



KELI CRISTINA BENEDICTO

**Participação de ERK-1 na regulação do complexo
quinásico IKK pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 β
e TNF- α e sua relevância na função e viabilidade de
células beta pancreáticas**

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

KELI CRISTINA BENEDICTO

“Participação de ERK-1 na regulação do complexo quinásico IKK pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α a sua relevância na função e viabilidade de células beta pancreáticas”

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida pela candidata

Keli Cristina Benedicto

e aprovada pela Comissão Examinadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestra em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.



Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschiero
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Ortis

CAMPINAS,
2013

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

B434p	<p>Benedicto, Keli Cristina, 1982- Participação de ERK-1 na regulação do complexo quinásico IKK pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α e sua relevância na função e na viabilidade de células beta pancreáticas / Keli Cristina Benedicto. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Antonio Carlos Boschero. Coorientador: Fernanda Ortis. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Proteínas quinases ativadas por mitógeno. 2. Células secretoras de insulina. 3. Citocinas. 4. Viabilidade. 5. Diabetes mellitus tipo 1. I. Boschero, Antonio Carlos, 1943-. II. Ortis, Fernanda. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Involvement of ERK-1 in the regulation of the IKK complex quinásico proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α and its relevance in the function and viability of pancreatic beta cells

Palavras-chave em inglês:

Mitogen-activated protein kinases

Insulin-secreting cells

Cytokines

Viability

Diabetes mellitus, type 1

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Antonio Carlos Boschero [Orientador]

Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Data de defesa: 12-09-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 12 de setembro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Boschiero (Orientador)



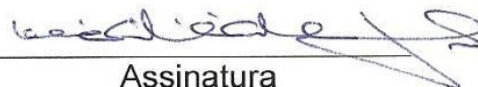
Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva



Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes



Assinatura

Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

Assinatura

Profa. Dra. Marciane Milanski Ferreira

Assinatura

RESUMO

O Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) caracteriza-se pela destruição seletiva, pelo sistema imune, das células beta pancreáticas produtoras de insulina. Durante o ataque autoimune, citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α e interferon (IFN)- γ contribuem para a morte de células beta pancreáticas, principalmente por ativação de NF- κ B. IL-1 β proporciona maior intensidade na ativação de NF- κ B, induzindo a expressão diferencial de genes putativamente envolvidos na disfunção e morte da célula beta, comparado ao TNF- α . Este efeito parece estar relacionado à intensidade na ativação (induzida por IL-1 β) de quinases que modulam o NF- κ B, como o complexo IKK (ponto importante de convergência de sinais extracelulares para ativação de NF- κ B). Recentemente, foi mostrado o uso diferencial do complexo IKK por IL-1 β e TNF- α , em células beta. Enquanto TNF- α utiliza o complexo IKK contendo tanto IKK α como IKK β , IL-1 β induz complexos contendo IKK α somente. Este efeito é conseguido através da indução da degradação de IKK β por proteassoma. IKK γ e a ativação da via TRAF6-TAK1-JNK estão envolvidos na degradação de IKK β induzido por IL-1 β , indicando uma complexa rede de transcrição de sinal que pode ser importante para a indução pró-apoptótica de NF- κ B nessas células. Neste contexto, nosso objetivo foi analisar a função de ERK-1, outra quinase envolvida na regulação de NF- κ B, na ativação diferencial do complexo quinásico IKK por citocinas pró-inflamatórias e seu papel na função e morte de células beta. O silenciamento de ERK-1 inibiu parcialmente a degradação de IKK β , induzida por IL-1 β e também aumentou a secreção de insulina estimulada por glicose em células de insulinoma de rato, INS-1E. Além disso, a ausência de ERK-1 preveniu a morte induzida tanto por IL-1 β +IFN- γ quanto por TNF- α +IFN- γ . Em conjunto, estes resultados mostram que ERK-1 está envolvida na regulação de IKK β , na função e viabilidade de células beta e na ação de citocinas pró-inflamatórias nessas células. Esses resultados são inéditos e, podem contribuir no desenvolvimento de terapias de prevenção e/ou recuperação das células beta após ataque autoimune.

ABSTRACT

Type I diabetes mellitus (DM1) is characterized by a selective destruction, by the immune system, of the insulin producing pancreatic beta cells. During the autoimmune assault, pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF) - α and interferon (IFN) - γ contribute for beta cells death, mainly by the activation of NF- κ B. IL-1 β induces stronger NF- κ B activation, leading to differential expression of genes putatively related to beta cells dysfunction and death, when compared to TNF- α . This effect seems to be related to increased activation (induced by IL-1 β) of kinases that modulate NF- κ B, such as IKK complex (an important point of convergence from extracellular signaling to NF- κ B activation). Recently, a differential use of IKK complex by IL-1 β and TNF- α was described in beta cells. While TNF- α uses IKK complex containing both IKK α and IKK β , IL-1 β induces complexes containing only IKK α . This effect is achieved by degradation of IKK β through the proteasome. IKK γ and the TRAF6-TAK1-JNK pathway are involved in IKK β degradation induced by IL-1 β , showing a complex transduction signaling network that could be important for the pro-apoptotic NF- κ B activation in these cells. The objective of this study was to analyze the role of ERK-1, another kinase involved in the regulation of NF- κ B, on the differential activation of IKK complex by pro-inflammatory cytokines and its role in beta cells function and death. ERK-1 silencing was able to partially inhibit IKK β degradation induced by IL-1 β and increase insulin secretion stimulated by glucose in INS-1E (rat insulinoma cells). Moreover, the absence of ERK-1 prevented cell death induced by either IL-1 β + IFN- γ and TNF- α + IFN- γ . Taken together, these results validate the participation of ERK-1 in beta cells death, and may contribute to the development of therapies for the prevention and / or after recovery of beta cell autoimmune attack.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
Diabetes mellitus tipo 1	1
Ativação de NF- κ B induzido por citocinas pró-inflamatórias	2
Envolvimento da ERK-1 na apoptose de células beta.....	5
OBJETIVOS	7
MATERIAL E MÉTODOS	8
Manutenção de culturas celulares.....	8
Tratamento com citocinas	8
Silenciamento da expressão de gene específico por siRNA	9
Ensaio de western blot.....	9
Análise da viabilidade celular	10
Análise da função celular	11
Análise estatística	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
Validação do modelo experimental.	13
Silenciamento da ERK-1 reduz degradação de IKK β induzida por IL-1 β	16
Análise da viabilidade celular após silenciamento de ERK-1	19
Análise da função celular após silenciamento de ERK-1	22
CONCLUSÃO	25

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

(Simone de Beauvoir)

**Dedico especialmente à minha querida mãe,
na certeza que seu coração está repleto
de alegria e orgulho.
Seus passos sempre irão me guiar...**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero pela oportunidade oferecida e exemplo de sabedoria e profissionalismo.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Fernanda Ortis pela colaboração desde a elaboração do projeto até a análise dos resultados e escrita desta dissertação. Muito obrigada pela paciência, disponibilidade, pelos inúmeros conhecimentos transmitidos e até mesmo pelas cobranças, que hoje as avalio como necessárias para meu crescimento e amadurecimento profissional e pessoal.

À Prof^a Dr^a Emerielle Cristine Vanzela pela atenção e colaboração dedicada, principalmente, na fase final deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo, Sandra, Priscila, Flávia, Patrícia, Jean, André, José Maria, Luis, Thiago (14 e 15), Rafael, Renato, Sarah, Nayara, Cláudio, Robertinha, Miriam, Juliana e Estela pelos momentos de bancada e de descontração que sempre contribuíram para uma melhor execução do trabalho. Gostaria de agradecer, em especial, à Luciana, por me ajudar durante alguns experimentos e pela amizade. Agradeço também, à Tarlliza, por cuidar das células, pelas dicas e sugestões e por fazer parte do meu subgrupo de pesquisa e desta forma participar mais ativamente deste trabalho.

Agradeço muito a minha família, principalmente a minha mãe Angelina e ao meu pai Roberto, pelos valores a mim ensinados, por me apoiarem e proporcionarem condições para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

Ao meu melhor amigo e futuro marido André, obrigada pela imensa paciência, pelos ensinamentos e por estar sempre ao meu lado, dando-me todo o apoio e carinho.

Aos meus amigos, que mesmo à distância, me incentivaram a prosseguir e executar este trabalho da melhor maneira possível.

À Marise pela colaboração nos serviços burocráticos e aos colegas do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional pela companhia.

Aos membros da banca do exame de qualificação, Profa. Dra. Carmem Veríssima Ferreira, Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes e Profa. Dra. Marciane Milanski pelas sugestões e críticas ao trabalho.

A todas as pessoas que, por ventura, aqui não se encontram citadas e que de alguma forma tenham feito parte da minha vida e colaborado para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço à Fundação FAPESP pelo apoio financeiro (processo nº 2011/03976-3).

LISTA DE ABREVIATURAS

DM: Diabetes Mellitus

DM1: Diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DNA: ácido desoxiribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM: erro padrão da média

ERK: quinase regulada por sinal extracelular

JNK: quinase da porção N-terminal de c-Jun

h: hora

HEPES: 4 - (2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico

IFN- γ : interferon gama

IL-1 β : interleucina 1 beta

I κ B: inibidor de NF-kappaB

IKK: quinase do inibidor de NF-kappaB

INS-1E: insulinoma de rato-1E

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MEK: proteína quinase da quinase ativada por mitógeno

MIN-6: insulinoma de Camundongo

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium

NF- κ B: fator nuclear KappaB

NO: óxido nítrico

PBS: phosphate buffered saline

PE: fluorocromo ficoeritrina

Pdx-1: pancreatic duodenal homeobox 1

PS: fosfatidilserina

SDS: dodecil sulfato de sódio

TAK: quinase ativada pelo *fator transformador de crescimento* (TGF)- β

TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa

TRAF: proteína adaptadora associada ao receptor do fator TNF
vs: Contra (*versus*)

INTRODUÇÃO

- **Diabetes Mellitus tipo 1**

O Diabetes mellitus (DM) é definido como uma síndrome cuja característica principal é a hiperglicemia. As principais classes desta síndrome são: a) Diabetes mellitus insulino-dependente ou tipo 1 (DM1) e, b) Diabetes mellitus não dependente de insulina ou tipo 2 (DM2).

No DM1, as ilhotas pancreáticas são invadidas por linfócitos do tipo T-CD4+ e T-CD8+ e por macrófagos ativados devido falha de reconhecimento do sistema imunológico (1-2). Estas células mononucleadas liberam óxido nítrico (NO), radical livre de oxigênio (3), além de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) (4). Este processo desencadeia mecanismos pró-apoptóticos causando perda da massa e funcionalidade das células beta (3), sem prejuízo aos demais tipos celulares que compõem a ilhota pancreática. As manifestações clínicas do DM1 (hiperglicemia e cetose) ocorrem tardiamente, geralmente após destruição de 80% das células beta (5). O fato deste processo ser lento e de natureza autoimune sugere que a prevenção da morte das células beta é possível.

Alterações funcionais semelhantes às observadas em indivíduos pré-diabéticos podem ser reproduzidas *in-vitro* com exposição de linhagem de células beta a IL-1 β combinada com IFN- γ e/ou TNF- α (1, 3, 6). O contato prolongado a estas citocinas compromete a funcionalidade destas células e evolui para a sua morte (7). Deste modo, mecanismos de indução de apoptose em células betas por citocinas pró-inflamatórias têm sido amplamente utilizado como modelo experimental de Diabetes tipo 1 *in vitro* (1, 3).

Em células beta, muitos dos genes modificados por citocinas pró-inflamatórias são regulados pelo fator de transcrição NF- κ B (8), que apresenta importante função na apoptose destas células mediada por citocinas (5, 9-12). NF- κ B também controla redes gênicas que modulam o fenótipo diferenciado das células beta

e atração de células do sistema imune (8). Cabe ressaltar que, em outros modelos celulares, NF- κ B tem um papel anti-apoptótico (12).

- **Ativação de NF- κ B induzido por citocinas pró-inflamatórias**

O fator de transcrição NF- κ B regula a expressão de indutores e efetores da resposta celular imune/inflamatória (13), além de controlar a divisão celular (14) e apoptose (15). A família do NF- κ B é composta por 5 subunidades denominadas p50, p52, p65, c-Rel e RelB, que compartilham o domínio homólogo Rel, localizado na região N-terminal da molécula. O domínio Rel é responsável tanto pela ligação do fator de transcrição na fita de DNA quanto pela homo e heterodimerização das subunidades (16).

Na sua forma inativa, os dímeros de NF- κ B encontram-se no citoplasma ligados a uma proteína pertencente à família das proteínas inibidoras κ B (I κ B). São conhecidos 3 subtipos principais de proteínas I κ B: I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ . A interação NF- κ B-I κ B melhor estudada é a do dímero p50/p65 com o I κ B α (16). Estímulos produzidos por citocinas pró-inflamatórias ativam o complexo quinásico I κ B (IKK) que fosforila proteínas inibitórias (I κ B). Os I κ Bs fosforilados sofrem rápida degradação, dependente de ubiquitinação pelo proteassomo 26S, permitindo a translocação dos dímeros do NF- κ B para o núcleo (17). Estes dímeros se ligam aos promotores de genes alvos para, posteriormente, regular os genes codificadores de citocinas, quimiocinas e reguladores de apoptose (16).

O complexo IKK representa o principal ponto de regulação de NF- κ B, tendo sua atividade controlada por uma cascata quinásica de sinalização (17-18). IKK é formado por 3 proteínas, pertencentes a uma mesma família: IKK α , β e γ . As subunidades IKK α e β (subunidades quinásicas) fazem parte desse complexo proteico de alto peso molecular, estando associadas como um homo ou heterodímero a subunidade reguladora IKK- γ (NEMO) (17, 19). Apesar de IKK α e IKK β possuírem alta identidade estrutural (17), estudos indicam que estas subunidades podem exercer diferentes funções, além de serem acionadas por vias distintas, dependendo do estímulo. Até recentemente, acreditava-se que IKK α não era necessário para indução

de NF- κ B por citocinas pró-inflamatórias (14). Porém, os trabalhos mostrando a importância de IKK β eram todos realizados com TNF- α , tendo sido recentemente revelado que ativação de NF- κ B por IL-1 β poderia ocorrer tanto via IKK α como IKK β (18).

Além disso, tanto TNF- α quanto IL-1 β ativam o fator de transcrição NF- κ B e, em combinação com IFN- γ , induzem a morte das células beta. Apesar destas similaridades, essas citocinas agem via diferentes receptores, recrutando moléculas adaptadoras e cascatas quinásicas de sinalização distintas (7, 20-21). Nesse caso, a ativação do complexo IKK por IL-1 β difere da ativação induzida por TNF- α , sendo que a ativação de IKK por IL-1 β é mais rápida e efetiva, refletindo em ativação mais rápida e intensa de NF- κ B, comparado ao TNF- α (12, 22). Essas diferenças parecem estar relacionadas à ativação das quinases ERK-1/2 (22) e IKK (12), conferindo a IL-1 β papel pró-apoptótico mais importante, comparado ao TNF- α (12, 21). Em células beta, outra diferença da ativação do complexo IKK por estas citocinas consiste na degradação de IKK β induzido por IL-1 β , mas não por TNF- α (23). Esta degradação é dependente do proteassomo e da presença da subunidade IKK γ (23) a qual não possui atividade quinásica, mas permite a associação entre o complexo IKK e as proteínas reguladoras que modulam a ativação ou repressão deste complexo (16). Essa degradação é também regulada por TRAF6-TAK1-JNK (23), indicando uma rede complexa de transdução de sinal que pode ser importante para a indução pró-apoptótica de NF- κ B nessas células. Isso faz com que a citocina IL-1 β utilize, preferencialmente, complexos contendo IKK α enquanto TNF- α utiliza complexos IKK β /IKK α (23) (Figura 1).

Compreender os mecanismos envolvidos na modulação diferencial do complexo IKK por citocinas pró-inflamatórias, ponto chave de regulação do fator de transcrição NF- κ B, é extremamente importante para entendermos os mecanismos que o levam ao papel pró-apoptótico em células beta.

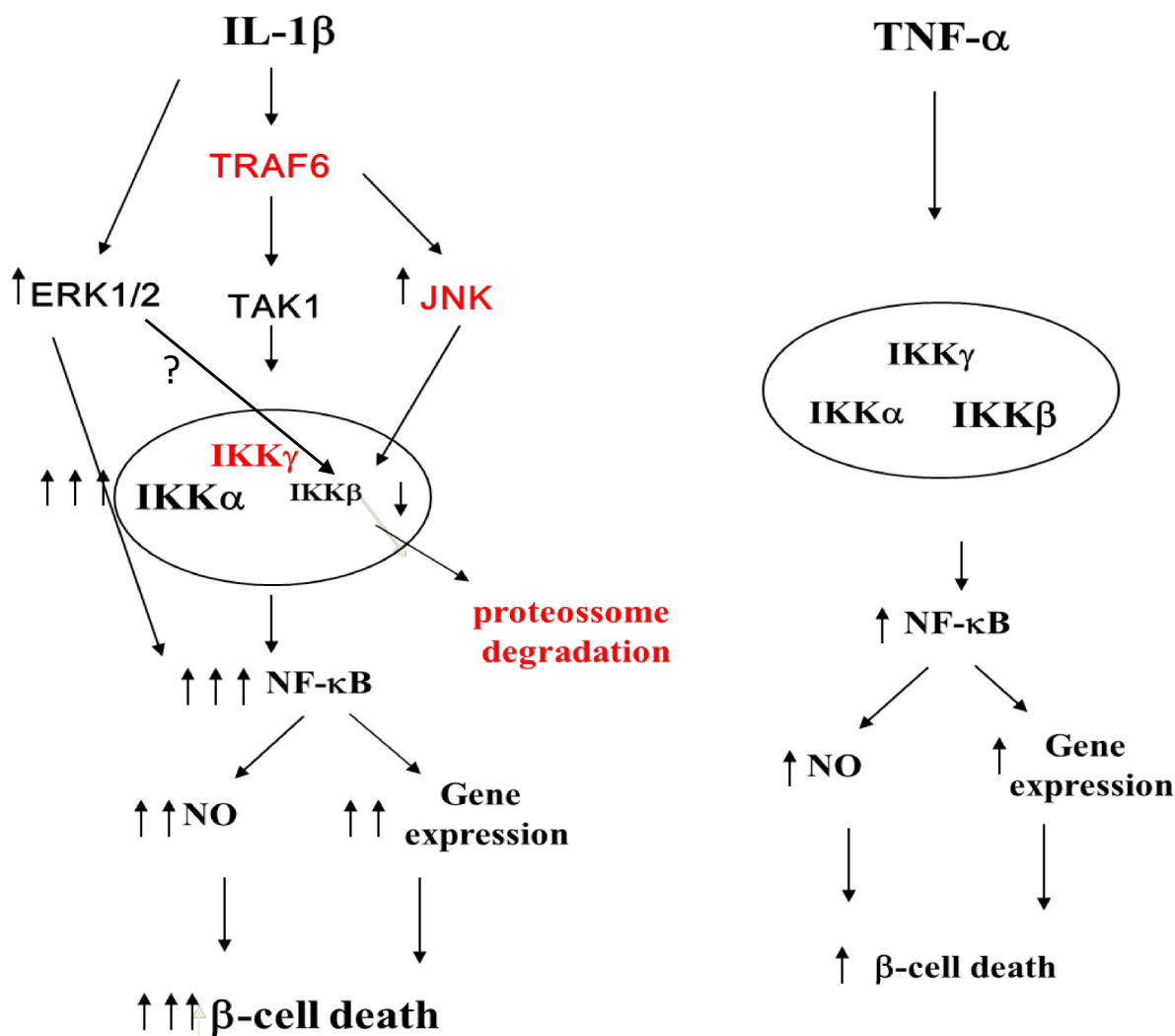


Figura 1: Modelo proposto para a utilização diferencial das vias de ativação de NF-κB por IL-1β e TNF-α em células beta. Em vermelho estão as proteínas envolvidas na degradação de IKKβ induzida por IL-1β (Figura modificada de (23)).

- **Envolvimento da ERK-1 na apoptose de células beta**

A transmissão de sinais extracelulares para o meio intracelular pode ser mediada por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que constituem uma grande rede de proteínas intracelulares, evolutivamente conservadas e responsáveis por uma variedade de processos fisiológicos como: adesão celular, diferenciação, regulação do ciclo celular, transcrição, proliferação e apoptose (24-25). As MAPKs são amplamente expressas nos tecidos de mamíferos e compreendem as proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), a p38 e a quinase da porção N-terminal de c-Jun (JNK) (24-25). A ativação da p38 e JNK geralmente está associada a apoptose, enquanto que a ERK1/2, considerada a família de MAPKs clássica, apresenta funções relacionadas, principalmente, a eventos nucleares, modulando a diferenciação celular e a transcrição de genes (26). Dentro do grupo de ERK, existem, até o momento, oito isoformas (ERK-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) (27-28) e dentre estas, a ERK-1 e ERK-2 são mais intensivamente estudadas e caracterizam-se por ser isoformas de 44kD e 42kD.

As proteínas ERK-1 e ERK-2 apresentam uma elevada similaridade, possuindo cerca de 84% de aminoácidos idênticos, possuindo um perfil de substrato muito semelhante (25). A via de sinalização destas proteínas compreende ativação prévia de quinases da quinase de ERK-1/2 (proteínas da família Raf) que catalisam a fosforilação das proteínas MEK (proteína quinase da quinase ativada por mitógeno) 1/2 que, quando ativas, catalisam a fosforilação das ERK1/2 no resíduo da treonina 202 e da tirosina 204. Sua desativação ocorre por desfosforilação no resíduo de treonina ou em ambos os resíduos (29). A ativação de ERK1/2 é um passo fundamental para a regulação de muitas respostas biológicas, no entanto, ainda não se estabeleceu se ERK-1 e ERK-2 são homólogos funcionais.

A resposta biológica direcionada pela ativação de ERK (proliferação celular, migração, diferenciação e/ou apoptose) depende do tipo celular, do estímulo e da duração desta ativação (30-31). Em linhagem de células beta tumorais MIN-6 e também em ilhotas pancreáticas isoladas de rato, a ativação de ERK1/2 por glicose leva a fosforilação de proteínas envolvidas nos processos de exocitose dos grânulos

de insulina, tais como a sinapsina I (32). A ativação desta quinase também resulta na expressão e translocação nuclear do NeuroD, um fator de transcrição essencial para a sobrevivência e desenvolvimento das ilhotas pancreáticas (33), e na fosforilação e ativação de PDX-1, o que leva a um aumento na expressão de insulina (34).

Alguns trabalhos sugerem que a ativação da ERK-1/2 resulta no aumento de expressão de proteínas anti-apoptóticas (35-36). Entretanto, outros indicam que estas quinases participam da via de sinalização para a apoptose mediado por citocinas pró-inflamatórias em células beta (37-38). Nestas células, a ativação de ERK-1/2, mediada por IL-1 β , aumenta a capacidade de transativação de NF- κ B (39), via fosforilação da subunidade p65, alterando o equilíbrio da expressão gênica e favorecendo a expressão de genes relacionados com a disfunção e morte de células beta (40). A indução pró-apoptótica de NF- κ B por IL-1 β pode estar relacionada a indução diferencial de ERK e do complexo IKK (Fig.1) indicando que estas vias podem estar conectadas entre si, e também com outras vias, controlando a ativação/modulação de fatores de transcrição como NF- κ B. Isto explicaria porque diferentes estímulos, mesmo ativando vias e fatores de transcrição parecidos, podem levar a diferentes resultados, como por exemplo, a IL-1 β induz mais morte celular do que TNF- α em células beta ou NF- κ B é anti-apoptótico em outras células e pró-apoptótico em células beta. Portanto, compreender o papel dos diferentes componentes das vias de NF- κ B/ERK-1 e os meios pelos quais interagem uns com os outros, nos permitem modular essa rede e, assim, evitar a apoptose das células beta.

OBJETIVOS

- **Objetivo Geral**

Analisar a participação de ERK-1 na regulação do complexo quinásico IKK, mediado por citocinas pró-inflamatórias, e sua participação na função e na viabilidade de células beta.

- **Objetivos específicos**

- Estabelecer os protocolos a serem utilizados para tratamento com citocinas pró-inflamatórias nas linhagens celulares INS-1E e MIN6 para estudo da ativação de NF- κ B;

- Avaliar a ativação do complexo IKK mediado por IL-1 β e TNF- α em células MIN-6;

- Avaliar o efeito do silenciamento da proteína ERK-1 na degradação de IKK β induzida por IL-1 β em células INS-1E;

- Avaliar o efeito do silenciamento da proteína ERK-1 na função e na viabilidade de células INS-1E após tratamento com citocinas pró-inflamatórias.

MATERIAL E MÉTODOS

- **Manutenção de culturas celulares**

Células de insulinoma de rato INS-1E, gentilmente fornecidas pelo laboratório do Prof. C. Wolheim (Centro Médico Universitário, Genebra, Suíça) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Invitrogen, Paisley, U.K.) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), HEPES 10mM, piruvato de sódio 1mM e 2-mercaptoetanol 50 μ M (41). Células beta pancreáticas de camundongo, MIN6 (42), foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen, Paisley, U.K.), suplementado com 5% de soro fetal bovino. Essas culturas foram mantidas em incubadora (CO-24, New Brunswick Scientific Co, Inc., New Jersey, USA) a 37°C, em atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

- **Tratamento com citocinas**

As células foram semeadas em placas de 24 poços, na densidade de 1.10⁵ células/poço e cultivadas por, pelo menos, 48h antes de qualquer tratamento, para garantir a aderência à placa e minimizar respostas potencialmente geradas pelo estresse durante tripsinização. Células INS-1E e células MIN6 foram tratadas na semi-confluência com diferentes concentrações de IL-1 β recombinante de rato (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) ou TNF- α recombinante de rato (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para indução de apoptose, essas citocinas foram utilizadas em combinação com IFN- γ recombinante de rato (Invitrogen, Carlsbad, CA). O tempo e a concentração das citocinas foram selecionados dependendo do objetivo proposto para cada experimento. Para simplificar e facilitar o estudo das vias de sinalização de NF- κ B optou-se por utilizar IL-1 β e TNF- α , sem a presença de IFN- γ que ativa outras vias. Porém, como essas citocinas sozinhas não induzem fortemente a apoptose dessas células, em estudos que envolviam a avaliação da viabilidade celular optou-se pela utilização de IFN- γ em combinação com IL-1 β ou TNF- α . Essa combinação não altera a degradação de IKK β induzida por IL-1 β (23).

- **Silenciamento de ERK-1 por siRNA**

Para silenciamento da expressão da proteína ERK-1 utilizou-se o siRNA específico Mm/Hs-MAPK1, com sequência UGCUGACUCCAAAGCUCUG (Qiagen). Um siRNA com sequência nucleotídica aleatória e sem especificidade foi utilizado para controle negativo (Qiagen). A transfecção por 16h foi realizada utilizando-se Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen) e 30nM de siRNA por amostra. Após 72h de transfecção, as células foram incubadas na ausência (controle) ou presença de citocinas pró-inflamatórias.

- **Ensaio de Western blot**

Após tratamento, as células foram lavadas com PBS e coletadas com Tampão de Laemmli (Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%) contendo β -mercaptoetanol e, em seguida, incubadas à 100°C por 5 minutos. Para corrida eletroforética foi utilizado gel bifásico: gel de empilhamento (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 750 mM, pH 6.7) e gel de resolução (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 50 mM, pH 8.9). A corrida foi efetuada a 50mA por aproximadamente 2 horas com Tampão de Corrida (Trisma base 200mM, glicina 1,52M, EDTA 7,18mM e SDS 0.4%). As amostras foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (BioRad- EUA), banhada com Tampão de Transferência, durante 2 horas à 370mA em gelo (Trisma base 25mM, glicina 192mM e metanol 20%). Após transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em solução de TBS por 1 hora à temperatura ambiente. As proteínas relacionadas ao estudo foram detectadas na membrana de nitrocelulose com anticorpo específico (anti-IKK β (#34673), I κ B α (#371), ERK-1(#94), (Santa Cruz Biotechnology) ERK-1/2 (#9102), Caspase-3 Clivada (#Asp175), (Cell Signaling Technology) e α -Tubulina (#T5168 - Sigma-Aldrich)) por incubação de 14-16h, 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada e incubada com anticorpo secundário (Cell Signaling, diluição: 1:10000 em TBS com 5% de leite desnatado) por 1h, a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBS, expostas a reagente de quimioluminescência e visualizadas em fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000 - GE). A intensidade e

quantificação das bandas foram medidas por densitometria (ImageQuant TL- GE), e normalizados pelos valores de densitometria do controle interno (α -Tubulina).

- **Análise da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi analisada por mais de um método para validação dos resultados.

