



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUCAS RODOLFO DE OLIVEIRA ROSA

A QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK) PARTICIPA DO
MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO
TAUOURSODEOIXÓLICO (TUDCA) CONTRA O ESTRESSE
DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM LINHAGEM DE
CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS INS-1E

THE FOCAL ADHESION KINASE (FAK) PARTICIPATES IN
TAUOURSODEOXYCHOLIC ACID (TUDCA)'S MECHANISM
OF ACTION AGAINST ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS
IN PANCREATIC BETA CELL LINE INS-1E

CAMPINAS

2024

LUCAS RODOLFO DE OLIVEIRA ROSA

A QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK) PARTICIPA DO MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO TAUROURSODEOIXICÓLICO (TUDCA) CONTRA O ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM LINHAGEM DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS INS-1E

THE FOCAL ADHESION KINASE (FAK) PARTICIPATES IN TAUROURSODEOXYCHOLIC ACID (TUDCA)'S MECHANISM OF ACTION AGAINST ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN PANCREATIC BETA CELL LINE INS-1E

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Molecular e Morfofuncional, na área de Fisiologia.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of PhD in Molecular and Morphofunctional Biology, in the field of Physiology.

Orientador: Helena Cristina de Lima Barbosa

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO LUCAS RODOLFO DE OLIVEIRA ROSA E ORIENTADA PELA PROFESSORA DOUTORA HELENA CRISTINA DE LIMA BARBOSA.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gilberto Martins Vicentin - CRB 8/8620

R71q Rosa, Lucas Rodolfo de Oliveira, 1994-
A quinase de adesão focal (FAK) participa do mecanismo de ação do ácido tauroursodeoxicolico (TUDCA) contra o estresse de retículo endoplasmático em linhagem de células beta pancreáticas INS-1E / Lucas Rodolfo de Oliveira Rosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Helena Cristina de Lima Barbosa.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Diabetes Mellitus. 2. Estresse do retículo endoplasmático. 3. Ácido tauroursodeoxicolico. I. Barbosa, Helena Cristina de Lima, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: The focal adhesion kinase (FAK) participates in tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)'s mechanism of action against endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cell line INS-1E

Palavras-chave em inglês:

Diabetes Mellitus

Endoplasmic reticulum stress

Tauroursodeoxycholic acid

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Molecular e Morfofuncional

Banca examinadora:

Helena Cristina de Lima Barbosa [Orientador]

Jane Cristina de Souza

Letícia Ignácio de Souza Zimmermann

Fernanda Ortis

Jean Franciesco Vettorazzi

Data de defesa: 19-07-2024

Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Morfofuncional

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8757-6165>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/8092287707261331>

Campinas, 19/07/2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Professora Doutora Helena Cristina de Lima Barbosa

Professora Dra. Jane Cristina de Souza

Professora Dra. Letícia Ignácio de Souza Zimmermann

Professora Dra. Fernanda Ortis

Professor Doutor Jean Franciesco Vettorazzi

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 Pós-Graduação em Biologia Molecular e Morfofuncional da Unidade Instituto de Biologia, UNICAMP.

DEDICATÓRIA

À pessoa mais importante: Eu. Que essa tese seja uma lembrança das lições aprendidas, dentro e principalmente fora do laboratório.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao apoio dos meus pais, familiares e amigos pelo apoio constante nos momentos bons e ruins, bem como de minha orientadora, Prof^a Helena Cristina de Lima Barbosa pela orientação ímpar que me concedeu nesses últimos 6 anos. Por fim, gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades (OCRC) e pela concessão de minha bolsa de Doutorado, e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio ao instituto e ao programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Este trabalho foi agraciado com o apoio financeiro do auxílio nº 2019/23951-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

RESUMO

O *diabetes mellitus* é um dos grandes problemas modernos de saúde pública no mundo; a busca por novas terapias ou adjuvantes que possam ajudar no seu controle é essencial. Entre os muitos fatores envolvidos na progressão da doença, o estresse de RE é de grande relevância na progressão da disfunção das células beta pancreáticas. O TUDCA é capaz de minimizar este estresse, mas seus mecanismos de ação ainda não são completamente compreendidos. Neste trabalho, estudamos o possível papel da FAK, uma proteína de adesão focal, nesse mecanismo. Realizamos os experimentos em linhagem de célula beta INS-1E que foram divididas em três grupos: submetidas a nenhum tratamento (Controle), ao Palmitato (0.5mM/24h) ou ao Palmitato + TUDCA (100µM/24h). Submetemos estas células adicionalmente ao *knockdown* da FAK por siRNA específico ou inibidor farmacológico Y15, bem como à incubação com inibidores específicos para os três principais receptores do TUDCA: $\alpha 5\beta 1$ -integrina, TGR5 e S1PR2. O TUDCA se mostrou capaz de minimizar o estresse de RE nessas células, reduzindo o conteúdo proteico de um marcador de estresse de RE, o ATF4, quando comparados ao grupo que foi exposto apenas ao palmitato. Essa capacidade, porém, foi perdida quando células foram submetidas ao *knockdown* da FAK ou aos inibidores dos três receptores. Além disso, o palmitato levou a um aumento da secreção de insulina, o que foi normalizado pelo tratamento com TUDCA, no entanto em condição de *knockdown* da FAK essa capacidade de normalizar a secreção foi abolida. Portanto, nossos resultados indicam que a FAK parece ser um elemento importante do mecanismo de ação do TUDCA em mitigar o estresse de RE e promover a normalização da secreção de insulina em células beta pancreáticas, com a FAK possivelmente agindo como um elemento comum pelo qual os três receptores convergem. Essa melhor compreensão acerca dos efeitos do TUDCA pode ajudar a viabilizar novas perspectivas de tratamento contra a disfunção de célula beta pancreáticas.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is one of the great modern public health challenges in the world; the search for new therapies or adjuvants that can help control it is essential. Amidst the many factors involved in the progression of the disease, endoplasmic reticulum stress is of great relevance in the progression of the dysfunction of pancreatic beta cells. TUDCA is capable of minimizing that stress, but its mechanisms of action are not still fully understood. In this work, we studied the possible role of FAK, a focal adhesion protein, in this mechanism. We performed our experiments in INS-1E pancreatic beta cell line, divided in three groups: Those subjected to no treatment (Control), exposed to Palmitate (0.5mM/24h) or Palmitate + TUDCA (100μM/24h). We subjected these cells additionally to *knockdown* of FAK by specific siRNA or Y15 pharmacological inhibitor, as well as incubation with inhibitors for the three TUDCA receptors: α5β1-integrin, TGR5 and S1PR2. TUDCA was capable of minimizing endoplasmic reticulum stress in these cells, reducing the protein content of a stress marker, ATF4, when compared to the groups exposed solely to Palmitate. This capacity, however, was lost when cells were subjected to *knockdown* of FAK, or the inhibitors of the three receptors. Besides that, Palmitate led to an increase in insulin secretion, which was normalized by TUDCA treatment; however, in the condition of FAK *knockdown*, this ability was abolished. Therefore, our results indicate that FAK seems to be an important element of the mechanism of action of TUDCA in mitigating endoplasmic reticulum stress and promoting the normalization of insulin secretion in pancreatic beta cells, with FAK possibly acting as a common element through which signaling of all three receptors converge. This better comprehension of TUDCA effects can help make viable new perspectives of treatment against pancreatic beta cell dysfunction.

ÍNDICE DE LEGENDAS

ATF4 – *Activating Transcription Factor 4*

ATF6 – *Activating Transcription Factor 6*

BiP – *Binding immunoglobulin protein*

CHOP – *C/EBP Homologous Protein*

eIF2 α – *Eukaryotic translation initiation factor 2alpha*

ERK1/2 – *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*

FAK – *Focal Adhesion Kinase, Quinase de Adesão Focal*

FAT – *Focal Adhesion Targeting*

IRE1 – *Inositol-requiring enzyme 1*

JNK – *C-Jun N-terminal Kinase*

PERK – *Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase*

PI3K - *Phosphoinositide 3-kinases*

RE/ER – *Retículo Endoplasmático/Endoplasmic Reticulum*

S1PR2 – *Sphingosine-1-phosphate receptor 2*

TGR5 – *G-protein-coupled bile acid receptor*

TUDCA – *Tauroursodeoxycholic Acid, Ácido Tauroursodeoxicólico*

UPR – *Unfolded Protein Response, Resposta da Proteína Mal Enovelada*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1. Cultura de células INS-1E	17
2.2 Inibição da expressão da FAK por <i>siRNA</i>	17
2.3 Inibidores Farmacológicos.....	17
2.4 Western Blotting	18
2.5 PCR Quantitativo Relativo	18
2.6 HO-PI	19
2.7 Estresse Oxidativo por sonda DHE	19
2.8 Secreção Estática de Insulina	19
2.9 Análise Estatística	19
3. RESULTADOS	20
3.1. TUDCA é Capaz de Mitigar a Expressão de Marcadores de Estresse de RE Induzidos por Palmitato em Células INS1-E, Mas Não é Capaz de Prevenir sua Apoptose	20
3.2 O <i>Knockdown</i> da FAK Perturba a Ação do TUDCA Sobre o Estresse de RE em Células INS1-E	21
3.3 Inibição do Receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina Perturba a Ação do TUDCA sobre o Estresse de RE	27
3.4 A Inibição dos receptores TGR5 ou S1PR2 Perturba a Capacidade do TUDCA em Mitigar o Estresse de RE, e a Capacidade do TUDCA em Fosforilar a FAK.....	29
3.5 TUDCA É Capaz de Normalizar Alterações na Secreção de Insulina Induzidas pelo Palmitato, mas Essa Capacidade é Perdida com o <i>knockdown</i> da FAK	31
4. DISCUSSÃO.....	33
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS	38
7. ANEXOS.....	41

1. Introdução

O *diabetes mellitus* é um dos grandes desafios de saúde pública do mundo moderno. A doença afeta aproximadamente 9,3% da população global [1], gerando gastos na esfera pública e privada, além de comprometer significativamente a qualidade de vida dos indivíduos afetados. Além disso, há expectativa de crescimento dessa prevalência projetada tanto para 2030 e 2045 [1]. Portanto, o esforço em compreender a fisiopatologia da doença e buscar por novos tratamentos ou adjuvantes terapêuticos é de grande interesse público.

O diabetes é uma doença multifatorial, e complexa tanto em termos de origem quanto de progressão. O *diabetes mellitus* possui dois principais tipos, ainda que não os únicos. O *diabetes mellitus* tipo 1 é compreendido como uma doença autoimune, que resulta na destruição significativa de células beta pancreáticas, responsáveis pela produção e liberação de insulina [2], apesar de fatores ambientais também serem discutidos na sua patogênese. O *diabetes mellitus* tipo 2, por sua vez, tem uma fisiopatologia que envolve tanto fatores genéticos quanto ambientais, mas que podem ser resumidos a dois pilares sinérgicos: o comprometimento da capacidade do pâncreas em secretar insulina (processo conhecido como disfunção de células beta pancreáticas), e o comprometimento da capacidade dos tecidos periféricos utilizarem corretamente a insulina produzida (processo conhecido como resistência à insulina) [3].

A disfunção de células beta pancreáticas é, por si só, outro assunto complexo. Ela envolve comprometimentos funcionais que podem ser induzidos por uma miríade de fatores que resultam em uma redução ou perda da capacidade normal de produção de insulina dessas células, bem como a perda de massa total dessas células através de sua morte [4]. Inflamação e estresse oxidativo são elementos clássicos que promovem essa disfunção [4], mas não os únicos.

O estresse de retículo endoplasmático (RE) também se destaca como um elemento importante da progressão da disfunção de células beta pancreáticas no *diabetes mellitus*. Primeiramente, o funcionamento adequado do retículo endoplasmático é essencial para a síntese correta da insulina, uma vez que é onde a pré-proinsulina é processada [5]. Além disso, o estresse de retículo tem há muito tempo sido estudado devido à sua relação com a manutenção da saúde celular [6]. Diversas condições do metabolismo celular podem levar ao seu surgimento, seja através de um aumento da demanda de enovelamento de proteínas no retículo, ou pelo comprometimento da sua capacidade, mas o resultado eventualmente é o mesmo: um acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen da organela [6].

Esse acúmulo deflagra a chamada Resposta a Proteínas Mal Enoveladas (conhecida pela sigla em inglês *UPR*, *Unfolded Protein Response*). A UPR, inicialmente, auxilia a célula a lidar com o estresse e retornar à uma situação de normalidade; porém, se mantida de maneira crônica ou exacerbada, esta mesma resposta deflagra a ação de elementos pró-apoptóticos, direcionando a célula para a morte [7]. Assim, a UPR – e por consequência, o estresse de retículo em si – contribuem para a disfunção de células beta pancreáticas e, portanto, para a progressão do diabetes [7].

