



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

Karina Rodrigues dos Santos

Papel do agonista do hormônio liberador do hormônio de crescimento MR-409, sobre modelo de célula beta pancreática INS-1E sob estresse de retículo endoplasmático

CAMPINAS

2020

KARINA RODRIGUES DOS SANTOS

PAPEL DO AGONISTA DO HORMÔNIO LIBERADOR DO HORMÔNIO DE
CRESCIMENTO MR-409, SOBRE MODELO DE CÉLULA BETA PANCREÁTICA INS-
1E SOB ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Dissertação/Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Funcional e Molecular, na Área de Fisiologia.

ORIENTADA PELA PROFA. DRA. HELENA CRISTINA DE LIMA BARBOSA
SAMPAIO

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA KARINA RODRIGUES DOS
SANTOS E ORIENTADA PELA HELENA CRISTINA
DE LIMA BARBOSA SAMPAIO.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R618p Rodrigues dos Santos, Karina, 1992-
Papel do agonista do hormônio liberador do hormônio de crescimento MR-409, sobre modelo de célula beta pancreática INS-1E sob estresse de retículo endoplasmático / Karina Rodrigues dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Células secretoras de insulina. 2. Estresse do retículo endoplasmático. I. Barbosa-Sampaio, Helena Cristina, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Role of growth hormone releasing hormone agonist MR-409, on the pancreatic beta cell model INS-1E under endoplasmic reticulum stress

Palavras-chave em inglês:

Insulin-secreting cells

Endoplasmic reticulum stress

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio [Orientador]

Claudio Chrysostomo Werneck

Camila Aparecida Machado de Oliveira

Data de defesa: 28-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3012-7171>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3066138614834099>

Campinas, 28 de fevereiro de 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

Profa. Dra. Camila Aparecida Machado de Oliveira

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia

DEDICATÓRIA

À minhas irmãs, Alcione, Luana e Gabrielle e
à Sil, “por sempre me pôr no caminho”.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto de pesquisa nº 2018/00665-6, que tornou possível a produção dessa dissertação.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por proporcionar a minha formação desde a graduação.

Aos professores, funcionários, colaboradores e todas às outras pessoas que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

À prof. Dr. Helena Barbosa, por me conceder a chance de um grande aprendizado.

Ao prof. Daniel Martins de Souza e à Lícia Costa pela análise do proteoma.

Aos colegas de grupo, Emilio, Lucas, Letícia e Gabriela, pelo crescimento profissional e pessoal.

Aos colegas de laboratório, pelo imenso aprendizado compartilhado. Com vocês, tudo ficou mais possível e mais leve.

Aos amigos do 012n, pelo suporte de sempre.

À minha família, em especial minhas irmãs, por sempre me incentivarem a percorrer novos caminhos em busca dos meus sonhos e por sempre me apoiarem durante a jornada.

À Silvana, por estar ao meu lado nos meus altos e baixos, e por me ensinar a ver a vida com outros olhos.

A Deus, por tudo.

RESUMO

O *growth-hormone-releasing hormone* (GHRH) é um hormônio produzido no hipotálamo, responsável por induzir a síntese e a secreção do hormônio do crescimento pela hipófise, contudo, recentemente, vem se demonstrando a sua ação também em tecidos periféricos, dentre eles o pâncreas endócrino. Nas células alvo o GHRH elicitia vias de sinalização que culminam com o aumento da sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. Desta maneira, considerando-se o declínio de massa de células beta concomitante à progressão do diabetes mellitus tipo 2 (DM2), o GHRH torna-se um potencial agente terapêutico, contudo seus mecanismos de ação não estão completamente elucidados. Um dos mecanismos relacionados ao declínio progressivo da função insular é o estresse de retículo endoplasmático (RE), que contribui para o avanço do DM2. Como os efeitos do GHRH e seus agonistas não foram totalmente elucidados na célula beta, propomos investigá-los avaliando o papel do agonista de GHRH, o MR-409, em células sob estresse de RE. Os resultados apontam que o agonista não foi capaz de modular os marcadores deste estresse. Apesar disso, células sob estresse de RE e tratadas com o agonista sobrevivem mais do que aquelas sem o tratamento. Essa sobrevivência pode ser devida, em parte, ao aumento de proteínas da família Bcl-2 anti-apoptóticas e à prevenção de estresse oxidativo. Estas repostas observadas podem ser devidas à maior fosforilação da proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB) desencadeada pela via de sinalização do MR-409. Nossos dados indicam efeito do MR-409 em atenuar parcialmente a apoptose em linhagem de células secretoras de insulina sob estresse de RE.

ABSTRACT

The growth-hormone-releasing hormone (GHRH) is a hormone produced in the hypothalamus, responsible for inducing the synthesis and secretion of growth hormone by the pituitary. However, recently, its action has also been demonstrated in peripheral tissues, among them the endocrine pancreas. In target cells, GHRH elicits signaling pathways that culminate in increased cell survival, proliferation and differentiation. Thus, considering the decline in beta cell mass concomitant with the progression of type 2 diabetes mellitus (DM2), GHRH becomes a potential therapeutic agent. However, its mechanisms of action are not entirely understood. The endoplasmic reticulum (ER) stress is one of the mechanisms related to the progressive decline of islet function, contributing to the progress of DM2. As the effects of GHRH and its agonists have not been fully elucidated in the beta cell, we propose to investigate them by evaluating the role of the GHRH agonist, MR-409, in cells under ER stress. The results show that the agonist was not able to prevent cells of ER stress. Despite this, cells under ER stress and treated with the agonist survive longer than those without the treatment. This survival may be due, in part, to an increase in anti-apoptotic Bcl-2 family proteins and prevention to oxidative stress. These responses may be due to the greater phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) triggered by the MR-409 signaling pathway. Our data indicate the effect of MR-409 in partially attenuating apoptosis in an insulin-secreting cell line under ER stress.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Diabetes	10
1.2 Estresse de Retículo Endoplasmático	10
1.3 Proteínas da UPR e célula beta pancreática.....	13
1.4 GHRH e agonistas	14
1.5 Agonistas de GHRH e célula beta pancreática.....	15
2. OBJETIVO.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Cultura de células.....	16
4.2 Teste de morte celular	17
4.3 Curva de concentração de CPA	17
4.4 Tratamento com CPA e MR-409	18
4.5 Real-time PCR.....	18
4.6 Western Blot	19
4.7 Fosforilação de CREB.....	19
4.8 Secreção de insulina	20
4.9 Mitosox	20
4.10 Extração de proteínas para espectrometria de massas e pré-fracionamento.....	20
4.11 Tripsinização	21
4.12 Análise proteômica por Espectrometria de Massas	21
4.13 Identificação das proteínas	22
4.14 Análise de <i>Fold Change</i>	22
4.15 Análise estatística	22
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO I.....	54
ANEXO II	55
ANEXO III.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes

O diabetes mellitus (DM) é uma desordem endócrina crônica e progressiva caracterizada pela concentração elevada de glicose no sangue (hiperglicemia) mesmo durante períodos de jejum (1, 2). Sua ocorrência se dá pela deficiência na produção do hormônio insulina pelas células beta pancreáticas e/ou pela disfunção da ação da insulina nos tecidos periféricos (3, 4). A insulina é um importante agente na manutenção da glicemia sistêmica atuando em diferentes tecidos do corpo, seja sinalizando para as células captarem glicose do sangue, como nos tecidos muscular e adiposo, ou sinalizando para a produção de glicogênio, como no caso do fígado.

Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) leva à resistência à insulina e à insensibilidade das células dos tecidos periféricos aos efeitos da insulina e/ou pela redução da capacidade secretória da célula beta (3-7). O desenvolvimento dessa insensibilidade característica do DM2 tem como fatores de riscos extrínsecos: excesso de peso e obesidade, desnutrição, tabagismo, dietas com alto consumo de açúcares e gorduras e sedentarismo (8), práticas muito comuns da vida urbana em nossa sociedade e que refletem na prevalência do DM2 entre os doentes (9).

A secreção de insulina se dá em resposta a fatores hormonais, nutricionais e neurais, onde o principal secretagogo é a glicose, que eleva a concentração plasmática de insulina através de aumento da razão ATP/ADP intracelular quando a glicose é oxidada; esta elevação promove o fechamento de canais de potássio sensíveis a ATP, o que gera alteração do potencial da membrana celular com consequente abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. O aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico estimula a atividade da maquinaria exocítica que culmina com a fusão dos grânulos de insulina à membrana celular e liberação da insulina no meio extracelular (10). Dentre as principais causas relacionadas à redução da capacidade secretória e/ou da massa de célula beta estão: glico- e lipotoxicidade, produção excessiva de ROS, ação de citocinas pró inflamatórias e estresse de RE (11-14).

1.2 Estresse de Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático é uma organela membranosa e pode ser classificada em liso (REL) e o rugoso (RER) (15). O liso é composto principalmente de estruturas tubulares membranosas e é responsável pela detoxificação de xenobióticos, biossíntese de lipídeos

(ácidos graxos e esteroides) e armazenamento de cálcio (16, 17). Já o RER, possui ribossomos associados à porção citoplasmática da sua membrana que lhe conferem aspecto rugoso e apresenta como principais funções a síntese, enovelamento e modificações pós traducionais de proteínas, além de também ser responsável pelo armazenamento de cálcio (17, 18). Alterações na homeostase do RER prejudicam suas funções de enovelamento e modificações pós traducionais, que caracterizam estresse de RE, que na célula beta pode resultar na perda da capacidade secretória e consequente hiperglicemia. As principais perturbações que levam ao estresse de RE nessa célula são a lipotoxicidade, a glicotoxicidade, ação de citocinas pró-inflamatórias, hipóxia e mutações no gene da insulina. (11-14). A perda da homeostase do RE favorece o mal enovelamento de proteínas que, ao se acumularem no lúmen da organela, ativam a resposta a proteínas mal dobradas (*Unfolded protein response*, UPR) (19). Tal resposta é um mecanismo adaptativo especialmente importante em células secretoras, que serve para expandir, dinamicamente, tanto o tamanho do RE quanto sua capacidade de enovelamento de proteínas, respondendo de forma satisfatória o estímulo secretório.

A UPR constitui uma sinalização fisiológica essencial à manutenção e sobrevivência da célula, que direciona, conforme o grau de estresse, a sobrevivência ou a morte celular. A ativação da UPR é mediada por três transdutores canônicos presentes na membrana do RE (Imagem 1): *inositol-requiring 1 α* (IRE1 α), *PKR-like ER kinase* (PERK) e *activating transcription factor 6* (ATF6). Estas proteínas, sob condições normais, estão ligados à chaperona *78-kDa glucose-regulated* (Grp78/Bip), a principal reguladora da UPR (20). A interação com Bip mantém os transdutores da UPR inativos e quando há perda de homeostase, como disfunções nos níveis de cálcio ou mudança no estado redox que levam ao acúmulo de proteínas mal enoveladas, a Bip se desliga dos transdutores para promover o enovelamento de proteínas mal dobradas (21).

IRE1 α , ao se desligar de Bip, oligomeriza e se autofosforila ativando seu domínio quinase e seu domínio com atividade endoribonuclease, que cliva 26 nucleotídeos do RNA mensageiro de *X-Box binding protein-1 unspliced* (XBP1u) produzindo o *X-Box binding protein-1 spliced* (XBP1s) maduro (22). Ao ser traduzido, XBP1s funciona como fator de transcrição de genes envolvidos na UPR, como proteínas envolvidas no enovelamento de proteínas, controle de qualidade, biossíntese de lipídeos, degradação de proteínas mal enoveladas e biogênese de RE e Golgi (23). Além disso, IRE1 α promove diretamente a degradação de RNAs mensageiros codificadores de proteínas que seriam translocadas para o lúmen do RE, diminuindo a carga de proteínas direcionadas à esta organela (19, 24).

De maneira similar à IRE1 α , ao perder a interação com Bip, PERK se dimeriza e sofre autofosforilação, passando a fosforilar também sua proteína alvo, *eukaryotic initiation factor 2 alpha* (eIF2 α), um importante componente da maquinaria traducional. Essa fosforilação impede que eIF2 α promova a troca de GDP por GTP, reduzindo a quantidade de complexo ternário eIF2-GTP-tRNAMet, necessário para a iniciação da tradução, reduzindo a taxa de tradução global e, assim, a quantidade de proteínas que seriam enviadas ao RE (25).

Paradoxalmente, essa diminuição global da síntese de proteínas favorece a tradução de ATF4, através do mecanismo de *Upstream Open Reading Frame* (uORFs) (26, 27). ATF4 induz a transcrição de CHOP (*DNA damage-inducible transcript 3* ou *C/EBP homologous* protein) que regula genes envolvidos na biossíntese e transporte de aminoácidos e, dependendo da intensidade do estímulo, apoptose (28, 29). A via PERK-ATF4 também é responsável pela ativação de resposta antioxidante, evitando a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), que leva à hiperoxidação do lúmen do RE, e contribui para a disfunção no enovelamento de proteínas e no vazamento de Ca²⁺ para a mitocôndria. O aumento do influxo de Ca²⁺ para a mitocôndria favorece a formação de EROs nesta organela além de desencadear morte celular (30, 31).

O último transdutor, ATF6, quando ativado, migra para o Golgi onde é clivado por proteases residentes na membrana, *site-1 protease* e *site-2 protease* (S1P e S2P), em ATF6 α e ATF6 β (32). O ATF6 α , é exportado para o núcleo, onde se liga aos cis-elementos de resposta ao estresse (ERSE) para transcrever genes que codificam XBP1u, chaperonas do RE e genes relacionados ao enovelamento de proteínas (33, 34).

Todas as ações das vias dos três transdutores da UPR culminam no alívio da carga de trabalho do retículo, diminuindo a quantidade de polipeptídeos recém sintetizados enviados à organela, além de aumentar sua capacidade de enovelamento de proteínas. Caso o estresse seja persistente, a resposta passa de recuperativa/adaptativa para pró-apoptótica. Neste último cenário, há ativação de proteínas pró-poptóticas e diminuição de proteínas anti-apoptóticas, desencadeando a morte celular. Uma das proteínas responsáveis pela ativação da apoptose celular via estresse de RE é a proteína CHOP (35), que, no estresse crônico, é capaz de se dimerizar com outras proteínas/fatores de transcrição e favorecer a transcrição de mediadores que promoverão a morte celular (36).

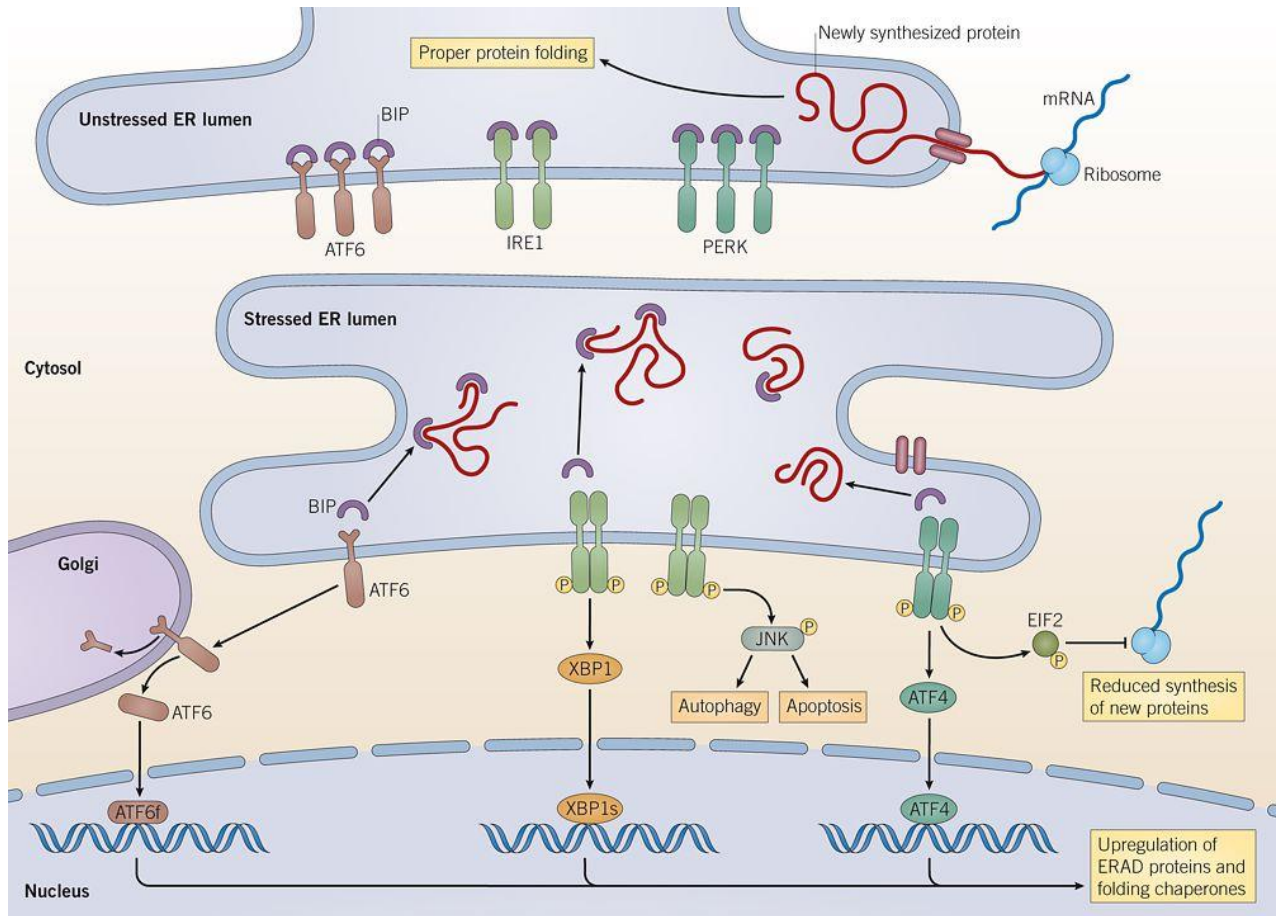


Imagem 1: *ER Stress and the Unfolded Protein Response (UPR)*: esquema mostrando a sinalização da UPR desencadeada pelas vias das proteínas IRE1 α , da PERK e do ATF6. Adaptado de Todd et al. (2008) (37)

1.3 Proteínas da UPR e célula beta pancreática

Na célula beta pancreática, o RER é uma organela bem ativa e possui sua estrutura de endomembranas bem desenvolvida, corroborando com a sua função central no enovelamento e processamento da insulina (38). Além disso, esta célula deve ser capaz de conseguir adaptar-se às variações na produção de insulina conforme a flutuação na concentração de glicose.

