TEMED; e 240µL de APS 10%), e por meio da eletroforese, as proteínas se separaram por peso molecular. Posteriormente as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose e após a transferência, a membrana foi colocada em solução de bloqueio (0,5g de albumina

em 10mL de TBST) por 2h em temperatura ambiente. Após esse tempo, a membrana foi lavada três vezes com solução basal - TBST 1x (100mL solução TBS 10x: 24g de Tris-HCl; 5,6g Tris-base; 88g de NaCl em 1L com pH7,6 + 890mL de solução Tween 10%), onde cada lavagem perdurou 5 minutos. A etapa seguinte consistia na incubação *overnight* da membrana com os anticorpos primários listados na Tabela 2 para as proteínas alvo, os mesmos tiveram diluição de 1:1000 em TBST. No dia seguinte, foram realizadas três lavagens da membrana novamente, com TBST por 10 minutos, e em seguida, a mesma foi incubada com os anticorpos secundários listados no Tabela 3 por duas horas. O anticorpo secundário também foi diluído, nesse caso de 1:20000 em TBST contendo 1% BSA. Antes da quantificação das bandas, foi feita a aplicação do kit *Clarity Western ECL Substrate* (BIO-RAD, 1705061) na membrana e a quantificação foi feita por densitometria no fotodocumentador Chemidoc MP BIORAD do LAMEB.

Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados na pesquisa.

Nome do anticorpo	Empresa	Código	Peso (kDa)	Origem	Reatividade
S6rib	Cell Signaling	2317S	32	Camundongo IgG1	Camundongos, humanos e coelhos
pS6rib	Cell Signaling	2211S	32	Coelho	Camundongos, humanos e coelhos

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3 - Anticorpos secundários utilizados na pesquisa.

Nome do anticorpo secundário	Empresa	Código
Anti Mouse	Sigma-Aldrich	AP160P

Fonte: Elaborada pela autora.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

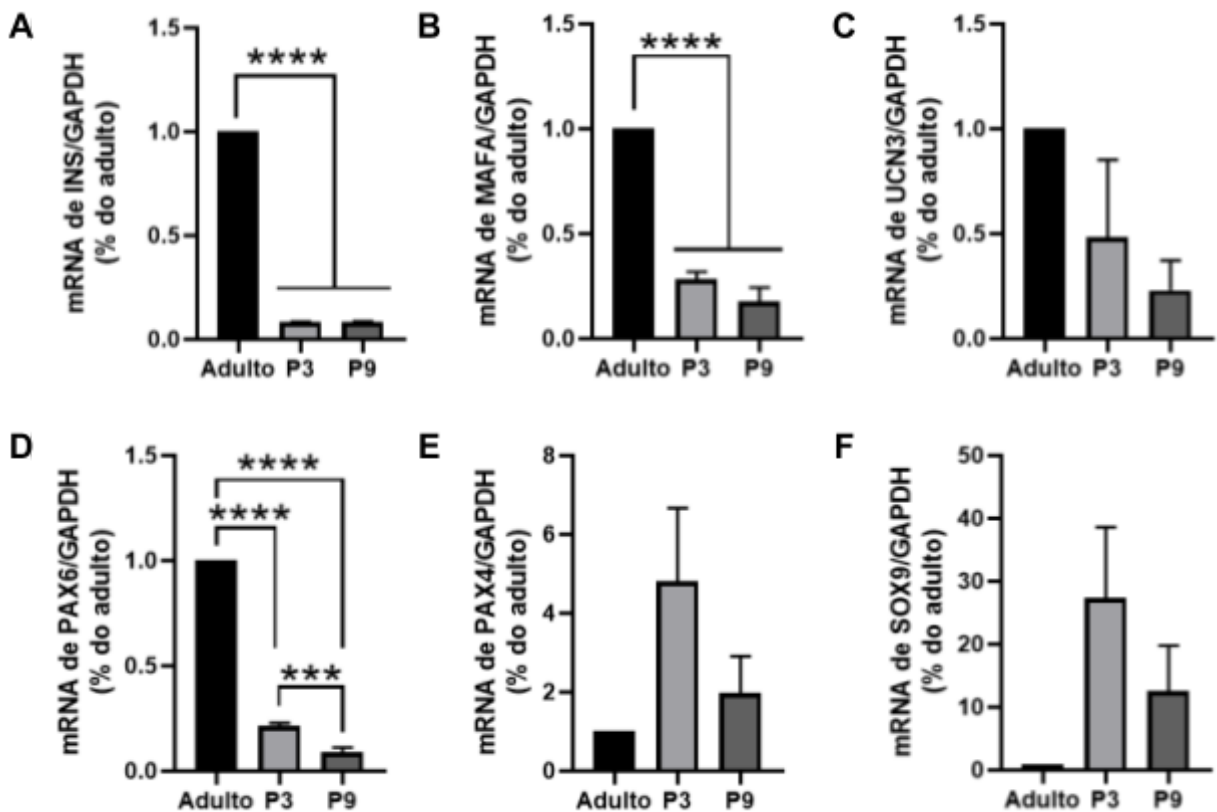
Os dados foram coletados e descritos para uma planilha no programa Excel, depois foram organizados, transferidos para o *software GraphPad PRISM 8*, o banco de dados foi conferido/revisado e após isso, foram analisados. Os resultados são apresentados por meio de médias \pm erro padrão da média (SEM), de acordo com a normalidade dos dados feito pelo teste de Shapiro-Wilk. Os *outliers* foram identificados por meio do teste de Grubb e as comparações entre grupos foram realizadas pelos testes de ANOVA de uma ou duas vias, *teste t de student* ou *Tukey*, como adequado. O índice de significância estabelecido foi de $p \leq 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO IMPORTANTES NA IDENTIDADE E MATURAÇÃO DE CÉLULAS β

Analisamos a expressão dos fatores de transcrição importantes na identidade e maturação de ilhotas pancreáticas e especificamente de células β . Observamos um aumento na expressão de INS e MAFA (FIG. 2A/B) nas ilhotas de camundongos adultos em relação às ilhotas de animais em P3 e P9. Diferente do esperado, não houve diferença estatística na expressão de UCN3 (FIG. 2C), há uma tendência de aumento de expressão nas ilhotas de adultos, porém a diferença estatística não foi alcançada talvez pelo tamanho do n amostral. Os níveis de expressão de PAX6 foi diferente nas ilhotas de P3, P9 e adultos (FIG. 2D), com um aumento expressivo nos adultos. Por fim, na expressão de PAX4 e SOX9 (FIG. 2E e 2F) não houve diferença estatística em nenhum estágio.

Figura 2 - Dados da expressão de mRNA de genes relacionados à identidade e maturação nas ilhotas de camundongos C57 neonatos (P3 e P9) e adultos (P45-P60).



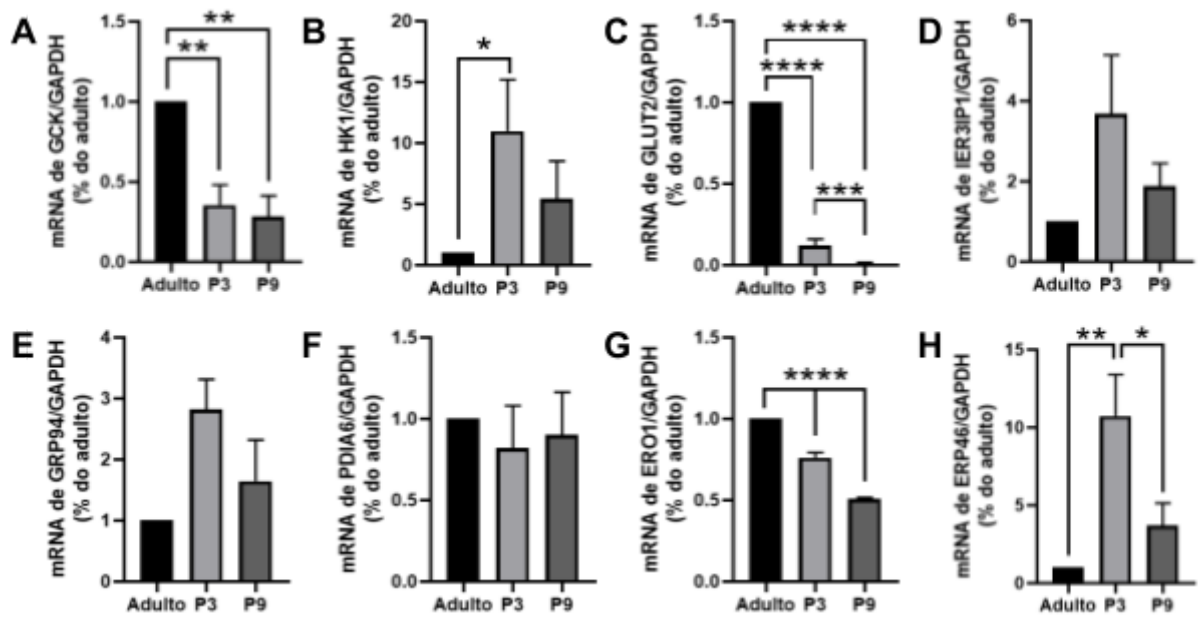
(A) Expressão de *INS* nas ilhotas de camundongos C57; (B) Expressão de *MAFA* nas ilhotas de camundongos C57; (C) Expressão de *UCN3* nas ilhotas de camundongos C57; (D) Expressão de *PAX6* nas ilhotas de camundongos C57; (E) Expressão de *PAX4* nas ilhotas de camundongos C57; (F) Expressão de *SOX9* nas ilhotas de camundongos C57. $n = 3-4$. Os dados apresentados são médias \pm os erros padrão das médias. **** $P < 0,0005$, *** $P < 0,005$.

4.2 EXPRESSÃO DOS GENES ASSOCIADOS À FUNÇÃO DA CÉLULA β PANCREÁTICA

Verificamos a expressão dos genes associados à função e/ou a maquinaria da célula β pancreática. Houve aumento na expressão de GCK (FIG. 3A) nas ilhotas pancreáticas de camundongos adultos quando comparado ao P3 e ao P9. E o inverso foi encontrado na expressão de HK1 (FIG. 3B), onde as ilhotas de camundongos em P3 tiveram uma maior expressão em comparação aos adultos. A expressão de GLUT2 (FIG. 3C) foi diferente entre todos os grupos, visivelmente aumentada nos adultos como o esperado. Não houve diferença estatística na expressão de IER3IP1, GRP94 e PDIA6 (FIG. 3D, 3E e 3F). Na figura 3G, observamos a expressão de ERO1, que teve expressão diferenciadas em todos os grupos, tendo uma maior expressão em adultos, seguidos de P3 e P9. Por fim, também analisamos a expressão de ERP46 (FIG. 3H), que codifica uma proteína

residente no RE com possíveis funções na formação, redução e isomerização de pontes dissulfeto em polipeptídeos, diferente do esperado, ERP46 foi mais expresso em P3 do que em P9 e adultos.

Figura 3 - Dados da expressão de mRNA de genes relacionados à função das células β pancreáticas de camundongos C57 neonatos (P3 e P9) e adultos (P45-P60).



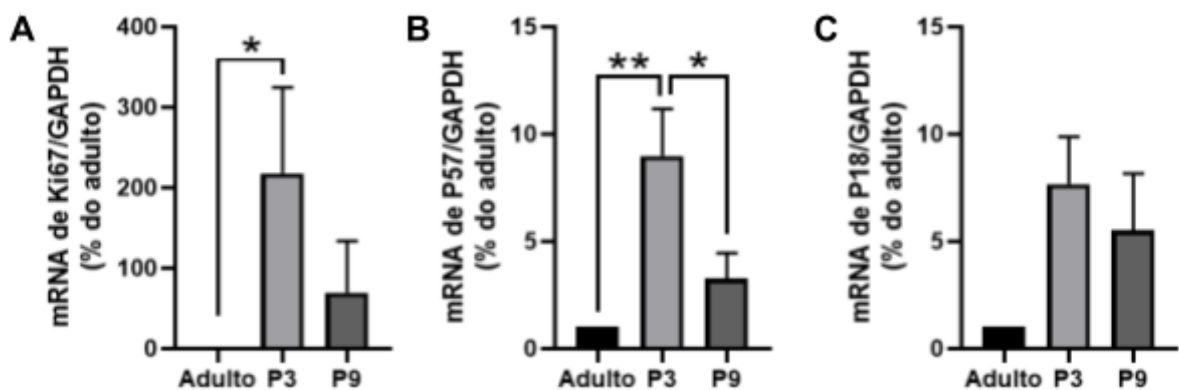
(A) Expressão de *GCK* nas ilhotas de camundongos C57; (B) Expressão de *HK1* nas ilhotas de camundongos C57; (C) Expressão de *GLUT2* nas ilhotas de camundongos C57; (D) Expressão de *IER3IP1* nas ilhotas de camundongos C57; (E) Expressão de *GRP94* nas ilhotas de camundongos C57; (F) Expressão de *PDIA6* nas ilhotas de camundongos C57; (G) Expressão de *ERO1* nas ilhotas de camundongos C57; (H) Expressão de *ERP46* nas ilhotas de camundongos C57. $n = 3$ a 4 . Os dados apresentados são médias \pm os erros padrão das médias. * em $P < 0,05$; ** em $P < 0,005$; *** $P < 0,005$; **** em $P < 0,0005$.

4.3 EXPRESSÃO DOS GENES ASSOCIADOS À PROLIFERAÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

Em relação à proliferação celular, analisamos a expressão de Ki67, P57 e P18. KI67 é um marcador de proliferação celular bastante conhecido que tem função na divisão nuclear mitótica. Ilhotas de camundongos adultos tiveram redução na expressão de KI67 (FIG. 4A) em comparação com o grupo P3, como o esperado, porém a expressão de P57 (FIG. 4B) foi maior nas ilhotas de P3, tendo redução em P9 e adulto. P57 é um inibidor de quinase dependente de ciclina 1C que atua na

inibição do complexo ciclinas D e CDKs e assim reduz a proliferação. Na figura 4C, não encontramos diferença na expressão de P18 em ilhotas de camundongos em P3, P9 e ilhotas de adultos. P18 também é um inibidor de quinase dependente de ciclina 2C e a sua função é semelhante ao P57.

Figura 4 - Dados da expressão de mRNA de genes relacionados à proliferação das células β pancreáticas de camundongos C57 neonatos (P3 e P9) e adultos (P45-P60).



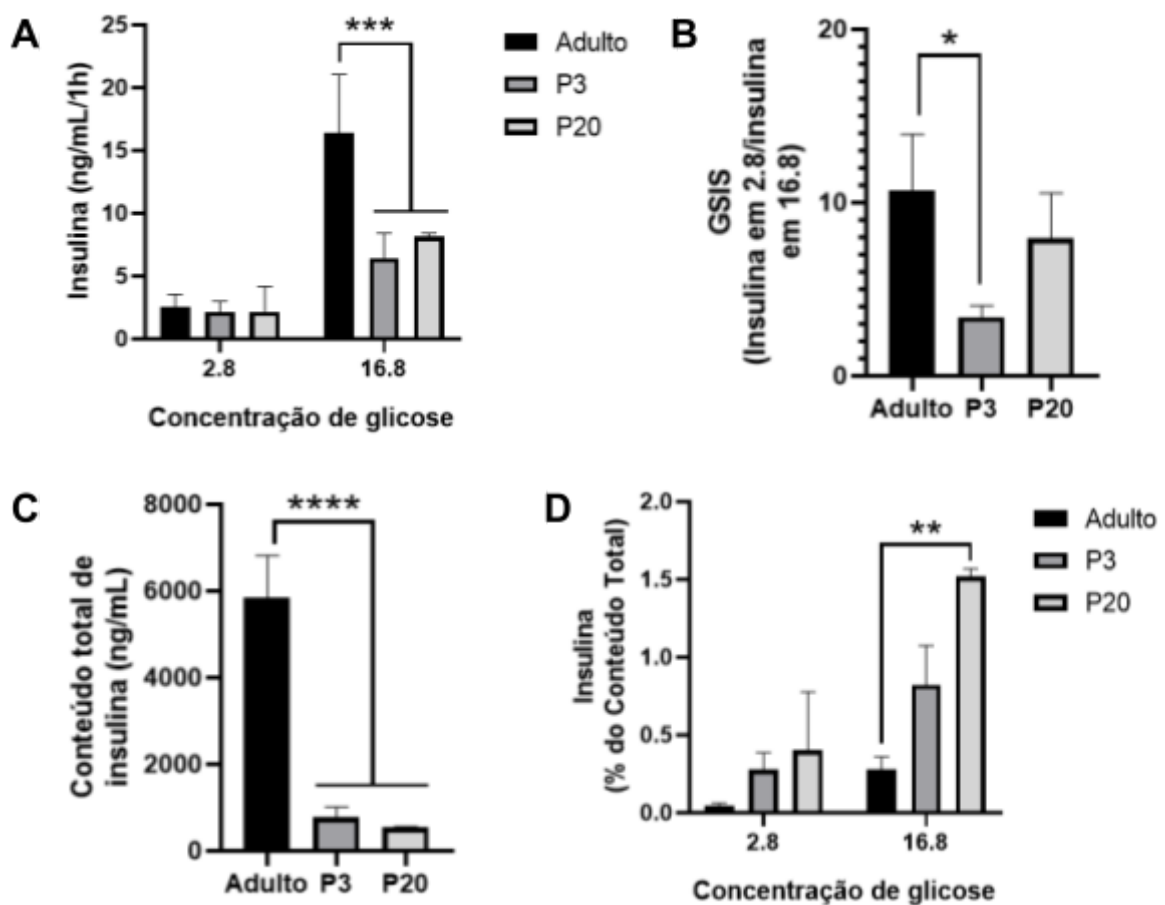
(A) Expressão de *Ki67* nas ilhotas de camundongos C57; (B) Expressão de *P57* nas ilhotas de camundongos C57; (C) Expressão de *P18* nas ilhotas de camundongos C57. $n = 3-4$. Os dados apresentados são médias \pm os erros padrão das médias. * em $P < 0,05$; ** $P < 0,005$.

4.4 SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA PELA GLICOSE

A fim de verificar a secreção de insulina estimulada pela glicose nas ilhotas dos animais em diferentes estágios do desenvolvimento e levando em consideração os resultados do PCR onde verificamos que camundongos em P3 e P9 não apresentavam tantas modificações gênicas, optamos por fazer a GSIS de camundongos em P20, um dia antes do desmame, para observar as diferenças no processo de exocitose de insulina. Observamos que em um estímulo de 16,8mM de glicose, as ilhotas de adultos secretam mais insulina que as ilhotas de P3 e P20 (FIG. 5A). Verificamos ainda a relação de insulina secretada em 2,8mM de glicose pela insulina secretada em 16.8mM de glicose, onde ilhotas de animais adultos apresentaram uma GSIS maior em relação ao P3, mas sem diferença estatística para o P20 (FIG. 5B). Na figura 5C, analisamos o conteúdo total de insulina nas ilhotas e observamos que animais adultos possuem mais insulina no meio

intracelular do que as ilhotas de P3 e P20. Por fim, verificamos a secreção de insulina das ilhotas em relação ao seu conteúdo total e observamos que ilhotas de adultos secretam menos em relação ao seu armazenamento quando comparado com ilhotas de P3 e P20 (FIG. 5D). No gráfico D também é possível observar que em níveis basais de glicose, as ilhotas de P3 e P20 possuem uma secreção relativamente maior que ilhotas de adultos.

Figura 5 - GSIS de ilhotas de camundongos C57 neonatos (P3 e P20) e adultos (P45-P60).

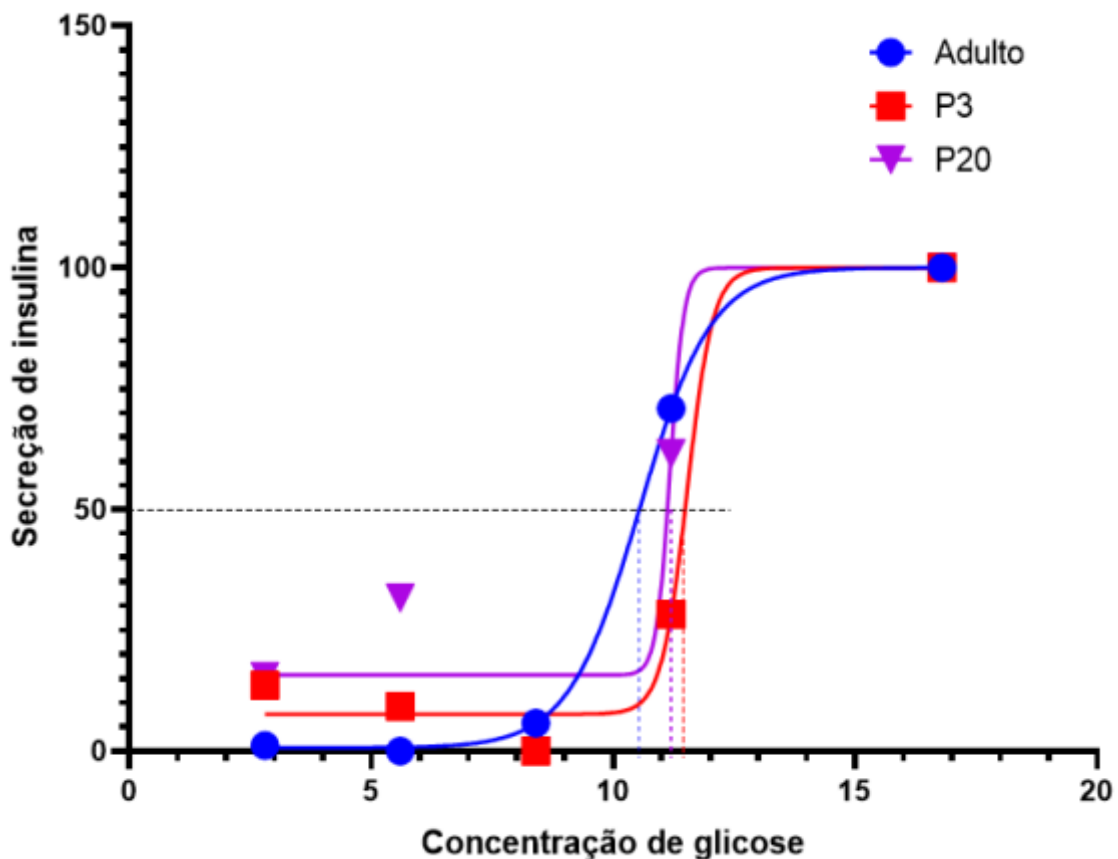


Secreção de insulina estimulada pela glicose de Ilhotas pancreáticas de camundongos C57 com 3, 20 e 45-60 (adultos) dias de idade. (A) Insulina secretada em ng/mL/1h das ilhotas em concentração de 2.8mM e 16.8mM (ANOVA de duas vias); (B) GSIS (razão da insulina secretada em 2.8mM pela insulina secretada em 16.8mM) das ilhotas (teste *t student*); (C) Conteúdo total de insulina em ng/mL das ilhotas (ANOVA de uma via); (D) Porcentagem de insulina secretada em relação ao conteúdo total das ilhotas (ANOVA de duas vias). $n = 3-5$. Os dados foram apresentados como médias \pm SEM. * em $P < 0,05$; ** em $P < 0,005$; *** em $P < 0,0005$; **** em $P < 0,0005$.

Também analisamos a capacidade de secreção de insulina das ilhotas frente a concentrações crescentes de glicose. Ilhotas de adultos chegam em 50% da sua capacidade de secreção com o estímulo de aproximadamente 10mM de glicose,

enquanto que ilhotas de P20 e P3 precisam de um estímulo maior que 11mM para metade da capacidade de secreção (FIG. 6A). Nesse mesmo gráfico, também podemos observar que a secreção de insulina a níveis basais de glicose é maior tanto em P3 e P20 em relação às ilhotas de adultos, essas iniciam o processo de exocitose de insulina com concentrações de glicose em torno de 8,4mM.

Figura 6 - Dados da GSIS de ilhotas de camundongos C57 neonatos (P3 e P20) e adultos (P45-P60) em concentrações crescentes de glicose (2,8, 5,6, 8,4, 11,2 e 16,8mM).