(A) Ensaio de MTS (Promega, Madison, USA): Este método se baseia na redução do sal de tetrazólio (MTS) por desidrogenases mitocondriais em células metabolicamente ativas, formando assim o formazano aquoso e solúvel. A intensidade da cor do formazano produzido é proporcional ao número de células viáveis (43). Para isto, as células foram lavadas com solução de PBS estéril e o MTS foi utilizado em conjunto com um agente acoplador de elétrons, o PMS (fenazina metossulfato). A mistura PMS/MTS foi preparada segundo indicações do fabricante e diluída para 10% em tampão Krebs (NaCl 109mM, KCl 4,7mM, CaCl₂.2H₂O 1,9mM, MgSO₄ 1,2mM, K₂HPO₄ 1,03mM, NaHCO₃ 25 mM, Hepes 20mM, C₆H₁₂O₆ 11,1 mM). A incubação em solução de MTS ocorreu por 4h e durante este período os níveis de formazano formado foram monitorados a cada 10 minutos em espectrofotômetro (SpectraMax M3, Molecular Devices), a 490nm de absorvância.

(B) Análise da clivagem de Caspase 3: A detecção do aumento de Caspase 3 clivada foi realizada por western blot, como descrito acima.

(C) Detecção de Apoptose por externalização de fosfatidilserina - Guava Nexin Reagent (Guava Technologies, Inc. Hayward, CA): Esta técnica é destinada a detecção de apoptose por avaliação de fosfatidilserina (PS) predominante na superfície interna da bicamada lipídica. Células em apoptose inicial, onde a membrana celular ainda permanece intacta, mas sofre certa desorganização, a PS é transferida para a superfície exterior da bicamada lipídica. Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolípidos e possui alta afinidade por PS. Mudanças nesta assimetria da membrana podem ser detectadas antes de alterações morfológicas associadas ao início de apoptose e antes da perda da integridade da membrana por medição da aderência de Anexina V à membrana celular. A conjugação Anexina V + PE (fluorocromofico eritrina), serve como sonda sensível para análise das células

apoptóticas no citometro de fluxo. O corante impermeante celular, 7-AAD (7-Aminoactinomycin D), é utilizado como indicador de integridade da membrana celular, por ter forte afinidade ao DNA. Para a realização do procedimento experimental, as células foram coletadas por método enzimático com solução de tripsina-EDTA e centrifugados a 3000rpm, por 2 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com Tampão fosfato (PBS) e ressuspensas em PBS contendo 1% de soro fetal bovino, de modo que a concentração celular permanecesse em $2,5 \times 10^5$ células por amostra. Oitenta μL de cada amostra foram transferidos para uma microplaca de 96 poços ($80\mu\text{L}/\text{poço}$) e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos (no escuro) com adicionais $100\mu\text{L}$ de Guava Nexin Reagent. A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo Guava easyCyte 8HT.

- **Análise da função celular**

Células INS-1E foram pré-incubadas em meio RPMI-1640 (Invitrogen, Paisley, U.K.) ausente de glicose, acondicionadas a 37°C , e mantidas em ambiente umidificado e gaseificado com 95% O_2 e 5% CO_2 por 60min. Após este período o meio foi removido e as células foram incubadas com solução Krebs-bicarbonato, suplementado com 0,3% de albumina, contendo 2,8 ou 16,7 mM de glicose, e pH 7.4, a 37°C . Após incubação de 60 min, removeu-se parte do meio de incubação e armazenou-se em tubos de ensaio à -20°C , para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio. As células foram coletadas com Tampão de Uréia 8M, contendo: 100 mM de Tris pH 7,5; 10 mM de pirofosfato de sódio; 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA; 10 mM de Ortovanadato de sódio; 2 mM de PMSF; e Triton-X100 1%, e sonicadas por 10 segundos a 21% de amplitude. A quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford para normalização dos dados da secreção de insulina.

Radioimunoensaio (RIE): A secreção estática de insulina foi quantificada pelo método de RIE (44), utilizando-se anticorpo específico anti- insulina de rato para traçar a curva padrão e insulina recombinante humana marcada com Iodo 125 (Amersham Biosciences). As amostras foram lidas em contador de raios gama e os valores das concentrações alocados em gráficos.

- **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo Teste "t" Student, utilizando o programa GraphPad Prism 5. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- **Validação do modelo experimental**

A linhagem celular INS-1E foi utilizada neste trabalho por apresentar características similares às células beta primárias de rato, tanto na expressão gênica induzida por citocinas (45) quanto na secreção de insulina em resposta a glicose (46). Trabalhos anteriores mostraram que, nestas células, a ativação do fator de transcrição NF- κ B por citocinas, é pró-apoptótica (21).

Estas células foram utilizadas como modelo experimental para investigar o envolvimento da quinase ERK-1 na regulação da ativação diferencial do complexo IKK, por citocinas pró-inflamatórias e seu papel na regulação da morte de células beta. Visto que a degradação de I κ B α é um passo chave para indução do fator de transcrição NF- κ B (16), utilizamos esse parâmetro para validar este modelo e determinar a concentração e o tempo de tratamento adequado para o objetivo proposto. Assim, células INS-1E foram expostas a diferentes concentrações de IL-1 β e TNF- α e analisou-se a degradação das proteínas I κ B α e IKK β . O tempo de tratamento e a concentração das citocinas foram selecionados com base em trabalhos anteriores (12, 21, 23).

Em células INS-1E, após 30 minutos de tratamento, tanto a IL-1 β (nas concentrações de 500 e 1000U/mL) como o TNF- α (2000 e 5000U/mL) induziram degradação da proteína I κ B α , comparados ao controle (Figura 2A-B). Com relação à proteína IKK β , ambas as concentrações de IL-1 β (500U/ml e 1000U/ml) induziram sua degradação, enquanto que concentrações iguais ou maiores de TNF- α (1000, 2000 ou 5000U/mL) não alteraram a quantidade desta proteína, comparado ao controle (Figura 2A e 2C). Estes resultados validam nosso modelo experimental, visto que houve degradação do IKK β , induzido por IL-1 β e não por TNF- α (23), além de comprovar a funcionalidade das citocinas utilizadas para indução do NF- κ B (12).

As concentrações das citocinas foram selecionadas com base na resposta celular perante o tratamento, ou seja, a menor concentração de citocina que

proporcionou degradação da proteína I κ B α (por IL-1 β e TNF- α). Deste modo, optamos por utilizar as concentrações de 500U/mL de IL-1 β e 2000U/mL de TNF- α , nos tratamentos de células INS-1E.

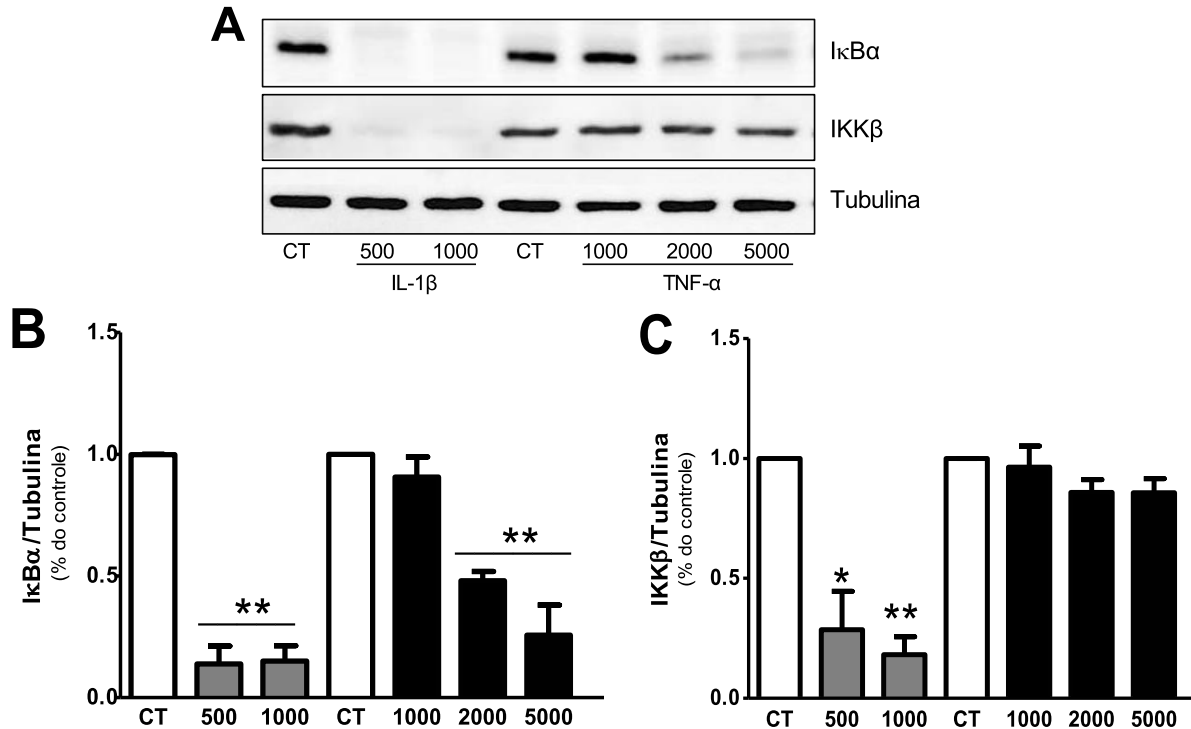


Figura 2: Efeito do tratamento com citocinas pró-inflamatórias em células INS-1E. As células foram expostas a 500 ou 1000U/mL de IL-1 β (barras cinzas) ou 1000, 2000 ou 5000U/mL de TNF- α (barras pretas) ou deixadas sem tratamento (CT, controle, barras brancas) por 30 minutos. Em seguida, as células foram lisadas e utilizadas para western blot, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Figura representativa de três experimentos independentes de western blot com a utilização de anticorpos anti I κ B α , IKK β e α Tubulina. As bandas correspondentes a I κ B α **(B)** e IKK β **(C)** foram quantificadas e corrigidas pelos valores de α Tubulina. Os resultados estão apresentados em % do respectivo controle considerado como 1. Os gráficos representam a média \pm EPM para 3 experimentos independentes. * p <0.05 ou ** p <0.01 vs respectivo controle. Teste “t” de Student – pareado.