O aumento na demanda pela produção de insulina em condições fisiológicas, como no estado pós prandial, ativa uma resposta adaptativa da UPR, pela IRE1 α . Durante a estimulação aguda de células beta, INS-1 e ilhotas de ratos, com alta glicose, há fosforilação de IRE1 α que age regulando positivamente a biossíntese e secreção de insulina, aumentando também a produção de proteínas residentes do RE e que estão envolvidas no enovelamento de proteínas. Essa ativação de IRE1 α acontece sem a clivagem de XBP1 e sem a ativação da via das *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs). Porém, o estímulo crônico com glicose, como acontece durante o desenvolvimento do DM2, onde há um aumento na demanda pela produção e secreção de

insulina na célula beta pancreática, leva à perda da homeostase do RE e à completa ativação da UPR, com o aumento da fosforilação de IRE1 α , que desencadeia o *splicing* de XBP1 e a diminuição no conteúdo proteico e do RNA mensageiro da insulina. Reduzindo a síntese e secreção de insulina, a capacidade secretória e, consequentemente, levando à perda da massa de célula beta que contribui ainda mais para a hiperglicemia na progressão do DM2 (39, 40).

Além do papel adaptativo e recuperativo da UPR, as proteínas desta via também desempenham um importante papel no desenvolvimento da célula beta. É sabido, por exemplo, que PERK, assim como p-eIF2 α , são importantes para a diferenciação das células beta e, consequentemente, para a formação das ilhotas pancreáticas no período neonatal (41-43) em humanos e camundongos. A sinalização PERK-eIF2 α é ainda importante para limitação no dano oxidativo que pode acontecer pela produção excessiva de proteína e o consequente acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE (42, 44). Dessa forma as proteínas que desencadeiam a UPR se mostram importantes desde a diferenciação e formação da ilhota beta pancreática até a promoção de respostas adaptativas essenciais para a função secretória, funcionando como um mecanismo chave entre a adaptação e sobrevivência da célula e a apoptose.

1.4 GHRH e agonistas

Alguns hormônios do eixo hipotálamo-hipófise, dentre eles o GHRH, vem se destacando como reguladores essenciais da homeostase glicêmica em tecidos periféricos (45-54), tornando-se potenciais agentes terapêuticos para melhora da função da célula beta, além de emergentes objetos de estudos no entendimento do D2M.

A principal função descrita para o hormônio liberador do hormônio de crescimento (*growth hormone releasing hormone* - GHRH), produzido principalmente no hipotálamo, é estimular a produção e a liberação do hormônio do crescimento (GH - *growth hormone*) pela adenohipofise. Sua ação nas células hipofisárias acontece através da interação do GHRH com seu receptor de membrana (*growth-hormone-releasing hormone receptor* - GHRH-R), um receptor acoplado à proteína G, que ativa o sistema adenilil-ciclase-AMPC e a via do fosfatidilinositol, resultando na síntese e na liberação do GH (55). Dentre os múltiplos efeitos associados a esta via, ocorre a fosforilação de CREB (56, 57), um fator de transcrição envolvido em uma série de fenômenos celulares como, por exemplo, resposta antioxidante, proliferação e sobrevivência celular (56, 58, 59).

Por muito tempo acreditou-se que a ação do GHRH se restringia basicamente ao somatotrofo, mas a presença desse hormônio tem sido descrita em diferentes tecidos periféricos,

como o coração, músculo esquelético, rins, fígado, pâncreas endócrino, tecido conjuntivo, ovários, endométrio, em células do sistema imunológico e tecido adiposo (49, 50, 53, 54, 60-64). Além da expressão do hormônio, tem-se demonstrado que esses tecidos também expressam um variante do receptor de GHRH (46, 49, 51, 53, 64, 65).

Devido a essas novas descobertas e ao interesse farmacológico nas ações do GHRH, uma série de agonistas deste hormônio foi sintetizada nos últimos anos. O primeiro grupo de peptídeos agonistas, chamado de série JI, mostraram-se mais ativos e estáveis quando comparados ao hormônio humano, possuindo afinidade e capacidade para estimular a secreção de GH superiores a este (66). O segundo grupo de agonistas, chamado de série MR, mostraram-se ainda mais potentes que os da série JI (67). O GHRH humano (hGHRH), GHRH [(1-44) NH₂], é um peptídeo que possui 44 aminoácidos dos quais, o fragmento 1-29 mostrou-se ser a sequência que exibe atividade completa do hormônio (66) sendo, portanto, a sequência que sofreu modificações nos agonistas (67, 68). Dentre os peptídeos da série MR, o MR-409 destacou-se no teste *in vitro* de ligação ao receptor de GHRH em membrana de células hipofisárias humanas, exibindo um IC₅₀ = 7.65nM, de 7,57 vezes maior que o humano. Quando testado quanto à capacidade de estimular a liberação de GH em ratos, o MR-409 foi mais de 100 vezes mais potente que o hormônio endógeno. Após a administração subcutânea, o agonista estimulou a liberação de 427,4 ng/ml de GH nos primeiros 15 min em comparação com os 140,9 ng/ml liberados pelo hGHRH. O estímulo de liberação de GH pelo MR-409 permaneceu alta mesmo após 30 min, o que indica estabilidade da molécula e uma meia-vida mais longa que o hormônio endógeno (67). Dessa forma, o MR-409 se tornou uma boa alternativa para uso em pesquisa, por ser mais estável e potente.

Dentre os efeitos do GHRH e/ou de seus agonistas nestes tecidos destaca-se: sobrevivência, proliferação e diferenciação celular em cardiomiócitos; diferenciação e regulação da produção de citocinas em células mononucleares do sangue; proliferação e migração de fibroblastos no tecido conjuntivo; sobrevivência e secreção de insulina estimulada por glicose na célula beta pancreática; e redução na adiposidade visceral e melhora na dislipidemia (46, 49-51, 53, 54, 65, 69).

1.5 Agonistas de GHRH e célula beta pancreática

Os efeitos dos agonistas sintéticos de GHRH, das séries JI e MR foram investigados em células e camundongos. O tratamento de células beta pancreática de ratos, INS-1E, com o

agonista JI-36 promoveu: 1) aumento da sobrevivência celular através da diminuição da atividade das caspases; 2) melhora das funções metabólicas, através do aumento da membrana celular, volume do citoplasma, quantidade de mitocôndrias e de lisossomos; 3) e aumento da proliferação celular e secreção de insulina. Além disso, ilhotas que foram pré tratadas com JI-36, antes do transplante sob a cápsula do rim de camundongos NOD-SCID diabéticos, foram capazes de normalizar a glicemia nesses animais mais cedo e mais consistentemente do que as ilhotas controle (50).

Ainda, agonistas da série MR, que se mostraram mais eficientes em relação à série JI (67), ativaram o GHRH-R, aumentando a atividade de vias ligadas à proliferação e sobrevivência em células beta INS-1E e a proliferação em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos. Os agonistas também foram capazes de aumentar o conteúdo de RNAm da insulina, de IGF-1 e GHRH-R em células beta INS-1 (70).

Tendo em vista as ações dos agonistas do GHRH em tecidos periféricos, especialmente suas ações em células beta pancreáticas, dando destaque para o aumento na sobrevivência celular e na secreção de insulina, hipotetizamos que o agonista é um alvo para tratar células sob estresse de RE, recuperando-a e evitando a apoptose da célula.

2. OBJETIVO

Investigar os efeitos do agonista MR-409 na modulação de proteínas da via da UPR em células INS-1E sob estresse de RE. Investigar os efeitos do agonista MR-409 na sobrevivência de células INS-1E sob estresse de RE.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Linhagens de células beta de rato (INS-1E), gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Wolheim (*Center Medical Universitaire, Geneva, Switzerland*), foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ em meio RPMI-1640 contendo 11 mM de glicose e suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de piruvato de sódio e 50 mM de beta-mercaptoetanol. Para os tratamentos, as células foram plaqueadas em placas de 96 ou 24 poços até atingirem 70-80% de confluência.

4.2 Teste de morte celular

Para avaliar a morte de células INS-1E, utilizamos a marcação com Hoechst 33342 (HO) e Iodeto de Propídio (PI), em células tratadas com o agonista MR-409 e diferentes estressores de RE: tunicamicina (Tm), coquetel de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e INF γ) e ácido ciclopiazônico (CPA), além do MR-409. As concentrações utilizadas foram: CPA 12,5 μ M por 12h; coquetel de Citocinas (10 U/ml de IL-1 β e 140 U/ml de INF- γ) por 24h; Tunicamicina 5 μ g/ml por 16h; e CPA 12,5 μ M + 0,5 μ M, 1 μ M e 2 μ M de MR-409 por 12h; coquetel de citocinas (10 U/ml de IL-1 β e 140 U/ml de INF- γ) + 1 μ M de MR-409 por 24h; tunicamicina 5 μ g/ml + 1 μ M de MR-409 por 16h. Os tratamentos foram realizados em triplicatas, em placas de 96 poços e as células foram incubadas com duas concentrações de soro: meio contendo 5% de soro, volume utilizado para o meio de manutenção das células INS-1E; e meio contendo 0,1% de soro, volume recomendado para o uso com o agonista MR-409. Após os tratamentos, 100 μ l de meio foram retirados dos poços. Em seguida, 100 μ l de solução contendo 1 mg/ml de Hoechst 33342 (HO) e 1 mg/ml de Iodeto de Propídio (PI) foi adicionado a cada poço da placa e incubado por 15 min. Após a incubação, a fim de diluir a solução de HOPI, foram retirados do poço 100 μ l da solução e adicionado mais 100 μ l de meio. A leitura e análise da placa para porcentagem de células apoptóticas foi realizada por *High-Content Imaging System (ImageXpress Micro Confocal, Molecular Devices)*, por meio do módulo *Live and Dead* do software *MetaXpress (Molecular Devices)*. Para identificar as populações de células vivas e mortas foram aplicadas máscaras para os comprimentos de onda *DAPI* (excitação em 350 nm e emissão em 470 nm - *Hoescht*) e *Texas Red* (excitação em 496 nm e emissão em 615 nm - Iodeto de Propídio).

4.3 Curva de concentração de CPA

Células INS-1E foram tratadas com CPA (Sigma C1530-5mg) nas concentrações de 6,25 μ M; 12,5 μ M e 25 μ M durante períodos de 8h ou 12h. Os grupos dos tratamentos foram: controle, que não receberam tratamento, apenas meio de manutenção; CPA, nas concentrações de 6,25 μ M, 12,5 μ M e 25 μ M; e DMSO, que recebeu DMSO nas mesmas concentrações que o CPA (6,25 μ M, 12,5 μ M e 25 μ M).

4.4 Tratamento com CPA e MR-409

O agonista do GHRH, MR-409, foi diluído em DMSO para obter a concentração de 10 mM conforme protocolo disponibilizado pelo Dr. Andrew V. Schally. Os grupos para tratamento com o agonista foram: DMSO, sendo o controle; MR, contendo 2 μ M de MR-409; CPA 12,5 μ M; e CPA 12,5 μ M + MR-409 2 μ M; Todos os grupos foram tratados por 12 horas. As drogas foram diluídas em meio RPMI-1640 contendo 11 mM de glicose e suplementado com 0,1% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 100 μ g/ml de piruvato de sódio e 50 mM de beta-mercaptoetanol. Após os tratamentos as células foram coletadas para *Western Blot* (WB), RT-qPCR (qPCR) e para espectrometria de massas.

4.5 Real-time PCR

Células INS-1E incubadas com CPA e/ou com o agonista MR-409, tiveram seu RNA extraído. As amostras foram coletadas com 500 μ l de *Trizol* (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizados 2 μ g de RNA para a síntese da fita de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit *High Capacity* (Applied Biosystems), de acordo com manual do fabricante. Em seguida, o cDNA foi diluído 20 vezes e 1 μ l foi utilizado em cada reação de PCR quantitativo, contendo 300 nM de primers, 3,4 μ l de água e 5 μ l de *Fast SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) totalizando 10 μ l de reação. A quantificação foi realizada no *Fast 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Os valores de C_T de cada RNAm quantificado foram corrigidos pelo controle interno HPRT e a expressão relativa dos mesmos foi calculada pelo método de *Livak* adaptado (71).

Tabela 1: Seqência dos primers utilizados no qPCR

Gene		Seqência dos primers (5'-3')
XBP1	<i>Forward</i>	AGCAGCAAGTGGTGGATTTG
	<i>Reverse</i>	GAGTTTTCTCCCGTAAAAGCTGA
CHOP	<i>Forward</i>	CTGGAAGCCTGGTATGAGGAT
	<i>Reverse</i>	CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGT
Bip	<i>Forward</i>	ACTTGGGGACCACTATTCCT
	<i>Reverse</i>	ATCGCCAATCAGACGCTCC
ATF4	<i>Forward</i>	GTTGGTCAGTGCCTCAGACA

SERCA2b	<i>Reverse</i>	CATTCGAAACAGAGCATCGA
	<i>Forward</i>	TTTGTGGCCCGAAACTACCT
	<i>Reverse</i>	GGCATAATGAGCAGCACAAAGGG
HPRT	<i>Forward</i>	GGTTAAGCAGTACAGCCCCA
	<i>Reverse</i>	TCCAACACTTCGAGAGGTCC

4.6 Western Blot

Extratos proteicos de células INS-1E tratadas com MR-409 e/ou CPA, bem como células controle foram quantificados utilizando-se reagente Bradford (BioRad), tendo como base uma curva padrão de albumina (BSA). As amostras foram então incubadas à 100°C por 5 min em Tampão de Laemmli contendo DTT. Para corrida eletroforética foi aplicado um volume correspondente a 10-20 µg de proteína em gel bifásico (gel de empilhamento e gel de resolução). Após a corrida as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) com tampão de transferência. Após bloqueio (5% de albumina bovina) as proteínas de interesse foram detectadas com anticorpo específico, (Anti-GRP78 (Bip), Abcam, ab21685; Anti-XBP1, Abcam, ab37152; Anti-DDIT3 (CHOP), Abcam, ab11419; Anti-eIF2S1 (phospho S51), Abcam, ab32157; Anti-Bcl-xL, Cell Signaling, 54H6; Anti-Bax, Cell Signaling, 27725; Anti-GAPDH, (Sigma, G9545); anti-Creb (Cell Signaling 48H2) e anti-p-Creb (ser133) (Cell Signaling 87G3) seguida de incubação com anticorpo secundário contendo peroxidase (HRP) e, finalmente, com reagentes de quimioluminescência. As imagens foram capturadas em fotodocumentador (Amersham™ Imager 600, Life Sciences) e a intensidade e quantificação das bandas foram medidas por densitometria (*ImageJ*, Bethesda, USA), sendo os valores das bandas normalizados pelos valores de densitometria dos controles internos.