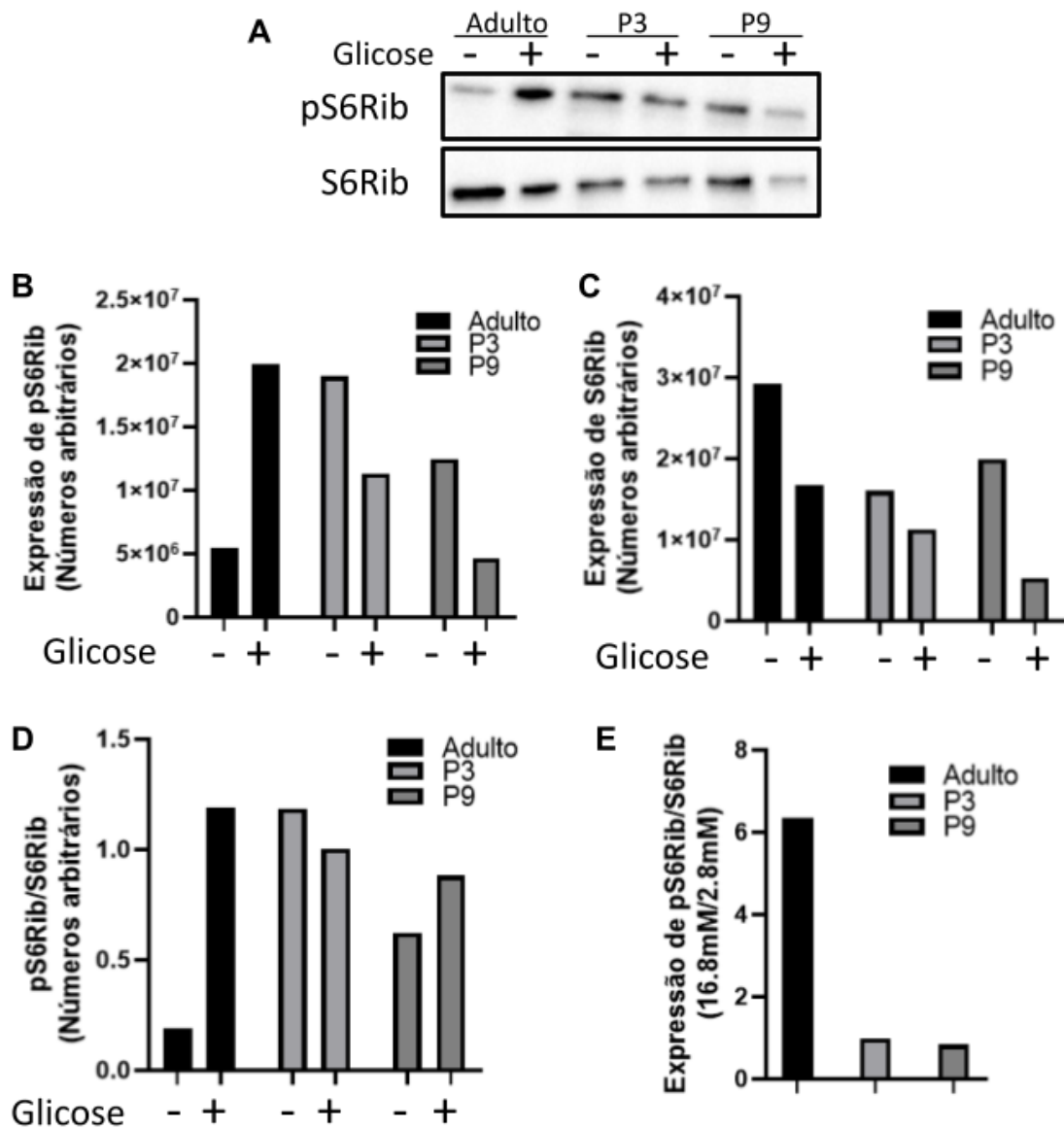
Secreção de insulina estimulada pela glicose de Ilhotas pancreáticas de camundongos C57 com 3, 20 e 45-60 dias de idade após 24h em cultura. Insulina secretada em ng/mL/1h das ilhotas em concentração de 2,8, 5,6, 8,4, 11,2 e 16,8mM (NONLIN FIT). $n = 3-5$. Os dados foram apresentados como médias \pm SEM.

4.5 FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA RIBOSOMAL S6 (S6RIB)

Para avaliar como estava o processo de tradução induzido pela glicose mensuramos o conteúdo proteico total e fosforilado da proteína S6Rib, que é uma proteína chave na tradução proteica e pode ser ativada pelo complexo mTORC1.

Como esses dados representam apenas um experimento não podemos fazer conclusões, entretanto podemos discuti-los e inferir seu significado. Observamos que apenas ilhotas de adultos apresentaram um aumento da fosforilação de S6Rib frente à estimulação de 1 hora com glicose. É importante ressaltar ainda sobre esses resultados, que a quantidade de proteína S6Rib fosforilada em P3 e P9 nas concentrações basais de glicose são maiores que em ilhotas de adultos (FIG. 7A/B). Quando comparamos a fosforilação de S6Rib, ou seja, o conteúdo de pS6Rib em relação a S6Rib total, ilhotas de adultos apresentaram maior fosforilação frente ao estímulo de glicose e ilhotas de P3 diminuem a fosforilação, notamos também que as ilhotas de P9 possuem um leve aumento na fosforilação de S6Rib apesar de apresentarem a fosforilação aumentada em concentrações basais de glicose (FIG. 7D). Além disso, analisamos a fosforilação da proteína S6Rib frente ao estímulo da glicose e observamos que ilhotas de camundongos adultos possuem o aumento de mais de 6 vezes, enquanto que ilhota de P3 e P9 apresentaram aumento da fosforilação da S6Rib somente 1 vez (FIG. 7E).

Figura 7 - Dados da expressão proteica de S6Rib total e fosforilada de ilhotas de camundongos C57 neonatos (P3 e P9) e adultos (P45-P60) em concentrações de 2,8 e 16,8mM de glicose.



Expressão proteica de S6rib total e fosforilada de ilhotas pancreáticas de camundongos C57 com 3, 9 e 45-60 dias após 1 hora de exposição à 2.8 mM de glicose (-) ou 16.8 mM de glicose(+). (A) Imagem representativa da expressão de S6rib e pS6Rib; (B) Expressão de pS6rib; (C) Expressão de S6rib; (D) Expressão de pS6rib em relação a S6Rib total; (E) Delta da fosforilação (pS6Rib/S6Rib) de S6Rib frente ao estímulo de glicose (16mM/2.8mM). n = 1.

5 DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento, a aquisição da capacidade de secretar insulina frente a um estímulo de glicose e a expressão de fatores de transcrição e/ou genes relacionados à função e o processamento da insulina são conquistas fundamentais para uma célula β ser considerada madura.

Com o intuito de traçar planos de treinamento para “ensinar” células β imaturas a se comportarem como células β maduras, investigamos neste trabalho possíveis alterações gênicas e funcionais que ocorrem durante o processo de maturação desse tipo celular. Inicialmente, avaliamos a expressão de genes importantes para a identidade de células β ao longo do processo de maturação (de P3 até Adulto). Nossos dados mostraram que no decorrer do processo de maturação observa-se um aumento na expressão dos genes INS e MAFA (FIG. 2A e 2B). Tanto INS como MAFA são considerados genes chave de maturação, sendo o último um dos principais fatores de transcrição para a insulina (47), como também para a transcrição de UCN3, PDX1 (23) e GLUT2. Em um trabalho realizado com camundongos *knockout* para o MAFA, a célula β sofre desdiferenciação e passa a expressar fatores de imaturidade, como MAFB e neurogenina 3 (Ngn3) (48). Isso mostra que para uma célula β ser funcional é fundamental a expressão do MAFA e, como mostramos essa expressão aumenta no decorrer do processo de maturação. A literatura mostra que a UCN3 é um marcador de maturação em células β (49). Já foi descrito que sua expressão é aumentada em quase 10 vezes em células β de adultos em comparação com células β pancreáticas de camundongos em estágio embrionário (E18.5) (50). Em nosso trabalho não se observou uma diferença estatística na expressão de UCN3 (FIG. 2C) ao longo do processo de maturação, entretanto acreditamos que esse fato se deve ao reduzido n amostral utilizado.

Ainda na análise dos fatores de transcrição importantes para a identidade e maturação das células β pancreáticas, investigamos a expressão do PAX6 em ilhotas de camundongos P3, P9 e Adulto. O PAX6 é um fator de transcrição necessário para o desenvolvimento das células progenitoras endócrinas, importante no desenvolvimento da linhagem endócrina das células pancreáticas. Além disso, participa da ativação de promotores do gene da insulina e de outros genes das células β (51). Aqui, mostramos que células β maduras (Adulto) apresentam maior expressão gênica desse fator de transcrição em comparação com células imaturas

(P3 e P9) (FIG. 2D). Sabe-se que camundongos *knockout* para PAX6 apresentam redução na expressão de mRNA de fatores de transcrição como MAFA, NKX6.1 e INS, bem como prejuízo no processamento da insulina (52). Corroborando esses dados, outro grupo também identificou nesse modelo menor expressão proteica de MAFA, NKX6.1, GLUT2 e GCK, bem como redução na presença de peptídeo C (53). Dessa forma, o aumento da expressão de PAX6 e MAFA explicam a maior expressão de GLUT2 (FIG. 3C) durante a maturação encontrada em nosso trabalho. MAFA pode atuar sinergicamente com NeuroD1 e HNF1 α /HNF1 β para ativar a região intensificadora do gene GLUT2 (54-55).

Para finalizar a análise dos fatores de transcrição importantes para a identidade e maturação das células secretoras de insulina, observamos a expressão do fator de transcrição PAX4 e SOX9. PAX4 é um fator presente principalmente no início do desenvolvimento, sendo importante na diferenciação e proliferação de células β pancreáticas imaturas e em células β pancreáticas maduras está envolvido com vias de sinalização de citocinas e regulador da plasticidade celular (56). O SOX9, por sua vez, é mais expresso em células pré-endócrinas, onde permite a atividade da Ngn3 que participa na transição de célula do tecido exócrino em células progenitoras endócrinas (57). Em nosso trabalho, observamos menor expressão de SOX9 nas ilhotas de adultos, mostrando que as ilhotas de P3 e P9 são realmente imaturas. Apesar da diferença estatística não ser alcançada na expressão desses dois genes (FIG. 2E e 2F), é possível observar uma tendência de redução na expressão desses dois fatores de transcrição ao decorrer da maturação, o que poderia ser explicado por terem maiores funções relacionadas às células imaturas.

Com o intuito de analisar os fatores de transcrição relacionados com a função da célula β pancreática, observamos a expressão de GCK e HK1. A GCK é uma enzima fundamental para a função da célula β pancreática madura, fazendo parte diretamente do metabolismo da glicose e da secreção de insulina. A sua superexpressão em camundongos diabéticos induzidos por HFD (*high fat diet*) melhorou a função da célula β e, por melhorar o metabolismo da glicose promoveu maior expressão gênica de canais de K⁺ sensíveis a ATP, canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem e outros genes da via da proteína quinase dependente de Ca²⁺/calmodulina (58). Já em células β imaturas, a hexoquinase é responsável por iniciar o metabolismo da glicose. A HK1 apresenta um *K_m* alto (0,1mM) para a glicose em comparação com a GCK (10mM). Assim, baixas concentrações de

glicose já ativam a HK1, enquanto que a GCK necessita de maiores concentrações de glicose para ser ativada, sendo esta considerada a responsável pelo limiar da concentração de glicose para a secreção de insulina (15). Dessa forma, para que a secreção de insulina ocorra apenas em condições estimulatórias de glicose, é necessário que a HK1 seja reprimida no período de maturação e que a GCK seja expressa em seu lugar. Nossos dados mostraram exatamente esse *shift*, observamos maior expressão de GCK (FIG. 3A) e redução da expressão de HK1 (FIG. 3B) ao longo do processo de maturação de células β pancreáticas.

Também verificamos a expressão dos genes relacionados com a função do RE, como o IER3IP1, GRP94 e o PDIA6, e assim analisar o processamento da insulina nas ilhotas ao decorrer da maturação. A atuação e a quantidade de proteínas do RE indicam a qualidade do dobramento da pró-insulina e consequentemente, a formação eficiente de grânulos de insulina para a exocitose. A proteína GRP94 é uma chaperona abundante no lúmen do RE e possui várias funções a fim de garantir a sua qualidade. GRP94 atua em conjunto com as proteínas PDIs, como a PDIA6, que é uma enzima residente do RE que tem atividade oxidoreductase e isomerase, catalisando a formação de pontes dissulfeto (59). Além disso, a GRP94 pode atuar no armazenamento de Ca^{2+} e no direcionamento de proteínas mal dobradas para degradação. Camundongos com deleção de GRP94 tiveram uma redução no volume do pâncreas durante o estágio embrionário, como também uma redução da massa de células β e prejuízo na secreção de insulina após o nascimento (60). Já a proteína IER3IP1 é uma enzima presente na membrana do RE e tem função no transporte de proteínas secretoras entre RE e Complexo de Golgi. Há indícios de que essa proteína não atua diretamente na biossíntese de insulina, mas sim na redução do tamanho da ilhota e na diminuição da massa de células β . Além disso, as ilhotas de camundongos adultos *knockout* para IER3IP1 apresentaram uma regulação negativa na transcrição de genes do ciclo celular, da proliferação e da maturação da célula β , como também tiveram estresse do RE pelo mal dobramento oxidativo da pró-insulina (61). Não obtivemos diferença estatística na expressão de IER3IP1 (FIG. 3D) e na expressão de GRP94 (FIG. 3E), porém esses genes codificam proteínas que desempenham um papel essencial na fisiologia das ilhotas pancreáticas, podendo atuar em processos de proliferação em células imaturas e na qualidade do RE em células maduras. Assim, é necessário maior aprofundamento na função dessas proteínas

durante o processo de maturação para determinar seu papel no processamento pós-traducional da insulina e como esse papel poderia contribuir para a maturação.

Devido a função da isomerase PDIA6, acreditávamos que ela estaria relativamente constante durante todas as fases de desenvolvimento, com um leve aumento em células β maduras. Sabe-se que o PDIA6 é essencial na fase embrionária, animais *knockout* em homozigose para PDIA6 não sobreviviam, já em heterozigose, esses animais apresentaram aumento da concentração de glicose sanguínea e perda da massa de célula β no período neonatal. Vale destacar que essa redução de massa de célula β não era causada por apoptose e sim por desdiferenciação, com diminuição da expressão de INS, GLUT2, NKX6.1 e aumento na expressão de glucagon (GCG) (38). Por essa razão, mesmo que não observando diferença estatística para PDIA6 (FIG. 3F), sua expressão é necessária para a aquisição de marcadores de célula β madura e automaticamente, importante na maturação.

Finalizando a expressão de genes envolvidos na função de célula β pancreática, analisamos a expressão de mRNA de ERO1 e ERp94. ERO1 é um gene que codifica uma proteína denominada oxirredutina 1 e essa por sua vez, controla a atividade das PDIs. O *Knockdown* de ERO1 em células Min6 promove um atraso na maturação da pró-insulina (dobramento incorreto) e mutações no gene ERO1 em camundongos afeta negativamente o armazenamento da insulina (62). Observamos a expressão de ERO1 aumentada ao longo do tempo (FIG. 3G), e apesar de não termos visto o mesmo resultado para a PDIA6, esse resultado indica uma participação importante no processamento da insulina durante a maturação. Já ERp46, que codifica a proteína 46 residente no RE, interage com a pró-insulina, sendo assim, acreditávamos que níveis reduzidos de ERp46 podem levar a alterações na produção de insulina. Porém, sabe-se que em concentrações elevadas de glicose, a expressão de ERp46 é reduzida (63), como sua expressão foi aumentada em células imaturas e ao longo da maturação foi diminuindo (FIG. 3H), acreditamos que o aumento do suprimento de glicose no período neonatal devido às mudanças alimentares pode ter influência na supressão desse gene e, sua função em célula β madura deve ser mais investigada.

A expressão de genes relacionados à proliferação celular, como o Ki67, P57 e P18 também foi analisada em nosso trabalho. O Ki67 é um marcador de proliferação celular que tem diferentes níveis de expressão durante o ciclo celular,

apresentando um pico de expressão durante a fase S, principalmente na metáfase (64-65). P57 é um inibidor do complexo de ciclinas e CDKs e faz com que a célula permaneça na fase G1 do ciclo celular. Estudos em ilhotas de camundongos já encontraram a atividade de P57 no período embrionário (E10.5-e12.5) atuando com Hes1 para regular a proliferação das células, ou seja, P57 e Hes1 estimulam a saída do ciclo celular e assim coordenam o número de progenitores pancreáticos (66). Em humanos, observou-se que a P57 apresenta uma expressão maior em células β no período da infância (67), como também já foi demonstrado que sua supressão aumentou a expressão de BrdU, um marcador permanente das células em proliferação (68). A P18, também é uma CDKI que inibe os complexos ciclinas e CDKs, inibindo o ciclo G0/G1. O seu silenciamento pode fazer com que células entrem na fase do G1/S (69). Aqui, observamos um grande aumento na expressão de Ki67 nas ilhotas de P3 e P9 em comparação com adultos, o que indica que essas células estão em uma fase bem imatura, pois células maduras permanecem na fase G0/G1 e nesta fase não existe expressão de Ki67 (FIG. 4A). No entanto, diferente do esperado, a expressão de P57 e P18 foi maior em células β imaturas (FIG. 4B e 4C). Imaginamos que essa expressão aumentada de P57 no período neonatal inicial ocorre devido a sua atuação na saída do ciclo celular e assim garantir uma melhor diferenciação/maturação celular. O P18 foi mais expresso nesse momento também para inibir o processo de proliferação celular, ambos seguindo uma redução na expressão pela estabilização da quantidade e do tamanho das células.