A linhagem celular de insulinoma de camundongo, MIN-6, também foi analisada quanto à degradação do IKK β induzido por IL-1 β , mas não por TNF- α (23), para verificar se esta característica poderia ser expandida para as células beta, de modo geral, ou se este efeito se tratava de uma característica específica de células tumorais beta de rato. Também foi avaliado se esta linhagem celular poderia ser utilizada como modelo de estudos da ativação diferencial do complexo IKK por citocinas pró-inflamatórias. Células MIN-6 apresentam padrão de resposta de secreção de insulina estimulada por glicose, comparável a camundongos, o que as tornam um modelo experimental semelhante às células beta primárias (42, 47). Estas células foram tratadas com 500, 1000 ou 2000U/mL IL-1 β ou 1000, 2000 ou 5000U/mL TNF- α , por 45 minutos. Um grupo controle, sem citocina, foi incubado por igual período de tempo. A degradação da proteína I κ B α pode ser observada em todas as concentrações de IL-1 β . Já para TNF- α , somente a maior concentração utilizada 5000U/mL foi capaz de induzir degradação de I κ B α (Figura 3A-B). A IL-1 β , mas não o TNF- α , induziu a degradação, estatisticamente significativa, de IKK β após tratamento na concentração com 1000 e 2000U/ml (Figura 3A; 3C).

Os resultados obtidos com a linhagem MIN-6 corroboram nossos dados e trabalhos anteriores feitos em linhagem celular INS-1E e células beta primárias de rato (23), indicando que a degradação do IKK β induzido por IL-1 β , e não por TNF- α , é uma característica de células beta, tanto de rato como de camundongo. Conclui-se que células MIN-6 podem servir para estudos dos mecanismos envolvidos na ativação diferencial do complexo IKK mediado por citocinas pró-inflamatórias.

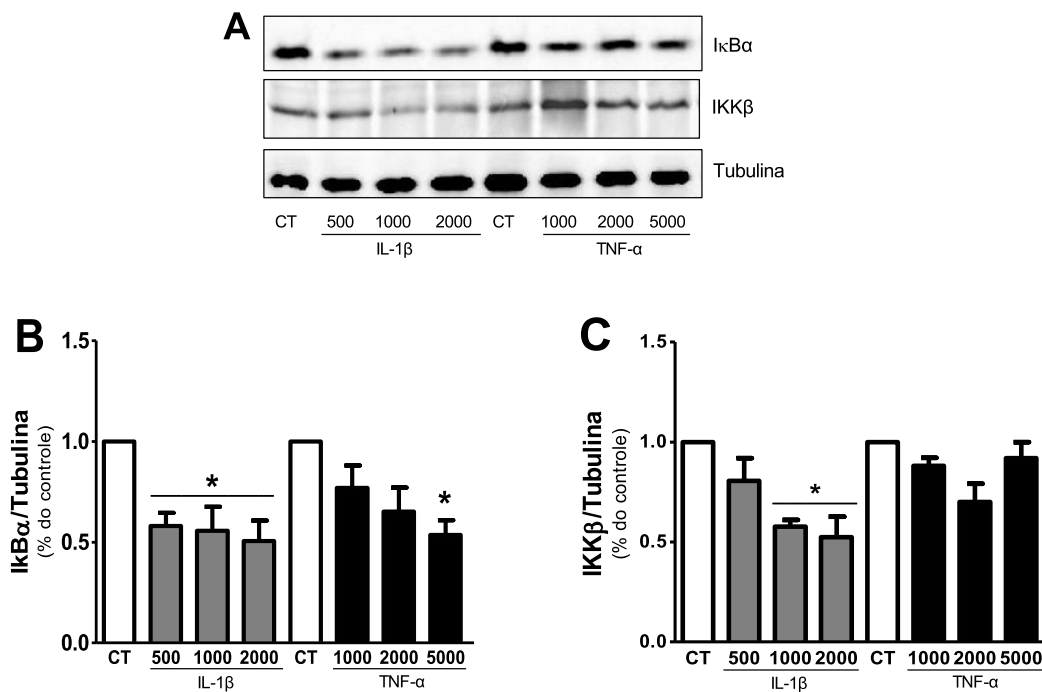


Figura 3: Efeito do tratamento com citocinas pró-inflamatórias em células MIN-6. As células foram expostas a 500, 1000 ou 2000U/mL de IL-1 β (barras cinza) ou 1000, 2000 ou 5000U/mL de TNF- α (barras pretas) ou deixadas sem tratamento (CT, controle, barras brancas) por 45 minutos. Em seguida, as células foram lisadas e utilizadas para western blot, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Figura representativa de três experimentos independentes de western blot com a utilização de anticorpos anti I κ B α , IKK β e α Tubulina. As bandas correspondentes a I κ B α **(B)** e IKK β **(C)** foram quantificadas e corrigidas pelos valores de α Tubulina. Os resultados estão apresentados em % do respectivo controle considerado como 1. Os gráficos representam a média \pm EPM para 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ vs respectivo controle. Teste “t” de Student – pareado.

- **Silenciamento da ERK-1 reduz degradação de IKK β induzida por IL-1 β .**

Durante a ativação da via IKK-NF- κ B, proteínas adaptadoras (TRAFs, MyD88 e TIRAP) e quinases (RIP, IRAK) são acionadas para facilitar o recrutamento e ativação do complexo IKK (16). Dependendo deste estímulo e de sua intensidade, subunidades do complexo IKK são acionadas, como homo

ou heterodímeros de IKK α ou IKK β , associados ou não ao NEMO (16). A subunidade catalítica IKK β tem sido descrita como a principal quinase deste complexo em resposta a insultos pró-inflamatórios (48). Além de controlar a transcrição de genes pró-inflamatórios por fosforilação dos inibidores I κ Bs em resposta a estímulos inflamatórios (49-50) em outros tipos celulares, IKK β pode desempenhar função crítica em muitos processos biológicos, incluindo autofagia, sinalização da insulina e dano ao DNA (revisto em (51-52)). IKK α também apresenta atividade específica que vai além da regulação de NF- κ B (53). O uso diferencial do complexo IKK por citocinas pró-inflamatórias (23) e os efeitos gerados por este uso na morte de células beta ainda não são claros. Foi demonstrado que a ativação mais intensa de ERK-1/2 por IL-1 β , comparado a TNF- α , poderia estar envolvida na indução diferencial de intensidade e duração da ativação de NF- κ B, e consequente expressão diferencial de genes envolvidos na disfunção e morte das células beta, mediada por estas citocinas (21). Neste trabalho, utilizamos siRNA específico para ERK-1 e, após confirmar redução (aproximadamente 60%) na sua expressão (Figura 4A-B), sem alterar a expressão da isoforma ERK-2 (Figura 4A; 4B), analisamos o efeito do silenciamento de ERK-1 na presença ou ausência de citocinas pró-inflamatórias sobre a degradação do IKK β (Figura 4A; 4D). A expressão da proteína ERK-2 foi analisada para validar a especificidade do siRNA e também confirmar que a diminuição na expressão de ERK-1 não alterou a expressão de ERK-2. Assim, de forma indireta, sugerimos que não houve sobreposição funcional.

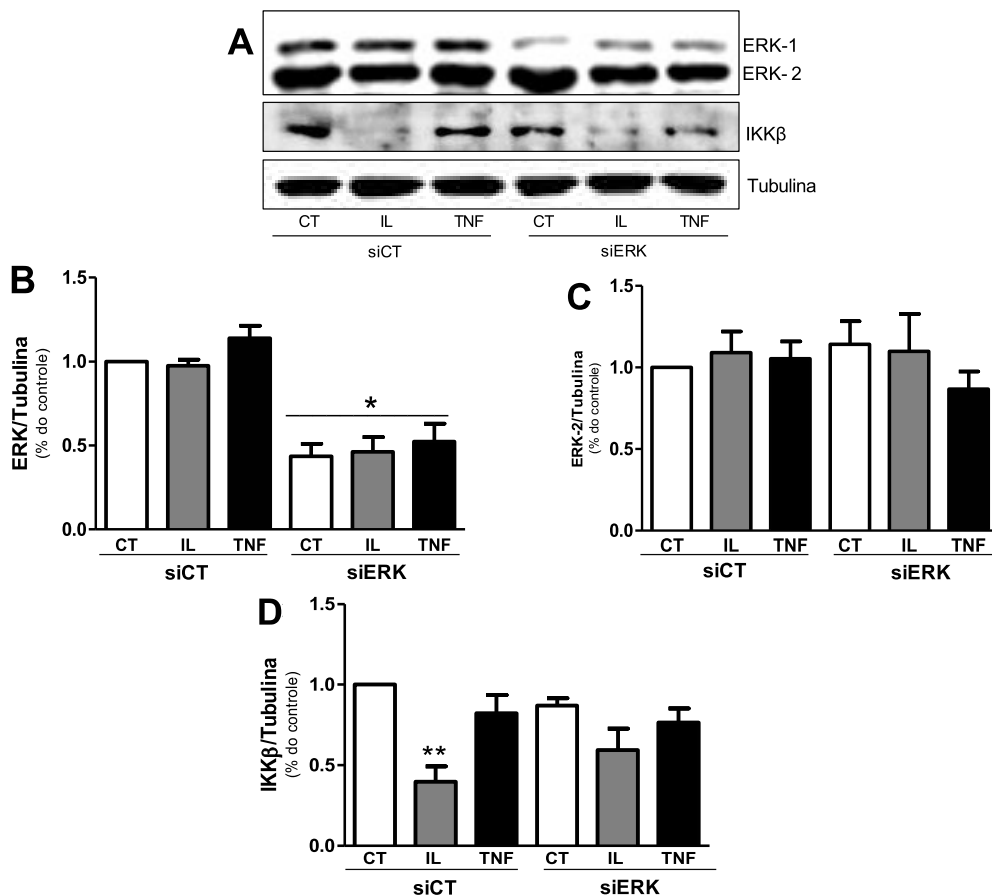


Figura 4: Silenciamento de ERK-1 reduz degradação de IKKβ induzida por IL-1β. Células INS-1E foram transfectadas com siRNA específico para ERK-1 (siERK-1) ou siRNA controle (siCT), ambos nas concentrações de 30nM, durante 15-16 horas. Três dias após a transfecção, as células foram tratadas por 30 minutos com IL-1β (500U/mL, barras cinzas) ou TNF-α (2000U/mL, barras pretas) ou deixadas sem tratamento (CT, controle, barras brancas). Em seguida, as células foram lisadas e utilizadas para western blot, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Figura representativa de quatro experimentos independentes de Western Blot com a utilização de anticorpos anti ERK1/2, IKKβ e αTubulina. As bandas correspondentes a ERK-1 **(B)**, ERK-2 **(C)** e IKKβ **(D)** foram quantificadas e corrigidas pelos valores de αTubulina. Os resultados estão apresentados em % do controle que corresponde a 1. Os gráficos representam a média ± EPM para 4 experimentos independentes. *p<0.05 ou **p<0.01 vs controle (CT). Teste “t” de Student – pareado.