4.7 Fosforilação de CREB

Células INS-1E foram cultivadas com meio RPMI para a avaliação de fosforilação de CREB. As células foram cultivadas em placas de 24 poços e quando atingiram 70-80% de confluência foram tratadas com 2 µM de MR-409, com o controle positivo Cafeína 5mM ou mantidas sem tratamento. Os tempos de tratamento foram 0, 15 e 30 minutos. A avaliação na modulação da fosforilação foi medida através de WB.

4.8 Secreção de insulina

Células INS-1E foram cultivadas com meio RPMI em placas de 96 poços até atingirem 70-80% de confluência, foram então tratadas com 12,5 μ M de CPA; 12,5 μ M de CPA + 2 μ M de MR-409 ou veículo por 12 horas. Logo após, o meio de cultura foi retirado e substituído por 100 μ L da solução de pré-incubação de Krebs (115 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,56 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 15 mM HEPES e 0.3% de BSA sem glicose e equilibrado com uma mistura contendo 5% CO₂ para um pH de 7.4), a 37°C por 1 hora. Posteriormente, a solução foi gentilmente removida e adicionou-se 100 μ L de Krebs contendo 2.8 mM ou 22.2 mM de glicose durante 1 hora. Ao fim da incubação, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -20°C para detecção de insulina por kit ELISA (*Crystal Chem, USA, Catalog #90080*), segundo orientações do fabricante.

4.9 Mitosox

Para medida de produção de superóxido mitocondrial, células INS-1E foram cultivadas em placa de 96 poços até atingirem confluência, tratadas com CPA e/ou MR-409, conforme já descrito, por 12h. Após o tratamento, as células foram incubadas por 10 minutos a 37°C com 5 μ M da sonda Mitosox Red (*Molecular Probes*) diluída em tampão Krebs (descrita anteriormente). Após este tempo, as células foram incubadas por 10 minutos com 1 μ g/mL Hoechst 33342 para normalização e, em seguida, lavadas por três vezes com PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ anidro; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,2). A intensidade de fluorescência do Mitosox Red (emissão 510 nm/excitação 580 nm) e do Hoechst 33342 (emissão 360 nm/excitação 500 nm) foi medida em espectrofotômetro.

4.10 Extração de proteínas para espectrometria de massas e pré-fracionamento

Após a incubação das células, as mesmas foram lavadas em tampão fosfato-salino. As células foram lisadas também na presença de tampão fosfato-salino usando sonicador por 10s. Todo o processo foi feito em banho de gelo. Para melhorar a cobertura proteômica, complexos de proteínas foram prefracionadas de acordo com o tamanho molecular aparente por SDS-PAGE. Amostras de 30 μ g de proteínas foram diluídas em tampão amostra de SDS-PAGE (2% w/v SDS, 100 mM Tris [pH 6.8], 10% glicerol, 100 mM DTT e 0,001% w/v azul de

bromofenol). Estas foram então aquecidas por 5 minutos à 95°C e então carregadas em gel 12% de poliacrilamida. Eletroforese foi realizada por uma hora a uma constante de 120 V. Bandas proteicas foram visualizadas por Coomassie blue. As bandas de proteínas foram retiradas do gel e submetidas à digestão por tripsina.

4.11 Tripsinização

As bandas proteicas do gel de poliacrilamida foram submetidas ao processo de digestão pela tripsina in gel de acordo com o protocolo descrito por Wilm, 1996. Basicamente, as bandas do gel foram trituradas e lavadas com 50% Acetonitrila (ACN) em 50 mM AmBic até a retirada do corante. Para alquilação das proteínas, 100 µL de 55 mM iodoacetamida (em 50 mM AmBic) foi adicionada e as amostras foram incubadas por 20 min a temperatura ambiente no escuro. Novamente, as bandas foram lavadas com 100% ACN e desidratadas. Solução de Tripsina 10 ng/µL foi adicionada aos tubos até cobrirem o gel seco e as amostras foram incubadas a 37°C overnight. A reação com a tripsina foi interrompida pela adição de solução de 50% ACN, 5% Ácido Fórmico em água. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante contendo os peptídeos gerados foi coletado para análises posteriores.

4.12 Análise proteômica por Espectrometria de Massas

As amostras foram analisadas por UPLC-MS num cromatógrafo líquido Waters ACQUITY UPLC H-Class acoplado a um espectrômetro de massas Waters Xevo G2-XS QTOF, operando em modo de resolução de ionização por eletrospray positivo (ESI+) (~ 35.000 FWHM). De cada amostra um volume de 10 µL (aproximadamente 10 µg de proteína) foi injetado. A separação foi realizada em uma coluna Charged Surface Hybrid (CSH) C18 2,1 × 150 mm, 1,7 µm mantida a 55 ° C, utilizando um gradiente linear de 200 µL/min de fases móveis A (água com 0,1% de ácido fórmico) e B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) de 99:1 a 70:30 A/B em 61,15 min, seguido de lavagem às 15:85 por 5 min e reequilíbrio em 99:1 por 8 minutos. Os peptídeos eluidores foram detectados pelo espectrômetro de massas QTOF operando em modo de aquisição independente de dados (DIA, MS E), com faixa de massa m/z 50-2000, tempo de varredura de 0,5s e uma rampa de energia de colisão de 19-45V na função de alta energia. As voltagens Capilar, Cone e Fonte foram ajustadas em 3kV, 40V e 80V, respectivamente. O fluxo de gás de dessolvatação e a temperatura foram de 900 L/he 450°C, respectivamente. O Quad Profile foi ajustado para m/z 500/600/700 com 25% de tempo de

espera e tempos de ciclo de rampa. O instrumento foi previamente calibrado com aglomerados de iodeto de sódio variando de m/z 100-2000 a partir de uma solução a 2 mg/ml em água/isopropanol. Durante todas as aquisições, foi adquirida uma referência externa amostrada por uma sonda ESI ortogonal (Lockmass, 200 fmol/ μ L Glu-Fibrinopeptide $[M + 2H]^+ 2+$ at m/z 785.8426) a cada 30s para 0,5 s para correção de massa pós-aquisição.

4.13 Identificação das proteínas

Os espectros foram processados e as proteínas foram identificadas e quantificadas com Progenesis QI for Proteomics® (Nonlinear Dynamics; Waters Corporation; versão 4.0) empregando Apex3D (Waters) para detecção de pico e pesquisa contra o banco de dados proteico humano Swiss-Prot. A quantificação foi realizada usando Hi-N (Hi3). Para obter o conjunto de dados preliminar de proteínas, os seguintes parâmetros foram considerados na identificação de peptídeos: digestão com tripsina com o máximo de uma clivagem perdida, oxidação de metionina como modificação variável (M) e modificação fixa por carbamidometil (C); taxa de descoberta falsa (FDR) menor que 4% e erro de massa menor que 20 ppm. Além disso, os requisitos de correspondência de íons foram definidos para identificar proteínas com pelo menos 1 íon por peptídeo, 3 íons por proteína e 1 peptídeo por proteína. As identificações que não atendiam a esses critérios foram rejeitadas. Em seguida, aplicou-se o agrupamento de proteínas, excluindo-se proteínas cujos peptídeos identificados consistiam em subconjuntos de outras proteínas.

4.14 Análise de *Fold Change*

O *fold change* (FC) foi calculado dividindo-se a abundância normalizada determinada pelo programa Progenesis (*Non linear dynamics*) do grupo tratado pelo grupo controle de cada comparação. Tomou-se como diferencialmente expressas as proteínas cujo FC foi maior do que aquele apresentado pela proteína *housekeeping* GAPDH.

4.15 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk* e, em seguida, aos testes de comparação paramétricos e não paramétricos teste *ANOVA one-way* e teste *t* de *Student*,

seguido do pós-teste Bonferroni. As análises foram feitas no programa *GraphPadPrism 7.04*. O nível de significância adotado para as análises foi $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

Morte celular em resposta a diferentes indutores de estresse de RE e concentrações de soro fetal bovino

Para iniciar nossas análises, realizamos um experimento de viabilidade celular para avaliar a resposta celular a diferentes agentes. Para isso utilizamos 3 modelos que levam a célula ao estresse de RE e disfunção na secreção de insulina: coquetel de citocinas pró-inflamatórias (72-74), ácido ciclopiazônico (CPA) (75, 76), um inibidor da bomba de cálcio SERCA2b, e tunicamicina (Tm) (77, 78), um inibidor da glicosilação de proteínas. Para o coquetel de citocinas, foi utilizada a dosagem de 10 U/ml de IL-1 β e 140 U/ml de IFN- γ , por 24h de acordo com Paula *et. al* (79). Para o CPA foi utilizada a concentração de 12,5 μ M por 12h, de acordo com Cunha *et. al* (75) e para Tm a concentração de 5 mg/ml por 12h conforme Abdullahi *et. al* (80). Nestes experimentos, a concentração utilizada do agonista foi de 1 μ M, em meio contendo 0,1% de SFB, conforme recomendações do Dr. Andrew V. Schally (Anexo 1), criador do agonista MR-409.

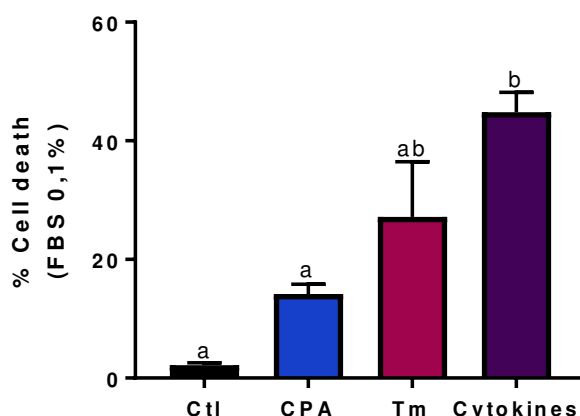


Figura 1: Porcentagem de células marcadas para morte celular, tratadas com CPA, tunicamicina e coquetel de citocinas, em meio contendo 0,1% de soro fetal bovino (SFB). Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-*one-way*, $n=3-4$; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

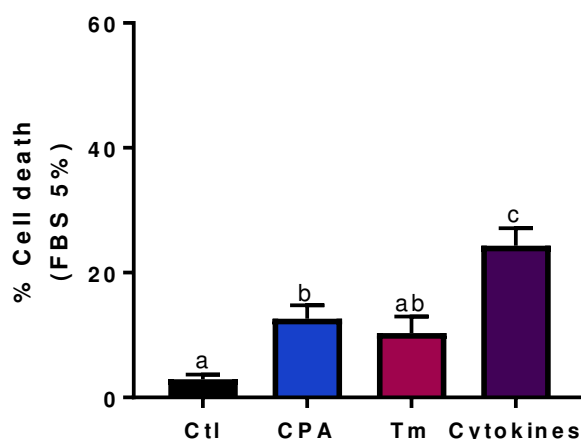


Figura 2: Porcentagem de células marcadas para morte celular, tratadas com CPA, tunicamicina e coquetel de citocinas, em meio contendo 5% de soro fetal bovino (SFB). Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-*one-way*, $n=4$; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Nesses primeiros resultados (Fig. 1 e 2) observamos que independentemente da concentração do SFB o grupo Citocinas apresentou maior morte celular, cerca de 44% no grupo com 0,1% de SFB (Fig. 1) e de 24% de morte no grupo com 5% de SFB (Fig. 2), mostrando-se o grupo com mais sensibilidade ao estressor. O tratamento com Tm apresentou menor porcentagem de morte no grupo tratado com 5% de SFB (Fig. 2), cerca de 10 % de morte, em relação ao grupo com 0,1% de SFB, onde a taxa ficou em cerca de 27% (Fig. 1). O grupo CPA mostrou a menor variação em relação a diferença na concentração de SFB. No grupo com 0,1% de SFB (Fig. 1), a porcentagem de morte foi de cerca de 14% e no grupo com 5% de SFB (Fig. 2) a morte celular foi de cerca de 12%.

O próximo passo foi avaliar a resposta das células com os agentes estressores de RE e o agonista do hormônio GHRH (MR-409) para verificar se este teria algum efeito nas respostas desencadeadas pelos agentes estressores.

MR-409 melhora viabilidade celular de células tratadas com CPA

As células foram tratadas com Citocinas por 24h, Tunicamicina por 16h e CPA por 12h, nas concentrações já apresentadas, em meio contendo 0,1% ou 5% de SFB, na presença de $1\mu\text{M}$ do agonista MR-409. Observamos que os grupos tratados com Citocinas permaneceram com alta porcentagem de células marcadas para morte, cerca de 47% no grupo com 0,1% de SFB (Fig. 3) e 21% no grupo com 5% de SFB (Fig. 4). No grupo Tm com 0,1% de SFB, a morte celular ficou em cerca de 64% (Fig. 3) e no grupo com 5% de SFB a taxa ficou em cerca de 9% (Fig. 4). Mais uma vez, o tratamento com CPA obteve a menor variação entre os tratamentos,

cerca de 12% de morte com 0,1% de SFB (Fig. 3) e cerca de 11% de morte com 5% de SFB (Fig. 4).

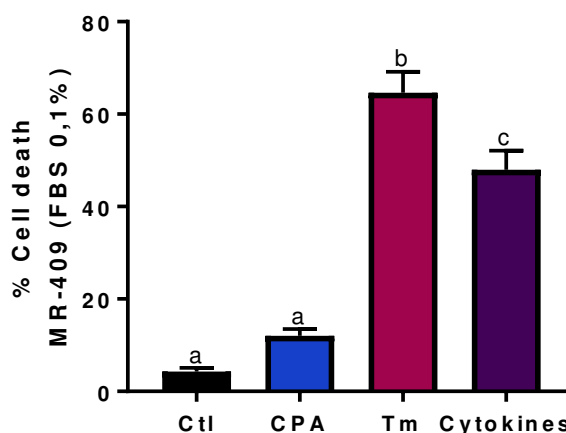


Figura 3: Porcentagem de células marcadas para morte celular, tratadas com CPA, tunicamicina e coquetel de citocinas, em meio contendo 0,1% de soro fetal bovino (SFB) e 1 μ M de MR-409. Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-*one-way*, $n=3-4$; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

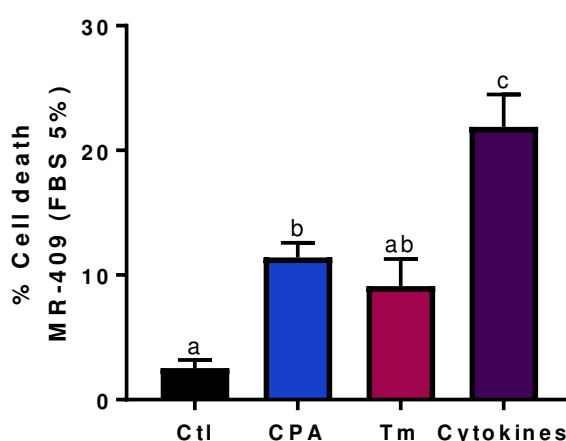


Figura 4: Porcentagem de células marcadas para morte celular, tratadas com CPA, tunicamicina e coquetel de citocinas, em meio contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1 μ M de MR-409. Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-*one-way*, $n=4-5$; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Baseando-se nesses resultados decidimos utilizar o grupo CPA para dar continuidade aos experimentos, pois, além de apresentar a menor taxa de morte celular entre os estressores, foi um tratamento que não variou conforme a concentração de SFB, possibilitando que conseguíssemos trabalhar com a concentração de soro (0,1%) necessária para o uso do MR-409, sem que este sofresse interferência do SFB. Além disso, o grupo Citocinas apresentou alta porcentagem de células marcadas para apoptose, principalmente no grupo com a concentração de soro recomendada para trabalho com o MR-409. Devido à grande variação de morte celular

apresentada pela Tm em resposta ao tratamento com diferentes concentrações de SFB, também a descartamos para dar sequência aos experimentos

Em seguida, realizamos um segundo experimento de viabilidade agora com diferentes concentrações do agonista MR-409: 0,5 μ M, 1 μ M e 2 μ M. As células foram tratadas com a mesma concentração de CPA (12,5 μ M) juntamente com uma das concentrações do MR-409 por 12h, em meio contendo 0,1% de soro fetal bovino.