A UPR possui três ramos principais – os ramos da PERK, IRE1 e ATF6 (Figura Suplementar 1) [8]. O ramo da PERK leva à uma redução da tradução proteica, dando um “descanso” para o retículo endoplasmático, mediado pela fosforilação da eIF2 α [9]. A ativação da IRE1 promove a degradação de RNAm, também contribuindo para que o retículo tenha uma demanda menor de trabalho enquanto lida com o estresse, além de promover o *splicing* da XBP1, gerando a XBP1s que atua como um fator de transcrição, promovendo a transcrição de genes que favorecem a capacidade do RE desempenhar suas funções [7]. O ATF6, por fim, é translocado ao complexo de golgi e clivado, gerando um fator de transcrição que leva à um aumento da produção de chaperonas, visando auxiliar o retículo a aumentar sua capacidade de lidar com a carga de proteínas a serem corretamente enoveladas e processadas [7]. Porém, a permanência dessas respostas pode levar à morte celular; a ativação contínua do ramo da PERK resulta na produção de CHOP, importante fator pró-apoptótico. A IRE1, por sua vez, é capaz de ativar a JNK, que também ativa vias de morte celular [7].

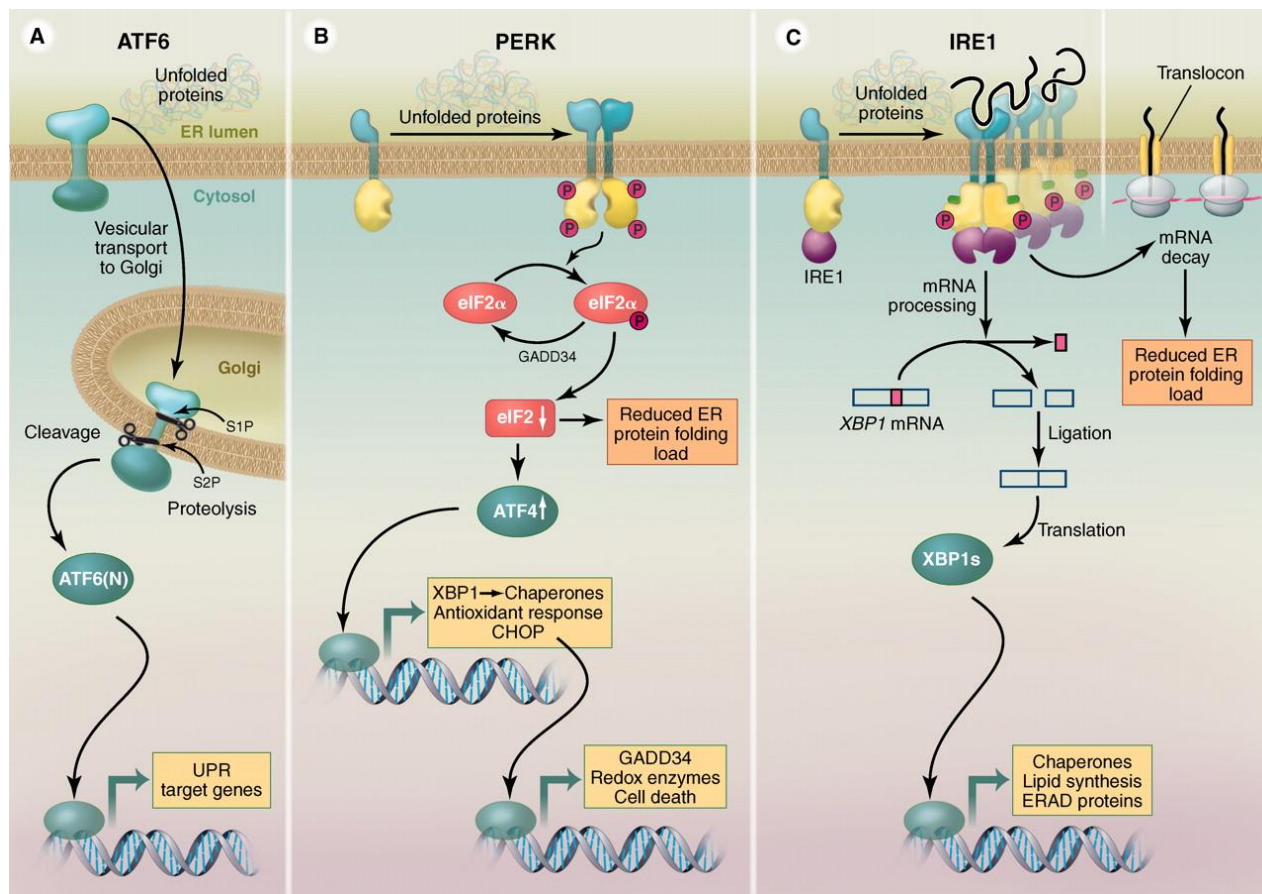


Figura Suplementar 1. Ilustração dos três braços da UPR e suas consequências. Ramos são iniciados pela dissociação da ligação da BiP com os fatores de iniciação Atf6, PERK e IRE1. O ramo da ATF6 consiste em sua internalização, clivagem no complexo de golgi, resultando em um fragmento capaz de agir como fator de transcrição. O ramo da PERK envolve sua dimerização e fosforilação, que leva à fosforilação de p $eIF2\alpha$ e subsequente produção de ATF4, transcrição gênica e produção de CHOP. O ramo da IRE1 também envolve dimerização e fosforilação, levando ao processamento do RNA da XBP1 e produção da XBP1s, capaz de modular a transcrição de diversos genes envolvidos na resposta. Créditos da figura: [8]

Portanto, substâncias capazes de intervir sobre o estresse de RE tem despertado interesse como possíveis adjuvantes terapêuticos. Uma que tem se destacado nesse sentido é o Ácido Tauroursodeoxicólico (TUDCA). A capacidade do TUDCA em minimizar o estresse de retículo já foi amplamente documentada na literatura, e em diversos tipos celulares [10, 11] bem como em estudos *in vivo* [12]. Crucialmente, já foi demonstrado que o TUDCA é capaz de reduzir o estresse de RE em células beta pancreáticas [13, 14], e trazer benefícios funcionais, preservando sua capacidade de secretar insulina [14], bem como promover a sobrevivência dessas células como decorrência desse efeito [13].

Porém, ainda há muitas questões em aberto sobre os mecanismos de sinalização envolvidos na ação do TUDCA. Recentemente, revisamos o assunto em um artigo que aborda o papel dos receptores do TUDCA na célula beta pancreática [15]. O TUDCA age através de três receptores principais – TGR5, S1PR2, e $\alpha5\beta1$ -integrina. Existem evidências escassas de

que uma interação com o receptor intracelular FXR também seja possível, mas os mecanismos dessa interação, e se ela é tecido-específica ou universal, ainda não estão totalmente elucidados [15]. Os receptores do TUDCA ainda são muito pouco estudados, principalmente na célula beta, especificamente; das evidências atualmente disponíveis, o TGR5 parece ter uma importância principalmente para a secreção de insulina [15]. O receptor S1PR2, por sua vez, possui um efeito curioso e até mesmo um tanto paradoxal, pois a literatura aponta que sua inibição tem resultados anti-apoptóticos [15]. Por fim, receptores de β 1-integrina, no geral, são muito importantes para a função da célula beta pancreática, e para a sua sobrevivência, mas há uma carência de estudos sobre os receptores α 5 β 1 especificamente, ou sobre a interação do TUDCA com eles na célula beta [15]. α 5 β 1-integrinas são particularmente interessantes dentro deste assunto pois sua interação é, até onde se descobriu até o momento, específica para o TUDCA, e não para ácidos biliares em geral como é o caso dos receptores TGR5 e S1PR2 [16]. Um estudo em hepatócitos indicou que a internalização do TUDCA talvez seja necessária para sua ativação, mas essa possibilidade ainda precisa ser mais estudada [15]. Esses receptores compartilham diversos elementos *downstream* em comum, como as vias da ERK1/2 e a via da Akt, que possuem papéis bem documentados na função e sobrevivência de células beta pancreáticas [15]

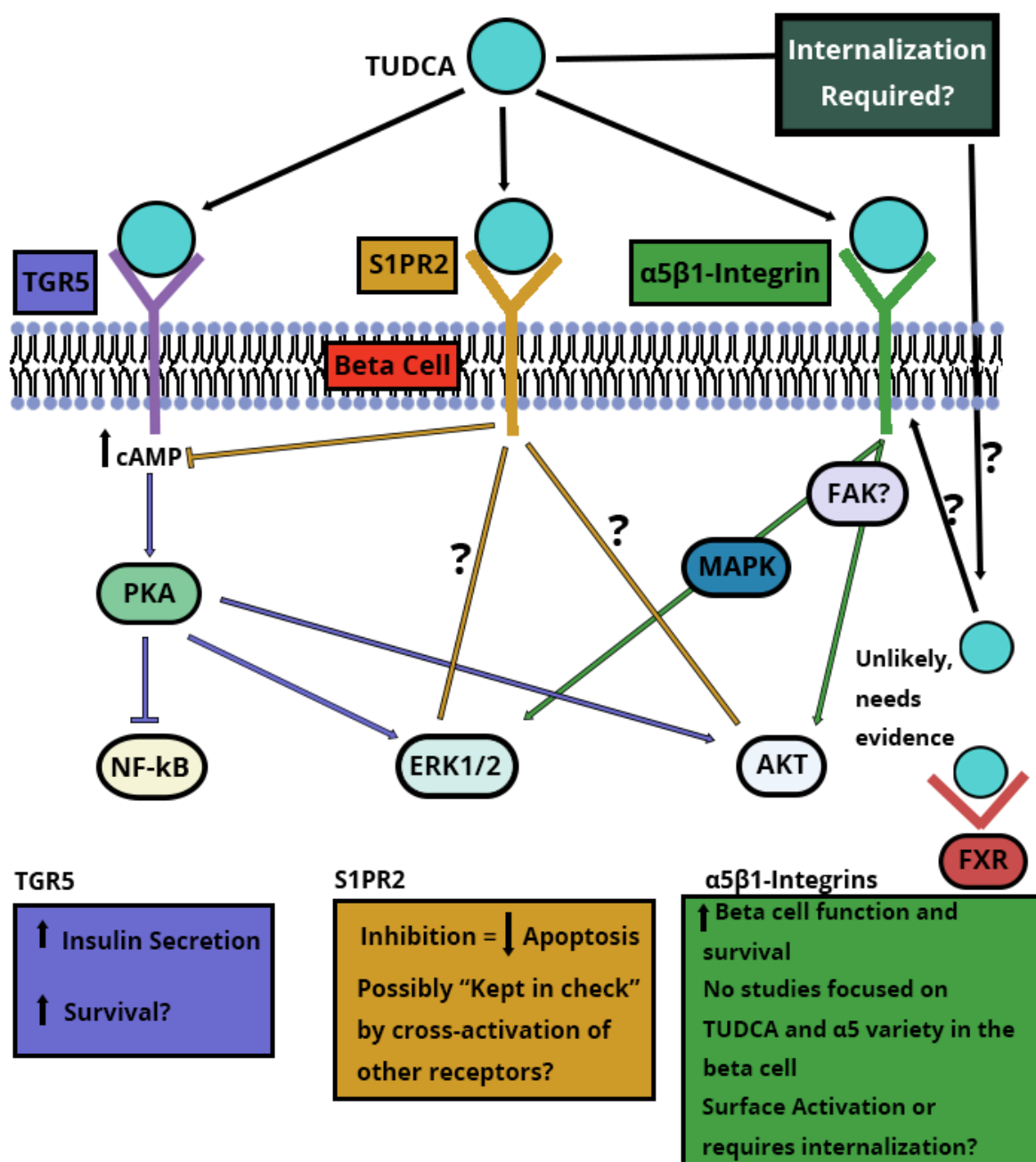


Figura Suplementar 2. Ilustração dos receptores do TUDCA e suas principais funções e vias de sinalização na célula beta pancreática. TUDCA age majoritariamente através dos receptores TGR5, S1PR2 e $\alpha 5 \beta 1$ -integrina. Na célula beta pancreática, o TGR5 parece ter uma importante função na secreção de insulina. A inibição do receptor S1PR2 parece ser positiva para a sobrevivência celular. E o $\alpha 5 \beta 1$ -integrina ainda precisa ser estudado, mas sabe-se que $\beta 1$ -integrinas são essenciais para a sobrevivência e função de células beta pancreáticas. Créditos da figura: [15]

No esforço de entender melhor a sinalização do TUDCA, o passo natural é observar elementos *downstream* – comprovados ou supostos – desses receptores. E, nesse sentido, voltamos nossa atenção e interesse para a Quinase de Adesão Focal (FAK). A FAK é uma tirosina quinase, e é a efetora imediata de receptores de integrina (como o mencionado $\alpha 5 \beta 1$), com um papel central na adesão celular – processo essencial para o funcionamento de vários

tecidos do organismo [17]. Estruturalmente, a FAK possui um domínio FERM em sua porção n-terminal, um domínio quinase no centro de sua estrutura, e um domínio não quinase composto de duas regiões ricas em prolina e uma região C-terminal de ligação com adesões focais [18]. Após ativação de receptores de integrina, a FAK é autofosforilada em seu resíduo tirosina 397 (tyr397); esse processo permite a ligação de proteínas com um domínio SH2, como as Src quinases [18]. Este processo também permite a interação da PI3K com a FAK. A ligação da Src cria um complexo FAK-Src Quinase que interage com diversos efetores *downstream* [18]. A src também fosforila outros sítios da FAK, como os resíduos Tyr576 e Tyr577 do domínio quinase da FAK, aumentando sua atividade catalítica [19]. O domínio não quinase, especificamente a região FAT (*Focal Adhesion Targeting*), é responsável por localizar e direcionar a FAK para regiões de adesão focal dentro da célula. [19]. Um mutante natural da FAK funcional é composto por apenas esse domínio, sem a região quinase; ele é expresso por um promotor gênico específico, e regula a atividade da FAK ao competir com a versão funcional pela localização em regiões de adesão focal [19].