O silenciamento de ERK-1 mostrou-se parcialmente efetivo na prevenção da degradação da proteína IKK β induzida por IL-1 β (Figura 4A; 4D). Recente estudo com células de insulinoma de rato demonstrou envolvimento da proteína adaptadora associada ao receptor do fator TNF (TRAF)-6, da quinase ativada por *fator transformador de crescimento* (TGF)- β , TAK-1 e também da quinase Jun-N-terminal (JNK) na degradação de IKK β induzida por IL-1 β (23) (Fig 1). Todas estas proteínas fazem parte da via de sinalização estimulada por IL-1 β , que leva a ativação do complexo IKK e, conseqüentemente, ativação de NF- κ B (16-17, 54). O envolvimento da proteína ERK-1 no mecanismo de regulação da degradação de IKK β , induzida por IL-1 β , é apontado pela primeira vez.

Sabe-se que o complexo IKK é a chave de regulação do fator de transcrição NF- κ B (16). As subunidades α e β deste complexo não só controlam a translocação do NF- κ B para o núcleo (17), como também podem modular sua atividade transcrricional (49). A subunidade IKK β contém um domínio semelhante a ubiquitina que pode ser importante para a sua ativação e degradação (55). O uso preferencial de complexos de IKK contendo apenas a subunidade IKK α , após exposição a IL-1 β em células beta, pode contribuir para a ativação mais intensa de NF- κ B por esta citocina, resultando na expressão de genes pró-apoptóticos e na morte de células beta (12, 21). Sabendo-se que a ativação de ERK-1/2 pode aumentar a capacidade de transativação de NF- κ B em células produtoras de insulina (40), após analisarmos o envolvimento de ERK-1 na degradação de IKK β induzida por IL-1 β , investigamos o papel desta quinase na viabilidade das células beta mediada por citocinas pró-inflamatórias.

- **Análise da viabilidade celular**

A combinação de citocinas pró-inflamatórias causam disfunção e morte em células beta pancreáticas (3, 7). O tratamento com IL-1 β +IFN- γ ou TNF- α +IFN- γ por 24h aumentou a apoptose em células INS-1E (Fig. 5), corroborando com dados da literatura (12). O efeito das citocinas na viabilidade celular após silenciamento de ERK-1 foi analisado por três métodos distintos para validar nossos resultados. Primeiro, avaliou-se a marcação de células

positivas para anexina V, utilizando citometria de fluxo (Fig. 5A-B). Este método baseia-se na adição de dois corantes: 1) anexina V-PE que detecta fosfatidilserina na membrana externa das células apoptóticas e 2) 7-AAD, corante impermeante celular, que indica integridade estrutural da membrana e, por isso, não é detectado em células saudáveis ou em apoptose inicial, mas consegue atravessar a membrana de células em apoptose avançada ou mortas. Outro método utilizado foi a quantificação do sal tetrazólico (MTS) incorporado em células viáveis (Fig. 5C). Este sal é reduzido pela succinato desidrogenase, presente na mitocôndria, formando um precipitado de cor púrpura, chamado formazama, quantificado por espectrofotometria. O resultado deste ensaio reflete o estado geral da mitocôndria e conseqüentemente se a célula esta ou não viável.

Em adição, a morte celular induzida por IL-1 β +IFN- γ ou TNF- α +IFN- γ foi observada por aumento de caspase-3 clivada, importante marcador de apoptose, por western blot (Fig. 5D-E). Vale notar que a ausência de ERK-1 por si só leva a um aumento de morte (Fig. 5A), o que está de acordo com a literatura que mostra função anti-apoptótica para essa proteína em células beta (35). Assim, para melhor visualização do efeito do tratamento com citocinas, consideramos os dois controles (siCT e siERK-1) com valor igual a 1, e os valores dos tratamentos com citocinas pró-inflamatórias foram corrigidos por seus respectivos controles (Figura 5B-C; 5E).

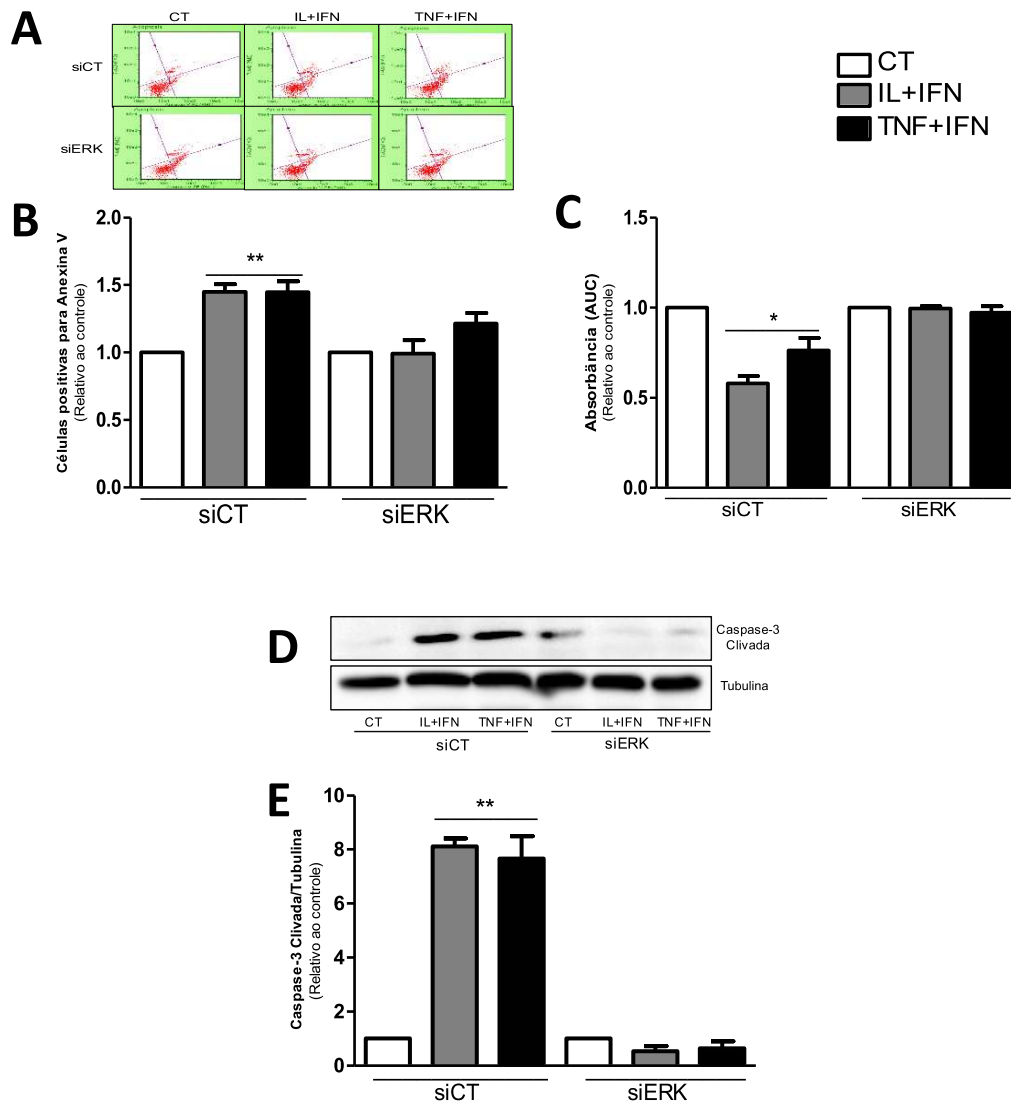


Figura 5: Silenciamento de ERK-1 previne morte celular induzida por citocinas pró-inflamatórias. Células INS-1E foram transfectadas com siRNA específico para ERK-1 (siERK-1) ou siRNA controle (siCT), ambos nas concentrações de 30nM, durante 14-15 horas. Três dias após a transfecção, as células foram tratadas com IL-1 β (500U/mL) e IFN γ (140U/mL) (barras cinzas) ou TNF- α (1600U/mL) e IFN γ (140U/mL) (barras pretas) ou deixadas sem tratamento (CT, controle, barras brancas), por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada por (A-B) citometria de fluxo: células mortas correspondem a porcentagem de células marcadas positivamente para anexina V. (A) figura representativa de 5 experimentos independentes. (C) ensaio de MTS: Quantificação do MTS convertido a formazano em células metabolicamente ativas. A medição ocorreu durante 4h a 490nm de absorbância. N=3. A apoptose foi determinada por (D-E) clivagem de caspase-3: determinada por western blot com a utilização de anticorpos específicos anti caspase-3 clivada. (D) imagem representativa de quatro experimentos independentes, (E) o gráfico corresponde a quantificação das bandas correspondentes a caspase-3 clivada corrigida pelos valores de α Tubulina. Os resultados estão apresentados em % do respectivo controle que corresponde a 1. *p<0.05, **p<0.01 vs. respectivo controle CT).

A exposição das células INS-1E por 24h a citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β +IFN γ e TNF- α +IFN- γ , resultou em uma diminuição da viabilidade dessas células. Em contraste, a ausência de ERK-1 preveniu esse efeito, normalizando os valores de apoptose aos níveis do controle (Fig. 5). Isto indica que esse mecanismo de proteção não está relacionado com a prevenção da degradação de IKK β , pois ele não ocorre no tratamento com TNF- α . Esse resultado mostra, pela primeira vez que, ERK-1 está relacionada com a morte de células beta induzida tanto por IL-1 β como por TNF- α .

- **Análise da função celular**

Para analisar a participação de ERK-1 na funcionalidade de células beta após exposição a citocinas pró-inflamatórias, quantificou-se a secreção de insulina após estímulo com 2,8mM e 16,7mM de glicose em células INS-1E, como descrito em Material e Métodos.

A Figura 6 demonstra que em baixa concentração de glicose (2,8 mM), o silenciamento de ERK-1 reduziu a secreção de insulina em células tratadas com TNF- α +IFN γ , mas não com IL-1 β +IFN γ . Na presença de 16,7 mM de glicose, a secreção do hormônio foi menor em células tratadas com IL-1 β +IFN γ quando comparado ao seu controle, independente de ERK-1. É interessante notar que, sob as mesmas condições de glicose, apenas o silenciamento desta quinase aumentou os níveis de secreção de insulina (siCT-CT vs siERK-CT), indicando uma participação inibitória de ERK-1 neste processo.

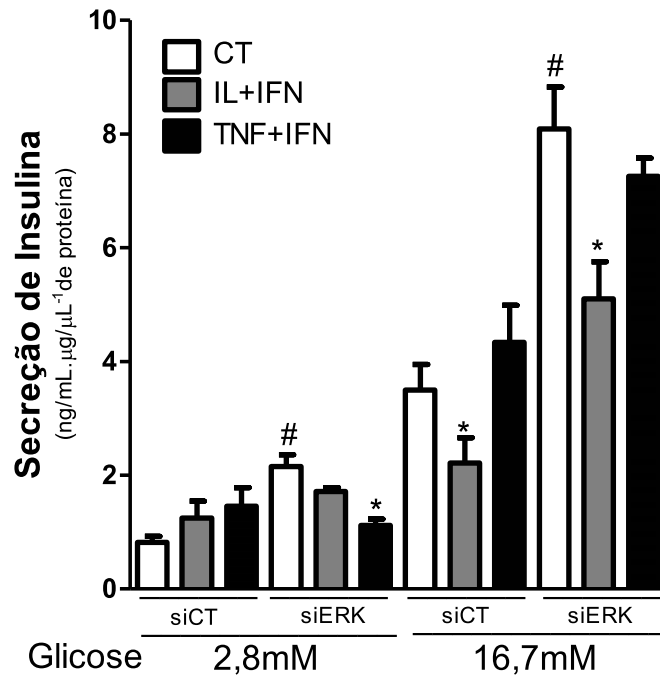


Figura 6: Secreção estática de insulina após silenciamento de ERK-1. Células INS-1E foram transfectadas com siRNA específico para ERK-1 (siERK-1) ou siRNA controle (siCT), ambos nas concentrações de 30nM, durante 14-15 horas. Três dias após a transfecção, as células foram tratadas com IL-1 β (500U/mL) e IFN γ (140U/mL) (barras cinzas) ou TNF- α (2000U/mL) e IFN γ (140U/mL) (barras pretas) ou deixadas sem tratamento (CT, controle, barras brancas), por 24horas. Em seguida, as células foram pré-incubadas em meio RPMI sem glicose por 1hora e após, incubadas em solução Krebs-bicarbonato contendo 2.8 ou 16.7mM de glicose, durante 1 hora. Após este período, o meio foi retirado para dosagem de insulina por radioimunoensaio e as células foram lisadas para quantificação proteica e normalização dos resultados. O gráfico representa a média \pm EPM para 4 experimentos independentes. * $p < 0.05$ vs respectivo controle (CT); # vs respectivo siCT-CT. Teste “t” de Student –

Os mecanismos envolvidos na regulação da atividade de ERK-1 e ERK-2 e os efeitos biológicos fundamentais destas proteínas, em células beta, ainda não foram totalmente esclarecidos. A fosforilação de ERK1/2 tem sido associada com remodelação de citoesqueleto de actina, adesão celular, secreção de insulina estimulada por glicose (56-57) e ainda, como regulador da transcrição do gene da insulina (58-59). Embora muitos trabalhos demonstrem que a fosforilação de ERK1/2 aumenta a secreção de insulina, os resultados são analisados na presença das duas isoformas, ERK1/2. Neste trabalho, avaliou-se a participação de ERK-1 somente, e estudos sugerem que, em

adição às suas funções de sobreposição, cada uma destas isoformas também podem apresentar funções únicas e distintas (60-62). Assim, talvez esta diferença encontrada em nossos resultados possa ser um indício na diferença da funcionalidade de ERK-1 e ERK-2 em células beta.

CONCLUSÃO

Diante do exposto acima, podemos concluir que:

- Células MIN-6 podem ser utilizadas para estudo do uso diferencial do complexo IKK por IL-1 β e TNF- α ;
- Pela primeira vez foi mostrado que a degradação de IKK β induzida por IL-1 β , mas não por TNF- α , é parcialmente dependente da ativação de ERK-1;
- O silenciamento da ERK-1 preveniu a morte celular induzida tanto por IL-1 β +IFN- γ quanto por TNF- α +IFN γ , indicando que essas citocinas podem regular diferencialmente vias de sinalização que induzem a morte de células INS-1E (Figura 07);
- A ERK-1 pode ter participação inibitória no processo de secreção de insulina em células INS-1E.

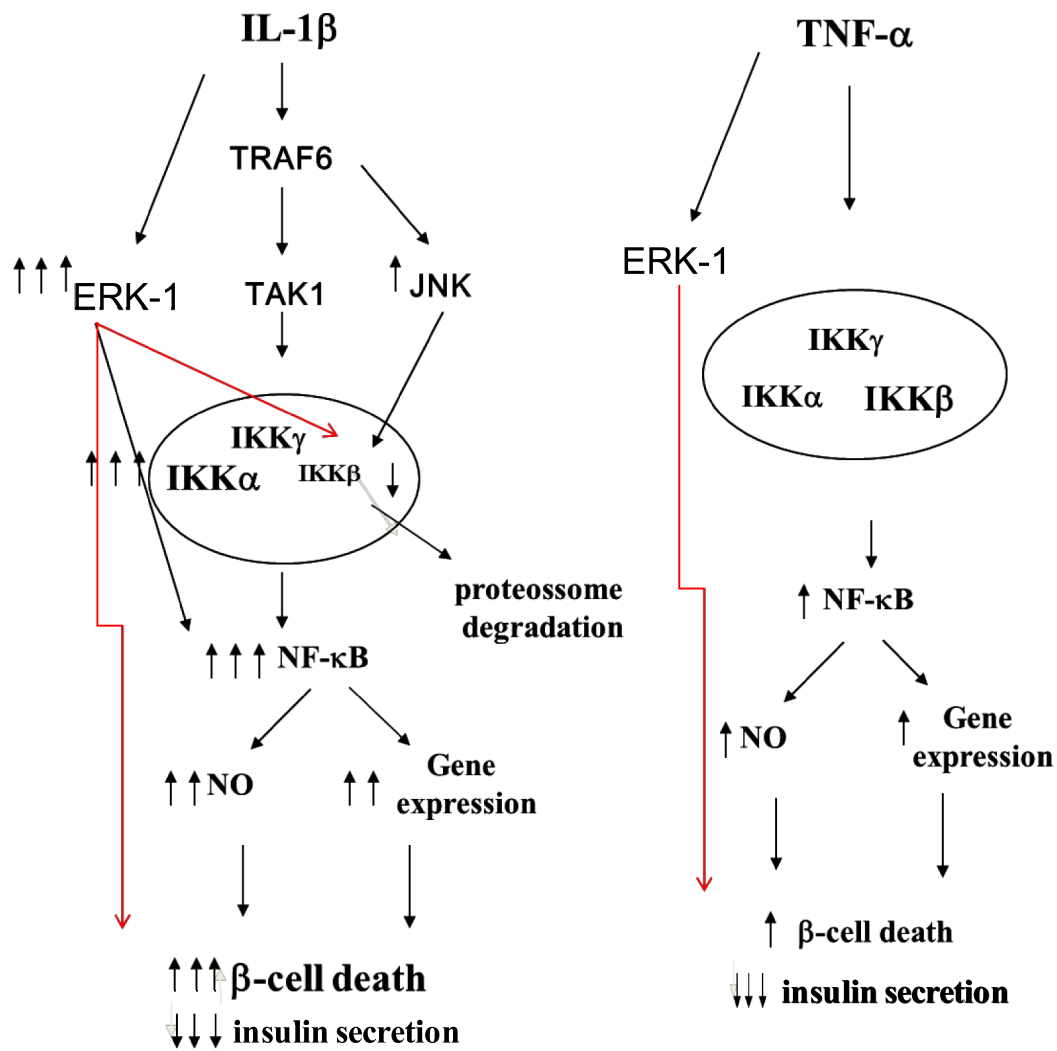


Figura 7: Resumo de vias relacionadas à ativação NF-κB induzida por citocinas pró-inflamatórias em células beta. TNF-α e IL-1β induzem a morte de células beta, através do fator de transcrição NF-κB, porém, estas citocinas agem por diferentes vias, resultando na interação de diferentes proteínas e quinases. Esta distinta ativação de NF-κB, gera diferentes respostas como maior indução pró-apoptótica de IL-1β comparado ao TNF-α. A proteína ERK-1 está envolvida na disfunção e na morte de células beta mediada tanto por e IL-1β como por TNF-α. Em vermelho as vias e proteínas que foram mostradas neste trabalho. Figura modificada da referência 23.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*. 2005 Dec;54 Suppl 2:S97-107.
2. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2006 Mar 11;367(9513):847-58.
3. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001 Dec;44(12):2115-33.
4. Kukreja A, Maclaren NK. Autoimmunity and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Dec;84(12):4371-8.
5. Klöppel G, Löhr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res*. 1985;4(2):110-25.
6. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*. 1998 Jun;14(2):129-51.
7. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 Apr;5(4):219-26.
8. Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y, Leeman R, Kutlu B, Kruhøffer M, et al. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 2001 Dec;276(52):48879-86.
9. Heimberg H, Heremans Y, Jobin C, Leemans R, Cardozo AK, Darville M, et al. Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis. *Diabetes*. 2001 Oct;50(10):2219-24.
10. Giannoukakis N, Rudert WA, Trucco M, Robbins PD. Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an Ikappa B repressor. *J Biol Chem*. 2000 Nov;275(47):36509-13.
11. Eldor R, Yeffet A, Baum K, Doviner V, Amar D, Ben-Neriah Y, et al. Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar;103(13):5072-7.
12. Ortis F, Pirot P, Naamane N, Kreins AY, Rasschaert J, Moore F, et al. Induction of nuclear factor-kappaB and its downstream genes by TNF-alpha and IL-1beta has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2008 Jul;51(7):1213-25.
13. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.
14. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004 Sep;18(18):2195-224.
15. Kuntzen C, Zazzeroni F, Pham CG, Papa S, Bubici C, Knabb JR, et al. A method for isolating pro-survival targets of NF-kappaB/Rel transcription factors. *Methods Mol Biol*. 2007;399:99-124.
16. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008 Feb;132(3):344-62.
17. Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006 Oct 17;2006(357):re13.
18. Solt LA, Madge LA, Orange JS, May MJ. Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta. *J Biol Chem*. 2007 Mar;282(12):8724-33.
19. Strnad J, Burke JR. I^BB kinase inhibitors for treating autoimmune and inflammatory disorders: potential and challenges. *Trends in pharmacological sciences*. 2007;28(3):142-8.

20. Andersen NA, Larsen CM, Mandrup-Poulsen T. TNF α and IFN γ potentiate IL-1 β induced mitogen activated protein kinase activity in rat pancreatic islets of Langerhans. *Diabetologia*. 2000 Nov;43(11):1389-96.
21. Ortis F, Cardozo AK, Crispim D, Störling J, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL. Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor-kappaB activation. *Mol Endocrinol*. 2006 Aug;20(8):1867-79.
22. Ortis F, Cardozo AK, Crispim D, Störling J, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL. Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor-kappaB activation. *Mol Endocrinol*. 2006 Aug;20(8):1867-79.
23. Ortis F, Miani M, Colli ML, Cunha DA, Gurzov EN, Allagnat F, et al. Differential usage of NF- κ B activating signals by IL-1 β and TNF- α in pancreatic beta cells. *FEBS Lett*. 2012 Apr;586(7):984-9.
24. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001 Apr;22(2):153-83.
25. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011 Mar;75(1):50-83.
26. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 1995 Jan;80(2):225-36.
27. NW. BMaC. Counting on mitogen-activated protein kinases—ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal*. 2004.;16:1345–54..
28. R. YSaS. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006.;24:1–44.
29. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, et al. MAP kinases. *Chem Rev*. 2001 Aug;101(8):2449-76.
30. J. RPaB. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004.;68:320–44..
31. Strniskova M BM, and Ravingerova T. Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes. *Gen Physiol Biophys*. 2002;21:231–55.
32. Longuet C, Broca C, Costes S, Hani EH, Bataille D, Dalle S. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology*. 2005 Feb;146(2):643-54.
33. Petersen HV, Jensen JN, Stein R, Serup P. Glucose induced MAPK signalling influences NeuroD1-mediated activation and nuclear localization. *FEBS Lett*. 2002 Sep;528(1-3):241-5.
34. Khoo S, Griffen SC, Xia Y, Baer RJ, German MS, Cobb MH. Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. 2003 Aug;278(35):32969-77.
35. Costes S, Broca C, Bertrand G, Lajoix AD, Bataille D, Bockaert J, et al. ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes*. 2006 Aug;55(8):2220-30.
36. Hayes HL ML, Schisler JC, Haldeman JM, Zhang Z, Rosenberg PB, Newgard CB, Hohmeier HE. Pdx-1 activates islet α - and β -cell proliferation via a TRPC3/6- and ERK 1/2-regulated mechanism. *Mol Cell Biol*. 2013.;10.1128/MCB.00469-13.
37. Pavlovic D, Andersen NA, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 contributes to cytokine-induced apoptosis in purified rat pancreatic beta-cells. *Eur Cytokine Netw*. 2000 Jun;11(2):267-74.
38. Cha Kyung Youn SJP, Mei Hong Li, Min Young Lee, Kun Yeong Lee, Man Jin Cha, Ok Hyeun Kim, Ho Jin You, In Youp Chang, Sang Pil Yoon and Young Jin Jeon. Radicol Inhibits

iNOS Expression in Cytokine-Stimulated Pancreatic Beta Cells. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2013.;17:315–20.

39. Larsen CM, Wadt KA, Juhl LF, Andersen HU, Karlens AE, Su MS, et al. Interleukin-1beta-induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1998 Jun;273(24):15294-300.

40. Larsen L, Størling J, Darville M, Eizirik DL, Bonny C, Billestrup N, et al. Extracellular signal-regulated kinase is essential for interleukin-1-induced and nuclear factor kappaB-mediated gene expression in insulin-producing INS-1E cells. *Diabetologia.* 2005 Dec;48(12):2582-90.

41. Ortis F, Naamane N, Flamez D, Ladriere L, Moore F, Cunha DA, et al. Cytokines Interleukin-1{beta} and Tumor Necrosis Factor-{alpha} Regulate Different Transcriptional and Alternative Splicing Networks in Primary {beta}-Cells. *Diabetes.* 2010 Feb;59(2):358-74.

42. Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, et al. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology.* 1990 Jul;127(1):126-32.

43. BARLTROP ea. "5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, Inner Salt (MTS) and Related Analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reducing to Purple water-soluble Formazans as cell-viability Indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 1991;vol. 1:611-4.

44. Scott PA, Farrell JP. Experimental cutaneous leishmaniasis. I. Nonspecific immunodepression in BALB/c mice infected with *Leishmania tropica*. *J Immunol.* 1981 Dec;127(6):2395-400.

45. Kutlu B, Cardozo AK, Darville MI, Kruhoffer M, Magnusson N, Orntoft T, et al. Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells. *Diabetes.* 2003;52(11):2701-19.

46. Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology.* 2004 Feb;145(2):667-78.

47. McClenaghan NH, Flatt PR. Engineering cultured insulin-secreting pancreatic B-cell lines. *J Mol Med (Berl).* 1999 Jan;77(1):235-43.

48. Schröfelbauer B, Polley S, Behar M, Ghosh G, Hoffmann A. NEMO Ensures Signaling Specificity of the Pleiotropic IKK² by Directing Its Kinase Activity toward I^κB[±]. *Molecular cell.* 2012;47(1):111-21.

49. Lee DF, Kuo HP, Liu M, Chou CK, Xia W, Du Y, et al. KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta. *Mol Cell.* 2009 Oct;36(1):131-40.

50. Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev.* 2006 Apr;210:171-86.

51. Chariot A. The NF-kappaB-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends Cell Biol.* 2009 Aug;19(8):404-13.

52. Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene.* 2006 Oct;25(51):6685-705.

53. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE.* 2006 Oct;2006(357):re13.

54. Inoue J, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res.* 2000 Jan;254(1):14-24.

55. May MJ, Larsen, S.E., Shim, J.H., Madge, L.A. and Ghosh, S. . A novel ubiquitin-like domain in IκB kinase b is required for functional activity of the kinase. . *J Biol Chem.* 2004.;279:45528–39.

56. Tomas A, Yermen B, Min L, Pessin JE, Halban PA. Regulation of pancreatic beta-cell insulin secretion by actin cytoskeleton remodelling: role of gelsolin and cooperation with the MAPK signalling pathway. *J Cell Sci.* 2006 May;119(Pt 10):2156-67.
57. Thurmond DC, Gonelle-Gispert C, Furukawa M, Halban PA, Pessin JE. Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex. *Mol Endocrinol.* 2003 Apr;17(4):732-42.
58. Benes C, Poitout V, Marie JC, Martin-Perez J, Roisin MP, Fagard R. Mode of regulation of the extracellular signal-regulated kinases in the pancreatic beta-cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription. *Biochem J.* 1999 May;340 (Pt 1):219-25.
59. Khoo S, Griffen SC, Xia Y, Baer RJ, German MS, Cobb MH. Regulation of Insulin Gene Transcription by ERK1 and ERK2 in Pancreatic β Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2003 August 29, 2003;278(35):32969-77.
60. Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P. Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol.* 2008 Jan;28(1):511-27.
61. Marchi M, D'Antoni A, Formentini I, Parra R, Brambilla R, Ratto GM, et al. The N-terminal domain of ERK1 accounts for the functional differences with ERK2. *PLoS One.* 2008;3(12):e3873.
62. Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R. ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J Biol.* 2006;5(5):14.