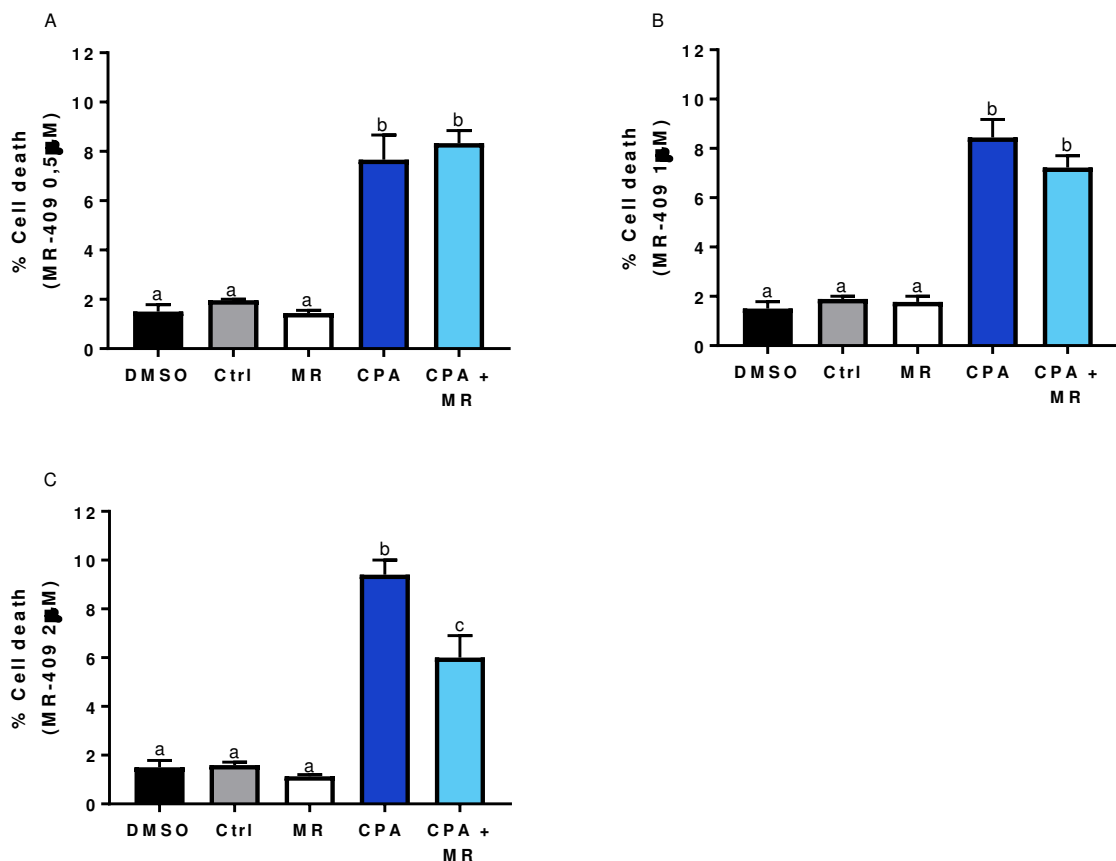


Figura 5: Porcentagem de morte celular de células tratadas com 12,5 μ M de CPA, em meio com 0,1% de soro fetal bovino (SFB) e 0,5 μ M (A), 1 μ M (B) e 2 μ M (C) de MR-409. Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-one-way, n=3; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

O grupo que recebeu o CPA e o agonista na concentração de 0,5 μ M (Fig. 5A) não apresentou melhora na marcação para morte (8%), quando comparado com o grupo que foi incubado apenas com CPA (7%). O grupo que recebeu o tratamento com 1 μ M do agonista (Fig. 5B) apresentou 7% de células marcadas para morte, enquanto que o grupo que recebeu apenas CPA apresentou 8% de células com a marcação. Os resultados apontam que nas concentrações de 0,5 μ M e 1 μ M o agonista não possui efeito sobre a morte celular. Já o grupo

tratado com CPA juntamente com 2 μ M do agonista apresenta uma diminuição, de 9% para 6% ($p=0,005$) de marcação para morte, quando comparado com o grupo tratado apenas com o CPA (Fig. 5C). Devido a essa melhora, indicada também na imagem representativa abaixo (Fig. 6), 2 μ M foi a concentração de escolha para seguirmos com os experimentos. O DMSO é o diluente tanto do agonista quanto do CPA, portanto foi adicionado DMSO nas células controle, mantendo-se concentração aproximada de DMSO das células tratadas (não ultrapassando 1% de DMSO). A exposição ao DMSO não resultou em diferenças estatísticas ($p=0,96$ Fig. 5A; $p=0,96$ Fig 5B; e $p=0,99$ Fig. 5C) em marcação para morte quando comparada às células com meio de manutenção.

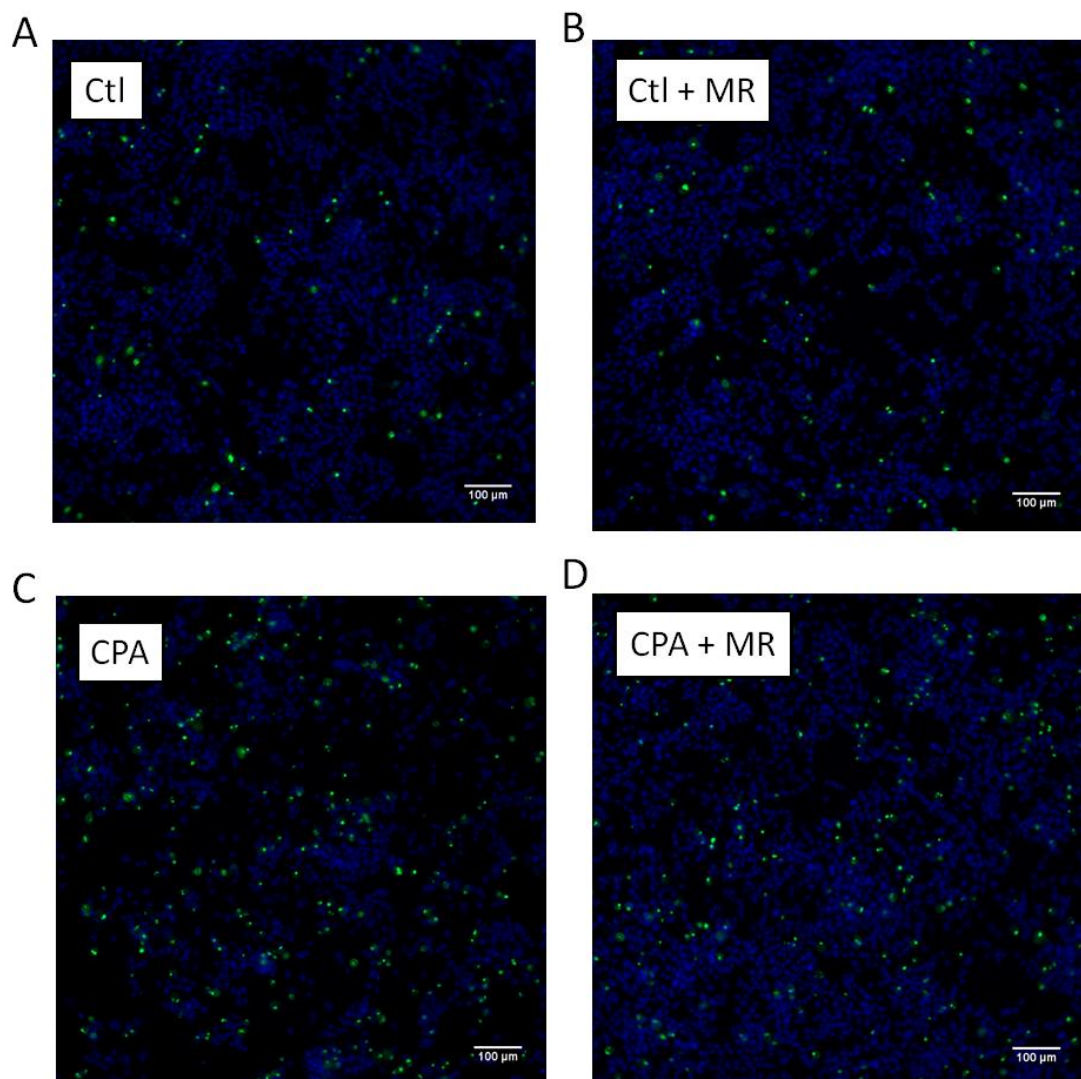


Figura 6: Imagem representativa do ensaio de viabilidade celular. A marcação em azul (Hoechst) indica núcleo celular e a marcação em verde (Iodeto de Propídeo) indica células em apoptose tardia. Grupo controle (A), células tratadas com 2 μ M MR-409 (B), tratadas com CPA (C), e tratadas com CPA + 2 μ M MR-409 (D). As imagens foram obtidas e analisadas pelo ImageXpress Micro Confocal High-Content Imaging System.

Células tratadas com CPA apresentam estresse de RE

O próximo passo após a realização da viabilidade celular por HOPI foi realizar uma curva com dois tempos e três concentrações de CPA, para validar a concentração de 12,5 μ M como um indutor de estresse de RE. As concentrações escolhidas foram 6,25 μ M; 12,5 μ M e 25 μ M, nos tempos de 8 (Fig. 7) e 12 horas (Fig. 8). Depois dos tratamentos as células foram coletadas para WB. Com 8 horas de tratamento (Fig. 7), Bip não sofreu modulação por CPA em nenhuma de suas concentrações (Fig. 7A), mas há ativação de p-eIF2 α (Fig. 7B) e de CHOP (Fig. 7C) nas concentrações de 12,5 μ M e 25 μ M, indicando ativação da via PERK da UPR e um possível estresse de RE.

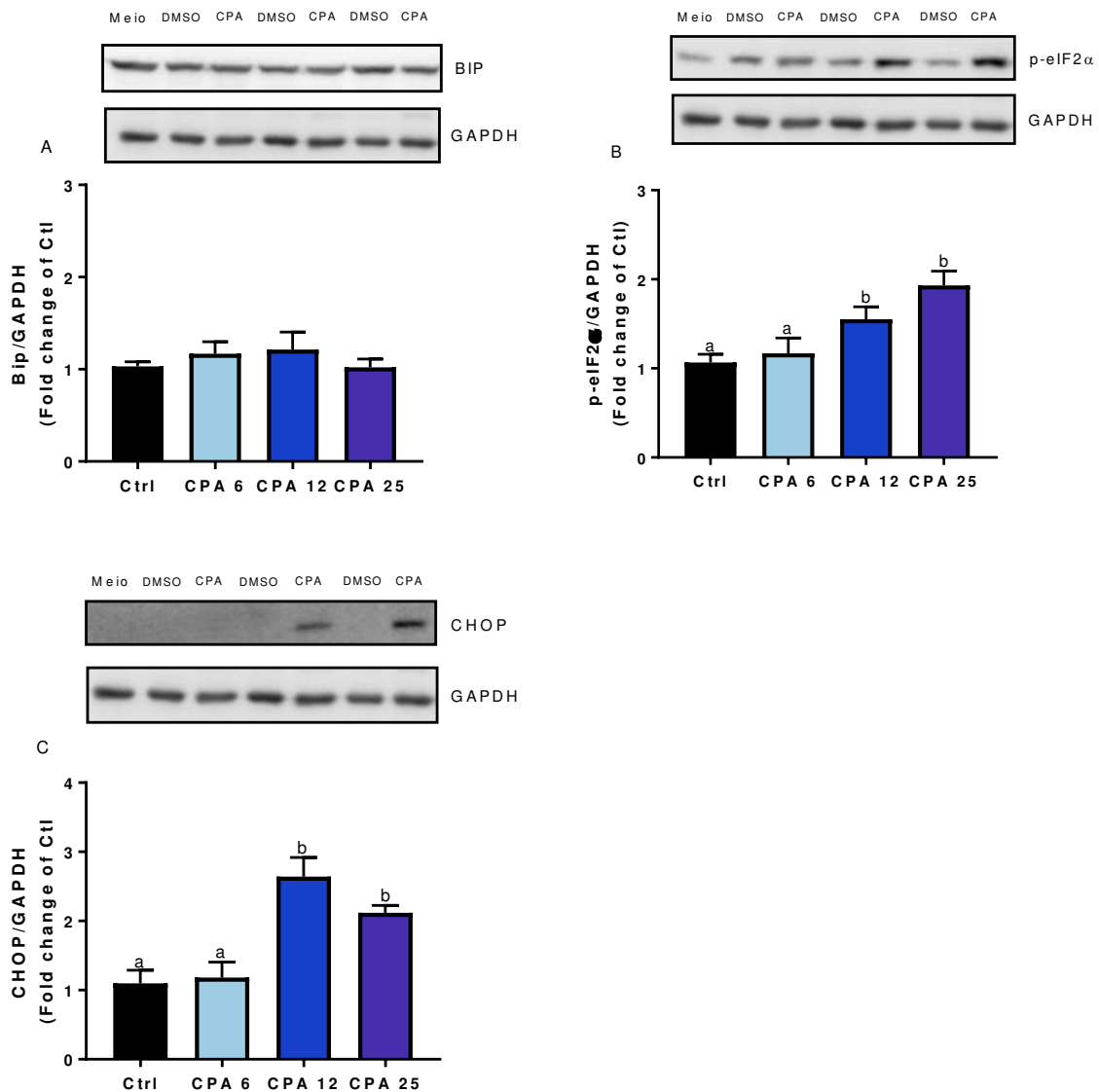


Figura 7: Conteúdo proteico de Bip (A), p-eIF2 α (B) e CHOP (C), normalizadas por GAPDH, após 8 h de tratamento com CPA nas concentrações de 6,25 μ M; 12,5 μ M e 25 μ M. Os resultados expressam a média $\pm$ SEM

e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-*one-way*, $n=3-4$; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

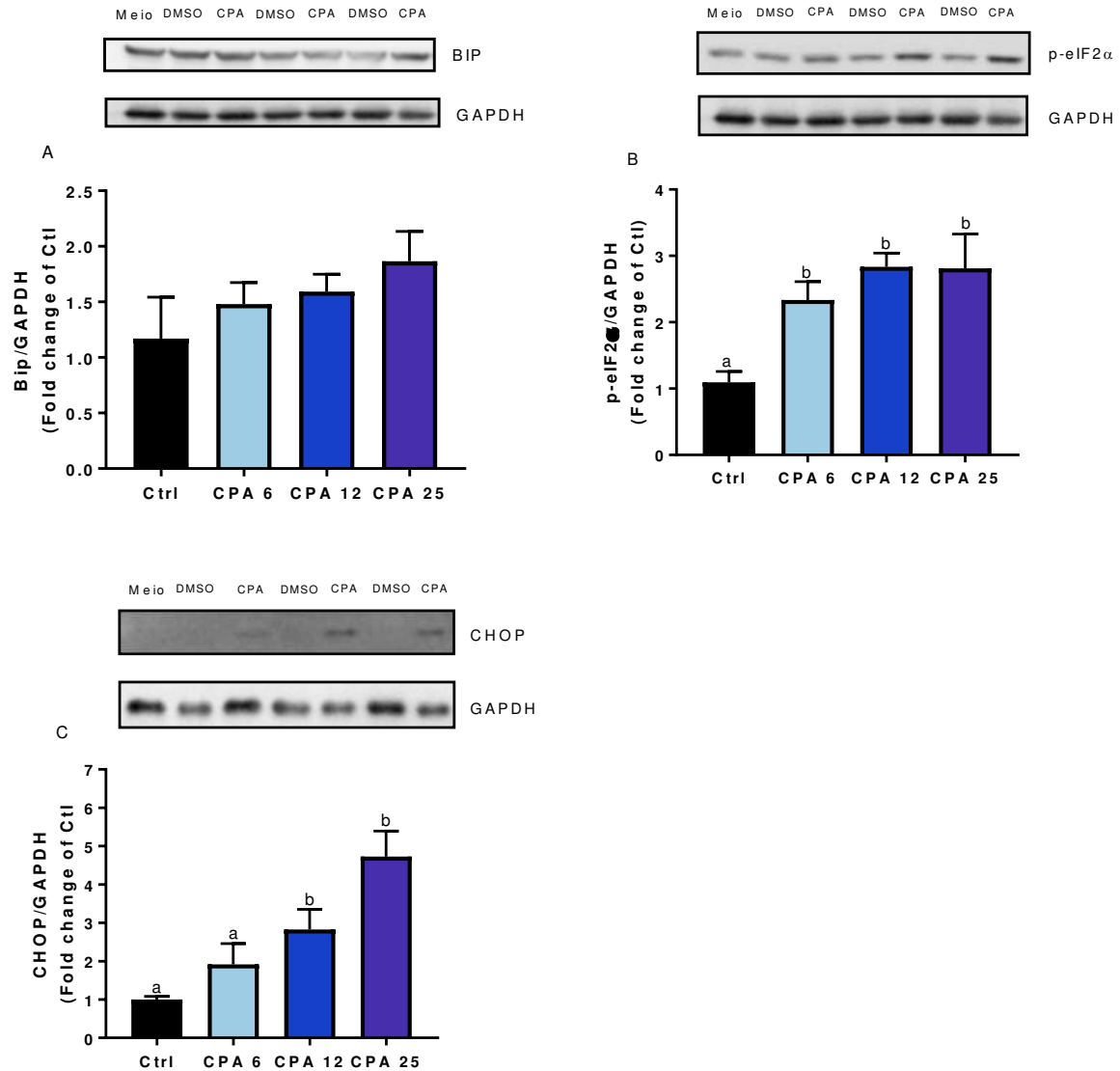


Figura 8: Conteúdo proteico de Bip (A), p-eIF2α (B) e CHOP (C), normalizadas por GAPDH, após 12h de tratamento com CPA nas concentrações de 6,25 μM; 12,5 μM e 25 μM. Os resultados expressam a média ± SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-*one-way*, $n=3-4$; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Com 12 horas de tratamento (Fig. 8), também não houve modulação de BIP, mas novamente há uma leve ativação de p-eIF2α e de CHOP na concentração de 6,25 μM, que aumenta nas concentrações de 12,5 μM e 25 μM, indicando que possivelmente há estresse de RE.