Já é fato bem estabelecido que a FAK possui papel importante na secreção de insulina; estudos de 2012 já indicavam um aumento da fosforilação da mesma em células beta estimuladas por glicose, e que sua inibição prejudica a secreção de insulina [20]. Crucialmente, a FAK coordena diversos elementos do citoesqueleto para possibilitar a secreção de insulina após estímulo de glicose [21]. Por exemplo, a fusão de grânulos de insulina à membrana – processo necessário para sua exocitose – é ativado por sinalização via integrinas, e a FAK é apontada como uma “reguladora mestre” desse processo de posicionamento dos elementos necessários para a secreção ocorrer [21].

Considerando que o TUDCA interage com um receptor de integrina, e que esses receptores sinalizam via FAK, seria de se esperar que existissem estudos associando os dois elementos. E, de fato, existem evidências do TUDCA levando à fosforilação da FAK e efeitos *downstream* em hepatócitos [22], mas não, ao nosso conhecimento, em células beta pancreáticas. Outra evidência teórica de uma possível relação entre estes dois elementos são as vias de sinalização que compartilham; a FAK também possui importante relação com a ativação das vias da ERK1/2 [23] e da Akt [24], por exemplo, que como mencionado anteriormente são vias importantes pelas quais o TUDCA parece agir.

Assim, decidimos estudar o possível papel da FAK e do receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina no mecanismo de ação do TUDCA em células beta pancreáticas, buscando entender qual impacto sua inibição teria sobre a capacidade do TUDCA em melhorar o estado destas células frente a um quadro de estresse de RE, para compreender melhor o funcionamento do TUDCA como possível adjuvante terapêutico. Nossos resultados indicaram que o *knockdown*

da FAK, e a inibição do receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina, resultaram em uma perturbação da capacidade do TUDCA em mitigar a indução do estresse de RE pela exposição ao palmitato *in vitro*, apontando para um papel desses elementos no mecanismo de ação do TUDCA na célula beta pancreática.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultura de células INS-1E

Linhagens de células beta de rato, INS-1E, gentilmente cedidos pelo Prof Dr Wolheim (Center Medical Universitaire, Geneva, Switzerland), foram mantidas em cultura (37°C, 5% CO₂), em meio RPMI-1640 (Corning) contendo 11 mM de glicose e suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de piruvato de sódio e 50 µmol/ml de mercaptoetanol. Células foram divididas em quatro grupos de tratamento: Controle (C), submetidas apenas à tratamento com veículo quando apropriado; Palmitato (P) tratadas com 0,5 mM de Palmitato por 24h; e Palmitato + TUDCA (T), tratadas com tratadas com 0,5 mM de Palmitato e 100 µM de TUDCA por 24h. Células foram coletadas em Laemmli (composto de Tris HCL 1M, SDS, glicerol, beta-mercaptoetanol, bromofenol e água miliQ) e o extrato foi utilizado para realização dos experimentos.

2.2 Inibição da expressão da FAK por siRNA

Células INS-1E foram semeadas em placas com 96 ou 24 poços, dependendo do experimento. Quando a confluência adequada foi atingida, seguiu-se a transfecção utilizando a Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. Foram utilizados 100 nM de siRNA (Dharmacon) por poço, contendo 4 sequências contra a FAK. O volume final de transfecção por poço foi de 100 ou 250 µl de meio de cultivo, dependendo da placa (Optmem + RPMI 1640 com 10% FBS). No dia seguinte, o meio foi retirado e substituído por volume habitual de meio RPMI 1640; as células descansaram por 24h, então foram coletadas (dependendo do experimento) ou tratadas conforme descrito acima. As células foram avaliadas quanto à eficiência da inibição da FAK bem como da modulação das proteínas da UPR através de Western Blotting, após 36 h da transfecção.

2.3 Inibidores Farmacológicos

Nos experimentos aplicáveis, inibidores farmacológicos para a FAK (Y15, SML0837 – Sigma Aldrich) e para os receptores $\alpha 5\beta 1$ -integrina (ATN-161, SML2079, Sigma Aldrich), TGR5 (NF449, 480420-10MG, Sigma Aldrich) e S1PR2 (JTE-013, J4080-5MG, Sigma Aldrich) foram acrescentados diretamente ao meio de cultura RPMI 1640 (ou diluído em

DMSO, no caso do JTE-013) na concentração de 10 μ M por 24h em adição aos tratamentos previamente mencionados.

2.4 Western Blotting

Extratos proteicos de células INS-1E tratadas com os tratamentos delineados acima foram coletadas em Tampão de Laemmli contendo DTT e incubadas a 100°C por 5 min e aplicadas em gel para eletroforese. Após a eletroforese, as amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF (BioRad) com tampão de transferência. Após bloqueio (5% de albumina bovina) as proteínas de interesse foram detectadas com anticorpo específico, 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 do controle interno Tubulina ou GAPDH. Anticorpos: pFAK – Santa Cruz, SC-11765; Thermo Fischer, 44625G; FAK total – Santa Cruz, SC-558; ATF4 - Cell Signaling, CS-11815; p $\text{eIF2}\alpha$ - Santa Cruz, SC-12412; BiP - Santa Cruz, SC-13968; PDX1 – Cell Signaling, D59H3; Bax – Cell Signaling, #2772; GAPDH – Cell Signaling, 14C10, Tubulina – Santa Cruz, SC-5286.

2.5 PCR Quantitativo Relativo

Foi realizada a extração de RNA das células INS-1E tratadas com veículo, Palmitato ou Palmitato + TUDCA, transfectadas com siRNA ou não, submetidas aos inibidores farmacológicos ou não, conforme apropriado. As amostras de RNA das células foram obtidas através do uso do kit RNeasy (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante. O RNA obtido foi convertido em cDNA utilizando-se o kit High Capacity (Applied Biosystems), de acordo com manual do fabricante. Em seguida, 2,0 μ L o cDNA foi aplicado em placa de 96 poços, bem como SYBR green mix (Applied Biosystems), de modo a obter a quantificação relativa de cDNA ao final do PCR quantitativo. A amplificação foi ainda normalizada pelo controle interno HPRT, e a expressão gênica relativa foi determinada utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ [25]. As reações foram realizadas de acordo com o manual do fabricante (Fast 7500, Applied Biosystems). Primers: ATF4 (F: GTTGGTCAGTGCCTCAGACA; R: CATTCGAAACAGAGCATCGA), INS2 (F: ATCCTCTGGGAGCCCCGC; R: AGAGAGCTTCCACCAAG), HPRT (F: TCCTCATGGACTGATTATGGACA; R: TAATCCAGCAGGTCAGCAAAGA).

2.6 HO-PI

Para avaliar a sobrevivência das células INS-1E tratadas com TUDCA, as células foram expostas aos tratamentos delineados anteriormente. Após o tratamento, as células foram incubadas por 15 minutos com 1 mg/ml de Hoechst 33342 (HO) e 1 mg/ml de Iodeto de Propídio (PI) e a leitura e análise da placa foi realizada pelo ImageXpress Micro Confocal High-Content Imaging System – Molecular Devices.

2.7 Estresse Oxidativo por sonda DHE

Placas contendo células INS-1E foram submetidas aos tratamentos previamente delineados, e incubadas com 10 μ M de sonda *dihydroethidium* (DHE) em solução de Krebs-bicarbonato (KBR; (in mmol/L) 115 NaCl, 5 KCl, 2.56 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 NaHCO₃, 15 HEPES), suplementado com 0.3% BSA, equilibrada com uma mistura 95% O₂/5% CO₂, pH 7.4; a incubação foi realizada por 30 minutos a 37°C. Amostras foram lidas em espectrofotômetro em excitação 518 nm e emissão 606 nm. A quantificação de células totais foi utilizada para normalização do resultado, que foi obtida através de incubação das células com solução de 1:1000 Hoescht diluído em PBS, a leitura foi realizada nos espectros excitação 350 nm e emissão 461 nm.

2.8 Secreção Estática de Insulina

Células INS-1E foram submetidas aos tratamentos previamente delineados, e foram incubadas por 1h em solução de Krebs-bicarbonato (KBR; (in mmol/L) 115 NaCl, 5 KCl, 2.56 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 NaHCO₃, 15 HEPES), suplementado com 0.3% BSA, equilibrada com uma mistura 95% O₂/5% CO₂, pH 7.4, sem glicose. Após este período de pré-incubação, foram tratadas com solução Krebs-bicarbonato suplementada com 2.8 ou 22.2 mM de glicose. Após 1h de incubação, solução foi armazenada em -20°C até utilização para quantificação por kit de ELISA conforme instruções do fabricante (EZRMI-13K, Merck Milipore).

2.9 Análise Estatística

Foram utilizados o teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey para avaliação de experimentos envolvendo três ou mais grupos, e teste T-Student para a comparação de dois grupos. Os testes utilizados estão indicados na legenda das figuras. Foram considerados significativos resultados com $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. TUDCA é Capaz de Mitigar a Expressão de Marcadores de Estresse de RE Induzidos por Palmitato em Células INS1-E, Mas Não é Capaz de Prevenir sua Apoptose

Realizamos a técnica de HOPI para investigar a capacidade do TUDCA em minimizar a apoptose das células INS-1E. Em nossas condições experimentais, observamos que o TUDCA não foi capaz de minimizar a apoptose em células expostas ao palmitato (Fig. 1B, 1C). Um achado interessante, porém, foi o do impacto do *knockdown* da FAK sobre a apoptose; quando inibimos a FAK através do uso de um *siRNA* específico (SiF), observamos um aumento significativo da apoptose (Figura 1C), reforçando o papel da FAK na sobrevivência de células beta pancreáticas conforme já reportado.

Nos dedicamos então a entender melhor os mecanismos envolvidos nesta apoptose e possíveis efeitos do TUDCA. Uma avaliação de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) revelou que não houve aumento desta produção pela exposição ao palmitato em nosso modelo experimental, e o tratamento com TUDCA também não levou a alterações relevantes neste parâmetro (Figura 1D).

Avaliamos, então, marcadores de estresse de RE. O tratamento com palmitato (grupo P) aumentou significativamente ($p < 0.05$) o conteúdo proteico de ATF4 (Fig. 1E) e de p $\text{eIF}2\alpha$ (Fig. 1F). Nos grupos T, observamos que o conteúdo de ATF4 foi normalizado, retornando a valores significativamente menores do que no grupo P, e semelhantes ao grupo C. O tratamento concomitante com TUDCA junto do palmitato não foi capaz de reduzir significativamente o conteúdo de p $\text{eIF}2\alpha$, em comparação com o grupo P, apresentando apenas uma tendência não significativa à redução. Porém, também não apresentou um aumento significativo em comparação ao grupo C, apesar da exposição ao palmitato no grupo. Considerando ambos os marcadores juntos, concluímos que o palmitato foi eficaz em induzir o estresse de RE, e o tratamento concomitante com TUDCA foi capaz de mitigá-lo, em nossas condições experimentais.