Diante desses resultados, podemos concluir que células β pancreáticas em estágio P3 e P9 são células imaturas e que, a partir de então, sofrem uma mudança mais acentuada na expressão de fatores de transcrição e genes relacionados à identidade e à função secretória de insulina, o que as tornam células maduras.

Seguindo no objetivo de analisar as alterações funcionais ao longo do processo de maturação, avaliamos a secreção de insulina estimulada pela glicose em ilhotas nos estágios P3, P20 e Adulto.

No nosso trabalho, ao decorrer da maturação as células β mostraram uma maior secreção de insulina em concentrações de 16.8mM de glicose, tanto a secreção bruta (FIG. 5A) quanto a relação com a secreção de 2.8mM de glicose (FIG. 5B). As células β neonatais apresentam uma taxa de oxidação de glicose através da via glicolítica e células β maduras apresentam a oxidação da glicose

através da via da fosforilação oxidativa, com maior participação da mitocôndria. Com isso, não se observa uma resposta à glicose em células imaturas, pois essas células já apresentam uma secreção elevada de insulina em níveis basais de glicose, o que as confere uma baixa sensibilidade à glicose (70). O metabolismo da glicose é de suma importância para a secreção de insulina, sabemos que células imaturas possuem maior atividade da HK1 e, a partir das mudanças ambientais e das sinalizações as células β vão adquirindo o fenótipo de célula madura juntamente com a expressão da GCK, que por sua vez substitui a HK1 a fim de garantir que um limiar da glicose seja estabelecido (71-72). Além disso, outros fatores podem interferir na secreção de insulina, como a atividade da AMPK (73), proteínas transmembranares que auxiliam no transporte e secreção dos grânulos (74), a atividade da PDH (75), o influxo de Ca^{2+} , a atividade mitocondrial (76), entre outros. Nos dados de expressão gênica, vimos que as células imaturas possuem uma menor expressão de MAFA e INS, assim como outros trabalhos relatam a importância desses fatores de transcrição, como também do PDX1, NKX2.1 para promover a maturação e a responsividade da célula β à glicose (23). No entanto, quando observamos os dados da secreção de insulina das células β em comparação com seu conteúdo total de insulina, observamos que as células imaturas secretam mais insulina em relação à quantidade de insulina em seu interior (FIG. 5D). A maior expressão de INS ao longo da maturação nos ajuda a entender também o motivo das células β maduras possuírem o conteúdo total de insulina maior do que células β imaturas em nosso trabalho (FIG. 5C), mas não está claro o fato das células β imaturas liberarem mais insulina em relação ao seu conteúdo total, imaginamos que seja a capacidade imatura de processamento, armazenamento e secreção do hormônio, porém mais investigações devem ser feitas.

Além desses dados, buscamos avaliar o *threshold* exato para a secreção de insulina das células β . Células β pancreáticas de camundongos adultos apresentaram o limiar para secreção em torno de 6mM de glicose, enquanto que células β de P3 e P20 apresentaram um limiar entre 10 e 11mM de glicose (FIG. 6A), isso porque células imaturas já apresentam uma secreção de insulina maior em concentrações basais de glicose. As células β de neonatos, pelo menos até P7, possuem menos canais de K^+ sensíveis ao ATP em sua membrana e, que isso contribuiria para as diferenças nesses limiares, enquanto que a partir de P14 as células já alcançariam o limiar de célula β madura, apesar de que em nosso trabalho

P20 apresenta um limiar de célula imatura (77). De qualquer forma, acredita-se que essa menor sensibilidade à glicose esteja entre o metabolismo da glicólise e a despolarização da membrana, como também na maquinaria de secreção. A secreção de insulina em períodos neonatais iniciais pode ser feita por receptor 1 de ácidos graxos livres (FFA1) e proteínas G do tipo Gq enquanto a maturação funcional não é atingida. A proteína Gq é sinalizada na sequência de FFA1 e atua na inibição de um canal de K⁺ hiperpolarizante, estimulando a secreção de insulina mesmo que em concentrações baixas de glicose (78).

Além disso, camundongos neonatos a partir de P6 iniciam uma transição na secreção de insulina, a partir de estímulos de aminoácidos e glicose de forma isolada. Em células imaturas, os aminoácidos podem ativar o complexo mTORC1 e isso é o suficiente para a secreção de insulina constante, e de maneira oposta, com a mudança de nutrientes e aumento da concentração de glicose há uma supressão da atividade de mTORC1 pela maior atividade da AMPK, sendo essencial também para a transição de secreção de insulina estimulada pela glicose (79). Apesar de não podermos concluir e nem comparar com a atividade da AMPK, é importante ressaltar que a fosforilação de S6Rib em ilhotas de neonatos é pouco aumentada frente ao estímulo de glicose, enquanto que em adultos, onde a célula β responde melhor à glicose, a S6Rib é aumentada (FIG. 7B e 7E). Em camundongo e em ilhotas foi demonstrado que condições de jejum prolongado foi difícil identificar a atividade mTORC1, enquanto que em condições estimulatórias de glicose ou após a alimentação dos animais, a mTORC1 é ativada. Nesse estudo, foi concluído que ao invés da inatividade de mTORC1 ao decorrer da maturação, esse complexo poderia se moldar em relação a troca de nutrientes no período pós-natal, pois se demonstrou necessária para a secreção de insulina pós-prandial (80).

De acordo com nossos dados e com o que está descrito na literatura, há controvérsias sobre a maturação funcional e o momento exato em que a célula β pancreática se torna efetivamente responsiva à glicose. De acordo com nosso experimento da GSIS, acreditamos que em P20 as células β ainda não estejam completamente maduras, pois elas não apresentam características funcionais como as células β de camundongos adultos. Considera-se que células β se tornam maduras na segunda semana de vida, entre P2 e P9, como também em P14 (27, 50, 81), mas vale ressaltar que em P20 os animais estão na mudança de dieta, pois o desmame acontece 21 dias após o nascimento, o que enfatiza a influência da

glicose como um fator ambiental para melhorar a responsividade da célula β à glicose, apesar de não conhecermos ainda todos os mecanismos que levam à maturação de fato. Dessa forma, podemos concluir que fatores de transcrição importantes na identidade e para a maturidade da célula β pancreática, como INS, MAFA, PAX6, GCK, GLUT2, ERO1, são aumentados a partir do 9º dia após o nascimento, mas diferente disso, a GSIS eficiente é alcançada somente após o 20º dia após o nascimento.

E para finalizar, uma dúvida do nosso grupo de pesquisa é se a razão da secreção de insulina em células β maduras em relação ao conteúdo total de insulina é menor do que em células imaturas é explicado pela quantidade de insulina armazenada? E esse pouco armazenamento é devido à pouca maturação da maquinaria de processamento e exocitose, como proteínas e enzimas do RE e dos grânulos de insulina, ou somente pela diferença do metabolismo da glicose e da atividade energética? Devido a esta questão pretendemos dar continuidade ao nosso trabalho.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A hipótese do nosso trabalho era que ao decorrer da maturação as células β pancreáticas apresentariam uma alteração na funcionalidade (aumento de GSIS) decorrente de um aumento nos genes UCN3, MAFA e PAX6. Investigamos algumas alterações funcionais, transcricionais e metabólicas que ocorrem durante a maturação das células β pancreáticas, mas ainda não conseguimos determinar o exato momento da maturação. Podemos concluir que fatores de transcrição importantes na identidade e para a maturidade da célula β pancreática, como INS, MAFA, PAX6, GCK, GLUT2, ERO1, são aumentados a partir do 9º dia após o nascimento, mas diferente disso, a GSIS eficiente é alcançada somente após o 20º dia após o nascimento.

É necessário analisar a expressão proteica de várias outras proteínas além da AMPK e mTORC, como proteínas e enzimas do RE e dos grânulos de insulina, a fim de analisar como está a capacidade pós-transcricional da célula β pancreática e como está a atividade dessas proteínas. Dessa forma, se torna necessário continuar investigando mais sobre a maturação de células beta pancreáticas.

REFERÊNCIAS

1. Hong, S., et al.. **IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045.** *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 2022.
2. Huang, E.S., et al.. **Projecting the future diabetes population size and related costs for the U.S.** *Diabetes Care*. 32(12): 2225-9, 2009.
3. Eizirik, D.L., Pasquali, L. and Cnop, M.. **Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure.** *Nature Reviews Endocrinology*. 16: 349–362, 2020.
4. Rezende, L.F., et al.. **Ciliary neurotrophic factor (CNTF) protects non-obese Swiss mice against type 2 diabetes by increasing beta cell mass and reducing insulin clearance.** *Diabetologia*. 55(5): 1495-504, 2012.
5. Yong, J., et al.. **Therapeutic opportunities for pancreatic β -cell ER stress in diabetes mellitus.** *Nature Reviews Endocrinology*. 17(8): 455-467, 2021.
6. Weir, G.C. and Bonner-Weir, S.. **Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes.** *Diabetes*. 53(3): 16-21, 2004.
7. Mittelman, S.D., et al.. **Longitudinal compensation for fat-induced insulin resistance includes reduced insulin clearance and enhanced beta-cell response.** *Diabetes*. 49(12): 2116-25, 2000.
8. Persaud, S. J., and Jones, P. M.. **A wake-up call for type 2 diabetes?.** *New England Journal of Medicine*, 375(11): 1090-1092, 2016.
9. Ceriello, A. and Prattichizzo, F.. **Variability of risk factors and diabetes complications.** *Cardiovascular Diabetology*. 20(1): 101, 2021.
10. Pagliuca, F.W., et al.. **Generation of functional human pancreatic β cells in vitro.** *Cell*. 159(2): 428-39, 2014.
11. Afelik, S. and Rovira, M.. **Pancreatic β -cell regeneration: Facultative or dedicated progenitors?.** *Molecular and Cellular Endocrinology*. 445: 85-94, 2017.
12. Karimova, M.V., Gvazava, I.G., and Vorotelyak, E.A.. **Overcoming the Limitations of Stem Cell-Derived Beta Cells.** *Biomolecules*. 12(6): 810, 2022.
13. D'Amour, K.A., et al.. **Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm.** *Nat. Biotechnology*. 23: 1534–154, 2005.

14. Mfopou, J.K., et al.. **Noggin, retinoids, and fibroblast growth factor regulate hepatic or pancreatic fate of human embryonic stem cells.** *Gastroenterology*. 138: 2233–2245, 2010.
15. Liu, J.S. and Hebrok, M.. **All mixed up: defining roles for β -cell subtypes in mature islets.** *Genes & Development*. 31(3): 228-240, 2017.
16. Kondo Y., et al.. **iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes.** *Journal of Diabetes Investigation*. 9(2): 234-243, 2018.
17. Petersen, M.B.K., et al.. **Single-Cell Gene Expression Analysis of a Human ESC Model of Pancreatic Endocrine Development Reveals Different Paths to β -Cell Differentiation.** *Stem Cell Reports*. 9(4): 1246-1261, 2017.
18. Rezania, A., et al.. **Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells.** *Nat. Biotechnol*. 32(11): 1121-33, 2014.
19. Jacovetti, C., and Regazzi, R.. **Mechanisms Underlying the Expansion and Functional Maturation of β -Cells in Newborns: Impact of the Nutritional Environment.** *International Journal of Molecular Sciences*. 23(4): 2096, 2022.
20. Nicholls, D.G.. **The Pancreatic β -Cell: A Bioenergetic Perspective.** *Physiological Reviews*. 96(4): 1385-447, 2016.
21. Rutter, G. A.. **Nutrient–secretion coupling in the pancreatic islet β -cell: recent advances.** *Molecular Aspects of Medicine*, 22(6): 247–284, 2001.
22. Diane, A., et al.. **β -cell mitochondria in diabetes mellitus: a missing puzzle piece in the generation of hPSC-derived pancreatic β -cells?** *Journal of Translational Medicine*. 20(1): 163, 2022.
23. Nasteska, D., et al.. **PDX1^{LOW} MAFA^{LOW} β -cells contribute to islet function and insulin release.** *Nature Communications*. 29;12(1): 674, 2021.
24. Benninger, R.K.P., and Hodson, D.J.. **New Understanding of β -Cell Heterogeneity and In Situ Islet Function.** *Diabetes*. 67(4): 537-547, 2018.
25. Balboa, D., et al.. **Functional, metabolic and transcriptional maturation of human pancreatic islets derived from stem cells.** *Nature Biotechnology*. 40(7): 1042-1055, 2022.
26. Smith, G.M. and Gallo, G.. **The role of mitochondria in axon development and regeneration.** *Developmental Neurobiology*. 78(3): 221-237, 2018.
27. Stolovich-Rain, M., et al.. **Weaning triggers a maturation step of pancreatic β cells.** *Developmental Cell*. 32(5): 535-45, 2015.

28. Yoshihara, E., et al.. **ERR γ Is Required for the Metabolic Maturation of Therapeutically Functional Glucose-Responsive β Cells.** *Cell Metabolism*. 23(4): 622-34, 2016.
29. Kone, M., et al.. **LKB1 and AMPK differentially regulate pancreatic β -cell identity.** *The FASEB Journal*. 28(11): 4972-85, 2014.
30. Ni, Q., et al.. **Raptor regulates functional maturation of murine beta cells.** *Nature Communications*. 8: 15755, 2017.
31. Jaafar, R., et al.. **mTORC1 to AMPK switching underlies β -cell metabolic plasticity during maturation and diabetes.** *Journal of Clinical Investigation*. 129(10): 4124-4137, 2019.
32. Ni, Q.. **mTORC1 is required for epigenetic silencing during β -cell functional maturation.** *Molecular Metabolism*. 64: 101559, 2022.
33. Sun, Z.Y., et al.. **Functional maturation of immature β cells: A roadblock for stem cell therapy for type 1 diabetes.** *World Journal of Stem Cells*. 13(3): 193-207, 2021.
34. Wortham, M. and Sander, M.. **Transcriptional mechanisms of pancreatic β -cell maturation and functional adaptation.** *Endocrinology and Metabolism*. 32(7): 474-487, 2021.
35. Pullen, T.J. and Rutter, G.A.. **When less is more: the forbidden fruits of gene repression in the adult β -cell.** *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 15(6): 503-12, 2013.
36. Nishimura, W., Takahashi, S. and Yasuda, K.. **MafA is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice.** *Diabetologia*. 58: 566–574, 2015.
37. Lee, J.H and Lee, J.. **Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Its Role in Pancreatic β -Cell Dysfunction and Senescence in Type 2 Diabetes.** *International Journal of Molecular Sciences*. 23(9): 4843, 2022.
38. Chhabra, N.F., et al.. **A point mutation in the Pdia6 gene results in loss of pancreatic β -cell identity causing overt diabetes.** *Molecular metabolism*. 54: 101334, 2021.
39. Aitken, T.J., et al.. **Decreased proliferation of aged rat beta cells corresponds with enhanced expression of the cell cycle inhibitor p27^{KIP1}.** *Biology of the Cell*. 113(12): 507-521, 2021.
40. Blagosklonny, M.V.. **Rapamycin, proliferation and geroconversion to senescence.** *Cell Cycle*. 17(24): 2655-2665, 2018.

41. Kulkarni, R.N., et al.. **Human β -cell proliferation and intracellular signaling: driving in the dark without a road map.** *Diabetes*. 61(9): 2205-13, 2012.
42. Blandino-Rosano, M., et al.. **Loss of mTORC1 signalling impairs β -cell homeostasis and insulin processing.** *Nature Communications*. 12(8): 16014, 2017.
43. Ingham, M. and Schwartz, G.K.. **Cell-Cycle Therapeutics Come of Age.** *Journal of Clinical Oncology*. 35(25): 2949-2959, 2017.
44. Zhou, H., et al.. **Pharmacological or transcriptional inhibition of both HDAC1 and 2 leads to cell cycle blockage and apoptosis via p21^{Waf1/Cip1} and p19^{INK4d} upregulation in hepatocellular carcinoma.** *Cell Proliferation*. 51(3): e12447, 2018.
45. Chen, H., et al.. **PDGF signalling controls age-dependent proliferation in pancreatic β -cells.** *Nature*. 478(7369): 349-55, 2011.
46. Chen, H., et al.. **Polycomb protein Ezh2 regulates pancreatic beta-cell Ink4a/Arf expression and regeneration in diabetes mellitus.** *Genes & Development*. 23(8): 975-85, 2009.
47. Matsuoka, T.A., et al.. **The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(9): 2930-3, 2004.
48. Deng, Z., et al.. **MafB Maintains β -Cell Identity under MafA-Deficient Conditions.** *Molecular and Cellular Biology*. 42(8): e0054121, 2022.
49. Flisher, M.F., Shin, D. and Huising, M.O.. **Urocortin3: Local inducer of somatostatin release and bellwether of beta cell maturity.** *Peptides*. 151, 2022.
50. Blum, B., et al.. **Functional beta-cell maturation is marked by an increased glucose threshold and by expression of urocortin 3.** *Nature Biotechnology*. 30(3): 261-4, 2012.
51. Ashery-Padan, R., et al.. **Conditional inactivation of Pax6 in the pancreas causes early onset of diabetes.** *Developmental Biology*. 269(2): 479-488, 2004.
52. Ahmad, Z., et al.. **Pax6 Inactivation in the Adult Pancreas Reveals Ghrelin as Endocrine Cell Maturation Marker.** *Plos One*. 10(12): e0144597, 2015.
53. Gosmain, Y., et al.. **Pax6 is crucial for β -cell function, insulin biosynthesis, and glucose-induced insulin secretion.** *Molecular endocrinology*. 26(4): 696-709, 2012.

54. Ono, Y., and Kataoka, K.. **MafA, NeuroD1, and HNF1 β synergistically activate the Slc2a2 (Glut2) gene in β -cells.** Journal of Molecular Endocrinology, 67(3): 71-82, 2021.
55. Low, B.S.J., et al.. **Decreased GLUT2 and glucose uptake contribute to insulin secretion defects in MODY3/HNF1A hiPSC-derived mutant β cells.** Nature Communications. 12(1): 3133, 2021.
56. Brun, T. and Gauthier, B. R.. **A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet β -cell expansion and survival in health and disease.** Journal of Molecular Endocrinology. 40(2): 37-45, 2008.
57. McDonald, E., et al.. **SOX9 regulates endocrine cell differentiation during human fetal pancreas development.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 44(1): 72-83, 2012.
58. Lu, B., et al.. **Impaired β -cell glucokinase as an underlying mechanism in diet-induced diabetes.** Disease Models & Mechanisms. 11(6): dmm033316, 2018.
59. Rohli, K.E., et al.. **Nutrient Regulation of Pancreatic Islet β -Cell Secretory Capacity and Insulin Production.** Biomolecules. 12(2): 335, 2022.
60. Kim, D.S., et al.. **GRP94 Is an Essential Regulator of Pancreatic β -Cell Development, Mass, and Function in Male Mice.** Endocrinology. 159(2): 1062-1073, 2018.
61. Yang, J., et al.. **IER3IP1 is critical for maintaining glucose homeostasis through regulating the endoplasmic reticulum function and survival of β cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 119(45): e2204443119, 2022.
62. Zito, E., et al.. **ERO1-beta, a pancreas-specific disulfide oxidase, promotes insulin biogenesis and glucose homeostasis.** Journal of Cell Biology. 188(6): 821-32, 2010.
63. Lampropoulou, E., Lymperopoulou, A. and Charonis, A.. **Reduced expression of ERp46 under diabetic conditions in β -cells and the effect of liraglutide.** Metabolism. 65(1):7-15, 2016.
64. Juríková, M., et al.. **Ki67, PCNA and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer.** Acta Histochemica. 118(5): 544-552, 2016.
65. Gupta, R.K., et al.. **Expansion of adult beta-cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4alpha.** Genes & Development. 21(7): 756-69, 2007.
66. Georgia, S., et al.. **p57 and Hes1 coordinate cell cycle exit with self-renewal of pancreatic progenitors.** Developmental Biology. 298(1): 22-31, 2006.

67. Kassem, S.A., et al.. **p57^{KIP2} Expression in Normal Islet Cells and in Hyperinsulinism of Infancy.** *Diabetes*. 50(12): 2763–2769, 2001.
68. Mead, T.J. and Lefebvre, V.. **Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections.** *Methods in Molecular Biology*. 11(30): 233-243, 2014.
69. Robitaille, K., et al.. **High-throughput Functional Genomics Identifies Regulators of Primary Human Beta Cell Proliferation.** *Journal of Biological Chemistry*. 291(9): 4614-25, 2016.
70. Boschero, A.C., et al.. **d-Glucose and l-leucine metabolism in neonatal and adult cultured rat pancreatic islets.** *Molecular and Cellular Endocrinology*. 73(1): 63-71, 1990.
71. Matschinsky, F.M.. **Regulation of Pancreatic β -Cell Glucokinase: From Basics to Therapeutics.** *Diabetes*. 51(s3): S394–S404, 2002.
72. Matschinsky, F.M. and Wilson, D.F.. **The Central Role of Glucokinase in Glucose Homeostasis: A Perspective 50 Years After Demonstrating the Presence of the Enzyme in Islets of Langerhans.** *Frontiers in Physiology*. 6(10): 148, 2019.
73. Huang, Q., et al.. **Loss of LAMTOR1 in pancreatic β -cells increases glucose-stimulated insulin secretion in mice.** *International Journal of Molecular Medicine*. 45(1): 23-32. 2020.
74. Yang, Y., et al.. **The phosphatidylserine flippase β -subunit Tmem30a is essential for normal insulin maturation and secretion.** *Molecular Therapy*. 29(9): 2854-2872, 2021.
75. Wang, X., et al.. **Conditional knockout of pyruvate dehydrogenase in mouse pancreatic β -cells causes morphological and functional changes.** *Molecular Medicine Reports*. 21(4): 1717-1726, 2020.
76. Ježek, P., et al.. **Contribution of Mitochondria to Insulin Secretion by Various Secretagogues.** *Antioxidants & Redox Signaling*. 36(13-15): 920-952, 2022.
77. Yang, J., et al.. **Decreased K^{ATP} Channel Activity Contributes to the Low Glucose Threshold for Insulin Secretion of Rat Neonatal Islets.** *Endocrinology*. 162(9): bqab121, 2021.
78. Lorza-Gil, E., et al. **Glucose-stimulated insulin secretion depends on FFA1 and Gq in neonatal mouse islets.** *Diabetologia*. 66(8): 1501-1515, 2023.
79. Helman, A., et al.. **A Nutrient-Sensing Transition at Birth Triggers Glucose-Responsive Insulin Secretion.** *Cell Metabolism*. 31(5): 1004-1016.e5, 2020.

80. Israeli, T., et al.. **Nutrient Sensor mTORC1 Regulates Insulin Secretion by Modulating β -Cell Autophagy.** *Diabetes*. 71(3): 453-469, 2022.
81. Sakhneny, L., et al.. **The postnatal pancreatic microenvironment guides β cell maturation through BMP4 production.** *Developmental Cell*. 56(19): 2703-2711, 2021.

ANEXO A



Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA DURANTE A MATURAÇÃO DE CÉLULA BETA PANCREÁTICA COMO GUIA PARA MELHORAR A FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS HPSC-BETA.", protocolada sob o CEUA nº 2465200522 (ID 002151), sob a responsabilidade de **Gustavo Jorge dos Santos e equipe; Flávia da Silva Wagner** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 04/07/2022.

We certify that the proposal "Metabolic reprogramming during beta-cell maturation as a guide to improving hPSC-beta functionality.", utilizing 822 isogenic mice (males and females), protocol number CEUA 2465200522 (ID 002151), under the responsibility of **Gustavo Jorge dos Santos and team; Flávia da Silva Wagner** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 07/04/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2022** a **07/2024** Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem:	CCB - Biotério Multiusuário de Roedores para Estudos na Área de Neuroquímica		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos
Linhagem:	C57BL/6j	idade:	50 a 120 dias
		Peso:	12 a 45 g
		N:	15
Origem:	CCB - Biotério Multiusuário de Roedores para Estudos na Área de Neuroquímica		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	C57BL/6j	idade:	50 a 120 dias
		Peso:	12 a 45 g
		N:	15
Origem:	CCB - Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas - LIDoC		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas
Linhagem:	C57BL/6j	idade:	0 a 12 horas
		Peso:	0 a 0 g
		N:	312
Origem:	CCB - Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas - LIDoC		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas
Linhagem:	C57BL/6j	idade:	3 a 3 dias
		Peso:	0 a 0 g
		N:	312
Origem:	CCB - Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas - LIDoC		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos
Linhagem:	C57BL/6j	idade:	45 a 60 dias
		Peso:	12 a 45 g
		N:	84
Origem:	CCB - Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas - LIDoC		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	C57BL/6j	idade:	45 a 60 dias
		Peso:	12 a 45 g
		N:	84

Local do experimento: Islet Biology and Metabolism Lab. CFS/CCB/UFSC

Florianópolis, 04 de julho de 2022



**Universidade Federal
de Santa Catarina**

Luciana A. Honorato

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**



Vanessa R. Foletto da Silva

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina