

FERNANDO FORATO ANHÊ

Regulação do perfil transcricional pelas
SMADs 1, 5 e 8 em células β da linhagem
INS1E.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Humana do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Silvana A. Bordin da Silva

São Paulo
2010

RESUMO

ANHÊ, F. F. **Regulação do perfil transcricional pelas SMADs1, 5 e 8 em células β INS1E.** 2010. 57 f. Dissertação (Mestrado Fisiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BMPs ocupam papel central na diferenciação e crescimento celulares. A sinalização intracelular das BMPs depende de substratos conhecidos como BR-SMADs (SMAD1/5/8). Em ilhotas pancreáticas de ratas grávidas, onde ocorre aumento da massa endócrina e da síntese e secreção de insulina, houve aumento da expressão do receptor BMPR1A. Em camundongos *knockout* para BMPR1A houve diminuição da expressão de genes-chave na exocitose de grânulos de insulina. Tais eventos estão associados à redução da atividade das BR-SMADs. O objetivo deste trabalho foi avaliar, em células β INS1E, o perfil de expressão gênica em larga escala após silenciamento das BR-SMADs. As expressões relativas de Munc18a, Munc18b e Snap23 foram reduzidas quando do silenciamento das BR-SMADs (n=3, p<0,05 vs CTL). O silenciamento de SMAD1 (n=3, p<0,05 vs CTL) ou SMAD5 (n=3, p<0,05 vs CTL) acarretaram redução do mRNA de Sintaxina 4. Conclui-se que as BR-SMADs estão envolvidas na regulação da secreção de insulina modulando proteínas envolvidas na fusão de vesículas contendo grânulos de insulina à membrana plasmática de células INS1E.

Palavras-chave: Células cultivadas. Insulina. Ilhotas de Langerhans. *Diabetes mellitus*.

ABSTRACT

ANHÊ, F. F. **Regulation of the transcriptional profile by SMADs 1, 5 and 8 in INS1E β cells.** 2010. 57 p. Master thesis (Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BMPs play a determinant role in cell differentiation and growth. BMP intracellular signaling involves the substrates known as BR-SMADs (SMAD1/5/8). BMPR1A receptor expression was upregulated in pancreatic islets from pregnant rats, in which endocrine mass and insulin secretion are increased. Mice with attenuated BMPR1A signaling in β cells showed decreased expression of key genes involved in insulin exocytosis. These events are associated with reduction of BR-SMADs activity. The aim of this work was to perform a screening to evaluate changes in expression profiles after knockdown of BR-SMADs in INS1E β cells. Relative expressions of Munc18a, Munc18b and Snap23 were diminished after knockdown of the BR-SMADs (n=3, p<0,05 vs CTL). Only SMAD1 (n=3, p<0,05 vs CTL) and SMAD5 (n=3, p<0,05 vs CTL) silencing caused reduction of Syntaxin 4 expression. These data point to the involvement of BR-SMADs in the regulation of insulin secretion by modulating the expression of proteins responsible for fusion of insulin-containing granules to the membrane of INS1E cells.