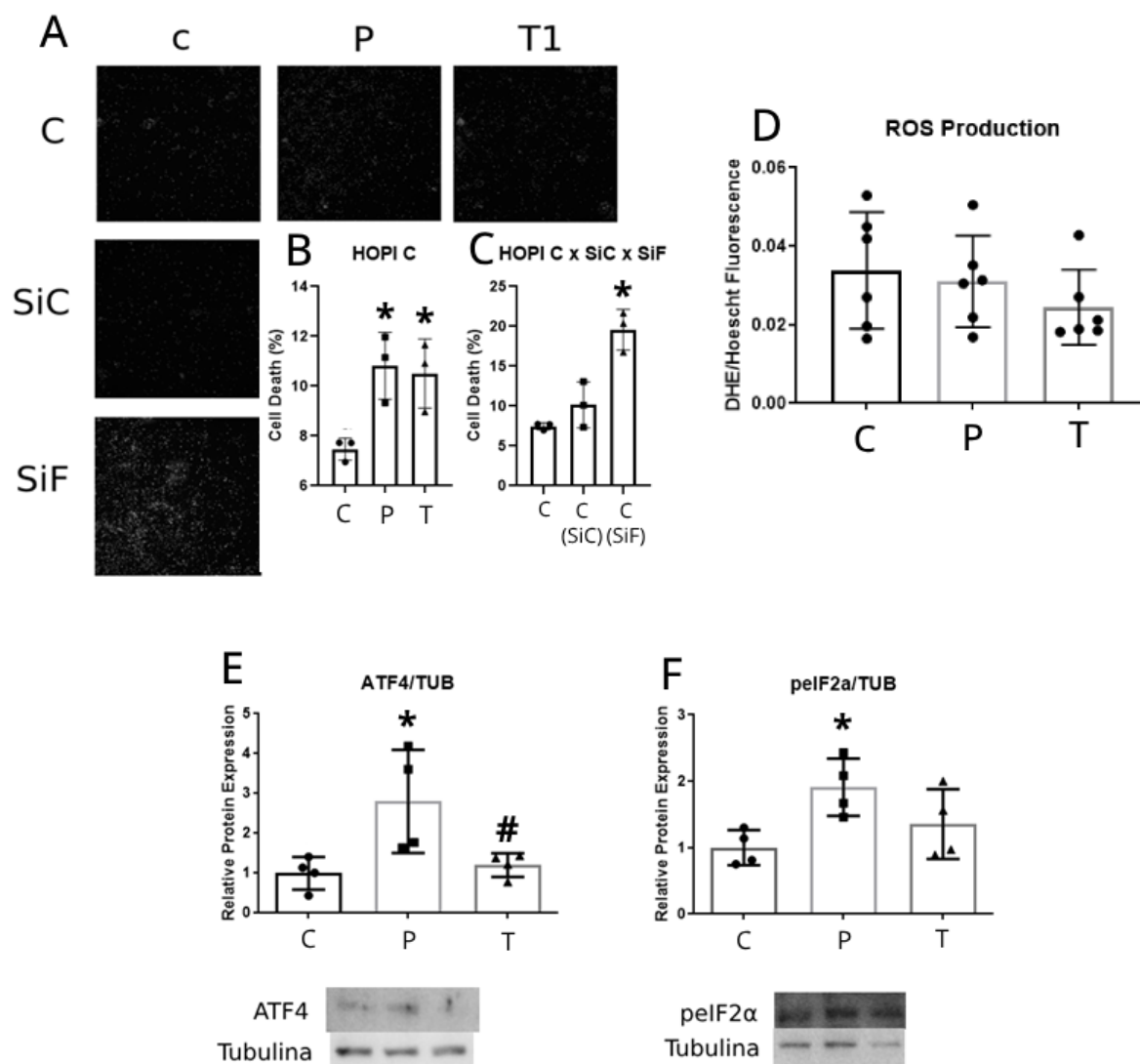


Figura 1. Análise de Apoptose e Sobrevivência, Estresse Oxidativo, e Estresse de Retículo em Células Beta INS-1E Expostas ao Palmitato e Tratadas com TUDCA. Análise de apoptose por HOPI (A-C), Estresse Oxidativo por sonda DHE (D), análise da expressão proteica de marcadores de estresse de retículo por Western-Blot (E, F). Grupos: C = Controle; P = Palmitato (0,5 mM); T = Palmitato (0,5 mM) + TUDCA (100 µM). Resultados apresentados como média dos grupos $\pm$ desvio padrão. Estatística realizada por One-Way ANOVA. * = Diferença estatisticamente significativa vs Grupo C ($p < 0,05$); # = Diferença estatisticamente significativa vs Grupo P ($p < 0,05$). N experimental variável por experimento (3-6). SiC = tratamento com siRNA controle, *scramble*; SiF = *Knockdown* da FAK por tratamento com siRNA.

3.2 O *Knockdown* da FAK Perturba a Ação do TUDCA Sobre o Estresse de RE em Células INS1-E

Para avaliar o possível papel da FAK sobre as ações do TUDCA, repetimos os tratamentos em duas condições experimentais distintas, tratando as células com um *siRNA scramble*, utilizado como condição controle, e um *siRNA* específico contra a FAK, no intuito de contrastar como esse *knockdown* iria interferir no perfil de ação do TUDCA sobre diversos parâmetros.

Validamos o funcionamento do *siRNA* através de uma avaliação de conteúdo total de FAK; o tratamento com o *siRNA* promoveu um *knockdown* de cerca de 57% deste conteúdo (Fig. 2A). Ainda avaliando a FAK, observamos que, nos grupos tratados com o *siRNA* *scramble* (SiC), o TUDCA promoveu uma fosforilação significativa da FAK (Fig 2B); esse aumento de fosforilação não pode ser explicado por um aumento no conteúdo total de FAK, uma vez que ele não diferiu entre os tratamentos (Fig 2C). Isso corrobora a hipótese de que o TUDCA desempenhe parte de seus efeitos através da ativação da FAK, promovendo a fosforilação da proteína.

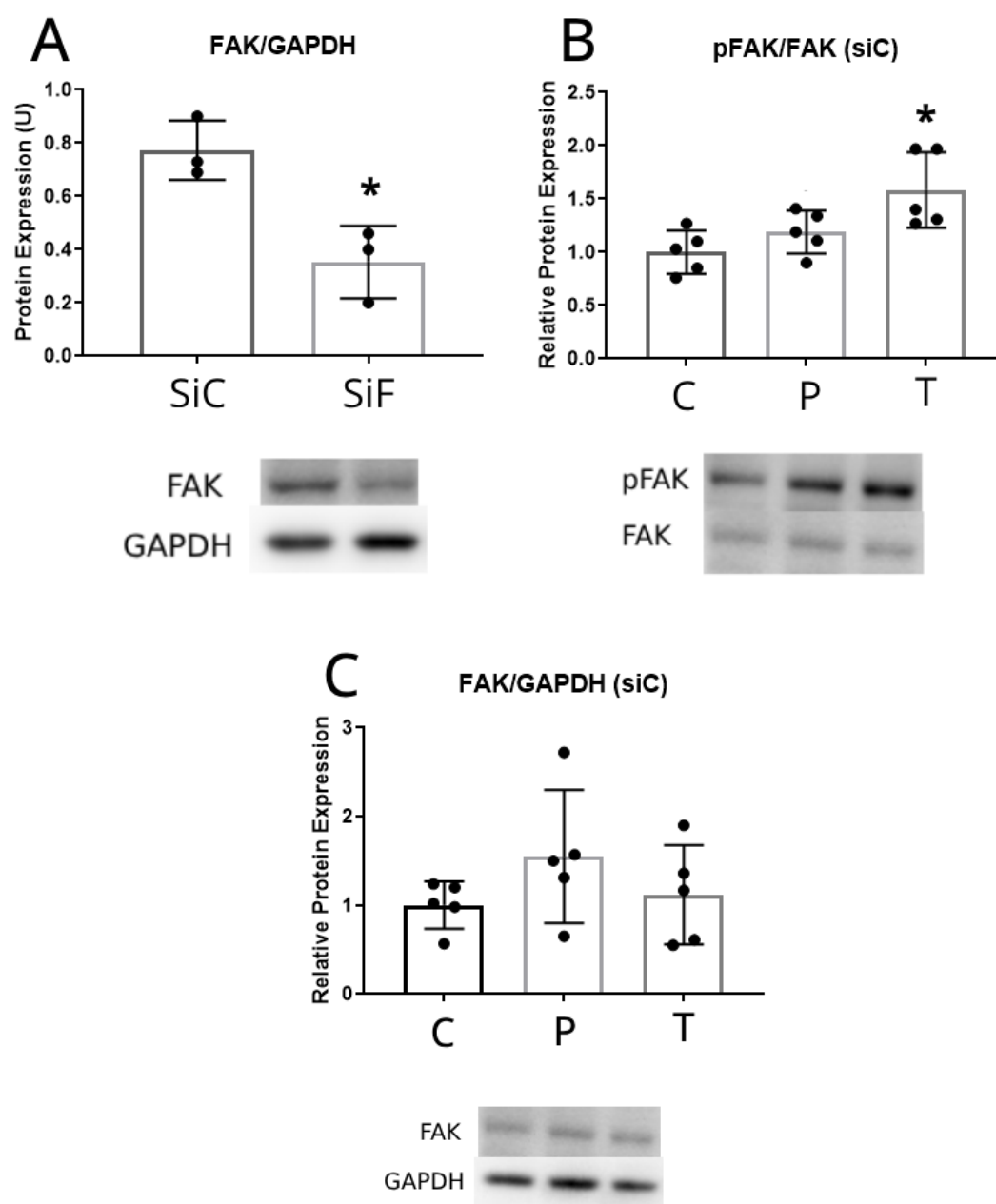


Figura 2. Análise da eficiência de *knockdown* da FAK induzido por *siRNA* específico (A) e expressão proteica

de FAK fosforilada (B) ou total (C) de células submetidas à exposição ao Palmitato com ou sem tratamento com TUDCA. Grupos: C = Controle; P = Palmitato (0,5 mM); T = Palmitato (0,5 mM) + TUDCA (100 μ M). Resultados apresentados como média dos grupos $\pm$ desvio padrão. Estatística realizada por Teste T (A) ou One-Way ANOVA (B, C). * = Diferença estatisticamente significativa vs Grupo C ($p < 0,05$). N experimental variável por experimento (3-6).

Replicamos a avaliação de marcadores de estresse de RE, buscando validar a eficácia do TUDCA em atenuar esta condição. Observamos que a exposição ao palmitato nos grupos submetidos ao SiC levou a um aumento significativo no conteúdo proteico dos três marcadores de estresse de RE estudados (ATF4, p ϵ IF2 α e BiP) (Figs. 3A, 3B e 3C), bem como um aumento no conteúdo gênico do ATF4 (Fig. 3D). Quando tratados com o TUDCA, o conteúdo proteico da ATF4 foi normalizado, apresentando valores estatisticamente diferentes do grupo P, e semelhantes aos do grupo controle. Para os conteúdos proteicos de p ϵ IF2 α e BiP, bem como o conteúdo gênico da ATF4, os grupos tratados com TUDCA não apresentaram uma redução significativa quando comparado ao grupo P, mas também não apresentaram um aumento significativo quando comparados ao grupo Controle. Portanto, o TUDCA parece ter apresentado um efeito significativo em mitigar o estabelecimento do estresse de RE, pelo menos em relação ao conteúdo proteico da ATF4.

A seguir, replicamos os mesmos tratamentos, porém submetendo as células a um *knockdown* da FAK induzido por *siRNA* específico (SiF). Nessa condição, observamos que o palmitato foi novamente capaz de induzir estresse de RE, indicado pelos aumentos significativos de ATF4 e p ϵ IF2 α no grupo P, em nossas condições experimentais (Figs. 3E, 3F). Porém, ao avaliar os efeitos do tratamento concomitante com TUDCA, nos grupos T nesses experimentos, observamos que a capacidade do TUDCA em mitigar alterações significativas dos marcadores foi perturbada, indicando um possível papel da FAK nos efeitos do TUDCA; os grupos T submetidos ao *knockdown* apresentaram um aumento significativo de ATF4 e p ϵ IF2 α (Figs. 3E, 3F), diferente do que foi observado nos experimentos com o SiC (Figs. 3A, 3B); para o caso da p ϵ IF2 α , mesmo a tendência não significativa à redução foi perdida, com seus valores diferindo significativamente do grupo C. Apesar das alterações observadas no conteúdo proteico, o conteúdo gênico da ATF4 não foi alterado em nenhum dos tratamentos, sob a condição de *knockdown* da FAK (Fig. 3H).

Por fim, para complementar esta abordagem, também realizamos uma inibição farmacológica da FAK com um tratamento concomitante com 10 μ M do inibidor Y15. O Y15 é um inibidor farmacológico capaz de impedir a autofosforilação de FAK em tyr397 e, portanto, comprometer o seu funcionamento [26].

Repetimos os tratamentos com as células expostas a esse inibidor; observamos que o palmitato foi novamente capaz de induzir um aumento significativo de marcadores de estresse de RE – especificamente, ATF4 (Fig. 3G) e BiP (Fig. 3I). Não observamos diferenças entre os tratamentos para o conteúdo proteico de p ϵ IF2 α (Figura 3H). Quanto ao efeito do TUDCA sob essa condição de inibição farmacológica da FAK, observamos que o TUDCA perdeu sua capacidade de reduzir a expressão de ATF4 de maneira significativa quando comparada ao grupo P (Fig. 3G), diferente do observado nos experimentos com o controle SiC (Fig. 3A). A expressão da BiP também permaneceu em valores intermediários, não aumentando significativamente o estresse comparado com o grupo C ou reduzindo significativamente comparado ao P, o mesmo padrão observado no experimento com o SiC (Fig. 3I).

Tomando todas essas observações em conjunto, concluímos que o TUDCA promoveu um efeito benéfico sobre o estresse de RE em nossas células, exemplificado principalmente pela sua redução significativa do conteúdo proteico da ATF4, em comparação aos grupos expostos apenas ao palmitato. Essa capacidade, porém, foi consideravelmente perturbada pelo *knockdown* da FAK e pelo tratamento com o inibidor Y15, sugerindo uma participação da FAK nos mecanismos de mitigação do TUDCA sobre o estresse de RE em células beta pancreáticas.

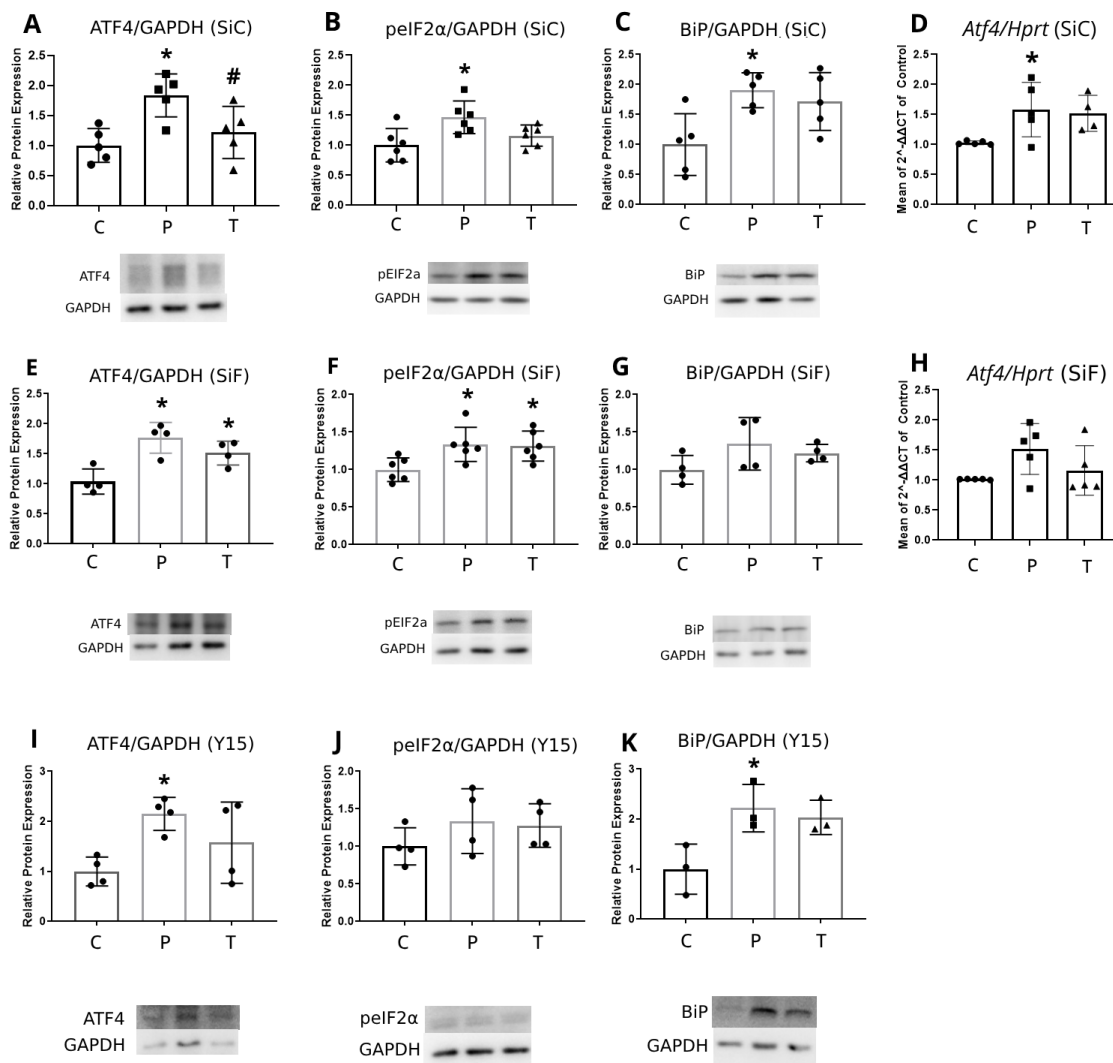


Figura 3. Análise da expressão de marcadores de estresse de retículo por Western-Blot (A-C, E-G, I-K) e Expressão Gênica (D, H) por RT-qPCR de células submetidas à exposição ao Palmitato com ou sem tratamento com TUDCA, na presença ou ausência da FAK. Condições: SiC = Transfecção com um siRNA *scramble*, não-específico (A-C); SiF = Silenciamento da FAK por siRNA específico (D-F); Y15 = Tratamento com inibidor farmacológico específico para a FAK (G-I). Grupos: C = Controle; P = Palmitato (0,5 mM); T = Palmitato (0,5 mM) + TUDCA 100 μ M. Resultados apresentados como média dos grupos $\pm$ desvio padrão. Estatística realizada por One-Way ANOVA. * = Diferença estatisticamente significativa vs Grupo C ($p < 0,05$); # = Diferença estatisticamente significativa vs Grupo P ($p < 0,05$). N experimental variável por experimento (3-6).

Também avaliamos marcadores de apoptose (Bax) e função de célula beta pancreática (PDX1). Observamos que a exposição ao palmitato resultou em um aumento significativo da do conteúdo proteico da Bax (Fig. 4A) e uma redução significativa do conteúdo proteico do PDX1 (Fig 4B). O tratamento com TUDCA impediu um alterações significativas quando comparado ao controle, mas não promoveu uma melhora significativa quando comparada ao palmitato.

Ao realizarmos o *knockdown* da FAK, porém, não observamos uma replicação deste comportamento nos grupos P, que não diferiram dos grupos T significativamente (Fig. 4C, 4D). Observamos, porém, que o conteúdo proteico de PDX1 apresentou uma redução significativa no grupo T dos experimentos de *knockdown* da FAK (Fig 2M), que não foi observada no experimento com o SiC (Fig. 4B).

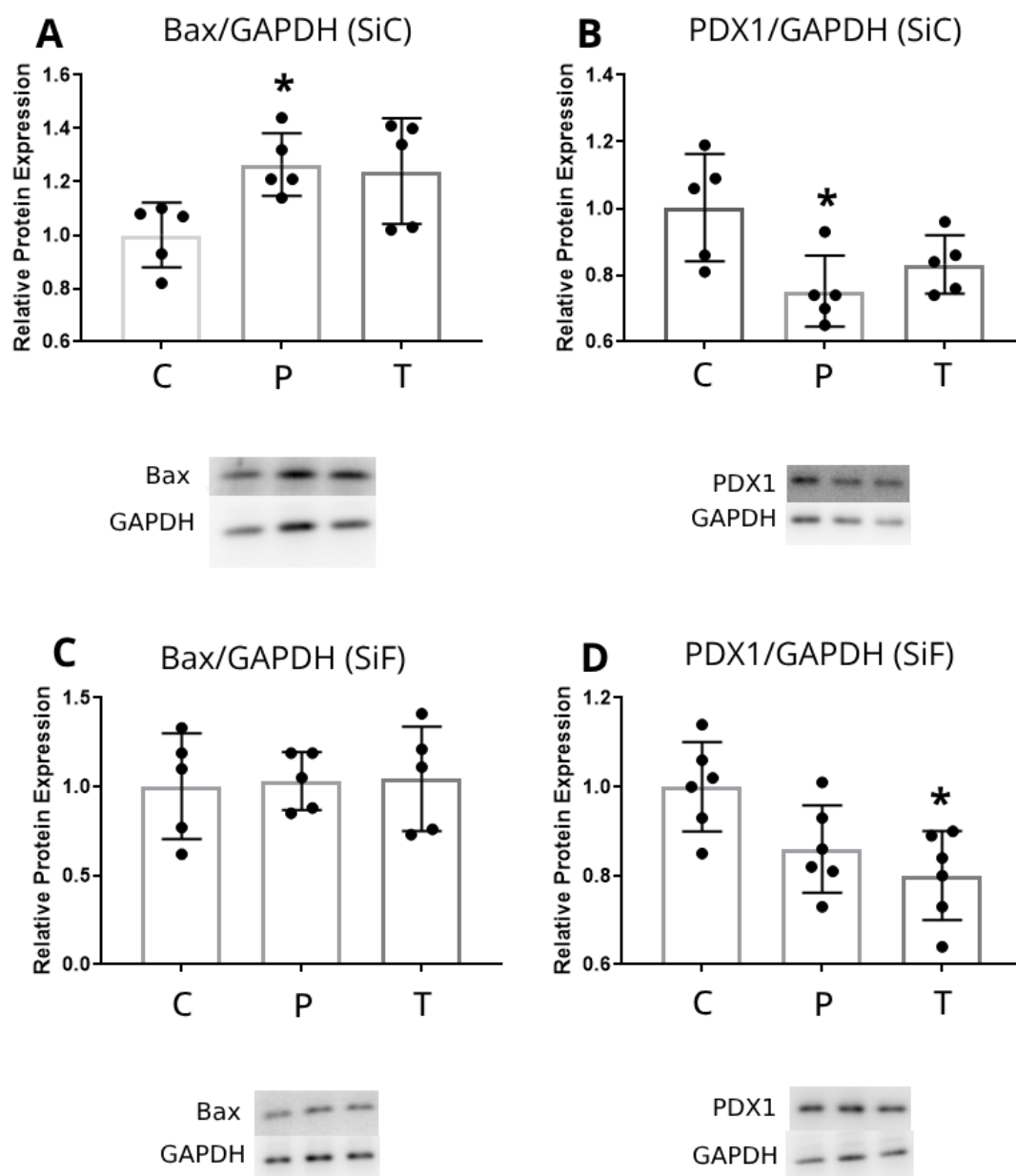


Figura 4. Análise da expressão proteica de marcadores de apoptose (A, C) e funcionais (B, D) por Western-Blot de células submetidas à exposição ao Palmitato com ou sem tratamento com TUDCA, na presença ou ausência da FAK. Condições: SiC = Transfecção com um siRNA *scramble*, não-específico (A, B); SiF = Silenciamento da FAK por siRNA específico (C, D). Grupos: C = Controle; P = Palmitato (0,5 mM); T = Palmitato (0,5 mM) + TUDCA 100 μ M. Resultados apresentados como média dos grupos $\pm$ desvio padrão. Estatística realizada por

One-Way ANOVA. * = Diferença estatisticamente significativa vs Grupo C ($p < 0,05$). N experimental variável por grupo (5-6).

3.3 Inibição do Receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina Perturba a Ação do TUDCA sobre o Estresse de RE

Avaliamos o impacto da inibição do receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina, para reforçar o possível papel da FAK, bem como apontar o papel específico deste receptor na resposta do TUDCA em células beta pancreáticas.

Para isso, utilizamos o inibidor específico ATN-161, que é capaz de se ligar ao domínio $\beta 1$ e manter a molécula em uma conformação inativa, impedindo assim sua função, bem como sua capacidade de interferir na ligação da $\alpha 5\beta 1$ -integrina com a fibronectina através da interferência da ligação da integrina na região PHSRN da fibronectina [27]. Observamos que a exposição ao ATN-161 (10 μ M, 24h), nas condições apresentadas, promoveu uma redução significativa na fosforilação da FAK (Fig. 5A), validando o seu funcionamento. Avaliamos então os efeitos do tratamento do TUDCA sob esta condição de inibição. Observamos que, novamente, o palmitato foi capaz de induzir o estresse de RE, levando a um aumento significativo do conteúdo proteico de ATF4 (Fig. 5B), p ϵ IF2 α (Fig. 5C) e BiP (Fig. 5D). O conteúdo gênico de ATF4 não aumentou significativamente pela exposição ao palmitato (Fig. 5E). Também observamos uma redução significativa na expressão de PDX1 (Fig. 5G). Estes resultados foram compatíveis com o observado nos grupos SiC (Fig. 3A-C); a exceção foi o conteúdo proteico da Bax, que não apresentou alteração neste experimento em nenhum dos grupos (Fig. 5F).

O tratamento com TUDCA na presença do ATN-161 não foi capaz de reduzir o conteúdo proteico de ATF4 em comparação ao grupo P, diferente dos experimentos com o SiC onde ele foi capaz de mitigar esse aumento. Já o conteúdo de p ϵ IF2 α e BiP (Fig. 5C, 5D) se mostrou significativamente elevada mesmo nos grupos T, perdendo mesmo as tendências não-significativas à redução observadas anteriormente (Fig. 3B, 3C). A expressão gênica de ATF4 aumentou significativamente no tratamento com TUDCA (Fig. 5E), diferente do observado no grupo SiC (Fig. 3D). O PDX1 apresentou o mesmo comportamento dos grupos SiC, com uma redução significativa induzida pela exposição ao palmitato, e o tratamento com TUDCA apresentando uma tendência ao aumento, sem diferir significativamente tanto dos grupos P ou C.

Portanto, tal qual o *knockdown* da FAK, a inibição farmacológica do receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina perturbou a capacidade do TUDCA em minimizar as alterações induzidas pela exposição ao palmitato, indicando que este receptor deve ser importante no mecanismo de ação do TUDCA.