Tratamento com MR-409 por 12h não atenua o estresse de RE induzido pelo CPA

Após a confirmação de que o tratamento de 12,5 μ M com CPA por 12h induz estresse de RE, foram realizados WB e qPCR de proteínas envolvidas no estresse de RE de células tratadas com o CPA e com o MR-409. As proteínas de estresse identificadas no WB foram Bip, CHOP e p-eIF2 α , e para controle interno foi utilizado o GAPDH (Fig 9). No qPCR os genes do estresse de RE avaliados foram Bip, CHOP, ATF4, XBP1 e SERCA2b, normalizados pelo controle interno HPRT (Fig 10).

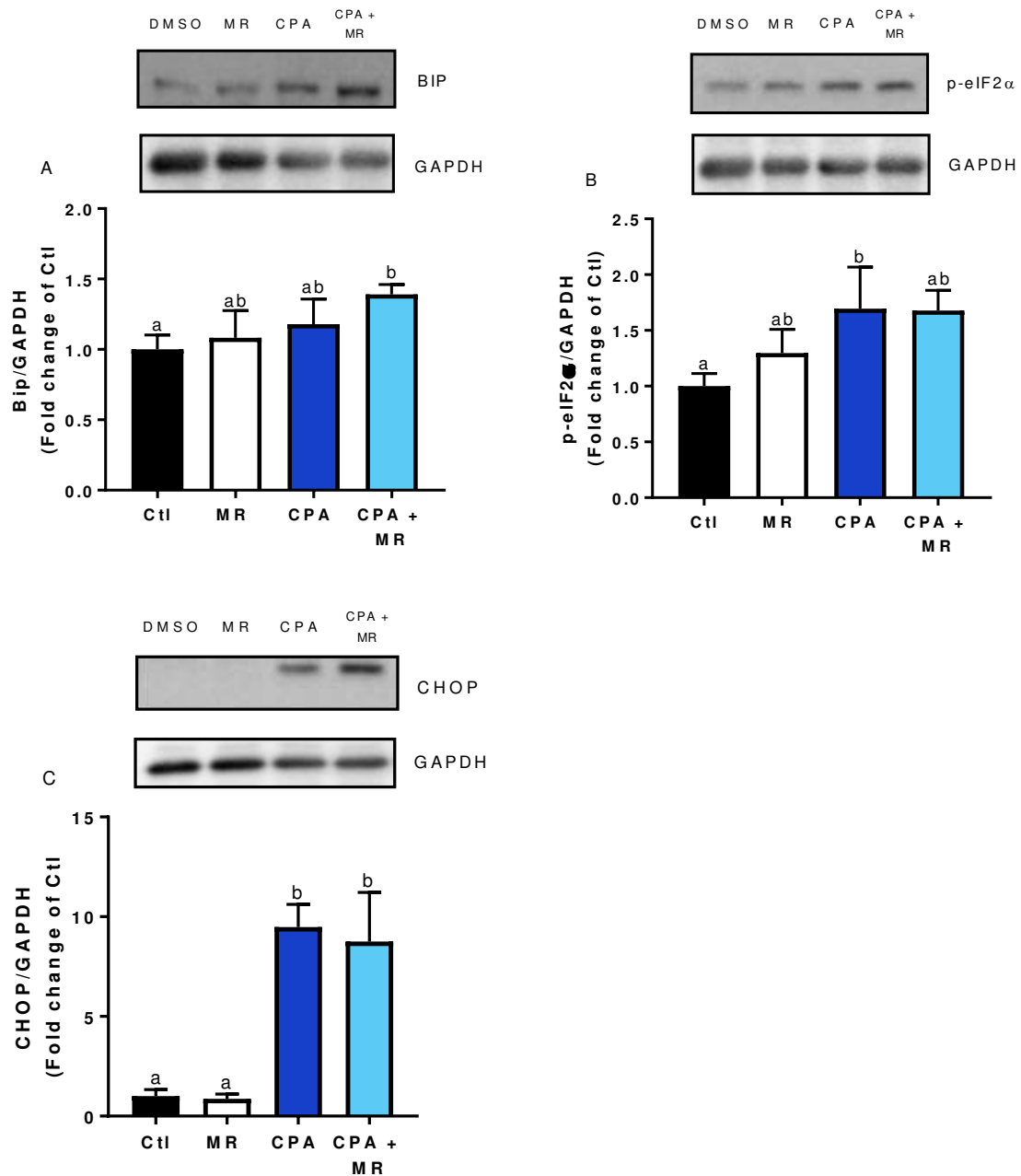


Figura 9: Conteúdo proteico de Bip (A), p-eIF2 α (B) e CHOP (C), normalizadas por GAPDH, após 12h de tratamento com 12,5 μ M de CPA e 2 μ M de MR-409. Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-*one-way*, n=3-4; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

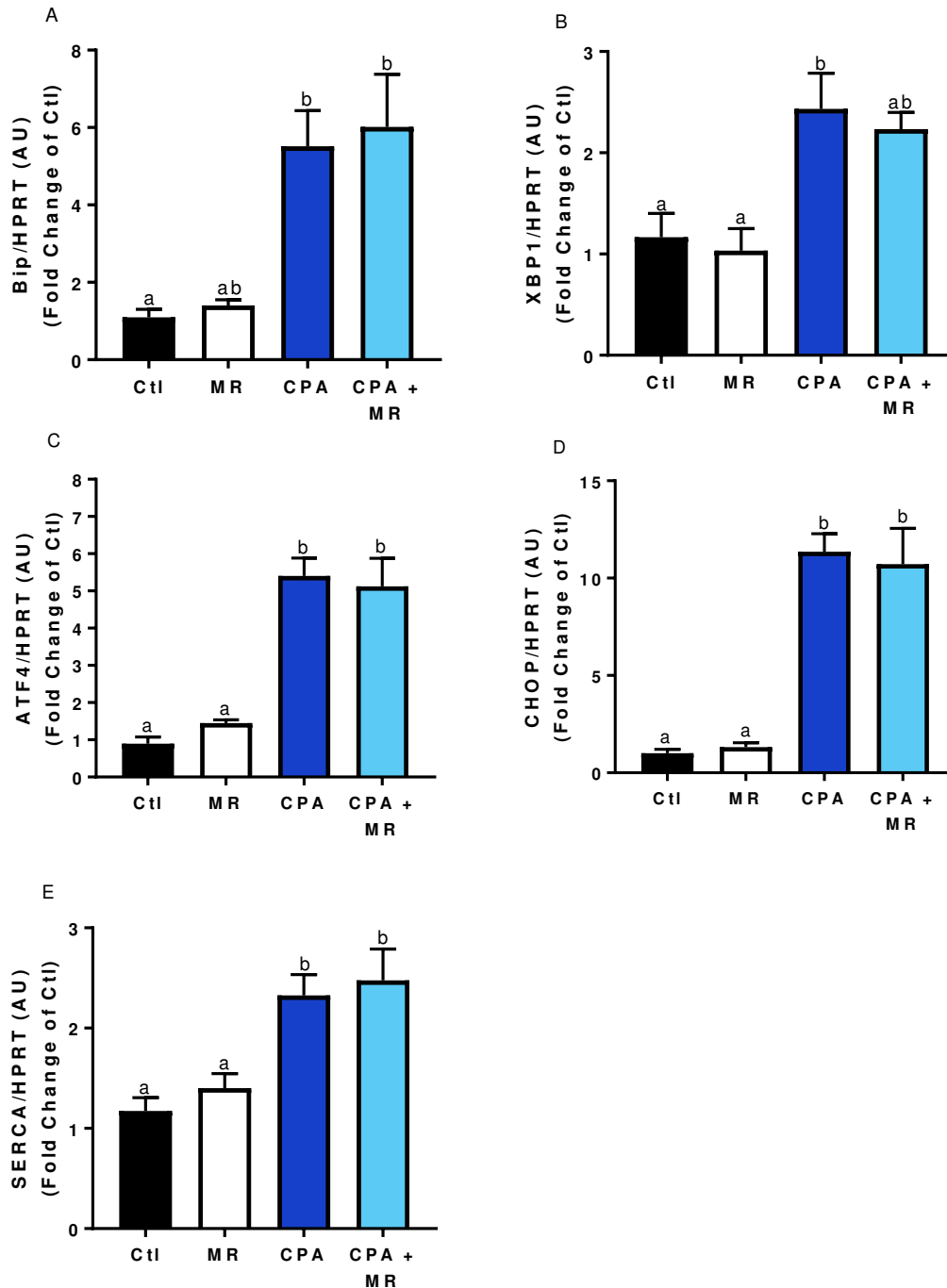


Figura 10: Conteúdo de RNA mensageiro de (A) Bip, (B) XBP1, (C) ATF4, (D) CHOP e (E) SERCA2b, normalizados por HPRT, após 12h de tratamento com 12,5 μ M de CPA e 2 μ M de MR-409. Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-*one-way*, n=4-5; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Os resultados mostram (Fig. 9 e 10) que o grupo tratado com agonista MR-409 não foi capaz de amenizar os efeitos do estresse de RE, no que diz respeito ao conteúdo da proteína fosforilada eIF2 α e nem da sua proteína *downstream* CHOP (Fig. 9). Isso se repete no conteúdo gênico, onde vimos que há o aumento da chaperona Bip e também de SERCA2b (Fig. 10).

Tratamento com MR-409 por 24h não previne estresse de RE induzido por CPA

Como os resultados do tratamento com 12h de CPA 12,5 μ M juntamente com 2 μ M de MR-409 não se mostraram capazes de reverter o estresse de RE, fizemos um novo teste: 12h de CPA 12,5 μ M, seguido de 24h de MR-409 na concentração de 2 μ M, totalizando 36 horas de tratamento (Fig 11). As células foram tratadas em placas de 96 poços e coletadas para WB.

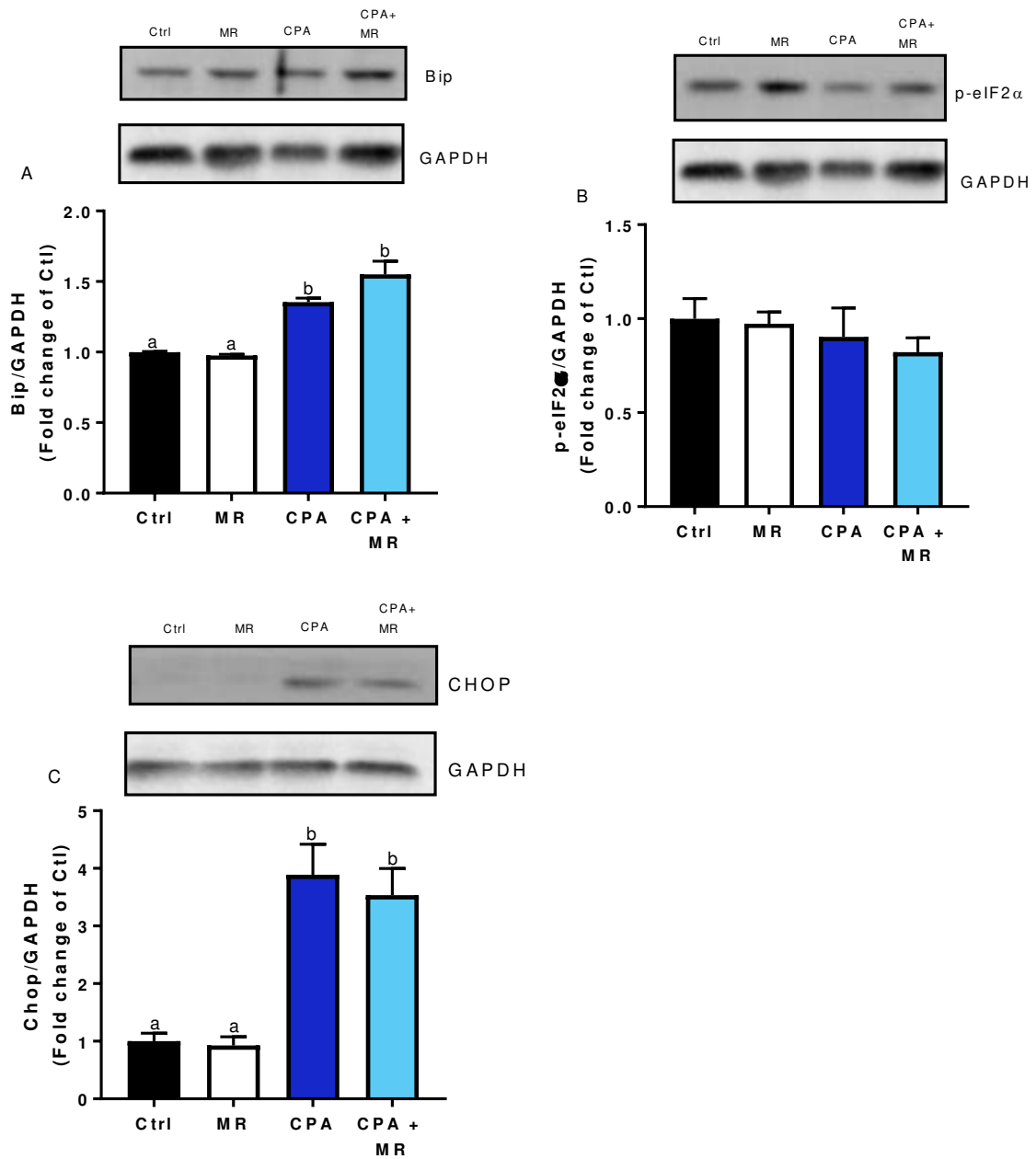


Figura 11: Conteúdo proteico de Bip (A), p-eIF2 α (B) e CHOP (C), normalizadas por GAPDH, após 12h de tratamento com 12,5 μ M de CPA e 2 μ M de MR-409, seguidos por mais 24h de tratamento com 2 μ M de MR-409. Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-*one-way*, $n=3$; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Neste tratamento (Fig. 11) observamos um aumento no conteúdo proteico de Bip no grupo CPA e no grupo CPA+MR, quando comparados com o controle. Não há diferença do conteúdo de p-eIF2 α , mas sua proteína *downstream*, CHOP, encontra-se aumentada no grupo CPA e CPA+MR quando comparados com o grupo controle.

Tratamento com MR-409 por 12h altera a razão Bax/Bcl-xL de células tratadas com CPA

Os resultados dos experimentos anteriores apontaram que o tratamento com o MR-409 não revertia o estresse de RE de células tratadas com CPA, apesar de apresentarem melhora na viabilidade. Dessa forma, fomos investigar se havia mudança na expressão de proteínas envolvidas com a sobrevivência da célula. As células foram tratadas com CPA e MR-409 por 12h e coletadas para WB. As proteínas investigadas foram Bax e Bcl-xL. Foi realizada a razão Bax/Bcl-xL após a normalização por GAPDH.

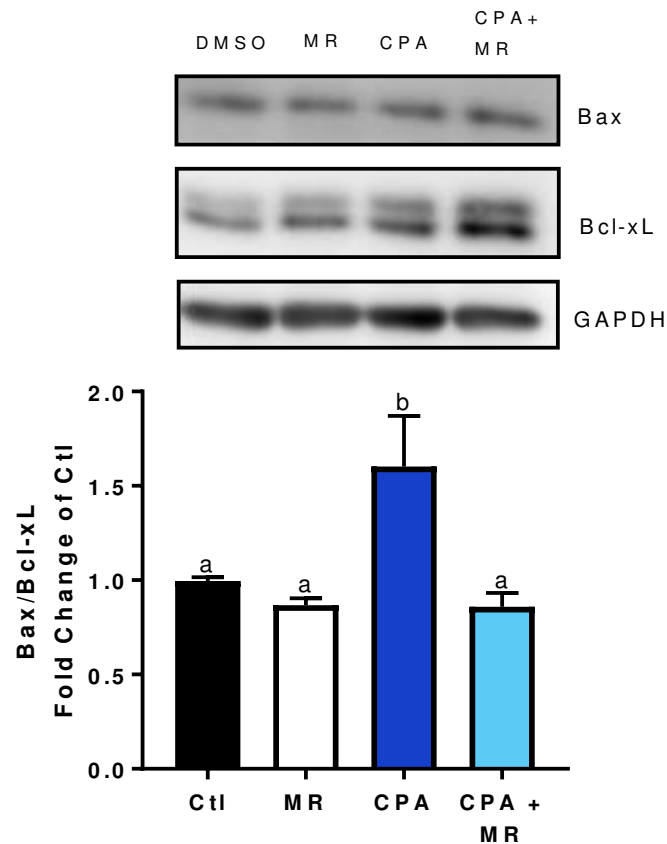


Figura 12: Conteúdo proteico de Bax por Bcl-xL, normalizadas por GAPDH, após 12h de tratamento com 12,5 μ M de CPA e 2 μ M de MR-409. Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-*one-way*, $n=3-4$; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

O resultado (Fig. 12) aponta aumento da razão Bax/Bcl-xL no grupo CPA em comparação com o grupo controle, indicando uma maior sinalização para a morte nesse grupo, enquanto que o grupo tratado com CPA e o MR-409 apresenta a razão Bax/Bcl-xL igual ao controle, indicando, portanto, uma maior sobrevivência no grupo tratado com o agonista.

Células tratadas com MR-409 apresentam aumento na fosforilação de CREB

Para avaliar a fosforilação da proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB), realizamos uma estimulação com 5mM de cafeína (81, 82) ou o agonista MR-409, por 0, 15 e 30 minutos.

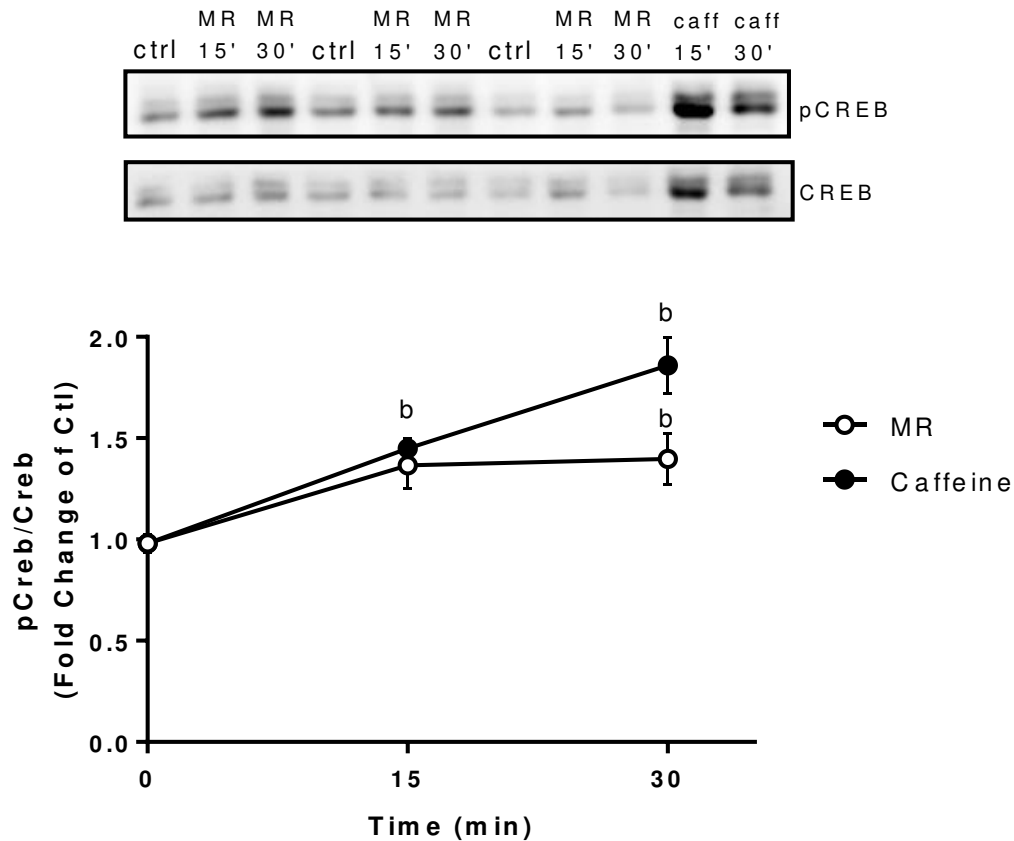


Figura 13: Conteúdo proteico de pCREB normalizado por CREB, após 0, 15 e 30 min de incubação com 2 μ M de MR-409 ou 5mM de cafeína. Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo teste t, n=3; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

O resultado aponta maior fosforilação de CREB após incubação com MR-409 aos 15 min, que se mantém até 30 min. O grupo tratado com cafeína 5mM, também apresentou maior fosforilação de CREB com 15 min e 30 min.

Tratamento de células com MR-409 por 12h impede a formação de superóxido mitocondrial

Realizamos um experimento funcional para medir a formação de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria. Para isso, usamos uma sonda, *Mitosox*, que é oxidada por superóxido produzindo uma fluorescência que pode ser medida, para detectar a formação de superóxido

mitocondrial em células tratadas com CPA e agonista, nas concentrações já mencionadas, por 12h em placas de 96 poços.

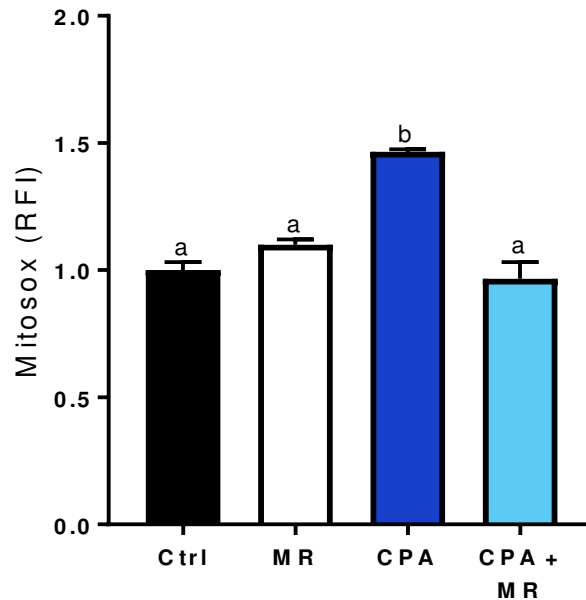


Figura 14: Formação de superóxido mitocondrial de células tratadas com 12,5 μ M de CPA e 2 μ M MR-409 por 12h. Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-*one-way*, $n=3$; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

O resultado (Fig. 14) indica um aumento na produção de superóxido mitocondrial no grupo de células tratadas com CPA, quando comparadas com o controle, o que pode representar um provável estresse oxidativo. O grupo que recebeu o tratamento com o CPA e o agonista MR-409 apresentou valores semelhantes ao do controle, indicando que o agonista foi capaz de prevenir aumento no estresse oxidativo nas mitocôndrias destas células.

Células tratadas com CPA e MR-409 por 12h apresentam secreção de insulina igual ao grupo CPA

Realizamos a secreção de insulina para avaliar a função de células tratadas com CPA e MR-409, nas mesmas concentrações e tempo apresentados anteriormente, para avaliar se a melhora na viabilidade indicada pelos outros experimentos estaria afetando de alguma forma a secreção de insulina das células.

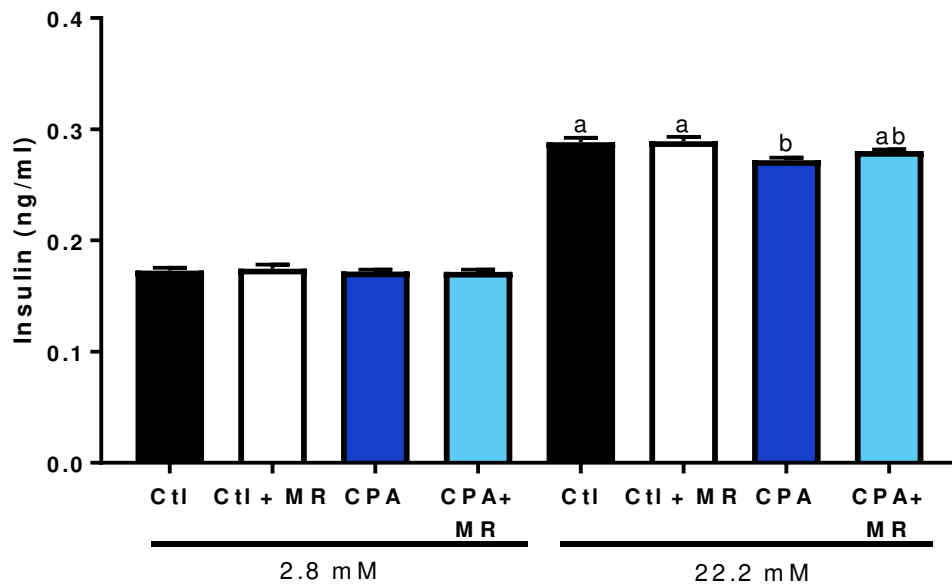


Figura 15: Secreção estática de insulina de células tratadas com 12,5 μ M de CPA e 2 μ M MR-409 por 12h. Os resultados expressam a média $\pm$ SEM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e então pelo ANOVA-one-way, $n=3-4$; letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

O resultado (Fig. 15) aponta que não houve diferença na secreção de insulina em nenhum dos grupos quando a célula foi estimulada com 2.8 mM de glicose. No caso da estimulação com 22.2 mM de glicose, há uma diminuição da secreção de insulina nas células tratadas com CPA, quando comparadas ao controle. Essa diminuição não se recupera no grupo tratado com CPA e MR-409.

Tratamento de células com MR-409 por 12h altera o padrão de expressão de proteínas

Tabela 2: Proteínas com conteúdo aumentado na análise de comparação do grupo controle com o grupo tratado com MR-409.

Gene symbol	UniprotKB ID	Fold Change	Gene name
Rnf152	D4A723	1.92	E3 ubiquitin-protein ligase RNF152 (EC 2.3.2.27) (RING finger protein 152) (RING-type E3 ubiquitin transferase RNF152)
Mras	P97538	1.61	Ras-related protein M-Ras (Ras-related protein R-Ras3)
Gtpbp3	Q5PQQ1	1.27	tRNA modification GTPase GTPBP3, mitochondrial (GTP-binding protein 3)
Tshb	P04652	1.24	Thyrotropin subunit beta (Thyroid-stimulating hormone subunit beta) (TSH-B) (TSH-beta) (Thyrotropin beta chain)
Spata19	Q920Q3	1.18	Spermatogenesis-associated protein 19, mitochondrial

			(Spermatogenic cell-specific gene 1 protein) (Spergen-1)
Ap2a2	P18484	1.16	AP-2 complex subunit alpha-2 (100 kDa coated vesicle protein C) (Adaptor protein complex AP-2 subunit alpha-2) (Adaptor-related protein complex 2 subunit alpha-2) (Alpha-adaptin C) (Alpha2-adaptin) (Clathrin assembly protein complex 2 alpha-C large chain) (Plasma membrane adaptor HA2/AP2 adaptin alpha C subunit)
Rpl19	P84100	1.14	60S ribosomal protein L19
Myh3	P12847	1.14	Myosin-3 (Myosin heavy chain 3) (Myosin heavy chain, fast skeletal muscle, embryonic)
Slc3a2	Q794F9	1.13	4F2 cell-surface antigen heavy chain (4F2hc) (Solute carrier family 3 member 2) (CD antigen CD98)
Sars	Q6P799	1.13	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic (EC 6.1.1.11) (Seryl-tRNA synthetase) (SerRS) (Seryl-tRNA(Ser/Sec) synthetase)
Cyp11b2	P30099; P30100	1.12	Cytochrome P450 11B2, mitochondrial (Aldosterone synthase) (ALDOS) (Aldosterone-synthesizing enzyme) (CYPXIB2) (Corticosterone 18-monooxygenase, CYP11B2) (EC 1.14.15.5) (Cytochrome P-450Aldo) (Cytochrome P-450C18) (Cytochrome P450-Aldo-1) (Steroid 11-beta-hydroxylase, CYP11B2) (EC 1.14.15.4) (Steroid 18-hydroxylase)
Aco1	Q63270	1.12	Cytoplasmic aconitate hydratase (Aconitase) (EC 4.2.1.3) (Citrate hydro-lyase) (Iron regulatory protein 1) (IRP1) (Iron-responsive element-binding protein 1) (IRE-BP 1)
Gdi1	P50398	1.12	Rab GDP dissociation inhibitor alpha (Rab GDI alpha) (Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1) (GDI-1)
Atic	O35567	1.12	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH [Includes: Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase (EC 2.1.2.3) (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase) (AICAR transformylase); IMP cyclohydrolase (EC 3.5.4.10) (ATIC) (IMP synthase) (Inosinicase)]
Kcnj16	P52191	1.11	Inward rectifier potassium channel 16 (BIR9) (Inward rectifier K(+) channel Kir5.1) (Potassium channel, inwardly rectifying subfamily J member 16)
Trap1	Q5XHZ0	1.11	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial (HSP 75) (TNFR-associated protein 1) (Tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein) (TRAP-1)

Camk2a	P11275	1.11	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha (CaM kinase II subunit alpha) (CaMK-II subunit alpha) (EC 2.7.11.17)
Hsp90aa1	P82995	1.11	Heat shock protein HSP 90-alpha (Heat shock 86 kDa) (HSP 86) (HSP86)
Kpnb1	P52296	1.10	Importin subunit beta-1 (Karyopherin subunit beta-1) (Nuclear factor p97) (Pore targeting complex 97 kDa subunit) (PTAC97)
Sptan1	P16086	1.09	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 (Alpha-II spectrin) (Fodrin alpha chain)
Immt	Q3KR86	1.09	MICOS complex subunit Mic60 (Mitochondrial inner membrane protein) (Mitofilin) (Fragment)
Isyna1	Q6AYK3	1.08	Inositol-3-phosphate synthase 1 (IPS 1) (EC 5.5.1.4) (Myo-inositol 1-phosphate synthase) (MI-1-P synthase) (MIP synthase)
Pcsk2	P28841	1.07	Neuroendocrine convertase 2 (NEC 2) (EC 3.4.21.94) (KEX2-like endoprotease 2) (Prohormone convertase 2) (Proprotein convertase 2) (PC2)

FC determinado pela abundância normalizada do grupo controle. As proteínas apresentadas obtiveram FC maior que o exibido pelo controle interno GAPDH (FC=1); n=3.

Tabela 3: Proteínas *up e down* reguladas na análise de comparação do grupo controle com o grupo exposto ao CPA.

Gene symbol	UniprotKB ID	Fold Change	Gene name
Lpar1	P61794	1.39	Lysophosphatidic acid receptor 1
Gnal	P38406	1.32	Guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha
Ran	P62828; Q8K586	1.32	GTP-binding nuclear protein Ran
Tuba4a	Q5XIF6	1.29	Tubulin alpha-4A chain
Chgb	O35314	1.27	Secretogranin-1
Por	P00388	1.27	NADPH--cytochrome P450 reductase
Eef1g	Q68FR6	1.27	Elongation factor 1-gamma
Vps33b	Q63616	1.26	Vacuolar protein sorting-associated protein 33B
Xpo1	Q80U96	1.24	Exportin-1
Hist1h1e	P15865	1.24	Histone H1.4
Slc25a5	Q09073	1.24	ADP/ATP translocase 2
Slc25a4	Q05962	1.23	ADP/ATP translocase 1

Prkar1a	P09456	1.22	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit
Slc3a2	Q794F9	1.21	4F2 cell-surface antigen heavy chain
Copg1	Q4AEF8	1.20	Coatomer subunit gamma-1
Ahcy	P10760	1.19	Adenosylhomocysteinase
Eef2	P05197	1.19	Elongation factor 2
Uqcrc1	Q68FY0	1.18	Cytochrome b-c1 complex subunit 1_mitochondrial
2	Q6AXM9	1.18	Uncharacterized protein C12orf29 homolog
Gdi1	P50398	1.17	Rab GDP dissociation inhibitor alpha
Aco1	Q63270	1.17	Cytoplasmic aconitate hydratase
Calr	P18418	1.16	Calreticulin
Myh9	Q62812	1.15	Myosin-9
Sars	Q6P799	1.14	Serine--tRNA ligase_ cytoplasmic
Rars	P40329	1.14	Arginine--tRNA ligase_ cytoplasmic
Eif3b	Q4G061	1.14	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B
Immt	Q3KR86	1.13	MICOS complex subunit Mic60 (Fragment)
Kpnb1	P52296	1.13	Importin subunit beta-1
Tkt	P50137	1.13	Transketolase
Atp6v1b2	P62815	1.13	V-type proton ATPase subunit B_brain isoform
Ccdc65	Q5XIJ8	1.12	Dynein regulatory complex subunit 2
Trap1	Q5XHZ0	1.12	Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial
Prkce	P09216	1.11	Protein kinase C epsilon type
Isynal	Q6AYK3	1.10	Inositol-3-phosphate synthase 1
Spata19	Q920Q3	0.92	Spermatogenesis-associated protein 19_mitochondrial
Rab8b	P70550; P35280	0.88	Ras-related protein Rab-8B
Nucb2	Q9JI85	0.72	Nucleobindin-2

FC determinado pela abundância normalizada do grupo controle. As proteínas apresentadas obtiveram FC maior que o exibido pelo controle interno GAPDH (FC=1); n=3.

Tabela 4: Proteínas *up e down* reguladas na análise de comparação do grupo tratado com CPA com o grupo tratado com CPA e o MR-409.

Gene symbol	UniprotKB ID	Fold Change	Gene name
Ppid	Q6DGG0	1.22	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D

Rps6	P62755	1.02	40S ribosomal protein S6
Ampd2	Q02356	0.94	AMP deaminase 2
Hadhb	Q60587	0.92	Trifunctional enzyme subunit beta_ mitochondrial
Psm2	Q4FZT9	0.92	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2
Rpl4	P50878	0.91	60S ribosomal protein L4
Ap2b1	P62944	0.90	AP-2 complex subunit beta
Myh9	Q62812	0.90	Myosin-9
Hspa4	O88600	0.90	Heat shock 70 kDa protein 4
Hnrnpa2b1	A7VJC2	0.89	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
Asns	P49088	0.89	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]
Akr1b1	P07943	0.87	Aldose reductase
Bhlhb3	O35779	0.87	Class E basic helix-loop-helix protein 41
Plppr1	Q6WAY2	0.87	Phospholipid phosphatase-related protein type 1
Fen1	Q5XIP6	0.86	Flap endonuclease 1
Aldob	P00884	0.86	Fructose-bisphosphate aldolase B
Vps33b	Q63616	0.86	Vacuolar protein sorting-associated protein 33B
Aga	P30919	0.86	N(4)-(Beta-N-acetylglucosaminy)-L-asparaginase
Nup210	P11654	0.84	Nuclear pore membrane glycoprotein 210
Lrrc59	Q5RJR8	0.84	Leucine-rich repeat-containing protein 59
Esyt1	Q9Z1X1	0.84	Extended synaptotagmin-1
Eif2d	Q5PPG7	0.83	Eukaryotic translation initiation factor 2D
Vgf	P20156	0.82	Neurosecretory protein VGF
Tubb2a	P85108	0.80	Tubulin beta-2A chain
Necab1	Q9ESB5	0.78	N-terminal EF-hand calcium-binding protein 1

FC determinado pela abundância normalizada do grupo controle. As proteínas apresentadas obtiveram FC maior que o exibido pelo controle interno GAPDH (FC=1); n=3.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho apresentamos os resultados obtidos com o tratamento de células INS-1E com CPA, um agente estressor de RE e com um agonista do GHRH, o MR-409. Contrariamente aos resultados de viabilidade celular obtidos não estão, em sua totalidade, de acordo com os resultados encontrados por Zhang e colaboradores (70), em que células INS-1E

tratadas apenas com o MR-409, apresentaram um aumento na viabilidade entre 10-40%, em relação aos controles não tratados. Em nossos experimentos não conseguimos evidenciar esse aumento na viabilidade de células entre os grupos controle e controle com MR-409, provavelmente devido ao tempo de tratamento diferente, uma vez que nossos testes foram realizados após 12 horas de tratamento, enquanto que Zhang e colaboradores utilizaram um mínimo de 72 horas. Contudo, neste experimento confirmamos que o MR-409 também aumenta a viabilidade de células mesmo sob condições de estresse, evidenciado pela melhora na sobrevivência das células tratadas com CPA e o agonista (Fig. 5), quando comparadas às células tratadas apenas com CPA no teste de viabilidade celular.

Com base em nossos resultados obtidos pela curva de tempo e concentração, observamos que o tratamento com CPA não induziu aumento significativo da proteína Bip, que regula a via da UPR (Fig. 7). Porém, pudemos observar que mesmo assim há indícios de estresse de RE em todos os tempos, evidenciado pelo aumento da proteína fosforilada eIF2 α e de uma proteína *downstream*, CHOP, apontada como uma das indutoras de morte celular via estresse de RE (83). O tratamento com CPA na concentração de 6,25 μ M mostrou um discreto aumento na proteína fosforilada eIF2 α , aumento este que não foi suficiente para induzir a transcrição de CHOP, mostrando que nessa condição, o estímulo que CPA induz, não é suficiente para induzir a transcrição dessa proteína (Fig. 7). Já no tratamento de 12h tanto p-eIF2 α quanto CHOP, nas três concentrações, apresentaram aumento significativo de conteúdo proteico em relação ao controle (Fig. 8), ativando completamente a via PERK.

Há um aumento do RNAm para Bip no grupo tratado com CPA, mas esse aumento não foi reduzido com o tratamento com o MR-409 (Fig. 10). Em relação ao conteúdo proteico, o aumento da Bip não é reduzido no tratamento com o agonista, pelo contrário, há um aumento significativo na quantidade desta proteína (Fig. 9), o que de forma geral, não seria prejudicial à célula visto que o aumento dessa chaperona é benéfico para, por exemplo, melhorar a capacidade de enovelamento do retículo promovendo uma melhora na atividade da organela, aliviando o estresse (84-86). Contudo, o tratamento com o agonista, não diminuiu a concentração proteica de p-eIF2 α e CHOP (Fig. 9), mostrando que o aumento na quantidade da proteína Bip não foi suficiente para restaurar a capacidade de enovelamento do retículo e, consequentemente, diminuir o nível de estresse e da resposta da UPR.

Corroborando esses achados, houve aumento no RNAm de ATF4 e CHOP, ambas proteínas *downstream* da via PERK, mostrando sua contínua ativação mesmo no grupo que recebeu o tratamento com o agonista. Além disso, observamos que o gene da

sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b (SERCA2b) também aumenta nos grupos tratados com o CPA e com CPA e o MR-409. O CPA promove o desacoplamento da bomba SERCA2b (87), incapacitando o bombeamento de cálcio citoplasmático para o lúmen do RE. O cálcio é de suma importância para o bom funcionamento do RE, atuando como uma co-enzima para muitas chaperonas e outras enzimas com ações *foldase* que promovem o correto enovelamento das proteínas recém sintetizadas (88). Dessa forma, a diminuição de cálcio no retículo desencadeia o mal funcionamento dessas enzimas e chaperonas, que leva ao aumento de proteínas não enoveladas e, conseqüentemente, ao estresse de RE. O aumento do gene da SERCA2b (Fig. 10), indica que a célula aumenta a tradução dessa proteína para reverter o efeito causado pelo CPA, porém, durante as 12h de tratamento e mesmo no grupo tratado com o agonista, esse aumento parece não ser suficiente para melhorar o quadro de estresse de RE.

Além disso, a comparação do proteoma dos grupos controle e CPA (Tabela 2) mostrou aumento de outras proteínas induzidas pelo estresse de RE, como a calreticulina, uma proteína localizada no lúmen desta organela e que funciona como uma chaperona molecular. Seu domínio de ligação a Ca²⁺ permite que ela atue como quelante deste íon (89). Dados já reportados demonstraram que o aumento no conteúdo dessa proteína está relacionado com o aumento de Ca²⁺ no lúmen do RE e prevenção de apoptose via estresse oxidativo em células beta (90-92), dessa forma, nossos dados indicam uma possível resposta adaptativa ao CPA.

Outra proteína identificada com aumento na comparação proteômica foi a *eukaryotic translation initiation factor 3 subunit b* (eIF3b), essa proteína é uma das 13 subunidades que formam o complexo eIF3. A eIF3 é necessária para muitas funções durante a tradução proteica, incluindo a iniciação, onde promove a ligação do complexo ternário à subunidade ribossomal 40S e, posteriormente, ao RNA mensageiro. A eIF3b é a principal subunidade de ancoragem da proteína eIF3 permitindo a ligação das outras subunidades do complexo, estabilizando-o e permitindo sua correta conformação. A subunidade b também é a porção da proteína que interage diretamente com a subunidade 40S do ribossomo (93, 94). Além disso, eIF3b também já foi descrita como a subunidade que garante maior controle do escaneamento do complexo ternário pelo códon de início (95). De forma geral, essa subunidade assegura o melhor funcionamento da eIF3, que já foi descrita como responsável pela manutenção do mecanismo de tradução via uORFs durante o estresse de RE crônico (96). Dessa forma, a identificação no aumento de eIF3b juntamente com as proteínas *elongation factor 1-gamma* (eEF1g) e *elongation factor 2* (eEF2) indica manutenção da tradução proteica via a ativação da UPR e a tentativa da célula de manter a resposta adaptativa durante o estresse de RE.

A maioria das proteínas identificadas na comparação proteômica entre os grupos tratados com CPA e com CPA e o MR-409 (Tabela 4), apresentaram diminuição em seus conteúdos (com FC menor que 1), mas nenhuma delas está diretamente ligada à resposta induzida pelo CPA ou às vias clássicas de sobrevivência. Sendo assim, nossos resultados confirmam que o CPA foi capaz de induzir estresse de RE e ativação da UPR e que o tratamento com o agonista MR-409 não foi capaz de prevenir essa resposta.

Para entender melhor o mecanismo de ação do MR-409 na célula beta, fomos investigar a via de transdução de sinal do agonista. Surpreendentemente, não fomos capazes de reproduzir a detecção ou o aumento no RNAm do receptor de GHRH nas células INS-1E tratadas com o agonista, como mostrado por Ludwig e colaboradores (50). Sendo assim, sabendo que a sinalização clássica do receptor do GHRH leva à ativação da proteína G estimulatória, ativando a sinalização dependente de AMPc (55), investigamos se havia fosforilação da proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB). Assim como visto por Zhang e colaboradores (70), células que receberam o agonista mostraram aumento, com relação ao grupo controle, sem tratamento, na fosforilação em serina 133 de CREB (Fig. 13). CREB já foi descrito como tendo um papel na sobrevivência celular (97). O promotor do gene de Bcl-2 (que corresponde a uma família de proteínas conhecidas por manter a integridade da mitocôndria, mas que podem promover a apoptose via liberação do citocromo c (98, 99)) é positivamente regulado por CREB através de sua ligação a um elemento responsivo a AMPc (CRE) na região 5' flanqueada, em células B (100), promovendo aumento nos conteúdos de RNAm e proteico de Bcl-2, aumentando a sobrevivência da célula. Outros autores mostraram aumento de Bcl-2 promovendo sobrevivência de vários tipos celulares através da via pCREB-Bcl-2, inclusive em ilhotas de camundongos e modelos de célula beta pancreática (59, 101-105). Ainda, Balogh e colaboradores (2014) também mostraram que a superexpressão de CREB protege vários tipos celulares de rato, como fibroblastos e células da medula da adrenal, da apoptose induzida por tunicamicina++ (106). Dessa forma, é possível que o aumento na sobrevivência observado por nós em células tratadas com o agonista seja via fosforilação de CREB.

Ao realizarmos a avaliação de proteínas da família Bcl-2 (Bcl-xL, anti-apoptótica e Bax, pró-apoptótica) (Fig. 12) constatamos um aumento na razão Bax/Bcl-xL no grupo tratado com CPA, que também apresentou mais marcação para morte celular (Fig. 5), enquanto que no grupo tratado com o MR-409, que apresentou menos marcação para morte celular (Fig.5), este aumento não acontece, indicando que a ação do agonista pode promover a modulação de proteínas pró e anti-apoptóticas, talvez via fosforilação de CREB, resultando no aumento da sobrevivência celular.

Como o estresse de RE leva não só à morte celular, mas também ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) no RE e na mitocôndria, realizamos um experimento para medir superóxido mitocondrial (Mitosox) e avaliar a formação de ERO em nossos grupos experimentais. Para avaliar se essa sobrevivência foi acompanhada de uma melhora na função celular, realizamos um experimento para medir o estresse oxidativo na célula. O RE possui em seu lúmen, um ambiente oxidante propício para a formação de ligações dissulfeto que promovem a conformação correta da proteína. Durante a formação dessas ligações são formadas ERO (30). Perturbações na homeostase do RE que levam ao estresse de RE, incluindo diminuição no conteúdo de Ca^{2+} , leva à ativação da UPR, que juntamente com a hiperoxidação no lúmen do RE, leva ao maior influxo de Ca^{2+} para a mitocôndria, causando mudanças no pH desta organela, à produção elevada de ERO e estresse oxidativo mitocondrial (31, 107, 108). Como o CPA leva à perturbação na homeostase do Ca^{2+} , é possível que também promova o aumento de ERO no retículo e na mitocôndria. Constatamos o aumento de superóxido no grupo tratado com CPA (Fig. 14). O grupo que recebeu o tratamento com CPA e com o agonista apresentou concentração de superóxido semelhante ao do grupo controle (Fig. 14), mostrando menos estresse oxidativo.

A ação antioxidante do agonista MR-409 já foi descrita em outros tipos celulares e em animais. Pesquisadores observaram diminuição na formação de ERO e aumento de genes antioxidantes em camundongos com retinopatia diabética (109, 110). Em nosso trabalho mostramos que essa ação permanece mesmo em células sob estresse de RE. Como já foi descrita a ação protetora de CREB contra o estresse oxidativo (102, 111, 112), é possível que a diminuição na concentração de superóxido mitocondrial no grupo tratado com o MR-409 seja por esta via.

Para avaliar se a sobrevivência e a diminuição no estresse oxidativo foi acompanhado de uma melhora na função celular, realizamos um experimento de secreção de insulina que nos mostrou uma diminuição da secreção no grupo tratado com CPA, quando estimulada com 22,2 mM de glicose. Essa diminuição permaneceu no grupo tratado com CPA e o agonista, indicando que este não foi capaz de modular a secreção de insulina estimulada com glicose. No trabalho de Zhang e colaboradores (70), foi mostrado um aumento na secreção de insulina no grupo tratado com o MR-409. Em nossos resultados, no entanto, não observamos esse aumento, mas acreditamos que isso se deva, novamente, ao tempo reduzido de tratamento em relação ao já realizado na literatura.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e apresentados neste trabalho, é possível concluir que o tratamento com o agonista do GHRH, MR-409, não modula a expressão de proteínas das vias e, portanto, não previne a instalação do estresse de retículo endoplasmático em células tratadas com CPA. Apesar disso, o agonista melhorou a viabilidade destas células, aumentando sua sobrevivência, provavelmente, através do aumento de proteínas anti-apoptóticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, Bozsak R, Speier S. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab.* 2017;6(9):943-57.
2. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003;52(1):102-10.
3. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1999;104(6):787-94.
4. Goldstein BJ. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2002;90(5A):3G-10G.
5. Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, et al. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1988;318(19):1231-9.
6. Lang DA, Matthews DR, Burnett M, Turner RC. Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes.* 1981;30(5):435-9.
7. Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA. beta-Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(1):493-500.
8. Organization WH. GLOBAL REPORT ON DIABETES 2016 [Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf].
9. Federation ID. IDF Diabetes Atlas 7th Edition 2015 [Available from: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/13-diabetes-atlas-seventh-edition.html>].
10. Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E, et al. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol.* 1995;268(2 Pt 1):E336-42.
11. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(3):463-6.
12. Cnop M, Ladriere L, Hekerman P, Ortis F, Cardozo AK, Dogusan Z, et al. Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis. *J Biol Chem.* 2007;282(6):3989-97.
13. Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC. The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;364(1-2):1-27.
14. Sharma RB, Alonso LC. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? *Curr Diab Rep.* 2014;14(6):492.
15. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 2002;3(10):944-50.
16. Meldolesi J, Pozzan T. The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci.* 1998;23(1):10-4.
17. Park SH, Blackstone C. Further assembly required: construction and dynamics of the endoplasmic reticulum network. *EMBO Rep.* 2010;11(7):515-21.

18. Chen X, Karnovsky A, Sans MD, Andrews PC, Williams JA. Molecular characterization of the endoplasmic reticulum: insights from proteomic studies. *Proteomics*. 2010;10(22):4040-52.
19. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):519-29.
20. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 2000;101(5):451-4.
21. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000;2(6):326-32.
22. Shamu CE, Walter P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J*. 1996;15(12):3028-39.
23. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001;107(7):881-91.
24. Sidrauski C, Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*. 1997;90(6):1031-9.
25. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev*. 2006;86(4):1133-49.
26. Shi Y, Vatter KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, et al. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol*. 1998;18(12):7499-509.
27. Somers J, Pöyry T, Willis AE. A perspective on mammalian upstream open reading frame function. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(8):1690-700.
28. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000;6(5):1099-108.
29. Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol*. 2002;318(5):1351-65.
30. Görlach A, Klappa P, Kietzmann T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1391-418.
31. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol*. 2015;6:260-71.
32. Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem*. 2002;277(15):13045-52.
33. Kokame K, Kato H, Miyata T. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem*. 2001;276(12):9199-205.
34. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*. 1998;273(50):33741-9.
35. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*. 1999;13(10):1211-33.
36. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140(6):900-17.

37. Bioscience T. ER Stress and the Unfolded Protein Response (UPR) [Available from: <https://www.tocris.com/cell-biology/er-stress-upr>.
38. Kim MK, Kim HS, Lee IK, Park KG. Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:509437.
39. Jonas JC, Bensellam M, Duprez J, Elouil H, Guiot Y, Pascal SM. Glucose regulation of islet stress responses and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11 Suppl 4:65-81.
40. Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*. 2001;50 Suppl 1:S154-9.
41. Zhang W, Feng D, Li Y, Iida K, McGrath B, Cavener DR. PERK EIF2AK3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2006;4(6):491-7.
42. Back SH, Scheuner D, Han J, Song B, Ribick M, Wang J, et al. Translation attenuation through eIF2alpha phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells. *Cell Metab*. 2009;10(1):13-26.
43. Senée V, Vatter KM, Delépine M, Rainbow LA, Haton C, Lecoq A, et al. Wolcott-Rallison Syndrome: clinical, genetic, and functional study of EIF2AK3 mutations and suggestion of genetic heterogeneity. *Diabetes*. 2004;53(7):1876-83.
44. Gupta S, McGrath B, Cavener DR. PERK (EIF2AK3) regulates proinsulin trafficking and quality control in the secretory pathway. *Diabetes*. 2010;59(8):1937-47.
45. Huising MO, van der Meulen T, Vaughan JM, Matsumoto M, Donaldson CJ, Park H, et al. CRFR1 is expressed on pancreatic beta cells, promotes beta cell proliferation, and potentiates insulin secretion in a glucose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(2):912-7.
46. Christodoulou C, Schally AV, Chatzistamou I, Kondi-Pafiti A, Lamnissou K, Kouloheri S, et al. Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and splice variant of GHRH receptors in normal mouse tissues. *Regul Pept*. 2006;136(1-3):105-8.
47. Cheung LW, Wong AS. Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS J*. 2008;275(22):5479-95.
48. Wu HM, Wang HS, Huang HY, Soong YK, MacCalman CD, Leung PC. GnRH signaling in intrauterine tissues. *Reproduction*. 2009;137(5):769-77.
49. Dioufa N, Schally AV, Chatzistamou I, Moustou E, Block NL, Owens GK, et al. Acceleration of wound healing by growth hormone-releasing hormone and its agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18611-5.
50. Ludwig B, Ziegler CG, Schally AV, Richter C, Steffen A, Jabs N, et al. Agonist of growth hormone-releasing hormone as a potential effector for survival and proliferation of pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(28):12623-8.
51. Kiaris H, Schally AV, Busto R, Halmos G, Artavanis-Tsakonas S, Varga JL. Expression of a splice variant of the receptor for GHRH in 3T3 fibroblasts activates cell proliferation responses to GHRH analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(1):196-200.
52. Park MK, Kanaho Y, Enomoto M. Regulation of the cell proliferation and migration as extra-pituitary functions of GnRH. *Gen Comp Endocrinol*. 2013;181:259-64.
53. Stanley TL, Grinspoon SK. Effects of growth hormone-releasing hormone on visceral fat, metabolic, and cardiovascular indices in human studies. *Growth Horm IGF Res*. 2015;25(2):59-65.
54. Granata R. Peripheral activities of growth hormone-releasing hormone. *J Endocrinol Invest*. 2016;39(7):721-7.
55. AIRES MDM. *Fisiologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 1232.
56. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002;35(4):605-23.

57. De Cesare D, Sassone-Corsi P. Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2000;64:343-69.
58. Bedogni B, Pani G, Colavitti R, Riccio A, Borrello S, Murphy M, et al. Redox regulation of cAMP-responsive element-binding protein and induction of manganous superoxide dismutase in nerve growth factor-dependent cell survival. *J Biol Chem.* 2003;278(19):16510-9.
59. Zhang Y, Zhen W, Maechler P, Liu D. Small molecule kaempferol modulates PDX-1 protein expression and subsequently promotes pancreatic β -cell survival and function via CREB. *J Nutr Biochem.* 2013;24(4):638-46.
60. Barabutis N, Schally AV. Growth hormone-releasing hormone: extrapituitary effects in physiology and pathology. *Cell Cycle.* 2010;9(20):4110-6.
61. Stepien T, Lawnicka H, Komorowski J, Stepien H, Siejka A. Growth hormone-releasing hormone stimulates the secretion of interleukin 17 from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Neuro Endocrinol Lett.* 2010;31(6):852-6.
62. Granata R, Isgaard J, Alloatti G, Ghigo E. Cardiovascular actions of the ghrelin gene-derived peptides and growth hormone-releasing hormone. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011;236(5):505-14.
63. Schmid J, Ludwig B, Schally AV, Steffen A, Ziegler CG, Block NL, et al. Modulation of pancreatic islets-stress axis by hypothalamic releasing hormones and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(33):13722-7.
64. Gallo D, Gesmundo I, Trovato L, Pera G, Gargantini E, Minetto MA, et al. GH-Releasing Hormone Promotes Survival and Prevents TNF- α -Induced Apoptosis and Atrophy in C2C12 Myotubes. *Endocrinology.* 2015;156(9):3239-52.
65. Fu L, Osuga Y, Yano T, Takemura Y, Morimoto C, Hirota Y, et al. Expression and possible implication of growth hormone-releasing hormone receptor splice variant 1 in endometriosis. *Fertil Steril.* 2009;92(1):47-53.
66. Izdebski J, Pinski J, Horvath JE, Halmos G, Groot K, Schally AV. Synthesis and biological evaluation of superactive agonists of growth hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(11):4872-6.
67. Cai R, Schally AV, Cui T, Szalontay L, Halmos G, Sha W, et al. Synthesis of new potent agonistic analogs of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and evaluation of their endocrine and cardiac activities. *Peptides.* 2014;52:104-12.
68. Coy DH, Murphy WA, Lance VA, Heiman ML. Differential effects of N-terminal modifications on the biological potencies of growth hormone releasing factor analogues with varying chain lengths. *J Med Chem.* 1987;30(1):219-22.
69. Kiaris H, Chatzistamou I, Papavassiliou AG, Schally AV. Growth hormone-releasing hormone: not only a neurohormone. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(8):311-7.
70. Zhang X, Cui T, He J, Wang H, Cai R, Popovics P, et al. Beneficial effects of growth hormone-releasing hormone agonists on rat INS-1 cells and on streptozotocin-induced NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(44):13651-6.
71. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
72. Gurzov EN, Ortis F, Bakiri L, Wagner EF, Eizirik DL. JunB Inhibits ER Stress and Apoptosis in Pancreatic Beta Cells. *PLoS One.* 2008;3(8):e3030.
73. Miani M, Colli ML, Ladrière L, Cnop M, Eizirik DL. Mild endoplasmic reticulum stress augments the proinflammatory effect of IL-1 β in pancreatic rat β -cells via the IRE1 α /XBP1s pathway. *Endocrinology.* 2012;153(7):3017-28.
74. Miani M, Barthson J, Colli ML, Brozzi F, Cnop M, Eizirik DL. Endoplasmic reticulum stress sensitizes pancreatic beta cells to interleukin-1 β -induced apoptosis via Bim/A1 imbalance. *Cell Death Dis.* 2013;4:e701.

75. Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 14):2308-18.
76. Allagnat F, Christulia F, Ortis F, Pirot P, Lortz S, Lenzen S, et al. Sustained production of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) induces pancreatic beta cell dysfunction and apoptosis. *Diabetologia.* 2010;53(6):1120-30.
77. Hong SW, Lee J, Cho JH, Kwon H, Park SE, Rhee EJ, et al. Pioglitazone Attenuates Palmitate-Induced Inflammation and Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic β -Cells. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2018;33(1):105-13.
78. Shahrestanaki MK, Arasi FP, Aghaei M. Adenosine protects pancreatic beta cells against apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biochem.* 2018.
79. Paula FM, Leite NC, Vanzela EC, Kurauti MA, Freitas-Dias R, Carneiro EM, et al. Exercise increases pancreatic β -cell viability in a model of type 1 diabetes through IL-6 signaling. *FASEB J.* 2015;29(5):1805-16.
80. Abdullahi A, Stanojcic M, Parousis A, Patsouris D, Jeschke MG. Modeling Acute ER Stress in Vivo and in Vitro. *Shock.* 2017;47(4):506-13.
81. Pratt EPS, Harvey KE, Salyer AE, Hockerman GH. Regulation of cAMP accumulation and activity by distinct phosphodiesterase subtypes in INS-1 cells and human pancreatic β -cells. *PLoS One.* 2019;14(8):e0215188.
82. Connolly S, Kingsbury TJ. Caffeine modulates CREB-dependent gene expression in developing cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;397(2):152-6.
83. Eizirik DL, Cnop M. ER stress in pancreatic beta cells: the thin red line between adaptation and failure. *Sci Signal.* 2010;3(110):pe7.
84. Liu H, Bowes RC, van de Water B, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca^{2+} disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272(35):21751-9.
85. Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman RJ. Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J Biol Chem.* 1997;272(7):4327-34.
86. Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat.* 2004;28(1-2):51-65.
87. Michelangeli F, East JM. A diversity of SERCA Ca^{2+} pump inhibitors. *Biochem Soc Trans.* 2011;39(3):789-97.
88. Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, De Smedt H, Missiaen L. Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(6).
89. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 2009;417(3):651-66.
90. Arnaudeau S, Frieden M, Nakamura K, Castelbou C, Michalak M, Demaurex N. Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem.* 2002;277(48):46696-705.
91. Mery L, Mesaali N, Michalak M, Opas M, Lew DP, Krause KH. Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca^{2+} storage and decreases store-operated Ca^{2+} influx. *J Biol Chem.* 1996;271(16):9332-9.
92. Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10845-50.
93. Gomes-Duarte A, Lacerda R, Menezes J, Romão L. eIF3: a factor for human health and disease. *RNA Biol.* 2018;15(1):26-34.

94. Wagner S, Herrmannová A, Šikrová D, Valášek LS. Human eIF3b and eIF3a serve as the nucleation core for the assembly of eIF3 into two interconnected modules: the yeast-like core and the octamer. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(22):10772-88.
95. Simonetti A, Brito Querido J, Myasnikov AG, Mancera-Martinez E, Renaud A, Kuhn L, et al. eIF3 Peripheral Subunits Rearrangement after mRNA Binding and Start-Codon Recognition. *Mol Cell.* 2016;63(2):206-17.
96. Guan BJ, van Hoef V, Jobava R, Elroy-Stein O, Valasek LS, Cargnello M, et al. A Unique ISR Program Determines Cellular Responses to Chronic Stress. *Mol Cell.* 2017;68(5):885-900.e6.
97. Somers JP, DeLoia JA, Zeleznik AJ. Adenovirus-directed expression of a nonphosphorylatable mutant of CREB (cAMP response element-binding protein) adversely affects the survival, but not the differentiation, of rat granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 1999;13(8):1364-72.
98. Granville DJ, Gottlieb RA. Mitochondria: regulators of cell death and survival. *ScientificWorldJournal.* 2002;2:1569-78.
99. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene.* 1998;17(25):3225-36.
100. Wilson BE, Mochon E, Boxer LM. Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1996;16(10):5546-56.
101. Pugazhenth S, Miller E, Sable C, Young P, Heidenreich KA, Boxer LM, et al. Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem.* 1999;274(39):27529-35.
102. Fu X, Feng Y, Shao B, Zhang Y. Activation of the ERK/Creb/Bcl-2 pathway protects periodontal ligament stem cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Mol Med Rep.* 2019;19(5):3649-57.
103. Ye D, Shi Y, Xu Y, Huang J. PACAP Attenuates Optic Nerve Crush-Induced Retinal Ganglion Cell Apoptosis Via Activation of the CREB-Bcl-2 Pathway. *J Mol Neurosci.* 2019;68(3):475-84.
104. Finkbeiner S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron.* 2000;25(1):11-4.
105. Kim SJ, Nian C, Widenmaier S, McIntosh CH. Glucose-dependent insulintropic polypeptide-mediated up-regulation of beta-cell antiapoptotic Bcl-2 gene expression is coordinated by cyclic AMP (cAMP) response element binding protein (CREB) and cAMP-responsive CREB coactivator 2. *Mol Cell Biol.* 2008;28(5):1644-56.
106. Balogh A, Németh M, Koloszár I, Markó L, Przybyl L, Jinno K, et al. Overexpression of CREB protein protects from tunicamycin-induced apoptosis in various rat cell types. *Apoptosis.* 2014;19(7):1080-98.
107. Zeeshan HM, Lee GH, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):327.
108. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(12):2277-93.
109. Recinella L, Chiavaroli A, Orlando G, Ferrante C, Diletta Marconi G, Gesmundo I, et al. Antiinflammatory, antioxidant, and behavioral effects induced by administration of growth hormone-releasing hormone analogs in mice. *Sci Rep.* 2020;10(1):732.
110. Thounaojam MC, Powell FL, Patel S, Gutsaeva DR, Tawfik A, Smith SB, et al. Protective effects of agonists of growth hormone-releasing hormone (GHRH) in early experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(50):13248-53.
111. Lee B, Cao R, Choi YS, Cho HY, Rhee AD, Hah CK, et al. The CREB/CRE transcriptional pathway: protection against oxidative stress-mediated neuronal cell death. *J Neurochem.* 2009;108(5):1251-65.

112. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006;127(2):397-408.

ANEXO I

Abbreviated Protocol for the Handling and Preparation of GHRH Analogs from the MIA Class Antagonists and the MR Class Agonists (updated June 26, 2013 by R. Perez, PhD)

Storage - Peptides should NOT be subjected to repeated cycles of freeze/thaw.

Dry peptides should be stored in a desiccator at room temperature. Alternately, dry peptides can be stored at -20°C in parafilm sealed vials. Vials should be equilibrated to room temperature prior to opening.

DMSO stocks of peptides (10mM maximum concentration) can be stored at -20°C for up to 12 weeks and -80°C for longer.

Injectable solutions of peptides (0.1% DMSO / 10% Propylene glycol) can be kept at -20°C for up to 4 weeks and can be stored at +4°C for up to 1 week.

Media solutions of peptides (10µM maximum concentration) for *in-vitro* work should be prepared fresh immediately before use and should not contain more than 1% serum (recommended 0.1% serum).

Preparation of Solutions

Injectable Solutions (*in-vivo*)

1. Dissolve the peptide in DMSO using a volume equivalent to 0.1% of the final solution
2. Slowly (drop-wise) add Propylene Glycol to the DMSO solution using a volume equivalent to 10% of the final solution
3. Add sterile water or PBS to the desired final volume. For use in rodents, final concentration of peptide is between 20µg/ml to 100µg/ml. Injections are usually 100µl subcutaneous.

Media Solutions (*in-vitro*)

1. Dissolve the peptide in DMSO to a final peptide concentration of 10mM or less
2. Add the appropriate volume of the DMSO stock solution to the warmed media using a maximum of 1% serum (0.1% serum recommended) and 0.01% final concentration of DMSO. Maximum DMSO concentration varies for different cell lines.
3. Peptide containing media should be replaced every 24 to 48 hours.

ANEXO II

Declaração

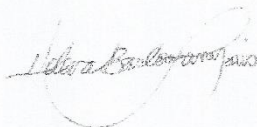
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Papel do agonista do hormônio liberador do hormônio de crescimento MR-409, sobre modelo de célula beta pancreática INS-1E sob estresse de retículo endoplasmático**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 15 de abril de 2020

Assinatura: *Karina R. dos Santos*

Nome do(a) autor(a): **Karina Rodrigues dos Santos**

RG n.º 40.042.850-7



Assinatura :

Nome do(a) orientador(a): **Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio**

RG n.º 30.231.474-X

ANEXO III

COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgeb@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha , intitulada ***"Papel do agonista do hormônio liberador do hormônio de crescimento MR-409, sobre modelo de célula beta pancreática INS-1E sob estresse de retículo endoplasmático"***, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: *Karina R. dos Santos*

Nome do(a) aluno(a): Karina Rodrigues dos Santos

Assinatura:

Nome do(a) orientador(a): Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

Data: Campinas, 15 de abril de 2020