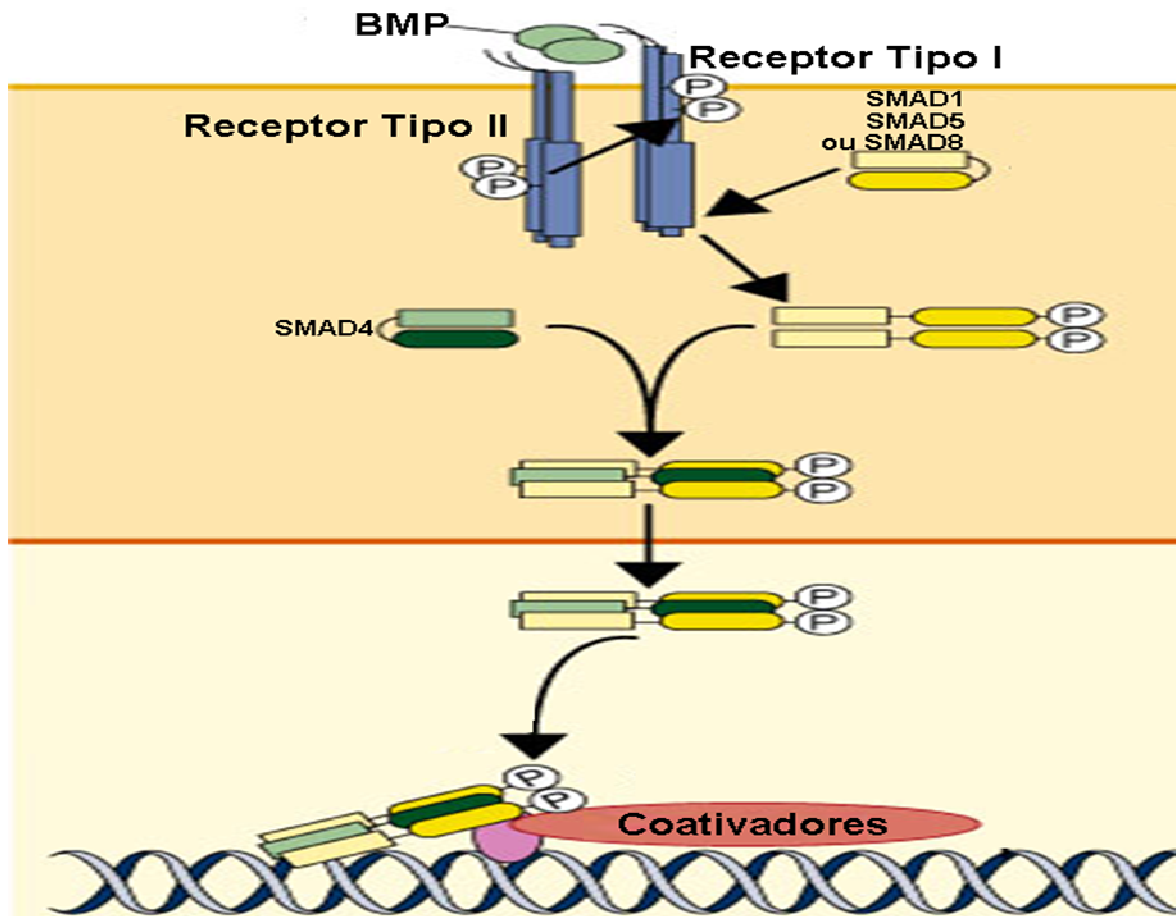
Key words: Cultured cells. Insulin. Islets of Langerhans. *Diabetes mellitus*.

1 INTRODUÇÃO

As proteínas da família BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*) constituem subclasse da superfamília TGF- β (*Transforming Growth Factors*) e ocupam papel central na diferenciação e crescimento celulares. Os membros desta superfamília representam uma série de proteínas sinalizadoras altamente conservadas cujos análogos são amplamente distribuídos em organismos, desde *Drosophila melanogaster* até humanos. As proteínas BMP foram originalmente caracterizadas por sua habilidade em induzir formação ectópica de osso após injeção subdermal, e sua sinalização parece ser particularmente importante durante o desenvolvimento. BMPs e seus receptores são expressos em numerosos tipos celulares, em diferentes estágios do desenvolvimento do embrião e na vida adulta (HOGAN, 1996).

As BMPs se ligam a receptores do tipo I e do tipo II com mesma afinidade. No entanto, para formar um complexo funcional e iniciar os eventos posteriores de sinalização, são necessários ambos os tipos de receptores (MASSAGUE, 1998). Após a ligação da BMP aos dois tipos de receptor, o receptor do tipo II, que tem atividade constitutiva seril-treonil quinase, fosforila e ativa a função seril-treonil quinase do receptor do tipo I. O receptor do tipo I, então ativado, inicia a sinalização intracelular fosforilando substratos citoplasmáticos conhecidos como proteínas SMAD (*Mothers Against Decapentaplegic Homolog*). Apesar da existência de mais de 30 proteínas BMP, foram identificados no genoma humano, até o momento, somente sete isoformas de receptores do tipo I e cinco isoformas de receptores do tipo II (MAZERRBOURG *et al.*, 2005). A interação entre as BMPs e seus receptores é considerada promíscua, na medida em que o número de ligantes excede o número de receptores do tipo I e do tipo II. Esta característica não significa que a ativação dos receptores desencadeie ações indiscriminadas, mas sim uma série de eventos bem controlados, temporal e espacialmente, para o desenvolvimento e manutenção do organismo. As respostas celulares

específicas dependem do conjunto de SMADs recrutadas, de seus co-fatores e da interação com outras vias de sinalização (VON BUBNOFF e CHO, 2001) (Figura 1).



Fonte: www.nature.com/nchembio/journal/v4/n1/fig_tab/nchembio0108-15_F1.html modificado por Fernando Forato Anhê, 2010.

Figura 1. Representação esquemática da via de sinalização intracelular BMP/SMAD. A proteína BMP se liga, inicialmente, a um dímero de um receptor do tipo II, que, então ativado, atrai, fosforila e ativa um dímero de um receptor do tipo I. O heterotetrâmero de receptores ativados atrai e fosforila dímeros de BR-SMAD (SMAD1, SMAD5 ou SMAD8); tais dímeros ativados, aos pares, associam-se a um dímero de Co-SMAD (SMAD4). O complexo BR-SMAD/Co-SMAD, então, transloca-se para o núcleo, onde, em associação com coativadores transcricionais, regulará a expressão de genes-alvo.

1.1 A via BMP/SMAD na secreção de insulina

É bem conhecido que os ajustes contínuos da secreção de insulina depende das flutuações dos níveis de nutrientes circulantes, em especial da glicose. A secreção é também modulada por hormônios, neurotransmissores e agentes farmacológicos, o que permite que as células β secretem insulina em quantidade e tempo adequados, regulando perfeitamente os níveis de nutrientes no sangue em diferentes situações fisiológicas, tais como jejum, período

alimentar, exercício físico, gravidez, lactação, crescimento e envelhecimento. Além dos ajustes responsáveis pela resposta secretora, as ilhotas também apresentam alterações morfológicas ao longo da vida, uma vez que as células β pancreáticas mantêm sua capacidade de se replicar no animal adulto (BONNER-WEIR, 1994; SMITH *et al.*, 1994).

A gravidez é provavelmente a mais notável condição em que a adaptação morfofuncional da ilhota pancreática é consistentemente observada. Em meados do século passado já se observava a expansão do volume das ilhotas durante a gravidez (HELLMAN, 1960), resultado do aumento da taxa de proliferação de células β (PARSONS; BRELJE; SORENSON, 1992). Em roedores, o aumento da proliferação ocorre ao redor do décimo dia de gestação, com pico ao redor do décimo quarto dia (SORENSON e BRELJE, 1997), correspondente na mulher ao final do 2º trimestre. Porém, o aumento da massa endócrina do pâncreas não é suficiente para desencadear o quadro de hiperinsulinemia característico da gravidez. Em paralelo à proliferação, ocorre o aumento da síntese e secreção de insulina, esta última decorrente da redução do limiar de sensibilidade à glicose (GREEN e TAYLOR, 1972). As evidências acumuladas nos últimos 30 anos mostram que o lactogênio placentário (PL) e a prolactina (PRL) induzem as alterações morfofuncionais da ilhota pancreática observadas na gravidez, i.e., (1) aumento da atividade mitogênica, (2) redução da apoptose e (3) aumento da sensibilidade à glicose. (SORENSON e BRELJE, 1997; NIELSEN *et al.*, 2001). Essas alterações são, em última análise, o resultado de um ajuste complexo da atividade transcricional das células da ilhota, envolvendo a inibição ou estimulação da síntese de proteínas que medeiam os processos intracelulares.

Na tentativa de elucidar os mecanismos responsáveis pelo ganho de função induzido pela PRL, experimentos realizados em nosso laboratório avaliaram as alterações da expressão gênica em larga escala em ilhotas de ratas tratadas *in vitro* com PRL (BORDIN *et al.*, 2004) e em ilhotas isoladas no final da gestação. Dentre os transcritos regulados em ambas as

condições, selecionamos para investigação proteínas relacionadas à sinalização intracelular, em especial aqueles cuja função na célula β ainda não era bem estabelecida. Os resultados obtidos até o momento mostraram que o aumento de ERK-3 (ANHÊ *et al.*, 2006) e STAT3 (ANHÊ *et al.*, 2007) têm participação importante na melhora da resposta secretora de insulina observada na gestação. A via das SMADs, uma terceira via regulada pela PRL identificada nos nossos trabalhos anteriores, ainda não está bem caracterizada na célula β pancreática.

Um amplo estudo baseado em farmacogenômica identificou a proteína BMP-9, uma proteína expressa predominantemente no fígado (SONG *et al.*, 1995), como um potencial alvo terapêutico para o *diabetes mellitus* tipo II (CHEN *et al.*, 2003). BMP-9 mostrou-se a mais potente mimetizadora da ação da insulina, apresentando resposta positiva para dois critérios avaliados: redução da expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) em hepatócitos e ativação da AKT/PKB em miotubos diferenciados. Além disso, o tratamento *in vivo* com BMP-9 reduziu a glicemia tanto de ratos normais quanto de diabéticos, sendo que tal habilidade parece estar associada com sua capacidade de (i) aumentar a secreção de insulina nas células β pancreáticas, (ii) regular a sinalização metabólica através da glicogênio sintase quinase (GSK) no músculo e, (iii) inibir a produção hepática de glicose (CHEN *et al.*, 2003).

Membros da superfamília das TGF- β têm sido relacionados ao câncer pancreático, pancreatite e à diferenciação do pâncreas exócrino e endócrino (BRORSON *et al.*, 2001). De fato, há mutações no gene de SMAD4 em cerca de metade de todos os tipos de cânceres pancreáticos em humanos (HAHN *et al.*, 1996). Análises de expressão gênica mostraram que SMAD1, SMAD2 e SMAD4 são expressas em ilhotas pancreáticas, sendo SMAD1 e SMAD4 predominantemente expressas em células β (BRORSON *et al.*, 2001). Esses resultados indicam uma participação funcional das BMPs nas ilhotas pancreáticas. Ademais, as expressões gênicas de SMAD1 e SMAD8 revelaram-se significativamente aumentadas em células AR42J diferenciadas a um fenótipo positivo para secreção de insulina (YEW *et al.*,

2005). Por fim, camundongos nocauteados no receptor BMPRI1A de células β pancreáticas apresentaram diminuição na expressão de genes-chave envolvidos na expressão gênica de insulina, processamento da pró-insulina, sensibilidade à glicose, sinalização de incretinas e exocitose de grânulos de insulina. Tais eventos estão associados à diminuição da atividade das BR-SMADs (GOULLEY *et al.*, 2007). No entanto, a participação de cada membro da família das BR-SMAD na fisiologia da célula β ainda não foi estudada.

1.2 Secreção de insulina e o complexo SNARE

Em linhas gerais, o processo de exocitose dos grânulos de insulina contidos nas células β pancreáticas tem início quando os níveis extracelulares de glicose aumentam. Através dos transportadores GLUT2 (*Glucose Transporter 2*), localizados na membrana plasmática das células β , as moléculas de glicose ganham o citoplasma e são rapidamente metabolizadas, acarretando em aumento da razão ATP/ADP (MALAISSE e SENER, 1987). Este último evento leva ao fechamento de canais de potássio sensíveis ao ATP e, assim, à despolarização das células β (COOK e HALES, 1984). Tal despolarização leva à abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e, conseqüentemente, aumento da concentração intracelular de cálcio (SATIN e COOK, 1985). Simplificadamente, este último processo permite que as vesículas contendo insulina se fundam à membrana plasmática das células β por meio de um processo dependente das proteínas da família SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptors*) (RORSMAN *et al.*, 2000).

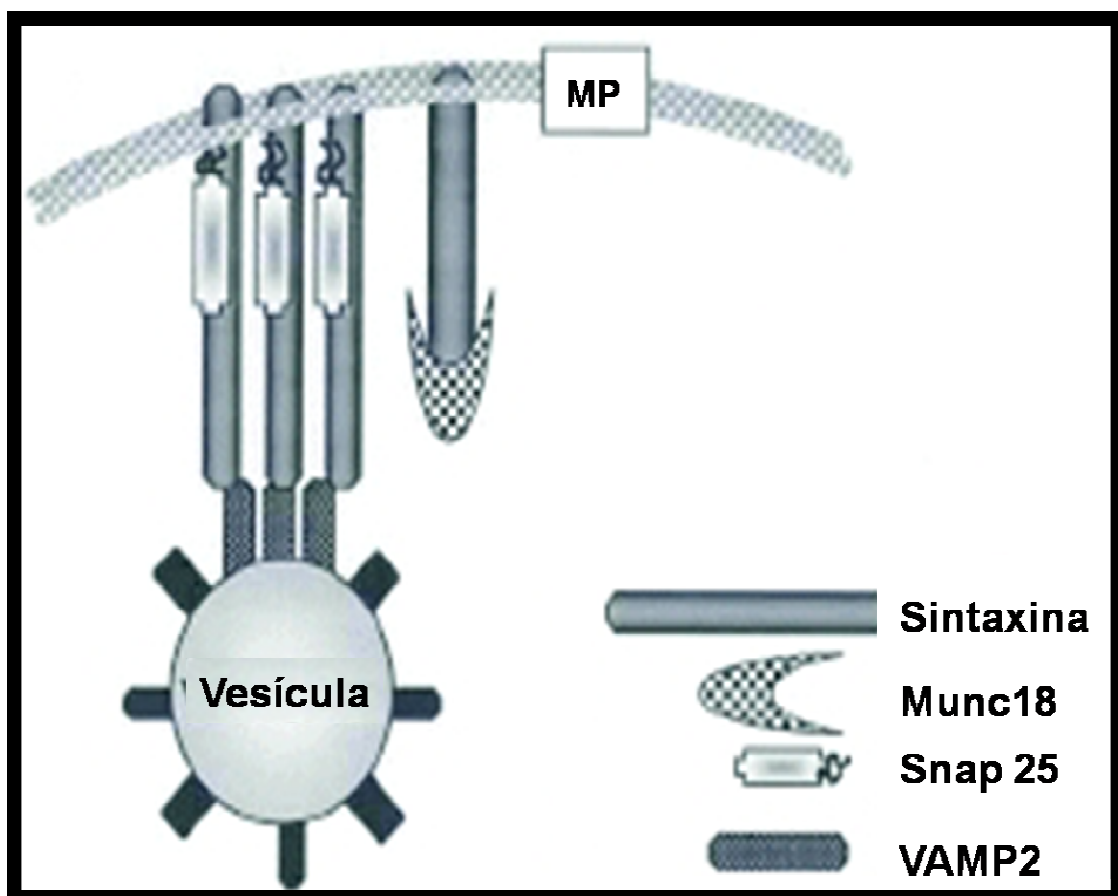
Devido à abundância e à relativa facilidade de isolá-las, as vesículas sinápticas têm sido uma rica fonte para o estudo das proteínas envolvidas no processo de exocitose (SÜDHOF, 1995). Porém, as proteínas das famílias SNARE, SM (*Sec1/Munc18*) e Rab (*Small GTPase Superfamily-related Proteins*), com importante participação da proteína NSF (*N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion Protein*) e de suas proteínas adaptadoras, estão provavelmente envolvidas em todas as reações que conduzem à fusão entre vesícula secretora

e membrana plasmática, o que implica no fato de que, virtualmente, todas as proteínas descritas na exocitose de vesículas sinápticas também desempenham funções em processos de exocitose de peptídeos endócrinos (GERBER e SÜDHOF, 2002).

As principais proteínas que integram a família SNARE são: SNAP25 (*Synaptosomal-associated Protein of 25 kDa*), SNAP 23 (*Synaptosomal-associated Protein of 23 kDa*), sintaxina 1, sintaxina 2, sintaxina 3, sintaxina 4, VAMP1 (*Vesicle-associated membrane protein 1*) e VAMP2 (*Vesicle-associated membrane protein 2*). Estas duas últimas, respectivamente, são também denominadas sinaptobrevina 1 e sinaptobrevina 2. Ademais, SNAP25, SNAP23 e sintaxinas localizam-se predominantemente na membrana plasmática, sendo conhecidas como t-SNARE (*target* SNARE), enquanto VAMP1 e VAMP2 são encontradas, exclusivamente, na membrana vesicular, sendo conhecidas como v-SNARE (*vesicular* SNARE) (GERBER e SÜDHOF, 2002). As proteínas da família SNARE conservam entre si uma sequência de aproximadamente 60 resíduos conhecida como motivo SNARE. Usualmente exibem domínios transmembrana (VAMP e sintaxinas) ou, do contrário, associam-se às membranas através de resíduos de palmitoil que se ligam a quatro resíduos de cisteína (SNAP25 e SNAP23) (SUTTON *et al.*, 1998; HODEL, 1998). Tais proteínas dispõem-se em membranas opostas e, através dos motivos SNARE, ligam-se umas as outras para formarem um complexo extremamente estável denominado complexo nuclear (ou complexo SNARE), processo imprescindível à fusão entre vesícula e membrana plasmática (GERBER e SÜDHOF, 2002).

Após a descrição das proteínas do complexo SNARE, tornou-se evidente a necessidade de proteínas acessórias para a correta formação deste complexo. Dentre essas proteínas, as primeiras que se destacaram foram as da família SM, sobretudo Munc18a, Munc18b e, mais recentemente, Munc18c (FERRO-NOVICK e JAHN, 1994; HATA *et al.*, 1993). Munc18a e Munc18b ligam-se à sintaxina 1 e à sintaxina 3, enquanto somente Munc18c liga-se à

sintaxina 4 (GARCIA *et al.*, 1995; TELLAM *et al.*, 1997). Em resumo, as proteínas Munc se ligam às sintaxinas e as inativam, impossibilitando sua interação com as demais proteínas do complexo SNARE (WANG e THURMOND, 2009). Recentemente foi demonstrado que ilhotas pancreáticas em cultura tratadas com prolactina têm aumento da fosforilação em resíduos de serina de Snap25, sintaxina1 e Munc18, acarretando maior formação de complexos SNARE em relação a ilhotas controle (CUNHA *et al.*, 2006). O mecanismo intracelular responsável por este efeito ainda não foi elucidado (Figura 2).



Fonte: www.landesbioscience.com/curie/chapter/2760/ modificado por Fernando Forato Anhô, 2010.

Figura 2. Representação esquemática da sinalização intracelular envolvida na exocitose de vesículas contendo grânulos de insulina. Sintaxina, quando não associada a Munc18, interage com Snap. Sintaxina e Snap, ambas na membrana plasmática (target-SNARE), constituem sítios de ancoragem para vesículas contendo VAMP-2 (vesicle-SNARE). Da ligação de VAMP2 a Sintaxina/Snap forma-se o complexo SNARE, necessário para que as vesículas se fundam à membrana plasmática (MP).

6 CONCLUSÕES

O silenciamento das BR-SMADs alterou a expressão de diversos genes em células β INS1E, conferindo diversas possibilidades de entendimento do papel das BR-SMADs na fisiologia da célula β . A análise mais criteriosa dos resultados acerca das proteínas Snap25, Snap23, Sintaxina 4, Munc18a e Munc18b nos permite concluir que as BR-SMADs estão envolvidas na regulação da secreção de insulina através da modulação de proteínas envolvidas na fusão das vesículas contendo grânulos de insulina à membrana plasmática. As BR-SMADs regulam as proteínas SNARE e SM de maneira específica: SMAD1 está envolvida na regulação de Snap23, Sintaxina 4, Munc18a e Munc18b; SMAD5 e SMAD8 estão envolvidas na regulação de Snap25, Snap23, Sintaxina 4, Munc18a e Munc18b, ficando evidente, portanto, a participação das BR-SMADs nos mecanismos de fusão de vesículas à membrana plasmática. Existe, porém, a necessidade de maiores esclarecimentos acerca da dinâmica de interações entre proteínas da via das SMADs e das famílias SNARE e SM, a fim de tornar mais claro o papel específico de cada membro das BR-SMADs na regulação de proteínas envolvidas no processo de fusão de vesículas.

REFERÊNCIAS*

ANHÊ, F. F.; LELLIS-SANTOS, C.; LEITE, A. R.; HIRABARA, S. M.; BOSCHERO, A. C.; CURI, R.; ANHÊ, G. F.; BORDIN, S. Smad5 regulates AKT2 expression and insulin-induced glucose uptake in L6 myotubes. *Molecular and Cell Endocrinology*, v. 319, p. 30-8, 2010.

ANHÊ, G. F.; HIRABARA, S. M.; TURRER, T. C.; CAPERUTO, L. C.; ANHÊ, F. F.; RIBEIRO, L. M.; MARÇAL, A. C.; CARVALHO, C. R.; CURI, R.; MACHADO, U. F.; BORDIN, S. Postpartum glycemic homeostasis in early lactating rats is accompanied by transient and specific increase of soleus insulin response through IRS2/AKT pathway. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 292, p. 2225-33, 2007.

ANHÊ, G. F.; TORRÃO, A. S.; NOGUEIRA, T. C.; CAPERUTO, L. C.; AMARAL, M. E.; MEDINA, M. C.; AZEVEDO-MARTINS, A. K.; CARPINELLI, A. R.; CARVALHO, C. R.; CURI, R.; BOSCHERO, A. C.; BORDIN, S. ERK3 associates with MAP2 and is involved in glucose-induced insulin secretion. *Molecular and Cell Endocrinology*, v. 251, p.33-41, 2006.

BONNER-WEIR, S. Regulation of pancreatic beta-cell mass in vivo. *Recent Progress in Hormone Research*, v.49, p. 91-104, 1994.

BORDIN, S.; AMARAL, M. E.; ANHÊ, G. F.; DELGHINGARO-AUGUSTO, V.; CUNHA, D. A.; NICOLETTI-CARVALHO, J. E.; BOSCHERO, A. C. Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. *Molecular and Cell Endocrinology*, v. 220, p. 41-50, 2004.

BRORSON, M.; HOUGAARD, D. M.; NIELSEN, J. H.; TORNEHAVE, D.; LARSSON, L. L. Expression SMAD signal transduction molecules in the pancreas. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 116, p. 263-267, 2001.

CHEN, C.; GRZEGORZEWSKI, K. J.; BARASH, S.; ZHAO, Q.; SCHNEIDER, H.; WANG, Q.; SINGH, M.; PUKAC, L.; BELL, A. C.; DUAN, R.; COLEMAN, T.; DUTTARROY, A.; CHENG, S.; HIRSCH, J.; ZHANG, L.; LAZARD, Y.; FISCHER, C.; BARBER, M. C.; MA, Z.; ZHANG, Y.; REAVEY, P.; ZHONG, L.; TENG, B.; SANYAL, I.; RUBEN, S.; BLONDEL, O.; BIRSE, C. E. An integrated functional genomics screening program reveals a role for bmp-9 in glucose homeostasis. *Nature Biotechnology*, v. 21, p. 294-301, 2003.

COOK, D. L.; HALES, C. N. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature*, v. 26, p. 271-3, 1984.

CUNHA, D. A.; AMARAL, M. E.; CARVALHO, C. P.; COLLARES-BUZATO, C. B.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C. Increased expression of SNARE proteins and synaptotagmin IV in islets from pregnant rats and in vitro prolactin-treated neonatal islets. *Biological Research*, v. 39, p. 555-66, 2006.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração*. Rio de Janeiro, 2002.

FERRO-NOVICK, S.; JAHN, R. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature*, v. 21, p. 191-3, 1994.

GARCIA, E. P.; MCPHERSON, P. S.; CHILCOTE, T. J.; TAKEI, K.; DE CAMILLI, P. RbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin. *Journal of Cell Biology*, v.129, p.105-20, 1995.

GERBER, S. H.; SÜDHOF, T. C. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes*, v. 51, p. S3-11, 2002.

GOULLEY, J.; DAHL, U.; BAEZA, N.; MISHINA, Y.; EDLUND, H. BMP4-BMPRII signaling in β cells is required for and augments glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metabolism*, v. 5, p.207-219, 2007.

GRAHAM, M. E.; SUDLOW, A. W.; BURGOYNE, R. D. Evidence against an acute inhibitory role of nSec-1 (munc-18) in late steps of regulated exocytosis in chromaffin and PC12 cells. *J. Neurochemistry*, v. 69, p. 2369-77, 1997.

GREEN, B. D.; IRWIN, N.; FLATT, P. R. Direct and indirect effects of obestatin peptides on food intake and the regulation of glucose homeostasis and insulin secretion in mice. *Peptides*, v. 28, p. 981-7, 2007

GREEN, I. C.; TAYLOR, K. Y. Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of Langerhans. *The Journal of Endocrinology*, v. 54, p. 317-25, 1972.

HAHN, S. A.; SCHUTTE, M.; HOQUE, A. T.; MOSKALUK, C. A.; DA COSTA, L. T.; ROZENBLUM, E.; WEINSTEIN, C. L.; FISCHER, A.; YEO, C. J.; HRUBAN, R. H.; KERN, S. E. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*, v. 271, p. 350-3, 1996.

HATA, Y.; SLAUGHTER, C. A.; SÜDHOF, T. C. Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature*, v. 25, p. 347-51, 1993.

HELLMAN, B. Impressions from trips to some European centers for experimental diabetes research. *Svenska Läkartidningen*, v. 57, p.2563-6, 1960.

HODEL, A. Snap-25. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 30, p. 1069-73, 1998.

HOGAN, B. L. Bone morphogenetic proteins in development. *Current Opinion in Genetics and Development*, v. 6, p. 432-8, 1996.

KEBEDE, M.; FAVALORO, J.; GUNTON, J. E.; LAYBUTT, D. R.; SHAW, M.; WONG, N.; FAM, B. C.; ASTON-MOURNEY, K.; RANTZAU, C.; ZULLI, A.; PROIETTO, J.; ANDRIKOPOULOS, S. Fructose-1,6-bisphosphatase overexpression in pancreatic beta-cells results in reduced insulin secretion: a new mechanism for fat-induced impairment of beta-cell function. *Diabetes*, v. 57, p. 1887-95, 2008.

LANG, J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *European Journal of Biochemistry*, v. 259, p. 3-17, 1999.

MALAISSIE, W. J.; SENER, A. Glucose-induced changes in cytosolic ATP content in pancreatic islets. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 18, p. 190-5, 1987.

MASSAGUÉ, J. TGF-beta signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, v.67, p.753-91, 1998.

MAZERRBOURG, S.; SANGKUHL, K.; LUO, C. H.; SUDO, S.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses. *The Journal of Biological Chemistry*, v.280, p. 32122-32, 2005.

NAGAMATSU, S.; NAKAMICHI, Y.; YAMAMURA, C.; MATSUSHIMA, S.; WATANABE, T.; OZAWA, S.; FURUKAWA, H.; ISHIDA, H. Decreased expression of t-SNARE, Syntaxin 1 and SNAP-25 in pancreatic β -cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets. *Diabetes*, v. 48, p. 2367-72, 1999.

NIELSEN, J. H.; GALSGAARD, E. D.; MOLDRUP, A.; FRIEDRICHSEN, B. N.; BILLESTRUP, N.; HANSEN, J. A.; LEE, Y. C.; CARLSSON, C. Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes*, v. 50, p. 25-29, 2001.

PARSONS, J. A.; BRELJE, T. C; SORENSON, R. L. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology*, v. 130, p. 1459-66, 1992.

PROCINO, G.; BARBIERI, C.; TAMMA, G.; DE BENEDICTIS, L.; PESSIN, J. E.; SVELTO, M.; VALENTI, G. AQP2 exocytosis in the renal collecting duct -- involvement of SNARE isoforms and the regulatory role of Munc18b. *Journal of Cell Science*, v. 15, p. 2097-106, 2008.

RORSMAN, P.; ELIASSON, L.; RENSTRÖM, E.; GROMADA, J.; BARG, S.; GÖPEL, S. The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News in Physiological Sciences*, v. 15, p.72-7, 2000.

SADOUL, K.; BERGER, A.; NIEMANN, H.; WELLER, U.; ROCHE, P. A.; KLIP, A.; TRIMBLE, W. S.; REGAZZI, R.; CATSICAS, S.; HALBAN, P. A. SNAP-23 is not cleaved by botulinum neurotoxin E and can replace SNAP-25 in the process of insulin secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 26, p. 33023-7, 1999.

SAITO, T.; OKADA, S.; YAMADA, E.; OHSHIMA, K.; SHIMIZU, H.; SHIMOMURA, K.; SATO, M.; PESSIN, J. E.; MORI, M. Syntaxin 4 and Synip (syntaxin 4 interacting protein) regulate insulin secretion in the pancreatic beta HC-9 cell. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 14, p. 921-8, 2005.

SATIN, L. S.; COOK, D. L. Voltage-gated Ca²⁺ current in pancreatic B-cells. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, v. 404, p. 385-7, 1985.

SMITH, F. E.; BONNER-WEIR, S.; LEAHY, J. L.; LAUFGRABEN, M. J.; OGAWA, Y.; ROSEN, K. M.; VILLA-KOMAROFF, L. Pancreatic Reg/pancreatic stone protein (PSP) gene expression does not correlate with beta-cell growth and regeneration in rats. *Diabetologia*, v.37, p. 994-9, 1994.

SONG, J. J.; CELESTE, A. J.; KONG, F. M.; JIRTLE, R. L.; ROSEN, V.; THIES, R. S. Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology*, v. 136, p. 4293-7, 1995.

SORENSEN, R. L.; BRELJE, T. C. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Hormone and Metabolic Research*, v. 29, p. 301-7, 1997.

SPURLIN, B. A.; THURMOND, D. C. Syntaxin 4 facilitates biphasic glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic β -cells. *Molecular Endocrinology*, v. 20, p. 183-93, 2009.

SÜDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, v. 22, p. 645-53, 1995.

SUTTON, R. B.; FASSHAUER, D.; JAHN, R.; BRUNGER, A. T. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4Å resolution. *Nature*, v. 395, p. 328-9, 1998.

TELLAM, J. T.; MACAULAY, S. L.; MCINTOSH, S.; HEWISH, D. R.; WARD, C. W.; JAMES, D. E. Characterization of Munc-18c and syntaxin-4 in 3T3-L1 adipocytes. Putative role in insulin-dependent movement of GLUT-4. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 7, p. 6179-86, 1997.

TOMAS, A.; MEDA, P.; REGAZZI, R.; PESSIN, J. E.; HALBAN, P. A. Munc 18-1 and granuphilin collaborate during insulin granule exocytosis. *Traffic*, v. 9, p. 813-32, 2008.

VERHAGE, M.; MAIA, A. S.; PLOMP, J. J.; BRUSSAARD, A. B.; HEEROMA, J. H.; VERMEER, H.; TOONEN, R. F.; HAMMER, R. E.; VAN DEN BERG, T. K.; MISSLER, M.; GEUZE, H. J.; SÜDHOF, T. C. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*, v. 4, p. 864-9, 2000.

VON BUBNOFF, A.; CHO, K. W. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Developmental Biology* v. 239, p. 1-14, 2001.

WANG, Z.; THURMOND, D. C. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *Journal of Cell Science*, v. 122, p. 893-903, 2009.

WON, K. C.; MOON, J. S.; EUN, M. J.; YOON, J. S.; CHUN, K. A.; CHO, I. H.; KIM, Y. W.; LEE, H. W. A protective role for heme oxygenase-1 in INS-1 cells and rat islets that are exposed to high glucose conditions. *Journal of Korean Medical Science*, v. 21, p. 418-24, 2006.

YÁÑEZ, A. J.; BUSTAMANTE, X.; BERTINAT, R.; WERNER, E.; RAUCH, M. C.; CONCHA, I. I.; REYES, J. G.; SLEBE, J. C. Expression of key substrate cycle enzymes in rat spermatogenic cells: fructose 1,6 bisphosphatase and 6 phosphofructose 1-kinase. *Journal of Cell Physiology*, v.212, p. 807-16, 2007.

YEW, K.; HEMBREE, M.; PRASADAN, K.; PREUETT, B.; MCFALL, C.; BENJES, C.; CROWLEY, A.; SHARP, S.; TULACHAN, S.; MEHTA, S.; TEL, E.; GITTES, G. Cross-talk between bone morphogenetic protein and transforming growth factor- β signaling is essential for exendin-4-induced insulin-positive differentiation of AR42J cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 32209-17, 2005.