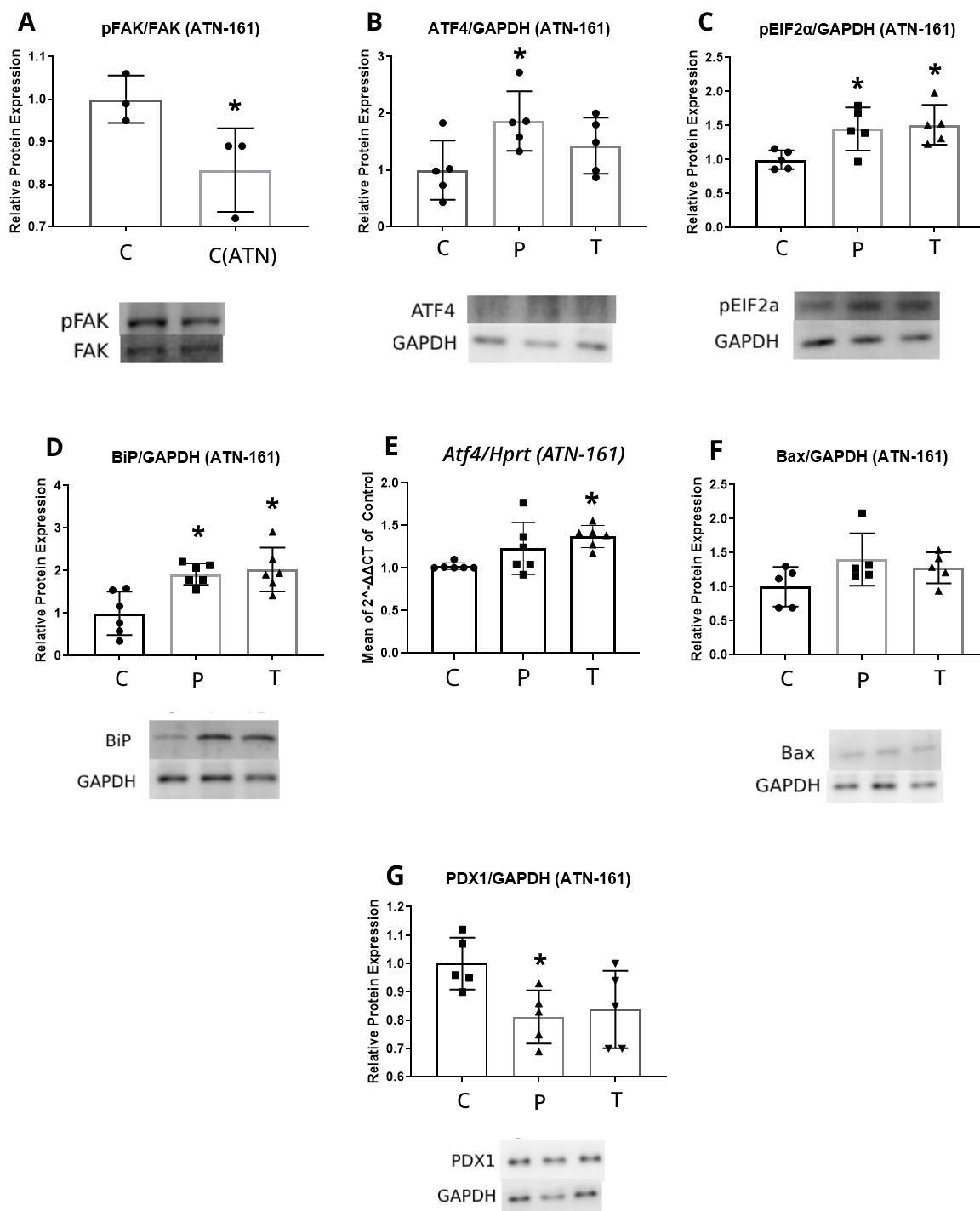


Figura 5. Análise da expressão proteica de FAK fosforilada (A), marcadores de estresse de retículo (B-D), apoptose (E) e funcionais (F) por Western-Blot e Expressão Gênica por RT-qPCR (E) de células submetidas à exposição ao Palmitato, com ou sem tratamento com TUDCA, e inibição do receptor do receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina por tratamento com inibidor farmacológico específico ATN-161. Grupos: C = Controle; P = Palmitato (0,5 mM); T = Palmitato (0,5 mM) + TUDCA 100 μ M. Resultados apresentados como média dos grupos $\pm$ desvio padrão. Estatística realizada por Teste T (A) ou One-Way ANOVA (B-G). Resultados apresentados como média dos grupos $\pm$ desvio padrão. * = Diferença estatisticamente significativa vs Grupo C ($p < 0,05$). N experimental variável por experimento (3-6).

3.4 A Inibição dos receptores TGR5 ou S1PR2 Perturba a Capacidade do TUDCA em Mitigar o Estresse de RE, e a Capacidade do TUDCA em Fosforilar a FAK.

Também avaliamos o impacto da inibição dos receptores TGR5 e S1PR2, receptores mais classicamente estudados como efetores da sinalização de ácidos biliares, mas cujos dados em células beta pancreáticas, principalmente no contexto de ação do TUDCA, são escassos [15]. Utilizamos os inibidores NF449 (inibidor do TGR5) e JTE-013 (Inibidor do S1PR2) para avaliar o impacto da inibição desses receptores sobre a ação do TUDCA no nosso modelo experimental.

Sob ambas as condições de inibição dos receptores, o TUDCA não induziu a fosforilação da FAK, como observamos anteriormente nos experimentos com o SiC (Fig 2B). Isso pode ser um indicativo de que esses receptores também convergem via FAK e apresentam uma importância para a ação do TUDCA mediada por esta proteína.

Avaliando os marcadores de estresse de RE, a inibição do receptor TGR5 levou a uma redução na capacidade do TUDCA em mitigar o estresse de RE induzido pelo palmitato, observado pela perda da capacidade de reverter o aumento do ATF4 (Fig 6C), apresentando apenas uma tendência não significativa à melhora, diferente do observado nos experimentos com o SiC (Fig 3A). Não observamos uma indução da p $\text{eIF2}\alpha$ pelo palmitato (Fig 6D), e observamos uma indução da expressão da BiP que não foi minimizada pelo tratamento com TUDCA (Fig 6E); mesmo a tendência à melhora observada anteriormente (Fig 3C) foi perdida, com o grupo T diferindo significativamente do grupo Controle.

Para a inibição do S1PR2, observamos um efeito similar; a exposição ao palmitato induziu um aumento de ATF4 (Fig 6F) e p $\text{eIF2}\alpha$ (Fig 6G), que não foi reduzido pelo tratamento com TUDCA. De fato, para o ATF4, o grupo T diferiu significativamente do grupo Controle, sem mesmo uma tendência não significativa à melhora, diferindo do observado nos experimentos com o SiC (Fig 3A).

Levados em conjunto, os resultados indicam que a sinalização dos dois receptores parece ser essencial para a ação do TUDCA contra o estresse de RE em nossas condições experimentais, e possivelmente a FAK possa ser um elemento convergente da sinalização de todos eles.

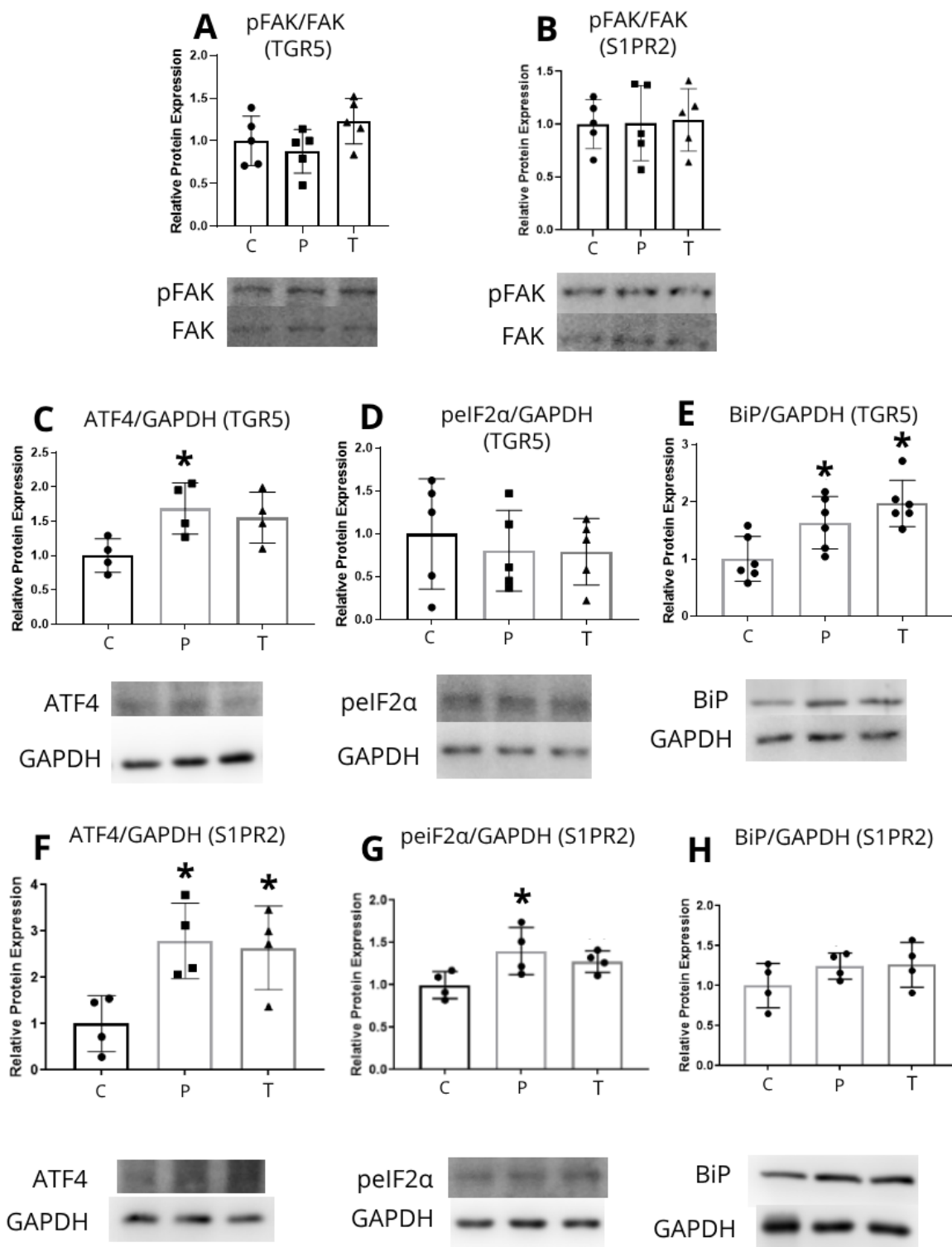


Figura 6. Análise da expressão proteica de FAK fosforilada (A, B) e marcadores de estresse de retículo (C-H) por Western Blot de células expostas ao Palmitato, com ou sem tratamento com TUDCA, e inibição dos receptores TGR5 ou S1PR2 por tratamento com inibidor farmacológico NF499 (Inibidor do TGR5, A, C-E) ou JTE-013 (Inibidor do S1PR2, B, F-H). Grupos: C = Controle; P = Palmitato (0,5 mM); T = Palmitato (0,5 mM) + TUDCA 100 μ M. Resultados apresentados como média dos grupos $\pm$ desvio padrão. Estatística realizada por

One-Way ANOVA. * = Diferença estatisticamente significativa vs Grupo C ($p < 0,05$); # = Diferença estatisticamente significativa vs Grupo P ($p < 0,05$). N experimental variável por experimento (3-5).

3.5 TUDCA É Capaz de Normalizar Alterações na Secreção de Insulina Induzidas pelo Palmitato, mas Essa Capacidade é Perdida com o *knockdown* da FAK

Em busca de compreender melhor o contexto funcional das células beta sob as condições experimentais estudadas, realizamos uma avaliação da secreção estática de insulina, bem como observamos o conteúdo do gene *Ins2*, um dos responsáveis pela expressão da insulina nessas células.

Nós observamos que, como esperado, uma exposição das células a uma concentração maior de glicose levou a um aumento da secreção de insulina, indicando um funcionamento normal das células nesse aspecto (Fig. 7A). Assim, avaliamos o perfil secretório dessas células após exposição à alta concentração de glicose, para verificar como a exposição ao palmitato e o tratamento com TUDCA afetaria sua função secretória.

Observamos que a exposição ao palmitato levou a um aumento significativo da secreção de insulina (Fig. 7B); o tratamento com o TUDCA levou a uma redução significativa desse aumento, diferindo do grupo P e semelhante ao grupo C. No grupo submetido ao *knockdown* da FAK (SiF), observamos novamente um aumento significativo da secreção induzido pelo palmitato, e esse aumento não foi normalizado pelo tratamento com TUDCA (Fig. 7C), indicando uma perturbação da ação do TUDCA sobre aspectos funcionais da célula beta em situação de *knockdown* da FAK.

O conteúdo do gene da insulina, *Ins2* não apresentou diferença estatística em nenhum dos grupos (Fig. 7D). Já na condição de *knockdown* da FAK, observamos uma redução significativa da expressão gênica do *Ins2* tanto nos grupos P e T (Fig. 7E). Isso indica uma piora funcional dessas células com a remoção da FAK.

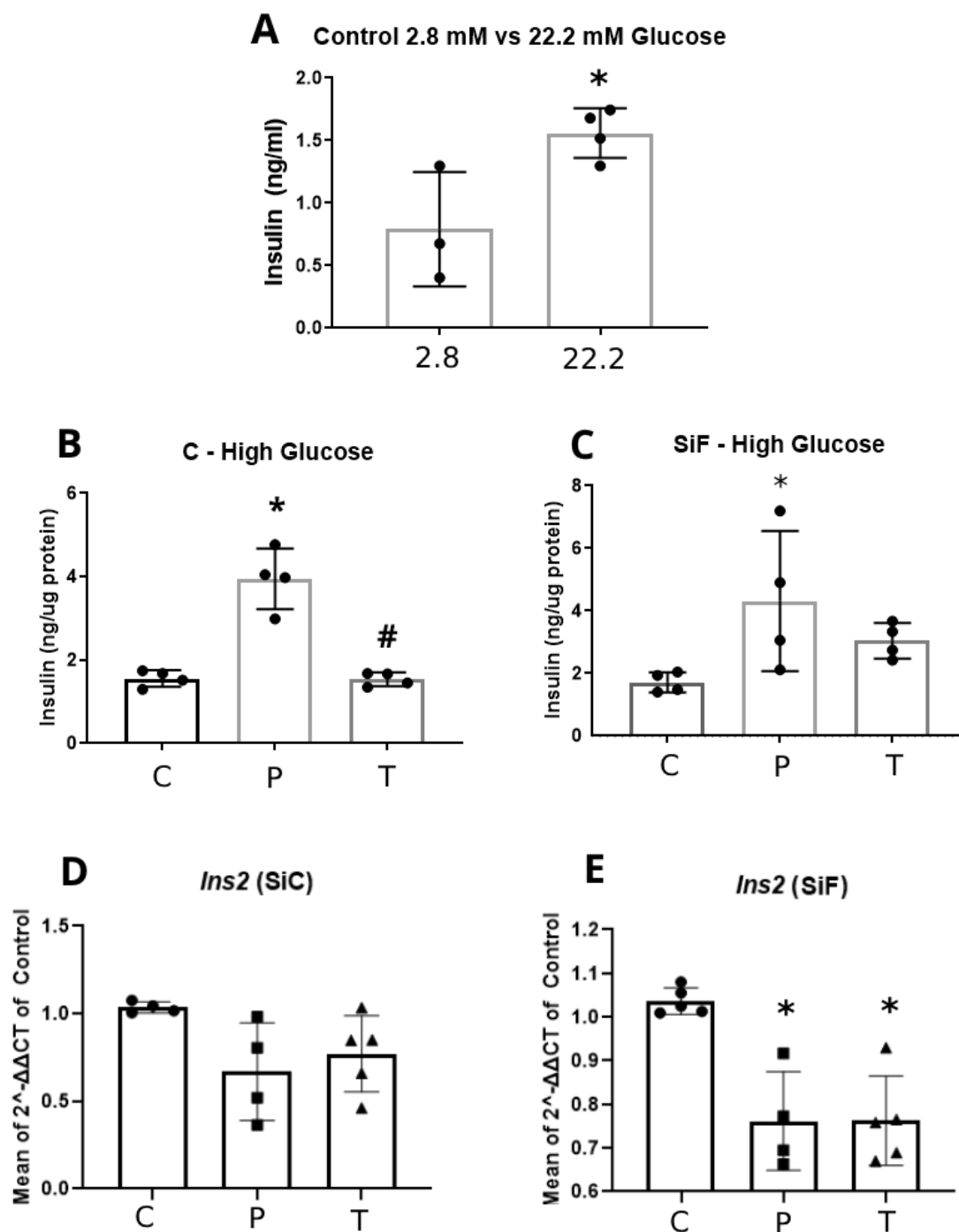


Figura 7. Análise da Secreção de Insulina (A-D) por imunoensaio ELISA e expressão do gene *Ins2* (E-F) por RT-qPCR de células submetidas à exposição ao Palmitato com ou sem tratamento com TUDCA, na presença ou ausência da FAK. Condições: SiF = Silenciamento da FAK por siRNA específico (C, E). Grupos: C = Controle; P = Palmitato (0,5 mM); T = Palmitato (0,5 mM) + TUDCA 100 μ M. Resultados apresentados como média dos grupos $\pm$ desvio padrão. Estatística realizada por Teste T (A) ou One-Way ANOVA (B-E). * = Diferença estatisticamente significativa vs Grupo C ($p < 0,05$); # = Diferença estatisticamente significativa vs Grupo P ($p < 0,05$). N experimental variável por experimento (3-5).

4. Discussão

No presente estudo, buscamos investigar o possível papel da FAK nos mecanismos de ação do TUDCA de forma a expandir o entendimento do funcionamento desta molécula e dos elementos envolvidos na disfunção de células beta pancreáticas, de forma a possibilitar a procura de novos adjuvantes terapêuticos para o *diabetes mellitus*.

Nossos experimentos indicaram que o TUDCA foi capaz de mitigar o estabelecimento de estresse de RE em células expostas ao palmitato, principalmente em relação aos seus efeitos sobre a expressão de ATF4. Este achado é consistente com a literatura [10-12]. A novidade relevante do nosso trabalho para a literatura científica é o corpo de evidências apresentado que apontam a importância da FAK para o mecanismo de ação do TUDCA em células beta pancreáticas, uma vez que o ácido biliar teve seu efeito perturbado quando células passaram por um *knockdown* da mesma ou pela inibição dos receptores do TUDCA - $\alpha 5\beta 1$ -integrina, TGR5 e S1PR2. A importância do receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina já era indicada por estudos anteriores em hepatócitos [22] mas é, ao nosso conhecimento, a primeira evidência dessa relação em células beta pancreáticas.

A literatura aponta alguns mecanismos pelos quais a FAK pode influenciar no cenário de estresse de RE, via seus efetores *downstream*, passo que não foi abordado neste estudo em seu estado atual. Um elemento com papel importante nessas especulações é a via PI3K/Akt, via sinalizadora com importância central na célula beta [28]. Como apresentado na introdução, a FAK pode ser um elemento desta via [24], participando de sua ativação. A Akt é capaz de fosforilar a PERK em seu resíduo Thr799, atenuando a ativação desse ramo da UPR [29, 30]. A Akt também é capaz de ativar uma fosfatase, a PTP1B, que é capaz de reduzir a ativação da IRE1 α [29], porém não avaliamos marcadores deste ramo da UPR neste estudo. Essa via também possui relações com a expressão de PDX1 – a via PI3k/Akt é responsável por regular a ativação da FoxO1, que por sua vez é um fator que modula a expressão de PDX1 [28]. Portanto, nossos achados parecem ser consistentes com esse mecanismo – o *knockdown* da FAK teria reduzido a capacidade do TUDCA em promover a ativação da via PI3K/Akt, impedindo o TUDCA de modular o ramo da PERK e, portanto, a expressão de ATF4. Naturalmente esta proposta é uma hipótese, e confirmação experimental direta seria necessária para avaliá-la com mais propriedade. Ainda assim, seria um possível meio de conectar a FAK aos achados reportados neste estudo.

Ao passo que os efeitos sobre o estresse de RE foram bastante claros, o efeito do TUDCA sobre apoptose foi menos relevante. Quanto ao conteúdo da Bax, o TUDCA foi capaz de induzir apenas uma tendência a melhora no grupo SiC; porém, não conseguimos replicar o aumento da Bax induzido por palmitato nos experimentos seguintes – o que destoa do que é

conhecido na literatura, uma vez que existem diversos relatos da exposição crônica ao palmitato induzindo um aumento na expressão da Bax [31-33], consistente com sua capacidade de levar células à apoptose. Uma possível explicação para isso reside nos resultados do HOPI, e do efeito do *knockdown* da FAK sobre a morte celular, já observamos apoptose que foi induzida pela redução da FAK nas células controle. De qualquer forma, fica difícil traçar conclusões sobre sobrevivência devido à incapacidade do TUDCA em resgatar as células da apoptose no experimento com HOPI e à dificuldade em replicar a indução da Bax por palmitato em nossas condições experimentais.

Na parte funcional, observamos um achado curioso: esperávamos ver um aumento da secreção de insulina induzida pelo TUDCA, mas não observamos isso. Invés disso, o palmitato levou a um aumento dessa secreção, com o TUDCA restaurando-a para um padrão semelhante ao controle – efeito este que foi perturbado pelo *knockdown* da FAK. Estudos anteriores apontam diversas possibilidades; alguns indicam que o palmitato *reduz* a secreção de insulina de maneira crônica, com o estudo em questão utilizando um tempo de exposição ao palmitato maior do que o utilizado neste experimento (48hs, vs 24hs no nosso modelo) [34], mas há dados indicando que o palmitato pode aumentar a secreção em uma exposição mais aguda (1h) [35]. Um estudo inclusive reportou um aumento de liberação de insulina com exposição ao palmitato por até 72hs [36]. Focando em estudos em linhagem celular INS-1E com um tempo de exposição similar ao nosso, a literatura novamente apresenta relatos com ambos os casos: estudos que reportam redução da secreção de insulina em exposição por 24hs [37], e estudos que reportam um aumento da secreção induzido por Palmitato em 48hs de exposição a um mix de ácidos graxos, incluindo Palmitato [38].

Esse aumento da secreção de insulina pelo palmitato em nosso experimento foi acompanhado de uma *redução* na expressão gênica do *Ins2*, um dos genes responsáveis pela expressão da insulina, bem como redução do conteúdo proteico do marcador funcional PDX1. Isso também está de acordo com a literatura, e já foi reportado em outros estudos [36]. O palmitato não necessariamente causa uma redução do PDX1; o entendimento clássico está mais relacionado com alterações na localização do PDX1, inibindo seu transporte para o núcleo e sua ligação com a região promotora do gene da insulina, impedindo sua ação habitual [39]. Isso parece ocorrer devido à captura do PDX1 em grânulos de estresse em condições de abundância de ácidos graxos [40]. Porém, estudos mais recentes indicaram haver sim uma redução na expressão do PDX1 em células INS-1E tratadas com Palmitato, consistente com os nossos resultados [41], incluindo um estudo realizado em ratos submetidos à dieta rica em gorduras saturadas (HFD), que também encontrou redução da expressão de PDX1 [42].

Portanto, temos um cenário de aumento de secreção de insulina induzida pelo palmitato, que por sua vez é acompanhado por uma redução na expressão da insulina – e, possivelmente, do próprio conteúdo total da insulina [36], apesar de não termos abordado este parâmetro no estudo. Cenário semelhante já foi inclusive observado *in vivo*, com jovens obesos com alta concentração de palmitato circulante apresentando hiperinsulinemia, até mesmo em comparação com outros jovens obesos com menores concentrações de palmitato no sangue [43]. Já existe um entendimento na literatura de que estados iniciais do desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 levam a um aumento da insulinemia, que pode estar associado à estresse de RE em células beta [44]. Como discutido na introdução, o retículo endoplasmático tem um papel importante na síntese da insulina [5]. Todos esses achados são consistentes com o que observamos – estresse de RE induzido pelo palmitato levando a uma hipersecreção de insulina, seguida de deficiência na síntese (observado pela redução da *Ins2* e conteúdo proteico de PDX1); assim, também temos o possível mecanismo pelo qual o TUDCA minimiza essas alterações: ao minimizar o estresse de RE mesmo na presença do palmitato, o TUDCA possivelmente auxiliou a lidar melhor com a demanda nutricional, normalizando a secreção e preservando a saúde funcional da célula beta. O *knockdown* da FAK perturbou a capacidade do TUDCA em normalizar o conteúdo, tanto de PDX1 quanto do *Ins2*, indicando uma importância da molécula como efetora da ação benéfica do TUDCA sobre a síntese e secreção de insulina em condições de estresse de RE.

Nosso estudo também indicou que os três receptores do TUDCA parecem ser importantes para a sua ação contra o estresse de RE. O receptor $\alpha 5 \beta 1$ -integrina era um alvo natural de nossa hipótese devido à sua relação com a FAK [15]. Há pouca informação sobre este receptor na literatura, especialmente em relação à célula beta pancreática; o que se sabe sobre o papel de receptores de β -integrina no geral (e não da variante $\alpha 5$ em específico) é consistente com nossos achados: é um receptor que favorece a função e sobrevivência da célula beta, e sua inibição costuma causar prejuízos nesses parâmetros [15]. Como sabemos que esse receptor sinaliza através da FAK, e observamos que a sua inibição causou prejuízos similares ao *knockdown* da FAK na capacidade do TUDCA em mitigar o estresse de RE, é uma conclusão razoável imaginar que provavelmente ambos os elementos estão sequencialmente envolvidos na sinalização do TUDCA – ou seja, ele interage com o receptor $\alpha 5 \beta 1$ -integrina e, através disso, leva à autofosforilação da FAK ativando suas vias de sinalização habituais.

Um achado curioso é que a inibição do $\alpha 5 \beta 1$ -integrina não impactou na expressão de PDX1 de uma maneira estatisticamente significativa no grupo T quando comparado ao controle, algo diferente do observado no grupo que sofreu o *knockdown* da FAK. O TUDCA,

como mencionado, também atua através dos receptores S1PR2 e TGR5, dos quais o TGR5 apresenta importância funcional para a secreção de insulina em células beta [15]. Ou seja – é possível que com a inibição do receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina, a célula ainda consegue se beneficiar da sinalização via outros receptores – presumivelmente, o TGR5 – para manter uma eficácia funcional relevante, ao passo que a inibição da FAK causou um comprometimento mais profundo. Experimentos específicos para testar esta hipótese seriam necessários para concluir de maneira mais concreta.

Também é possível supor que a sinalização dos três receptores se utilize da FAK como efetora. Os fatos que sustentam essa hipótese em nosso trabalho são a observação de que o TUDCA apresentou uma capacidade de fosforilar a FAK (Fig 2A), mas essa capacidade não foi observada nos grupos submetidos à inibição dos receptores TGR5 e S1PR2 (Fig 6A, 6B). A literatura já aponta uma relação desses receptores com outros elementos de sinalização com os quais a FAK se relaciona, como a Akt e a ERK $\frac{1}{2}$ [15]; não seria impossível imaginar que a sinalização de todos eles converge pela FAK, ou envolve a FAK em algum nível, para que o TUDCA realize suas ações. Estudos futuros podem explorar essa possibilidade através da avaliação da interação específica de cada um desses receptores com a FAK, ou da FAK com os elementos citados.

Uma questão interessante para estudos futuros é a natureza da interação do TUDCA com o receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina. Estudos anteriores indicaram que a internalização do TUDCA é necessária para a interação com o receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina, em células hepáticas [45]. Porém, o TUDCA é um ácido biliar pouco lipofílico, com dificuldades em adentrar a célula e realizar efeitos intracelulares diretamente [15]. Apesar disso, existem evidências de que ele é capaz de interagir com receptores intracelulares, como o FXR, provavelmente através da internalização por transportadores específicos – especificamente, o Polipeptídeo Co-transportador de Sódio e Taurocolato (conhecido como NTCP) [15, 45]. Esses transportadores existem em células hepáticas, porém não encontramos achados reportando o mesmo em células beta pancreáticas. Assim, estabelecido que o TUDCA e o receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina interagem, como nosso estudo indica, seria de interesse investigar se essa interação depende da internalização do mesmo ou não, em células beta pancreáticas. Ambas as possibilidades seriam de interesse acadêmico – caso a internalização ocorra, significaria a descoberta desses transportadores em células beta, o que traz implicações inclusive clínicas interessantes, uma vez que esses transportadores estão envolvidos, por exemplo, no mecanismo de infecção do vírus da hepatite B [46]. Por outro lado, se essa internalização não for necessária para a ação do TUDCA sobre este receptor, esse achado expandiria nosso entendimento de como receptores de integrina funcionam e quais tipos de efeitos podem

exercer na célula beta em termos de sinalização. Nosso estudo trabalhou com células isoladas e, assim, não envolveu os possíveis efeitos da matriz extracelular, que é a principal ligante de receptores de integrina, nesse processo de ação do TUDCA sobre esses receptores – portanto, os dados precisam ser interpretados com cautela sob esta consideração.

5. Conclusão

Em conclusão, neste trabalho mostramos que a FAK exerce um papel importante nos mecanismos de ação do TUDCA para a mitigação do estresse de RE em células beta pancreáticas, indicado pelo ATF4. Propomos um mecanismo de ação que envolve sinalização através do receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrina, TGR5 e/ou S1PR2, que leva à fosforilação da FAK, que ativa vias que levam à redução deste estresse; essa redução do estresse leva à impactos funcionais positivos na célula beta INS-1E. A elucidação dos mecanismos do TUDCA na célula beta nos ajuda a compreender melhor seu papel como um adjuvante terapêutico para o *diabetes mellitus* e, portanto, nossos achados são de interesse para a saúde pública.

6. Referências

1. Saeedi, P., et al., *Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition*. Diabetes Res Clin Pract, 2019. **157**: p. 107843.
2. Atkinson, M.A., G.S. Eisenbarth, and A.W. Michels, *Type 1 diabetes*. Lancet, 2014. **383**(9911): p. 69-82.
3. Galicia-Garcia, U., et al., *Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus*. 2020. **21**(17).
4. Dłudla, P.V., et al., *Pancreatic β -cell dysfunction in type 2 diabetes: Implications of inflammation and oxidative stress*. World J Diabetes, 2023. **14**(3): p. 130-146.
5. Kim, M.K., et al., *Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 509437.
6. Marciniak, S.J. and D. Ron, *Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Disease*. Physiological Reviews, 2006. **86**(4): p. 1133-1149.
7. Eizirik, D.c.L., A.K. Cardozo, and M. Cnop, *The Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes Mellitus*. Endocrine Reviews, 2008. **29**(1): p. 42-61.
8. Walter, P. and D. Ron, *The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation*. Science, 2011. **334**(6059): p. 1081.
9. Shrestha, N., et al., *Pathological β -Cell Endoplasmic Reticulum Stress in Type 2 Diabetes: Current Evidence*. Frontiers in Endocrinology, 2021. **12**.
10. Chen, F., et al., *TUDCA protects against tunicamycin-induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons by suppressing activation of ER stress*. Exp Ther Med, 2022. **24**(2): p. 509.
11. Huang, X., et al., *Tauroursodeoxycholic acid mediates endoplasmic reticulum stress and autophagy in adrenocortical carcinoma cells*. Oncol Lett, 2019. **18**(6): p. 6475-6482.
12. Pasha, M., et al., *The effect of tauroursodeoxycholic Acid (TUDCA) treatment on placental endoplasmic reticulum (ER) stress in a rat model of advanced maternal age*. PLOS ONE, 2023. **18**(4): p. e0282442.
13. Zhu, Q., et al., *Tauroursodeoxycholate, a chemical chaperone, prevents palmitate-induced apoptosis in pancreatic β -cells by reducing ER stress*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2013. **121**(1): p. 43-7.
14. Lee, Y.Y., et al., *Tauroursodeoxycholate (TUDCA), chemical chaperone, enhances function of islets by reducing ER stress*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **397**(4): p. 735-739.
15. Rosa, L.R.O., et al., *TUDCA receptors and their role on pancreatic beta cells*. Prog Biophys Mol Biol, 2021. **167**: p. 26-31.
16. McMillin, M. and S. DeMorrow, *Effects of bile acids on neurological function and disease*. The FASEB Journal, 2016. **30**(11): p. 3658-3668.
17. Michael, K.E., et al., *Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(9): p. 2508-19.
18. Blaukat, A., *Focal Adhesion Kinase*, in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, S.J. Enna and D.B. Bylund, Editors. 2007, Elsevier: New York. p. 1-10.
19. Hall, J.E., W. Fu, and M.D. Schaller, *Chapter Five - Focal Adhesion Kinase: Exploring FAK Structure to Gain Insight into Function*, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, K.W. Jeon, Editor. 2011, Academic Press. p. 185-225.
20. Rondas, D., et al., *Novel Mechanistic Link between Focal Adhesion Remodeling and Glucose-stimulated Insulin Secretion* ^{*}. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(4): p. 2423-2436.

21. Jevon, D., et al., *Local activation of focal adhesion kinase orchestrates the positioning of presynaptic scaffold proteins and Ca²⁺ signalling to control glucose-dependent insulin secretion*. eLife, 2022. **11**: p. e76262.
22. Häussinger, D., et al., *Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced cholestasis*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1476-1487.
23. Cai, E.P., et al., *In Vivo Role of Focal Adhesion Kinase in Regulating Pancreatic β -Cell Mass and Function Through Insulin Signaling, Actin Dynamics, and Granule Trafficking*. Diabetes, 2012. **61**(7): p. 1708-1718.
24. Daval, M., et al., *Cyclin-Dependent Kinase 5 Promotes Pancreatic β -Cell Survival via Fak-Akt Signaling Pathways*. Diabetes, 2011. **60**(4): p. 1186-1197.
25. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
26. O'Brien, S., et al., *FAK inhibition with small molecule inhibitor Y15 decreases viability, clonogenicity, and cell attachment in thyroid cancer cell lines and synergizes with targeted therapeutics*. Oncotarget, 2014. **5**(17): p. 7945-59.
27. Stoeltzing, O., et al., *Inhibition of integrin $\alpha 5 \beta 1$ function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice*. International Journal of Cancer, 2003. **104**(4): p. 496-503.
28. Zhang, B., et al., *Role and mechanism of PI3K/AKT/FoxO1/PDX-1 signaling pathway in functional changes of pancreatic islets in rats after severe burns*. Life Sciences, 2020. **258**: p. 118145.
29. Mounir, Z., et al., *Akt determines cell fate through inhibition of the PERK-eIF2 α phosphorylation pathway*. Sci Signal, 2011. **4**(192): p. ra62.
30. Winnay, J.N., et al., *Inhibition of the PI 3-kinase pathway disrupts the unfolded protein response and reduces sensitivity to ER stress-dependent apoptosis*. The FASEB Journal, 2020. **34**(9): p. 12521-12532.
31. Peterson, J.M., et al., *Bax signaling regulates palmitate-mediated apoptosis in C(2)C(12) myotubes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(6): p. E1307-14.
32. Zhang, E., et al., *The functional role of Bax/Bak in palmitate-induced lipoapoptosis*. Food and Chemical Toxicology, 2019. **123**: p. 268-274.
33. Liang, H., et al., *Palmitic Acid-induced Apoptosis in Pancreatic β -Cells Is Increased by Liver X Receptor Agonist and Attenuated by Eicosapentaenoate*. In Vivo, 2011. **25**(5): p. 711.
34. Watson, M.L., et al., *Chronic Effects of Palmitate Overload on Nutrient-Induced Insulin Secretion and Autocrine Signalling in Pancreatic MIN6 Beta Cells*. PLOS ONE, 2011. **6**(10): p. e25975.
35. Parker, S.M., et al., *Palmitate potentiation of glucose-induced insulin release: a study using 2-bromopalmitate*. Metabolism - Clinical and Experimental, 2003. **52**(10): p. 1367-1371.
36. Jacqueminet, S., et al., *Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration*. Metabolism, 2000. **49**(4): p. 532-6.
37. Maris, M., et al., *Role of the saturated nonesterified fatty acid palmitate in beta cell dysfunction*. J Proteome Res, 2013. **12**(1): p. 347-62.
38. dos Reis Araujo, T., et al., *The Taurine-Conjugated Bile Acid (TUDCA) Normalizes Insulin Secretion in Pancreatic β -Cells Exposed to Fatty Acids: The Role of Mitochondrial Metabolism*, in *Taurine 12: A Conditionally Essential Amino Acid*, S.W.

- Schaffer, A. El Idrissi, and S. Murakami, Editors. 2022, Springer International Publishing: Cham. p. 293-303.
39. Hagman, D.K., et al., *Palmitate Inhibits Insulin Gene Expression by Altering PDX-1 Nuclear Localization and Reducing MafA Expression in Isolated Rat Islets of Langerhans**. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(37): p. 32413-32418.
 40. Zhang, M., et al., *Saturated fatty acids entrap PDX1 in stress granules and impede islet beta cell function*. Diabetologia, 2021. **64**(5): p. 1144-1157.
 41. Ryu, G.R., et al., *Decreased Expression and Induced Nucleocytoplasmic Translocation of Pancreatic and Duodenal Homeobox 1 in INS-1 Cells Exposed to High Glucose and Palmitate*. Diabetes Metab J, 2011. **35**(1): p. 65-71.
 42. Glavas, M.M., et al., *Early overnutrition reduces Pdx1 expression and induces β cell failure in Swiss Webster mice*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 3619.
 43. Staaf, J., et al., *Initial hyperinsulinemia and subsequent β -cell dysfunction is associated with elevated palmitate levels*. Pediatric Research, 2016. **80**(2): p. 267-274.
 44. Hasnain, S.Z., J.B. Prins, and M.A. McGuckin, *Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β -cell dysfunction in diabetes*. Journal of Molecular Endocrinology, 2016. **56**(2): p. R33-R54.
 45. Gohlke, H., et al., *$\alpha 5 \beta 1$ -integrins are sensors for tauroursodeoxycholic acid in hepatocytes*. Hepatology, 2013. **57**(3): p. 1117-29.
 46. Yan, Y., et al., *Down-regulation of cell membrane localized NTCP expression in proliferating hepatocytes prevents hepatitis B virus infection*. 2019. **8**(1): p. 879-894.

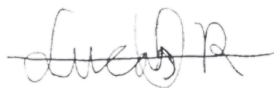
7. Anexos

7.1 Declaração de Direitos Autorais

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 **A QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK) PARTICIPA DO MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO TAUROURSODEOIXÍCÓLICO (TUDCA) CONTRA O ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM LINHAGEM DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS INS-1E**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de Agosto de 2024

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Lucas Rodolfo de Oliveira Rosa**
RG n.º 46897004-6

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Helena Cristina de Lima Barbosa**
RG n.º 30.231.474-X

7.2 Declaração de Bioética



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil

Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@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 **“A QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK) PARTICIPA DO MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO TAUROURSODEOIXICÓLICO (TUDCA) CONTRA O ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM LINHAGEM DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS INS-1E”**, 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: _____
Nome do(a) aluno(a): Lucas Rodolfo de Oliveira Rosa

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

Data: 30/08/2024