

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CAROLINA RUOSO

**O PAPEL DO HNF4 α NA EXPANSÃO DA MASSA DE
CÉLULA β INDUZIDA POR DEXAMETASONA**

Florianópolis
2019

CAROLINA RUOSO

**O PAPEL DO HNF4 α NA EXPANSÃO DA MASSA DE
CÉLULA β INDUZIDA POR DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas como requisito para a obtenção do título de mestra em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Jorge dos Santos.

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ruoso, Carolina

O PAPEL DO HNF4A NA EXPANSÃO DA MASSA DE CÉLULA B
INDUZIDA POR DEXAMETASONA / Carolina Ruoso ;
orientador, Gustavo Jorge dos Santos, 2019.
56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. HNF4A. 3. Diabetes
Mellitus. 4. Plasticidade Pancreática. 5.
Dexametasona. I. Santos, Gustavo Jorge dos. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.
III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

AUTORA: CAROLINA RUOSO

TÍTULO: O PAPEL DO HNF4 α NA EXPANSÃO DA MASSA DE CÉLULA β INDUZIDA POR DEXAMETASONA

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de mestra e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2019.

Prof. Prof. Dr. Vander Baptista
Coordenador do PPGMCF

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a Fernanda Barbosa (CFS/CCB/UFSC)

Dr.^a Sandra Mara Ferreira (IB/UNICAMP)

Prof.Dr.^a Renata Lataro (CFS/CCB/UFSC) – Membro Suplente

Dedico este trabalho à mãe (*in memoriam*)
que proporcionou a vida e com seu imenso
amor sempre buscou fazer do possível e o
impossível para que eu pudesse ter uma vida
digna e de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades, desafios, conquistas e força diante de todas as dificuldades para que nunca desistisse dos meus objetivos.

Aos amigos (*brothers*) e familiares que sempre quando precisei desabafar estiveram dispostos a me ouvir, por estarem presentes nos momentos difíceis e de contentamento durante esta trajetória, torcendo sempre pelo meu sucesso e compreendendo minhas escolhas e abdições para obtenção desta conquista.

Ao meu orientador, Dr. Gustavo Jorge dos Santos, por proporcionar todo seu conhecimento para a construção e desenvolvimento do projeto, paciência e suporte para explicar todas as técnicas e conhecimentos fundamentais para melhor entendimento dos resultados encontrados, compreensão de minhas limitações, proporcionando formas de serem superadas.

Aos colegas do laboratório do LIDoC que desde o primeiro momento de contato com a ciência tiveram a paciência e atenção de transmitir o conhecimento e técnicas de laboratório que foram de suma importância para formar o que sou hoje durante estes anos em que estive envolvida com o mestrado.

À equipe do Landi que também fizeram parte da rotina de laboratório e no biotério, em que muitas vezes foram grandes ouvintes auxiliando no que diz respeito ao comportamento animal e rotina do biotério.

Aos funcionários da UFSC localizados na Histologia que tiveram paciência em ensinar as técnicas histológicas, bem como, proporcionaram um ambiente agradável de trabalho. Assim como às funcionárias do LAMEB que também foram excepcionais no atendimento e ensino das técnicas de microscopia e histológica, bem como à equipe do LAPOGE.

Ao professor Dr. Alex Rafacho, pelas suas aulas e todo conhecimento proporcionado nelas. Assim como o professor Dr. Everson Soares, que mudou minha visão do “ser cientista” e sua disponibilidade para esclarecer dúvidas pertinentes ao desenvolvimento do meu projeto.

Aos professores da UFRGS da Pós em Fisiologia, à professora da Pós em Neurociências Dr. Lenir na qual proporcionou aprendizado a cerca do comportamento animal durante o período em que estive em Porto Alegre.

Aos funcionários terceirizados do CFS que, mesmo de forma indireta, foram fundamentais para o desenvolvimento do meu projeto e minha rotina de trabalho.

Por fim, a UFSC pela infraestrutura e a CNPq/CAPES e pela FAPESC pelo financiamento desta pesquisa.

Imensa gratidão a todos vocês!

*“Que a força do medo que tenho não me
impeça de ver o que anseio.”*
(Fernando Pessoa)

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla, poligênica, caracterizado por hiperglicemia crônica, resultante da depleção total de células β (DM do Tipo 1) ou por consequência de uma resistência à insulina (RI) (DM do Tipo 2). Observa-se também a existência do DM monogênico, como o MODY1 causado pela mutação do gene que expressa o fator de transcrição HNF4 α . O HNF4 α é importante para células β pancreáticas, pois controla genes relacionados com o metabolismo da glicose e com a expressão gênica da insulina e proliferação. É sabido que HNF4 α controla o aumento de massa de células β em resposta ao estresse, como a gravidez, através da ativação da via ERK-ST5. A dexametasona é um glicocorticoide sintético com potente efeito diabetogênico. Animais tratados com dexametasona desenvolvem Resistência à Insulina (RI) e, conseqüentemente, aumento de massa de células β pancreáticas. Independente da etiologia, qualquer forma de DM apresenta perda de massa secretora de insulina, por isso é importante investigar vias que induzem o aumento da massa desse tipo celular. Baseado no fato que (1) o HNF4 α é crucial para a proliferação de célula β , (2) RI induzida por dexametasona promove aumento de massa de célula β e, (3) estimular a regeneração de massa de célula β pode ser um alvo terapêutico importante para o DM, nós investigamos se a proliferação de células β pancreáticas induzidas por dexametasona é dependente do HNF4 α . Para isso, utilizamos animais WildType (C) e *Knockout* (K) para o HNF4- α (HNF4 α ^{loxP/loxP;Ins.Cre}), tratados ou não com 10 mg/Kg/dia de dexametasona, por 5 dias consecutivos, dose dividida em duas aplicações ao dia. No dia seguinte à última injeção de dexametasona a RI foi comprovada por ipITT e os animais foram eutanasiados para retirada do pâncreas. Os dados foram analisados pelo software Graph Prisma 6. Em comparação aos animais C, animais *knockout* apresentaram maior tolerância à glicose, menor glicemia de jejum e GSIS (*Glucose Secretion Insulin Stimulation*) aumentada, a expressão gênica de HNF4 α aumentada nos animais CD, a expressão gênica dos hormônios glucagon e somatostatina aumentou com o tratamento do DEXA somente em animais WT. O DEXA aumentou do mRNA do PDX1 e NGN3 apenas nos animais WT, indicando que essa modulação pode ser dependente de HNF4 α . Com isso,

concluimos que o aumento de massa de célula β induzida por DEXA é dependente da ação do fator de transcrição HNF4 α .

Palavras-chave: HNF4 α ; Diabetes Mellitus; proliferação; insulina; dexametasona.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic syndrome with multiples etiology, characterized by chronic hyperglycemia due to total β -cell depletion (DM Type 1) or insulin resistance (IR) (DM Type 2). It is also observed the existence of monogenic DM, such as MODY1 caused by the mutation of the HNF4 α gene. HNF4 α is important for pancreatic β cells since it controls genes related to glucose metabolism and insulin gene expression. It is known that HNF4 α controls the β -cell mass expansion in response to stress, such as pregnancy, through the activation of the ERK-ST5 pathway. Dexamethasone is a synthetic glucocorticoid with potent diabetogenic effect. Dexamethasone-treated animals develop Insulin Resistance (IR) and consequently increase pancreatic β cell mass. Regardless of the etiology, any form of DM presents loss of insulin-secreting cell mass, so it is important to investigate pathways that induce the increase of the mass of this cellular type. Based on the fact that (1) HNF4 α is crucial for β cell proliferation, (2) dexamethasone-induced RI promotes β cell mass increase, and (3) stimulating β cell mass regeneration may be an important therapeutic target for DM, we investigated whether dexamethasone-induced proliferation of β pancreatic cells is dependent on HNF4 α . For this, we used WildType (WT) and Knockout (KO) animals for HNF4- α (HNF4 α ^{loxP / loxP; Ins.Cre}), treated or not with 10 mg/Kg/day of dexamethasone, for 5 consecutive days. The day after the last injection of dexamethasone the RI was confirmed by ipITT and the animals were euthanized for removal of the pancreas. Data were analyzed by Graph Prisma 6 software. In comparison to WT animals, KO animals presented higher glucose tolerance, lower fasting glucose and increased GSIS. We evaluated the gene expression of HNF4 α in treated and untreated animal islets and observed increased expression in CD animals, suggesting that the glucocorticoid used increases the pathway of activation of HNF4 α gene expression. We evaluated the gene expression of glucagon and somatostatin hormones, where observed that treatment with DEXA increased the expression of the hormones analyzed only in WT animals. We decided to deepen the investigation and evaluate the gene expression of transcription factors essential to the pancreatic β -cell phenotype, and we observed that treatment with DEXA promoted the increase of PDX1 and NGN3 mRNA only in WT animals, indicating that this modulation is dependent on HNF4 α .

Thus, we conclude that the increase of glucocorticoid-induced β cell mass is dependent on the action of the HNF4 α transcription factor.

Keywords: HNF4 α ; Diabetes Mellitus; proliferation; insulin; dexamethasone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho Experimental.....	28
Figura 2. Análise da expressão gênica do HNF4 α	34
Figura 3. Metabolismo glicêmico dos animais <i>knockout</i>	35
Figura 4. Insulinemia, GSIS e ipITT dos animais <i>knockout</i>	37
Figura 5. ipITT, kITT e ipGTT dos animais <i>knockout</i> tratados ou não com Dexametasona	39
Figura 6. IHQ dos animais <i>knockout</i> tratados ou não com Dexametasona	40
Figura 7. Expressão gênica em Animais <i>knockout</i> tratados ou não com Dexametasona	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anks4b - *Ankyrin Repeat and Sterile α Motif Domain Containing 4b*
ARX - *Aristaless-Related Homeobox* / Homeobox Relacionado a Aristaless
ATP - *Adenosine Triphosphate* / Trifosfato de Adenosina
CD - Controle Dexametasona
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
cDNA - *Complementary Deoxyribonucleic Acid* / Ácido Desoxirribonucleico complementar
CS - Controle Salina
DAB - Diaminobenzidina
DEXA - Dexametasona
DM - Diabetes Mellitus
DM2 - Diabetes Mellitus do Tipo 2
DM1 - Diabetes Mellitus do Tipo 1
Fas - *Apoptosis stimulating fragment* / Fragmento estimulante de apoptose
FT - Fator de Transcrição
GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* / Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC - Glicocorticoides
GCK - Glicoquinase
GLUT 2 - *Glucose transporter 2* / Transportador de glicose 2
GRP78 - *Glucose-Regulated Protein 78*
GSIS - *Glucose Secretion Insulin Stimulation* / Secreção de Insulina Estimulada por Glicose
HHEX - *Hematopoietically Expressed Homeobox*
HNF4 α - *Hepatocyte Factor Nuclear 4 alpha* / Fator Hepático Nuclear 4 alfa
ipGTT - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
ipITT - Teste intraperitoneal de tolerância à insulina
IL-1 β - Interleucina-1beta
IFN- γ - *Interferon gama*
KO - *Knockout*
KD - *Knockout* Dexametasona
KS - *Knockout* Salina
MODY1 - *Maturity Onset Diabetes of the Young 1* / Diabetes de início na maturidade dos jovens 1

mRNA – *messenger Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucleico
mensageiro
NGN3 - Neurogenina 3
NO - *Nitric Oxide* / Óxido Nítrico
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAX4 - *Paired Box 4*
PBS (*Phosphate Buffered Saline*) / Tampão fosfato
PDX1 - *Pancreatic and Duodenal Homeobox Gene 1*
RI – Resistência à Insulina
RIA – Radioimunoensaio
RAS – *Rat Sarcome Virus*
ERK – *extracellular signal-regulated kinase* / Quinase
controlada por sinalização extracelular
TNF- α - *Fator de Necrose Tumoral alpha* / Fator de Necrose
Tumoral alfa
WT – *Wild Type* / Tipo Selvagem / Controle

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Descrição do diabetes	17
1.2 HNF4 α , célula β e proliferação	19
1.3 Resistência à insulina, aumento da massa de célula β e HNF4 α	20
1.4 Dexametasona como modelo de RI	22
2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivos gerais	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 Animais	26
4.2 Genotipagem	27
4.3 Desenho experimental	28
4.4 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)	28
4.5 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)	28
4.6 Imunohistoquímica	29
4.7 Isolamento das ilhotas pancreáticas	29
4.8 Real Time-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	29
4.9 Análise Estatística	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Descrição do diabetes

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica multifatorial, caracterizada por hiperglicemia crônica, decorrente de uma produção inadequada de insulina pelas células β pancreáticas ou uma resposta inapropriada dos tecidos periféricos a este hormônio (Chen *et al.*, 2018). Mesmo com todo o empenho dos órgãos públicos de saúde, a população com DM cresce anualmente e, aproximadamente 700 mil pessoas foram diagnosticadas entre os anos de 2011 e 2015 (Association, 2018). Essa doença apresenta elevado grau de mortalidade, em 2012 cerca de 1,5 milhões de mortes ocorreram por causas diretas dessa patologia. Representa ainda um grande problema de saúde pública, uma vez que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre os anos de 2011 e 2030, o custo estimado com a doença permeia 1,7 trilhões de dólares.

A duas principais formas da doença são conhecidas como DM do tipo 1 (DM1) e DM do tipo 2 (DM2) e, apesar de ambos serem poligênicos, diferem em sua etiologia (Rojas *et al.*, 2018). O DM1 decorre de uma redução da massa de células β - por exemplo, por apoptose e/ou dediferenciação - que ocorre pelo contato com células do sistema imune e pela ação de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas (Rojas *et al.*, 2018). Esse contato é decorrente de uma falha no reconhecimento de proteínas específicas das células β pelo sistema imune e pela infiltração das ilhotas por neutrófilos ativados, que liberam citocinas pró-inflamatórias como Interleucina-1 β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), e radicais livres, como o óxido nítrico (NO). As células β possuem receptores para estas citocinas, que ativam vias apoptóticas, vias de supressão da síntese proteica e vias de expressão de *Fas* na membrana plasmática, que é um marcador para a ligação de linfócitos T (Rojas *et al.*, 2018). Após semanas ou meses (parâmetros humanos) (Pipeleers e Ling, 1992; Kay *et al.*, 2000), há perda quase total das células β sem prejuízo aos demais tipos celulares que compõem a ilhota pancreática (Mandrup-Poulsen, 1996; Eizirik e Mandrup-Poulsen, 2001; Cnop *et al.*, 2005; Eizirik *et al.*, 2009).

O DM2, por sua vez, caracteriza-se por hiperglicemia e está associada à obesidade, resistência periférica à insulina (RI), disfunção da célula β pancreática e alteração no *clearance* de insulina (Hansen *et al.*, 1993; Mittelman *et al.*, 2000; Kahn, 2003; Weir e Bonner-Weir, 2004; Kotronen *et al.*, 2008; Poitout *et al.*, 2010; Rezende *et al.*, 2012). Entretanto, o DM2 se instala apenas quando ocorre a falência das células β , reforçando o papel central dessas células na gênese desta patologia (Weir e Bonner-Weir, 2004; Kitamura, 2013). Inicialmente as células β compensam a RI promovendo um aumento de massa e volume, viabilizando assim uma maior produção e secreção deste hormônio (Gupta e Kaestner, 2004). Com a progressão do DM2, já em um período descompensatório, onde ocorre um ligeiro aumento da glicemia, existe uma redução progressiva da massa e da função da célula β . Com este progresso o desajuste se torna mais intenso levando a hiperglicemia decorrente de uma severa redução da massa e função das células β (Weir e Bonner-Weir, 2004; Poitout *et al.*, 2010).

Tanto o DM1 como DM2 são formas poligênicas do DM, todavia existem as formas monogênicas de DM, como o *Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY) (Firdous *et al.*, 2018), caracterizado por uma herança genética de dominância autossômica de diagnóstico precoce, geralmente antes dos 24 anos de idade (Gupta e Kaestner, 2004). O MODY resulta de uma mutação mendeliana de ao menos 16 diferentes genes (Firdous *et al.*, 2018), entre eles o *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* (HNF4 α) que é responsável pelo MODY1 (Gupta e Kaestner, 2004; Gupta *et al.*, 2007). Nesta doença, o neonato humano pode apresentar hiperglicemia hiperinsulinêmica no pós-parto imediato (Demirbilek *et al.*, 2017). De modo geral, o mais comum é a presença de hiperglicemia não assintomática na criança, adolescente ou jovem antes do seu diagnóstico definitivo (Fajans, 2001) em conjunto com uma secreção de insulina diminuída sem defeito na sua ação, quando não associada com a obesidade (ADA, 2018) e, ao longo dos anos, presença de anormalidades nas lipoproteínas e nas concentrações lipídicas (Dhe-Paganon, 2002). Para nortear o diagnóstico, um critério que distingue o MODY1 dos demais DMs é ter história familiar progressiva de diabetes, em três ou mais gerações, sem a presença de obesidade ou autoimunidade das células pancreáticas (Fajans e Bell; 2011).

Considerada uma doença bastante rara, no Reino Unido e EUA o MODY representa em torno de 1 a 2% dos casos de diabetes rastreados em jovens (Unnikrishnan, 2016), porém devemos considerar que o exame genético não é algo realizado de rotina na clínica.

1.2 HNF4 α , célula β e proliferação

O HNF4 α é um fator de transcrição (FT) pertencente à superfamília de receptores hormonais nucleares (NR2A1). Apresenta diferentes domínios em sua estrutura, entre eles um domínio de transativação N-terminal, um domínio de ligação ao DNA do tipo dedos de zinco e uma região C-terminal crucial para sua dimerização (Ihara *et al.*, 2005). Em adultos esse FT é altamente expresso no fígado e, em menor grau, nos rins, intestino delgado, cólon e células β pancreáticas (Gonzalez, 2008).

Podemos encontrar diferentes isoformas do HNF4 α (HNF4 α 1-9) que também diferem em termos de distribuição tecidual (Guo and Lu, 2018). A expressão das diferentes isoformas depende do promotor ativado em determinados tecidos: a ativação do promotor proximal P1 resulta na expressão das isoformas HNF4 α 1 ao 6 e é predominante no fígado do adulto e nos rins, já a ativação da região promotora P2 resulta na expressão das isoformas HNF4 α 7 ao 9 e prevalece no fígado fetal, pâncreas e nos cânceres hepáticos e de cólon (Gupta e Kaestner, 2004; Ihara *et al.*, 2005; Bailly *et al.*, 2009; Guo e Lu, 2019). Assim, devido a presença do promotor P2, as isoformas expressas em células β pancreáticas são HNF4 α -7, α 8 e α 9 (Hansen *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008).

Nessas células, esse FT apresenta um papel central na regulação transcricional, incluindo a expressão de genes envolvidos com o metabolismo da glicose (Gupta et al, 2005), como a aldolase B, GLUT2 e a glicoquinase (GCK) (Johnson, 2007), e na secreção de insulina, como a L-piruvato kinase e Kir6.2 (Gupta *et al.*, 2005) – este último, é uma subunidade do canal de potássio sensível a ATP (*Adenosine triphosphate*) que promove a despolarização da membrana plasmática durante o processo de secreção de insulina (Fajans e Bell, 2011). É descrito na literatura que anima K para o HNF4 α especificamente em

células β pancreática (HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre) são intolerantes à glicose e apresentam hiperinsulinemia no jejum e no estado alimentado. Além disso, o HNF4 α regula mais de mil outros genes no fígado e no pâncreas (Gupta e Kaestner, 2004).

O HNF4 α também regula o processo de proliferação e crescimento das células β , principalmente no período de desenvolvimento pancreático durante a gestação (Sandovici *et al.*, 2013) e no período neonatal (Gupta *et al.*, 2007). Foi demonstrado que fêmeas HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre prenhas não apresentam aumento na proliferação de célula β (esperado durante este período) e, conseqüentemente são intolerantes à glicose (Gupta *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado que esses efeitos se devem à redução na via Ras/ERK (*Rat sarcome virus/Extracellular Signal-Regulated Kinase*) (Gupta *et al.*, 2007). Sabe-se também que o HNF4 α controla alguns genes relacionados com apoptose (Odom *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2005) e que também está envolvido na proteção da morte celular induzida por estresse de retículo (Johnson, 2007), através da ativação da via HNF4 α -GRP78-Anks4b (Sato *et al.*, 2012).

1.3 Resistência à insulina, aumento da massa de célula β e HNF4 α

O pâncreas é uma glândula mista composta por uma porção exócrina (ácinos e ductos) e por uma porção endócrina (ilhas de Langerhans) (Zaret e Grompe, 2008). A ilha pancreática, que corresponde à porção endócrina do pâncreas, representa aproximadamente 5% de todo o volume do órgão e é constituída de cinco diferentes tipos celulares: as células α produtoras de glucagon, as células β produtoras de insulina – estas de maior predominância - as células δ produtoras de somatostatina, as células ϵ produtoras de grelina e, em um número muito pequeno, as células PP produtoras do polipeptídeo pancreático (Gupta *et al.*, 2007).

É importante reiterar que a célula β é primordial para a homeostase glicêmica e, sua disfunção resulta em DM. Tanto no desenvolvimento do DM1 como do DM2 existe uma redução progressiva da massa funcional de célula secretora de insulina, assim, regenerar essa massa celular é um alvo terapêutico importante para o DM (Gupta e Kaestner, 2004; Thorel *et al.*,

2010). Atualmente, muito se tem discutido sobre este potencial terapêutico do processo de regeneração de células β para o tratamento do DM (Ferber *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2011; Spijker *et al.*, 2013). Por exemplo, nos estágios iniciais do DM2 observa-se uma resposta metabólica compensatória – aumento da massa celular – com progressiva falência da célula β frente ao estresse metabólico.

Como já mencionado, a RI nos tecidos muscular, adiposo e hepático é um processo central na fisiopatologia do DM2 (Steil *et al.*, 2001). Esse estado de RI desencadeia nas ilhotas pancreáticas, em especial nas células β , uma hipersecreção compensatória de insulina na tentativa de vencer a RI e de se reestabelecer a normoglicemia. Essas alterações podem ser tanto na função celular (aumento da produção e secreção de insulina) como alterações estruturais (ocorrência de hiperplasia e hipertrofia de célula β) (Kahn, 2003; Paulsen *et al.*, 2010). Atualmente se sabe que as células da ilhota pancreática apresentam certa plasticidade e se adaptam a determinados estados *fisio(pato)lógicos*, por exemplo na prenhez, obesidade e RI e, que essa plasticidade pode estar envolvida tanto no aumento da massa de células β na resposta compensatória à RI, como na falência progressiva observada com o passar do tempo (Gupta *et al.*, 2007; Chera *et al.*, 2014; Cigliola *et al.*, 2016).

A plasticidade pancreática é o processo onde um tipo celular diferenciado do pâncreas se transforma em outro também diferenciado e, esse processo é facilitado pelo fato de todas as células pancreáticas terem uma mesma linhagem precursora (Zaret e Grompe, 2008; Ziv *et al.*, 2013). Devido a seu potencial para o tratamento/cura do DM, apareceram, nos últimos anos, vários trabalhos mostrando e discutindo processo de conversão de células não- β em células β pancreáticas (Ferber *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2011; Spijker *et al.*, 2013). Foi mostrado que existem várias possibilidades de reprogramar células já diferenciadas em células β funcionais. A expressão ectópica artificial do PAX4 (*Paired Box 4*), um importante fator de transcrição para o desenvolvimento pancreático no período embrionário, em célula α (Collombat *et al.*, 2009), bem como do FT PDX1 (*Pancreatic and duodenal homeobox gene 1*) em célula α (Yang *et al.*, 2011) e hepatócitos (Ferber *et al.*, 2000) converteu essas células em células secretoras de insulina.

Do outro lado, parece que as células β também apresentam potencial de se dediferenciar em nesta doença. Quando se bloqueia a via da insulina na célula β ou quando ocorre perda desse tipo celular (DM) observa-se que as células β se transdiferenciam em células α (Spijker *et al.*, 2013; Cigliola *et al.*, 2018).

O HNF4 α parece participar dos processos que envolvem a regeneração de célula β . Como mencionado, este FT é crucial para a expansão de massa de células β induzida pela gestação e foi demonstrado que a superexpressão ectópica do HNF4 α , em linhagens de células α , promove a transdiferenciação dessas células em células β -like (Sangan *et al.*, 2015). Essas células β provenientes de células α expressam genes importantes para o fenótipo β , como GCK, insulina e GLUT2 e, apresentam a capacidade de produzir e processar a insulina, apresentando em seu interior peptídeo-C, ou seja, são células β verdadeiramente funcionais.

Assim, elucidar os mecanismos que levam a expansão de células β induzida por RI é fundamental e diversos modelos animais são utilizados para este propósito, dentre eles animais alimentados com dieta hiperlipídica (Dalby *et al.*, 2017), animais geneticamente modificados (Chehab *et al.*, 1997) e animais expostos a glicocorticoides (Rafacho *et al.*, 2008) ou outras drogas como aloxano (Takasu *et al.*, 1991) e streptozotocina (Thorel *et al.*, 2010).

1.4 Dexametasona como modelo de RI

Os glicocorticoides (GC), cortisol em seres humanos e corticosterona em roedores, são hormônios esteroides importantes na resposta a vários eventos estressores como traumas, cirurgias, infecções, inflamações e regulam diversos processos fisiológicos, dentre eles o metabolismo e a proliferação celular. Em condições não patológicas, os GC regulam diversos processos homeostáticos em quase todos os tecidos, como regulação do metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas, função cardiovascular, respostas inflamatórias e desenvolvimento. Ainda, os GC participam da resposta ao jejum, atuando em processos que mantém a normoglicemia e na disponibilização de substrato energético para os tecidos. Para isso, os GC induzem

processos que culminam no aumento da produção endógena de glicose através da glicogenólise e da neoglicogênese hepática, na diminuição da captação de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo e, estimulam a lipólise e a proteólise, gerando substrato energético (Patel *et al.*, 2014).

A Dexametasona (DEXA) é a forma sintética mais utilizada dos GC e é amplamente prescrita para o tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes (Yang *et al.*, 2017). Porém, o uso em altas doses ou de forma crônica induz diversas alterações metabólicas no fígado, no pâncreas, tecido adiposo e glândulas suprarrenais (Liu *et al.*, 2013). A DEXA, como todos os GC, possui um efeito anti-insulínico, ou seja, antagoniza as ações da insulina nos tecidos periféricos. Assim, devido a este efeito anti-insulínico o tratamento com DEXA é vastamente utilizado como um modelo experimental de indução de RI (Rafacho *et al.*, 2008).

2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

Devido a sua função na manutenção da homeostase glicêmica e sua relação com o desenvolvimento do DM, a ilhota pancreática é vastamente estudada. A diferenciação dos vários tipos celulares da ilhota é que determinam o destino inicial de célula α e β , respectivamente (Spijker *et al.*, 2013) controlada por diversos FT, como ARX (*Aristaless-Related Homeobox*) e PAX4. Além da diferenciação, o controle da transcrição gênica é fundamental na manutenção do fenótipo e da função de células já adulta (Shih *et al.*, 2001). Em células β pancreáticas, a importância dos FT pode ser verificada quando se observa o desenvolvimento do MODY1 (Gupta *et al.*, 2007), o qual é decorrente de uma mutação do fator de transcrição HNF4 α , responsável por diversas funções na célula β (Hansen *et al.*, 2002), como metabolismo de glicose e produção e secreção de insulina.

Uma vez instaurado, tanto DM1 como DM2 e MODY apresentam diminuição da função e da massa de célula β e, portanto, estudar mecanismos que promovam a regeneração dessas células é fundamental para traçar novos alvos terapêuticos para o tratamento e uma possível cura desta patologia. Além do processo de proliferação celular, a plasticidade pancreática (diferenciação e transdiferenciação celular) vem sendo apontada como um processo importante na regeneração de célula β . Sabe-se que a condição de RI impõe várias alterações à ilhota, dentre elas proliferação celular e indução de mecanismos de plasticidade. Assim, sabendo que (1) a DEXA induz RI, (2) a RI promove um aumento de massa de célula β , e (3) que o HNF4 α é um fator de transcrição que regula o aumento da massa de célula β induzido por situações de estresse, hipotetizamos que o HNF4 α participa do processo de aumento proliferação ou trans/diferenciação da massa de célula β induzido pelo DEXA.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o papel do HNF4 α na plasticidade das células β em modelo de animais com RI induzida por exposição ao glicocorticoide DEXA.

3.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar o metabolismo glicêmico (ipGTT, ipITT, GSIS, Glicemia de Jejum) dos animais HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre⁺;
- b. Avaliar a instauração da RI induzida pela DEXA;
- c. Avaliar a expressão do HNF4 α em ilhota de animais wild type(C) e animais KO (HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre⁺) expostos ou não à DEXA;
- d. Avaliar se em animais KO a DEXA é capaz de promover aumento da massa secretora de insulina;
- e. Avaliar se a DEXA é capaz de alterar a expressão dos genes dos hormônios glucagon e somatostatina nos diferentes grupos tratados e não tratados;
- f. Avaliar as alterações da expressão dos fatores de transcrição ARX, PAX4, PDX1 e NGN3, em animais C e animais KO expostos ou não à DEXA.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

O estudo foi aprovado pela CEUA/UFSC - número de protocolo 4359060516 (Anexo 01). Para a realização deste trabalho utilizamos animais KOTecido específico e condicional para o HNF4 α (HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre⁺). Os animais foram gerados a partir do cruzamento da linhagem portadora da enzima CRE Recombinase nas células β (linhagem Ins.Cre⁺) e da linhagem que possui o gene para o FT HNF4 α flanqueado pela sequência LoxP (HNF4 α ^{loxP/loxP}). Os animais foram mantidos no biotério setorial do CFS em condições padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de 22 \pm 2 °C. Durante todo o período experimental tiveram livre acesso à água e ração padrão. Para o desenvolvimento experimental, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

- Controle Salina (CS): após a genotipagem, os animais que não expressavam o gene para a enzima CRE e eram homocigotos para a sequência Lox (animais (HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre⁻) foram incluídos nesse grupo. Dez dias após a última injeção de Tamoxifeno (dia 17) os animais desse grupo receberam 10 injeções de salina em 5 dias consecutivos (1 injeção pela manhã e 1 injeção durante a tarde). Para simular o volume aplicado nos grupos DEXA, essas injeções de salina foram de volume igual ao peso do animais multiplicado por 12,5.
- *Knockout* Salina (KS): Após a genotipagem, os animais que expressavam o gene para a enzima CRE e eram homocigotos para a sequência Lox (animais (HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre⁺) foram incluídos nesse grupo. Dez dias após a última injeção de Tamoxifeno (dia 17) os animais desse grupo receberam 10 injeções de salina em 5 dias consecutivos (1 injeção pela manhã e 1 injeção durante a tarde). Para simular o volume aplicado nos grupos DEXA, essas injeções de salina foram de volume igual ao peso do animais multiplicado por 12,5.
- Controle Dexa (CD): Após a genotipagem, os animais que não expressavam o gene para a enzima CRE e eram

homozigotos para a sequência Lox (animais (HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre⁻) foram incluídos nesse grupo. Dez dias após a última injeção de tamoxifeno (dia 17) os animais desse grupo receberam 10 injeções de Dexametasona¹, em 5 dias consecutivos (1 injeção pela manhã e 1 injeção durante a tarde). A dose diária de DEXA foi de 100 mg/Kg, dividida em 50 mg/kg pela manhã e 50 mg/kg no período da tarde.

- **Knockout Dexta (KD):** Após a genotipagem, os animais que expressavam o gene para a enzima CRE e eram homozigotos para a sequência Lox (animais (HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre⁺) foram incluídos nesse grupo. Dez dias após a última injeção de Tamoxifeno (dia 17) os animais desse grupo receberam 10 injeções de Dexametasona¹, em 5 dias consecutivos (1 injeção pela manhã e 1 injeção durante a tarde). A dose diária de DEXA foi de 100 mg/Kg, dividida em 50 mg/kg pela manhã e 50 mg/kg no período da tarde.

4.2 Genotipagem

A genotipagem dos animais foi realizada a partir do DNA extraído da cauda dos animais. Um fragmento da cauda foi incubado a 55 °C, *overnight*, com Proteinase K (Roche, USA). Para a determinação da enzima CRE recombinase foi realizado um RT-PCR para o gene CRE, conforme instrução do produtor dos animais (*Jackson Laboratory*, USA). Da mesma forma, para determinar se os animais eram homozigotos para a sequência LOX, foi realizado um PCR conforme instruções do produtor do animal (*Jackson Laboratory*, USA). Como descrito no item 4.1, o animais considerado experimental é aquele que, após a genotipagem, foi positivo para o gene CRE e homozigoto para a sequência LOX.

¹ Foi utilizado o fármaco Decadron®.

4.3 Desenho experimental

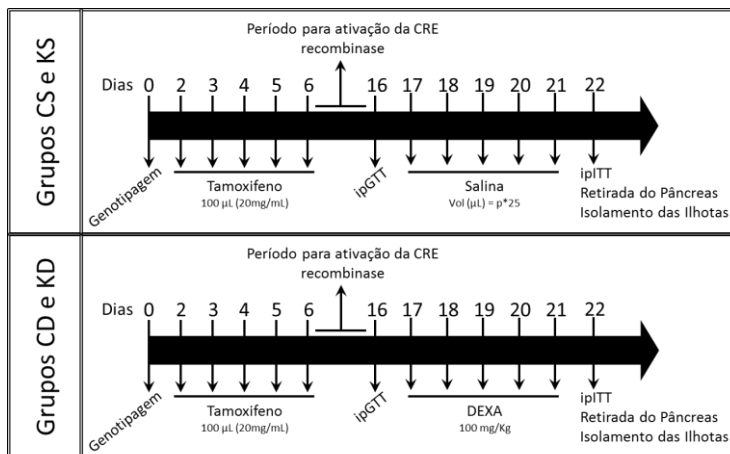


Figura 1. Desenho Experimental. Descrição da linha temporal e dos eventos durante o período experimental.

4.4 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)

Os animais foram mantidos em jejum por 10 h. Após a verificação da glicemia de jejum com aparelho Accu-Check Advantage II, uma solução de glicose 50% (1 g/Kg de massa corpórea) foi administrada pela via intraperitoneal. A glicemia dos animais foi verificada nos tempos 0, 15, 30, 60, 45, 60 e 120 min após a administração de glicose.

4.5 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)

Após a verificação da glicemia no estado alimentado (1,5 horas de privação de alimento), insulina (1 U/kg de massa corpórea) diluída em solução salina (0,9% de NaCl) foi administrada intraperitonealmente nos animais. A glicemia foi verificada nos tempos 0, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 min após a administração de insulina. A taxa de constante de decaimento da glicose (kITT) foi calculada à partir das concentrações de glicose

plasmática durante a fase de decaimento linear, utilizando a fórmula $0.693/t_{1/2}$.

4.6 Imunohistoquímica

Após a morte dos animais uma incisão abdominal foi realizada para a retirada do pâncreas, que por sua vez foi fixado em solução de 4% de Parafolmoldeido, por 24 horas. Após esse período, o pâncreas foi embebido em parafina e, secções seriadas foram realizadas com a ajuda de micrótomo. Depois da desparafinização, as secções foram bloqueadas com solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (0.05% Tween 20; 5% de leite em pó desnatado) e incubadas com anticorpo primário contra proteínas-alvo (Insulina, Glucagon, Ki67) por 2h em temperatura ambiente ou *overnight* a 4° C. Após lavagem em PBS, foi utilizado anticorpo secundário específico e as imagens foram reveladas com DAB (diaminobenzidina). As secções foram então marcadas com hematoxilina e montadas para observação em microscópio.

4.7 Isolamento das ilhotas pancreáticas

Após a eutanásia, incisão abdominal e retirada do pâncreas, foi realizada a extração das ilhotas pancreáticas após digestão do pâncreas pelo método da Colagenase (1,7 mg/mL de Colagenase do tipo V, por 17 min a 37°C).

4.8 Real Time-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para analisar a expressão gênica de HNF4 α , INS1/2, Glucagon, Somatostatina, PDX1, PAX4, ARX, HHEX e NGN3, as amostras de ilhotas isoladas foram homogeneizadas em 1 ml de TRIzol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) por 1min. O mRNA foi extraído e quantificado por espectrofotometria (GeneQuant, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK). O cDNA (DNA complementar) foi preparado utilizando-se 1 μ g de RNA total com os reagentes do kit High Capacity cDNA Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA). O gene GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) foi usado como controle endógeno. As condições de termociclagem utilizadas

foram de 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 10s e 60°C por 30s. As curvas de amplificação foram analisadas utilizando-se o Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

4.9 Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre os animais WT e KO foram realizadas pelo teste T (*t student test*). Já as comparações feitas entre os grupos CS, CD, KS E KD foram realizadas por ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Turkey. Foi considerado estatisticamente diferente quando $p > 0.05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pâncreas é uma glândula que possui tanto um compartimento endócrino como um compartimento exócrino. A porção exócrina compreende 95% do volume total do órgão e consiste em unidades denominadas ácinos e uma rede de ductos que drenam a secreção acinar para o sistema digestório (Benitez *et al.*, 2012). Enquanto os ácinos têm como função principal produzir e secretar enzimas digestivas, as células ductais produzem bicarbonato de sódio e participam do controle do pH no sistema digestório (Lee *et al.*, 2013). Já a porção endócrina consiste em uma estrutura, incrustada no tecido exócrino, organizada em uma espécie de micro-órgão, denominado Ilhota de Langerhans. Aos menos cinco diferentes tipos celulares são encontrados nas ilhotas, a saber: células α produtoras de glucagon, células β produtoras de insulina, células δ produtoras de somatostatina, células PP produtoras de polipeptídio pancreático e células ϵ produtoras de grelina (Oliver-Krasinski e Stoffers, 2008). Os diferentes tipos celulares da porção endócrina são os principais reguladores do metabolismo intermediário, em especial do metabolismo dos carboidratos.

O DM é uma desordem metabólica caracterizada por perda da função e/ou da massa de célula β pancreática. O DM é instaurado quando a produção de insulina não é capaz de suprir a necessidade fisiológica dos tecidos periféricos, como fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (Oliver-Krasinski e Stoffers, 2008). Então, independente da classificação etiológica que se observa DM1, DM2 ou MODY a fisiopatologia do DM reside na redução do número e/ou na eficiência da célula β , sendo assim, qualquer forma de DM será beneficiada com o tratamento que promova a regeneração de células β . Justificando assim o intenso esforço da comunidade científica em desenvolver novas fontes de células produtoras de insulina para terapias de reposição/regeneração celular (Afelik e Rovira, 2017).

A habilidade de regeneração dos animais depende, principalmente, da atividade de células tronco pluripotentes residentes no tecido danificado em se multiplicar e em se diferenciar, somado à capacidade das células pré-existentes em se proliferar. Nos mamíferos, em contraste com tecidos altamente regeneráveis, por exemplo, o intestino, epiderme e sistema

hematopoiético, o pâncreas endócrino apresenta, em condições fisiológicas, uma taxa muito pequena de substituição celular (Afelik e Rovira, 2017).

Apesar disso, o pâncreas tem a capacidade de se adaptar a desafios metabólicos, por exemplo, na gravidez e obesidade, aumentando a massa de célula β por replicação, hipertrofia e/ou neogênese (Bonner-Weir, 2000). Neste contexto, emerge um processo denominado *Plasticidade Pancreática*, definido como a habilidade de um tipo celular já diferenciado do pâncreas se transformar em outro tipo celular diferenciado. Assim, a conversão de células não- β em células β pancreáticas também tem sido alvo de vários trabalhos na busca de novas fontes de célula secretora de insulina para o tratamento do DM (Spijker *et al.*, 2013). Apesar do grande progresso que se têm observado nos últimos anos, muitas vias intracelulares que controlam a regeneração de células secretoras de insulina e o processo de plasticidade pancreática ainda permanecem desconhecidas. Neste cenário, objetivamos neste trabalho desvendar o papel do FT HNF4 α no processo de aumento de célula β induzida por uma resistência periférica à insulina.

Como já mencionado, o HNF4 α é um FT importante para células β e, sabe-se que participa de processos de aumento de massa secretora de insulina. Podemos observar a importância do HNF4 α no fato que a mutação no gene que produz esse FT leva ao desenvolvimento do MODY1. Gupta *et al.* mostrou que ao contrário de animais WT, fêmeas que não expressam o HNF4 α em células β não apresentam uma expansão de massa de célula β induzida pela gestação. Neste artigo, os autores mostraram que o processo fisiológico de aumento de massa de célula β , observado nas gestas é dependente da atividade do FT HNF4 α . Ainda, fica claro que em condições de não-prenhez os animais KO para o HNF4 α não apresentam prejuízo em comparação com os animais WT (Gupta *et al.*, 2007). Com isso, podemos concluir que esse FT é crucial para processos que envolvam aumento da massa de células secretoras de insulina, em cenários onde se observa aumento da demanda por este hormônio.

O HNF4 α também participa de processos de plasticidade pancreática. Como já mencionado anteriormente, foi mostrado que células α se tornam células *like- β* após a superexpressão artificial desse FT (Sangan *et al.*, 2015). Isso nos mostra que o

HNF4 α é importante tanto para o desenvolvimento de um fenótipo de célula β , quanto a sua ausência é crucial para a célula α se manter em um estado de célula α . Com esses dados, podemos afirmar que o HNF4 α é um FT que participa de eventos de proliferação de célula β e do processo de plasticidade pancreática e, sendo assim, estudar o seu papel em modelos experimentais que promovam o aumento da massa secretora de insulina é fundamental para o entendimento do processo de regeneração de células β .

Como detalhado na Introdução, o estado de RI desencadeia nas ilhotas pancreáticas, em especial nas células β , tanto as alterações na função celular aumento da produção/secreção de insulina como alterações estruturais hiperplasia/hipertrofia de célula β (Kahn, 2003; Paulsen *et al.*, 2010), sendo assim, modelos de animais com RI são excelentes modelos experimentais para se estudar vias que estimulam a expansão das células β (Rafacho *et al.*, 2008).

Assim, visando atingir nosso objetivo de elucidar o papel do HNF4 α na plasticidade das células β em modelos de animais RI induzida por exposição a glicocorticoides, decidimos utilizar neste trabalho animais KO para o HNF4 α - tratados ou não com DEXA.

Antes de tratar os animais com DEXA nós validamos o modelo de deleção do gene HNF4 α exclusivamente em células β . Para isso, analisamos a expressão do mRNA do HNF4 α nas ilhotas dos camundongos KO e WT e, como esperado, ilhotas de animais KO apresentaram uma redução de 58% da expressão gênica do HNF4 α em comparação com as ilhotas dos animais WT (Fig.2). Uma vez que os animais eram *knockouts*, o esperado seria que se observasse uma redução próxima a 100%, entretanto, vale ressaltar que os animais são *knockout* especificamente em células β e a análise da expressão gênica foi feita com ilhotas inteiras, e outros tipos celulares da ilhota também expressam o HNF4 α (Miura A, *et al.*). Com isso, nosso modelo de animais KO para o gene do HNF4 α , especificamente em células β foi validado de fato.

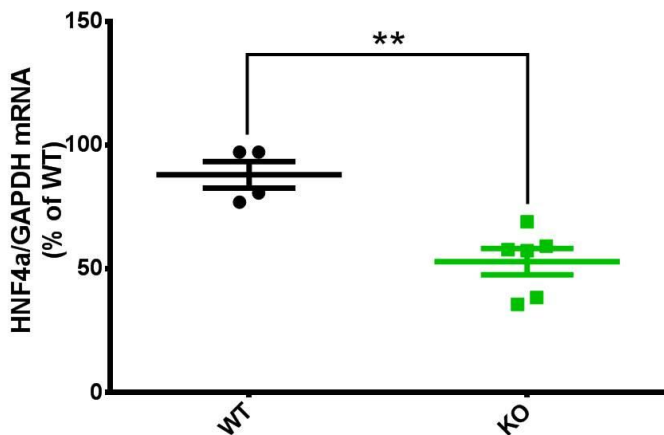


Figura 2. Análise da expressão gênica do HNF4 α . Análise da expressão gênica do HNF4 α em ilhotas de animais WT e KO após 10 dias da última injeção de Tamoxifeno. A expressão gênica foi realizada por RT-PCR Real Time e, o valor da expressão do HNF4 α foi normalizado pela expressão do GAPDH. Dados apresentados como média \pm SEM, em relação ao WT. ** $p > 0.01$ vs WT.

Após a validação genética, analisamos as características metabólicas do modelo em questão. Inicialmente, avaliamos a glicemia de jejum e a resposta destes animais a uma carga de glicose no ipGTT. Em comparação com os animais WT, animais KO apresentaram menor glicemia de jejum (Fig. 3A) e uma maior eficiência em lidar com uma sobrecarga de glicose, mostrando-se mais tolerantes à glicose ao longo do tempo (Fig. 3B e 3C). De fato alguns estudos anteriores (Gupta *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2007) mostram que animais que não expressam o HNF4 α em células β são intolerantes à glicose, entretanto, é preciso destacar que existe uma diferença metodológica entre esses estudos e o nosso. Diferente dos trabalhos citados anteriormente, nós avaliamos a tolerância à glicose dez dias após a última dose de Tamoxifeno, período onde a deleção do HNF4 α ainda é precoce e, as células β ainda não estão completamente disfuncionais, inclusive apresentam capacidade secretória elevada em resposta a concentrações estimulatórias de glicose (Miura *et al.*, 2006).

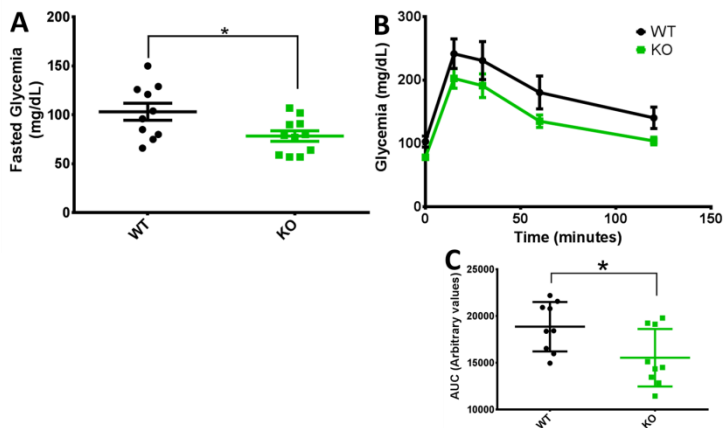


Figura 3. Metabolismo glicêmico dos animais *knockout*. Análise da glicemia de jejum (A) e do ipGTT (B e C) dos animais WT e KO após 10 dias da última injeção de tamoxifeno. **A.** Após 8-10 horas de jejum a glicemia foi avaliada com uso do Glicosímetro Accu-Check®. **B.** ipGTT dos animais WT e KO. A glicemia foi aferida nos tempos 0 e, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 minutos da injeção de 1g/Kg de glicose. **C.** Área Abaixo da Curva (AUC) do ipGTT mostrado em B. Dados apresentados como média \pm SEM. Em B dados em relação ao WT. * $p > 0.05$ vs WT.

Mesmo sabendo que, o ipGTT é um método que nos fornece uma visão fisiológica geral do metabolismo da glicose, sem determinar a causa dos mecanismos e de possíveis alterações encontradas (Bowe *et al.*, 2014) a maior tolerância à glicose observada, somada à glicemia de jejum reduzida, nos permite inferir que os animais KO poderiam estar hiperinsulinêmicos e que as células β dos animais estariam liberando maior quantidade de insulina frente ao estímulo da glicose.

Então, em virtude das alterações encontradas, resolvemos avaliar a função da célula β , aferindo a insulinemia durante o ipGTT e a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas isoladas de WT e KO, além da sensibilidade periférica à insulina. Corroborando com os resultados mostrados até o momento (Fig. 3) e, em acordo com dados da literatura (Gupta *et al.*, 2007), nossos dados mostram que os animais KO, quando comparados com animais WT, apresentaram hiperinsulinemia durante o ipGTT, em todos os tempos analisados (Fig. 4A).

A hiperinsulinemia observada pode ser explicada pelo fato de que a ausência do gene para o HNF4 α , nas células β pancreáticas dos animais KO, promove alteração na expressão de genes que controlam o processo secretório, pois o HNF4 α é o principal regulador da expressão da subunidade Kir 6.2 dos Canais de K⁺ Dependentes de ATP (K⁺_{ATP}). Durante o processo secretório, esses canais são inativados pelas altas concentrações de ATP oriundas da oxidação da glicose e, uma vez fechados, despolarizam a membrana plasmática promovendo o influxo de íons Ca²⁺ e, conseqüente exocitose dos grânulos de insulina (Velasco *et al.*, 2016; Lu e Li, 2018). Gupta e colaboradores mostraram que com a deleção do gene para o HNF4 α , os Canais K⁺_{ATP} são, potencialmente, inativados mais facilmente, ocasionando a liberação do hormônio de forma exacerbada em relação ao estímulo da glicose (Gupta *et al.*, 2005).

Além disso, diversos estudos mostram que uma mutação no gene do HNF4 α altera os níveis de mRNA de genes relacionados com o metabolismo da glicose e com a GSIS (*Glucose Stimulation Insulin Secretion*), entre eles o gene para o GLUT2, aldolase, L-piruvato quinase (Wang *et al.*, 2000). Além da atividade *per se* do HNF4- α em regular o metabolismo da glicose nas células β em adultos, observa-se também um *loop* regulatório entre HNF4 α e HNF1 α (Gupta e Kaestner, 2004), onde ambos os FT se autorregulam, controlando genes importantes para a GSIS (Hansen *et al.*, 2002; Johnson, 2007).

Com isso nossa atenção se voltou para o processo de GSIS e, quando examinada, notamos que as ilhotas provenientes de animais KO apresentaram maior secreção de insulina em condições estimuladoras de glicose (Fig. 4B), sem apresentar diferença no conteúdo total de insulina (Fig. 4C). Então, como a alteração na GSIS não se deu por diferença no conteúdo total de insulina nas ilhotas, sugere-se que tenha ocorrido uma alteração na maquinaria secretória e não na quantidade de insulina presente no interior destas células ou no número de célula β . Mesmo que isto vá de encontro com os achados de Gupta e colegas, em que ilhotas isoladas de camundongos mutantes para o HNF4 α apresentaram uma diminuição na primeira fase da secreção de insulina em resposta às diferentes concentrações de glicose (Gupta *et al.*, 2005), estes achados ainda são válidos quando o

contexto experimental adotado por nós é observado como um todo.

De acordo com nossas expectativas, observamos que os animais KO não apresentaram diferença na sensibilidade à insulina, em comparação com os animais WT (Fig. 4D), evidenciando que a deleção do gene para o HNF4 α é específica nas células β do pâncreas, não sendo capaz então, de alterar a resposta do hormônio insulina pelos tecidos periféricos. Portanto, nosso modelo experimental apresenta redução da expressão de HNF4 α , maior tolerância à glicose, menor glicemia de jejum, hiperinsulinemia durante o ipGTT, maior GSIS e ausência de RI.

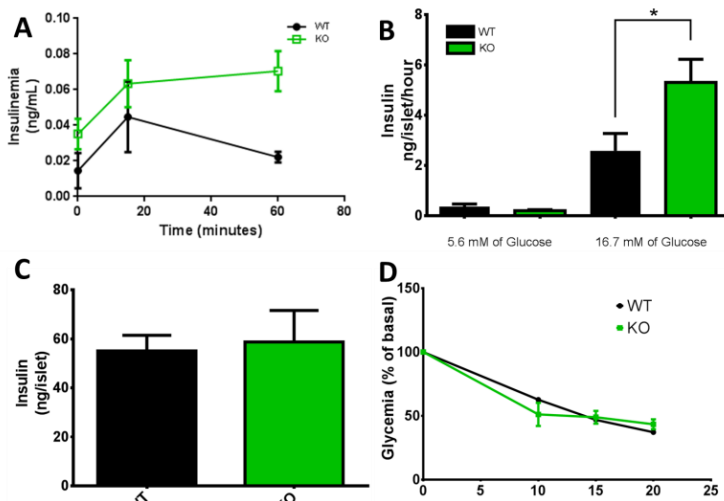


Figura 4. Insulinemia, GSIS e ipITT dos animais *knockout*. Análise da insulinemia durante o ipGTT (A), da GSIS (B), do conteúdo total de insulina (C) e do ipITT dos animais WT e KO após 10 dias da última injeção de tamoxifeno. **A.** A concentração de insulina no plasma foi medida durante o experimento de ipGTT nos tempos 15 e 60 minutos. **B.** Após isolamento, as ilhotas foram incubadas por 1 hora com concentrações basais (5.6 mM) ou estimulatórias (16.7) de glicose. A insulina secretada foi dosada por RIA e o valor encontrado foi normalizado pelo número de ilhotas no poço. **C.** Após a análise da GSIS, em B, o conteúdo total de insulina foi medido por RIA e o valor encontrado também foi normalizado pelo número de ilhotas no poço. **D.** Após privação alimentar de 1 hora e 30 minutos, a glicemia foi aferida nos tempos 0, 10, 15 e 20 minutos da injeção de 1 U/Kg de insulina Humolin[®]. A glicemia foi avaliada com uso do Glicosímetro Accu-Check[®]. Dados apresentados como média \pm SEM. Em C dados em relação da glicemia de jejum. * $p > 0.05$ vs WT.

Uma ressalva em relação ao modelo experimental deve ser explicitada, por mais que o nosso modelo não expresse o gene do HNF4 α em células β , como no MODY1, este experimental que apresentamos não configura um modelo da doença MODY1. Ao contrário disso, o objetivo proposto foi desenvolver um modelo KO para HNF4 α em células β , mas que não apresentasse um fenótipo de intolerância a glicose, hiperglicemia e diminuição do GSIS como encontrado no MODY1. Logo, propusemos um modelo onde o tratamento com DEXA se iniciaria em um momento em que o animal fosse KO e não apresentasse ainda as características do MODY1.

Dando continuidade aos experimentos, após validar o modelo KO e caracterizá-lo metabolicamente, seguimos com a análise do processo de expansão de massa de célula β utilizando a DEXA para induzir a RI nos animais. O fato de a DEXA ser capaz de causar a RI é algo bem documentado pela literatura (Rafacho *et al.*, 2008; Protzek *et al.*, 2014) e para comprovar que a RI foi instaurada, analisamos o ipITT e a taxa de decaimento da glicemia frente à insulina (kITT).

Estes experimentos nos permitem analisar, independe da condição funcional do pâncreas, como os tecidos periféricos, principalmente, músculo esquelético e tecido adiposo estão respondendo à insulina (Bowe *et al.*, 2014). Como esperado, o tratamento com DEXA induziu RI tanto nos animais WT como nos animais KO (Fig.5 A e B). Avaliamos também a capacidade desses animais, após o tratamento com DEXA, em lidar com uma sobrecarga de glicose e, observamos que o tratamento com DEXA não foi capaz de alterar a tolerância à glicose, tantos nos animais WT quanto nos animais KO (Fig.5 C).

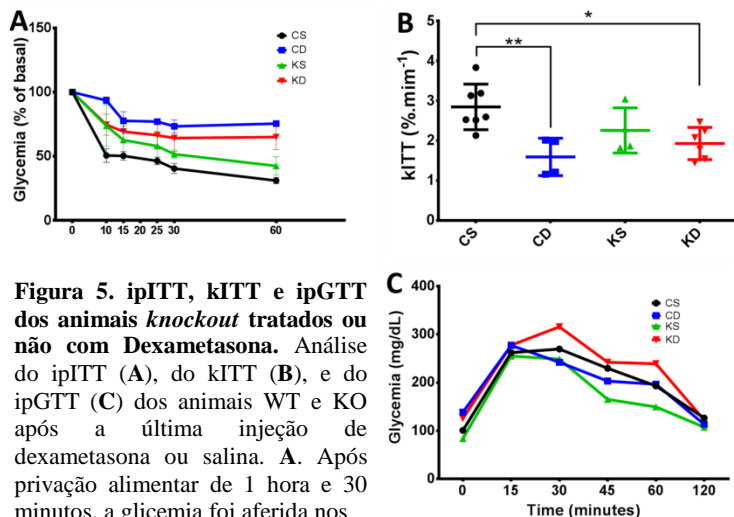


Figura 5. ipITT, kITT e ipGTT dos animais *knockout* tratados ou não com Dexametasona. Análise do ipITT (A), do kITT (B), e do ipGTT (C) dos animais WT e KO após a última injeção de dexametasona ou salina. **A.** Após privação alimentar de 1 hora e 30 minutos, a glicemia foi aferida nos tempos 0, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 minutos da injeção de 1 U/Kg de insulina Humolin®. **B.** Constante de decaimento (kITT) da glicemia. $kITT (\%/min) = 0.693/t(1/2)$, onde $t(1/2)$ foi calculado pelo decaimento da glicemia após 0-25 minutos da injeção intraperitoneal de 1 U/Kg de insulina. **C.** ipGTT dos animais CS, CD, KS e KD. A glicemia foi aferida nos tempos 0, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos após a injeção de 1g/kg de glicose. Dados apresentados como média \pm SEM. Em A, dados em relação da glicemia de jejum, * $p > 0.05$ vs WT, e ** $p > 0.01$ vs WT,

Considerando que a RI é uma potente indutora da expansão de célula β (Kahn, 2003; Paulsen *et al.*, 2010) e, após detectar que o nosso tratamento com DEXA realmente promoveu o aparecimento da RI, comparamos a possível expansão de massa destas células entre os animais CD e KD e, também analisamos alterações na quantidade de células α e do antígeno Ki67, uma proteína nuclear que indica proliferação celular (Gupta *et al.*, 2007; Juríková *et al.*, 2016).

Salientamos que o projeto inicial era transpor em valores numéricos as observações feitas acerca da morfometria do pâncreas endócrino, entretanto, por problemas metodológicos apenas ilustramos aqui as alterações observadas visualmente durante a coleta das imagens de IHQ. Como podemos ver na Figura 6 (A-D), o tratamento com DEXA promoveu um aumento na imunoreatividade para a insulina e uma visível hipertrofia das ilhotas apenas nos animais CD. Aparentemente, injeções de DEXA, mesmo causando RI, não foi capaz de promover um aumento na massa de célula β quando o HNF4 α não estava presente. Esse fato vai ao encontro de nossa hipótese e indica que

o HNF4 α é essencial para a expansão de célula β induzida por RI. Da mesma forma, o DEXA promoveu aumento da marcação para o glucagon somente nos animais WT (Fig.6 E-H).

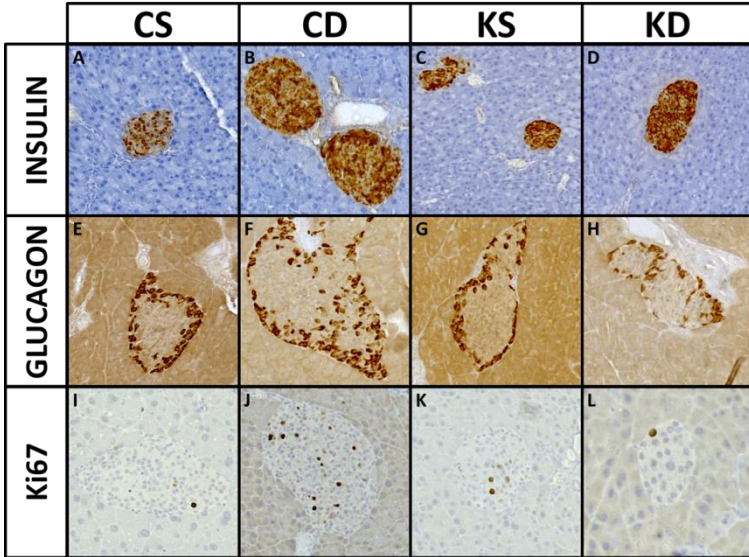


Figura 6. IHQ dos animais *knockout* tratados ou não com Dexametasona. Análise da imunomarcção para Insulina (A-D) Glucagon (E-H) e Ki67 (I-L) dos animais WT e KO após a última injeção de dexametasona ou salina. Após a realização da técnica de IHQ, as imagens foram capturadas no com ajuda do equipamento digitalizador de lâminas Axio Scan Z1. Imagens com 20 vezes de aumento.

Esses achados indicam que o tratamento com DEXA promove expansão da massa de insulina e que, provavelmente, esta expansão ocorre devido ao aumento na proliferação de células β já existentes e, indica também que pode ocorrer a plasticidade pancreática (Courty *et al.*, 2019). Ainda, podemos inferir que esse processo de expansão, seja por proliferação aumentada ou plasticidade, parece depender da presença do HNF4 α . Quando olhamos para a marcação de Ki67, notamos que q DEXA promoveu uma maior marcação para esta proteína somente no CD (Fig.6 I-L). Interessantemente, este aumento foi visível somente nos animais WT, não sendo observado nos animais KO tratados com DEXA. Devido à técnica utilizada, não podemos inferir qual célula da ilhota está se proliferando em

resposta ao DEXA, mas podemos sugerir que independente do tipo celular onde a proliferação é observada, existe uma dependência do HNF4 α para este processo proliferativo.

Após essas observações, decidimos voltar nossa atenção para a expressão de genes relacionados com a plasticidade pancreática. Primeiramente avaliamos a expressão gênica do HNF4- α em ilhotas de animais WT e KO, tratados ou não com DEXA e observamos uma tendência no aumento da expressão nos animais CD (Fig. 7A) sugerindo que o DEXA aumenta vias que culminam no aumento da expressão do HNF4 α . Esse fato corrobora nossa hipótese de que o HNF4 α é necessário para a ação da DEXA no quesito expansão de massa de célula β , embora existam dados contrários na literatura que mostram que a fosforilação e, conseqüente inativação do HNF4 α , pela via da ERK1/2 podem induzir a proliferação e a sobrevivência celular (Vetó *et al.*, 2017). Vale ressaltar que nem atividade do HNF4 α nem o seu estado fosforilado foram avaliados, mas apenas a sua expressão gênica.

Ademais, alguns estudos trazem que o gene do HNF4 α pode ser ativado através dos receptores de GC no fígado (Bailly *et al.*, 2009) e, linhagem celular de hepatócito expostas à DEXA apresentaram redução no mRNA para o HNF4 α (Oyadomari *et al.*, 2000). O efeito da DEXA sobre a expressão/atividade do HNF4 α em células β pancreática ainda é desconhecido e nossos dados sugerem que, assim como observado em hepatócitos, a DEXA parece aumentar o mRNA para o HNF4 α .

Após a análise da expressão do mRNA do HNF4 α , nós investigamos a expressão gênica dos hormônios glucagon e somatostatina, produzidos pelas células α e δ pancreáticas, respectivamente. Nossos dados mostraram que o tratamento com DEXA teve uma tendência de aumentar (para GCG: $p>0.07$; para STT: $p>0.094$), em comparação com o grupo CS, a expressão dos dois hormônios estudados apenas em animais CD, porém, nenhuma alteração foi observada nos animais deficientes para o HNF4 α (Fig. 7B). Esses experimentos indicam que, como observado na análise das imagens de IHQ (Fig. 6), o tratamento com DEXA parece induzir uma plasticidade na ilhota pancreática, sugerindo que a expansão de massa de célula β induzida pela RI pode se dar não somente pela proliferação de

células β já existentes, mas também pela conversão de células

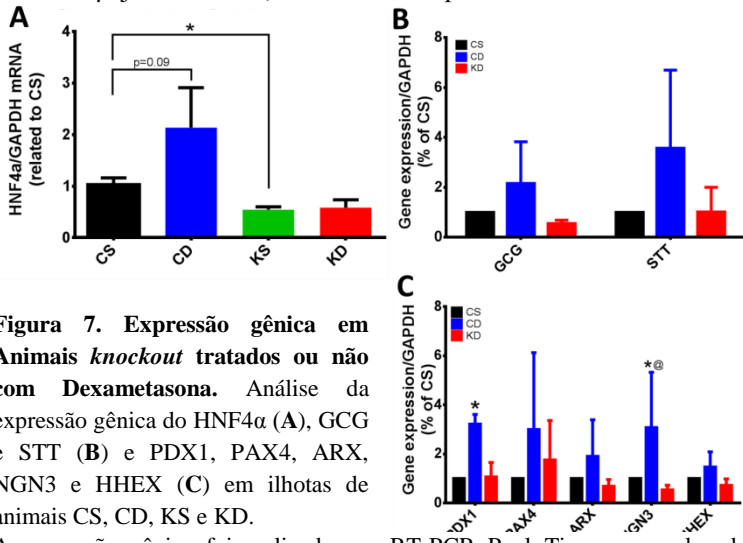


Figura 7. Expressão gênica em Animais *knockout* tratados ou não com Dexametasona. Análise da expressão gênica do HNF4 α (A), GCG e STT (B) e PDX1, PAX4, ARX, NGN3 e HHEX (C) em ilhotas de animais CS, CD, KS e KD.

A expressão gênica foi realizada por RT-PCR Real Time e, o valor da expressão do HNF4 α foi normalizado pela expressão do GAPDH. Dados apresentados como média \pm SEM, em relação ao CS. * $p > 0.05$ vs CS. @ $p > 0.05$ vs KD.

Uma possível ação do GC sobre a neogênese de célula β foi recentemente publicada. Neste trabalho os autores mostram que a exposição crônica à corticosterona induz neogênese de células β e, inclusive, pode reverter parcialmente o DM induzido por estreptozotocina (Courty *et al.*, 2019). Nossos resultados apontam que esse processo de plasticidade pancreática induzido por GC é, ao menos em parte, dependente da ação do HNF4 α e estão em consonância com a literatura. Como já relatado, sabe-se que células α in vitro se transformam em células β -like após a superexpressão artificial do HNF4 α (Sangan *et al.*, 2015).

Posteriormente à observação de alteração na expressão gênica de hormônios pancreáticos, investigamos a expressão gênica de FT chave no processo de plasticidade pancreática. Analisamos então a expressão de: PDX1 (*Pancreatic Duodenal Homeobox 1*), PAX4 (*Paired Box 4*), ARX (*Aristaless-Related Homeobox*), NGN3 (*Neurogenina 3*) e HHEX (*Hematopoietically Expressed Homeobox*). Encontramos que o tratamento com DEXA promoveu aumento no mRNA dos genes PDX1 e NGN3

apenas nos animais *wildtype*, sugerindo que o HNF4 α participa deste processo (Fig. 7C).

O PDX, também conhecido como IPF1 (*Insulin Promoter Factor 1*) desempenha um papel fundamental no período inicial da embriogênese – nas chamadas células multipotentes progenitoras pancreáticas - tanto para o desenvolvimento do pâncreas exócrino como para as células endócrinas, incluindo as células β (Oliver-Krasinski e Stoffers, 2008; Bramswig *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017). Nas células β , o PDX1 é fundamental para a expressão do gene da insulina, ligando-se a elementos regulatórios e modulando a transcrição do gene da insulina. Em modelos de animais adultos, a depleção ou redução do PDX1, nas células β , induz intolerância à glicose, fato que mostra o papel deste FT na homeostase da glicose (Zhu *et al.*, 2017). No cenário da plasticidade pancreática, sabe-se que a deleção do PDX1, especificamente em células β , promove redução da massa deste tipo celular e aumento do número de células α ; já a sua deficiência em células α leva ao desenvolvimento de células β (Bramswig e Kaestner, 2011). Com isso, podemos afirmar que existe uma correlação positiva entre a expressão de PDX1 e a quantidade de células produtoras de insulina. Quando confrontamos esses dados com nossos achados, podemos inferir que o tratamento com DEXA realmente promoveu um aumento nos níveis de mRNA para o PDX1 e que isso, provavelmente, esta interligado com a expansão de massa de célula β observado na Fig.6. Ainda, podemos inferir que esse processo é dependente de HNF4 α , pois não se observou nem expansão de célula β , nem aumento do mRNA para o PDX1 nos animais KD.

Já o FT NGN3 é fundamental para o desenvolvimento da linhagem de células endócrinas do pâncreas de humanos e camundongos, por isso, altos níveis de sua expressão são vistos apenas no desenvolvimento embrionário, não sendo expresso em células α e β já diferenciadas. A NGN3 também controla a diferenciação e a regeneração das células da ilhota pancreática, participando do processo de plasticidade (Vieira *et al.*, 2018). O fato do tratamento com DEXA promover o aumento da expressão do mRNA para a NGN3 indica que este GC pode induzir o aparecimento de células pré-endócrinas na ilhota, que por sua vez podem se diferenciar em qualquer um dos tipos celulares da porção endócrina. A expressão forçada da NGN3 em embrião de

camundongos promove a diferenciação de células endócrinas pancreáticas, especialmente células α e diminuição de células exócrinas (Zhu *et al.*, 2017). Isso pode explicar a observação feita na Fig.6 e na Fig. 7B, onde o tratamento com DEXA parece aumentar a expressão de glucagon. Mais uma vez, esse processo indica uma plasticidade induzida pela DEXA e dependente do FT HNF4 α .

Por outro lado, não observamos diferença estatística na análise da expressão dos FT PAX4, ARX e HHEX, apenas uma tendência da ação da DEXA com a participação do HNF4 α . Nossos experimentos de RT-PCR Real Time refletem três experimentos independentes e, portanto, mais experimentos devem ser realizados acerca destes FT para poder inferir qualquer consequência de suas alterações. Esses FT também estão relacionados com o desenvolvimento do pâncreas e com processos de plasticidade pancreática.

O FT PAX4 está presente em células β maduras e é fundamental para o fenótipo deste tipo celular (Collombat *et al.*, 2009). Já o FT ARX, presente em células α , é crucial para as células α manterem seu fenótipo (Spijker *et al.*, 2013). Ainda, a modulação artificial destes FT promove conversão entre os tipos celulares da ilhota, a saber: (a) a superexpressão do FT ARX em célula β promove alterações para células α e, (b) superexpressão de PAX4 em célula α leva ao aumento do número de células β (Bramswig e Kaestner, 2011).

Já o HHEX é um fator de transcrição que regula o desenvolvimento de diversos órgãos incluindo o pâncreas, sendo importante para a diferenciação das células δ (Zhang *et al.*, 2014). Em nossos experimentos não houve diferença significativa entre os grupos (Fig. 7C), apenas uma tendência no aumento do HHEX induzida pelo DEXA, de maneira dependente ao HNF4 α .

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Diante do exposto, concluímos que O HNF4 α é uma peça-chave importante no processo de expansão de célula produtora de insulina, em modelo de RI induzida por glicocorticoide e, que esta expansão dependente de HNF4 α parece envolver tanto proliferação de células β já existentes, como processos de plasticidade pancreática. Isso indica que, por promover regeneração de célula β pancreática, o HNF4 α é um importante alvo terapêutico para o tratamento/cura de qualquer forma de DM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFELIK, S.; ROVIRA, M. Pancreatic β -cell regeneration: Facultative or dedicated progenitors? **Mol Cell Endocrinol**, v. 445, p. 85-94, 04 2017. ISSN 1872-8057. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27838399>>.

ASSOCIATION, A. D. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2017. **Diabetes Care**, v. 41, n. 5, p. 917-928, 05 2018. ISSN 1935-5548. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29567642>>.

BAILLY, A.; BRIANÇON, N.; WEISS, M. C. Characterization of glucocorticoid receptor and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) binding to the hnf4alpha gene in the liver. **Biochimie**, v. 91, n. 9, p. 1095-103, Sep 2009. ISSN 1638-6183. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540905>>.

BENITEZ, C. M.; GOODYER, W. R.; KIM, S. K. Deconstructing pancreas developmental biology. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 6, Jun 2012. ISSN 1943-0264. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22587935>>.

BONNER-WEIR, S. Islet growth and development in the adult. **J Mol Endocrinol**, v. 24, n. 3, p. 297-302, Jun 2000. ISSN 0952-5041. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828822>>.

BOWE, J. E. et al. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. **J Endocrinol**, v. 222, n. 3, p. G13-25, Sep 2014. ISSN 1479-6805. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25056117>>.

BRAMSWIG, N. C. et al. Epigenomic plasticity enables human pancreatic α to β cell reprogramming. **J Clin Invest**, v. 123, n. 3, p. 1275-84, Mar 2013. ISSN 1558-8238. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23434589>>.

BRAMSWIG, N. C.; KAESTNER, K. H. Transcriptional regulation of α -cell differentiation. **Diabetes Obes Metab**, v. 13 Suppl 1, p. 13-20, Oct 2011. ISSN 1463-1326. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824252>>.

CHEN, C. et al. ERK5 plays an essential role in gestational beta-cell proliferation. **Cell Prolif**, v. 51, n. 3, p. e12410, Jun 2018. ISSN 1365-2184. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29159830>>.

CHERA, S. et al. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic δ -cells into insulin producers. **Nature**, v. 514, n. 7523, p. 503-7, Oct 2014. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25141178>>.

CHEHAB, FF. et al. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. **Science**. vol 3;275(5296):88-90, Jan 1997.

Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8974400>>

CIGLIOLA, V. et al. Pancreatic islet-autonomous insulin and smoothened-mediated signalling modulate identity changes of glucagon. **Nat Cell Biol**, v. 20, n. 11, p. 1267-1277, Nov 2018. ISSN 1476-4679. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30361701>>.

_____. Stress-induced adaptive islet cell identity changes. **Diabetes Obes Metab**, v. 18 Suppl 1, p. 87-96, Sep 2016. ISSN 1463-1326. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27615136>>.

CNOP, M. et al. Mechanisms of Pancreatic b-Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes: Many Differences, Few Similarities. **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, p. S97-S107, 2005. Disponível em: <16306347 >.

COLLOMBAT, P. et al. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. **Cell**, v. 138, n. 3, p. 449-62, Aug 2009.

ISSN 1097-4172. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665969>>.

COURTY, E. et al. Adaptive β -Cell Neogenesis in the Adult Mouse in Response to Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 68, n. 1, p. 95-108, Jan 2019. ISSN 1939-327X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30327384>>.

DALBY, M. J. Dietary Uncoupling of Gut Microbiota and Energy Harvesting from Obesity and Glucose Tolerance in Mice. *Cell*, v. 21, n. 6, p. 1521-1533, Nov 2017. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29117558>>.

EIZIRIK, D. L.; COLLI, M. L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. **Nat Rev Endocrinol**, v. 5, n. 4, p. 219-26, Apr 2009. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&d=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19352320>.

EIZIRIK, D. L.; MANDRUP-POULSEN, T. A choice of death-the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. **Diabetologia**, v. 44, n. 12, p. 2115-2133, 2001. Disponível em: < 11793013 >.

FAJANS, S. S.; BELL, G. I. MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. **Diabetes Care**, v. 34, n. 8, p. 1878-84, Aug 2011. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21788644> >.

FERBER, S. et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. **Nat Med**, v. 6, n. 5, p. 568-72, May 2000. ISSN 1078-8956. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802714>>.

GONZALEZ, F. J. Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription. **Drug Metab Pharmacokinet**, v.

23, n. 1, p. 2-7, 2008. ISSN 1880-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305369> >.

GUO, S.; LU, H. Novel mechanisms of regulation of the expression and transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 α . **J Cell Biochem**, v. 120, n. 1, p. 519-532, Jan 2019. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30191603> >.

GUPTA, R. K. et al. Expansion of adult beta-cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4 α . **Genes Dev**, v. 21, n. 7, p. 756-69, Apr 2007. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17403778> >.

GUPTA, R. K.; KAESTNER, K. H. HNF-4 α : from MODY to late-onset type 2 diabetes. **Trends Mol Med**, v. 10, n. 11, p. 521-4, Nov 2004. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519277> >.

GUPTA, R. K. et al. The MODY1 gene HNF-4 α regulates selected genes involved in insulin secretion. **J Clin Invest**, v. 115, n. 4, p. 1006-15, Apr 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761495> >.

HANSEN, B. C.; STRIFFLER, J. S.; BODKIN, N. L. Decreased hepatic insulin extraction precedes overt noninsulin dependent (Type II) diabetes in obese monkeys. **Obes Res**, v. 1, n. 4, p. 252-60, Jul 1993. ISSN 1071-7323 (Print) 1071-7323 (Linking).

HANSEN, S. K. et al. Genetic evidence that HNF-1 α -dependent transcriptional control of HNF-4 α is essential for human pancreatic beta cell function. **J Clin Invest**, v. 110, n. 6, p. 827-33, Sep 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235114> >.

HUANG, J. et al. Expression of HNF4 α variants in pancreatic islets and Ins-1 beta cells. **Diabetes Metab Res Rev**,

v. 24, n. 7, p. 533-43, Oct 2008. ISSN 1520-7552. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18561282> >.

IHARA, A. et al. Functional characterization of the HNF4alpha isoform (HNF4alpha8) expressed in pancreatic beta-cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 329, n. 3, p. 984-90, Apr 2005. ISSN 0006-291X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752752> >.

JOHNSON, J. D. **Pancreatic Beta-cell Apoptosis in Maturity Onset Diabetes of the Young**: Journal of Diabetes. 31(1): 67 - 74 p. 2007.

JURÍKOVÁ, M. et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. **Acta Histochem**, v. 118, n. 5, p. 544-52, Jun 2016. ISSN 1618-0372. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27246286> >.

KAHN, S. E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 46, n. 1, p. 3-19, Jan 2003. ISSN 0012-186X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12637977> >.

KAY, T. W. et al. The beta cell in autoimmune diabetes: many mechanisms and pathways of loss. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, n. 1, p. 11-15, 2000. Disponível em: < 10652500 >.

KITAMURA, T. The role of FOXO1 in beta-cell failure and type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, v. 9, n. 10, p. 615-23, Oct 2013. ISSN 1759-5037 (Electronic) 1759-5029 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23959366> >.

KOTRONEN, A. et al. Increased liver fat, impaired insulin clearance, and hepatic and adipose tissue insulin resistance in type 2 diabetes. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 122-30, Jul 2008. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085 (Linking).

LEE, J. et al. Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. **Elife**, v. 2, p. e00940, Nov 2013. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24252877> >.

LIU, D. et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. **Allergy Asthma Clin Immunol**, v. 9, n. 1, p. 30, Aug 2013. ISSN 1710-1484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23947590> >.

LU, M.; LI, C. Nutrient sensing in pancreatic islets: lessons from congenital hyperinsulinism and monogenic diabetes. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1411, n. 1, p. 65-82, Jan 2018. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29044608> >.

MANDRUP-POULSEN, T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. **Diabetologia**, v. 39, n. 9, p. 1005-1029, 1996. Disponível em: < 8877284 >.

MITTELMAN, S. D. et al. Longitudinal compensation for fat-induced insulin resistance includes reduced insulin clearance and enhanced beta-cell response. **Diabetes**, v. 49, n. 12, p. 2116-25, Dec 2000. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking).

MIURA, A. et al. Hepatocyte nuclear factor-4alpha is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells. **J Biol Chem**, v. 281, n. 8, p. 5246-57, Feb 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16377800> >.

ODOM, D. T. et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. **Science**, v. 303, n. 5662, p. 1378-81, Feb 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988562> >.

OLIVER-KRASINSKI, J. M.; STOFFERS, D. A. On the origin of the beta cell. **Genes Dev**, v. 22, n. 15, p. 1998-2021, Aug 2008. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18676806> >.

OYADOMARI, S. et al. The gene for hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha is activated by glucocorticoids and glucagon, and repressed by insulin in rat liver. **FEBS Lett**, v. 478, n. 1-2, p. 141-6, Jul 2000. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922486> >.

PATEL, R.; WILLIAMS-DAUTOVICH, J.; CUMMINS, C. L. Minireview: new molecular mediators of glucocorticoid receptor activity in metabolic tissues. **Mol Endocrinol**, v. 28, n. 7, p. 999-1011, Jul 2014. ISSN 1944-9917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24766141> >.

PAULSEN, S. J. et al. Characterization of beta-cell mass and insulin resistance in diet-induced obese and diet-resistant rats. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 2, p. 266-73, Feb 2010. ISSN 1930-739X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661956> >.

PIPELEERS, D.; LING, Z. Pancreatic beta cells in insulin-dependent diabetes. **Diabetes Metab Rev**, v. 8, n. 3, p. 209-27, Oct 1992. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&b=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1292912 >.

POITOUT, V. et al. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 3, p. 289-98, Mar 2010. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19715772> >.

PROTZEK, A. O. et al. Augmented β -Cell Function and Mass in Glucocorticoid-Treated Rodents Are Associated with Increased Islet Ir- β /AKT/mTOR and Decreased AMPK/ACC and AS160 Signaling. **Int J Endocrinol**, v. 2014, p. 983453, 2014. ISSN

1687-8337. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313308>>.

RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v. 36, n. 3, p. 284-93, Apr 2008. ISSN 1536-4828. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362843>>.

REZENDE, L. F. et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) protects non-obese Swiss mice against type 2 diabetes by increasing beta cell mass and reducing insulin clearance. **Diabetologia**, v. 55, n. 5, p. 1495-504, May 2012. ISSN 1432-0428 (Electronic) 0012-186X (Linking).

ROJAS, J. et al. Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. **J Diabetes Res**, v. 2018, p. 9601801, 2018. ISSN 2314-6753. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29670917>>.

SANDOVICI, I. et al. Developmental and environmental epigenetic programming of the endocrine pancreas: consequences for type 2 diabetes. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 9, p. 1575-95, May 2013. ISSN 1420-9071. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463236>>.

SANGAN, C. B. et al. In vitro reprogramming of pancreatic alpha cells towards a beta cell phenotype following ectopic HNF4 α expression. **Mol Cell Endocrinol**, v. 399, p. 50-9, Jan 2015. ISSN 1872-8057. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25224487>>.

SATO, Y. et al. Anks4b, a novel target of HNF4 α protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. **J Biol Chem**, v. 287, n. 27, p. 23236-45, Jun 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22589549>>.

SHIH, D. Q. et al. Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. **Diabetes**, v. 50, n. 11, p. 2472-80, Nov 2001. ISSN 0012-1797. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679424>>.

SPIJKER, H. S. et al. Conversion of mature human β -cells into glucagon-producing α -cells. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2471-80, Jul 2013. ISSN 1939-327X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23569174>>.

STEIL, G. M. et al. Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 5, p. E788-96, May 2001. ISSN 0193-1849. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287362>>.

TAKASU N. et al. Streptozocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. **Diabetes**, v. 40, n. 9, p. 1141-5, Set 1991. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1834504>>

THOREL, F. et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. **Nature**, v. 464, n. 7292, p. 1149-54, Apr 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20364121>>.

VELASCO, M. et al. Modulation of Ionic Channels and Insulin Secretion by Drugs and Hormones in Pancreatic Beta Cells. **Mol Pharmacol**, v. 90, n. 3, p. 341-57, Sep 2016. ISSN 1521-0111. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27436126>>.

VETÓ, B. et al. The transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 alpha is inhibited via phosphorylation by ERK1/2. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0172020, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28196117>>.

WANG, H. et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. **J Biol Chem**, v. 275, n. 46, p. 35953-9, Nov 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967120> >.

WEIR, G. C.; BONNER-WEIR, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 3, p. S16-21, Dec 2004. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561905> >.

YANG, H. W. et al. Glucocorticoids ameliorate TGF- β 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition of airway epithelium through MAPK and Snail/Slug signaling pathways. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 3486, 06 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28615628> >.

YANG, Y. P. et al. Context-specific α - to- β -cell reprogramming by forced Pdx1 expression. **Genes Dev**, v. 25, n. 16, p. 1680-5, Aug 2011. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21852533> >.

ZARET, K. S.; GROMPE, M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. **Science**, v. 322, n. 5907, p. 1490-4, Dec 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056973> >.

ZHANG, J. et al. The diabetes gene Hhex maintains δ -cell differentiation and islet function. **Genes Dev**, v. 28, n. 8, p. 829-34, Apr 2014. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24736842> >.

ZHU, Y. et al. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. **Stem Cell Res Ther**, v. 8, n. 1, p. 240, Nov 2017. ISSN 1757-6512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29096722> >.

ZIV, O.; GLASER, B.; DOR, Y. The plastic pancreas. **Dev Cell**, v. 26, n. 1, p. 3-7, Jul 2013. ISSN 1878-1551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23867225> >.

ANEXO 01



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O Papel do HNF4alfa na plasticidade de ilhotas pancreáticas", protocolada sob o CEUA nº 4359060516, sob a responsabilidade de **Gustavo Jorge dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 03/06/2016.

We certify that the proposal "The HNF4alfa role in pancreatic islet plasticity", utilizing 8 Heterogenics mice (males and females), 8 Knockout mice (males and females), protocol number CEUA 4359060516, under the responsibility of **Gustavo Jorge dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 06/03/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2016 a 04/2019**

Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem:	Biotério Externo	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	45 a 60 dias	N:	8
Espécie:	Camundongos heterogênicos						
Linhagem:	C57BL/6			Peso:	18 a 35 kg		
Origem:	Biotério Externo	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	45 a 60 dias	N:	8
Espécie:	Camundongos Knockout						
Linhagem:	HNF4alfaLoxP/loxP;Ins.Cre			Peso:	18 a 35 kg		

Resumo: O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla, caracterizado por hiperglicemia crônica. É resultante da depleção total (Tipo 1) ou parcial (Tipo 2) das células beta, associado, ou não, à resistência à insulina (RI). Contudo, durante a instação do DM2, a RI induz aumento da massa funcional de célula beta, na tentativa do organismo compensar os efeitos dessa resistência. O HNF4alfa é um fator de transcrição fundamental para células beta pancreáticas, pois regula a expressão de proteínas que participam no metabolismo da glicose bem como a expressão do gene da insulina. O HNF4alfa controla o aumento de massa de células beta em resposta ao estresse (e.g. premeiz) através ativação da via ERK-SRS. Sabe-se que o HNF4alfa regula a ERK que controla a expressão e translocação nuclear do fator de transcrição NeuroD e a ativação do PDX-1, essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento das ilhotas pancreáticas. Diante do exposto, nosso objetivo é avaliar um possível efeito do HNF4alfa no aumento de massa de célula beta em modelos de RI. Bem como sua participação na regeneração de células beta em animais diabéticos por STZ.

Local do experimento: Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB/UFSC Departamento de Biologia Estrutural e Funcional/IB/Unicamp

Florianópolis, 25 de janeiro de 2019

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina