



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

FRANCIELI CAROLINE DE RAMOS

**O HNF4 α CONTROLA O AUMENTO DE MASSA DE CÉLULA BETA
EM RESPOSTA AO AUMENTO DA DEMANDA METABÓLICA**

Florianópolis
2022

FRANCIELI CAROLINE DE RAMOS

**O HNF4 α CONTROLA O AUMENTO DE MASSA DE CÉLULA BETA
EM RESPOSTA AO AUMENTO DA DEMANDA METABÓLICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas como requisito para
a obtenção do título de Mestre
em Ciências Fisiológicas.
Orientador: Prof. Dr. Gustavo
Jorge dos Santos

Florianópolis
2022

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

DE RAMOS, Francieli Caroline

O HNF4alpha controla o aumento da massa de célula beta em resposta ao aumento da demanda metabólica / Francieli Caroline DE RAMOS ; orientador, Gustavo JORGE DOS SANTOS, 2022.

54 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Diabetes Mellitus. 3. Resistência à Insulina. 4. Obesidade. 5. Dieta Hiperlipídica. I. JORGE DOS SANTOS, Gustavo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

Francieli Caroline de Ramos

**O HNF4 α controla o aumento da massa de célula beta
em resposta ao aumento da demanda metabólica**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Eduardo Gasnhar Moreira, Dr. Universidade de Santa Catarina

Profa. Fernanda Barbosa Lima, Dra. Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Prof. Guilherme Fleury Fina Speretta, Dr.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Gustavo Jorge dos Santos, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2022

Dedico este trabalho às duas mulheres mais fortes que já conheci: minha mãe, que me deu o dom da vida, e dedicou a sua para eu me tornar quem sou. E minha Vó, Leduina (in memorian), que me ensinou sobre o amor.

AGRADECIMENTOS

Todos sabemos que precisamos uns dos outros uma hora ou outra. Desde pequenos precisamos de alguém para simplesmente sermos alimentados. Mas entrar na vida científica me mostrou que de fato eu preciso de outras pessoas. Pesquisa não se faz sozinho, e é por isso que quando olhamos um artigo científico publicado em uma revista renomada, com vários experimentos complicados, várias técnicas, existem vários nomes. Porque ninguém domina todos os conhecimentos, ninguém domina todas as técnicas. E é por isso que eu devo os meus agradecimentos ao meu orientador que Prof. Dr. Gustavo Jorge dos Santos por me conduzir no desenvolvimento dessa pesquisa, não medindo esforços e indo até mesmo para a bancada comigo, se necessário fosse.

Agradeço também à minha mãe Marilene Valdameri, que sem ela, nada disso seria possível, ela topou esse sonho comigo, ela apostou tudo em mim, e por isso eu devo tudo a ela.

Sou grata à minha família que mesmo de longe sempre se fez presente me dando todo o apoio de que precisei.

Ao meu amor, Marcos Rizzon Santos por me aguentar nesse período e por me dar suporte no que fosse preciso, sou muito grata.

À minha psicóloga por me ajudar a enfrentar esse momento complicado pelo qual passei, sou muito grata.

Robsom mais que um colega de laboratório, um amigo. Eu sou muito grata pelos discursos de incentivo antes das eutanásias, GTT, ITT...etc. Meu muito obrigada. Sem você teria sido muito difícil meu amigo.

Milena, a Dot de “Vida de Inseto”, obrigada Mi, eu te agradeço por me ensinar a técnica de Imunoflorescência e Hematoxilina e Eosina, entre outras coisas que você me ensinou. Agradeço ainda pela amizade, pelo café e por me ouvir quando eu precisei. Ah, a Dot tem asas, voa!

Rodrigo, eu acho que a gente foi um claro exemplo de simbiose, ou será que tá mais para parasitismo da minha parte? De qualquer forma, eu tenho muita saudade de ti, de comer burrito, hambúrguer, Méqui, Bk com você! (Calma gente, não era tudo de uma vez, e a gente comia salada também, às vezes). Também tenho saudade de ver filme ruim, eles só ficam

bons com você, tenho saudade de fazer brownie com você (comer moderadamente depois). Tenho saudade de tomar chá Twinings com você como duas senhoras. Muito obrigada!

Professor Alex, não só pela transmissão de conhecimento, mas também pelas conversas e incentivos. Minha gratidão.

Às minhas colegas e amigas do IBM, Liana, Flávia, Larissa, pelos seminários, conversas e trocas de conhecimento. Muito obrigada.

Aos meus colegas e amigos do LIDoC, Thais, Renata, Priscila, Guilherme e Maciel, pelo conhecimento trocado, pelas conversas, risadas e o cafezinho, sou grata.

Aos meus amigos do LENEC, Flaviano e Tamires, pelos incentivos, conhecimento, momentos felizes e amizade, minha gratidão.

Ao LAMEB, tanto corpo técnico quanto pela infraestrutura, sou muito grata.

Aos funcionários técnicos de laboratório, auxiliares de limpeza, seguranças, secretárias, recepcionistas, bioteristas do CCB, meu muito obrigada.

À UFSC pela infraestrutura e por me aceitar nessa casa onde sou muito orgulhosa de ter aprendido tantas coisas, muito obrigada.

Aos órgãos de incentivo à pesquisa CAPES e CNPq pela contribuição financeira dedicada à esta pesquisa, sou muito grata.

Não posso deixar de agradecer a mim mesma por não ter desistido, por ter perseverado, por não ter tido medo, na verdade, por ter tido medo, mas ter seguido mesmo assim, por ter seguido em frente mesmo quando já não tinha mais força. Então, obrigada a mim mesma.

Enfim, a todos, amigos e familiares, que embora eu não tenha mencionado, sabem que fizeram parte dessa história, muito obrigada!

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos, do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.” (Cora Coralina)

RESUMO

Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica, com um distúrbio da metabolização de carboidratos lipídeos e proteínas, devido à destruição da massa secretora de insulina (DM1) ou à um estado de resistência à insulina (DM2). Ambas as formas de DM apresentam redução da massa secretora de insulina, a célula beta pancreática, portanto é importante investigar vias que aumentem a massa desse tipo celular. Os alvos para o tratamento/cura do DM envolvem processos que promovem a restauração da massa de células beta funcionais, tais como diferenciação transdiferenciação e/ou replicação celular. Sendo assim, o *Hepatocyte Nuclear Factor 4-α* (HNF4α), é um importante fator de transcrição para as células beta pancreáticas, pois além de participar da expressão dos genes ligados a produção da insulina, regula a expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose. Além disso, sabe-se que o HNF4α é crucial para o aumento da massa de células beta induzida pela prenhez. No entanto o papel do HNF4α na expansão da massa de célula beta, em resposta ao aumento da demanda, como no estado de resistência à insulina, ainda é desconhecido. Baseado no fato de que esse pode ser um alvo terapêutico potencial para o DM, buscamos desvendar o papel do HNF4α nos mecanismos envolvidos na proliferação da célula beta induzida pela dieta hiperlipídica (HFD). Para essa proposta, usamos camundongos WildType (WT) (HNF4α^{loxp/loxp};Ins1^{Cre-}) e camundongos HNF4α Knockout (KO) (HNF4α^{loxp/loxp};Ins1^{Cre+}), específico na célula beta e condicionados pelo tempo (a inativação do HNF4α apenas acontece após a aplicação de tamoxifeno) alimentados com ou sem HFD. Após 20 semanas de exposição a HFD, avaliamos a massa corporal, tecido perigonadal, tolerância a glicose, sensibilidade à insulina, insulinemia e a morfometria pancreática. Como esperado os animais WT alimentados com HFD apresentaram aumento da massa corporal, bem como do tecido perigonadal, intolerância a glicose. Por outro lado, observamos que os animais KO foram mais susceptíveis a ação da HFD, apresentando glicemia de jejum aumentada e intolerância a glicose. O fenótipo observado nos animais KO alimentados com HFD foi semelhante ao perfil diabético. Além disso, a redução da sensibilidade foi observada em todos os animais expostos a HFD, independente do genótipo. A insulinemia de jejum dos animais KO/HFD estava reduzida em relação aos CTL/HFD, demonstrando que os animais KO/HFD tiveram um prejuízo na compensação adaptativa da arquitetura morfofuncional do pâncreas, comprovando que o HNF4α desempenha um papel importante no metabolismo. Em concordância, nossos dados das imunofluorescências do pâncreas demonstraram que ao analisar a massa de células beta demonstraram que os animais KO/HFD não foram capazes de expandir a massa dessas células em comparação com os animais CTL/HFD. Juntando o fato de que (1) camundongos KO foram mais susceptíveis a ação da HFD, ao ponto de apresentaram características diabéticas e (2) os camundongos KO/HFD apresentaram redução da capacidade de aumentar a massa de célula beta em um cenário de demanda metabólica aumentada, concluímos que o HNF4α é importante para as adaptações das ilhotas pancreáticas induzidas por HFD.

Palavras-chave: HNF4α; Diabetes *Mellitus*; Resistência à Insulina; Dieta Hiperlipídica.

ABSTRACT

Diabetes *Mellitus* (DM) is a metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia with a disturbance on carbohydrates, lipids and proteins. It is due to the destruction of the pancreatic beta-cell mass (DM1) or due to an insulin resistance state (DM2). Any type of DM presents a reduction in the insulin-secretory cell mass; therefore, it is important to investigate pathways that increase this cell type mass. Targets to the treatment/cure of DM involve processes that promote the functional beta-cell mass restoration, such as differentiation, transdifferentiation and/or cellular replication. Thus, Hepatocyte Nuclear Fator 4- α (HNF4 α) is an important transcription factor for the pancreatic beta-cells because, in addition to participating in the insulin gene expression, it regulates the expression of genes related to glucose metabolism. Furthermore, it is known that HNF4 α is crucial for the pregnancy-induced beta-cell mass increase. However, the role of HNF4 α in the beta-cell expansion in response to increased metabolic demand, such as in the insulin resistance state, is still unknown. In this context and based on the fact that beta-cell expansion may be a potential therapeutic target for DM, we aimed to unveil the role of HNF4 α in the mechanisms involved in high-fat diet (HFD)-induced pancreatic beta-cell proliferation. For this purpose, we used WildType (WT) (HNF4 α ^{loxp/loxp};Ins1^{Cre-}), and a beta-cell-specific and time-conditional HNF4 α Knockout (KO) mice (HNF4 α ^{loxp/loxp};Ins1^{Cre+}), fed with or without HFD. After 20 weeks of HFD, we evaluated body mass, perigonadal fat, glucose tolerance insulin sensitivity, pancreatic morphometry. As expected, WT animals fed with HFD displayed both body mass and perigonadal fat increase as well as glucose intolerance. On the other hand, we observed that KO animals were more susceptible to HFD action, presenting augmented fasting glycemia and glucose intolerance. The phenotype observed in the KO animals fed with HFD was similar to a diabetic profile. Additionally, insulin sensitivity was reduced in all animals exposed to HFD. In agreement, our data from immunofluorescence of the pancreas showed that when analyzing qualitatively the images of animals KO/HFD, there was a slight reduction in the islet diameter when compared to CTL/HFD. Furthermore, quantitative analysis of the beta cell mass showed that animals KO/HFD were not able to expand the beta cell mass compared to CTL/HFD. Adding to the fact that (1) KO mice were more susceptible to the action of HFD, as they display diabetic characteristics and (2) KO-HFD mice were incapable of increasing beta cell mass in a scenario of increased metabolic demand, we conclude that HNF4 α is essential for HFD-induced pancreatic islet adaptations.

Key-words: HNF4 α ; Diabetes *Mellitus*; Insulin Resistance; Hyperlipidic diet.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Ilustração representativa do K ⁺ ATP | 16 |
| Figura 2 - Design Experimental..... | 23 |
| Figura 3 – Genotipagem dos animais CRE-LOX..... | 24 |
| Figura 4 - Ilustração representativa da secreção de insulina | 31 |
| Figura 5 - Confirmação do perfil glicêmico dos animais Knockout para HNF4 α | 32 |
| Figura 6 - Potencial obesogênico da dieta hiperlipídica sob o ganho de massa corporal e tecido adiposo perigonadal | 34 |
| Figura 7 - Efeito da dieta rica em gordura no tecido hepático | 36 |
| Figura 8 - Perfil Glicêmico de Knockout expostos ou não à dieta rica em gordura..... | 39 |
| Figura 9 - Características da DHNA em decorrência da dieta | 37 |
| Figura 10 - Insulinemia de jejum dos animais WildType e Knockout expostos ou não a dieta gordurosa | 40 |
| Figura 11 - Imunofluorescência do pâncreas de Knockout e WildType alimentados ou não com dieta..... | 42 |

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

| | |
|---|----|
| Figura Suplementar 1 - Imunoistoquímica do pâncreas de animais Knockout e WildType alimentados ou não com dieta HFD | 49 |
| Figura Suplementar 2 - Imunofluorescência do pâncreas de animais Knockout e WildType alimentados ou não com dieta HFD | 49 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição da dieta padrão..... | 23 |
| Tabela 2 - Composição da dieta hiperlipídica | 23 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARX – *Homeobox Related to Aristaless* / Homeobox Relacionada A Aristaless;

ATF6 – *Activating transcription factor 6* / Ativação do fator de transcrição 6;

ATP – *Adenosine Triphosphate* / Trifosfato de Adenosina;

cDNA – *Complementary Deoxyribonucleic Acid* / Ácido Desoxirribonucleico complementar;

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais;

CHOP – *C/EBP homologous protein* / proteína homóloga de C/EBP;

CTL – Grupo Experimental Controle *Wild Type* e Dieta Padrão;

CTL/HFD – Grupo Experimental Controle *Wild Type* e Dieta HFD;

da Tradução Eucariótica 2-Alfa-Cinase 3;

DAB – Diaminobenzidina;

DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilidona;

DM – Diabetes *Mellitus* do Tipo 2;

DM – Diabetes *Mellitus*;

DM2 – Diabetes *Mellitus* do Tipo 1;

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* / Ácido Desoxirribonucleico;

DP5 – *Death protein 5* / proteína de morte 5;

ERK – *Extracellular Signal-Regulated Kinases*

FADH – Dinucleotídeo de flavina-adenina;

FMO – Federação Mundial da Obesidade;

FT – Fator de Transcrição;

GCK – Glicoquinase;

GLUT 2 – *Glucose transporter 2* / Transportador de glicose 2;

GLUT 4 – *Glucose transporter 4* / Transportador de glicose 4;

GSIS – *Glucose Secretion Insulin Stimulation* / Secreção de Insulina Estimulada por Glicose;

HCK – Hexoquinase;

HFD – *High fat diet* / Dieta rica em gordura;

HNF4 α – *Hepatocyte Factor Nuclear 4 alpha* / Fator Hepático Nuclear 4 alfa;

IKKB – *Inhibitor of nuclear Factor kappa-B Kinase Subunit beta* / Inibidor da Subunidade beta do fator cinase nuclear kappa-B;

IL-6 – *Interleukin-6* / interleucina-6;

ipGTT – *Glucose Tolerance Test* / Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose;

ipITT – *Insulin Tolerance Test* / Teste Intraperitoneal de Tolerância à Insulina;

IR – *Insulin Receptor* / Receptor de Insulina;

IRS – *Insulin Receptor Substrate* / Substrato do Receptor de Insulina;

JNK – *c-Jun N-terminal Kinase* / N-terminal cinase c-Jun;

KH- Grupo experimental *Knockout* HFD;

K_{ir}6.2 – *Subunit of the ATP-Sensitive K⁺ Channel* / Subunidade do Canal de K⁺ATP Sensível;

KO – *Animal Knockout*;

KO/HFD – Grupo Experimental *Knockout* e Dieta HFD;

MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinases*

MODY1 – *Maturity Onset Diabetes of the Young 1* / Diabetes de Início na Maturidade dos Jovens 1;

mRNA – *Messenger Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucleico Mensageiro;

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo;

NFkB – *Nuclear Factor kappa B* / Factor Nuclear kappa;

NGN3 – *Neurogenin 3* / Neurogenina 3

OMS – Organização Mundial da Saúde;

PAX4 – *Paired Box 4*;

PDX1 – *Pancreatic and Duodenal Homeobox 1*;

PERK – *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3* / O fator de Iniciação;

Pi3q – Fosfatidilinositol 3-cinase;

PKC – *Protein Kinase C* / Proteína Cinase C;

PKR – *Protein Kinase R* / Proteína Cinase R;

RE – Retículo Endoplasmático;

RI – Resistência à Insulina;

SNARE – “SNAP” “RE”ceptores - Família de proteínas;

TNF-α – *Fator de Necrose Tumoral alpha* / Fator de Necrose Tumoral alfa;

TRL – *Toll-like receptor* / Receptor do Tipo Toll

UPR – *Unfolded Protein Response* / Resposta à Proteínas Mal Enoveladas;

WT – *Wild Type* / Tipo Selvagem.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 1.1 Obesidade e Diabetes _____ | 12 |
| 1.2 O HNF4 α e a massa de célula beta, proliferação celular, diferenciação, transdiferenciação e regeneração _____ | 14 |
| 1.3 Resistência à insulina, aumento da massa de célula beta _____ | 16 |
| 1.4 Modelos de estudo da célula beta e da obesidade _____ | 18 |
| 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE..... | 20 |
| 3. OBJETIVOS..... | 21 |
| 3.1 Objetivos gerais _____ | 21 |
| 3.2 Objetivos específicos _____ | 21 |
| 4. METODOLOGIA | 22 |
| 4.1 Animais _____ | 22 |
| 4.2 Genotipagem _____ | 24 |
| 4.3 Metabolismo Glicêmico _____ | 24 |
| 4.3.1 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT) _____ | 25 |
| 4.3.2 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) _____ | 25 |
| 4.5 Eutanásia, extração de tecidos e armazenamento _____ | 25 |
| 4.6 Dosagem de Insulinemia _____ | 26 |
| 4.7 Histologia dos tecidos pancreático e hepático _____ | 26 |
| 4.7.1 Processamento dos tecidos _____ | 26 |
| 4.7.2 Inclusão na parafina _____ | 26 |
| 4.7.3 Secção dos tecidos _____ | 26 |
| 4.7.4 Imunohistoquímica do tecido pancreático _____ | 27 |
| 4.7.5 Imunofluorescência do tecido pancreático _____ | 27 |
| 4.7.6 Coloração Hematoxilina-Eosina do tecido hepático _____ | 28 |
| 4.8 Análise Estatística _____ | 28 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 5.1 Validação dos animais <i>knockout</i> _____ | 30 |
| 5.2 Desfechos da dieta _____ | 33 |
| 5.2.1 Ingestão alimentar e mudança da massa corporal _____ | 33 |
| 5.2.2 Dieta Hiperlipídica e a esteatose hepática _____ | 36 |
| 5.3 Adaptações metabólicas na obesidade _____ | 38 |
| 5.3.1 Perfil glicêmico e sensibilidade à insulina _____ | 38 |
| 5.3.2 Insulinemia _____ | 39 |
| 5.4.1 Análise da arquitetura morfológica do tecido endócrino pancreático _____ | 40 |
| 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS..... | 43 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 44 |
| 8. ANEXOS..... | 49 |
| 8.1 Anexo 01 _____ | 49 |
| 8.2 Anexo 02 _____ | 49 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e Diabetes

O aumento da prevalência da obesidade vem se tornando um dos mais importantes fenômenos epidemiológicos da atualidade ao redor do mundo, sobretudo em países da civilização ocidental, onde elevados índices de sedentarismo são predominantes e os hábitos alimentares caracterizam-se pelo consumo de dietas hipercalóricas, com um alto grau de lipídeo na composição (OMS, 2021).

Em 2025, a prevalência global deve chegar a 18% em homens e ultrapassar 21% em mulheres. Destes, estima-se que 257 milhões de adultos em todo o mundo (6% dos homens e 9% das mulheres) vivam com obesidade grave (definido aqui como um índice de massa corporal (IMC) $> 35\text{kg/m}^2$), mostrando um rápido aumento de um valor estimado de 202 milhões em relação ao ano de 2016. Sabe-se que no Brasil, no ano de 2019, 18,6% da população masculina e 24,4% da feminina, em idade adulta, apresentava IMC maior que 35kg/m^2 , mostrando que o Brasil vem superando as estimativas mundiais, e atualmente ocupa as posições 83º para homens e 94º para mulheres, no ranking (% obesidade por país) (FMO, 2022).

A obesidade pode ser definida como um acúmulo excessivo de gordura que resulta de um desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético. É uma doença multifatorial que possui influências genéticas, epigenéticas, fisiológicas, comportamentais e ambientais. Sobretudo, essa patologia é considerada um preocupante e oneroso problema de saúde pública, além de ser um fator de risco para outras complicações, dentre elas, a síndrome metabólica. (ABESO, 2020; OMS 2022).

O desenvolvimento de resistência insulínica (RI), dislipidemia aterogênica e disfunção endotelial denotam prejuízos que estão relacionadas à fisiopatologia dessa síndrome. A dislipidemia aterogênica pode ser consequência da RI e da obesidade, e a disfunção endotelial é resultado da RI, das adipocinas e ácidos graxos livres liberados pela gordura visceral (Gadde, *et al.*, 2018). No entanto, nem todo obeso apresenta síndrome metabólica ou RI, porém o aumento de massa corporal está, geralmente, associado ao aumento da gordura visceral, predispondo assim o indivíduo ao desenvolvimento da RI (Isfort, *et al.*, 2014).

Além das implicações já descritas e decorrentes do acúmulo de gordura, a obesidade pode ainda ser considerada uma doença de caráter inflamatório crônico (Barazzoni, 2018). Nessa configuração, ocorre uma infiltração de células do sistema imune que sintetizam e liberam diversas citocinas e proteínas de fase aguda associadas à inflamação, com destaque para o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e para a Interleucina-6 (IL-6) (Bastard, *et al.*, 2016).

Sabe-se que na obesidade há um aumento desses marcadores inflamatórios e que este fato está relacionado ao desenvolvimento da resistência à ação da insulina. As citocinas pró-inflamatórias, são capazes de alterar a sinalização da insulina ao desativar o substrato do receptor de insulina (IRS), por meio da fosforilação em resíduos serina/treonina (Nakatani *et al.*, 2005), atenuando a cascata de sinalização da translocação do *Glucose Transporter 4* (GLUT4), um transportador citosólico de glicose, presente nos tecidos adiposo e muscular. Assim, o aumento do tecido adiposo visceral demonstra-se estar intimamente ligado ao processo de RI (Czech, 2017).

Porém, o aumento das citocinas inflamatórias não é um processo que acontece exclusivamente devido ao aumento do tecido adiposo visceral. Já se sabe que existe uma grande influência da dieta hiperlipídica sobre o aumento desses marcadores, isso se dá devido à interação entre a dieta e a microbiota intestinal do hospedeiro (Brooks *et al.*, 2017). Uma vez que quando há um alto consumo de dieta hipercalórica, sobretudo hiperlipídica, há também um aumento da proliferação de bactérias *gram* negativas, estas, por sua vez, têm um constituinte na membrana chamado Lipopolissacarídeo (LPS) (Wu e Ballantyne, 2017).

O LPS é uma molécula altamente inflamatória para o hospedeiro, pois estimula a liberação de TNF- α , via interação com o receptor *Toll-like Receptor* (TLR), e como mencionado anteriormente o TNF- α está intimamente relacionado ao desenvolvimento da atenuação da sinalização da insulina (Brooks *et al.*, 2017). Sendo assim o organismo exposto à uma dieta rica em gordura apresenta um estado de inflamação crônica de baixo grau, que leva à RI, tanto pelo aumento do tecido adiposo quanto pela interação dieta *versus* microbiota (Antuna-Puente *et al.*, 2008).

Sendo assim, a obesidade e a exposição à dieta hiperlipídica são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, dislipidemia, síndrome metabólica, RI e Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2).

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma disfunção metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica com alteração no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Resulta da ausência de secreção e/ou de uma inadequada ação da insulina (ADA, 2021). Segundo estimativas da OMS, o número de pessoas diagnosticadas com DM nos anos 2000 era de 177 milhões e, espera-se que este número alcance 350 milhões de pessoas em 2025.

Etiologicamente o DM é classificado em tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2). O DM1, corresponde a cerca de 10 a 15% dos casos registrados com DM e decorre da depleção total da massa de células beta pancreática devido a um ataque autoimune (IDF, 2020; Poitout, 2010). Já o DM2, corresponde a 90% dos casos registrados como DM e, seu desenvolvimento está

associado, como mencionado anteriormente, à obesidade, sedentarismo, RI e ainda a disfunção da célula beta pancreática (Kitamura, 2013).

Além desses tipos clássicos de DM, também conhecidos como Diabetes Poligênicos, existe uma classificação de DM decorrente de uma alteração monogênica. Este DM é chamado de *Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY), e está relacionada como diabetes do jovem, no início da maturidade, caracterizado por uma única mutação genética e apresenta como característica deficiência na secreção de insulina induzida por glicose (Fajans, 2011). O MODY resulta da mutação de ao menos 16 diferentes genes, entre eles o *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* (HNF4 α), responsável pelo MODY1, que pode se manifestar no neonato como hiperglicemia hiperinsulinêmica, porém o mais comum é a presença de hiperglicemia assintomática na criança, adolescente ou jovem antes do seu diagnóstico definitivo (Al-kandari, 2021). Para que o diagnóstico se diferencie das demais classificações de DM, o MODY é diagnosticado por meio do histórico familiar progresso de diabetes, em três ou mais gerações, sem a presença de obesidade ou autoimunidade reativa contra células pancreáticas (Fajans, 2011).

1.2 O HNF4 α e a massa de célula beta, proliferação celular, diferenciação, transdiferenciação e regeneração

O HNF4 α , é um fator de transcrição (FT) e dentre seus diferentes domínios, apresenta um do tipo “dedos de zinco” que se liga ao DNA como homodímero. Este FT desempenha um papel no desenvolvimento do fígado, rins e intestinos. O processamento alternativo do gene do HNF4 α resulta em várias variantes de transcrito (Sangan, 2015).

As diferentes isoformas do HNF4 α , (HNF4 α 1-9) também se diferem em termos de distribuição tecidual (Guo, 2018). Os fatores que determinam qual isoforma vai atuar em determinado tecido são os diferentes promotores teciduais: a ativação do promotor proximal P1 resulta na expressão das isoformas HNF4 α 1 ao 6 é predominante no fígado do adulto. 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 colón (Gupta e Kaestner, 2004; Guo, 2018) Sendo assim, as isoformas expressas em células beta pancreáticas são as HNF4 α 7, 8 e 9 (Ihara, 2005; Bailly, 2009).

Nas células beta pancreáticas, o HNF4 α controla genes envolvidos com o metabolismo da glicose, dentre eles a Aldolase B, GLUT2 e a Glicoquinase, e na secreção de insulina, como a L-piruvato cinase e K_{ir}6.2 (Hansen, 2002; Gupta, 2007), este último é uma subunidade dos canais de K⁺ sensível (K⁺_{ATP}) à *Adenosine triphosphate* (ATP) que atua como promotor da despolarização bicamada fosfolipídica (membrana celular) durante o processo de secreção de

insulina (Figura 1). Ademais, o HNF4 α regula mais de mil outros genes no fígado e no pâncreas (Gupta e Kaestner, 2004). Sabe-se que animais *knockout* para HNF4 α em células beta pancreáticas (HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP};\text{Ins1}^{\text{Cre+}}$) apresentam intolerância a glicose e hiperinsulenemia de jejum e no estado alimentado (Huang, 2008).

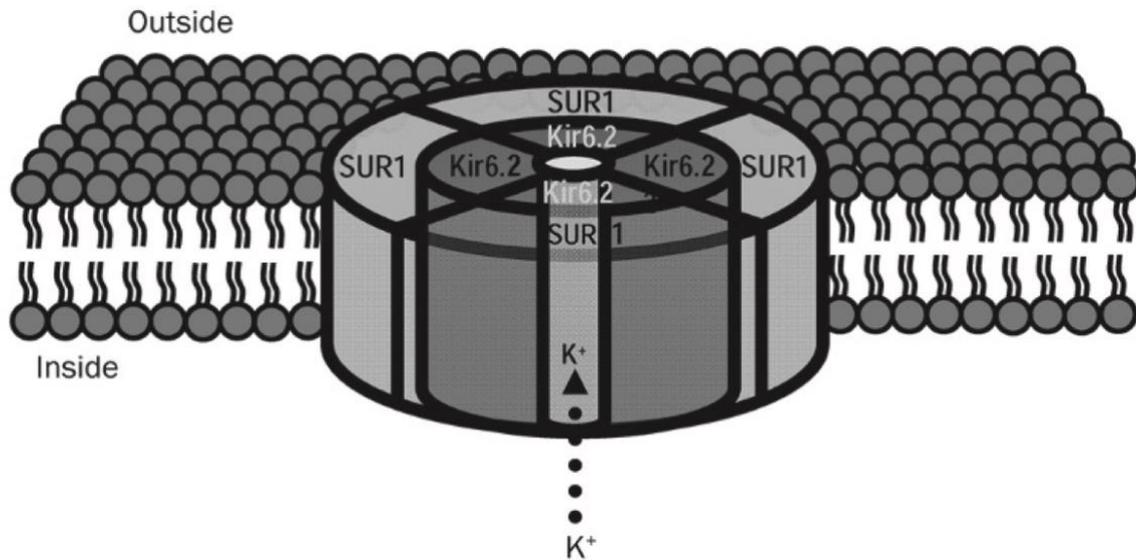
Ainda nas células beta pancreáticas, o HNF4 α regula o processo de diferenciação, proliferação e crescimento, principalmente na fase neonatal e durante a gestação (Gupta e Kaestner, 2004).

Já está bem consolidado na literatura que o processo de diferenciação, proliferação e crescimento é resultado de uma das vias de crescimento denominada MAPK. E no caso da célula beta, a cascata MAP é ativada por receptores tirosina cinases, receptores auto fosforiláveis, resultante da ativação da insulina com seu respectivo receptor. A ativação da via MAPK desencadeia uma sequencia de cinases que culminam na ativação de RAS, RAF, MEK1/2 que culmina na fosforilação e ativação de ERK1/2 e desempenham um papel crítico para efeitos mitogênicos da insulina, incluindo proliferação, diferenciação e sobrevivência (Campbell e Newgard, 2021).

Gupta *et al.*, (2007), demonstraram que animais HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP};\text{Ins1}^{\text{Cre+}}$, KO para HNF4 α nas células beta, frente um aumento da demanda metabólica por meio da gravidez, tiveram uma redução da expansão da massa de célula beta através da via RAS/RAF/MEK/ERK, com diminuição da atividade da via de crescimento MAPK, em comparação com animais HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP};\text{Ins1}^{\text{Cre-}}$. Tais observações nos levam a crer que o HNF4 α desempenha um papel importante na expansão da massa de célula beta diante de um aumento da demanda metabólica.

Nesta mesma seara, nosso grupo de pesquisa mostrou que, assim como na prenhez, o HNF4 α é importante no aumento de massa de célula secretora de insulina em um cenário de RI induzida por fármacos. Mostramos que, em comparação com animais WT, animais KO para o HNF4 α em células beta não apresentaram aumento de massa de célula beta em resposta à dexametasona (Barth e Ruoso *et al.*, 2021). No mesmo estudo mostramos que o tratamento com dexametasona foi incapaz de promover o aumento da expressão de genes relacionados com o fenótipo de célula beta, como PDX1, PAX4, NGN3, no animal mutante, em comparação com o animal sem alteração genética. Confirmando que o HNF4 α desempenha um papel fundamental na adaptação morfológica do pâncreas diante do desafio com glicocorticoide e aumento da demanda metabólica induzida por prenhez.

Figura 1- Ilustração representativa do K⁺ATP



FONTE: (Sun e Feng, 2013).

1.3 Resistência à insulina, aumento da massa de célula beta

Nos tecidos periféricos, muscular e adiposo, a ativação da via Serina/Treonina Cinase 1 e Fosfatidilinositol 3-cinase (PI3q/AKT) pela ativação do receptor de insulina tirosina cinase (IR) em resposta à concentração de glicose sanguínea, estimula a translocação de GLUT4. Porém essa via de ativação não termina por aí. A ativação de PI3q pela insulina, influencia a translocação de GLUT4 por meio da ativação de: (1) da PDK-1, que por sua vez fosforila as isoformas atípicas da Proteína Cinase C (PKC λ/θ) envolvidas na síntese proteica e no transporte de vesículas de GLUT4 para a membrana celular e (2) da AKT, que fosforila a proteína AS160, promovendo a translocação do GLUT4 para a membrana celular. E assim a célula do tecido periférico pode ter o aporte adequado de glicose para executar as suas funções (Sevillano *et al.*, 2021).

Como mencionado anteriormente a obesidade é um fator de risco para desenvolvimento de DM2 isso se deve muito por causa do acúmulo de tecido adiposo pode interferir na sinalização da insulina.

Durante a instalação da obesidade o aumento da massa de tecido adiposo ocasiona infiltração de células imunes nesse tecido, como neutrófilos e macrófagos M1 inflamatórios (Hotamisligil, 2017).

No plano celular e molecular na obesidade e no DM2, a RI é secundária ao fenômeno inflamatório. No caso de alterações pós-translacionais, resalta-se a ativação de serinas cinases, *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), *Inhibitor of nuclear Factor kappa-B kinase Subunit β* (IKKB), Proteína Cinase C PKC β e θ e Proteína Cinase R (PKR) e outras que induzem fosforilação em serina (sítio inibitório) de substratos do receptor de insulina, como IRS-1 e 2 de interagir com o receptor (sítio de ativação) e induz a degradação proteossômica do IRS-1 resultando em RI (Boden *et al.*, 2015);(Hotamisligil, 2017).

Com a RI nos tecidos periféricos muscular e adiposo, principal característica da fisiopatologia do DM2, o corpo precisa fazer ajustes (Steil *et al.*, 2001). A RI leva ao processo compensatório de hipersecreção de insulina, com a finalidade de atingir a homeostase glicêmica, e essa fase é denominada fase compensatória, caracterizada por normoglicemia. Essa compensação ocorre tanto em nível funcional, onde se observa aumento na função celular (aumento da produção/secreção de insulina) quanto em nível estrutural, com alterações estruturais (hiperplasia e hipertrofia de célula beta) (Chera *et al.*, 2014; Paulsen, *et al.*, 2010).

Porém com o avanço do quadro de aumento da demanda da insulina, a célula β , começa apresentar um processo chamado de estresse de retículo endoplasmático (RE), onde se observa um acúmulo de proteínas mal dobradas no RE em decorrência de uma disfunção no processamento de proteínas. Para lidar com o estresse do RE, as células desencadeiam uma série de vias conhecidas como 'resposta desdobrada da proteína' (UPR). Esse processo é mediado por pelo menos três proteínas, IRE α , PERK e ATF6. As UPRs desencadeiam uma transdução de sinal inflamatória, IKKB, NF κ B, AP1, as quais interferem na via de sinalização da insulina. A estimulação persistente da UPR em resposta ao estresse do RE induz apoptose via ativação da proteína homóloga C/EBP (CHOP), quinase N-terminal c-jun (JNK), proteína de morte 5 (DP5) e outros sinais pró-apoptóticos. Sendo assim o organismo, deixa a fase compensatória e entra da fase descompensada, apresentando hiperglicemia crônica (Yang, *et al.*, 2017).

Com o intuito de dar suporte às células beta, na fase compensatória, nos últimos anos as pesquisas têm se voltado para a discussão do processo de conversão de células não-beta em células beta pancreáticas, ou seja, para o processo de plasticidade pancreática, o que tem grande potencial de tratamento da DM (Ferber, *et al.*, 2000; Spijker, *et al.*, 2013). Devido a esse potencial terapêutico, o processo de plasticidade pancreática é vastamente estudado e, hoje sabemos que existem muitas possibilidades de reprogramar células já diferenciadas em células beta funcionais, a fim de curar/tratar o quadro de DM (Fajans, 2011; Sangan, 2015).

A capacidade das células do pâncreas em se modificar de acordo com o ambiente e suas influências denota que a massa de células beta é diferente ao longo da vida e tal processo é resultante de atividades celulares como hiperplasia, neogênese, apoptose e hipertrofia. A capacidade de adaptação pancreática é observada em diversos momentos fisiológicos, como durante a prenhez e em indivíduo neonato, porém essa capacidade tende a diminuir ao longo do envelhecimento saudável (Gupta e Kaestner, 2004).

Desse modo, se faz necessário a compreensão dos mecanismos envolvidos no aumento da massa de célula beta pancreática induzido por RI. Para tal finalidade, existem diversos modelos animais, dentre eles estão: animais expostos a glicocorticoides; animais geneticamente obesos e; animais alimentados com dieta hiperlipídica.

1.4 Modelos de estudo da célula beta e da obesidade

As ferramentas de estudo da expansão da massa de célula beta pancreática são limitadas em humanos. Por causa do tamanho pequeno das ilhotas, a falta de bons marcadores de superfície para a célula beta, e a posição retro peritoneal do pâncreas. Atualmente não é possível fazer imagem da ilhota ou da massa de célula beta em pessoas vivas (Saisho et al, 2013). A biopsia pancreática também não é viável, devido as diferentes densidades em várias regiões do pâncreas, então a caracterização exata da célula beta requereria múltiplas amostras ao longo do órgão (Wang et al, 2013).

Além do mais, biopsia pancreática é um procedimento que pode levar a pancreatite, então as amostras destinadas para estudo devem ser pós-morte. Por causa dessas limitações, muitos pesquisadores têm recorrido aos estudos com células beta de roedores (Craven et al, 2015). A capacidade proliferativa da célula beta tende a ser maior no rato que no humano. Portanto, apesar das diferenças entre humanos e camundongos, na proliferação da célula beta, o camundongo é mais relevante (Linnemann, 2014).

Dentro da pesquisa experimental existem inúmeros métodos que expõem os animais experimentais a um contexto obesogênico. Alguns modelos animais de indução da obesidade são produzidos através da lesão do núcleo ventromedial do hipotálamo, em que se utilizam dois métodos: administração de glutamato monossódico ou lesão elétrica direta (Von Diemen, Trindade *et al.*, 2006). A administração do glutamato monossódico em ratos recém-nascidos leva ao desenvolvimento da obesidade devido à falta de controle entre a absorção e gasto de energia.

No campo da manipulação genética, para a indução de obesidade há diversos modelos capazes de reproduzir tal contexto. Nos últimos anos, roedores geneticamente modificados ou

knockout foram utilizados para auxiliar no estudo dos genes que influenciam a sensação de saciedade e as causas da obesidade (Bao, Ma *et al.*, 2015; Ishii, Motohashi *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2017).

Outro método amplamente utilizado na pesquisa com animais sujeitos a obesidade é a exposição à dieta hipercalórica. Por se tratar de um modelo simples e que mais se assemelha à realidade da obesidade em humanos, os modelos animais de obesidade obtidos através de dietas hipercalóricas têm sido amplamente utilizados no estudo das alterações metabólicas ligadas à obesidade (Sladek, Stevens *et al.*, 2015; Grasa-Lopez, *et al.*, 2016). Nestes modelos, os animais reproduzem melhor o estado de obesidade comum em humanos do que a maioria dos modelos geneticamente modificados e podem ser a melhor escolha para testar estratégias terapêuticas (Lutz e Woods, 2012; Barrett *et al.*, 2016). São vários os tipos de dietas e tanto as dietas suplementadas com maior percentual de carboidratos como as suplementadas com maior conteúdo de lipídios, atingem valores hipercalóricos com elevado ganho energético. Tais dietas, chamadas de obesogênicas, promovem hiperfagia, acúmulo de gordura visceral e resistência insulínica. (Donner, Elliott *et al.*, 2015; Sadowska *et al.*, 2017). Sendo assim, a exposição de animais experimentais à dieta rica em gordura tem se mostrado um promissor método de estudo de doenças metabólicas.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Devido à sua função na manutenção da homeostase glicêmica e sua relação com o desenvolvimento do DM, a ilhota pancreática é vastamente estudada, pois nela se encontram diversos tipos celulares, dentre eles as células beta, principais células acometidas no processo de patogênese do DM.

A diferenciação, proliferação e transdiferenciação, também denominada plasticidade pancreática, dos vários tipos celulares da ilhota é controlada por diversos fatores de transcrição. A plasticidade celular, atrelada ao controle da transcrição gênica, é fundamental na manutenção do fenótipo e da função de células já adulta (Shih, 2001). Em células beta pancreáticas, a importância do HNF4 α pode ser verificada quando se observa o desenvolvimento do MODY1 (Gupta e Kaestner, 2007), um tipo de DM, o qual é decorrente de uma mutação desse FT, responsável por diversas funções na célula beta (Hansen *et al.*, 2002), como metabolismo de glicose e produção/secreção de insulina.

Quando instalado, o DM leva a depleção total da massa de célula beta, sendo assim, se faz necessário estudar mecanismos que promovam a regeneração dessas células e isso é fundamental para traçar novos alvos terapêuticos para o tratamento e uma possível cura. A plasticidade pancreática tem sido a aposta no processo de regeneração de massa de célula beta e uma possível terapia para qualquer forma de DM. 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 exposição a uma dieta hiperlipídica induz RI, (2) a RI promove um aumento de massa de célula beta, e (3) que o HNF4 α é um fator de transcrição que regula o aumento da massa de célula beta induzido por situações de estresse, hipotetizamos que animais *knockout* para HNF4 α apresentam um prejuízo no aumento de massa de célula beta, induzido pela RI em animais submetidos à dieta hiperlipídica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o papel do HNF4 α na expansão das células beta no modelo animal de RI induzida por exposição à dieta hiperlipídica.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar se a exposição à hiperlipídica promove alterações gene-dependentes ligadas à falta do HNF4 α :

Na massa corporal dos animais;

Na glicemia de jejum dos animais;

Na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina dos animais;

Na presença de esteatose no tecido hepático dos animais;

Na insulinemia de jejum dos animais;

Na massa de células beta pancreáticas na massa de células beta dos animais.

Além disso para todos os objetivos supracitados, investigar se a falta do HNF4 α implica em alterações morfológicas e funcionais no tecido pancreático.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

O estudo foi aprovado pela CEUA/UFSC - número de protocolo 7696221019 (Anexo 01). Para a realização deste trabalho utilizamos animais machos¹ knockout tecido específico e tempo-condicional para o HNF4 α (HNF4 α ^{loxP/loxP}; Ins1^{Cre+}). Os animais foram gerados a partir do cruzamento da linhagem portadora da enzima CRE-recombinase nas células beta (linhagem Ins1^{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 (CTL):** após a genotipagem, os animais que não expressavam o gene para a enzima CRE-recombinase e eram homocigotos para a sequência LOX (animais (HNF4 α ^{loxP/loxP}; Ins1^{Cre-}) foram incluídos nesse grupo e com 45 dias de vida esses animais receberam 100 μ L de Tamoxifeno intraperitoneal, com concentração de 20mg/mL, por cinco dias consecutivos. Quinze dias após a última injeção de Tamoxifeno os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose e expostos a dieta padrão por 20 semanas.
- **CONTROLE/HFD (CTL/HFD):** Após a genotipagem, os animais que não expressavam o gene para a enzima CRE-recombinase e eram homocigotos para a sequência LOX (animais (HNF4 α ^{loxP/loxP}; Ins1^{Cre-}) foram incluídos nesse grupo e com 45 dias de vida esses animais receberam 100 μ L de Tamoxifeno intraperitoneal, com concentração de 20mg/mL, por cinco dias consecutivos. Quinze dias após a última injeção de Tamoxifeno animais desse grupo foram submetidos ao teste de tolerância à glicose e expostos a dieta hiperlipídica por 20 semanas.
- **Knockout/HFD (KO/HFD):** Após a genotipagem, os animais que expressavam o gene para a enzima CRE-recombinase e eram homocigotos para a sequência LOX (animais (HNF4 α ^{loxP/loxP}; Ins1^{Cre+}) foram incluídos nesse grupo e com 45 dias de vida esses animais receberam 100 μ L de Tamoxifeno, intraperitoneal, com concentração de

¹ Foi utilizado apenas machos pois, a literatura relacionada ao tema, em sua grande maioria utiliza machos e assim, a discussão e inserção de nossos resultados no conhecimento atual é facilitado e, uma vez que o ciclo estral influencia na ação da insulina e na resposta à insulina, utilizaremos macho para excluir essa variável hormonal. Além disso o método para indução da ativação da enzima CRE-recombinase utiliza o fármaco Tamoxifeno, o qual interage com o receptor de estrogênio, então as fêmeas estariam ainda mais susceptíveis a variação hormonal, e deixando um viés nesta pesquisa.

20mg/mL, por cinco dias consecutivos. Quinze dias após a última injeção de Tamoxifeno os animais desse grupo foram submetidos ao teste de tolerância à glicose e expostos a dieta hiperlipídica por 20 semanas.

A dieta padrão (Tabela 1) foi fornecida aos animais foi da empresa Nuvilab[®] e a dieta hiperlipídica (Tabela 2) fornecida aos animais foi da empresa PragSoluções[®] Biociências.

Tabela 1 - Composição da dieta padrão

| Ingredientes | g/Kg |
|----------------------|-------|
| Caseína | 140 |
| Amido | 115,5 |
| Dextrina | 155 |
| Sacarose | 100 |
| L-cistina | 1,8 |
| Fibra | 50 |
| Óleo de soja | 40 |
| Banha | 0 |
| Sais AIN93G** | 35 |
| Vitaminas AIN93G** | 10 |
| Cloridrato de colina | 2,5 |

Tabela 2 - Composição da dieta hiperlipídica

| Ingredientes | g/Kg |
|----------------------|-------|
| Caseína | 200 |
| Amido | 115,5 |
| Dextrina | 132 |
| Sacarose | 100 |
| L-cistina | 3 |
| Fibra | 50 |
| Óleo de soja | 40 |
| Banha | 312 |
| Sais AIN93M** | 35 |
| Vitaminas AIN93M** | 10 |
| Cloridrato de colina | 2,5 |

** Composição detalhada dada por Reeves e colaboradores (1993) (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993).

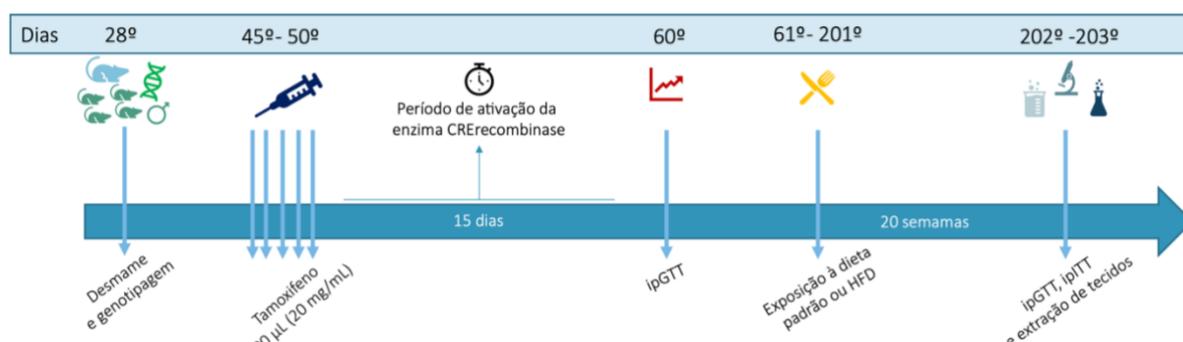


Figura 2 - Design Experimental

4.2 Genotipagem

A genotipagem foi realizada a partir do DNA extraído da cauda dos animais. O DNA genômico foi preparado a partir de biópsia de cauda lisada com proteinase K. Um fragmento da cauda foi incubado em tampão contendo Proteinase K (Roche®, USA) a 55 °C, *overnight*, seguido de 95 °C, por 10 minutos. Após a extração, o DNA seguiu para o processo de amplificação onde foi adicionado, o *SYBER green* (enzima TaqDNA polimerase, MgCl₂, dNTPs e *buffer*), e os iniciadores, oIMR1084 e oIMR1085, os quais apresentam a sequência de bases nitrogenadas GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC (*foward*) e GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT (*reverse*), respectivamente e amplificam parte do gene que codifica a enzima CRE-recombinase. E em outro preparo e os iniciadores oIMR2064 e oIMR2065, os quais apresentam as bases nitrogenadas AGAATGACCCTGAAGCACCAGG (*foward*) e GCCAGAGGTCTGTGAAACAAGG (*reverse*) respectivamente e amplificam parte do gene que codifica a sequência LOX, já anteriormente desenhados pelo *Jackson Laboratory*®, USA, laboratório produtor dos animais. Então as amostras seguiram para o termociclador, ciclando à diversas temperaturas para promover os processos de desnaturação, anelamento e extensão. Após a finalização da etapa de amplificação, as amostras seguiram para a etapa de eletroforese, em um gel de agarose 1,5% para a genotipagem de CRE e um gel de agarose 3% para genotipagem de LOX, em um *buffer* de corrida Tris/borato/EDTA, para a separação das sequências de nucleotídeos, por pesos moleculares (Figura 3).

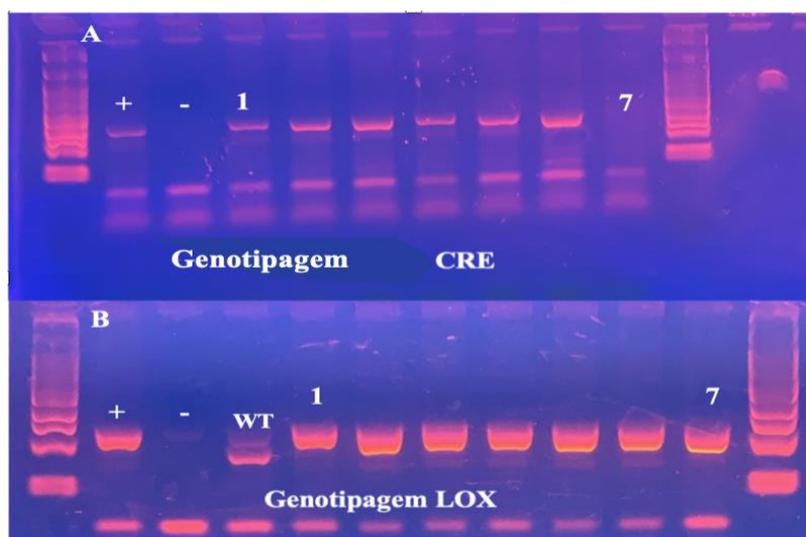


Figura 3 – Genotipagem dos animais CRE-LOX

Após a extração e amplificação das amostras, as mesmas foram submetidas a eletroforese em que ocorre a separação das proteínas por tamanho. Na genotipagem de CRE temos primeiramente o marcador de peso molecular, seguido dos controles positivo, negativo, e os animais que estavam sendo genotipados, finalizando com o marcador de peso molecular. Nessa genotipagem apenas o animal 7 não era positivo para CRE (A). Na genotipagem de LOX, temos primeiramente o marcador de peso molecular, seguido dos controles, LOX-homozigoto, negativo, *Wild Type*, e os animais que estavam sendo genotipados, finalizando com o marcador de peso molecular. Nessa genotipagem todos os animais eram LOX-homozigoto. (B)

4.3.1 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 20% (1 g/Kg de massa corpórea do animal) foi administrada pela via intraperitoneal. A glicemia dos animais foi verificada nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 min após a administração de glicose.

4.3.2 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)

Após a verificação da glicemia no estado alimentado com aparelho *Accu-Check Advantage II*[®], (1,5 horas de privação de alimento), insulina (1 U/kg de massa corpórea do animal) 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 $0.693/t^{1/2}$.

4.5 Eutanásia, extração de tecidos e armazenamento

A eutanásia foi realizada segundo os procedimentos do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), para roedores e logomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica, do Guia Brasileiro de Produção Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, Resolução Normativa N° 33 de 18 de novembro de 2016.

Após sedação com gás isoflurano os animais foram decapitados e tiveram o sangue troncular coletado para análises subsequentes. O peritônio dos animais foi exposto para a extração de tecidos hepático, pancreático, adiposo perigonadal, e muscular extensor digital longo e gastrocnêmio. Após a extração os tecidos foram pesados e armazenados, cada um conforme o seu protocolo de análise. Para as análises bioquímicas do plasma, o sangue foi coletado em tubos com 50µL de heparina, centrifugado e, o plasma sobrenadante e coletado e armazenados em -20°C. Para as análises histológicas os tecidos hepático e pancreático foram removidos e fixados em paraformaldeído 4%, e, após lavagem, armazenados em álcool 70% em 4°C. Para as análises moleculares de PCR e *Western Blot*, dos tecidos hepático e muscular foram armazenados.

4.6 Dosagem de Insulinemia

Após a coleta os sangues tronculares foram armazenados em microtubos com EDTA em gelo até a coleta do plasma. As amostras foram centrifugadas a 12000 G e 4 °C por 15 minutos e, em seguida o plasma sobrenadante foi coletado e armazenamento em novo tubo a -20 °C.

A insulina plasmática foi mensurada com o kit AlphaLISA Detection Kit. (#AL204C, PerkinElmer[®], MA, USA).

4.7 Histologia dos tecidos pancreático e hepático

4.7.1 Processamento dos tecidos

Após a extração dos tecidos pancreático e hepático, armazenamento na solução histológica paraformaldeído 4% por 24 horas refrigerados a 4°C. Os tecidos então foram lavados com solução tampão PBS (NaCl 140 mM, Kcl 2,6 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, pH 7,4), por 3 vezes (5 minutos sobre agitação) e armazenados em Álcool 70%, à 4 °C.

As amostras foram desidratadas com um sequencia de álcoois de 80%, 95%, 100%, xilol/álcool, xilol 100 %, xilol parafina, parafina 100%, para passarem pelo processo de inclusão na parafina.

4.7.2 Inclusão na parafina

Com a parafina líquida a 65 °C foi dado início ao processo de inclusão dos tecidos nos moldes, colocando a amostra centralizada no bloco, com o auxílio de uma pinça. Os moldes foram preenchidos com mais parafina líquida até serem completados. Então as amostras seguiram para o resfriamento em geladeira a 4 °C e após o resfriamento foram desemblocadas do molde.

A partir dessa etapa os blocos seguiram para a microtomia.

4.7.3 Secção dos tecidos

O tecido pancreático fixado em parafina foi preso no micrótomo. Iniciamos com o desbaste do bloco até a chegada do tecido. Após a identificação do fragmento de tecido a secção começa-se a contagem para a realização das secções seriadas, de 5 µm. Então foram coletados os 5 primeiros secções, desbastado 100 secções, então selecionados mais 5 secções, desbastado mais 100 secções, repetindo o procedimento por mais duas vezes. Já o tecido hepático após a

identificação do fragmento de tecido na secção começou-se a coleta dos dois primeiros fragmentos, de 5 µm, então desbastou-se 200 secções, posteriormente coletou-se mais dois fragmentos de tecidos.

4.7.4 Imunohistoquímica do tecido pancreático

Para mensuração da massa das células beta, as secções foram desparafinizadas, reidratadas, lavadas com tampão fosfato, PBS (pH 7,4) e incubadas com solução de citrato de sódio 10mM (pH 6) aquecida e mantida a 98 °C em banho-maria por 30 min para recuperação antigênica. Na sequência as secções foram novamente lavadas com PBS e uma solução de peróxido de hidrogênio (0,3%) foi usada para bloquear a atividade da peroxidase endógena antes da permeabilização com PBS contendo Tween-20 (0,1%) e bloqueio com albumina bovina (5%) em temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as secções foram lavadas com PBS e então, imunocoradas por incubação com anticorpo primário policlonal anti-insulina feito em *guinea pig* (1:400; *Dako North America*[®], Inc.; cat. no. A0564) diluído em PBS contendo albumina bovina a 3% *overnight* a 4°C. No dia seguinte as secções foram lavadas com PBS e incubadas, por 2h em temperatura ambiente com anticorpo HRP-conjugado anti-*guinea pig* (1:1000; *Invitrogen*[®]; cat. no. 614620). Células positivas para insulina foram detectadas com solução de 3,3'-diaminobenzidina (*Sigma Chemical*[®]). Na sequência, as secções foram coradas com hematoxilina de *Ehrlich*, desidratadas e posteriormente escaneadas utilizando um *scanner* automático (*AxioScan*, *ZEISS*[®], *Oberkochen*, Alemanha) para posterior análise.

As imagens foram obtidas pelo *AxioScan*, a mensuração da área total do pâncreas e a área total imunomarcada para insulina nas ilhotas, foi realizado pelo *software Zen Blue Lite*[®] (*ZEISS*[®], *Oberkochen*, Alemanha). Então todo o tecido pancreático foi contornado com a ferramenta própria do *software* seguido dos contornos nas ilhotas e posteriormente nas marcações para Insulina e Glucagon. A determinação da massa relativa de células beta foi feita por meio do cálculo da razão entre a multiplicação da área de INS⁺ (cm²) com a massa do pâncreas (g) sobre a área total do pâncreas (cm²).

As imagens representativas foram obtidas em microscópio invertido (*OLYMPUS*[®]; *Tokyo, Japan*).

4.7.5 Imunofluorescência do tecido pancreático

As secções foram desparafinizadas, reidratadas, lavadas com tampão fosfato, PBS (pH 7,4). Para recuperação antigênica as secções foram incubadas com solução de citrato de sódio

10mM (pH 6) aquecida no micro-ondas em potência média por 3 minutos com ciclos de 3 vezes e intervalo de 2 minutos entre cada ciclo.

Para diminuir as ligações inespecíficas do anticorpo primário e permeabilizar as secções, estas foram bloqueadas em solução de PBS contendo 3% de albumina bovina e 0,5% de triton X-100 (PBST) por 1 hora em temperatura ambiente. A incubação com o anticorpo primário anti-insulina A0564, *Dako cytometry, CA, USA*, e anti-glucagon sc7779R, *Santa Cruz Biotechnology* (na diluição 1:100 e 1:25 respectivamente, em PBS 1% albumina bovina) por 4 horas refrigerada a 4°C em câmara úmida. Após este período, as secções foram lavadas em PBS (3 vezes de 5 min) e incubadas com anticorpo secundário *anti-goat AlexaFluor 488* (1:500) por 1 hora em temperatura ambiente. A seguir, as secções foram lavadas mais 3 vezes em PBS e incubadas com DAPI por cinco minutos em câmara úmida.

Após lavagens em PBS (3 vezes de 5 min), as secções foram montadas com lamínulas, previamente lavadas para evitar artefatos, utilizando-se o meio de montagem *Vectashield antifading mounting media*.

As imagens foram obtidas pelo *AxioScan* (ZEISS®, *Oberkochen, Alemanha*), a mensuração da área total do pâncreas e a área total imunomarcada para insulina nas ilhotas, foi realizado pelo *software ImageJ*® (Fiji), após as imagens receberem tratamento de marcação inespecífica. Os resultados do *ImageJ*®, são expressos em pixel, então os mesmos foram convertidos para cm². A determinação da massa relativa de células beta foi feita por meio do cálculo da razão entre a multiplicação da área de INS⁺ (cm²) com a massa do pâncreas (g) sobre a área total do pâncreas (cm²).

As imagens representativas foram obtidas em microscópio invertido (OLYMPUS®, *Tokyo, Japan*).

4.7.6 Coloração Hematoxilina-Eosina do tecido hepático

Após o processo de desparafinização com xilol, os tecidos foram hidratados, e seguiu-se para a coloração com hematoxilina de *Ehrlich* e eosina, diferenciador ácido e básico, desidratação e finalizando com o meio de montagem.

4.8 Análise Estatística

O “n” amostral foi determinado pelo modelo de Cochran (1965), em que $n = 1 + [2C*(s/d)^2]$, onde: C= representa o poder do teste (1-β; chance de encontrar uma diferença existente) e nível de significância (α; a chance de considerar dois grupos diferentes quando eles não o são). Para p<0,05 o valor de α é 0,05. s= é o desvio padrão β= é a diferença esperada entre

os grupos. Para calcular o C, deve-se aplicar a fórmula: $C = (z\alpha + z\beta)^2$. Onde z corresponde valores no intervalo de 0,95 ($z\alpha=1,96$ e $z\beta= 1,282$) ou seja $(1,96 + 1,282)^2 = 10,51$. Considerando-se um desvio máximo (s) de 0,20 (20%) e a diferença da média entre os grupos (d) de 0,45 (45%), ao aplicarmos a fórmula temos que: $n=1+ [2*10,51*(0,2/0,45)^2] + \% 10$ para eventual perdas = 5,66, ou seja, ≈ 6 animais por grupo.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (*SEM*). A verificação dos *outliers* foi feita pelo método de Grubb's. Os dados passaram por testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro–Wilk para verificar a frequência de distribuição. As comparações entre os animais WT e KO, antes da exposição a dieta HFD, foram realizadas pelo teste T de *Student* ou Mann Whitney quando os dados não foram paramétricos. Já as comparações pós a exposição as dietas foram realizadas por ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Turkey ou Kruskal Wallis *Test*, com comparações de Dunn, quando os dados não foram paramétricos. Foi considerado estatisticamente relevante quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

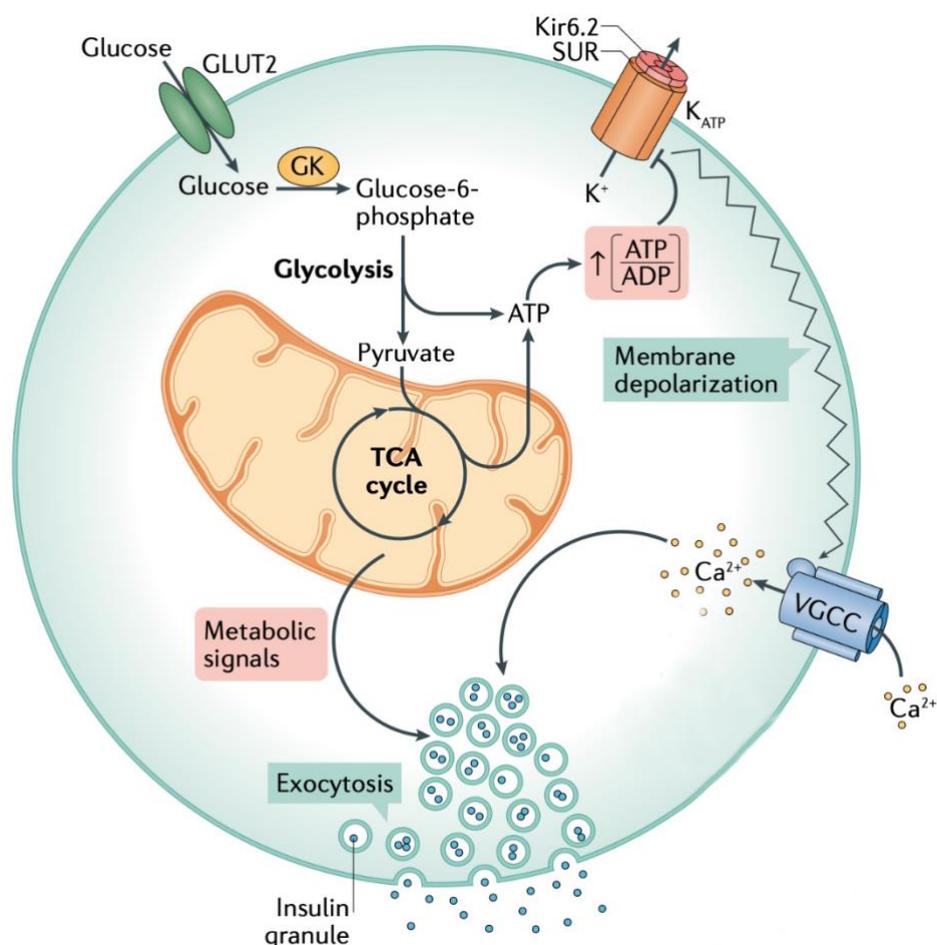
5.1 Validação dos animais *knockout*

Devido a expressão de glicoquinase (GCK), a baixa afinidade com hexoquinase (HCK), e o bidirecional transportador de glicose, *glucose transporter 2* (GLUT2), a célula beta pancreática é unicamente desenhada para sentir pequenas mudanças nas concentrações da glicose fisiológica e finalmente regular as concentrações intracelulares de ATP em resposta para o consumo de glicose e metabolismo. As células beta respondem ao aumento da glicose através das vias de sinalização que levam a secreção de insulina. (Boland, Rhodes e Grimsby, 2017)

O regulador primário da secreção de insulina nas células beta é a concentração de glicose plasmática circulante. A célula beta está fundamentalmente pronta para detectar glicose na faixa fisiologicamente relevante (Ohneda *et al.*, 1993). Uma vez que a glicose entra na célula via GLUT2, ela é fosforilada pela GCK para formar glicose-6-fosfato na etapa limitante da taxa deste processo. Uma vez formada, a glicose-6-fosfato entra na glicólise para formar piruvato, o qual é oxidado pela piruvato-desidrogenase em Acetil-CoA, que entra no Ciclo Ácido Tricarboxílico (TCA) na mitocôndria, para produzir NADH e FADH₂, que podem então ser metabolizados oxidativamente para produzir ATP (Schuit *et al.*, 1999).

O K⁺ATP, cuja funcionalidade depende da adequada expressão da subunidade K_{ir}6.2, regulada pelo gene HNF4 α , é fechado a partir do aumento da razão ATP/ADP resultante do aumento do fluxo glicolítico nas células beta. Esse evento culmina na despolarização da membrana bicamada fosfolipídica e subsequente abertura dos canais de Ca²⁺ tipo L dependentes de voltagem e rápido influxo de Ca²⁺ na célula. O aumento do Ca²⁺ citosólico intracelular é o principal mediador da exocitose da insulina (Curry *et al.*, 1968), pois arbitra os eventos necessários, incluindo o tráfego do grânulo secretor de insulina para a membrana plasmática, *priming*, *docking* e liberação regulada exocitótica via SNARE complexos (Figura 4) (Engel *et al.*, 1968).

Figura 4 - Ilustração representativa da secreção de insulina



FONTE: Adaptado de Campbell e Newgard, 2021.

Dessa forma os animais KO para HNF4 α , após a aplicação de Tamoxifeno (para a ativação da enzima CRE-recombinase) apresentam uma menor glicemia de jejum em comparação com os animais WT, devido à dependência do HNF4 α para a expressão da subunidade Kir6.2 do K⁺ATP, fundamental no processo de exocitose da insulina.

Diante dessas informações, para confirmação da ativação da enzima CRE-recombinase, 15 dias após a última aplicação do Tamoxifeno, avaliamos a glicemia de jejum dos animais. Como esperado, os animais KO apresentaram uma glicemia de jejum menor em relação aos animais WT (Fig. 5, p<0,05). Isso se dá devido a inabilidade das células beta dos animais KO em secretar insulina de maneira controlada, apresentando secreção em condições basais de glicose sanguínea.

Além da participação na secreção de insulina, o HNF4 α , também demonstra contribuir para expressão de mRNAs de genes que estão relacionados com o metabolismo da glicose e com a GSIS, 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 beta 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 *Glucose Stimulated Insulin Secretion* (GSIS) (Hansen *et al.*, 2002; Johnson, 2007).

Este trabalho não realizou o teste de GSIS, bem como mediu a insulina sérica antes da exposição à dieta, porém Barth e Ruoso, *et al.*, (2021) demonstraram em seu trabalho que os animais KO para HNF4 α apresentam maior hiperinsulinemia quando comparados com os animais WT. Também no mesmo trabalho, no teste de GSIS, quando as ilhotas dos animais geneticamente modificados foram desafiadas com alta concentração de glicose (16,7 mM), esse mesmo grupo secretou mais insulina que os animais sem deleção genética. Demonstrando então, que de fato, os animais KO para HNF4 α têm uma condição de secreção de insulina em níveis supra fisiológicos o que os deixa hiperinsulinêmicos. Diante dessas informações, e ainda correlacionando com o fato que no ipGTT (Fig. 5 B), os animais apresentam normoglicêmica e ausência de RI.

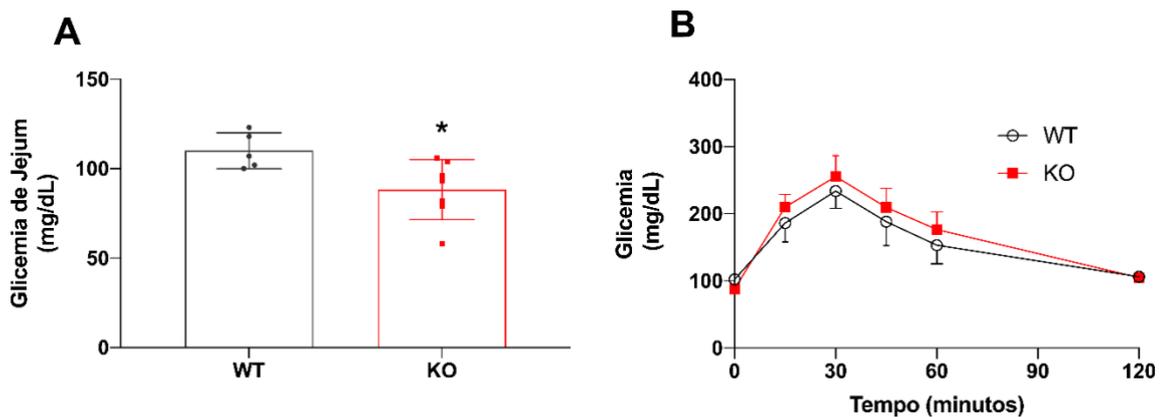


Figura 5 - Confirmação do perfil glicêmico dos animais Knockout para HNF4 α

Glicemia de jejum e ipGTT dos animais *Knockout* e *WildType*, antes da exposição à dieta hiperlipídica ou dieta controle. Análise da Glicemia após 10 horas de jejum (A) e ipGTT (B) dos animais WT: n= 5 e KO n=7, 15 dias depois da última aplicação de tamoxifeno, antes do início das dietas. Dextrose foi usada no ipGTT com dose de 1U/kg intraperitoneal. WT: Animal HNF4 $\alpha^{loxP/loxP};Ins1^{Cre-}$ e KO: HNF4 $\alpha^{loxP/loxP};Ins1^{Cre+}$. Dados mostrados com média \pm SEM. Valor de *p* apresentado como **p*<0,05 comparações usando teste *t de Student*.

5.2 Desfechos da dieta

5.2.1 Ingestão alimentar e mudança da massa corporal

Sendo assim, após a confirmação da ativação da enzima CRE-recombinase, para a caracterização do nosso modelo, iniciamos a oferta de dieta hiperlipídica (HFD) *ad libitum* aos animais.

Semanalmente os animais foram pesados e tiveram sua dieta consumida anotada por 20 semanas. Na Figura 6 A ($p < 0,05$) é possível notar, embora os grupos estejam próximos estatisticamente, que o grupo alimentado com dieta HFD consumiu menos dieta ao longo do experimento em comparação com o grupo alimentado com dieta padrão. E a diferença da ingestão observada não teve relação com a massa corpórea dos animais, uma vez que a ingestão alimentar diária foi normalizada pela massa dos animais (Fig.6 C, $p < 0,0001$). A obesidade, que pode ser observada nos animais nas Figuras 7 B-C ($p < 0,05$), se desenvolve quando a ingestão de energia excede o gasto de energia ao longo do tempo, com o excesso de energia armazenado como gordura.

Hormônios gastrointestinais estimulados por refeições gordurosas, como a Colecistocinina (CCK), contribuem para a homeostase energética, e alguns influenciam o cérebro servindo como sinais de saciedade para inibir a ingestão de alimentos. A CCK periférica é secretada pelas células I intestinais em resposta a refeições gordurosas e está envolvida na modulação intestinal, motilidade, estimulando a secreção de enzimas pancreáticas e regulando o tamanho da refeição (Lo *et al.*, 2010). A administração intraperitoneal de CCK purificada em ratos em jejum reduz o tamanho da refeição, mas não a frequência da refeição classificando a CCK como um peptídeo de saciedade (Mueller e Hsiao, 1977). Sendo assim, em concordância com a literatura, a dieta HFD induziu maior saciedade que a dieta padrão, por isso os animais comeram menos no montante total de 20 semanas.

Além disso, apesar da Figura 6 B inferir que o consumo calórico diário de ambos os grupos foi equiparável, a figura 6 D ($p < 0,001$) reflete que a dieta HFD teve eficiência energética mais pronunciada que a dieta padrão, justificando assim o fato do ganho de massa corporal e aumento de gordura perigonadal. (Fig. 7 B-C, $p < 0,05$).

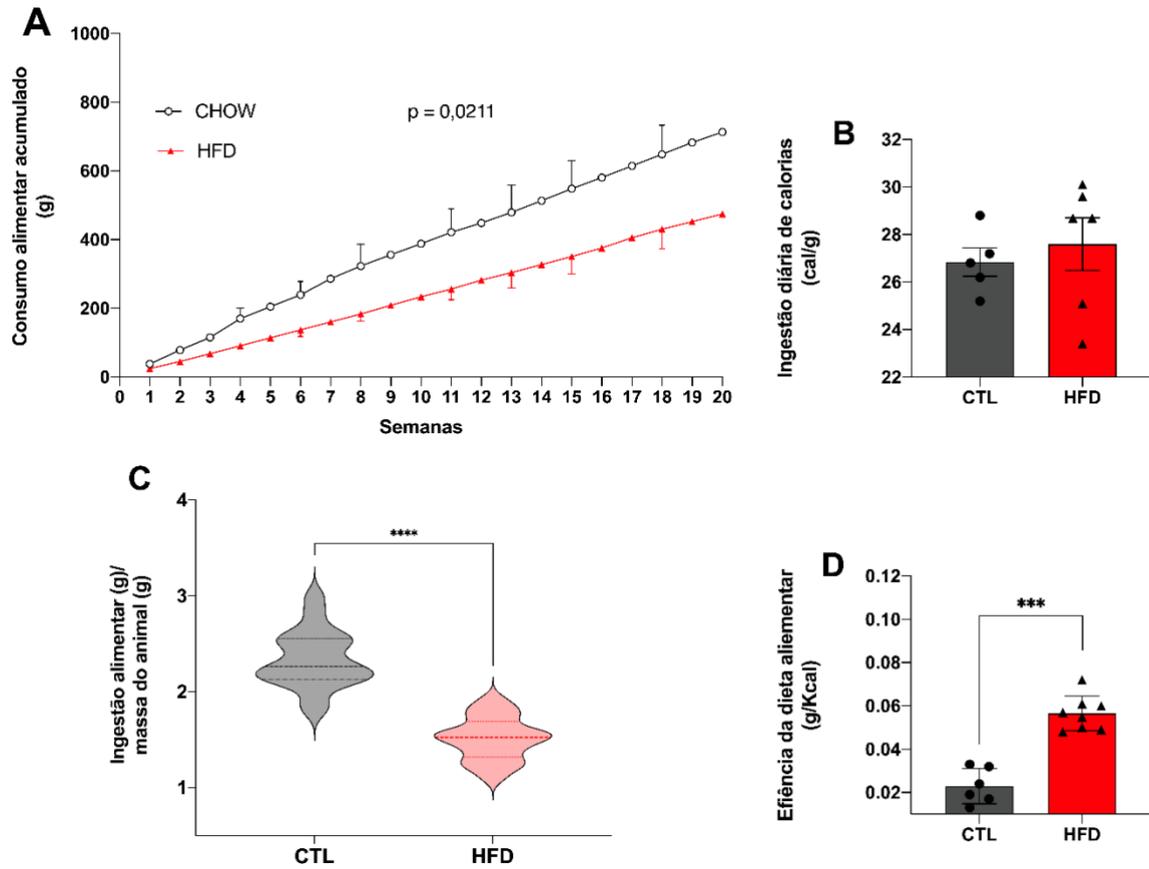


Figura 6. Diferença ingestão acumulativa das dietas, ingestão calórica, eficiência calórica e ingestão alimentar relativa à massa corporal do animal. Consumo de dieta padrão: $n = 4$ HFD: $n = 4$ (A). Eficiência da dieta padrão: 6 HFD: 8 obtida por meio da razão entre a Δ massa do animal (g) e o consumo calórico (Kcal) (B). Calorias diárias consumidas por animal dieta padrão: $n = 6$ HFD: $n = 8$ (C). Dados mostrados com média \pm SEM. Valores de p apresentados como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $p < 0,0001$, usando Teste de Mann Whitney para eficiência alimentar da dieta e consumo alimentar acumulado, teste t de *Student* para ingestão alimentar normalizada pela massa do animal.

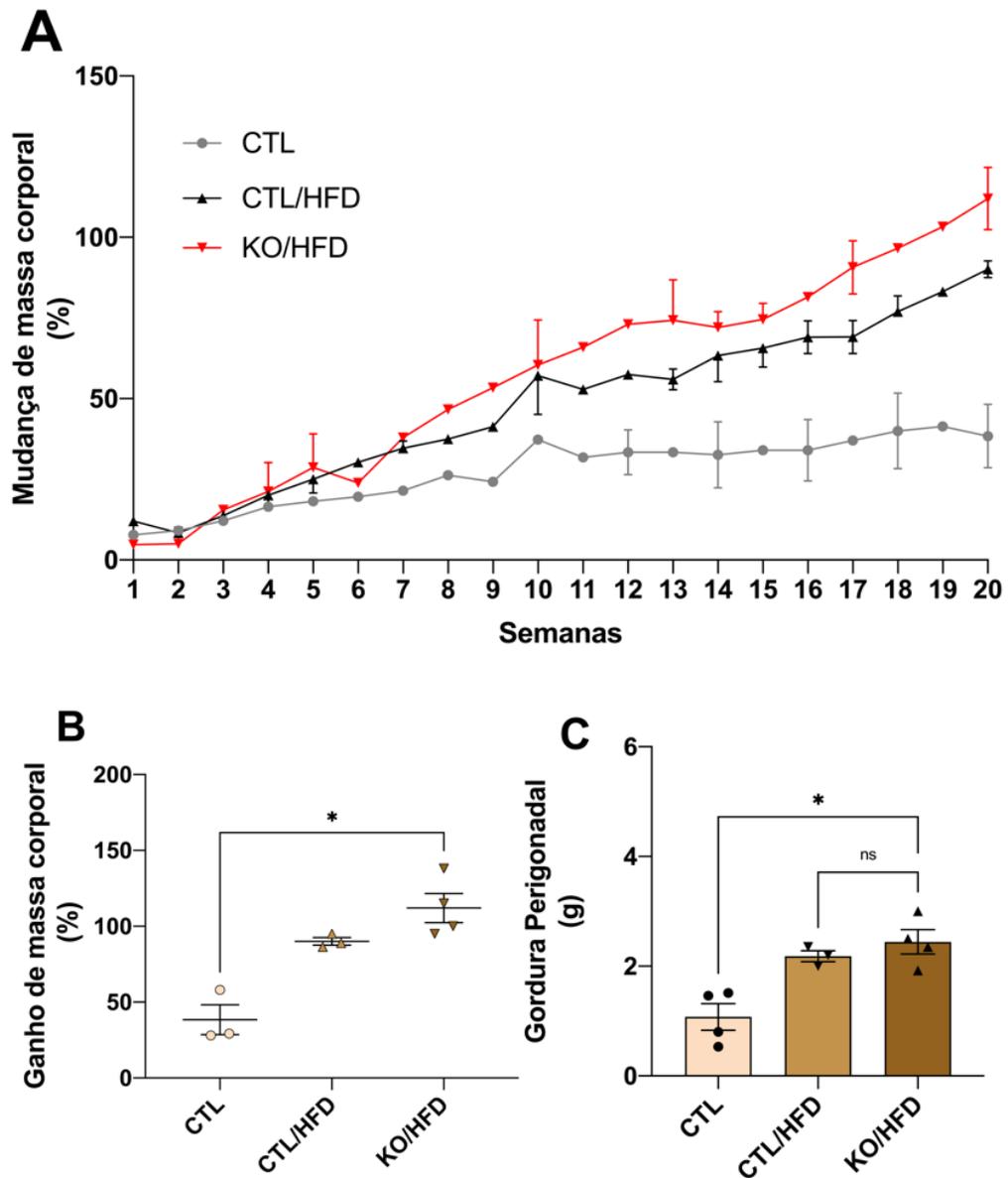


Figura 7. Ganho de massa corporal e tecido adiposo em resposta a exposição a dieta hiperlipídica em de animais knockout e WildType. Porcentagem de mudança de massa corporal CTL: n = 3; CTL/HFD: n=3; KO/HFD: n=4 (A). Acúmulo de tecido adiposo perigonadal em resposta à exposição a dieta rica em gordura ou dieta padrão: CTL: n=3; CTL/HFD n=3; KO/HFD = 4 (C). Dados mostrados com média \pm SEM. Valores de p apresentados como $*p < 0,05$, usando Teste Kruskal Wallis com comparações de Dunn.

5.2.2 Dieta Hiperlipídica e a esteatose hepática

Ainda sobre os efeitos da dieta HFD, quando observamos as lâminas de fígado dos animais WT e KO (Fig. 8 B e D), podemos notar que quando expostos a dieta gordurosa os animais apresentam esteatose ao longo do parênquima hepático. Por outro lado, os animais alimentados com dieta padrão WT e KO (Fig. 8 A e C) apresentam parênquima hepático preservado.

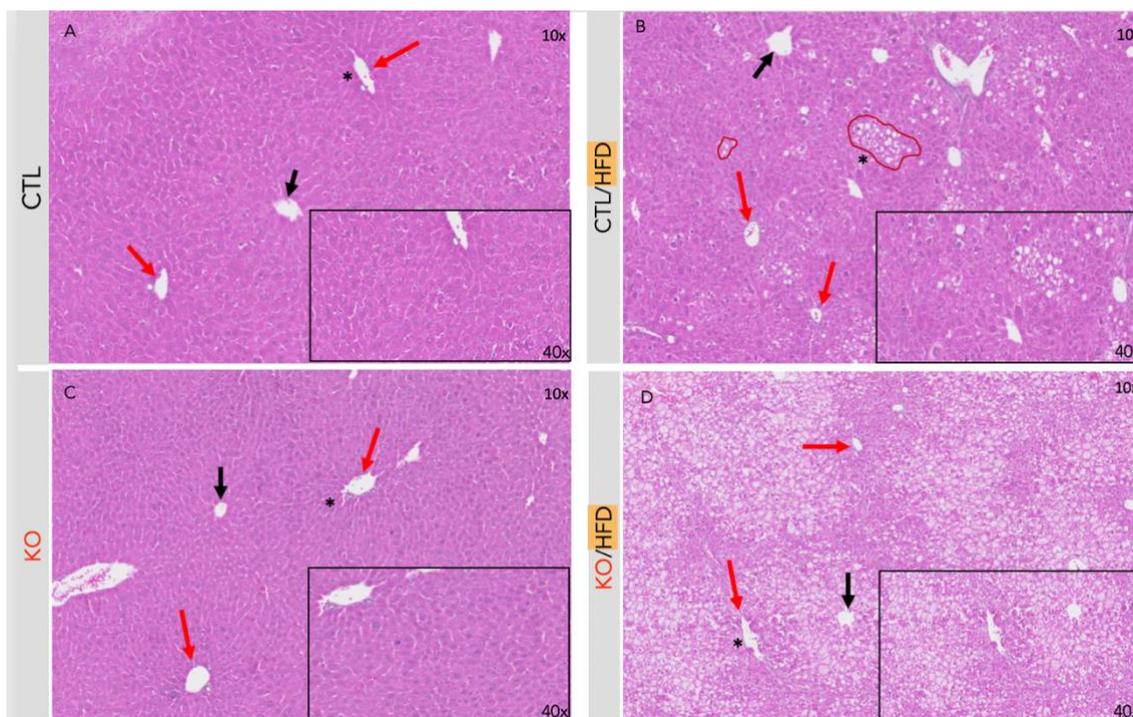


Figura 8. O efeito da dieta rica em gordura e dieta controle observado em cortes histológicos do tecido hepático de animais WildType e Knockout para HNF4 α . Coloração Hematoxilina-Eosina do tecido hepático de animais WildType (A e B) e Knockouts (C e D). Animais alimentados com dieta padrão por 20 semanas (A e C) ou HFD (B e D). As flechas vermelhas indicam os espaços portais e as pretas as veias centro lobulares, circulado em vermelho está o acúmulo de gordura (esteatose).

Ambos os animais alimentados com dieta rica em gordura possuem sinais de tal exposição: (1) animal CTL/HFD e KO/HFD, apresentaram macro e micro depósitos de gotículas de lipídeos (esteatose) (Fig. 8 B) (destacado em vermelho) e (2) animal KO/HFD, com deleção do gene HNF4 α , manifestou difusos depósitos de gordura ao longo do parênquima hepático evidenciando uma alteração na Hialina do hepatócitos, bem como hepatócitos abaulados (Fig. 8 D). Essas evidências nos direcionam a pensar que a deleção específica do FT HNF4 α na célula beta do pâncreas pode desencadear alterações sistêmicas. Acreditamos que isso pode ser em decorrência da falta de insulina circulante no animal KO.

Achados característicos tais como: alteração da Hialina de Mallory, abaulamento dos hepatócitos, presença de imuno necrose, tecido fibroso (principalmente nos espaços portais e

veias centro lobulares), além da própria esteatose ao longo do tecido hepático observadas nas secções histológicas previamente mencionadas (Fig. 8 B e D), são sugestivos de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (Powell, Wong e Rinella, 2021), que está ligada com obesidade e tem seu diagnóstico clínico que pode ser dado por meio da biopsia do tecido hepático (Ipsen, Lykkesfeldt e Tveden-Nyborg, 2018).

Na Figura 9 A, animal sem alteração genética, alimentado com dieta HFD, percebe-se uma massa de células imunológicas, compostas principalmente por Linfócitos T, na Figura 9 B, também do mesmo grupo experimental, nota-se a presença tanto de fibroblastos quanto de fibrócitos, o que indica tecido fibroso, próximo ao espaço portal. Por outro lado, na Figura 9 C, observa-se que os animais geneticamente modificados tiveram ausência das células do sistema imunológico, porém tiveram extensa esteatose ao longo do parênquima hepático bem como a fibrose no tecido demonstrou-se mais abrangente.

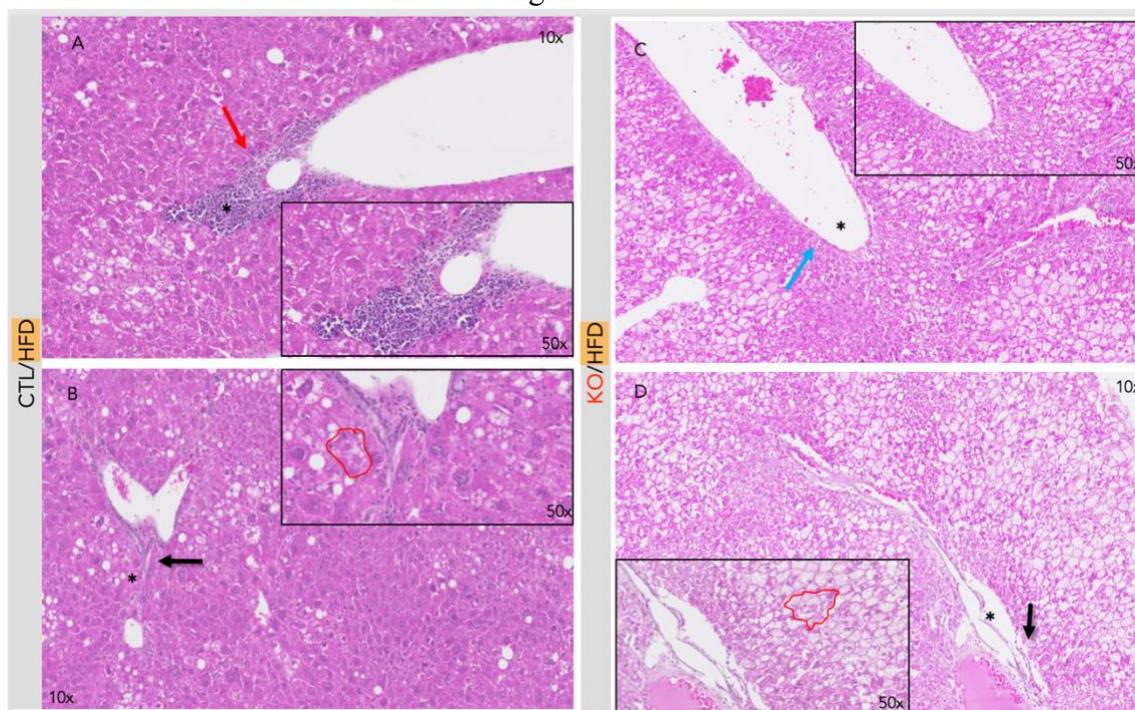


Figura 9. O efeito da dieta rica em gordura observado em cortes histológicos do tecido hepático de animais WildType e Knockout para HNF4 α . Coloração Hematoxilina-Eosina do tecido hepático de animal WildType (A-B) e Knockout (C-D). Animais alimentados com HFD por 20 semanas (A, B, C e D). Indicando imuno necrose na flecha vermelha e a ausência da mesma na flecha azul, alteração da Hialina de Mellory e abaulamento do hepatócito, circulado em vermelho e fibrose nas flechas pretas.

Sendo assim, esses dados da ingestão acumulativa e da mudança da massa corporal ao longo do tempo, do peso das gorduras perigonadais e da histologia do tecido hepático validam o nosso modelo de obesidade.

5.3 Adaptações metabólicas na obesidade

5.3.1 Perfil glicêmico e sensibilidade à insulina

Após 20 semanas de dieta avaliamos a tolerância à glicose (ipGTT) e a sensibilidade à insulina (ipITT). Estes experimentos nos permitem analisar, como os tecidos periféricos (principalmente músculo esquelético e tecido adiposo) estão respondendo à insulina e também inferir sobre o funcionamento das células beta (Bowe *et al.*, 2014). A HFD promoveu um aumento na glicemia de jejum nos animais KO/HFD (Fig. 10 C, $p < 0,01$) Ainda, a dieta induziu uma intolerância à glicose e essa intolerância parece ser maior nos animais KO (Fig. 10 A, C e D, $p < 0,01$). O que vai ao encontro dos dados demonstrados por Gupta e Kaestner, (2007) no modelo de aumento da demanda metabólica induzida por prenhez, em que impacto da deficiência de HNF4 α na resposta imediata ao desafio de glicose é pronunciado, sugerindo que a deficiência na função das células beta nos camundongos mutantes HNF4 α , prejudica ainda mais a tolerância à glicose.

Com esses dados, do ponto de vista do metabolismo glicêmico, podemos inferir que os animais KO são mais susceptíveis a ação da HFD, apresentando aumento na glicemia de jejum e profunda intolerância à glicose. No mesmo sentido e, como esperado, a exposição a dieta gordurosa reduziu a sensibilidade à insulina igualmente nos WT e KO, independente do genótipo, com diferença estatística em relação ao grupo CTL, alimentado com dieta padrão (Fig.10 B e E, $p < 0,05$).

Já é bem estabelecido no meio científico que qualquer redução na sensibilidade periférica à insulina, é reparada de forma adaptativa pelo aumento da função das células beta pancreáticas e ainda pela expansão dessa população de células. Quando não ocorre essa adaptação na estrutura do tecido pancreático, sobre tudo nas células beta, diante da demanda por insulina imposta pelo ambiente, seja por glicocorticoide, (Rafacho *et al.*, 2008), prenhez (Gupta e Kaestner, 2007) ou obesidade (Hotamisligil, 2017), pode surgir hiperglicemia em jejum e/ou pós-prandial. Sendo assim podemos inferir que nosso modelo experimental apresentou as características de aumento da demanda metabólica diante de um cenário obesogênico.

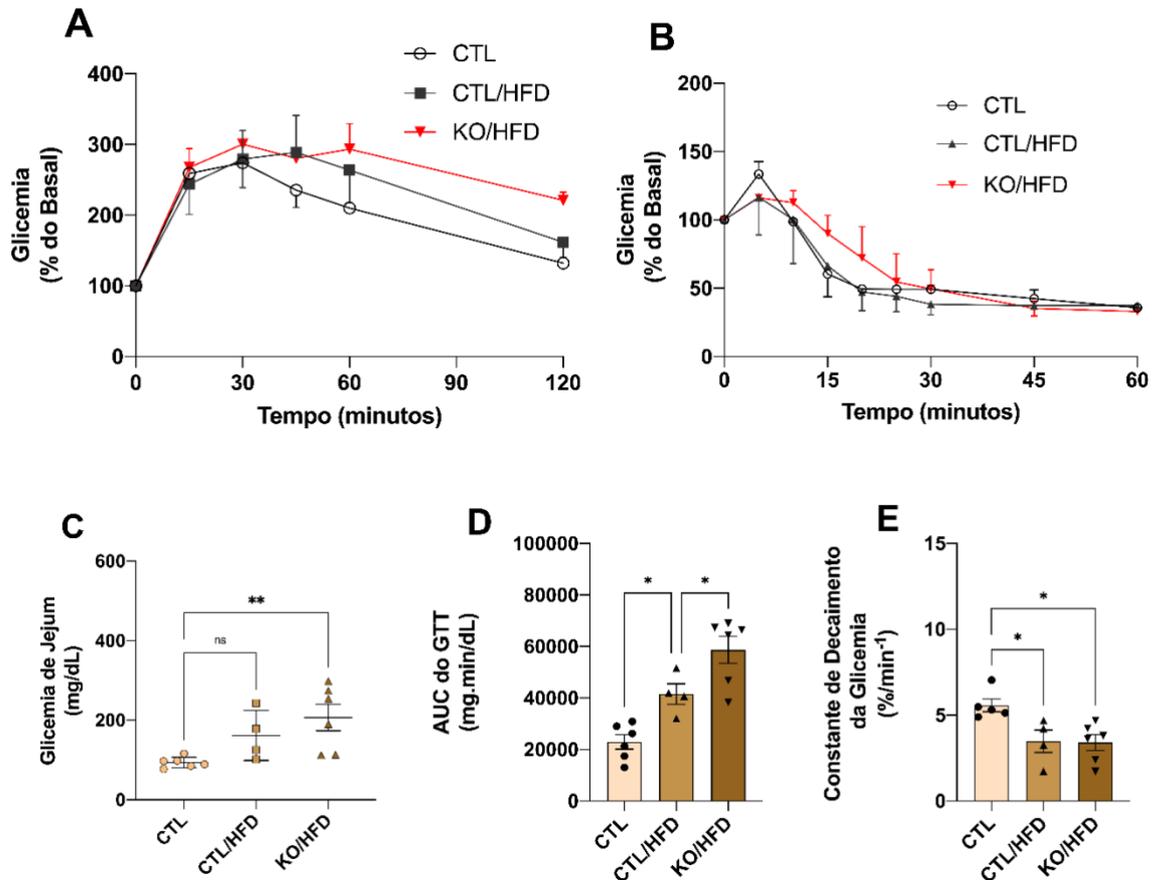


Figura 10. Perfil glicêmico de animais knockout e WildType expostos ou não à dieta rica em gordura. Análise do teste de tolerância à glicose com aplicação de 1 U / kg intraperitoneal de dextrose, ipGTT de animais CTL: n = 6; CTL/HFD n = 4 KO/HFD: n = 6, depois de 20 de exposição à dieta (A) e teste de tolerância à insulina, aplicação de 1 U/kg intraperitoneal, coleta do sangue caudal, ipITT. CTL: n = 5; CTL/HFD: n = 4; KO/HFD n = 6 (B). E a *area-under-glucose-curve* (AUC) foi derivado a partir do gráfico (C). Glicemia de jejum antes do ipGTT (D). Constante de decaimento da glicose em resposta a aplicação, kITT, gráfico derivado a partir dos dados do ITT, CTL: n = 5; CTL/HFD: n = 4; KO/HFD n = 6 (E). Dados mostrados com média \pm SEM (B, C, E). Valores de *p* apresentados como * $p < 0,05$ usando teste Kruskal Wallis com comparações de Dunn.

5.3.2 Insulinemia

Então seguimos para a quantificação das insulinemias de jejum para analisar se a função da célula beta estava prejudicada nos animais com modificação genética e desafiados com dieta gordurosa. As análises da insulinemia de jejum nos sugerem que os animais WT alimentados com dieta rica em gordura desenvolveram uma hiperinsulinemia em comparação com os animais alimentados com dieta controle (Fig. 11 A, $p < 0,01$). Fato que vai ao encontro da literatura pois, os níveis plasmáticos de adiponectina, uma citocina pro-inflamatória característica da obesidade, foram correlacionados com as concentrações dos níveis plasmáticos de insulina, e foi constatado que indivíduos obesos ($IMC \geq 30$) apresentam correlação positiva, nas concentrações de insulinemia. (Weyer, 2001).

Porém, ao observarmos a insulina plasmática dos animais KO, também alimentados com dieta rica em gordura, não observamos um aumento na mesma proporção que nos WT. Já em humanos com DM 2, doença atrelada com a obesidade devido às alterações funcionais, as células beta nesses pacientes eram aproximadamente 30% maiores do que as células beta de indivíduos normais. Além disso, proporção da área citoplasmática para a área nuclear também foi muito maior nos pacientes diabéticos tipo 2 em relação aos controles normais (Cho *et al.*, 2011). Assim, o fato de os animais KO não apresentarem, em comparação com os animais WT, hiperinsulinemia induzida pela dieta gordurosa corrobora nossa hipótese de que o HNF4 α é crucial para o aumento de massa secretora de insulina em modelos de RI. Os dados da quantificação da insulinemia vão ao encontro dos dados exibidos na Figura 9, em que os animais expostos à dieta gordurosa e com deleção do gene HNF4 α demonstraram maior intolerância à glicose do que os animais WT também expostos à mesma dieta.

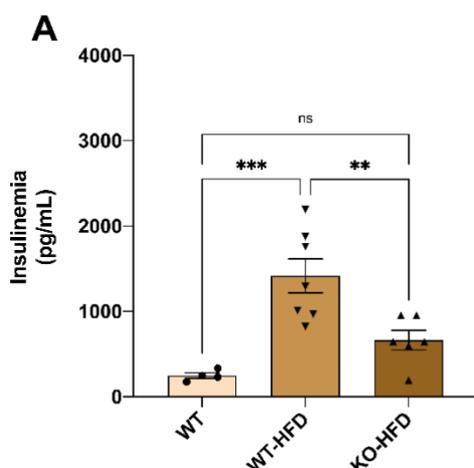


Figura 11. Insulinemia de jejum dos animais WildType e Knockout expostos ou não a dieta gordurosa. 10h de jejum, sangue troncular CTL: n = 4, CTL/HFD: n = 7, KO/HFD: n = 6 (A). média \pm SEM. Valores de p apresentados como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ usando ANOVA de 1-via com pós *hoc* de Tukey.

5.4 Adaptações estruturais no tecido pancreático

5.4.1 Análise da arquitetura morfológica do tecido endócrino pancreático

A partir dos dados metabólicos de perfil glicêmico e insulinemia nos questionamos se isso se refletiria na arquitetura no pâncreas. Então, para aprofundar as observações seguimos para as análises do tecido pancreático. Inicialmente utilizamos a técnica Imuno-histoquímica (IHQ), e começamos a ver resultados promissores, que corroboravam com a nossa hipótese tais como: (1) redução da massa de célula beta do animal mutante alimentado com HFD, em comparação com o sem mutação (Figura Suplementar 1 E). E (2) redução no tamanho das ilhotas na distribuição por tamanho ao longo do corte histológico (Figura Suplementar 1 H).

Nosso grupo de pesquisa já vem trabalhando há muito tempo com animais KO para o HNF4 α e em trabalhos anteriores já foi visto que após um insulto metabólico com dexametasona os animais mutantes são incapazes de desempenhar adaptações morfológicas para expandir a população de células beta (dados não mostrados), revelando assim que o HNF4 α desempenha um papel importante sobre a manutenção da expansão adaptativa das células secretoras de insulina.

Além disso, Gupta e Kaestner (2007), ao desafiar o metabolismo de camundongos prenhas KO para HNF4 α , submeteram as lâminas histológicas desses animais à um marcador de proliferação celular BrdU, este marca núcleos em divisão, e observaram que as prenhas tiveram menos marcação para proliferação que as prenhas não mutantes, evidenciando a importância do HNF4 α para a expansão da massa de célula beta.

Sendo assim, submetemos os nossos próximos cortes histológicos à técnica de IF (Fig. 12 A-P). Nos dados quantitativos referentes ao aumento massa de célula beta, induzida por dieta gordurosa, o grupo KO/HFD não apresentou diferença estatística com relação ao CTL (alimentado com dieta padrão), enquanto que o CTL/HFD teve diferença estatística significativa na expansão da massa produtora de insulina. Ou seja, é possível afirmar que KO/HFD teve prejuízo nessa adaptação compensatória do pâncreas em comparação com os animais do CTL/HFD (Fig. 12 Q, $p < 0,05$). Esses dados em conjunto reforçam mais uma vez a importância do HNF4 α para morfofuncionalidade pancreática.

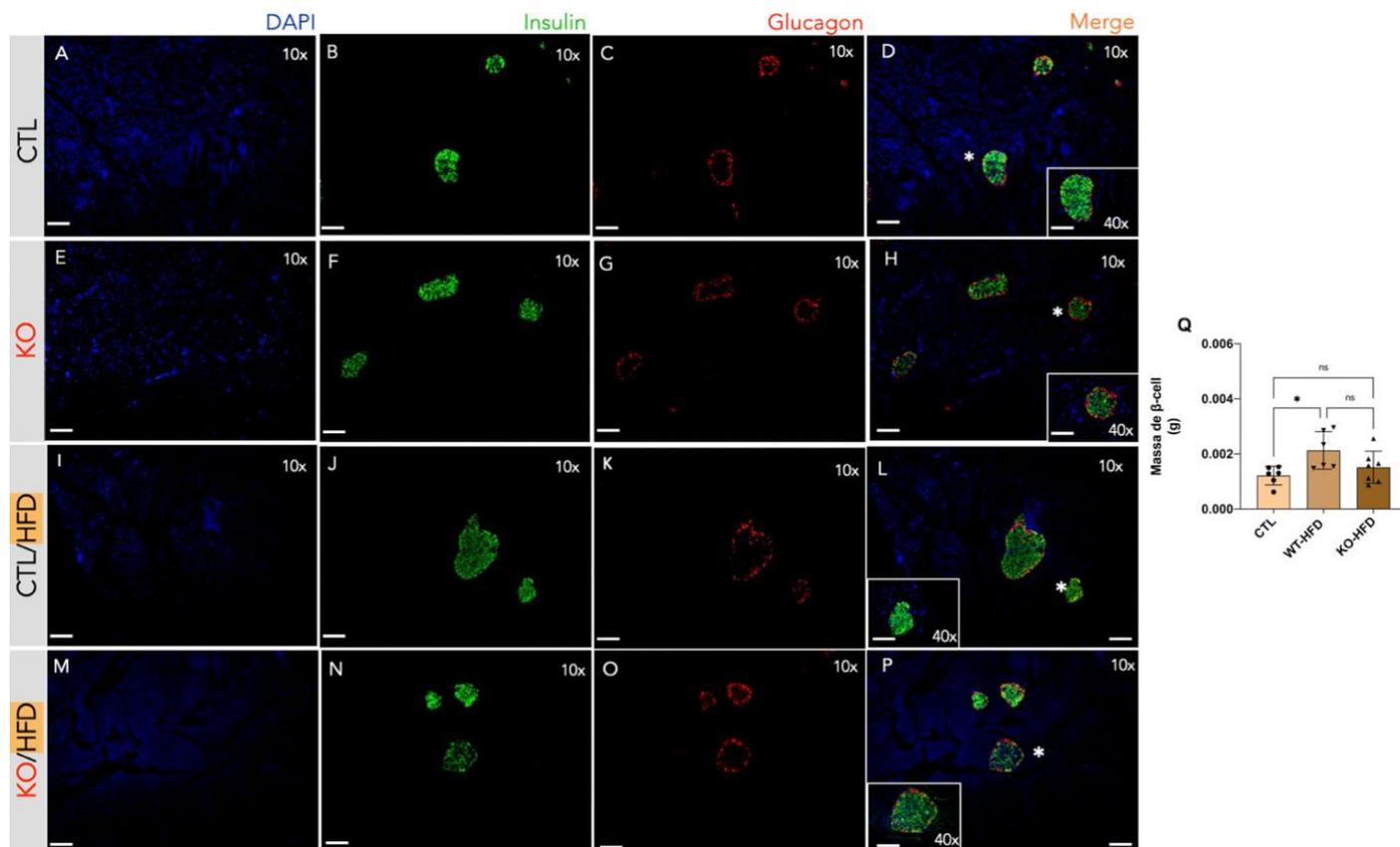


Figura 12. Imunoflorescência do pâncreas de animais *Knockout* e *WildType* alimentados ou não com dieta HFD e análise quantitativa da massa de célula beta a partir dos dados da Imunoflorescência. Barras da escala significam 100 μm em uma magnitude final de 10x e 40x, como indicado na figura (A-P) CTL: n = 3, CTL/HFD: n = 3, KO/HFD: n = 5. O cálculo da massa de célula beta foi feito em duplicata a partir de dois cortes diferentes do pâncreas do mesmo animal (Q). média \pm SEM. Valores de *p* apresentados como **p*<0,05, ANOVA de 1-via com pós *hoc* de Tukey.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Com o conjunto de dados podemos inferir que a dieta HFD induziu os animais à um perfil diabético, com diminuição da sensibilidade à insulina e intolerância à glicose, características estas que foram mais acentuadas nos animais sem expressão do gene HNF4 α , pois esses animais não secretaram insulina de modo compensatório diante do desafio com dieta. A redução de insulina plasmática nos animais KO/HFD, em comparação com CTL/HFD é explicada pela inabilidade desse grupo em expandir a massa secretora de insulina de forma adaptativa, como ocorreu no grupo CTL/HFD, que conseguiu se distanciar significativamente do grupo CTL enquanto que os KO/HFD não. Confirmando a nossa hipótese de que animais *knockout* para HNF4 α apresentam um prejuízo no aumento de massa de célula beta, induzido pela RI em animais submetidos à dieta hiperlipídica.

Contudo, não sabemos se a expansão massa de célula beta, induzida pela dieta gordurosa nos animais CTL/HFD foi devido à proliferação, diferenciação, neogênese ou hipertrofia, sendo assim, com a finalidade aprofundar as análises para a publicação da pesquisa, ainda pretendemos realizar IHQ no pâncreas para Ki67, um marcador de proliferação celular. E ainda temos a intenção de realizar as análises bioquímicas do plasma sanguíneo (Colesterol e *High-density lipoprotein*), bem como aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase para caracterização do modelo e análise da função hepática.

7. REFERÊNCIAS

ABESO **Relatórios em Saúde**. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica v.93, p.44-45, Jun 2020.

AL-KANDARI, Hessa et al. Identification of Maturity-Onset-Diabetes of the Young (MODY) mutations in a country where diabetes is endemic. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2021.

American Diabetes Association. **Standards of Medical Care in Diabetes**. Diabetes Care 2021 44 (Suppl 1): S3-11.

ANTUNA-PUENTE, B. *et al.* Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes and Metabolism**, v. 34, n. 1, p. 2–11, 2008.

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.

BARAZZONI, Rocco et al. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. **Eating and Weight disorders-studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, v. 23, n. 2, p. 149-157, 2018.

BARAZZONI, Rocco et al. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. **Eating and Weight disorders-studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, v. 23, n. 2, p. 149-157, 2018.

BODEN, G. *et al.* Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, GLUT4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, p. 1–10, 2015.

BOLAND, B. B.; RHODES, C. J.; GRIMSBY, J. S. The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 9, p. 958–973, 2017.

BOWE, J. E. et al. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. **J Endocrinol**, v. 222, n. 3, p. 13-25, Set 2014.

BROOKS, L. *et al.* Fermentable carbohydrate stimulates FFAR2-dependent colonic PYY cell expansion to increase satiety. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 1, p. 48–60, 2017.

CAMPBELL, J. E.; NEWGARD, C. B. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 142–158, 2021.

CHERA, Simona et al. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic δ -cells into insulin producers. **Nature**, v. 514, n. 7523, p. 503-507, 2014.

CHO, J. H. *et al.* B-Cell Mass in People With Type 2 Diabetes. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 2, n. 1, p. 6–17, 2011.

CRAVEN, C. J. Alpha-and beta-cell proliferation and extracellular signaling-a hypothesis. **Int J Diabetes Clin Res**, v. 2, n. 2, p. 6, 2015.

CURRY, Donald L.; BENNETT, Leslie L.; GRODSKY, Gerold M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. **Endocrinology**, v. 83, n. 3, p. 572-584, 1968.

CZECH, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature Medicine**, v. 23, n. 7, p. 804–814, 2017.

DONNER, Daniel G. et al. Impact of diet-induced obesity and testosterone deficiency on the cardiovascular system: a novel rodent model representative of males with Testosterone-Deficient Metabolic Syndrome (TDMetS). **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0138019, 2015.

ENGEL, FRANK L. et al. Evidence for stimulation of insulin secretion by growth hormone in the rat. **Endocrinology**, v. 63, n. 1, p. 99-105, 1958.

FAJANS, S. S.; BELL, G. I. MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. **Diabetes Care**, v. 34, n. 8, p. 1878-84, Ago 2011.

Federação Mundial de Obesidade (ed.). Relatório em Saúde. *In: Relatório Sobre Saúde*. [S. l.], 6 jan. 2020. Disponível em: <https://data.worldobesity.org/rankings/?age=c&sex=f>. Acesso em: 3 maio 2022.

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, Mai 2000.

Gadde, K. M., Martin, C. K., Berthoud, H. R., et al, **J Am College of cardiology**, v.71, p. 69-84, jan, 2018.

GRASA-LÓPEZ, Ameyalli et al. Undaria pinnatifida and fucoxanthin ameliorate lipogenesis and markers of both inflammation and cardiovascular dysfunction in an animal model of diet-induced obesity. **Marine drugs**, v. 14, n. 8, p. 148, 2016.

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 2018.

GUPTA, Rana K. et al. Expansion of adult β -cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4 α . **Genes & development**, v. 21, n. 7, p. 756-769, 2007.

GUPTA, Rana K.; KAESTNER, Klaus H. HNF-4 α : from MODY to late-onset type 2 diabetes. **Trends in molecular medicine**, v. 10, n. 11, p. 521-524, 2004.

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, Set 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177–185, 2017.

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, Out 2008.

IDF Clinical Guidelines Task Force. Global guideline for Type 2 diabetes. Brussels: **International Diabetes Federation**, 2020.

IHARA, Arisa et al. Functional characterization of the HNF4 α isoform (HNF4 α 8) expressed in pancreatic β -cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 329, n. 3, p. 984-990, 2005.

IPSEN, D. H.; LYKKESFELDT, J.; TVEDEN-NYBORG, P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 18, p. 3313–3327, 2018.

ISFORT, Michael et al. Metabolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy. **Heart failure reviews**, v. 19, n. 1, p. 35-48, 2014.

ISHII, Yukihiro et al. Female spontaneously diabetic Torii fatty rats develop nonalcoholic steatohepatitis-like hepatic lesions. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 21, n. 30, p. 9067, 2015.

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

KANETO, Hideaki. Pancreatic β -cell glucose toxicity in type 2 diabetes mellitus. **Current Diabetes Reviews**, v. 11, n. 1, p. 2-6, 2015.

KITAMURA, Tadahiro. The role of FOXO1 in β -cell failure and type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 10, p. 615-623, 2013.

LINDEMANN, Amelia K.; BAAN, Mieke; DAVIS, Dawn Belt. Pancreatic β -cell proliferation in obesity. **Advances in nutrition**, v. 5, n. 3, p. 278-288, 2014.

LO, C. M. *et al.* Cholecystokinin Knockout Mice Are Resistant to High-Fat Diet-Induced Obesity. **Gastroenterology**, v. 138, n. 5, p. 1997–2005, 2010.

LUTZ, Thomas A.; WOODS, Stephen C. Overview of animal models of obesity. **Current protocols in pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 5.61. 1-5.61. 18, 2012.

MA, Xingliang et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. **Molecular plant**, v. 8, n. 8, p. 1274-1284, 2015.

MUELLER, K.; HSIAO, S. Specificity of cholecystokinin satiety effect: Reduction of food but not water intake. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 6, n. 6, p. 643–646, 1977.

NAKATANI, Y. *et al.* Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 1, p. 847–851, 2005.

NOGUCHI, Shuhei et al. FANTOM5 CAGE profiles of human and mouse samples. **Scientific data**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2017.

- OHNEDA, M. *et al.* GLUT-2 function in glucose-unresponsive β cells of dexamethasone-induced diabetes in rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 4, p. 1950–1956, 1993.
- 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.
- POITOUT, Vincent *et al.* Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 289-298, 2010.
- POWELL, E. E.; WONG, V. W. S.; RINELLA, M. Non-alcoholic fatty liver disease. **The Lancet**, v. 397, n. 10290, p. 2212–2224, 2021.
- SAISHO, Yoshifumi *et al.* β -cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. **Diabetes care**, v. 36, n. 1, p. 111-117, 2013.
- 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, Mai 2013.
- SANGAN, Caroline B. *et al.* In vitro reprogramming of pancreatic alpha cells towards a beta cell phenotype following ectopic HNF4 α expression. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 399, p. 50-59, 2015.
- SCHUIT, F. *et al.* Cellular origin of hexokinase in pancreatic islets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 46, p. 32803–32809, 1999.
- SEVILLANO, J. *et al.* Role of receptor protein tyrosine phosphatases (RPTPs) in insulin signaling and secretion. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, 2021.
- SHIH, D. Q. *et al.* Loss of HNF-1 alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. **Diabetes**, v. 50, n. 11, p. 2472-2480, Nov 2001.
- SLADEK, Celia D. *et al.* The “metabolic sensor” function of rat supraoptic oxytocin and vasopressin neurons is attenuated during lactation but not in diet-induced obesity. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 310, n. 4, p. R337-R345, 2016.
- 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.
- 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, Mai 2001.
- SUN, H. S.; FENG, Z. P. Neuroprotective role of ATP-sensitive potassium channels in cerebral ischemia. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 1, p. 24–32, 2013.

VAN DER HOOFT, Justin Johan Jozias et al. Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 48, p. 13738-13743, 2016.

VON DIEMEN, Vinicius; TRINDADE, Eduardo Neubarth; TRINDADE, Manoel Roberto Maciel. Modelo experimental para induzir obesidade em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 425-429, 2006.

WANG, Xiaojun et al. Regional differences in islet distribution in the human pancreas-preferential beta-cell loss in the head region in patients with type 2 diabetes. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e67454, 2013.

WEYER, Christian et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 5, p. 1930-1935, 2001.

WOOLCOTT, O. O.; BERGMAN, R. N. Relative fat mass (RFM) as a new estimator of whole-body fat percentage — A cross-sectional study in American adult individuals. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

WORLD Obesity Day 2022. **Accelerating action to stop obesity**. [S. l.], 4 março. 2022. Disponível em: World Obesity Day 2022 – Accelerating action to stop obesity. Acesso em: 3 maio 2022.

WU, H.; BALLANTYNE, C. M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity Find the latest version : Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 43–54, 2017.

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, Mai 2017.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 01

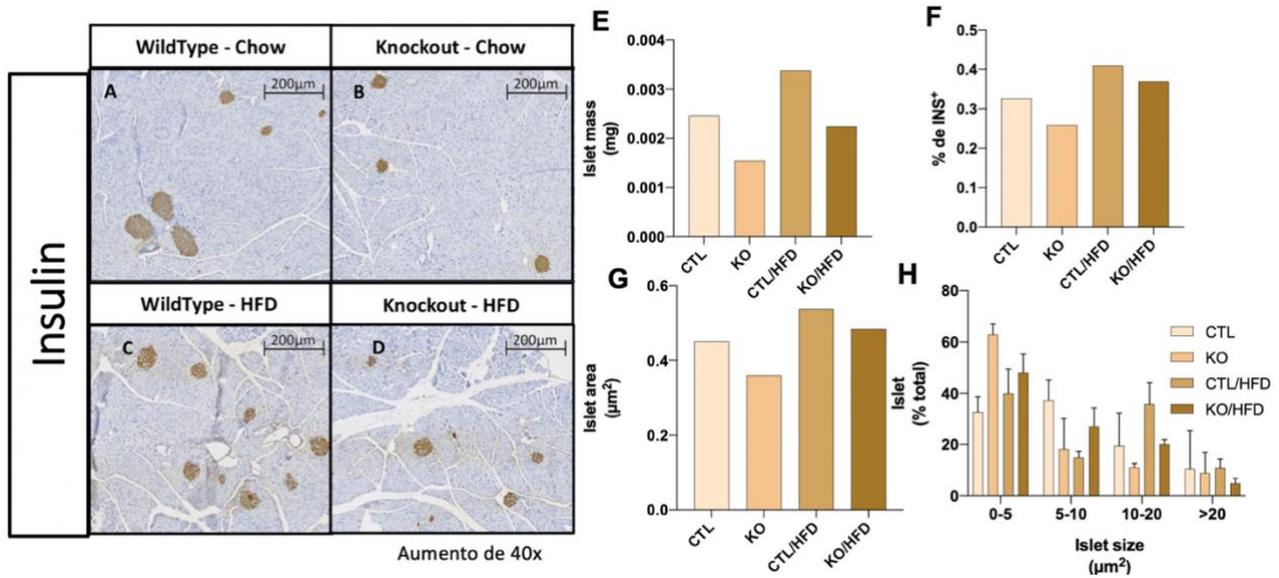


Figura Suplementar 1. Imunistoquímica do pâncreas de animais Knockout e WildType alimentados ou não com dieta HFD. Imunomarcagem para insulina de WT (A e C) e KO (B e D) animais alimentados por 20 semanas com dieta padrão (A e B) ou HFD (C e D). Massa de Ilhota pancreática (E), % positiva para insulina marcada (F), área de ilhota (G) e distribuição das ilhotas por tamanho (H) de animais CTL: n = 1, KO = 1; CTL/ HFD n=1; KO / HFD: n = 1, depois de 20 semanas de exposição à dieta.

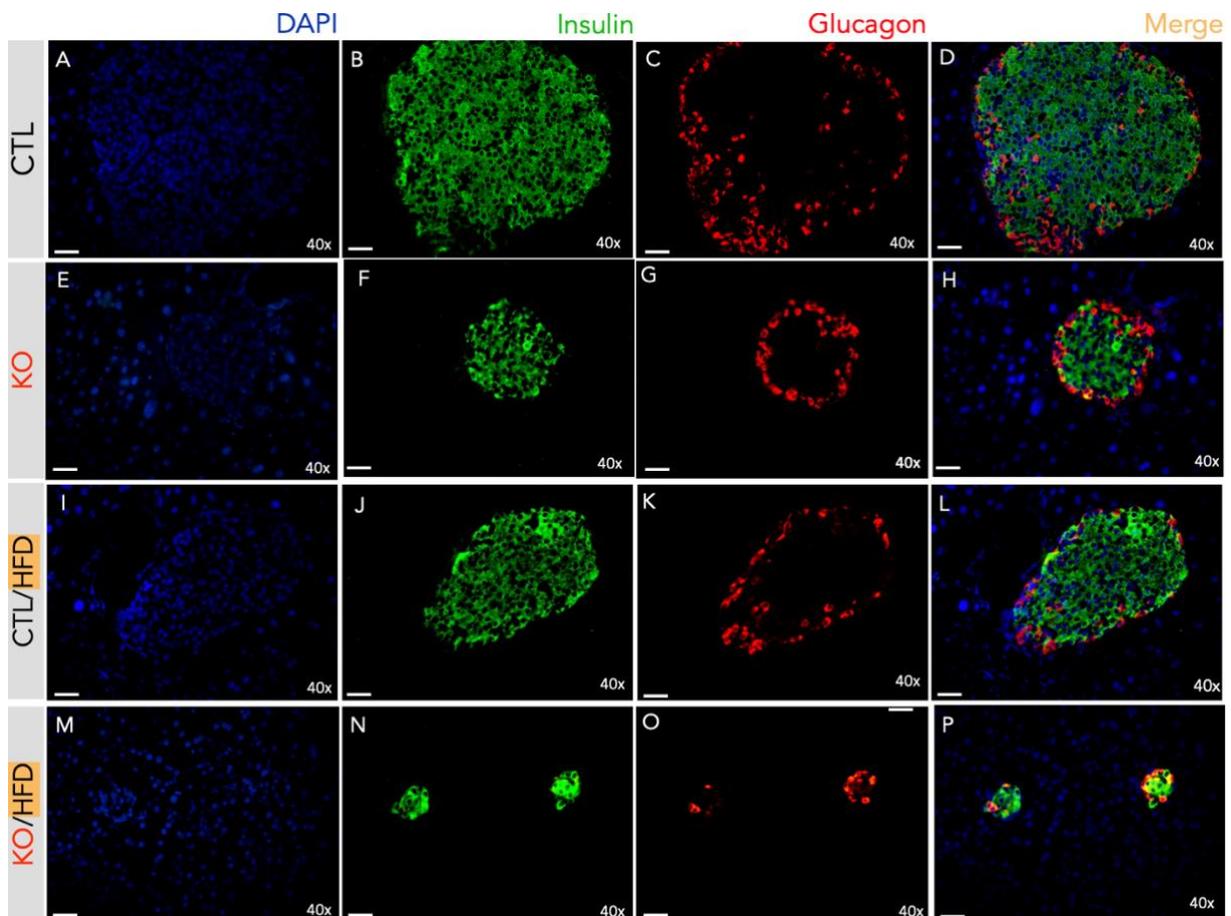


Figura Suplementar 2. Imunofluorescência do pâncreas de animais Knockout e WildType alimentados ou não com dieta HFD. Barras da escala significam 100 μm em uma magnitude final de 40x, como indicado na figura.

8.2 Anexo 02



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



Florianópolis, 18 de maio de 2022
CEUA N 7696221019

Ilmo(a), Sr(a),
Responsável: Gustavo Jorge Dos Santos
Área: Ciências Fisiológicas

Título da proposta: "O PAPEL DO HNF4? NA EXPANSÃO DA MASSA DE CE? LULA ? INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSC (ID 001623)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 31/março/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram todos cumpridos? Resp: Sim. Os resultados obtidos propiciaram a criação de novos projetos? Resp: Não. 2. O N amostral proposto inicialmente foi suficiente? Resp: Sim, o N amostral foi suficiente. 3. Houve perdas? se sim, quantas? Resp: Não houve perdas de animais. 4. Ocorreu algum evento adverso durante a condução do estudo? Resp: Não. 5. Resultados já apresentados em congresso? Resp: Sim, os resultados foram apresentados em reuniões científicas nacionais 6. Resultados já publicados? Resp: Não. Devido a um problema de saúde, a mestranda responsável pelo projeto está afastada e sua defesa prevista para Jun/2022. Ainda, o artigo oriundo dessa dissertação está sendo escrito e deverá ser submetido no segundo semestre de 2022. Destaco que toda a parte experimental já foi finalizada."

Comentário da CEUA: "Resultado CEUA - Aprovado".

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina