



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

Henrique Fernandes de Mello

**AVALIAÇÃO DA VIA Ca^{2+} /CaMKII/CREB DURANTE A MATURAÇÃO PÓS-
NATAL DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS**

Florianópolis

2026

Henrique Fernandes de Mello

**Avaliação da Via Ca^{2+} /CaMKII/CREB Durante a Maturação Pós-Natal de Células
Beta Pancreáticas**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciência Biológicas do Centro de Ciência Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciência Biológicas.

Orientador(a): Prof. Dr. Gustavo Jorge dos Santos

Florianópolis

2026

Mello, Henrique Fernandes de

Avaliação da Via Ca^{2+} /CaMKII/CREB Durante a Maturação Pós-Natal de Células Beta Pancreáticas / Henrique Fernandes de Mello ; orientador, Gustavo Jorge dos Santos, 2026.

34 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

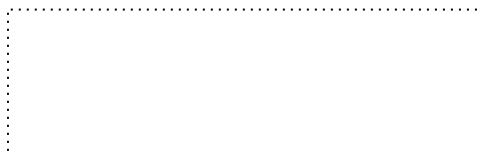
1. Ciências Biológicas. 2. Diabetes mellitus. 3. Secreção de insulina. 4. Cálcio. 5. Ipsc-beta. I. Santos, Gustavo Jorge dos . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Henrique Fernandes de Mello

**Avaliação da Via Ca^{2+} /CaMKII/CREB Durante a Maturação Pós-Natal de Células Beta
Pancreáticas**

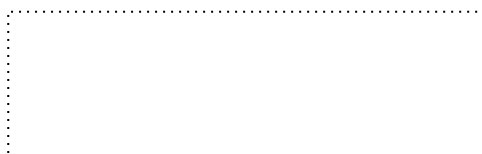
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharelado e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Centro de Ciências Biológicas, Sala PG-4, 26 de junho de 2026.

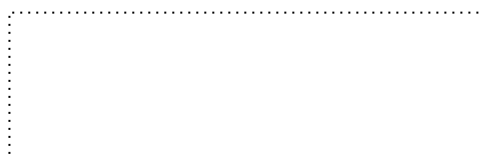


Coordenação do Curso

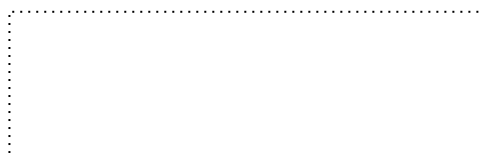
Banca examinadora



Prof. Dr. Gustavo Jorge dos Santos
Orientador



Prof. Dr. Maurício Peña Cunha
Instituição UFSC



Profa. Dra. Fernanda Barbosa de Lima
Instituição UFSC

Florianópolis, 2026.

Dedico esse trabalho à minha família, que sempre me incentivou a estudar e aos meus amigos que sempre me apoiaram durante essa jornada.

RESUMO

O diabetes mellitus é uma doença caracterizada por alterações na secreção e/ou ação da insulina, sendo a disfunção das células beta pancreáticas um dos principais fatores envolvidos em sua fisiopatologia. Nesse contexto, a compreensão dos mecanismos responsáveis pela maturação funcional dessas células é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de terapia celular. O presente estudo avaliou a participação da via de sinalização Ca^{2+} /CaMKII/CREB durante a maturação pós-natal de células beta pancreáticas. Para isso, ilhotas pancreáticas foram isoladas de camundongos C57BL/6J em diferentes estágios de desenvolvimento pós-natal (P3, P9, P20, P28 e P45–60), cultivadas e submetidas a condições de baixa e alta concentração de glicose. A expressão proteica de CaMKII, sua forma fosforilada (pCaMKII) e o fator de transcrição fosforilado pCREB foram avaliados por Western blot. Os resultados indicaram uma tendência de aumento da expressão total de CaMKII em estágios mais avançados do desenvolvimento, especialmente em animais P28 e adultos. Em contrapartida, os grupos neonatais apresentaram maior proporção de CaMKII fosforilada em relação ao conteúdo total da proteína. A análise da resposta ao estímulo glicêmico revelou maior ativação de pCaMKII e pCREB em ilhotas de animais adultos quando comparadas às de animais neonatais, sugerindo uma maior capacidade de resposta à glicose nas fases mais maduras do desenvolvimento. Esses achados indicam que a ativação da via Ca^{2+} /CaMKII/CREB acompanha o processo de maturação funcional das células beta pancreáticas, estando potencialmente associada à aquisição da capacidade de responder adequadamente aos estímulos glicêmicos. Embora os resultados sejam descritivos devido ao número reduzido de amostras, o estudo contribui para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na maturação das células beta e fornece subsídios para futuras estratégias voltadas à obtenção de células beta funcionalmente maduras para aplicação em terapias celulares do diabetes mellitus.

Palavras-chave: diabetes mellitus; secreção de insulina; cálcio; ipsc-beta.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a disease characterized by alterations in insulin secretion and/or action, with pancreatic beta-cell dysfunction representing one of the main factors involved in its pathophysiology. In this context, understanding the mechanisms responsible for the functional maturation of these cells is essential for the development of cell-based therapeutic strategies. The present study evaluated the involvement of the Ca^{2+} /CaMKII/CREB signaling pathway during the postnatal maturation of pancreatic beta cells. To achieve this, pancreatic islets were isolated from C57BL/6J mice at different postnatal developmental stages (P3, P9, P20, P28, and P45–60), cultured, and exposed to low- and high-glucose conditions. The protein expression of CaMKII, its phosphorylated form (pCaMKII), and the phosphorylated transcription factor pCREB were assessed by Western blot analysis. The results indicated a trend toward increased total CaMKII expression in more advanced developmental stages, particularly in P28 and adult animals. In contrast, neonatal groups exhibited a higher proportion of phosphorylated CaMKII relative to total protein content. Analysis of the response to glucose stimulation revealed greater activation of both pCaMKII and pCREB in islets from adult animals compared with neonatal animals, suggesting a higher glucose responsiveness in more mature developmental stages. These findings indicate that activation of the Ca^{2+} /CaMKII/CREB pathway accompanies the process of functional maturation of pancreatic beta cells and may be associated with the acquisition of the ability to respond appropriately to glycemic stimuli. Although the results are descriptive due to the limited number of samples analyzed, this study contributes to the understanding of the molecular mechanisms involved in beta-cell maturation and provides a foundation for future strategies aimed at generating functionally mature beta cells for diabetes mellitus cell therapy applications.

Keywords: diabetes mellitus; insulin secretion; calcium; ipsc-beta.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus do tipo 1
DM2	Diabetes mellitus do tipo 2
hPSCs- β	Células beta produtoras de insulina provenientes de células-tronco
hPSCs	Células-tronco humanas pluripotentes
GSIS	Secreção de insulina estimulada pela glicose
KATP	Canais de potássio sensíveis ao ATP
CaM	Calmodulina
CamKII	Proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	DIABETES MELLITUS.....	10
1.2	CÉLULAS BETA PANCREÁTICA E SUA MATURAÇÃO FUNCIONAL.....	11
1.3	SINALIZAÇÃO POR CÁLCIO E CALMODULINA.....	12
1.4	CAMKII E MATURAÇÃO DE CÉLULAS BETA.....	14
2	JUSTIFICATIVA	15
3	HIPÓTESE.....	16
4	OBJETIVOS.....	16
4.1	OBJETIVO GERAL.....	16
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
5.1	ANIMAIS.....	17
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	17
5.3	ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	19
5.4	CULTURA DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	20
5.5	WESTERN BLOT.....	20
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
6	RESULTADOS	22
6.1	EXPRESSÃO PROTEICA E FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA CAMKII....	22
6.2	FOSFORILAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO CREB.....	23
7	DISCUSSÃO.....	24
8	CONCLUSÃO.....	27
	REFERÊNCIAS	28
	APÊNDICE A – MEMBRANAS CORADAS COM PONCEAU UTILIZADAS PARA NORMALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE WESTERN BLOT	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença de etiologia multifatorial caracterizada por hiperglicemia crônica com alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (World Health Organization, 1999). Sua ocorrência está relacionada à deficiência na secreção de insulina, à redução desse hormônio ou à combinação de ambos os mecanismos. O DM pode ser classificado em diferentes tipos, sendo os mais prevalentes o diabetes mellitus do tipo 1 (DM1) e o diabetes mellitus do tipo 2 (DM2). O DM1 corresponde aproximadamente a 10-20% dos casos e resulta de um processo de destruição autoimune das células beta pancreáticas. O DM2, por sua vez, representa cerca de 80-90% do total dos casos, e caracteriza-se pela disfunção das células beta pancreáticas associado à resistência à insulina, além de fatores como obesidade, estilo de vida e outros fatores ambientais (Eizirik; Pasquali; Cnop, 2020).

Em 2022 estimava-se que aproximadamente 828 milhões de adultos viviam com DM em todo o mundo (Zhou et al., 2024). Esse número expressivo reflete, em grande parte, o crescimento contínuo da prevalência do DM2, que representa um importante desafio para os sistemas de saúde em escala global (Lovic et al., 2020). O Brasil acompanha essa tendência mundial e, estima-se que possui 10% de sua população adulta apresentando algum tipo de DM com uma projeção de que esse número possa dobrar até 2050 (Magliano; Boyko, 2025).

Embora avanços significativos tenham sido alcançados no tratamento da doença, o DM ainda não possui cura definitiva. As abordagens terapêuticas atualmente disponíveis concentram-se, principalmente, no controle glicêmico por meio da administração de insulina, especialmente em indivíduos com DM1, e da utilização de agentes hipoglicemiantes orais no tratamento do DM2. Apesar de sua eficácia no manejo da glicemia, essas estratégias não restauram a massa funcional de células beta pancreáticas perdida ou comprometida durante a progressão da doença.

Dessa forma, a reposição de células beta tem sido amplamente investigada como uma alternativa terapêutica capaz de atuar diretamente no tratamento de qualquer forma de DM. Nesse contexto, o transplante de células beta pancreáticas provenientes de doadores cadavéricos demonstrou potencial para restaurar a produção de insulina. Entretanto, sua aplicação clínica permanece limitada devido à

escassez de doadores, à reduzida viabilidade celular após o transplante e à necessidade de imunossupressão prolongada dos pacientes receptores (Lee; Yoon, 2022).

Como alternativa, o uso de células beta produtoras de insulina derivadas de células-tronco induzidas humanas pluripotentes (iPSCs-beta) tem emergido como uma estratégia promissora para a terapia celular do diabetes. Essas células representam uma fonte potencialmente ilimitada para reposição celular, contornando parte das limitações associadas à disponibilidade de doadores. No entanto, apesar dos avanços obtidos nos protocolos de diferenciação, as iPSCs-beta frequentemente apresentam características funcionais imaturas quando comparadas às células beta pancreáticas adultas (Jiang; Jiang, 2023). Como consequência, sua capacidade de detectar variações glicêmicas e secretar insulina de maneira adequada permanece reduzida, comprometendo sua eficácia terapêutica (Karimova; Gvazava; Vorotelyak, 2022).

A limitação funcional observada em iPSCs-beta evidencia a necessidade de compreender os processos biológicos que caracterizam uma célula beta plenamente madura. Entre essas características, destaca-se a capacidade de detectar alterações na concentração de glicose circulante e responder de maneira eficiente por meio da secreção regulada de insulina. Dessa forma, torna-se essencial discutir os mecanismos fisiológicos que governam a função das células beta pancreáticas e sua aquisição durante o processo de maturação celular.

1.2 CÉLULAS BETA PANCREÁTICA E SUA MATURAÇÃO FUNCIONAL

As células betas pancreáticas desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase glicêmica. Localizadas nas ilhotas de Langerhans, essas células constituem a única fonte de insulina do organismo, hormônio responsável por promover a captação e o armazenamento de glicose pelos tecidos periféricos, contribuindo para a manutenção da glicemia dentro de limites fisiológicos (Kaestner et al., 2021).

A principal função das células beta é detectar alterações na concentração de glicose circulante e responder por meio da secreção regulada de insulina. Esse processo, denominado secreção de insulina estimulada pela glicose (Glucose-Stimulated Insulin Secretion, GSIS), depende de uma complexa rede de mecanismos

metabólicos e eletrofisiológicos que permitem às células beta ajustar sua atividade secretora de acordo com as necessidades metabólicas do organismo (Campbell; Newgard, 2021). Além de sua importância para a regulação da glicemia, uma GSIS eficiente é considerada uma das principais características de células beta funcionalmente maduras e esse parâmetro é amplamente utilizado como indicador de maturação celular (Salinno et al., 2019).

De maneira simplificada, a GSIS é iniciada pela captação e metabolização da glicose pelas células beta, resultando no aumento da razão ATP/ADP intracelular. Esse evento promove o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP), levando à despolarização da membrana plasmática. Como consequência, ocorre a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, permitindo o influxo de cálcio (Ca^{2+}) para o citoplasma celular (Wortham; Sander, 2021). O aumento da concentração intracelular de cálcio constitui o principal sinal desencadeador da exocitose dos grânulos de insulina, promovendo a fusão dessas vesículas com a membrana plasmática e a subsequente liberação do hormônio para a corrente sanguínea (Ashcroft; Rorsman, 2012).

Além de seu papel na secreção de insulina, o cálcio atua como um importante segundo mensageiro em diversos processos celulares relacionados à sobrevivência, proliferação, diferenciação e maturação funcional das células beta (Klec et al., 2019). Alterações na dinâmica intracelular desse íon podem comprometer tanto a capacidade secretora quanto a aquisição de características típicas de células beta maduras, evidenciando a importância das vias de sinalização dependentes de cálcio para a manutenção da funcionalidade dessas células (Mu-u-min et al., 2023).

1.3 SINALIZAÇÃO POR CÁLCIO E CALMODULINA

O Ca^{2+} é um dos principais íons sinalizadores intracelulares, atuando como segundo mensageiro em uma ampla variedade de processos celulares, incluindo secreção, metabolismo, proliferação, diferenciação e morte celular programada (Berridge, 2012). Nas células beta pancreáticas, a dinâmica do Ca^{2+} desempenha papel central na secreção de insulina e na manutenção da função celular, sendo essencial para a conversão de estímulos metabólicos em respostas secretórias apropriadas (Rorsman; Braun, 2013).

A sinalização por cálcio é altamente regulada, uma vez que pequenas variações na concentração citosólica de Ca^{2+} podem desencadear respostas celulares específicas. Em condições basais, os níveis intracelulares de Ca^{2+} são mantidos baixos, enquanto estímulos fisiológicos promovem aumentos rápidos e transitórios desse íon, gerando sinais espaciais e temporais altamente controlados (Müller et al., 2023).

A transdução dos sinais mediados por cálcio depende da ação de proteínas sensoras especializadas capazes de converter alterações na concentração intracelular desse íon em respostas biológicas específicas. Entre essas proteínas, destaca-se a calmodulina (CaM), uma proteína ligadora de cálcio altamente conservada que atua como reguladora central de múltiplas vias de sinalização intracelular. Por meio da interação com diversos alvos moleculares, a CaM participa da regulação de processos fundamentais para a fisiologia celular, incluindo mecanismos relacionados à secreção hormonal, expressão gênica, diferenciação celular e aquisição da maturidade funcional (Niki; Hidaka, 1999; Idevall-Hagren; Tengholm, 2020; Valverde; Malaisse, 1984).

Uma vez ativada pelo Ca^{2+} , a calmodulina regula diversas enzimas e vias de sinalização, incluindo quinases, fosfatases e proteínas envolvidas no tráfego vesicular e na expressão gênica. Essa versatilidade permite que a CaM atue como um integrador central da sinalização intracelular dependente de cálcio, modulando processos essenciais para a função celular (Marcelo; Means; York, 2016).

Nas células beta pancreáticas, a sinalização mediada por Ca^{2+} /calmodulina está intimamente relacionada ao controle da secreção de insulina e à regulação da excitabilidade celular. Evidências sugerem que complexos Ca^{2+} -CaM participam da modulação da maquinaria exocítica e de vias intracelulares envolvidas na resposta secretória à glicose (Hisatomi; Hidaka, 1996).

Além disso, a via Ca^{2+} /calmodulina desempenha papel importante na ativação de quinases dependentes de calmodulina, como a CaMKII, que têm sido associadas à regulação de processos de plasticidade celular, metabolismo e maturação funcional em diferentes tipos celulares (Illario et al., 2009). Dessa forma, a sinalização por cálcio e calmodulina não apenas regula a secreção de insulina, mas também pode estar envolvida em processos mais amplos relacionados à aquisição e manutenção do fenótipo maduro das células beta pancreáticas.

1.4 CAMKII E MATURAÇÃO DE CÉLULAS BETA

Diversos fatores podem afetar a maturação e funcionalidade das células beta pancreáticas, incluindo fatores ambientais, metabólicos e regulatórios de natureza transcricional (Jaafar et al., 2019). Entre os componentes envolvidos na integração dessas vias, destaca-se a CaMKII, uma quinase inicialmente estudada no sistema nervoso central, onde desempenha papéis fundamentais em processos como plasticidade sináptica e memória celular (Yasuda; Hayashi; Hell, 2022).

Apesar de sua associação clássica com neurônios, a CaMKII é uma enzima amplamente expressa em diversos tipos de celulares e participando de múltiplas vias de sinalização intracelular. Nesse contexto, sua principal função está relacionada à tradução de sinais de cálcio em respostas bioquímicas e funcionais específicas, atuando como um importante modulador de processos dependentes de Ca^{2+} (Swulius; Waxham, 2008).

Nas células beta pancreáticas, a sinalização mediada por CaMKII tem sido associada à GSIS. Evidências experimentais em camundongos demonstram que a inibição ou deleção da CaMKII compromete significativamente a tolerância à glicose, em parte devido à redução da GSIS, indicando seu papel funcional na atividade secretora dessas células (Dadi et al., 2014). Esses achados reforçam a importância da via Ca^{2+} /CaMKII na fisiologia das células beta.

A CaMKII é uma serina/treonina quinase multifuncional ativada pela ligação do complexo Ca^{2+} /CaM ao seu domínio regulatório. Em condições basais, essa enzima permanece em um estado autoinibido, onde o domínio regulatório bloqueia o sítio catalítico, impedindo sua atividade. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} promove a formação do complexo Ca^{2+} /CaM, que se liga à CaMKII e induz alterações conformacionais capazes de expor o domínio catalítico e ativar a enzima (Hudmon; Schulman, 2002).

Após sua ativação, subunidades adjacentes da CaMKII promovem a autofosforilação da treonina 286 (Thr286), um dos principais sítios regulatórios dessa proteína. Essa modificação confere à CaMKII atividade autônoma parcial, permitindo que a enzima permaneça ativa mesmo após a redução dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e a dissociação da calmodulina (Lou; Lloyd; Schulman, 1986). Além disso, a fosforilação da Thr286 aumenta a afinidade da CaMKII pela calmodulina, fenômeno

denominado *calmodulin trapping*, prolongando a duração da sinalização intracelular dependente de cálcio (Meyer et al., 1992).

Em contrapartida, a autofosforilação dos sítios Thr305 e Thr306, localizados na região responsável pela ligação da calmodulina, reduz a capacidade de associação do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ à enzima, contribuindo para sua inativação e para o controle da sensibilidade a novos estímulos de cálcio (Colbran et al., 1989). Dessa forma, por meio de mecanismos de autofosforilação e autorregulação, a CaMKII atua como um importante decodificador dos sinais de Ca^{2+} , convertendo alterações transitórias na concentração intracelular desse íon em respostas celulares mais duradouras (Rostas; Skelding, 2023).

Um dos principais alvos *downstream* da CaMKII é o fator de transcrição CREB (*cAMP response element-binding protein*), uma proteína amplamente reconhecida por sua participação na regulação da expressão gênica associada à sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (Shin et al., 2014). A ativação do CREB pode ocorrer por meio da fosforilação mediada por CamKII integrando assim sinais de Ca^{2+} à regulação transcricional (Suefuji et al., 2012).

Nas células beta pancreáticas, o CREB desempenha papel essencial na manutenção da função celular, sendo considerado um regulador importante da identidade e da resposta secretória dessas células. Além disso, sua ativação está associada a processos de desenvolvimento e maturação celular, incluindo proliferação e sobrevivência de células beta (Jansson et al., 2008). Dessa forma, a via $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMKII}/\text{CREB}$ emerge como um eixo funcional relevante na integração entre sinalização de cálcio, secreção de insulina e maturação das células beta pancreáticas.

2 JUSTIFICATIVA

A maturação funcional das células beta pancreáticas é um processo essencial para a aquisição de uma secreção eficiente e responsiva de insulina frente a estímulos glicêmicos e, estudar esse processo de ganho de função é crucial para a geração de células iPSC-beta viáveis para transplante em pacientes diabéticos.

Evidências da literatura indicam que a sinalização intracelular mediada por Ca^{2+} desempenha papel central nesse processo de maturação, especialmente por meio da ativação de proteínas como a CaMKII e de fatores de transcrição como o CREB, os

quais estão envolvidos na regulação da GSIS, da expressão gênica e da manutenção da identidade celular.

Como visto anteriormente, estudos experimentais sugerem que alterações na atividade da CaMKII podem impactar diretamente a capacidade secretória das células beta, enquanto a ativação do CREB está associada à sobrevivência, proliferação e regulação transcricional dessas células. No entanto, ainda não está completamente elucidado de que forma a integração entre a via Ca^{2+} /CaMKII e a ativação do CREB contribui para os diferentes estágios de maturação das células beta pancreáticas.

Dessa forma, a investigação desses mecanismos pode contribuir para uma melhor compreensão dos processos envolvidos no desenvolvimento funcional das células beta, sendo potencialmente relevante para estratégias de terapia celular voltadas ao diabetes mellitus.

3 HIPÓTESE

Hipotetizamos que a ativação da via Ca^{2+} /CaMKII está diretamente associada ao processo de maturação funcional das células beta pancreáticas, influenciando positivamente a GSIS. Além disso, a ativação do fator de transcrição CREB ocorrerá de maneira dependente da sinalização mediada por CaMKII, contribuindo para a regulação da expressão gênica relacionada à função e maturação dessas células. Adicionalmente, espera-se que a expressão e/ou atividade de CaMKII e CREB varie de acordo com o estágio de desenvolvimento das células beta, sendo mais evidente em condições que favoreçam a maturação e resposta glicêmica adequada.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão proteica de CamKII, pCamKII e phospho-CREB em diferentes estágios de desenvolvimento das células beta pancreáticas de camundongos C57BL/6J, bem como seu estado de ativação, a fim de avaliar a maturação dessas células.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com o intuito de investigar a participação das vias de sinalização dependentes de cálcio na maturação das células beta pancreáticas, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a expressão proteica de CaMKII total em diferentes estágios de desenvolvimento de células beta pancreáticas;
- Quantificar a ativação da CaMKII por meio da análise da sua forma fosforilada (pCaMKII) nos mesmos estágios;
- Analisar a expressão do fator de transcrição CREB fosforilado (pCREB) como marcador de ativação de vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} em células beta pancreáticas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

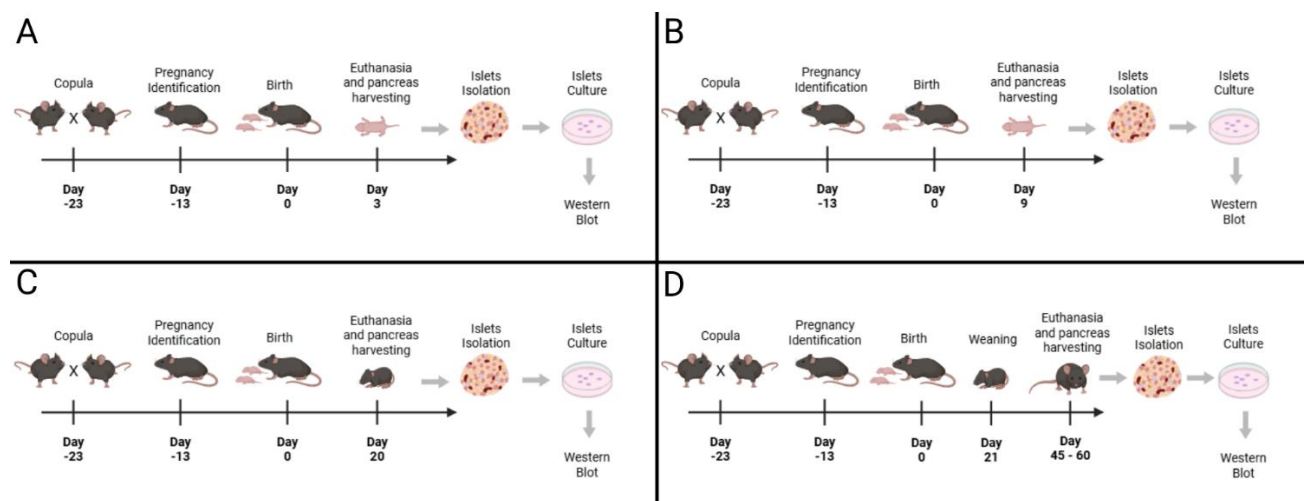
Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J, provenientes do Biotério Setorial de camundongos do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CFS/UFSC). A partir dessas matrizes, foram gerados os animais utilizados nesse projeto. Todos os procedimentos realizados foram realizados em conformidade com as normas éticas vigentes para o uso de animais em pesquisa, após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC) sob protocolo número 2465200522.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As ilhotas pancreáticas foram isoladas de camundongos C57BL/6J em diferentes estágios de desenvolvimento pós-natal, correspondentes aos dias P3, P9, P20, P28 e P45–P60 (adultos). Os animais foram obtidos por cruzamento controlado de casais mantidos em caixas individuais. Após a confirmação de prenhez, o macho foi separado da fêmea, e o nascimento da prole foi considerado como dia pós-natal 1 (P1). Os filhotes foram acompanhados diariamente até atingirem os estágios experimentais definidos. Para animais do grupo P3 no terceiro dia (P3) os filhotes

foram recolhidos, sedados com isoflurano e em seguida eutanasiados por meio de decapitação com tesoura afiada, foram utilizadas ninhadas apenas com mais de 5 animais (FIG. 1A). Para animais do grupo P9 no nono dia (P9) os filhotes foram recolhidos, sedados com isoflurano e em seguida eutanasiados por meio de decapitação com tesoura afiada, sendo utilizadas ninhadas apenas com mais de 5 animais (FIG. 1B). Para animais do grupo P20 no vigésimo dia (P20), um dia antes do desmame, os filhotes foram recolhidos, sedados com isoflurano e em seguida eutanasiados por meio de decapitação com tesoura afiada (FIG. 1C). Para animais do grupo P28 no 21º dia (P21) os animais foram desmamados e colocados em caixas de no máximo 5 animais do mesmo sexo. E no vigésimo oitavo dia (P28) esses animais foram recolhidos sedados com isoflurano e eutanasiados por meio de deslocamento da cervical (FIG. 1D). Para animais do grupo Adulto no 21º dia (P21) os animais foram desmamados e colocados em caixas de no máximo 5 animais do mesmo sexo. E a partir de 45 dias eles já estavam disponíveis para serem usados nos experimentos, até completarem 60 dias de vida. Antes do isolamento das ilhotas pancreáticas, os animais foram sedados com isoflurano e eutanasiados por meio de deslocamento da cervical (FIG. 1D).

Figura 1: Delineamento experimental



Fonte: Imagem elaborada pelo autor.

Legenda: Delineamento experimental dos camundongos C57BL/6J: processamento de amostras de animais com 3 dias de vida (A). Processamento de amostras de animais com 9 dias de vida (B). Processamento de amostras de animais com 20 dias de vida (C). Processamento de amostras de animais adultos e P28 (D).

5.3 ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

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 collagenase (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]). Para a digestão e separação da parte exócrina e endócrina, a amostra foi levada ao vórtex por 5 segundos, colocadas em banho-maria com temperatura de 37°C por 5 minutos, seguido de vórtex por mais 3 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 1300 rpm por 5 minutos a 4°C, a primeira centrifugação foi feita com a *stop solution* e as duas últimas foram somente com a solução de HBSS. Sendo coletadas somente após a cultura, devido ao nível de desenvolvimento desses animais.

Ilhotas pancreáticas de neonatos P9 e P20: 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 4 mL de solução de collagenase 0,6 mg/mL de HBSS. Depois, foi levado ao vórtex por 20 segundos, colocados em banho-maria com temperatura de 37°C por 6 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. Sendo coletadas somente após a cultura, devido ao nível de desenvolvimento desses animais.

Ilhotas pancreáticas de P28 e Adultos: primeiramente os animais foram anestesiados com isoflurano e em seguida foram eutanasiados por deslocamento da cervical. Antes da dissecação do pâncreas, ele foi inflado com 3 a 4 ml de solução de collagenase 0,8 mg/ml de HBSS. Após a dissecação, o pâncreas foi levado para o banho-maria com temperatura de 37 °C por 16 minutos, agitado por mais 1 minuto

dentro do banho maria, além de serem agitadas manualmente 30 vezes no final do processo 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.

5.4 CULTURA DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

Após o isolamento, as ilhotas foram coletadas manualmente com micropipetas e depois, em todos os estágios de desenvolvimento analisados, foram mantidas em cultura celular (37°C e 5% de CO₂) por 24h. As ilhotas foram cultivadas em meio RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement (1X) (Gibco; Cod. 72400047) com bicarbonato de sódio, glutamina, antibiótico (1%).

5.5 WESTERN BLOT

Após a coleta, as ilhotas foram incubadas em tampão 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%]) por 40 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a estímulos glicêmicos, sendo incubadas com KRBH suplementado com glicose em duas condições experimentais: baixa glicose (2,8 mM) e alta glicose (16,8 mM), por 1 hora. Após o período de incubação, as ilhotas foram lisadas em tampão RIPA contendo coquetel antiprotease (Sigma-Aldrich, 04693159001) e antifosfatase (Sigma-Aldrich, 04906837001) A lise foi seguida da sonicação por 10 segundos a 20% de potência para a homogeneização completa das amostras.

Após lise completa do material, a quantidade de proteína foi dosada pelo método de Bradford (Bio-Rad, 5000205), utilizando uma curva padrão de albumina. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas Infinite M200 (Tecan), no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC).

Para a análise do Western Blotting, foram utilizadas 30µg de proteína por amostra, que foram submetidos à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida

(SDS-PAGE), a 90V por 3 horas. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, a 120V por 1h30min.

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em solução de albumina (0,5g de albumina em 10mL de TBST) por 2h em temperatura ambiente, seguida de três lavagens com TBST 1x por 5 minutos cada.

Na sequência, as membranas foram incubadas a 4 graus, overnight com os seguintes anticorpos primários diluídos na proporção 1:1000:

- Coelho anti-fosfo-CREB (Ser133; 87G3; Cell Signaling Technology; cat. nº #9198; peso molecular 43 kDa)
- Coelho anti-CamKII (Cell Signaling Technology; cat. nº #4430; peso molecular 50 kDa se)
- Coelho anti-phospho-CaMKII (fosfo T305; Abcam; car. nº ab63377; peso molecular 50kDa)

No dia seguinte, foram realizadas três lavagens com TBST 1x por 5 minutos cada, seguidas de incubação com os anticorpos secundários por 2 horas. O anticorpo secundário também foi diluído, na proporção de 1:10000:

- Cabra anti-coelho (ThermoFisher Scientific, cat. nº 31460).

A detecção das proteínas foi realizada por quimioluminescência, utilizando o kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, 1705061), utilizando o ChemiDoc MP (Bio-Rad), no LAMEB/UFSC. Posteriormente os resultados foram normalizados pelo Ponceau (Apêndice A).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram inicialmente registrados em planilhas do Microsoft Excel®, onde foram organizados e posteriormente transferidos para o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) para análise e elaboração dos gráficos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (SN).

Devido ao reduzido número de amostras biológicas disponíveis em cada grupo experimental, não foram realizadas análises estatísticas. Dessa forma, os dados foram avaliados de maneira descritiva, buscando identificar tendências de expressão das proteínas analisadas entre os diferentes estágios de desenvolvimento e condições experimentais.

6 RESULTADOS

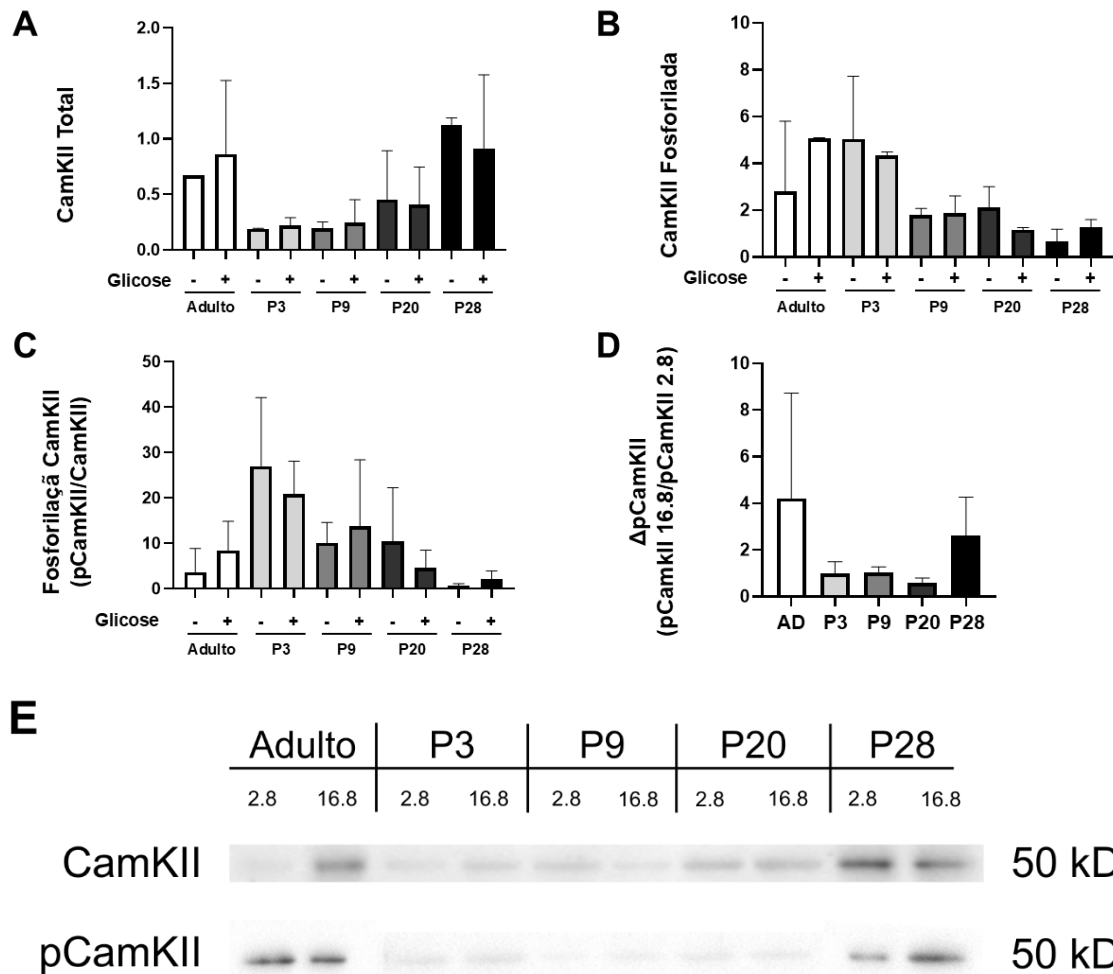
6.1 EXPRESSÃO PROTEICA E FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA CAMKII

Em relação ao conteúdo proteico total de CaMKII, os resultados sugerem uma tendência de aumento da expressão em ilhotas provenientes de animais mais desenvolvidos, especialmente nos grupos P28 e adultos, tanto em condições basais quanto estimuladas (Figura 2A e 2E). Quanto à forma fosforilada da proteína (pCaMKII), observou-se uma tendência de maior expressão nos grupos P3 e adultos quando comparados aos demais estágios avaliados (Figura 2B e 2E).

Ao analisar a razão entre a proteína fosforilada e o conteúdo total de CaMKII, observou-se uma tendência de maior ativação da quinase nos grupos neonatais (P3, P9 e P20), principalmente em condições basais de glicose (2,8 mM) (Figura 2C), em contraste, os grupos mais desenvolvidos apresentaram menores níveis relativos de fosforilação basal e uma maior variação da pCaMKII em resposta ao estímulo glicêmico, assim, os resultados sugerem que as ilhotas neonatais apresentam uma ativação relativamente elevada da CaMKII mesmo em baixas concentrações de glicose, enquanto as ilhotas mais maduras exibem uma ativação mais dependente do estímulo glicêmico, evidenciada pela maior diferença entre as condições basal e estimulada.

Adicionalmente, foi avaliada a variação da fosforilação da CaMKII em resposta ao estímulo glicêmico. Os resultados indicam que as ilhotas provenientes de animais adultos apresentaram uma tendência de maior resposta à glicose, evidenciada por uma maior diferença entre as condições basal e estimulada, quando comparadas às ilhotas de animais neonatos (Figura 2D).

Figura 2: Expressão proteica de CamKII em células beta de camundongos



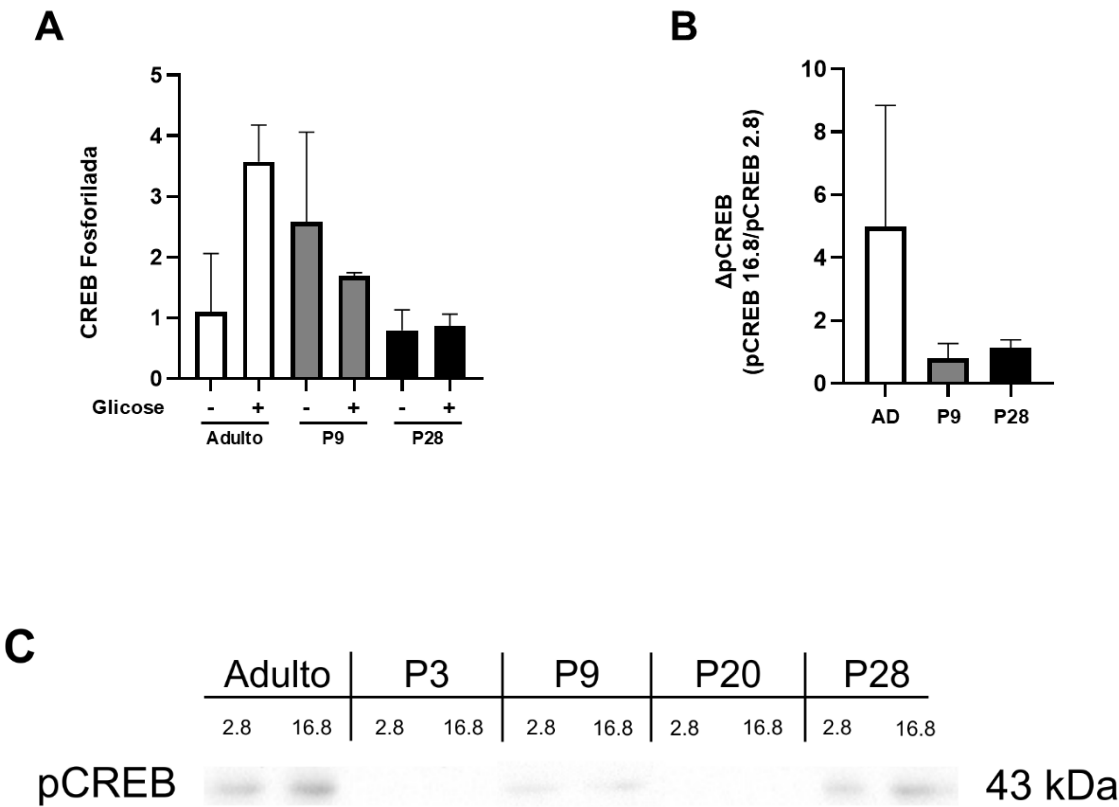
Legenda: Expressão proteica do conteúdo total de CamKII em células de camundongos Adultos, P3, P9, P20 e P28 (n=2) em concentração basal de glicose (2.8 mM) e com estímulo de glicose (16.8 mM) (A). Expressão proteica de pCamKII em células de camundongos Adultos, P3, P9, P20 e P28 (n=2) em concentração basal de glicose (2.8 mM) e com estímulo de glicose (16.8 mM) (B). Fosforilação do conteúdo total de CamKII (razão fosforilada/total) (C). Delta da expressão proteica de pCamKII (razão 16.8mM/2.8mM) (D). Blots brutos CamKII e pCamKII em células de camundongos Adultos, P3, P9, P20 e P28 (n=1) em concentração basal de glicose (2.8 mM) e com estímulo de glicose (16.8 mM) (E).

6.2 FOSFORILAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO CREB

Os resultados sugerem uma tendência de maior conteúdo de pCREB em ilhotas provenientes de animais adultos, enquanto os grupos neonatais apresentaram níveis aparentemente inferiores dessa proteína (Figura 3A e 3C). Esse padrão também foi observado na análise da variação da expressão de pCREB em resposta ao estímulo glicêmico. Os dados indicam que as ilhotas de animais adultos

apresentaram uma maior diferença entre as condições basal e estimulada quando comparadas às ilhotas dos grupos neonatais (Figura 3B).

Figura 3: Expressão proteica de pCREB em células beta de camundongos



Legenda: Expressão proteica de pCREB em células de camundongos Adultos, P3, P9, P20 e P28 (n=2) em concentração basal de glicose (2.8 mM) e com estímulo de glicose (16.8 mM) (A). Delta da expressão proteica de pCREB (razão 16.8mM/2.8mM) (B). Blot bruto pCREB em células de camundongos Adultos, P3, P9, P20 e P28 (n=1) em concentração basal de glicose (2.8 mM) e com estímulo de glicose (16.8 mM) (C).

7 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar a expressão e a ativação de componentes da via Ca^{2+} /CaMKII/CREB durante diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal de células beta pancreáticas. Essa via tem sido associada à regulação GSIS e a processos relacionados à aquisição da maturidade funcional das células beta (Blanchet et al., 2015; Benchoula; Mediani; Hwa, 2023).

A análise da expressão proteica total de CaMKII sugere uma tendência de aumento dessa proteína em ilhotas provenientes de animais mais desenvolvidos, especialmente nos grupos P28 e adultos, quando comparados aos grupos neonatais. Esses achados são consistentes com o processo de maturação funcional das células beta, caracterizado pela aquisição progressiva da capacidade de responder adequadamente aos estímulos glicêmicos (Barsby; Otonkoski, 2022). Considerando o papel da CaMKII na sinalização dependente de cálcio e na regulação da secreção de insulina, o aumento de sua expressão ao longo do desenvolvimento pode refletir a necessidade crescente de mecanismos especializados para o controle da atividade secretória das células beta.

Em relação à forma fosforilada da CaMKII, observou-se uma tendência de maior expressão nos grupos P3 e adultos. Entretanto, ao analisar separadamente as condições experimentais, verificou-se que, em concentração basal de glicose (2,8 mM), os animais neonatais apresentaram níveis relativamente elevados de fosforilação da CaMKII quando comparados aos grupos mais desenvolvidos. Em contraste, nas ilhotas de animais adultos, a fosforilação da CaMKII mostrou-se mais pronunciada após o estímulo com alta glicose (16,8 mM), sugerindo uma maior responsividade dessa quinase ao estímulo glicêmico.

Essa diferença torna-se mais evidente quando analisada a razão entre as condições estimulada (16,8 mM) e basal (2,8 mM), onde os animais adultos apresentaram uma resposta mais robusta ao aumento da glicose, enquanto os grupos neonatais exibiram valores reduzidos dessa razão. De forma semelhante, a análise da proporção entre pCaMKII e CaMKII total revelou níveis relativamente elevados de fosforilação basal nos grupos neonatais, sugerindo que a ativação dessa enzima nessas ilhotas ocorre mesmo em baixas concentrações de glicose. Em conjunto, esses achados apontam que a ativação da CaMKII em ilhotas adultas está mais associada à resposta ao estímulo glicêmico, enquanto nos grupos neonatais observa-se uma ativação relativamente elevada já em condições basais.

No geral, esses resultados podem indicar que, durante os estágios iniciais do desenvolvimento, a ativação da CaMKII não está necessariamente associada à resposta funcional à glicose observada em células beta maduras, podendo estar relacionada a processos de diferenciação celular, remodelação metabólica ou estabelecimento da identidade funcional dessas células (Bonner-Weir, 2000) (Bouwens; Rومان, 2005).

Esses achados estão de acordo com o modelo atualmente aceito de maturação pós-natal das células beta pancreáticas, no qual a capacidade de realizar GSIS de forma eficiente é adquirida gradualmente ao longo do desenvolvimento. Estudos demonstram que células beta neonatais apresentam limitações funcionais importantes quando comparadas às células adultas, incluindo alterações na dinâmica de cálcio, no metabolismo da glicose e na capacidade secretória (Blum et al., 2012) (Benninger; Piston, 2014). Dessa forma, a menor responsividade observada nos grupos neonatais pode refletir a imaturidade funcional característica dessas fases do desenvolvimento.

A análise da expressão de pCREB revelou um padrão semelhante ao observado para a CaMKII. Os resultados sugerem uma maior ativação desse fator de transcrição em ilhotas de animais adultos submetidos ao estímulo glicêmico, enquanto os grupos neonatais apresentaram menor diferença entre as condições basal e estimulada. Considerando que a fosforilação do CREB pode ocorrer por meio da ativação da CaMKII (Yan et al., 2016), esses resultados reforçam a possibilidade de que a atividade dessas proteínas esteja funcionalmente associada ao longo do processo de maturação das células beta.

Além de sua participação na secreção de insulina, o CREB desempenha funções importantes na sobrevivência celular, proliferação e regulação da expressão gênica em células beta pancreáticas (Dalle et al., 2011). Dessa forma, os padrões de ativação observados ao longo do desenvolvimento podem refletir não apenas alterações na capacidade secretória das células, mas também mudanças em programas transcricionais envolvidos na aquisição e manutenção do fenótipo maduro.

Uma possível explicação para as diferenças observadas entre os grupos experimentais está relacionada às alterações metabólicas que ocorrem durante o período pós-desmame. A transição da alimentação baseada no leite materno para uma dieta sólida promove importantes adaptações metabólicas e transcricionais que funcionam como gatilhos para a maturação funcional das células beta pancreáticas (Stolovich-Rain et al., 2015). Esse processo está associado ao aumento da capacidade de secreção de insulina, à reorganização de vias metabólicas e à aquisição de características típicas de células beta maduras, o que pode explicar a maior responsividade observada nos grupos P28 e adultos.

Embora os resultados obtidos sejam consistentes com a hipótese de que a via Ca^{2+} /CaMKII/CREB participe do processo de maturação das células beta

pancreáticas, este estudo apresenta limitações relacionadas ao reduzido número de amostras avaliadas, o que impossibilitou a realização de análises estatísticas inferenciais. Dessa forma, os resultados devem ser interpretados como observações descritivas e exploratórias. Ainda assim, os padrões observados fornecem indícios de que alterações na expressão e ativação da CaMKII e do CREB acompanham o desenvolvimento pós-natal das células beta, reforçando a relevância dessa via de sinalização para a aquisição da maturidade funcional.

8 CONCLUSÃO

Os achados deste estudo reforçam a importância da sinalização dependente de cálcio para a aquisição da maturidade funcional das células beta pancreáticas. Em conjunto, os resultados sugerem que componentes da via Ca^{2+} /CaMKII/CREB acompanham as alterações moleculares observadas ao longo do desenvolvimento pós-natal dessas células, estando potencialmente associados ao estabelecimento da capacidade de responder adequadamente a estímulos glicêmicos.

Embora sejam necessários estudos adicionais para elucidar os mecanismos envolvidos e confirmar essa relação, os dados obtidos apontam para a participação da via Ca^{2+} /CaMKII/CREB no processo de maturação das células beta pancreáticas. Dessa forma, este trabalho contribui para a compreensão dos eventos moleculares relacionados ao desenvolvimento funcional dessas células e amplia o conhecimento sobre vias potencialmente relevantes para estratégias de geração de células beta maduras a partir de células-tronco pluripotentes destinadas à terapia do diabetes mellitus.

REFERÊNCIAS

ASHCROFT, Frances M.; RORSMAN, Patrik. Diabetes Mellitus and the β Cell: The Last Ten Years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160–1171, mar. 2012.

BARSBY, Tom; OTONKOSKI, Timo. Maturation of beta cells: lessons from in vivo and in vitro models. **Diabetologia**, v. 65, n. 6, p. 917–930, jun. 2022.

BENCHOULA, Khaled; MEDIANI, Ahmed; HWA, Wong Eng. The functions of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in diabetes progression. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 25–34, mar. 2023.

BENNINGER, Richard K. P.; PISTON, David W. Cellular communication and heterogeneity in pancreatic islet insulin secretion dynamics. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 8, p. 399–406, ago. 2014.

BERRIDGE, Michael J. Calcium signalling remodelling and disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 2, p. 297–309, 1 abr. 2012.

BLANCHET, Emilie *et al.* Feedback Inhibition of CREB Signaling Promotes Beta Cell Dysfunction in Insulin Resistance. **Cell Reports**, v. 10, n. 7, p. 1149–1157, fev. 2015.

BLUM, Barak *et al.* Functional beta-cell maturation is marked by an increased glucose threshold and by expression of urocortin 3. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 261–264, mar. 2012.

BONNER-WEIR, Susan. Perspective: Postnatal Pancreatic β Cell Growth. **Endocrinology**, v. 141, n. 6, p. 1926–1929, 1 jun. 2000.

BOUWENS, Luc; ROOMAN, Ilse. Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 4, p. 1255–1270, out. 2005.

CAMPBELL, Jonathan E.; NEWGARD, Christopher B. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 142–158, fev. 2021.

COLBRAN, R. J. *et al.* Regulatory Domain of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 9, p. 4800–4804, mar. 1989.

DADI, Prasanna K. *et al.* Inhibition of Pancreatic β -Cell Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II Reduces Glucose-stimulated Calcium Influx and Insulin Secretion, Impairing Glucose Tolerance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 18, p. 12435–12445, maio 2014.

DALLE, Stephane *et al.* Roles and Regulation of the Transcription Factor CREB in Pancreatic β -Cells. **Current Molecular Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 187–195, 1 nov. 2011.

EIZIRIK, Décio L.; PASQUALI, Lorenzo; CNOP, Miriam. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 7, p. 349–362, jul. 2020.

HISATOMI, M.; HIDAKA, H. **Ca^{2+} /Calmodulin and Cyclic 3,5' Adenosine Monophosphate Control Movement of Secretory Granules through Protein Phosphorylation/Dephosphorylation in the Pancreatic P-Cell***. 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/137/11/4644/3037285>>.

HUDMON, Andy; SCHULMAN, Howard. Neuronal Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II: The Role of Structure and Autoregulation in Cellular Function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 473–510, jun. 2002.

IDEVALL-HAGREN, Olof; TENGHOLM, Anders. Metabolic regulation of calcium signaling in beta cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 103, p. 20–30, jul. 2020.

ILLARIO, Maddalena *et al.* Calcium-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) mediates insulin-stimulated proliferation and glucose uptake. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 5, p. 786–792, maio 2009.

JAAFAR, Rami *et al.* mTORC1-to-AMPK switching underlies β cell metabolic plasticity during maturation and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 10, p. 4124–4137, 26 ago. 2019.

JANSSON, Deidre *et al.* Glucose controls CREB activity in islet cells via regulated phosphorylation of TORC2. **MEDICAL SCIENCES**, 22 jul. 2008.

JIANG, Helen; JIANG, Fang-Xu. Human pluripotent stem cell-derived β cells: Truly immature islet β cells for type 1 diabetes therapy? **World Journal of Stem Cells**, v. 15, n. 4, p. 182–195, 26 abr. 2023.

KAESTNER, Klaus H. *et al.* What is a β cell? – Chapter I in the Human Islet Research Network (HIRN) review series. **Molecular Metabolism**, v. 53, p. 101323, nov. 2021.

KARIMOVA, Mariana V.; GVAZAVA, Inessa G.; VOROTELYAK, Ekaterina A. Overcoming the Limitations of Stem Cell-Derived Beta Cells. **Biomolecules**, v. 12, n. 6, p. 810, 9 jun. 2022.

KLEC, Christiane *et al.* Calcium Signaling in β -cell Physiology and Pathology: A Revisit. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 6110, 4 dez. 2019.

LEE, Joonyub; YOON, Kun-Ho. β cell replacement therapy for the cure of diabetes. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 13, n. 11, p. 1798–1802, nov. 2022.

LOU, L. L.; LLOYD, S. J.; SCHULMAN, H. Activation of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 24, p. 9497–9501, dez. 1986.

LOVIC, Dragan *et al.* The Growing Epidemic of Diabetes Mellitus. **Current Vascular Pharmacology**, v. 18, n. 2, p. 104–109, 27 jan. 2020.

MAGLIANO, Dianna; BOYKO, Edward J. **Diabetes atlas**. 11th edition ed. Brussels: International Diabetes Federation, p. 87-88, 2025.

MARCELO, Kathrina L.; MEANS, Anthony R.; YORK, Brian. The Ca²⁺/Calmodulin/CaMKK2 Axis: Nature's Metabolic CaMshaft. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 10, p. 706–718, out. 2016.

MEYER, Tobias *et al.* Calmodulin Trapping by Calcium-Calmodulin-Dependent Protein Kinase. **Science**, v. 256, n. 5060, p. 1199–1202, 22 maio 1992.

MÜLLER, Michael *et al.* The Dynamics of Calcium Signaling in Beta Cells—A Discussion on the Comparison of Experimental and Modelling Data. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3206, 6 fev. 2023.

MU-U-MIN, Razik Bin Abdul *et al.* Ca²⁺-Mediated Signaling Pathways: A Promising Target for the Successful Generation of Mature and Functional Stem Cell-Derived Pancreatic Beta Cells In Vitro. **Biomedicines**, v. 11, n. 6, p. 1577, 29 maio 2023.

NIKI, Ichiro; HIDAKA, Hiroyoshi. Roles of intracellular Ca²⁺ receptors in the pancreatic β -cell in insulin secretion. 1999.

RORSMAN, Patrik; BRAUN, Matthias. Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. **Annual Review of Physiology**, v. 75, n. 1, p. 155–179, 10 fev. 2013.

ROSTAS, John A. P.; SKELDING, Kathryn A. Calcium/Calmodulin-Stimulated Protein Kinase II (CaMKII): Different Functional Outcomes from Activation, Depending on the Cellular Microenvironment. **Cells**, v. 12, n. 3, p. 401, 23 jan. 2023.

SALINNO, Ciro *et al.* β -Cell Maturation and Identity in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5417, 30 out. 2019.

SHIN, Soona *et al.* CREB mediates the insulinotropic and anti-apoptotic effects of GLP-1 signaling in adult mouse β -cells. **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 8, p. 803–812, nov. 2014.

STOLOVICH-RAIN, Miri *et al.* Weaning Triggers a Maturation Step of Pancreatic β Cells. **Developmental Cell**, v. 32, n. 5, p. 535–545, mar. 2015.

SUEFUJI, Mihoshi *et al.* The impact of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II on insulin gene expression in MIN6 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 421, n. 4, p. 801–807, maio 2012.

SWULIUS, M. T.; WAXHAM, M. N. Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 17, p. 2637–2657, set. 2008.

VALVERDE, I.; MALAISSE, W. J. Calmodulin and pancreatic B-cell function. **Experientia**, v. 40, n. 10, p. 1061–1068, out. 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus.* Geneva: World Health Organization, 1999.

WORTHAM, Matthew; SANDER, Maike. Transcriptional mechanisms of pancreatic β -cell maturation and functional adaptation. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 474–487, jul. 2021.

YAN, Xiaodong *et al.* CaMKII-Mediated CREB Phosphorylation Is Involved in Ca^{2+} -Induced BDNF mRNA Transcription and Neurite Outgrowth Promoted by Electrical Stimulation. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162784, 9 set. 2016.

YASUDA, R.; HAYASHI, Y.; HELL, J. W. **CaMKII: a central molecular organizer of synaptic plasticity, learning and memory.** Nature Reviews NeuroscienceSpringer Nature, 1 nov. 2022.

ZHOU, Bin *et al.* Worldwide trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-representative studies with 141 million participants. **The Lancet**, v. 404, n. 10467, p. 2077–2093, nov. 2024.

APÊNDICE A – MEMBRANAS CORADAS COM PONCEAU UTILIZADAS PARA NORMALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE WESTERN BLOT

Os resultados obtidos por Western blot foram normalizados utilizando a coloração total de proteínas por Ponceau. A área delimitada pelo retângulo pontilhado corresponde à região empregada para a quantificação e normalização das bandas (Estão apresentados exemplos representativos das membranas utilizadas na normalização).

