UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

NATHÁLIA RUDER BORÇARI

**Efeito da progesterona na expressão de genes envolvidos no estresse
oxidativo e defesa antioxidante em células beta pancreáticas: uma abordagem
in vitro para o estudo do diabetes gestacional**

São Paulo

2018

NATHÁLIA RUDER BORÇARI

Efeito da progesterona na expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante em células beta pancreáticas: uma abordagem *in vitro* para o estudo do diabetes gestacional

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão julgadora em 16/03/2018. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca da EACH/USP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Área de Concentração:
Bioquímica e Biologia Molecular

Orientadora:
Profa. Dra. Viviane Abreu Nunes Cerqueira Dantas

Coorientadora:
Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Biblioteca)
CRB-8 4936

Borçari, Nathália Ruder

Efeito da progesterona na expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante em células beta pancreáticas: uma abordagem *in vitro* para o estudo do diabetes gestacional / Nathália Ruder Borçari ; orientadora, Viviane Abreu Nunes Cerqueira Dantas ; Coorientadora Mariana da Silva Araújo. - 2018

104 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo
Versão corrigida

1. Biologia molecular. 2. Bioquímica. 3. Diabetes mellitus. 4. Gestantes. 5. Progesterona - Efeitos. 6. Antioxidantes. I. Dantas, Viviane Abreu Nunes Cerqueira, orient. II. Araújo, Mariana da Silva, coorient. III. Título

CDD 22.ed. – 572.8

Nome: BORÇARI, Nathália Ruder

Título: Efeito da progesterona na expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante em células beta pancreáticas: uma abordagem *in vitro* para o estudo do diabetes gestacional

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular

Área de Concentração:
Bioquímica e Biologia Molecular

Aprovado em: 16/03/2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. Belmiro Gonçalves Pereira
Universidade de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas

Profa. Dra. Nádia Zanon Narchi
Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades

Profa. Dra. Fernanda Marques da Cunha
Universidade Federal de São Paulo. Departamento de Bioquímica

Á minha família por todo apoio, carinho, amor e paciência. Nada disso seria possível sem vocês ao meu lado.

Agradecimentos

A Deus por ter sempre me guiado no caminho do bem, por me dar força e resiliência necessárias para encarar um novo desafio todos os dias. Por ser uma força interior a me impulsionar nos momentos mais difíceis. Sempre o sinto me abençoando.

À Profa. Dra. Viviane Abreu Nunes Cerqueira Dantas, minha professora na graduação, orientadora de iniciação científica e pós-graduação. Acreditou em mim desde o primeiro dia de aula quando, mesmo sem nos conhecermos, me convidou para ser sua aluna de iniciação e, desde então, minha vida mudou. Você me introduziu à vida acadêmica, me mostrou um caminho o qual eu desconhecia, mas que agora não me vejo fora dele. Obrigada por ter acreditado em mim desde o princípio, por me resgatar à pós-graduação e me receber de braços abertos em sua vida. Obrigada pelos momentos de imenso aprendizado e reflexões, por exaltar as minhas qualidades e me ensinar a lidar com os meus defeitos. Você é o meu maior e melhor exemplo de professora e pesquisadora, pois acredita na educação e no melhor de cada um de nós. Vi, muito obrigada por tudo e jamais esqueça que estarei sempre aqui.

À Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo, por ter aceitado o nosso convite de co-orientação. Pelos encontros que, mesmo sendo breves, foram tão enriquecedores e cheios de alegrias. Obrigada por ser um grande exemplo de mulher cientista, pela dedicação à pesquisa e o amor ao ensino. Sou muito grata por nossos destinos terem se cruzado.

Aos meus pais, Maria Cecília e Valdir, por serem meus maiores exemplos na vida, pelo apoio, amor, carinho, confiança e incentivo diários. Vocês não mediram esforços para garantir a minha educação e a de meus irmãos e serei eternamente grata a isso. Sem vocês eu não estaria onde estou e não almejaria chegar mais longe. Sintam-se orgulhosos da criação que nos deram, amo muito vocês.

Aos meus avós que, embora não estejam mais por perto, me amaram, me protegeram e cuidaram de mim. Muito obrigada por terem me incentivado sempre.

Que de onde vocês estejam continuem olhando por mim e por toda a nossa família. Vocês estão em cada passo que eu dou. Amo muito vocês, saudades eternas.

Aos meus irmãos, Anna Carolina e Leonardo, por sempre acreditarem em mim e incentivarem as minhas escolhas. Vocês são as minhas “vidinhas” e fazem parte de mais esta conquista pessoal. Obrigada por muitas vezes terem feito companhia nas minhas longas noites de estudo, jamais me esquecerei disso. Amo vocês para sempre.

Ao amor da minha vida, meu noivo Fernando, por acreditar cada segundo em mim, na minha competência e responsabilidade. Obrigada pela paciência, principalmente, naqueles momentos em que eu parecia não acreditar que daria certo e compreender meus atrasos ou ausências por conta dos experimentos. Você sempre me incentivou e serei eternamente grata por todo apoio e carinho. Te amo, meu amor, para sempre!

Ao Prof. Dr. Felipe Chambergo, por quem tenho uma admiração imensa, por acreditar e cuidar de todos os seus alunos como se fossem filhos. Seu amor e dedicação à pesquisa, sua presença diária no laboratório, não só me fascinam, mas são as melhores referências que eu poderia ter. Obrigada por zelar pelo laboratório, do nosso programa de pós-graduação e por seres quem és. Jamais me esquecerei dos momentos compartilhados, conte sempre comigo.

Aos Profs. Drs. Miguel Garay e Anna Karenina, por me ensinarem tanto na graduação e na pós-graduação, pelas palavras doces e de tanto alento. Sorte a minha por ter conhecido pessoas e profissionais tão incríveis como vocês. Obrigada por acreditarem em mim e tornarem a minha vida mais leve. Estarei aqui, sempre.

A todos os Profs. Drs. do Programa de Bioquímica e Biologia Molecular da EACH que, certamente, contribuíram muito para a minha formação. Muito obrigada por lutarem diariamente a favor do ensino e pesquisa nesta Escola, vocês não fazem ideia do quanto são importantes para todos nós.

À família Ruder e à família Borçari, que sempre vibraram pelas minhas conquistas e

sempre estenderam suas mãos. Muito obrigada por todo amor e carinho, pelas palavras de estímulo e pelo zelo. Amo todos vocês

A minha segunda família, José Manoel, Valquíria, Olinda, Adriana, Rita, Marcos, Cleiton, Guto, Gabrielli, Giovanni, Vitória e Bruna, por me acolherem tão bem e por estarem presentes em minha vida nesse momento tão especial. Muito obrigada por todo amor e paciência. Estar com vocês sempre alegra meu coração e recarrega minhas energias para começar uma nova semana. Em especial, um muito obrigada ao Marcos, também Prof. Dr. que já passou por este momento, que sempre me aconselha e no qual me espelho muito. Amo vocês.

Aos amigos que a pós-graduação me presenteou e que me acolheram com tanto amor e carinho desde o início: Jeniffer, Gabriel, Patrícia, Fábio, Carla e Izabela. E, também aqueles que chegaram há pouco tempo: Adriana, Suelen, Gustavo, Myrian, Bruna e Camila. Muito obrigada por permitirem que eu fizesse parte da vida de vocês. Jamais me esquecerei dos nossos almoços, dos cafés da tarde, dos congressos, das longas noites de companhia no laboratório, das risadas e dos choros. Obrigada pelos géis de agarose compartilhados (risos), pelas alegrias em cada resultado positivo e pelas lamentações quando algo não dava certo como esperado. Obrigada por se tornarem meus grandes amigos, levarei todos sempre em meu coração e estarei sempre ao lado de cada um de vocês.

À Suellen, Mayara e Marina, grandes amigas que ganhei em diversos momentos da minha vida e que sempre torceram por mim. Obrigada por me incentivarem e estarem ao meu lado nesta conquista.

A todos os professores, do maternal à graduação, que passaram pela minha vida e deixaram a sua marca. Muito obrigada pelos seus ensinamentos, pelo afeto, pelos puxões de orelhas necessários e por reconhecerem meus esforços; Lembrar-me-ei de todos com muito carinho.

A todos os amigos que cruzaram meu caminho e fizeram de mim uma pessoa melhor. Muito obrigada por torcerem por mim e por me incentivarem sempre.

À Escola de Artes, Ciências e Humanidades, nossa querida USP Leste, por ser a minha segunda casa, meu lar por quase sete anos da minha vida. Obrigada à Universidade de São Paulo por oportunizar esse grande sonho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa concedida ao nosso grupo (Processo FAPESP 2016/14150-2).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa a mim concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que me apoiaram e ajudaram na realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*“A educação é a arma mais poderosa que você
pode usar para mudar o mundo”*

(Nelson Mandela, 2003)

RESUMO

BORÇARI, Nathália Ruder. **Efeito da progesterona na expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante em células beta pancreáticas**: uma abordagem *in vitro* para o estudo do diabetes gestacional. 2018. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Versão corrigida

O diabetes gestacional (DG) é uma condição definida como intolerância a carboidratos e hiperglicemia, com início no segundo trimestre da gravidez. Trabalhos desenvolvidos por nosso grupo mostraram que a progesterona (PG) é capaz de causar a morte de células β pancreáticas, por um mecanismo dependente da geração de radicais livres, o que poderia contribuir para o desenvolvimento do DG. O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito da PG, na presença ou não de antioxidantes, na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e na defesa oxidante em células pancreáticas da linhagem RINm5F. As células foram incubadas com PG 0,1, 1,0 e 100 μ M por 6 ou 24 h, na presença ou não dos antioxidantes vitamina E e C. Após a incubação, foram realizados ensaios de viabilidade celular e fragmentação do DNA. A PG, não causou perda da integridade da membrana das células RINm5F, porém, ela promoveu fragmentação do DNA em, aproximadamente, 40% das células RINm5F e MCF-7 (controle positivo), enquanto que os antioxidantes vitamina E e C reduziram tal fragmentação. A partir da extração do RNA e síntese de cDNA foi investigada a expressão de 84 genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante. Dos 84 genes, cinco deles tiveram sua expressão aumentada em no mínimo, duas vezes em, pelo menos, duas concentrações diferentes, independentemente do tempo de incubação, ou nas mesmas concentrações em tempos diferentes, como os que codificam para a proteína de choque térmico α 1a (Hspa1a), glutathione peroxidase 6 (Gpx6), dual oxidase 1 (Duox1), heme oxygenase 1 (Hmox1) e esteroil-CoA desaturase 1 (Scd1). Esses genes, juntamente com a peroxirredoxina 4 (Prdx4), desempenham importante papel na fisiologia da célula β pancreática e/ou DG. A expressão desses genes também foi estudada na pré-incubação das células RINm5F com as vitaminas E e C. Tais antioxidantes, de forma geral, foram capazes de aumentar a expressão de Hmox1 e Prdx4, genes com funções antioxidantes, e de diminuir de Scd1, um gene com função pró-oxidante. Ao nível citoplasmático, verificou-se que as quantidades das proteínas Hmox1 e Prdx4 também foram moduladas pela da PG

e/ou vitamina E e C. Os resultados sugerem que esses antioxidantes apresentam importante papel na proteção da células RINm5F contra o dano oxidativo induzido pela PG. Desta forma, os resultados obtidos nesse projeto, em conjunto, devem colaborar para melhor compreensão da patogênese do DG, abrindo novas perspectivas não só para elucidação do mecanismo molecular envolvido na ação da PG sobre células pancreáticas e sua relação com o DG, mas para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento dessa doença baseadas na terapia com antioxidantes.

Palavras-chave: Diabetes gestacional, Estresse Oxidativo, Defesa Antioxidante, Progesterona, Estado Redox

ABSTRACT

BORÇARI, Nathália Ruder. **Progesterone effect on the genes expression involved on oxidative stress and antioxidant defense in pancreatic beta cells:** an *in vitro* approach to the study of gestational diabetes. 2018. 104f. Dissertation (Master in Science) – Postgraduate Program in Biochemistry and Molecular Biology, School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2018. Corrected version

Gestational diabetes (GD) is a condition defined as carbohydrate intolerance and hyperglycemia, beginning in the second trimester of pregnancy. Studies developed by our group have shown that progesterone (PG) is able to cause pancreatic β cells death, by a mechanism dependent on the generation of free radicals, which could contribute to the development of GD. The aim of this work was to study the effect of PG, in the presence or absence of antioxidants, on the expression of genes related to oxidative stress and oxidant defense in pancreatic cells of the RINm5F lineage. Cells were incubated with 0.1, 1.0 and 100 μ M PG for 6 or 24 h, in the presence or absence of vitamin E and C antioxidants. PG did not cause loss of membrane integrity of RINm5F cells, however, it promoted DNA fragmentation in approximately 40% of the RINm5F and MCF-7 cells (positive control), whereas vitamin E and C antioxidants reduced such fragmentation. From the RNA extraction and cDNA synthesis was investigated the expression of 84 genes involved in oxidative stress and antioxidant defense. Among of 84 investigated genes, five of them had their expression increased, in the minimum 2-fold in, at least, two different concentrations independent of incubation time (6 or 24 h), or at the same concentrations at different times, such as those that encoding for heat shock protein α 1a (Hspa1a), glutathione peroxidase 6 (Gpx6), dual oxidase 1 (Duox1), heme oxygenase 1 (Hmox1) and stearoyl-CoA denaturase 1 (Scd1). These genes, together with the peroxiredoxin 4 (Prdx4), play an important role in pancreatic β cell physiology and/or DG. The gene expression was also studied in the preincubation of RINm5F cells with vitamin E and C. These antioxidants were generally able to increase the Hmox1 and Prdx4 expression, genes with antioxidant functions, and decrease the Scd1 expression, a gene with pro-oxidant function. At the cytoplasmic level, it was found that the amounts of Hmox1 and Prdx4 proteins were also modulated by PG and / or vitamin E and C. The results suggest that these antioxidants play an important role in the RINm5F protection cells against the oxidative damage induced by PG. Thus, the

results obtained in this project, together, should contribute to a better understanding of the pathogenesis of DG, opening new perspectives not only to elucidate the molecular mechanism involved in the action of PG on pancreatic cells and its relationship with DG, but for the development of strategies for the prevention and treatment of this disease based on antioxidant therapy.

Key-words: Gestational Diabetes, Oxidative Stress, Antioxidant Defense, Progesterone, Redox State.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagnóstico de DG em situação de viabilidade financeira e disponibilidade técnica total.....	23
Figura 2.	Diagnóstico de DG em situação de viabilidade financeira e/ou disponibilidade técnica parcial.....	24
Figura 3.	Viabilidade celular após o tratamento com PG em células RINm5F.....	39
Figura 4.	Fragmentação do DNA após o tratamento com PG em células RINm5F	40
Figura 5.	Viabilidade celular após o tratamento com PG em células RINm5F, na presença de antioxidantes.....	41
Figura 6.	Fragmentação do DNA após o tratamento com PG em células RINm5F, na presença de antioxidantes.....	42
Figura 7.	Esquema de seleção dos genes envolvidos em vias de estresse oxidativo ou defesa antioxidante.....	47
Figura 8.	Expressão dos genes regulados pela PG em células RINm5F...	50
Figura 9.	Expressão do gene Hmox1 em células RINm5F tratadas com PG, na presença de antioxidantes.....	52
Figura 10.	Expressão do gene Prdx4 em células RINm5F tratadas com PG, na presença de antioxidantes.....	54
Figura 11.	Expressão do gene Scd1 em células RINm5F tratadas com PG, na presença de antioxidantes.....	56
Figura 12.	Curva-padrão para quantificação de proteínas Hmox1 em células RINm5F.....	57
Figura 13.	Determinação da quantidade de Hmox1 em células RINm5F após incubação com PG, na presença ou não de antioxidantes.	59
Figura 14.	Curva-padrão para quantificação de proteínas Prdx4 em células RINm5F.....	60
Figura 15.	Determinação da quantidade de Prdx4 em células RINm5F após incubação com PG, na presença ou não de antioxidantes.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Diagnóstico de DG por TOTG após sobrecarga de 75 g de glicose.....	22
Tabela 2.	Genes investigados envolvidos no estresse oxidativo e na defesa antioxidante.....	31
Tabela 3.	Sequência dos primers dos genes estudados.....	36
Tabela 4.	Expressão gênica, avaliada por PCR Array, após incubação em células RINm5F com PG, em diferentes concentrações, por 6 e 24 h.	43
Tabela 5.	Seleção final dos genes cuja expressão foi regulada após tratamento com PG, em diferentes concentrações, por 6 e 24 h.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Associação Americana de Diabetes (do inglês de, American Diabetes Association)
AMPc	adenosina monofostado cíclico
AV-HRP	peroxidase de rábano conjugado com avidina D (do inglês, horseradish peroxidase Avidin D)
BSA	albumina de soro bovino
CAT	catalase
CO	monóxido de carbono
Cu/Zn SOD	cobre e zinco superóxido dismutase
DG	diabetes gestacional
DM	diabetes <i>mellitus</i>
DM1	diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1
DM2	diabetes <i>mellitus</i> do tipo 2
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ERO	espécies reativas de oxigênio
FEBRASGO	Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia
GC	gene controle
GI	gene de interesse
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HAPO	Hiperglicemia e Desfechos Adversos na Gestação (do inglês de, Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome)
HPRT	hipoxantina guanina fosforribosil transferase

HRP	peroxidase de raiz forte (do inglês de, horseradish peroxidase)
HSP	proteínas de choque térmico (do inglês de, heat shock protein)
HuH-7	linhagem celular de hepatocarcinoma
IADPSG	Associação Internacional dos Grupos de Estudo de Diabetes e Gestação (do inglês de, International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups)
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
LDL	lipoproteína de baixa intensidade
Log	logaritmo
MDA	malondialdeído
MnSOD	manganês superóxido dismutase
MS	Ministério da Saúde
NADPH	Dinucleotídeo adenina-nicotinamida fosfato reduzido
NIH	Instituto Nacional de Saúde (do inglês National Institute of Healthy)
NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH oxidase
O ₂ ^{•-}	superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
pB	Pares de bases
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
PG	progesterona
pg	picograma
PI	iodeto de propídeo

PR	receptor de progesterona
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TOTG	teste oral de tolerância à glicose
Vit E	vitamina E
Vit C	vitamina C

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	<i>Investigação in vitro</i>.....	32
3.1.1	<i>Cultivo Celular.....</i>	32
3.1.2	<i>Tratamento das células.....</i>	33
3.1.3	<i>Efeito da PG na viabilidade das células RINm5F.....</i>	33
3.1.4	<i>Efeito da PG na fragmentação do DNA das células RINm5F.....</i>	34
3.1.5	<i>Extração de RNA, obtenção do cDNA e PCR quantitativo.....</i>	34
3.1.6	<i>Desenho e síntese dos primers.....</i>	35
3.1.7	<i>PCR quantitativo.....</i>	36
3.1.8	<i>Imunodeteção das proteínas de interesse por ELISA.....</i>	36
3.1.8.1	<u><i>Determinação da concentração de proteínas nas amostras.....</i></u>	36
3.1.8.2	<u><i>Hmox1.....</i></u>	37
3.1.8.3	<u><i>Prdx4.....</i></u>	38
4	RESULTADOS.....	38
4.1	<i>Efeito da PG na viabilidade e morte de células RINm5F.....</i>	38
4.2	<i>Efeito da PG, na presença de antioxidantes, na viabilidade e morte das células RINm5F.....</i>	40
4.3	<i>Efeito da PG na expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante.....</i>	42
4.3.1	<i>Seleção de genes modulados pela PG</i>	42
4.3.2	<i>Avaliação da expressão dos genes Hspa1a, Duox1, Gpx6, Hmox1, Prdx4 e Scd1 por PCR quantitativo.....</i>	47
4.3.2.1	<u><i>Expressão dos genes Hspa1a, Duox1, Gpx6, Hmox1, Prdx4 e</i></u>	

	<u>Scd1.....</u>	48
4.3.2.2	<u>Expressão dos genes Hmox1, Prdx4 e Scd1 na presença de antioxidantes.....</u>	51
4.3.3	<i>Imunodeteção das proteínas Hmox1 e Prdx4 por ELISA</i>	57
4.3.3.1	<u>Hmox1.....</u>	57
4.3.3.2	<u>Prdx4.....</u>	60
5	DISCUSSÃO.....	62
6	CONCLUSÃO.....	71
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	72
8	PERSPECTIVAS.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO A. SIGLA DOS GENES ESTUDADOS.....	84
	ANEXO B. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM INTERNATIONAL JOURNAL.	87

1. INTRODUÇÃO

Durante a gravidez ocorrem diversos ajustes no organismo materno, os quais asseguram sua manutenção. Um dos aspectos profundamente afetados é o metabolismo dos carboidratos, incluindo o aumento da resistência periférica à insulina e da síntese e secreção desse hormônio estimulada por glicose, diminuição do limiar de estimulação pela glicose, aumento da proliferação de células β e do volume das ilhotas pancreáticas, além do aumento da oxidação da glicose e do metabolismo do AMPc (1–3).

Embora a hiperglicemia desempenhe importante função na nutrição e desenvolvimento do feto, fornecendo quantidades adequadas de glicose (4), as variações da glicemia, observadas nesse período são, relativamente, pequenas. Tal fato aponta para uma enorme plasticidade da massa de células β pancreáticas (5), aspecto fundamental na regulação normal da glicemia durante a gravidez. Porém, a incapacidade das ilhotas maternas responderem à demanda aumentada de insulina pode levar ao desenvolvimento do diabetes gestacional (DG).

O DG é uma condição caracterizada pela intolerância aos carboidratos, resultando em hiperglicemia de gravidade variável, com início a partir da vigésima semana de gestação, associado tanto a resistência à insulina quanto à diminuição da função das células β -pancreáticas (6), podendo ou não persistir após o parto (7–10).

Além disso, gestantes com idade materna avançada, aumento do tecido adiposo, tabagistas e com estilo de vida sedentário (11), bem como portadoras de hipertensão relacionada à gravidez, histórico familiar com DM2 (parentes de primeiro grau) ou de DG em gestações anteriores (12) apresentam risco aumentado para o desenvolvimento dessa condição.

É a doença metabólica mais comum na gestação e tem prevalência entre 3 e 25% das gestações, dependendo dos grupos de risco (13), do grupo étnico, da população e do critério de diagnóstico utilizado (14). No Brasil, estima-se que a prevalência de DG no Sistema Único de Saúde (SUS) seja de, aproximadamente, 18% (15). Segundo o Ministério da Saúde (16), cerca de 40% das mulheres que apresentam diagnóstico de DG tornar-se-ão diabéticas em até 10 anos após o parto, enquanto algumas permanecem diabéticas após a gestação vigente.

Atualmente, diversos métodos são empregados para o diagnóstico do DG (**Tabela 1**), contudo, a Associação Internacional dos Grupos de Estudo de Diabetes e Gestação (do inglês de, *International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups* - IADPSG) estabeleceu, em 2010, que os critérios de diagnóstico do DG deveriam se fundamentar nos resultados do estudo Hiperglicemia e Desfechos Adversos na Gestação (do inglês de, *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes* - HAPO), uma pesquisa observacional que teve como objetivos obter referências que relacionassem a hiperglicemia materna a eventos perinatais adversos. Desse modo, novos valores de referência para glicemia de jejum e após 1 e 2 h do teste oral de tolerância à glicose (TOTG), com sobrecarga de 75 g de glicose, foram propostos. Esse estudo determinou que a glicemia de jejum maior do que 92 mg/dl, e/ou maior do que 180 mg/dl 1 h após a sobrecarga de glicose, e/ou maior do que 153 mg/dl 2 h após sobrecarga de glicose, levam ao diagnóstico de DG, sendo necessária alteração em apenas um dos pontos (14).

Estado metabólico no TOTG	IADPSG, 2010		
	ADA, 2011	NIH, 2012*	OMS, 2013**
	SBD, 2011**		
Jejum	92 mg/dl	95 mg/dl	92 a 125 mg/dl
1 h	180 mg/dl	180 mg/dl	180 mg/dl
2 h	153 mg/dl	155 mg/dl	153 a 199 mg/dl

Tabela 1. Diagnóstico de DG por TOTG após sobrecarga de 75 g de glicose. *Dois valores alterados confirmam o diagnóstico. ** Um valor alterado confirma o diagnóstico. IADPSG: International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups; ADA: American Diabetes Association; SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes; NIH: National Institute of Health (EUA); MS: Ministério da Saúde (Brasil). OMS: Organização Mundial da Saúde. (Metzer *et al.*, 2010; ADA, 2011; WHO, 2013; NIH, 2013). *Adaptado de Sociedade Brasileira de Diabetes (2016).*

Nota-se que, as diferenças entre os diversos métodos de rastreio justificam a variedade da prevalência do DG, sendo de extrema importância um consenso nacional para o seu diagnóstico adequado. Desta maneira, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), juntamente com o Ministério da Saúde, a Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) e a Sociedade Brasileira de Diabetes, tendo em vista as particularidades do Brasil, preveem a proposição de duas estratégias de diagnóstico do DG para nossa população, a dependente da viabilidade financeira e disponibilidade técnica total (Figura 1) ou parcial (Figura 2) de cada região, compreendendo a maior cobertura possível e, conseqüentemente, diminuindo a iniquidade no acesso (15).

Figura 1. Diagnóstico de DG em situação de viabilidade financeira e disponibilidade técnica total. Adaptado de OPAS, 2017.

Figura 2. Diagnóstico de DG em situação de viabilidade financeira e/ou disponibilidade técnica parcial. Adaptado de OPAS, 2017.

O relatório da OPAS (15) serve de referência normativa com o intuito de nortear as equipes de saúde na perspectiva de universalizar o método de rastreio do DG, o que permite adotar um tratamento mais adequado e personalizado, e assim, reduzir as inúmeras complicações nos desfechos materno-fetais.

O tratamento inicial para o DG diz respeito à orientação alimentar e atividade física, respeitando-se as contraindicações obstétricas. Recomenda-se o monitoramento da glicemia capilar pré e pós-prandiais, de quatro a sete vezes por dia e, se após duas semanas de dieta, os níveis glicêmicos permanecerem elevados, deve-se iniciar tratamento farmacológico. Medicamentos como metformina e insulina são, comumente, indicados durante a gestação (15).

O DG, se não tratado corretamente, pode causar complicações tanto fetais quanto neonatais, como defeitos no tubo neural, anomalias dos grandes vasos, hipoglicemia neonatal, hiperinsulinemia fetal, macrosomia, síndrome do desconforto

respiratório, hipocalcemia, hiperbilirrubinemia, policetemia e hipomagnesemia. Tais complicações atingem cerca de 30% dos recém-nascidos de mães portadoras de DG (17–20), as quais também têm risco aumentado de sofrer rotura prematura de membranas, parto pré-termo e pré-eclâmpsia (10). Todavia, o DG não está somente associado à morbidade materna e perinatal aumentada, mas também a consequências a longo prazo que incluem o desenvolvimento de DM2, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica, tratando-se, assim, de um problema de saúde pública (11).

Embora os fatores de risco e complicações sejam bem conhecidos, ainda muito se discute sobre o gatilho responsável para o surgimento do DG. Algumas evidências sugerem que a resistência à insulina e a inflamação, bem como a obesidade, possam desempenhar função importante no desenvolvimento dessa condição (4).

O DG e a obesidade apresentam um cenário comum de inflamação crônica subclínica, caracterizado pela produção anormal de citocinas e ativação de vias de sinalização da inflamação (21). Vrachnis *et al.* (4) mostraram que gestantes com DG apresentaram aumento dos níveis de mediadores inflamatórios, durante e após a gestação. Além disso, também foi observada relação entre o aumento da gordura corporal com inflamação, necrose dos adipócitos, hipóxia e liberação de quimiocinas. Vale ressaltar que as citocinas desempenham papel relevante no aumento da resistência à insulina e no estímulo à resposta inflamatória aguda, sendo a inflamação considerada fator determinante para o desenvolvimento do DG (21).

Além disso, em relação à etiologia do DG, sugere-se um possível defeito na função das células β pancreáticas, decorrentes da destruição autoimune destas células por anticorpos anti-ilhotas, evento que está presente em 10% das gestantes com DG (22).

Outra condição ultimamente associada à patogênese do DG, relaciona-se a defeitos na via de sinalização da insulina na placenta de mulheres com gestações complicadas pelo diabetes e obesidade (23).

Aspectos imunogenéticos da gestação também vêm sendo alvo de estudos para melhor compreensão do surgimento e desenvolvimento do DG. Sabe-se que

mecanismos específicos devem atuar para modular o sistema imune materno, impossibilitando a rejeição do feto. Alterações nestes mecanismos têm sido relacionadas a complicações durante a gestação e ao o desenvolvimento dessa condição (24).

Embora os mecanismos patofisiológicos que levam ao DG não sejam completamente conhecidos, a função alterada de determinados genes, imprescindíveis no controle da ação da insulina, parecem influenciar o desenvolvimento da doença (25). Nesse cenário, Buchanan e Xiang, juntamente com Lauenborg *et al.* (26)(27) relataram a existência de algumas mutações gênicas, mono ou poligênicas, presentes em gestantes com DG. Um estudo mundial em termos da expressão gênica, a partir de amostras de placentas, demonstrou a indução de genes envolvidos na resposta imune em mulheres com DG (28). Portanto, esse conjunto de evidências sugere que o DG possa apresentar fatores genéticos associados ao DM1.

A diminuição da resistência à insulina, drasticamente, após o parto, por outro lado, aponta para o envolvimento dos hormônios placentários no desenvolvimento do DG (26). Neste contexto, é relevante considerar outra importante modificação fisiológica que ocorre durante a gestação que compreende o aumento expressivo da concentração dos hormônios esteroides: estrógenos e progestágenos.

Existem três estrógenos principais presentes em quantidades significativas no plasma da gestante, representados pela estrona, estradiol e estriol (29). A concentração plasmática de estriol, o principal esteroide estrogênico produzido na gravidez (30), varia, na décima segunda semana de gestação, de 10 a 50 ng/ml, podendo atingir valores próximos de 400 ng/ml a partir da vigésima oitava semana (31). Enquanto o estriol aumenta cerca de 1000 vezes em relação aos níveis pré-gravídicos, o estradiol e a estrona aumentam cerca de 100 vezes.

Os hormônios esteroides, durante a gestação, impedem que novos folículos comecem a se desenvolver, além de contribuir para o desenvolvimento dos ductos de secreção de leite nas mamas (32). Além disso, o aumento dos níveis de estrógeno coopera para o relaxamento muscular, suavizando as cartilagens e permitindo a passagem do feto durante o trabalho de parto e parto (33).

A progesterona (PG), único progestágeno natural (34), na oitava semana de gestação, eleva-se de um valor mínimo de 5 para cerca de 40 ng/ml e, em seguida, aumenta, gradativamente, até alcançar 200 ng/ml (31). Este hormônio está envolvido nas adaptações maternas em uma gravidez saudável, sendo responsável, por exemplo, pelo aumento da resistência periférica à insulina (35), o que, provavelmente, é essencial para que o embrião tenha supridas suas necessidades metabólicas crescentes.

Este hormônio também contribui para a viabilidade e o desenvolvimento do feto, uma vez que desempenha importante função na supressão da resposta imunológica materna aos antígenos do feto, prevenindo a rejeição materna do trofoblasto, bem como contribui para o preparo e preservação do endométrio para a implantação bem-sucedida (36).

Recentemente, estrógenos e progestágenos também têm sido implicados no desenvolvimento do DG (35,37). Picard *et al.* (38) sugeriram que as particularidades hormonais da gestação e, mais especificamente, a PG, cujas elevadas concentrações no segundo trimestre da gestação coincidem com o surgimento do DG (39), poderiam contribuir para a adaptação insuficiente na secreção de insulina, frente à demanda aumentada da gestação.

Corroborando a tese de que a PG estaria envolvida na fisiopatologia do DG, Rebarber *et al.* (40) estudaram a incidência dessa doença entre gestantes que receberam doses semanais de 250 mg de PG por via intramuscular, como medida profilática para a prevenção de partos prematuros. Os resultados mostraram que a incidência de DG foi superior no grupo de mulheres que recebeu PG (12,9%) em relação ao grupo controle (4,9%), indicando que o tratamento com esse hormônio estaria associado a um maior risco de desenvolvimento de DG. Estudo similar envolvendo 526 mulheres hispânicas, sem histórico prévio de DG, mostrou que a contracepção baseada em progestágenos injetáveis, por longos períodos, está associada ao aumento do risco de desenvolvimento do DG (41).

Embora o efeito diabetogênico clássico da PG seja o aumento da resistência periférica à insulina, mais recentemente, alguns estudos têm atribuído outras propriedades a este hormônio. Nesse sentido, Verma e Rana (42) encontraram elevada peroxidação lipídica no fígado e nos rins de ratos tratados com benzeno, após terem recebido PG. Cheng *et al.* (43), por sua vez, demonstraram que esse

hormônio é capaz de contribuir para a apoptose mediada por TNF- α , por um mecanismo que envolve a geração de radicais livres, em células de hepatoma HuH-7. Além disso, Fedotcheva *et al.* (44) mostraram que a PG é capaz de contribuir, por meio da formação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, para o estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou redução da capacidade antioxidante (45). As espécies reativas sejam elas derivadas do oxigênio, enxofre ou nitrogênio são classificadas, didaticamente, em dois grupos: os radicais livres e os grupos não radiculares (46) e participam de processos fisiológicos essenciais como o controle da pressão sanguínea, a sinalização celular, apoptose, fagocitose de agente patogênicos, fertilização de ovos e amadurecimento de frutos (47,48). A reatividade das ERO se deve à instabilidade da molécula em virtude da presença de elétrons desemparelhados e sua formação, *in vivo*, ocorre pela ação catalítica de enzimas que atuam na cadeia transportadora de elétrons (fatores endógenos) e pela exposição a fatores exógenos como ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro, entre outros (49).

O aumento de ERO e o simultâneo declínio de mecanismos de defesa antioxidantes têm sido relacionados ao envelhecimento e à etiologia de várias doenças como as cardiovasculares, oculares degenerativas (catarata e degeneração macular) e diabetes (50,51), além de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (52).

No contexto do DM, as ERO podem inativar enzimas, causar o aumento da peroxidação lipídica nas membranas celulares, além de colaborar para o desenvolvimento da resistência periférica à insulina (53). O estresse oxidativo também tem sido relacionado ao DM2 (54), porém, ainda são poucos os estudos que relacionam esse fenômeno ao DG. Apesar disso, Lappas *et al.* (55) estudaram a liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , interleucina 6 e 8 (IL-6 e IL-8), e um produto da peroxidação lipídica, o 8-isoprostano, pela placenta, tecido adiposo e músculo esquelético de gestantes saudáveis ou com DG. Os pesquisadores identificaram que, nos três tecidos estudados, houve uma maior liberação de 8-isoprostano em mulheres com DG, sem diferença na liberação de citocinas.

Diante dos inúmeros efeitos deletérios das ERO, as células contam com a

ação de um sistema de defesa antioxidante, representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (Gpx), capazes de atenuar tais efeitos. Além desse, há um sistema de defesa não-enzimático que inclui compostos sintetizados pelo organismo (endógenos), como glutathione (GSH), ácido úrico e os estrógenos (48,56), ou ingeridos por meio da dieta regular (exógenos), que compreendem o β -caroteno, o α -tocoferol e o ácido ascórbico, também conhecidos como vitaminas A, E e C, respectivamente (42,43).

A vitamina A pode ser encontrada em alguns óleos, frutas, legumes e verduras, ovos, leite e derivados. Já a vitamina E, cujas principais fontes alimentares são os óleos vegetais, como canola e girassol, e nozes (51), é um dos antioxidantes mais importantes na proteção contra a peroxidação lipídica. Não obstante, a vitamina C, presente nas frutas ácidas como tomate e em vegetais, tais como couve, pimenta e brócolis, é considerada o mais importante e potente antioxidante nutricional hidrossolúvel, atuando, diretamente, nas membranas celulares, impedindo a iniciação da peroxidação lipídica ou, indiretamente, na regeneração da vitamina E (57).

Pensando na primordialidade do equilíbrio entre a produção de ERO e ação do sistema de defesa antioxidante no contexto do DM e do DG, Peuchant *et al.* (58) avaliaram a atividade da enzima SOD, bem como as concentrações de glutathione (GSH), malondialdeído (MDA) - um marcador de peroxidação lipídica (59), e das vitaminas A, no plasma, e E, nos eritrócitos de gestantes saudáveis e com DG ou DM2. Os autores verificaram que nas gestantes, tanto com DG quanto com DM2, houve um aumento nos marcadores de estresse oxidativo, menores concentrações de vitaminas A e E, além de redução da quantidade de GSH, em relação às gestantes saudáveis.

Sabendo-se que as células β , produtoras de insulina, expressam receptores de PG e de estrógenos, e considerando a baixa expressão das principais enzimas antioxidantes Cu/Zn superóxido dismutase (Cu/ZnSOD), Mn superóxido dismutase (MnSOD) e CAT em células β (60,61), nosso grupo iniciou um estudo para avaliar o efeito da PG sobre a célula β pancreática, ampliando o que já se conhecia sobre os efeitos desse hormônio em relação ao aumento da resistência periférica à insulina no contexto do DG.

Já mostramos que a PG induziu a morte, por apoptose, tanto de células da linhagem RINm5F quanto em células de ilhotas de ratas (62). Verificamos também que a morte celular causada pela PG foi, significativamente, menor quando as células foram pré-incubadas com vitamina E, corroborando a hipótese de que o efeito desse hormônio envolve um mecanismo molecular associado ao estresse oxidativo (62). Tendo em vista esse complexo cenário, seria possível sugerir que o balanço hormonal durante a gestação estaria relacionado ao estresse oxidativo e, consequentemente, ao surgimento e/ou progressão do DG.

Embora os efeitos da PG já tenham sido associados ao estresse oxidativo, pouco se sabe sobre o mecanismo molecular envolvido na ação desse hormônio que contribui para esse fenômeno em células β . Neste contexto, este projeto pretendeu avaliar o efeito da PG na expressão de genes envolvidos em vias de estresse oxidativo e defesa antioxidante em células produtoras de insulina da linhagem RINm5F. As siglas dos genes investigados, agrupados em famílias, estão mostrados na **Tabela 2**. A tabela completa com os nomes dos genes encontra-se no **Anexo A**.

	Família	Genes
1	Glutathiona Peroxidases (Gpx)	Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4, Gpx5, Gpx6, Gpx7, Gstk1, Gstp1
2	Peroxirredoxinas	Ehd2, Prdx1, Prdx2, Prdx3, Prdx4, Prdx5, Prdx6 (Aop2)
3	Peroxidases	Apc, Cat, Ctsb, Duox1, Epx, Lpo, Mpo, Ptgs1 (Cox1), Ptgs2 (Cox2), Rag2, Serpinb1b
4	Outros antioxidantes	Alb, Gsr, Vimp, Sod1, Sod3, Srxn1, Txnrd1, Txnrd2
5	Superóxido Dismutase	Sod1, Sod2, Sod3
6	Metabolismo de Superóxido	Ccs, Cyba, Ncf1, Ncf2, Nos2 (Nos2a, iNos), Nox4, Noxa1, Noxo1, Scd1, Ucp2
7	Metabolismo de outras ERO	Aox1, Fmo2
8	Responsivos ao estresse oxidativo	Als2, Apoe, Cat, Ccl5 (RANTES), Ctsb, Dhcr24, Duox1, Duox2, Epx, Ercc2 (Xpd), Ercc6, Fth1, Gclc, Gclm, Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4, Gpx5, Gpx6, Gpx7, Gsr, Hmox1, Hspa1a (Hsp70-1), Idh1, Krt1, Mpo, Nqo1, Nudt1, Park7, Prdx1, Prdx2, Prdx6 (Aop2), Prnp, Psmb5, Vimp, Sepp1, Sod1, Sqstm1, Tpo, Txn1, Txnip, Txnrd1, Txnrd2, Ucp3
9	Transportadores de Oxigênio	Cygb, Dnm2, Fancc, Hba1, Mb, Ngb, Ift172, Slc38a1, Slc38a5, Vim

Tabela 2. Genes investigados envolvidos no estresse oxidativo e na defesa antioxidante.

Dessa maneira, este trabalho deve colaborar para a melhor compreensão do mecanismo molecular envolvido na patogênese do DG, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento da doença, fundamentadas no restabelecimento do estado redox do organismo materno.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da PG, na presença ou ausência de antioxidantes, na morte de células produtoras de insulina da linhagem RINm5F.
- Investigar o efeito da PG, na presença ou ausência de antioxidantes, na

expressão de genes envolvidos em vias de estresse oxidativo e defesa antioxidante de células produtoras de insulina da linhagem RINm5F.

- Determinar as concentrações, em nível citoplasmático, de proteínas codificadas por genes modulados pela PG, na presença ou ausência de antioxidantes, em células RINm5F.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o cumprimento dos objetivos propostos, os vários procedimentos metodológicos estão descritos, em detalhes, a seguir.

3.1 *Investigação in vitro*

3.1.1 *Cultivo celular*

Foram utilizadas células RINm5F (linhagem derivada de insulinoma de rato, gentilmente cedidas pelo laboratório do Professor Sigurd Lenzen, Departamento de Bioquímica Clínica, Escola de Medicina de Hanover, Alemanha). Como controle negativo foram usadas células da linhagem MDA-MB-231, por não apresentarem receptores de PG (63). Células da linhagem MCF-7 foram usadas como controle positivo, por apresentarem tais receptores (64). Ambas as linhagens, derivadas de carcinoma ductal invasivo humano, foram gentilmente cedidas pelo professor Humberto Miguel Garay, do Laboratório de Biotecnologia da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo). As células foram cultivadas em frascos de 25 ou 75 cm² (Ultra Cruz, Santa Cruz Biotechnology, Finnell St, Dallas, Texas, USA). Tanto as células da linhagem RINm5F como da MDA-MB-231 foram mantidas em meio RPMI-1640 (LGC Biotecnologia, São Paulo, BR), suplementado com bicarbonato de sódio 24 mM, glutamina 2 mM, penicilina 10 U/ml, estreptomicina 10 µg/ml e soro fetal bovino 10%. Já as células da linhagem MCF-7 foram mantidas em DMEM com alta concentração de glicose (High Glucose, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), contendo penicilina 10 U/ml, estreptomicina 10 µg/ml e soro fetal bovino 10%. Todos os tipos celulares foram mantidos a 37°C, em atmosfera umidificada e CO₂ 5%.

3.1.2 Tratamento das células

Para os tratamentos, foram preparadas soluções de PG (Massa Molecular: 314,47 g/mol – Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) nas concentrações 40, 400, 4000 e 40000 μ M (40 mM); α -tocoferol – vitamina E (Massa Molecular: 472,74 g/mol - Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) na concentração de 40000 μ M (40 mM); e ácido ascórbico – vitamina C (Massa Molecular: 198,11 g/mol - Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) na concentração de 50000 μ M (50 mM). As células foram incubadas com etanol (controle) ou PG 0,1, 1,0 e 100 μ M por 6 ou 24 h em placas de 6 poços (Corning Incorporated, NY, USA). Para avaliar os efeitos dos antioxidantes, as células RINm5F foram pré-incubadas por 2 h com vitamina E (Vit E) na concentração final de 40 μ M, conforme Nunes *et.al* (62) ou com vitamina C (Vit C) na concentração final de 50 μ M, conforme García *et. al* (65), antes da adição da PG.

Após o cultivo nos períodos indicados, foram avaliadas a viabilidade celular e fragmentação do DNA dessas células, a expressão dos genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante, usando-se a técnica de PCR quantitativo, conforme descrito no kit PCR Array, além da quantidade de proteína Hmox1 e Prdx4.

3.1.3 Efeito da PG na viabilidade das células RINm5F

Inicialmente, foi importante confirmar o efeito da PG sobre a morte das células, verificada por meio da perda da integridade da membrana plasmática e fragmentação do DNA. Para essa finalidade, as células RINm5F, pré-incubadas ou não com vitamina E 40 μ M ou vitamina C 50 μ M por 2 h, foram incubadas com etanol ou PG em diferentes concentrações (0,1, 1,0 e 100 μ M), enquanto as células MDA-MB-231 e MCF-7 foram incubadas somente com PG 100 μ M. Após 24 h, as células foram coletadas das placas por tripsinização (tripsina 0,25%, Invitrogen, Califórnia, EUA). Em seguida, foram adicionados 500 μ l de PBS às placas para lavagem e completa remoção das células. A suspensão de células foi centrifugada a 400 x g por 7 min (Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após descarte do sobrenadante e ressuspensão das células em 300 μ l de PBS, foram adicionados 5 μ l de solução de iodeto de propídeo (PI) 1 mg/ml (Invitrogen, CA,

USA). As células foram avaliadas no citômetro de fluxo Guava (Merck Millipore Corporation, Hayward, CA, USA), usando-se o software InCyte (Millipore Corporation, Hayward, CA, USA), sendo adquiridos 10.000 eventos. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via e pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações, disponível no software GraphPad Prism 5.01. As diferenças foram expressas em relação ao controle com etanol e consideradas significativas para $p < 0,05$.

3.1.4 Efeito da PG na fragmentação do DNA das células RINm5F

As células RINm5F, assim como as MDA-MB-231 e MCF-7, foram tratadas e coletadas nas mesmas condições descritas no item 3.1.3. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 300 μ l de PBS contendo Triton X-100 0,1% (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) e PI 20 μ g/ml (Invitrogen, CA, USA). As células foram avaliadas no citômetro de fluxo Guava e a análise estatística também foi realizada como descrito no item 3.1.3.

3.1.5 Extração de RNA, obtenção do cDNA e PCR quantitativo

O RNA das células submetidas aos diferentes tratamentos, conforme descrito no item 3.1.2, foi extraído de acordo com o recomendado no Mini Kit RNeasy (Qiagen, Frederick, MD, USA). A fita complementar de DNA (cDNA) foi obtida a partir de duas etapas: a primeira consistiu na eliminação do DNA genômico usando-se 8 μ l de RNA (5 μ g) e 2 μ l do tampão GE 5x concentrado, sendo a mistura incubada por 5 min a 42°C; a segunda compreendeu a transcrição reversa, propriamente dita, na qual foram usados 10 μ l do produto da primeira etapa, 4 μ l de tampão de reação 5x concentrado (BC3), 1 μ l de controle P2 (oligo (dT)₁₈, uma mistura de dNTPs 10 mM, 2 μ l da enzima transcriptase reversa (RE3) e 3 μ l de água livre de RNase, em um volume final de 20 μ l. Essa mistura foi incubada por 15 min a 42°C e, em seguida, por 5 min em 95°C em termociclador, conforme o protocolo do RT² First Strand Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Para a avaliação do efeito da PG na expressão de 84 genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante das células, foi usado o RT² Profiler PCR

Array (Qiagen, Hilden, Alemanha), usando-se a técnica de PCR quantitativo.

O ciclo em que a reação cruza o limiar de detecção (cycle threshold – Ct) do gene de interesse (GI) foi correlacionado à quantidade de RNAm alvo. Para normalização, foram usados genes controles (GC) fornecidos no kit (β -actina, β -2 microglobulina, hipoxantina guanina fosforribosil transferase, lactato desidrogenase A e proteína ribossomal P1). O valor do Ct do GC foi subtraído do valor do Ct do GI, resultando no valor Δ Ct, que representa a quantidade relativa da transcrição do GI. A partir desse cálculo, determinou-se o valor de $\Delta\Delta$ Ct, subtraindo-se o Δ Ct do controle experimental (etanol) do Δ Ct da amostra. O incremento foi calculado como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ e a expressão gênica apresentada em função do controle, ou seja, das células cultivadas somente com etanol absoluto (veículo para dissolução e diluição da PG). Os dados referentes à expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante foram apresentados em termos do número de vezes que a expressão do gene foi modificada em relação ao controle com etanol.

Para investigação mais detalhada dos genes, cuja expressão foi modulada por PG, foram desenhados primers específicos, conforme descrito a seguir.

3.1.6 Desenho e síntese dos primers

Os primers para investigação dos genes Hspa1a, Duox1 e Gpx6 foram desenvolvidos pela Qiagen (Frederick, MD, USA), que mantém em sigilo sua sequência de bases. Para o desenho dos primers para Hmox1, Prdx4 e Scd1, primeiramente, foi obtida a sequências de seus genes, a partir da base de dados do PubMed. Os primers foram desenhados usando-se o software Primer3 (v. 0.4.0) (66), levando-se em consideração três características importantes: o tamanho da sequência a ser amplificada (amplicon), temperatura de fusão (TM, de *Temperature of Melting*) e a porcentagem de bases GC. Os primers desenhados foram sintetizados pela Invitrogen (Califórnia, EUA) e as suas sequências estão mostradas na **Tabela 3**.

Gene	Primer	Sequência 5'-3'	TM (°C)	% GC
Hmox1	Primer Foward	GAC AGC ATG TCC CAG GAT TT	59.9	50
	Primer Reverse	ATG GTA CAA GGA GGC CAT CA	60.3	50
Prdx4	Primer Foward	CTT TTG GGG ATC GAA TTG AA	59.9	40
	Primer Reverse	AAT CCT TAT TGG CCC CAG TC	60.2	50
Scd1	Primer Foward	TCA ATC TCG GGA GAACAT CCT	60.0	48
	Primer Reverse	TCG ATG AAG GTG GTG AA	60.2	45

Tabela 3. Sequência dos primers dos genes estudados.

3.1.7 PCR quantitativo

Dos 84 genes estudados usando-se o Kit RT² Profiler PCR Array, 29 foram selecionados (**Tabela 4**) por terem sua expressão regulada pela PG, conforme seleção preliminar descrita na **Figura 7**. Finalmente, seis genes foram selecionados por estarem relacionados ou apresentarem funções associadas à célula β pancreática e/ou ao DG (**Tabela 5**).

A expressão dos seis genes selecionados foi mais bem estudada, individualmente, por meio da técnica de PCR quantitativo. O gene que codifica para a proteína constitutiva hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HPRT) foi usado como controle. As reações foram desenvolvidas utilizando-se o Kit SYBR® Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientifics, Waltham, MA, EUA), em 40 ciclos térmicos no equipamento Eco™ Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA, EUA). Foi utilizado 1 μ l de cDNA (125 ng/ μ l) diluído em água ultrapura autoclavada, 4 μ l dos diferentes conjuntos de primers (10 μ M) e 5 μ l de Master Mix, totalizando 10 μ l por amostra.

3.1.8 Imunodeteção das proteínas de interesse por ELISA

3.1.8.1. Determinação da concentração de proteínas nas amostras

Para a investigação da quantidade de Hmox1 e Prdx4 foi necessário, inicialmente, determinar a quantidade de proteínas totais para cada amostra pelo método de Bradford (67). Após o tratamento das células, as proteínas totais foram

obtidas com a adição de 300 µl de tampão de lise, contendo PBS, Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) e coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Alíquotas de 20 µl de cada amostra foram misturadas a 200 µl do reagente para dosagem de proteína (LGC Biotecnologia, São Paulo, BR) preparado segundo instruções do fabricante. Após 5 min, a absorbância, em 595 nm, foi determinada na leitora de placas Synergy HT (Biotek, Winooski, VT, EUA), utilizando-se o software Gen5™ (BioTek, Winooski, VT, EUA). A quantidade de proteína em cada amostra foi determinada a partir de uma curva-padrão de albumina de soro bovino (BSA).

3.1.8.2. Hmox1

As concentrações de HMOX1 foram determinadas usando-se o kit Human Total HO-1/Hmox1 DuoSet IC ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) DYC3776-2 (R&D Systems Inc., Minneapolis, EUA). Inicialmente, a microplaca de 96 poços foi coberta com o anticorpo de Captura Hmox1 (8,0 µg/ml) diluído em PBS, selada e incubada *overnight* à temperatura ambiente. Após esse período, o anticorpo foi removido e os poços lavados três vezes com 300 µl de tampão de lavagem. Os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados com 300 µl de tampão de bloqueio, seguindo-se a incubação à temperatura ambiente por 2 h. Após bloqueio, os poços foram, novamente, lavados três vezes com 300 µl de tampão de lavagem, sendo adicionados 100 µl da solução padrão de Hmox1 fornecida pelo kit (156 a 10.000 pg/ml) para a construção da curva-padrão e determinação da equação da reta. Em um segundo momento, foram adicionados 100 µl das amostras obtidas após lise das células. Após três lavagens com 300 µl de tampão de lavagem, foram adicionados 100 µl do anticorpo de Detecção Hmox1 (200 ng/ml). A placa foi selada e incubada por mais 2 h à temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagem com 300 µl de tampão de lavagem, foram adicionados 100 µl de solução de estreptavidina conjugada com peroxidase de raiz forte (HRP, do inglês de, *Horseradish Peroxidase*) e uma incubação de 20 min à temperatura ambiente foi realizada. Em seguida, os poços foram, novamente, lavados com 300 µl de tampão de lavagem, seguindo-se a adição de 100 µL da solução de substrato, que foi incubado por 20 min em ambiente protegido da luz direta. Após essa

incubação, foram adicionados 50 µl da solução de parada. A absorbância das amostras foi determinada em 450 nm, em leitora de placas Synergy HT (Biotek, Winooski, VT, EUA), utilizando-se o software Gen5™ (BioTek, Winooski, VT, EUA).

3.1.8.3 Prdx4

As concentrações de Prdx4 foram determinadas usando-se o kit KA2121 (Abnova Corporation, Walnut, EUA). Para o preparo da microplaca de 96 poços, foram adicionados, em cada poço, 300 µl do tampão de incubação e a placa incubada por 5 min à temperatura ambiente. Foi realizada a lavagem dos poços com 300 µl de solução de lavagem. Tanto para a curva-padrão quanto para a determinação da quantidade de Prdx4 nas amostras de interesse, foram adicionados 100 µl da solução padrão ou extratos celulares, sendo o branco considerado o tampão de diluição. A placa foi selada e incubada por 2 h a 37°C. Após esse período, foram realizadas três lavagens com 300 µl do tampão de incubação, seguindo-se a adição de 100 µl de solução de anticorpo secundário. A incubação prosseguiu por 1 h à temperatura ambiente e, a seguir, os poços foram lavados três vezes com 300 µl de solução de lavagem. Foram, então, adicionados 100 µl de solução de avidina-conjugada com peroxidase (AV-HRP), seguindo-se a incubação por 30 min à temperatura ambiente. Após três lavagens com 300 µl de solução de lavagem, foram adicionados 100 µl da solução de substrato. A microplaca foi incubada por 5 min, no escuro. Após essa incubação final, foram adicionados 100 µl da solução de parada. A absorbância das amostras foi determinada em 450 nm, em leitora de placas Synergy HT (Biotek, Winooski, VT, EUA), utilizando-se o software Gen5™ (BioTek, Winooski, VT, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da PG na viabilidade e morte de células RINm5F

A incubação das células RINm5F, por 24 h, com diferentes concentrações de PG, não resultou na perda da integridade de membrana celular (**Figura 3**). Porém, quando o hormônio foi usado na concentração de 100 µM, causou fragmentação do DNA em aproximadamente 40% das células RINm5F (**Figura 4**) e MCF-7 (controle positivo), Tal fenômeno não foi observado quando a PG foi incubada com células da

linhagem MDA-MB-231.

Figura 3. Viabilidade celular após o tratamento com PG em células RINm5F. As células RINm5F foram incubadas com etanol absoluto ou PG nas concentrações 0,1; 1,0 e 100 µM e analisadas após 24 h. As células MDA-MB-231 e MCF-7 foram tratadas somente com PG 100 µM. Foram analisados 10000 eventos por amostra. Os dados estão apresentados com a média $\pm$ DP de dois experimentos em duplicatas e um experimento em triplicatas. As diferenças foram analisadas por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Figura 4. Fragmentação do DNA após o tratamento com PG em células RINm5F. As células RINm5F foram incubadas com etanol absoluto ou PG nas concentrações 0,1, 1,0 e 100 µM e analisadas após 24 h. As células MDA-MB-231 e MCF-7 foram tratadas somente com PG 100 µM. Foram analisados 10000 eventos por amostra. Os dados estão apresentados com a média ± DP de dois experimentos em duplicatas e um experimento em triplicatas. As diferenças foram analisadas por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). *, indica diferença significativa em relação ao controle.

4.2 Efeito da PG, na presença de antioxidantes, na viabilidade e morte de células RINm5F

A pré-incubação das células com as vitaminas E e C não modificou os resultados sobre a perda da integridade da membrana plasmática (**Figura 5**). Essas vitaminas, por sua vez, foram capazes de reduzir, significativamente, a fragmentação do DNA causada por PG 100 µM, sugerindo um efeito protetor na apoptose induzida por esse hormônio e confirmando os dados previamente obtidos pelo grupo (**Figura 6**).

Figura 5. Viabilidade celular após o tratamento com PG em células RINm5F, na presença de antioxidantes. As células RINm5F foram pré-incubadas com vitamina E 40 μM ou vitamina C 50 μM, por 2 h, sendo, posteriormente, incubadas com etanol absoluto ou PG na concentração 100 μM por mais 24 h. Foram analisados 10000 eventos por amostra. Os dados estão apresentados com a média $\pm$ DP de dois experimentos em duplicatas e um experimento em triplicatas. As diferenças foram analisadas por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Vit E: Vitamina E; Vit C: Vitamina C.

Figura 6. Fragmentação do DNA após o tratamento com PG em células RINm5F, na presença de antioxidantes. As células RINm5F foram pré-incubadas com vitamina E 40 μM ou vitamina C 50 μM, por 2 h, sendo, posteriormente, incubadas com etanol absoluto ou PG na concentração 100 μM por mais 24 h. Foram analisados 10000 eventos por amostra. Os dados estão apresentados com a média $\pm$ DP de dois experimentos em duplicatas e um experimento em triplicatas. As diferenças foram analisadas por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). *, indica diferença significativa em relação ao controle. \$, indica diferença significativa entre os tratamentos com e sem vitamina. Vit E: Vitamina E; Vit C: Vitamina C.

4.3 Efeito da PG na expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante

4.3.1. Seleção dos genes modulados pela PG

Para este experimento, as concentrações de PG foram escolhidas pensando-se em diferentes cenários: a concentração 0,1 μM (100 nM) que corresponde à concentração fisiológica do hormônio em uma condição não gravídica e no início da gestação; 1,0 μM que se refere a uma concentração fisiológica que pode ser alcançada no segundo e terceiro trimestres da gestação; e 100 μM que corresponde a uma concentração farmacológica do hormônio usada para a prevenção de partos pré-termo (68).

Após incubação das células RINm5F com a PG em diferentes concentrações , por 6 ou 24 h, a expressão dos 84 genes de interesse foi avaliada usando-se o kit RT² Profiler PCR Array. Os resultados mostrados na **Tabela 4** referem-se ao número de vezes que o gene foi mais ou menos expresso em relação ao controle com etanol.

Para permitir melhor avaliação dos genes, potencialmente, envolvidos na ação da PG, foram realizadas distintas etapas de seleção, a partir de critérios definidos, especificamente, para esse estudo. A primeira etapa de seleção considerou a regulação da expressão dos genes pela PG, positiva ou negativamente em, no mínimo, duas vezes, em, pelo menos, duas diferentes concentrações, independentemente do tempo (6 ou 24 h), ou nas mesmas concentrações nos diferentes tempos. Dessa forma, dos 84 genes, 29 foram selecionados e estão destacados em cinza na **Tabela 4**.

Gene	6 h			24h		
	Concentrações de Progesterona					
	0,1 µM	1 µM	100 µM	0,1 µM	1 µM	100 µM
Alb	1,14	1,10	4,04	1,30	1,13	-1,25
Als2	-1,51	-1,50	-6,40	-1,13	-1,55	-1,74
Aox1	-1,15	-1,09	-1,74	-1,03	-1,33	-1,80
Apc	1,07	-1,06	-2,75	1,16	-1,24	-1,17
Apoe	-1,03	1,00	-2,85	-1,06	-1,16	1,47
Cat	-1,11	-1,06	-1,34	-1,11	-1,17	-1,24
Ccl5	1,03	1,01	-2,84	1,62	1,00	-1,53
Ccs	-1,08	-1,25	-1,27	-1,12	-1,12	-1,39
Ctsb	-1,59	-1,73	-2,81	-1,27	-1,90	1,00
Cyba	2,17	1,50	-1,46	2,69	2,33	1,27
Cygb	-1,58	-1,55	-7,41	-1,10	-1,77	-1,67
Dhcr24	-1,55	-1,45	-5,77	-1,36	-2,13	-1,72
Dnm2	-1,51	-1,56	-5,46	-1,48	-2,04	-2,10
Duox1	2,45	1,59	1,45	4,54	2,84	-1,04
Duox2	1,28	1,55	-2,90	1,57	1,34	-1,40
Ehd2	-1,35	1,12	-3,69	1,32	1,19	-1,36
Epx	-1,20	-1,06	-4,34	-1,15	-1,26	-1,90
Ercc2	-1,31	-1,60	-5,16	-1,14	-1,81	-1,70

Ercc6	-1,11	-1,38	-3,61	-1,20	-1,48	-2,14
Fancc	-1,27	-1,53	-3,31	-1,34	-2,04	-2,86
Fmo2	1,15	-2,01	-1,76	5,55	5,89	1,96
Fth1	1,13	1,00	1,28	1,19	1,33	1,14
Gclc	-1,31	-1,48	-4,27	-1,18	-1,28	-1,33
Gclm	-1,11	-1,29	-1,02	1,02	1,05	-1,43
Gpx1	-1,06	1,08	-2,58	-1,36	-1,21	-1,31
Gpx2	-1,13	-1,17	-2,39	1,15	-1,11	-2,33
Gpx3	-1,22	-1,33	-2,11	-1,05	-1,68	-1,53
Gpx4	1,01	-1,06	-1,37	1,21	-1,12	-1,09
Gpx5	2,16	1,15	1,31	1,63	1,14	-1,23
Gpx6	1,57	2,82	-1,15	4,06	4,82	1,12
Gpx7	1,03	-1,83	-2,35	3,07	2,53	2,87
Gsr	-1,25	-1,39	-2,17	-1,19	-1,35	-1,38
Gstk1	1,03	-1,27	-1,51	1,13	-1,40	-2,55
Gstp1	-1,02	-1,31	-1,97	-1,12	-1,64	1,40
Hba1	-1,06	1,14	-1,18	-1,10	-1,21	-3,68
Hmox1	-1,09	-1,57	2,66	-1,26	-1,63	4,18
Hspa1a	3,81	4,85	7,98	7,14	3,80	1,24
Idh1	1,05	-1,03	-2,56	1,28	1,34	-2,20
Ift172	-1,39	-1,66	-2,80	-1,41	-1,95	-1,41
Krt1	-1,66	1,47	1,01	1,10	1,35	2,33
LOC367198	1,14	2,23	1,78	1,10	1,35	-1,04
Lpo	-2,81	1,20	-1,33	1,90	3,62	23,08
Mb	-1,32	-1,10	-7,13	-1,10	-1,91	-1,40
Mpo	-1,19	-1,31	1,13	1,23	1,05	-1,02
Ncf1	-1,03	-1,16	-3,81	-1,19	-1,33	-3,68
Ncf2	-1,60	1,04	-14,08	1,53	-4,72	1,95
Ngb	-1,51	-1,56	-4,64	1,76	2,29	-1,28
Nos2	-1,76	-1,52	1,86	-1,03	-1,22	1,78
Nox4	1,87	3,34	1,78	1,10	1,35	-1,04
Noxa1	-2,37	-1,22	-7,60	-1,26	-1,90	-2,15
Noxo1	1,17	-1,71	-7,83	-1,36	1,09	-2,47
Nqo1	-1,28	-1,70	-9,26	-1,22	-1,82	3,18
Nudt1	1,06	1,07	1,20	1,11	1,13	-2,29
Park7	1,14	1,11	1,30	1,05	-1,01	-1,48
Prdx1	1,10	1,13	1,20	1,36	1,26	-1,05
Prdx2	1,06	-1,00	-1,03	1,04	1,01	-1,78

Prdx3	-1,44	-1,46	-1,94	-1,22	-1,40	-1,40
Prdx4	1,25	1,22	1,07	1,66	1,42	1,06
Prdx5	1,05	1,08	-1,33	1,07	1,02	1,04
Prdx6	-1,19	-1,26	-1,81	-1,14	-1,39	-1,69
Prnp	-1,56	-2,23	-2,10	-1,46	-2,01	-2,70
Psmb5	1,16	1,17	1,13	1,16	1,28	-1,24
Ptgs1	-1,33	-1,71	-2,15	-1,55	-2,05	-1,96
Ptgs2	-1,08	-1,09	1,24	1,38	-1,21	3,77
Rag2	3,73	4,60	2,09	1,10	1,35	3,08
Scd1	-1,11	1,39	-1,42	2,00	2,15	1,38
Vimp	1,25	1,18	1,36	1,33	1,47	1,92
Sepp1	-1,19	1,10	-1,71	1,15	-1,11	-5,07
Serpinb1b	-1,82	-1,51	-1,86	-1,43	-1,85	-6,55
Slc38a1	2,20	4,75	-1,66	1,92	2,96	-2,90
Slc38a5	-1,08	1,39	-3,45	1,32	1,01	-1,29
Sod1	1,05	1,04	1,39	1,14	1,29	-1,31
Sod2	-1,04	1,01	-1,01	1,35	1,24	1,14
Sod3	-1,03	-1,08	-3,07	1,00	-1,05	-1,76
Sqstm1	-1,42	-1,78	-2,33	-1,24	-1,66	1,11
Srxn1	-1,11	-1,13	-3,61	-1,09	-1,23	4,63
Tpo	1,14	1,10	1,78	1,10	1,35	-1,04
Txn1	1,25	1,20	1,25	1,23	1,24	-1,22
Txnip	-1,16	-1,56	-50,94	-2,19	-3,53	-26,65
Txnrd1	-1,39	-1,37	-5,54	-1,43	-1,98	-1,62
Txnrd2	-1,20	-1,61	-2,89	-1,10	-1,57	-1,59
Ucp2	-1,62	-1,79	-4,51	-1,40	-1,73	-2,10
Ucp3	1,18	-1,31	-1,16	-1,23	-1,53	-4,51
Vim	1,58	1,01	-7,99	1,29	2,55	-1,14

Tabela 4. Expressão gênica, avaliada por PCR Array, após incubação em células RINm5F com PG, em diferentes concentrações, por 6 e 24 h. Dos 84 genes, 29 foram selecionados (destacados em cinza), conforme descrito. Aqueles que tiveram sua expressão aumentada, quando comparado ao etanol, estão representados em vermelho. Já aqueles que tiveram sua expressão diminuída (valores negativos) estão representados em azul.

Em seguida, dos 29 genes, cinco foram selecionados por estarem, de alguma forma, relacionados ou apresentarem funções associadas à célula β pancreática e/ou ao DG. Adicionalmente, incluiu-se o gene Prdx4 que, embora não tenha sido

regulado mais de duas vezes pela ação da PG, tem sido estudado no contexto do diabetes por desempenhar importante papel na proteção da célula β pancreática e na regulação da síntese de insulina (69).

A **Tabela 5** reúne os seis genes que foram selecionados para o estudo e sintetiza o número de vezes que cada um teve sua expressão modificada em relação ao controle com etanol, de acordo com as concentrações de PG e o tempo de incubação. Os genes dual oxidase 1 (Duox1) e estearoil-CoA desaturase 1 (Scd1) codificam para proteínas de propriedades pró-oxidantes, enquanto os genes glutathione peroxidase 6 (Gpx6), heme oxigenase-1 (Hmox1), proteína de choque-térmico $\alpha 1a$ (Hspa1a) e peroxirredoxina 4 (Prdx4) codificam para proteínas de propriedades antioxidantes, conforme indicado na tabela.

Gene	Pot. Redox	6 h			24h		
		Concentrações de Progesterona					
		0,1 μM	1 μM	100 μM	0,1 μM	1 μM	100 μM
Duox1	P	2,45	1,59	1,45	4,54	2,84	-1,04
Gpx6	A	1,57	2,82	-1,15	4,06	4,82	1,12
Hmox1	A	-1,09	-1,57	2,66	-1,26	-1,63	4,18
Hspa1a	A	3,81	4,85	7,98	7,14	3,80	1,24
Prdx4*	A	1,25	1,22	1,07	1,66	1,42	1,06
Scd1	P	-1,11	1,39	-1,42	2,00	2,15	1,38

Tabela 5. Seleção final dos genes cuja expressão foi regulada após tratamento com PG, em diferentes concentrações, por 6 ou 24 h. Dos 29 genes, 5 foram selecionados por estarem relacionados à fisiologia de células β e/ou DG. O gene Prdx4* foi incluído na análise, apesar de não ter sido regulado pela PG, conforme os critérios estabelecidos. O potencial redox (Pot. redox) dos genes foi expresso como pró-oxidante (P) ou antioxidante (A). A marcação em vermelho refere-se ao número de vezes que o gene foi mais expresso em relação ao controle etanol.

Para facilitar o entendimento, as etapas metodológicas e sua relação com a seleção dos genes, cuja expressão foi modulada por progesterona, estão ilustradas na **Figura 7**.

Figura 7. Esquema de seleção dos genes envolvidos em vias de estresse oxidativo ou defesa antioxidante. *Dos seis genes selecionados, cinco foram modulados pela PG e, juntamente ao gene Prdx4, estão envolvidos na fisiologia da célula β pancreática e/ou DG.

4.3.2 Avaliação da expressão dos genes *Hspa1a*, *Duox1*, *Gpx6*, *Hmox1*, *Prdx4* e *Scd1* por PCR quantitativo

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de PCR Array, foram realizados ensaios de PCR quantitativo. Essa etapa do estudo justificou-se, fundamentalmente, pela necessidade de confirmação dos resultados obtidos, pois o sistema de PCR Array permitiu a avaliação dos genes uma única vez para cada concentração de progesterona testada, nos dois períodos de incubação. Além disso, é sabido que estudos de expressão gênica são bastante sensíveis às condições

experimentais e, frequentemente, resultam em grandes desvios em torno dos valores médios.

4.3.2.1 Expressão dos genes *Hspa1a*, *Duox1*, *Gpx6*, *Hmox1*, *Prdx4* e *Scd1*

A avaliação se deu pelo cálculo do número de vezes em que a expressão foi modificada, considerando-se a expressão do gene constitutivo HPRT, em comparação às amostras controle, ou seja, aquelas incubadas somente com etanol. A **Figura 7** mostra os resultados, de três diferentes experimentos.

Conforme já havia sido demonstrado, a incubação das células com PG por 6 ou 24 h, nas diferentes concentrações, promoveu a modulação desses seis genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante em até, aproximadamente, oito vezes em comparação às amostras controle.

O gene que codifica para *Hmox1* teve sua expressão aumentada em, aproximadamente, duas vezes após 6 h de incubação com PG 100 μ M e em torno de quatro vezes na incubação das células, por 24 h, com PG nessa mesma concentração, comumente utilizada para prevenção de partos pré-termo (**Figura 8A**).

No que diz respeito ao gene *Prdx4*, não foi observado efeito significativo na sua expressão após incubação das células com PG, confirmando os resultados obtidos nos experimentos de PCR Array (**Figura 8B**). Embora este hormônio não cause alteração significativa na expressão de *Prdx4*, este gene vem sendo associado ao DM2 e, por isso, foi um dos genes escolhidos para os experimentos subsequentes.

Em relação ao gene *Scd1*, sua expressão foi modificada positivamente em, aproximadamente, duas vezes, quando comparado ao controle, tanto na incubação com PG 1,0 quanto 100 μ M por 24 h (**Figura 8C**), indicando que o efeito deste hormônio na expressão de *Scd1* foi dependente do tempo.

Especificamente, o gene *Hspa1a* foi o mais bem modulado pela PG, sendo sua expressão foi modificada em, aproximadamente, quatro e sete vezes na incubação com PG 0,1 μ M, no período de 6 e 24 h, respectivamente. Quando incubada com PG 1,0 μ M, as células β pancreáticas apresentaram aumento na expressão desse gene em, aproximadamente, cinco e quatro vezes, após 6 h e 24 h,

respectivamente, enquanto que com PG 100 μ M houve um aumento de cerca de oito e três vezes, após 6 e 24 h de incubação, respectivamente (**Figura 8D**).

Curiosamente, a regulação positiva desse gene, na incubação por 6 h, foi dependente do aumento da concentração, contudo, na incubação por 24 h, houve redução da sua expressão de modo inverso ao aumento.

O gene que codifica para a proteína Gpx6 teve sua expressão aumentada, significativamente, após a incubação com PG por 24 h, sendo verificado apenas um efeito discreto na incubação com o hormônio por 6 h (**Figura 8E**).

A expressão de Duox1 também foi aumentada, em torno de quatro vezes na incubação com PG 0,1 ou 1,0 μ M por 24 h. Porém, a PG na concentração final de 100 μ M promoveu diminuição considerável na expressão do gene. Esse hormônio não alterou a expressão de Duox1 na incubação por 6 h (**Figura 8F**).

Figura 8. Expressão dos genes regulados pela PG em células RINm5F. As células foram incubadas, por 6 e 24, h com PG nas concentrações 0,1, 1,0 e 100 μM. O RNA foi extraído e o cDNA usado para avaliação da expressão gênica. Os dados estão apresentados com a média ± DP de três experimentos em duplicatas. As diferenças foram analisadas por ANOVA de duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). *, indica diferença significativa em relação ao controle. #, indica diferença significativa entre os tempos de incubação, para a mesma concentração. A. Hmox1. B. Prdx4. C. Scd1. D. Hspa1a. E. Gpx6. F. Duox1. A/C: Amostra em relação ao Controle.

4.3.2.2 Expressão dos genes *Hmox1*, *Prdx4* e *Scd1*, na presença de antioxidantes

A avaliação dos três genes mais bem expressos nas células se deu pelo cálculo do número de vezes em que a expressão foi modificada, considerando-se a expressão do gene constitutivo HPRT, em comparação às amostras controle. As **Figuras 9, 10 e 11** mostram os resultados de três diferentes experimentos em duplicatas, referentes ao efeito da PG em células RINm5F, quando pré-incubadas com os antioxidantes vitamina E e C.

Conforme pode ser observado na **Figura 9A**, a vitamina E, promoveu aumento de, aproximadamente, duas vezes na expressão de *Hmox1*, um gene com características antioxidantes, na incubação das células com PG 1,0 μM , em comparação ao mesmo tratamento sem essa vitamina.

A vitamina C, de forma similar à observada para a vitamina E, promoveu aumento significativo na expressão de *Hmox1* na incubação das células com PG 0,1 e 100 μM por 24 h (**Figura 9B**).

Figura 9. Expressão do gene Hmox1 em células RINm5F tratadas com PG, na presença de antioxidantes. Após pré-incubação com vitamina E 40 μM ou vitamina C 50 μM por 2 h, as células foram incubadas, por 6 ou 24 h, com PG nas concentrações 0,1, 1,0 e 100 μM. Os dados estão apresentados com a média ± DP de três experimentos em duplicatas. As diferenças foram analisadas por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). *, indica diferença significativa em relação ao controle. #, indica diferença significativa entre os tempos de incubação, para a mesma concentração. \$ indica diferença significativa em relação ao tratamento sem antioxidantes. A. Amostras pré-incubadas com vitamina E. B. Amostras pré-incubadas com vitamina C.

Com relação à expressão do gene Prdx4, que também apresenta função antioxidante, verificou-se que a vitamina E promoveu aumento de, praticamente, três vezes na expressão desse gene, na incubação com PG 0,1 μ M, por 6 h (**Figura 10A**), enquanto a vitamina C causou aumento de, aproximadamente, quatro vezes nas células incubadas com PG 1,0 μ M por 6 h (**Figura 10B**). Por outro lado, essa vitamina provocou diminuição na expressão desse gene na incubação com PG 100 μ M por 24 h, em relação ao tratamento somente com o hormônio.

Embora o gene Prdx4 não seja modulado, significativamente, pela PG, verificou-se que o uso dessas vitaminas foi capaz de aumentar sua expressão nas células para algumas concentrações de PG.

Figura 10. Expressão do gene Prdx4 em células RINm5F tratadas com PG, na presença de antioxidantes. Após pré-incubação com vitamina E 40 μM ou vitamina C 50 μM por 2 h, as células foram incubadas, por 6 e 24 h, com PG nas concentrações 0,1, 1,0 e 100 μM . Os dados estão apresentados com a média $\pm$ DP de três experimentos em duplicatas. As diferenças foram analisadas por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). *, indica diferença significativa em relação ao controle. #, indica diferença significativa entre os tempos de incubação, para a mesma concentração. \$, indica diferença significativa em relação ao tratamento sem antioxidantes. A. Amostras pré-incubadas com vitamina E. B. Amostras pré-incubadas com vitamina C.

No que concerne à Scd1, um gene que codifica para uma proteína pró-oxidante, a incubação das células com PG 1,0 e 100 μ M por 6 h, na presença de vitamina E, foi capaz de reduzir a expressão desse gene em cerca de 50%. Tal efeito também foi observado após a incubação com o hormônio, nas diferentes concentrações, por 24 h (**Figura 11A**), sendo que na incubação com PG 100 μ M, o gene Scd1 teve sua expressão quase abolida.

Nas células pré-incubadas com a vitamina C, o gene Scd1 também teve sua expressão diminuída em, aproximadamente, 50%, após tratamento com PG 1,0 e 100 μ M por 24 h (**Figura 11B**).

Figura 11. Expressão do gene Scd1 em células RINm5F tratadas com PG, na presença de antioxidantes. Após pré-incubação com vitamina E 40 μM ou vitamina C 50 μM por 2 h, as células foram incubadas, por 6 e 24 h, com PG nas concentrações 0,1, 1,0 e 100 μM . Os dados estão apresentados com a média $\pm$ DP de três experimentos em duplicatas. As diferenças foram analisadas por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). *, indica diferença significativa em relação ao controle. #, indica diferença significativa entre os tempos de incubação, para a mesma concentração. \$, indica diferença significativa em relação ao tratamento sem antioxidantes. A. Amostras pré-incubadas com vitamina E. B. Amostras pré-incubadas com vitamina C.

4.3.3 Imunodeteção das proteínas Hmox 1 e Prdx4 por ELISA

Após tratamento das células RINm5F com PG, na presença ou não dos antioxidantes vitamina E e C, a concentração das proteínas Hmox1 e Prdx4, ao nível citoplasmático, foi determinada por ELISA.

4.3.3.1 Hmox1

Para se determinar a quantidade da proteína Hmox1, inicialmente, foi construída uma curva-padrão, relacionando o logaritmo da concentração da proteína (pg/ml) em função do logaritmo da absorbância (450 nm), conforme as instruções do kit (**Figura 11**).

Figura 12. Curva-padrão para quantificação de proteínas Hmox1 em células RINm5F. A curva-padrão foi construída utilizando-se cinco pontos correspondentes às quantidades de padrão de Hmox1 (312,5; 625; 1250; 2500 e 5000 pg/ml) em função da absorbância em 450 nm.

As células incubadas com PG 0,1 e 100 μ M, por 6 h, apresentaram aumento na concentração de Hmox1 de, aproximadamente, duas e três vezes, respectivamente. Já na incubação com PG 100 μ M, por 24 h, foi verificado aumento significativo de, aproximadamente, quatro vezes em relação ao controle (**Figura 13**). A vitamina E promoveu diminuição da quantidade de proteína Hmox1 na incubação das células com PG 1,0 e 100 μ M por 24 h. (**Figura 13A**).

De forma análoga, na presença de vitamina C, verificou-se diminuição de, aproximadamente, três vezes da quantidade de Hmox1 na incubação das células com PG 100 μ M por 24 h em relação ao tratamento somente com o hormônio (**Figura 13B**).

É interessante notar que a incubação das células somente com etanol por 24 h, mesmo que respeitada a concentração máxima final de 0,5%, foi suficiente para causar aumento na quantidade da proteína Hmox1 nas células. Apesar desse resultado ser bastante significativo, é preciso dizer que todas as comparações já foram feitas considerando esse aumento produzido pelo etanol.

Figura 13. Determinação da quantidade de Hmox1 em células RINm5F após incubação com PG, na presença ou não de antioxidantes. Após pré-incubação com vitamina E 40 µM ou vitamina C 50 µM por 2 h, as células foram incubadas, por 6 ou 24 h, com PG nas concentrações 0,1, 1,0 e 100 µM e lisadas para obtenção de proteínas totais. Foi utilizado o kit Human Total Ho-1/Hmox1 DuoSet IC ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, EUA) para quantificação das proteínas de interesse. Os dados estão apresentados com a média ± DP de dois experimentos em duplicatas. As diferenças foram analisadas por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). *, indica diferença significativa em relação ao controle. #, indica diferença significativa entre os tempos de incubação, para a mesma concentração. \$ indica diferença significativa em relação ao tratamento sem antioxidantes. A. Amostras pré-incubadas com vitamina E. B. Amostras pré-incubadas com vitamina C.

4.3.3.2 Prdx4

Para a determinação da concentração de Prdx4, inicialmente, foi construída uma curva padrão relacionando a concentração da proteína (pg/ml) com a absorbância em 450 nm (**Figura 14**).

Figura 14. Curva-padrão para quantificação de proteínas Prdx4 em células RINm5F. A curva-padrão foi construída utilizando-se sete pontos correspondentes às quantidades de padrão de Prdx4 (78,1; 156,3; 312,5; 625; 1250; 2500 e 5000 pg/ml) em função da absorbância em 450 nm.

Embora a expressão do gene Prdx4 não tenha sido significativamente modulada pela PG nas células RINm5F, esse hormônio, na incubação por 6 h, promoveu aumento da quantidade da proteína Prdx4 em todas as concentrações testadas. Já na incubação por 24 h, a PG, nas concentrações 0,1 e 1,0 μ M, causou diminuição na quantidade dessa proteína em relação ao controle (**Figura 15**).

Na presença de vitamina E, houve aumento de, aproximadamente, 20% da quantidade da proteína Prdx4, após incubação com PG 100 μ M por 24 h (**Figura 15A**).

Já na presença de vitamina C, o tratamento das células com PG, tanto por 6 ou 24 h, causou, de modo geral, redução na quantidade de Prdx4 em comparação ao mesmo tratamento na ausência do antioxidante (**Figura 15B**), sendo essa redução melhor observada na incubação com o hormônio por 24 h.

Figura 15. Determinação da quantidade de Prdx4 em células RINm5F após incubação com PG, na presença ou não de antioxidantes. Após pré-incubação com vitamina E 40 µM ou vitamina C 50 µM por 2 h, as células foram incubadas, por 6 e 24 h, com PG nas concentrações 0,1, 1,0 e 100 µM e lisadas para obtenção de proteínas totais. Foi utilizado o kit Prdx4 ELISA (Abnova Corporation, Walnut, EUA) para quantificação das proteínas de interesse. Os dados estão apresentados com a média ± DP de dois experimentos em duplicatas. As diferenças foram analisadas por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). *, indica diferença significativa em relação ao controle. #, indica diferença significativa entre os tempos de incubação, para a mesma concentração. \$ indica diferença significativa em relação ao tratamento sem antioxidantes. A. Amostras pré-incubadas com vitamina E. B. Amostras pré-incubadas com vitamina C.

5 DISCUSSÃO

Os efeitos diabetogênicos da PG na gravidez têm sido explicados, até o momento, pelo aumento na resistência à insulina, especialmente no músculo esquelético e tecido adiposo (70). Outros autores têm descrito os efeitos da PG, isoladamente ou em combinação com o estrógeno, e os dados, embora ainda controversos, apontam para uma especificidade dos efeitos desses hormônios que depende do modelo e tecido em que estão sendo estudados (42,71,72).

Embora poucos estudos tenham relacionado a PG ao DG, Ngala *et al.* (73) relataram aumento significativo, durante o primeiro trimestre da gestação, da glicemia de jejum, insulina, resistência à insulina e hemoglobina glicada em mulheres diabéticas pré-gestacionais, enquanto que PG e ETD foram, significativamente, aumentados nas mulheres grávidas não diabéticas. No entanto, no segundo trimestre, as mulheres grávidas que desenvolveram DG apresentaram aumento significativo da glicemia plasmática de jejum, leptina, bem como PG e ETD, em relação as gestantes com baixo risco de diabetes.

Os mecanismos pelos quais a PG manifesta seus efeitos sobre as células β pancreáticas ainda não estão esclarecidos, porém, o estresse oxidativo parece estar envolvido na toxicidade deste hormônio, o que já foi observado em alguns estudos (42). Nesse sentido, Wassmann *et al.* (74) mostraram que a PG, em células musculares lisas vasculares, aumentou a liberação intracelular de ERO após 24 h de incubação, enquanto o 17β -estradiol diminuiu. Além disso, esse trabalho mostrou que o 17β -estradiol impediu a produção de ERO induzida por PG.

A partir dessas evidências, e considerando o aumento da concentração da PG durante a gestação, no presente trabalho, interessamo-nos em investigar o efeito desse hormônio na expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante em células β pancreáticas.

Primeiramente, foi verificado que a incubação das células RINm5F e MCF-7 com PG 100 μ M aumentou a porcentagem de células que exibiram fragmentação do DNA (**Figura 4**), corroborando os dados de Nunes *et al.* (62). A fragmentação do DNA é um indicador de morte celular por apoptose, o que confirma os efeitos pró-apoptóticos da PG. Assim como as células RINm5F, as MCF-7 possuem receptores de estrógeno e PG (64), o que, provavelmente, explicaria a ação da PG mediada

pela sua ligação ao seu receptor nuclear conhecido como PR (receptor de progesterona) (75). Contudo, esse hormônio não teve efeito sobre as células MDA-MB-231, usadas como controle negativo por não apresentam tais receptores (63).

As vitaminas E e C reduziram em, aproximadamente, 40% a fragmentação do DNA nas células incubadas com PG 100 μ M por 24 h, indicando um possível efeito dessas vitaminas na proteção contra a morte celular induzida por PG.

Também mostramos que a PG foi capaz de modular, em células produtoras de insulina da linhagem RINm5F, a expressão de vários genes, entre os quais os que codificam para as proteínas Hspa1a, Gpx6, Duox1, Hmox1 e Scd1 (**Tabela 4**).

O gene Hspa1a, também conhecido como Hsp72, pertencente à família das proteínas heat shock protein (hsp), desempenha importante função anti-inflamatória em um meio pró-inflamatório, protegendo as células contra o aumento da temperatura, estresse oxidativo e efeitos da inflamação (76).

Nesse contexto, um estudo realizado por Bellmann *et al.* (77), também com células da linhagem RINm5F, mostrou que o tratamento com a proteína Hspa1e/ou a transfecção com esse gene resultou na redução da lise celular induzida por NO• e por ERO. Corroborando tais resultados, Burkart *et al.* (78) observaram que quando a expressão de Hspa1a foi suprimida nestas células, a proteção contra o efeito do NO• foi abolida.

Além disso, outros estudos vêm demonstrando que as concentrações de Hsp70 circulantes estão elevadas no DM1 e DM2 (79–81), muito provavelmente, por esta condição apresentar características de inflamação e envolver o estresse oxidativo. Na mesma linha, Yabunaka *et al.* (82) mostraram que os níveis de Hsp70 em células mononucleares do sangue periférico estavam elevados em indivíduos com DM2, devido ao aumento do estresse oxidativo.

Pouco se conhece sobre a relação entre os níveis séricos de Hspa1a e o DG, contudo, Garamvölgyi *et al.* (83) demonstraram que as concentrações de Hspa1a no soro de mulheres com pré-DG e DG foram, significativamente, maiores do que em mulheres com gestação saudável.

Em um estudo para se investigar os efeitos adversos para a saúde causados por nanopartículas de prata, em termos de citotoxicidade e estresse oxidativo, células A549 e HepG2 foram tratadas com tais nanopartículas por 48 h. Observou-se

diminuição da viabilidade celular, aumento na quantidade de MDA, bem como da expressão de Hspa1a e Hmox1 (84), corroborando os nossos resultados.

Martínez de Toda e De la Fuente (85), a respeito do papel da Hspa1a no envelhecimento e seu uso como biomarcador da vida útil, também evidenciaram que esta proteína atua no mecanismo de defesa celular, tendo sua expressão aumentada em condições relacionadas ao estresse. Além disso, a Hspa1a foi associada à proteção contra os efeitos nocivos do estresse oxidativo, bem como à modulação do estado inflamatório (85).

Considerando que a PG está envolvida no estresse de retículo endoplasmático e na resposta a proteínas mal enoveladas (62) e que a proteína Hspa1a é uma chaperona que medeia o enovelamento adequado de proteínas recém-traduzidas, além de levar a degradação de proteínas mal enoveladas (86), poder-se-ia sugerir que o estresse oxidativo causado pela PG poderia aumentar a expressão de Hspa1a, que é um das respostas possíveis para conter o dano oxidativo e evitar a morte celular.

Dentre os genes modulados pela PG, destaca-se também o que codifica para a proteína antioxidante Gpx6. Esse gene, pertencente à família das glutational peroxidases (Gpx), codifica enzimas de detoxificação de ERO (87), ou seja, enzimas antioxidantes que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água, proporcionando proteção contra danos oxidativos causados pelo excesso dessas espécies.

Holley *et al.* (88) observaram que pacientes com menor atividade de Gpx tendiam a ter níveis mais elevados de ERO no sangue, demonstrando correlação significativa entre Gpx e o estresse oxidativo. No contexto do DG, já se sabe que a enzima codificada pelo gene Gpx3 se manteve aumentada entre a 16^a. e 20^a. semana e entre a 32^a. e 36^a. semana de gestação em mulheres com DG, em comparação a gestantes saudáveis, possivelmente, para compensar a geração excessiva de ERO (89).

Nossos resultados mostraram que a PG foi capaz de aumentar a expressão da Gpx6 em, aproximadamente, cinco vezes, o que pode sugerir que essa enzima esteja envolvida na manutenção do estado redox tanto em um cenário no qual a PG esteja presente em concentrações fisiológicas da gestação, mas também em

concentrações mais elevadas, como aquelas encontradas em anticoncepcionais.

Outro gene estudado foi o que codifica para a proteína Duox1, isoforma pertencente à família das enzimas NADPH oxidase (NOX), conhecida por ser fonte produtora de superóxido (O_2) e H_2O_2 (46). Duox1 é caracterizado, portanto, como um gene pró-oxidante. A relação entre Duox1 e o DG ainda é pouco explorada, porém, já foi mostrado que o aumento da produção de ERO induzido por NOX está associado à retinopatia diabética. Além disso, já foi mostrado que tratamentos com antioxidantes, tais como as vitaminas E e C, reduziram a lesão vascular nessa condição (90).

A PG, em concentrações fisiológicas, foi capaz de aumentar a expressão do gene Duox1 em, aproximadamente, quatro vezes, muito embora sua expressão nas células seja relativamente baixa. Apesar de não terem sido realizados, ainda, experimentos para se investigar a relação exata entre a PG e Duox1, esses dados sugerem que o mecanismo de ação da PG poderia estar relacionado a esse gene. Já em concentrações elevadas do hormônio, não se verificou aumento da expressão deste gene.

O gene que codifica para a proteína Hmox1 também teve sua expressão aumentada pela PG, em quatro vezes, na concentração farmacológica de 100 μ M. Em concordância com nossos resultados, Pileggi *et al.* (91) mostraram que a expressão do gene Hmox1 foi, igualmente, regulada em ilhotas pancreáticas em condições de estresse e que a ação da proteína por ele codificada produz três compostos com efeitos citoprotetores.

Especificamente, já foi demonstrada estreita relação entre Hmox1 e o DG. A partir das concentrações séricas de Hmox1 no início de gestação, constatou-se que quanto maior o risco de desenvolver DG, menor é a sua concentração (13). Além disso, níveis elevados de glicose aumentaram a expressão e a atividade dessa proteína (92). O gene que codifica para Hmox1 também já foi relacionado, positivamente, com a concentração de MDA, um marcadores de estresse oxidativo, no estudo desenvolvido por Xin *et al.* (93).

Além de estar relacionada ao DG e ao estresse oxidativo, Hmox1 também foi associada à PG em um estudo sobre a contratilidade miometrial. Assim, o gene Hmox1 e a expressão da proteína codificada por ele foram, positivamente, regulados

pela PG, em explante de miométrio a termo fora do trabalho de parto (94).

Considerando que a PG causa a apoptose de células β pancreáticas por um mecanismo que depende da geração de ERO, o aumento da expressão de Hmox1 poderia constituir um mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo e reestabelecimento do estado redox.

Assim como as proteínas codificadas pelos genes Hspa1a, Duox1, Gpx6 e Hmox1, o gene Prdx4, pertencente à família das peroxirredoxinas (Prdx), codifica para uma proteína que atenua os efeitos do H_2O_2 , sendo importante agente na defesa antioxidante (95,96). Vários estudos vêm mostrando a importância das Prdx, identificando-as como possíveis moduladores das vias de sinalização intracelular relacionadas à apoptose e à proliferação (97). Nesse sentido, sua perda pode levar a distúrbios hematológicos e câncer, além de aumentar as chances de se desenvolver doenças associadas ao estresse oxidativo (97,99). Como consequência, a abolição da expressão de Prdx, normalmente, torna as células mais suscetíveis à morte celular induzida pelo estresse oxidativo, enquanto a sua superexpressão confere proteção às células (101), caracterizando esta família como antioxidantes importantes para a manutenção do estado redox.

Complementando esses dados, Mehmeti *et al.* (69) mostraram que o aumento da expressão de Prdx4 resulta no metabolismo eficiente de H_2O_2 , além de estimular a produção e secreção de insulina, revelando uma possível e importante relação com o DG. Ainda, já foi observado que os níveis plasmáticos de Prdx4 foram, significativamente, mais elevados em indivíduos portadores de DM2 em comparação aos não diabéticos (102).

Embora o gene Prdx4 não tenha sido, significativamente, modulado pela PG, nas condições estudadas, uma pesquisa realizada em 2012 mostrou que ratos tratados com estreptozotocina, droga usada em um modelo de indução de DM1, superexpressaram Prdx4 nas ilhotas pancreáticas, levando à proteção das células β contra os danos causados por estreptozotocina e atenuação do estresse oxidativo (103).

Em contrapartida, alguns estudos mostraram que as proteínas Prdx2, Prdx4 e Prdx5 são expressas em pequenas quantidades nas células, não sendo detectáveis por anticorpos, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho. Além disso,

a baixa expressão desse gene também poderia estar relacionada à suscetibilidade das células RINm5F ao estresse oxidativo (104).

O último gene estudado foi o Scd1, que codifica para uma proteína regulada, positivamente, na obesidade e na resistência à insulina (105,106), sendo sua atividade estimulada tanto por glicose quanto pela insulina (107).

O gene Scd1 codifica para uma enzima importante na biossíntese de gorduras monoinsaturadas, uma vez que introduz uma dupla ligação em seus substratos palmítico e ácido esteárico para gerar os produtos palmitoleico e ácido oleico, que são os ácidos graxos mais abundantes encontrados nos triacilglicerídeos ésteres de colesterol e fosfolipídios (108).

Estudo realizado por Ralston *et al.* (109) mostrou que Scd1 pode ter uma função importante para o efeito de ácidos graxos na inflamação dos adipócitos, uma vez que os produtos gerados pela ação da enzima codificada por esse gene regulam diferencialmente a inflamação do tecido adiposo alterando as vias de sinalização dos adipócitos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Embora pouco se conheça sobre a relação entre Scd1 e o DG, Ntambi e Miyazaki (110) reportaram que essa proteína participa no controle metabólico e sua inibição poderia ser favorável no tratamento do diabetes, da obesidade e em outras doenças metabólicas (111).

A PG aumentou em, aproximadamente, duas vezes a expressão do gene que codifica para a Scd1, o que poderia representar uma via potencial envolvida no mecanismo de ação da PG para o DG.

Adicionalmente, o efeito da PG nas células RINm5F foi estudado na presença das vitaminas E 40 μ M ou C 50 μ M, considerando-se os três genes mais bem expressos (Hmox1, Prdx4 e Scd1), ou seja, aqueles para os quais foi detectada maior quantidade de RNAm alvo nos experimentos de PCR quantitativo.

Harris *et al.* (112) mostraram que o tratamento com lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada também aumentou a expressão de Hmox1 em macrófagos; no entanto, esse aumento foi significativamente atenuado pelo pré-tratamento com vitamina C. Embora a apoptose induzida pela LDL oxidada tenha sido modestamente promovida pela vitamina C, ela aparentemente diminuiu os níveis de estresse oxidativo nos macrófagos, sugerindo que esse efeito pró-apoptótico não tenha sido mediado por um mecanismo pró-oxidante, mas, possivelmente, devido à proteção

intracelular.

Um estudo realizado por Reed *et al.* (113) mostrou que a suplementação com vitamina E protegeu os tubos proximais renais contra a ação de ERO por meio do aumento de Hmox1. O papel da vitamina E também foi investigado na espermatogênese em um modelo de hipertermia escrotal, o qual se relaciona também ao aumento de ERO. Nesse modelo, a atividade de Gpx, bem como a expressão de Hmox1 foram sugeridos como alvos de interesse terapêutico (114).

A expressão de Hmox1 também foi avaliada em camundongos privados de vitamina E ou suplementados com farelo de arroz, fonte dessa vitamina. Verificou-se que Hmox1 foi regulada, positivamente, no cérebro de camundongos com deficiência de vitamina E, enquanto que a suplementação com farelo de arroz inibiu o seu aumento (115).

No presente trabalho, foi verificado que este gene, na presença de vitamina E, teve sua expressão aumentada em, aproximadamente, duas vezes na incubação com PG 1,0 μ M. A vitamina C, por sua vez, promoveu aumento na expressão de Hmox1 em até 15 vezes, na incubação das células com PG 100 μ M por 24 h, sugerindo, possivelmente, que o uso desse antioxidante possa proteger a célula β pancreática contra o dano oxidativo por meio do aumento de Hmox1.

Embora poucos estudos tenham avaliado o efeito do uso de antioxidantes na expressão de Prdx4, já foi mostrado que proteínas da família peroxirredoxinas, como Prdx2, -3 e -6, tiveram sua expressão regulada, negativamente, quando linfócitos humanos foram expostos a H₂O₂, enquanto que este efeito foi revertido após o tratamento com vitamina E (116), corroborando os resultados aqui obtidos. Neste caso, na presença da vitamina E, as células tratadas com PG 0,1 μ M, por 6 h, apresentaram aumento na expressão de Prdx4 de, aproximadamente, três vezes, em comparação ao tratamento sem o antioxidante, o que poderia constituir um mecanismo adicional para o efeito protetor contra as ERO gerados pela PG.

No que diz respeito ao Scd1, já se sabe que a dieta é um fator que pode contribuir para a regulação da expressão desse gene. Um estudo mostrou que dietas ricas em carboidratos levaram ao aumento da expressão de Scd1 em ratos (117). Além da dieta, outros fatores como hormônios, temperatura, metais e vitamina A são capazes de agir sobre o padrão de expressão da proteína codificada por Scd1 (117).

A regulação e síntese da atividade de lipoproteínas lipases pode ser modulada por diferentes fatores nutricionais e hormonais, como a progesterona, que é capaz de aumentar a sua atividade (118). Marks *et al.* (119) observaram que a proteína Scd1 foi aumentada em ratos tratados com estradiol e progesterona, indicando que esses hormônios poderiam estar envolvidos com a biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados, mas a relação parece complexa e envolve elongase 6 e Scd1.

No presente trabalho, verificamos que, em células pré-incubadas com a vitamina E, houve redução da expressão de Scd1 para todas as concentrações de PG testadas, na incubação por 24 h. Vale à pena ressaltar que na incubação com PG 100 μ M, a sua expressão foi praticamente suprimida, sugerindo que a vitamina E seja capaz de proteger a célula produtora de insulina contra o estresse oxidativo causado pela PG, lembrando que este hormônio, sozinho, aumentou a expressão de Scd1. A vitamina C apresentou comportamento similar ao da vitamina E no que se refere à expressão de Scd1.

Uma etapa importante desse trabalho foi verificar se a expressão dos genes estudados era acompanhada pela presença das proteínas nas células, o que garantiria o seu efeito e contribuição para o balanço redox no ambiente celular. Nesse sentido, foi determinada a concentração de Hmox1 e Prdx4 por ELISA, uma técnica bastante sensível que permite a detecção dessas proteínas em nível de pg.

A PG na concentração final de 100 μ M, na ausência dos antioxidantes, promoveu aumento na quantidade de Hmox1, na incubação por 6 ou 24 h, o que foi também observado no nível do RNAm que codifica para essa proteína. Contudo, na presença da vitamina E, houve redução da quantidade da proteína Hmox1 nas células incubadas com PG 100 μ M, o que seria, aparentemente, discordante dos resultados sobre expressão gênica. Nesse sentido, é preciso considerar que o aumento promovido pela vitamina E na expressão do RNAm que codifica para Hmox1 nas primeiras 24 h, poderia não ter sido ainda detectado, em termos de proteína, no mesmo período, o que seria plenamente aceitável. Para responder a essa pergunta, uma alternativa seria avaliar a quantidade de proteína Hmox1 algumas horas depois do período de incubação de 24 h, tempo em que o aumento do RNAm de Hmox1 foi verificado. Além disso, esses dados podem indicar a existência de algum mecanismo pós-traducional capaz de diminuir essas proteínas

no nível citoplasmático.

De forma similar, foi mostrado que o uso de um derivado sintético de vitamina E, por 24 h, aumentou a expressão de Hmox1 em células epiteliais de pulmão humano da linhagem A549 (120). Outro estudo realizado para se investigar o processo de cicatrização de feridas, uma das principais complicações diabéticas, analisou o efeito da suplementação com γ -tocoferol no mecanismo associado à inflamação, estresse oxidativo e apoptose durante a cicatrização cutânea precoce em camundongos diabéticos. Os autores verificaram que a suplementação com este antioxidante reduziu a concentração de glicose sanguínea, acelerou a taxa de fechamento da ferida por regulação de proteínas relacionadas a resposta inflamatória, bem como aumentou os níveis das proteínas SOD, Gpx e Hmox1 (121).

Em relação à presença de Prdx4 nas células, embora o gene que codifica para essa proteína não tenha sido, significativamente, modulado pela PG, foi observado aumento dessa proteína após incubação, por 6 h, com o hormônio em todas as concentrações.

O aumento de Prdx4 também já foi observado em pacientes em estado pré-diabético (122), confirmando o papel da Prdx4 como parte de um sistema antioxidante endógeno. Karihtala, *et al.* (123) também demonstraram que a superexpressão desse gene foi associada a casos de câncer de mama, cujas células são positivas para receptores de PG, evidenciando que o aumento de Prdx4 poderia constituir um mecanismo de proteção contra a ação de ERO.

Também verificamos que a quantidade de Prdx4 foi, significativamente, maior na incubação das células com PG 100 μ M, por 24 h, na presença de vitamina E, sugerindo que o dano oxidativo causado pela PG em uma concentração farmacológica poderia ser atenuado pelo aumento da expressão de uma proteína com propriedades antioxidantes. O aumento de dessa proteína também foi encontrado em células HepG2 após incubação com γ -tocotrienol 70 μ M, um tipo de vitamina E (124).

Em relação ao efeito da vitamina C na expressão de Prdx4 nas células incubadas com PG, foi verificado que o aumento da expressão desse gene não resultou no aumento concomitante da proteína, sugerindo que a quantidade de Prdx4 deva ser avaliada em momento subsequente ao período de incubação de 24 h

ou, ainda, que outros mecanismos pós-traducionais participariam na regulação do efeito da vitamina C sobre a expressão da Prdx4.

Em síntese, mostramos que a PG pode regular a expressão de vários genes relacionados ao estresse oxidativo e defesa antioxidante na célula β pancreática, que podem estar relacionados, direta ou indiretamente, ao desenvolvimento do DG. Destacam-se os genes Hmox1 e Prdx4, cujas propriedades antioxidantes poderiam estar relacionadas à proteção das células contra o dano oxidativo causado pela PG. Já o aumento da expressão de genes que codificam para proteínas com características pró-oxidantes como Scd1 poderia se relacionar ao mecanismo de ação da PG, no contexto do DG, algo ainda a ser investigado. Interessantemente, a expressão desse gene foi, praticamente, abolida na presença da vitamina E.

Também mostramos que as vitaminas E e C, facilmente obtidas por meio da dieta, participam regulação da expressão desses genes, ora aumentando a expressão de genes antioxidantes, ora diminuindo a expressão de genes pró-oxidantes, o que pode constituir um mecanismo de defesa celular eficiente contra o dano oxidativo.

Embora preliminares, esses resultados nos permitem acessar vários aspectos inéditos sobre a fisiologia da célula β pancreática, além de contribuir para melhor entendimento do mecanismo molecular envolvido na ação da PG, e sua potencial relação com o DG, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento da doença, fundamentadas no restabelecimento do estado redox do organismo materno e uso da terapia com antioxidantes.

6. CONCLUSÃO

A PG alterou a expressão de genes que estão envolvidos no estresse oxidativo e defesa antioxidante, e estão relacionados à fisiologia da célula β pancreática, fortalecendo as evidências de que este hormônio atua por um mecanismo molecular que envolve o estado redox.

Os antioxidantes dietéticos (vitaminas E e C) atenuaram a morte das células β pancreáticas induzida pela PG, o que está de acordo com o mecanismo de ação desse hormônio nesse modelo. Esses antioxidantes também modificaram a resposta das células frente a ação da PG, em relação à expressão de genes envolvidos no

estresse oxidativo e defesa antioxidante das células.

A modificação da expressão gênica e da quantidade das proteínas Hmox1 e Prdx4 nas células incubadas com PG, na presença das vitaminas E e C, poderia sugerir que a ingestão de antioxidantes como parte integrante da dieta de gestantes desempenharia um efeito protetor contra o estresse oxidativo. Tais resultados, embora incipientes, permitem ampliar a compreensão do que se sabe sobre a patogênese do DG, além de estimular o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento fundamentadas no uso de antioxidantes na dieta.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Investigar e quantificar os marcadores de estresse oxidativo e defesa antioxidante, como SOD, CAT, Gpx e MDA, bem como as proteínas codificadas pelos genes estudados, Hspa1a, Duox1, Gpx6 e Scd1.

Quantificar esses marcadores no sangue de gestantes com e sem diagnóstico de DG, a fim de se estabelecer uma relação entre a concentração plasmática de PG, o estado redox da gestante e o desenvolvimento do DG.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados desse trabalho estão sendo organizados na elaboração do artigo intitulado “Effect of progesterone on the expression of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in pancreatic beta cells: an in vitro approach to the study of gestational diabetes” para submissão no periódico Journal of Endocrinology.

REFERÊNCIAS

1. Sorenson RL, Parsons JA. Insulin secretion in mammosomatotropic tumor-bearing and pregnant rats. A role for lactogens. *Diabetes* [Internet]. 1985 Apr;34(4):337–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2857670>
2. Sheridan JD, Anaya PA, Parsons JA, Sorenson RL. Increased dye coupling in pancreatic islets from rats in late-term pregnancy. *Diabetes* [Internet]. 1988 Jul;37(7):908–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3290008>
3. Green IC, Perrin D, Howell SL. Insulin release in isolated islets of Langerhans of pregnant rats. Relationship between glucose metabolism and cyclic AMP. *Horm Metab Res* [Internet]. 1978 Jan;10(1):32–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/204563>
4. Vrachnis N, Belitsos P, Sifakis S, Dafopoulos K, Siristatidis C, Pappa KI, et al. Role of Adipokines and Other Inflammatory Mediators in Gestational Diabetes Mellitus and Previous Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2012;2012:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ije/2012/549748/>
5. Demcollari TI, Cujba A-M, Sancho R. Phenotypic plasticity in the pancreas: new triggers, new players. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2017 Dec 8;49:38–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29227863>
6. Shaat N, Ekelund M, Lernmark A, Ivarsson S, Almgren P, Berntorp K, et al. Association of the E23K polymorphism in the KCNJ11 gene with gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* [Internet]. 2005 Dec;48(12):2544–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16320083>
7. American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2000 Jan;23 Suppl 1:S77-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12017686>
8. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* [Internet]. 1998 Jul;15(7):539–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9686693>
9. Schmidt MI, Reichelt AJ. Consenso sobre diabetes gestacional e diabetes pré-gestacional. *Arq Bras Endocrinol Metabol* [Internet]. 1999 Feb;43(1):14–20. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27301999000100005&lng=pt&tlng=pt
10. Metabologia SB de E e. Diabetes mellitus gestacional. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2008 Dec;54(6). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302008000600006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
11. Gueuvoghlian-Silva BY, Torloni MR, Mattar R, de Oliveira LS, Scomparini FB, Nakamura MU, et al. Profile of inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus: phenotype and genotype. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2012 Mar;67(3):241–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22070425>
12. Fernández-Morera JL, Rodríguez-Rodero S, Menéndez-Torre E, Fraga MF. The possible role of epigenetics in gestational diabetes: cause, consequence, or both. *Obstet Gynecol Int* [Internet]. 2010;2010:605163. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21052542>
13. Qiu C, Hevner K, Enquobahrie DA, Williams MA. Maternal Serum Heme-Oxygenase-1 (HO-1) Concentrations in Early Pregnancy and Subsequent Risk of Gestational Diabetes Mellitus. Zencussen AC, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Nov 6;7(11):e48060. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0048060>
14. Diabetes SB de. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016) [Internet]. 2016. Available from: <http://www.diabetes.org.br/profissionais/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>
15. Da Saúde, Organização Pan-Americana, Da Saúde M. Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil [Internet]. Vol. 1, Sociedade Brasileira de Diabetes.

2017. 1-36 p. Available from: <http://www.diabetes.org.br/profissionais/images/pdf/diabetes-gestacional-relatorio.pdf>
16. Ministério da Saúde. *Gestação de Alto Risco - Manual Técnico* [Internet]. 2012. p. 301. Available from: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/gestacao_alto_risco.pdf
 17. Gabbe SG, Quilligan EJ. General obstetric management of the diabetic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* [Internet]. 1981 Mar;24(1):91–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7011642>
 18. Damm P, Mølsted-Pedersen L. Significant decrease in congenital malformations in newborn infants of an unselected population of diabetic women. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1989 Nov;161(5):1163–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2686445>
 19. Rosenn B, Miodovnik M, Combs CA, Khoury J, Siddiqi TA. Pre-conception management of insulin-dependent diabetes: improvement of pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* [Internet]. 1991 Jun;77(6):846–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2030855>
 20. Jovanovic-Peterson L, Peterson CM, Reed GF, Metzger BE, Mills JL, Knopp RH, et al. Maternal postprandial glucose levels and infant birth weight: the Diabetes in Early Pregnancy Study. The National Institute of Child Health and Human Development--Diabetes in Early Pregnancy Study. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;164(1 Pt 1):103–11.
 21. Daher S, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY, Moron AF, Mattar R. Inflammatory mediator gene polymorphisms and gestational diabetes: a review of the literature. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2011 Jun;90(1):111–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684013>
 22. Kaaja R, Rönnemaa T. Gestational diabetes: pathogenesis and consequences to mother and offspring. *Rev Diabet Stud* [Internet]. 2008;5(4):194–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19290380>
 23. Colomiere M, Permezel M, Riley C, Desoye G, Lappas M. Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2009 Apr;160(4):567–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19179458>
 24. Hviid TVF. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* [Internet]. 12(3):209–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280356>
 25. Oztekin O. New insights into the pathophysiology of gestational diabetes mellitus: possible role of human leukocyte antigen-G. *Med Hypotheses* [Internet]. 2007;69(3):526–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17374556>
 26. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* [Internet]. 2005 Mar;115(3):485–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15765129>
 27. Lauenborg J, Grarup N, Damm P, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Pedersen O, et al. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2009 Jan;94(1):145–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18984664>
 28. Enquobahrie DA, Williams MA, Qiu C, Muhie SY, Slentz-Kesler K, Ge Z, et al. Early pregnancy peripheral blood gene expression and risk of preterm delivery: a nested case control study. *BMC Pregnancy Childbirth* [Internet]. 2009 Dec 10;9(1):56. Available from: <http://bmcpregnancychildbirth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2393-9-56>
 29. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 1997. 1014 p.
 30. Reyes MR, Sifuentes-Alvarez A, Lazalde B. Estrogens are potentially the only steroids with an antioxidant role in pregnancy: in vitro evidence. *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet]. 2006;85(9):1090–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16929413>
 31. Rezende J. *Obstetricia Fundamental*. 10 ed. 2006. 95-96 p.
 32. Silverthorn DU. *Human physiology an integrated approach* [Internet]. Regulation. 2010. 516-520 p. Available from: http://www.amazon.com/Human-Physiology-Integrated-Approach-IP-10/dp/0321559398/ref=sr_1_1?ie=UTF8&qid=1324003257&sr=8-1

33. Costa Batista D, Lucia Chiara V, Angela Gugelmin S, Dias Martins P. Atividade física e gestação: saúde da gestante não atleta e crescimento fetal Physical activity and pregnancy: non-athletic pregnantwomes health and fetal growth. *Rev Bras Saúde Matern Infant*, Recife. 2003;3(2):151–8.
34. Vigo F, Lubianca JN, Corleta H von E. Progestágenos: farmacologia e uso clínico. *Femina*, vol 39. 2011;127–37.
35. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2000 May;71(5 Suppl):1256S–61S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799399>
36. Magon N, Kumar P. Hormones in pregnancy. *Niger Med J* [Internet]. 2012;53(4):179. Available from: <http://www.nigeriamedj.com/text.asp?2012/53/4/179/107549>
37. Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, et al. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Jun 13;103(24):9232–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16754860>
38. Picard F, Wanatabe M, Schoonjans K, Lydon J, O'Malley BW, Auwerx J. Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 Nov 26;99(24):15644–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438645>
39. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* [Internet]. 2002 Oct;25(10):1862–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351492>
40. Rebarber A, Istwan NB, Russo-Stieglitz K, Cleary-Goldman J, Rhea DJ, Stanziano GJ, et al. Increased incidence of gestational diabetes in women receiving prophylactic 17alpha-hydroxyprogesterone caproate for prevention of recurrent preterm delivery. *Diabetes Care* [Internet]. 2007 Sep;30(9):2277–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17563346>
41. Xiang AH, Kawakubo M, Kjos SL, Buchanan TA. Long-acting injectable progestin contraception and risk of type 2 diabetes in Latino women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2006 Mar;29(3):613–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505515>
42. Verma Y, Rana SVS. Effects of progesterone on benzene toxicity in rats. *Arh Hig Rada Toksikol* [Internet]. 2008 Mar;59(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18407866>
43. Cheng X, Shimizu I, Yuan Y, Wei M, Shen M, Huang H, et al. Effects of estradiol and progesterone on tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human hepatoma HuH-7 cells. *Life Sci* [Internet]. 2006 Oct 19;79(21):1988–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16860828>
44. Fedotcheva TA, Kruglov AG, Teplova V V, Fedotcheva NI, Rzhiznikov VM, Shimanovskii NL. [Effect of steroid hormones on production of reactive oxygen species in mitochondria]. *Biofizika* [Internet]. 57(6):1014–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23272582>
45. Coughlan MT, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE. Repression of oxidant-induced nuclear factor-kappaB activity mediates placental cytokine responses in gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2004 Jul;89(7):3585–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240650>
46. Martelli F, Nunes FMF. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Cienc Cult* [Internet]. 2014 Sep;66(3):54–7. Available from: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252014000300017&lng=pt&tlng=pt
47. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JB de F, Manfredini V, Benfato M da S, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova* [Internet]. 2007 Oct;30(5):1323–38. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

40422007000500046&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

48. Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev Bras Reprod Anim*. 2010;34(2):79–85.
49. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4 ed. Oxford University Press; 2007.
50. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metabol* [Internet]. 2008 Oct;52(7):1096–105. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302008000700005&lng=pt&tlng=pt
51. Leite H, Sarni R. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. *Rev Bras Nutr Clin*. 2003;18(2):87–94.
52. Barbosa LF, Medeiros MHG de, Augusto O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quim Nova* [Internet]. 2006 Dec;29(6):1352–60. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000600034&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
53. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol* [Internet]. 2003;17(1):24–38. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbt.10058>
54. Román-Pintos LM, Villegas-Rivera G, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG. Diabetic Polyneuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. *J Diabetes Res* [Internet]. 2016;2016:1–16. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2016/3425617/>
55. Lappas M, Permezel M, Rice GE. Release of Proinflammatory Cytokines and 8-Isoprostane from Placenta, Adipose Tissue, and Skeletal Muscle from Normal Pregnant Women and Women with Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2004 Nov;89(11):5627–33. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2003-032097>
56. Pereira B. RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO E SUA IMPORTÂNCIA PARA A FUNCIONALIDADE IMUNOLÓGICA. *Motriz*. 1996;2.
57. Tureck, C.; Gesser Correa, V.G.; Peralta, R. M.; Koehnlein E. Estimativa do consumo de vitaminas e minerais antioxidantes da dieta brasileira. *Nutr clínica y Dietética Hosp*. 2013;33(3):30–8.
58. Peuchant E, Brun J-L, Rigalleau V, Dubourg L, Thomas M-J, Daniel J-Y, et al. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* [Internet]. 2004 Apr;37(4):293–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003731>
59. Petersen KE, Lykkesfeldt J, Raun K, Rakipovski G. Brief Communication: Plasma lipid oxidation predicts atherosclerotic status better than cholesterol in diabetic apolipoprotein E deficient mice. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2017 Jan;242(1):88–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28044466>
60. Ho E, Bray TM. Antioxidants, NFkappaB activation, and diabetogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* [Internet]. 1999 Dec;222(3):205–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601879>
61. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* [Internet]. 1997 Nov;46(11):1733–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9356019>
62. Nunes VA, Portioli-Sanches EP, Rosim MP, Araujo MS, Praxedes-Garcia P, Valle MMR, et al. Progesterone induces apoptosis of insulin-secreting cells: insights into the molecular mechanism. *J Endocrinol* [Internet]. 2014 May;221(2):273–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24594616>

63. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1974 Sep;53(3):661–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4412247>
64. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma 2. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1973 Nov;51(5):1409–16. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/51.5.1409>
65. García A, Morales P, Arranz N, Delgado ME, Rafter J, Haza AI. Antiapoptotic effects of dietary antioxidants towards N -nitrosopiperidine and N -nitrosodibutylamine-induced apoptosis in HL-60 and HepG2 cells. *J Appl Toxicol* [Internet]. 2009 Jul;29(5):403–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.1426>
66. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2012 Aug;40(15):e115–e115. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gks596>
67. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 May 7;72:248–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
68. Dodd JM, Flenady VJ, Cincotta R, Crowther CA. Progesterone for the prevention of preterm birth: a systematic review. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2008 Jul;112(1):127–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591318>
69. Mehmeti I, Lortz S, Elsner M, Lenzen S. Peroxiredoxin 4 Improves Insulin Biosynthesis and Glucose-induced Insulin Secretion in Insulin-secreting INS-1E Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 Sep 26;289(39):26904–13. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.568329>
70. Sugaya A, Sugiyama T, Yanase S, Shen X-X, Minoura H, Toyoda N. Expression of glucose transporter 4 mRNA in adipose tissue- and skeletal muscle of ovariectomized rats treated with sex steroid hormones. *Life Sci* [Internet]. 2000 Jan;66(7):641–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320599006360>
71. Candolfi M, Jaita G, Zaldivar V, Zárate S, Ferrari L, Pisera D, et al. Progesterone Antagonizes the Permissive Action of Estradiol on Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis of Anterior Pituitary Cells. *Endocrinology* [Internet]. 2005 Feb;146(2):736–43. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2004-1276>
72. Yuan Y, Shimizu I, Shen M, Aoyagi E, Takenaka H, Itagaki T, et al. Effects of estradiol and progesterone on the proinflammatory cytokine production by mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2008;14(14):2200. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v14/i14/2200.htm>
73. Ngala RA, Fondjo LA, Gmagna P, Ghartey FN, Awe MA. Placental peptides metabolism and maternal factors as predictors of risk of gestational diabetes in pregnant women. A case-control study. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(7):e0181613. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28732072>
74. Wassmann K, Wassmann S, Nickenig G. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res* [Internet]. 2005 Nov 11;97(10):1046–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16195479>
75. Scarpin K. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl Recept Signal* [Internet]. 2009; Available from: <https://www.nursa.org/NRS/nrs07009.pdf>
76. Krause M, Rodrigues-Krause J da C. Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: Possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment. *Med Hypotheses* [Internet]. 2011 Feb;76(2):286–90. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030698771000438X>
77. Bellmann K, Jäättelä M, Wissing D, Burkart V, Kolb H. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett* [Internet]. 1996 Aug 5;391(1–2):185–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8706913>
78. Burkart V, Liu H, Bellmann K, Wissing D, Jäättelä M, Cavallo MG, et al. Natural resistance of

- human beta cells toward nitric oxide is mediated by heat shock protein 70. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Jun 30;275(26):19521–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751413>
79. Morteza A, Nakhjavani M, Larry M, Nargesi AA, Esteghamati A. Heat shock protein 70 and albuminuria in patients with type 2 diabetes: a matched case control study. *Cell Stress Chaperones* [Internet]. 2013 Nov;18(6):815–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681922>
 80. Nakhjavani M, Morteza A, Khajeali L, Esteghamati A, Khalilzadeh O, Asgarani F, et al. Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. *Cell Stress Chaperones* [Internet]. 2010 Nov 23;15(6):959–64. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12192-010-0204-z>
 81. Oglesbee MJ, Herdman A V., Passmore GG, Hoffman WH. Diabetic ketoacidosis increases extracellular levels of the major inducible 70-kDa heat shock protein. *Clin Biochem*. 2005;38(10):900–4.
 82. Yabunaka N, Ohtsuka Y, Watanabe I, Noro H, Fujisawa H, Agishi Y. Elevated levels of heat-shock protein 70 (HSP70) in the mononuclear cells of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 1995 Nov;30(2):143–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8833636>
 83. Garamvölgyi Z, Prohászka Z, Rigó J, Kecskeméti A, Molvarec A. Increased circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) levels in gestational diabetes mellitus: a pilot study. *Cell Stress Chaperones* [Internet]. 2015 Jul;20(4):575–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25720752>
 84. Xin L, Wang J, Fan G, Che B, Wu Y, Guo S, et al. Oxidative stress and mitochondrial injury-mediated cytotoxicity induced by silver nanoparticles in human A549 and HepG2 cells. *Environ Toxicol*. 2016;31(12):1691–9.
 85. Martínez de Toda I, De la Fuente M. The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan. *Biogerontology* [Internet]. 2015 Dec;16(6):709–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26386684>
 86. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2005 Mar;62(6):670–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15770419>
 87. Endres L, Begley U, Clark R, Gu C, Dziergowska A, Małkiewicz A, et al. Alkbh8 Regulates Selenocysteine-Protein Expression to Protect against Reactive Oxygen Species Damage. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(7):e0131335. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26147969>
 88. Holley AS, Miller JH, Larsen PD, Harding SA. Relationship between Glutathione Peroxidase, Platelet Reactivity, and Reactive Oxygen Species in an Acute Coronary Syndrome Population. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 2016 Dec;46(6):639–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27993878>
 89. Li H, Yin Q, Li N, Ouyang Z, Zhong M. Plasma Markers of Oxidative Stress in Patients with Gestational Diabetes Mellitus in the Second and Third Trimester. *Obstet Gynecol Int* [Internet]. 2016;2016:3865454. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27803713>
 90. Wilkinson-Berka JL, Rana I, Armani R, Agrotis A. Reactive oxygen species, Nox and angiotensin II in angiogenesis: implications for retinopathy. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2013 May;124(10):597–615. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23379642>
 91. Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattani P, Vizzardelli C, Oliver R, et al. Heme Oxygenase-1 Induction in Islet Cells Results in Protection From Apoptosis and Improved In Vivo Function After Transplantation. *Diabetes* [Internet]. 2001 Sep 1;50(9):1983–91. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diabetes.50.9.1983>
 92. Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. *Diabetes* [Internet]. 2003 Sep;52(9):2338–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941774>

93. Xin G, DU J, Wang Y-T, Liang T-T. Effect of oxidative stress on heme oxygenase-1 expression in patients with gestational diabetes mellitus. *Exp Ther Med* [Internet]. 2014 Feb;7(2):478–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24396429>
94. Acevedo CH, Ahmed A. Hemeoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesterone during pregnancy. *J Clin Invest* [Internet]. 1998 Mar 1;101(5):949–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486963>
95. Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2005 Jun;38(12):1543–52. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584905000985>
96. Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2003 Jan;28(1):32–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517450>
97. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* [Internet]. 2007 Feb;115(2):81–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295675>
98. Lee T-H, Kim S-U, Yu S-L, Kim SH, Park DS, Moon H-B, et al. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* [Internet]. 2003 Jun 15;101(12):5033–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586629>
99. Li L, Shoji W, Takano H, Nishimura N, Aoki Y, Takahashi R, et al. Increased susceptibility of MER5 (peroxiredoxin III) knockout mice to LPS-induced oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2007 Apr 13;355(3):715–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17316558>
100. Neumann CA, Krause DS, Carman C V, Das S, Dubey DP, Abraham JL, et al. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* [Internet]. 2003 Jul 31;424(6948):561–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12891360>
101. Hampton MB, O 'connor KM. Peroxiredoxins and the Regulation of Cell Death. *Mol Cells* [Internet]. 2016 Jan 31;39(1):72–6. Available from: <http://www.molcells.org/journal/view.html?doi=10.14348/molcells.2016.2351>
102. Al-Masri AA, El Eter E, Tayel S, Zamil H. Differential associations of circulating peroxiredoxins levels with indicators of glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2014;18(5):710–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24668713>
103. Yamada S, Ding Y, Sasaguri Y. Peroxiredoxin 4: critical roles in inflammatory diseases. *J UOEH* [Internet]. 2012 Mar 1;34(1):27–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22428456>
104. Paula FMM, Ferreira SM, Boschero AC, Souza KLA. Modulation of the peroxiredoxin system by cytokines in insulin-producing RINm5F cells: Down-regulation of PRDX6 increases susceptibility of beta cells to oxidative stress. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2013 Jul;374(1–2):56–64. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720713001548>
105. Sjögren P, Sierra-Johnson J, Gertow K, Rosell M, Vessby B, de Faire U, et al. Fatty acid desaturases in human adipose tissue: relationships between gene expression, desaturation indexes and insulin resistance. *Diabetologia* [Internet]. 2008 Feb;51(2):328–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18030445>
106. Gutiérrez-Juárez R, Pocai A, Mulas C, Ono H, Bhanot S, Monia BP, et al. Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* [Internet]. 2006 Jun;116(6):1686–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16741579>
107. Prasad MR, Joshi VC. Regulation of rat hepatic stearoyl coenzyme A desaturase. The roles of insulin and carbohydrate. *J Biol Chem* [Internet]. 1979 Feb 25;254(4):997–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33188>
108. Rabelo ACS, Costa DCC, Lima WG. Baccharis trimera protege contra a hepatotoxicidade

- induzida pelo etanol em células HepG2 e em ratos. Universidade Federal de Ouro Preto; 2017.
109. Ralston JC, Metherel AH, Stark KD, Mutch DM. SCD1 mediates the influence of exogenous saturated and monounsaturated fatty acids in adipocytes: Effects on cellular stress, inflammatory markers and fatty acid elongation. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2016 Jan;27:241–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26481476>
 110. Ntambi JM, Miyazaki M. Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1. *Curr Opin Lipidol* [Internet]. 2003 Jun;14(3):255–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12840656>
 111. Yokoyama S, Hosoi T, Ozawa K. Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) is a key factor mediating diabetes in MyD88-deficient mice. *Gene* [Internet]. 2012 Apr 15;497(2):340–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22326531>
 112. Harris LK, Mann GE, Ruiz E, Mushtaq S, Leake DS. Ascorbate does not protect macrophages against apoptosis induced by oxidised low density lipoprotein. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2006 Nov 1;455(1):68–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049479>
 113. Reed DK, Hall S, Arany I. α -Tocopherol protects renal cells from nicotine- or oleic acid-provoked oxidative stress via inducing heme oxygenase-1. *J Physiol Biochem* [Internet]. 2015 Mar;71(1):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25471815>
 114. Kaur S, Bansal MP. Protective role of dietary-supplemented selenium and vitamin E in heat-induced apoptosis and oxidative stress in mice testes. *Andrologia* [Internet]. 2015 Dec;47(10):1109–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25521483>
 115. Takahashi T, Nakaso K, Horikoshi Y, Hanaki T, Yamakawa M, Nakasone M, et al. Rice Bran Dietary Supplementation Improves Neurological Symptoms and Loss of Purkinje Cells in Vitamin E-Deficient Mice. *Yonago Acta Med* [Internet]. 2016 Sep;59(3):188–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27708533>
 116. Dahlan HM, Karsani SA, Rahman MA, Hamid NAA, Top AGM, Ngah WZW. Proteomic analysis reveals that treatment with tocotrienols reverses the effect of H₂ O₂ exposure on peroxiredoxin expression in human lymphocytes from young and old individuals. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2012 Jul;23(7):741–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840697>
 117. Oliveira AM de. Influência da temperatura ambiental e dos cenários climáticos futuros sobre o metabolismo dos ácidos graxos e desempenho zootécnico do tambaqui (*Colossoma macropomum*) [Internet]. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA; 2014. Available from: http://bdt.inpa.gov.br/bitstream/tede/1542/2/Tese_AlziraMirandaOliveira.pdf
 118. De Pergola G. The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. *Int J Obes Relat Metab Disord* [Internet]. 2000 Jun;24 Suppl 2:S59–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10997611>
 119. Marks KA, Kitson AP, Shaw B, Mutch DM, Stark KD. Stearoyl-CoA desaturase 1, elongase 6 and their fatty acid products and precursors are altered in ovariectomized rats with 17 β -estradiol and progesterone treatment. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* [Internet]. 2013 Aug;89(2–3):89–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23777599>
 120. Kim J, Shin S-H, Ko Y-E, Miki T, Bae H-M, Kang J-K, et al. HX-1171, a Novel Nrf2 Activator, Induces NQO1 and HMOX1 Expression. *J Cell Biochem* [Internet]. 2017 Oct;118(10):3372–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28300285>
 121. Shin J, Yang SJ, Lim Y. Gamma-tocopherol supplementation ameliorated hyper-inflammatory response during the early cutaneous wound healing in alloxan-induced diabetic mice. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2017;242(5):505–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28211759>
 122. Gateva A, Assyov Y, Velikova T, Kamenov Z. Increased peroxiredoxin 4 levels in patients with prediabetes compared to normal glucose tolerance subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2016 Oct;85(4):551–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27303935>
 123. Karihtala P, Kauppila S, Soini Y, Arja-Jukkola-Vuorinen. Oxidative stress and counteracting mechanisms in hormone receptor positive, triple-negative and basal-like breast carcinomas. *BMC Cancer* [Internet]. 2011 Jun 21;11:262. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693047>
124. Abdul Rahman Sazli F, Jubri Z, Abdul Rahman M, Karsani SA, Md Top AG, Wan Ngah WZ. Gamma-tocotrienol treatment increased peroxiredoxin-4 expression in HepG2 liver cancer cell line. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2015 Mar 13;15:64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25886747>
 125. Miranda P, Reis R. Diabetes mellitus gestacional. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2008 Dec;54(6). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302008000600006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 126. The HAPO Study Cooperative Research. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *N Engl J Med* [Internet]. 2008;358(19):1991–2002. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0707943>
 127. IDF. IDF Diabetes Atlas 7th edition. <http://www.diabetesatlas.org/>. 2015. p. 144.
 128. Menicatti M, Prado CE, Fregonesi T. Diabetes gestacional: aspectos fisiopatológicos e tratamento. *Arq Ciênc Saúde Unipar*. 2006;10(2):105–11.
 129. Nogueira AI. Diabetes Gestacional: perfil e evolução de um grupo de pacientes do Hospital das Clínicas da UFMG. *Rev Med Minas Gerais*. 2001;32–41.
 130. Brănișteanu DD, Mathieu C. Progesterone in gestational diabetes mellitus: guilty or not guilty? *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2003 Mar;14(2):54–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591170>
 131. Geisler JG, Zawulich W, Zawulich K, Lakey JRT, Stukenbrok H, Milici AJ, et al. Estrogen can prevent or reverse obesity and diabetes in mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Diabetes* [Internet]. 2002 Jul;51(7):2158–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086946>
 132. Louie MC, Seigny MB. Steroid hormone receptors as prognostic markers in breast cancer. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2017;7(8):1617–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28861319>
 133. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* [Internet]. 1990 May;9(5):1603–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2328727>
 134. Arnett-Mansfield RL, DeFazio A, Wain G V, Jaworski RC, Byth K, Mote PA, et al. Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium. *Cancer Res* [Internet]. 2001 Jun 1;61(11):4576–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11389093>
 135. Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* [Internet]. 1997 Aug;18(4):502–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9267762>
 136. Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2000 Feb;98(2):217–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657279>
 137. Graham JD, Clarke CL. Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer: Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2002 Oct 1;4(5):187. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr450>
 138. Ozawa H. Steroid Hormones, their receptors and neuroendocrine system. *J Nihon Med Sch = Nihon Ika Daigaku zasshi*. 2005;72(6):316–25.
 139. Tincello DG, Taylor AH, Spurling SM, Bell SC. Receptor Isoforms That Mediate Estrogen and Progestagen Action in the Female Lower Urinary Tract. *J Urol*. 2009;181(3):1474–82.
 140. Han SJ, O'Malley BW, DeMayo FJ. An estrogen receptor alpha activity indicator model in mice. *genesis* [Internet]. 2009;NA-NA. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dvg.20572>
 141. Straub SG, Sharp GWG, Meglasson MD, De Souza CJ. Progesterone inhibits insulin secretion by a membrane delimited, non-genomic action. *Biosci Rep*. 2001;21(5):653–66.

142. Speroff L, Glass R, Kase N. Hormone biosynthesis, metabolism, and mechanism of action. In: Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 3 ed. Baltimore: William and Wilkins; 1982. p. 1–41.
143. Spencer TE, Bazer FW. Conceptus signals for establishing and maintenance of pregnancy. Vol. 2, Reproductive Biology and Endocrinology. 2004.
144. Ohta Y, Sato T, Iguchi T. Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the reproductive tract of adult female rats. Biol Reprod [Internet]. 1993;48(1):205–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8418909>
145. Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. Reproduction. 2001;122(6):965–79.
146. Bryś M, Szyłło K, Romanowicz-Makowska H, Dobrowolski Z, Masłowska I, Krajewska W. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol. Sao Paulo Med J [Internet]. 2009;127(3):128–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820872>
147. Mourot B, Nguyen T, Fostier A, Bobe J. Two unrelated putative membrane-bound progesterin receptors, progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and membrane progesterin receptor (mPR) beta, are expressed in the rainbow trout oocyte and exhibit similar ovarian expression patterns. Reprod Biol Endocrinol. 2006;4.
148. Pasanen S, Ylikomi T, Syväälä H, Tuohimaa P. Distribution of progesterone receptor in chicken: Novel target organs for progesterone and estrogen action. Mol Cell Endocrinol. 1997;135(1):79–91.
149. Guo M, Zhang C, Wang Y, Feng L, Wang Z, Niu W, et al. Progesterone Receptor Membrane Component 1 Mediates Progesterone-Induced Suppression of Oocyte Meiotic Prophase I and Primordial Folliculogenesis. Sci Rep [Internet]. 2016 Dec 16;6(1):36869. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep36869>
150. Wang R, Sheehan PM, Brennecke SP. Changes in myometrial expression of progesterone receptor membrane components 1 and 2 are associated with human parturition at term. Reprod Fertil Dev. 2016;28(5):618–27.
151. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods. 1991;139(2):271–9.
152. Teilmann SC, Clement CA, Thorup J, Byskov AG, Christensen ST. Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. J Endocrinol [Internet]. 2006;191(3):525–35. Available from: <http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1677/joe.1.06565>
153. Contreras JL, Smyth CA, Bilbao G, Young CJ, Thompson JA, Eckhoff DE. 17beta-Estradiol protects isolated human pancreatic islets against proinflammatory cytokine-induced cell death: molecular mechanisms and islet functionality. Transplantation [Internet]. 2002 Nov 15;74(9):1252–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12451262>
154. Kim SJ, An S, Lee JH, Kim JY, Song K-B, Hwang DW, et al. Loss of Progesterone Receptor Expression Is an Early Tumorigenesis Event Associated with Tumor Progression and Shorter Survival in Pancreatic Neuroendocrine Tumor Patients. J Pathol Transl Med [Internet]. 2017 Jul 15;51(4):388–95. Available from: <http://jpatholm.org/journal/view.php?doi=10.4132/jptm.2017.03.19>
155. Zhou R, Yao X, Xu X, Wang G, Zhu Z, Chen J, et al. Blockage of progesterone receptor effectively protects pancreatic islet beta cell viability. Steroids [Internet]. 2013 Oct;78(10):987–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23827354>
156. Diller M, Schüller S, Buchholz S, Lattrich C, Treeck O, Ortmann O. Effects of estriol on growth, gene expression and estrogen response element activation in human breast cancer cell lines. Maturitas [Internet]. 2014 Apr;77(4):336–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24529907>
157. Zheng ZY, Lin VCL. Anti-estrogenic effect of unliganded progesterone receptor is estrogen-

- selective in breast cancer cells MCF-7. *Cancer Lett.* 2008;268(2):202–11.
158. Hornick JR, Spitzer D, Goedegebuure P, Mach RH, Hawkins WG. Therapeutic targeting of pancreatic cancer utilizing sigma-2 ligands. *Surgery* [Internet]. 2012 Sep;152(3):S152–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003960601200222X>
 159. Kociszewska K, Czekaj P. New Insight into Progesterone-dependent Signalization. *Open Pharm Sci J* [Internet]. 2017 Feb 16;4(1):11–22. Available from: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/PHARMSCI-4-11>
 160. Zhang L, Kanda Y, Roberts DJ, Ecker JL, Losel R, Wehling M, et al. Expression of progesterone receptor membrane component 1 and its partner serpine 1 mRNA binding protein in uterine and placental tissues of the mouse and human. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;287(1–2):81–9.
 161. Allen TK, Feng L, Grotegut CA, Murtha AP. Progesterone receptor membrane component 1 as the mediator of the inhibitory effect of progestins on cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 activity in vitro. *Reprod Sci* [Internet]. 2014 Feb;21(2):260–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23813454>
 162. Bali N, Arimoto JM, Iwata N, Lin SW, Zhao L, Brinton RD, et al. Differential responses of progesterone receptor membrane component-1 (Pgrmc1) and the classical progesterone receptor (Pgr) to 17 β -estradiol and progesterone in hippocampal subregions that support synaptic remodeling and neurogenesis. *Endocrinology* [Internet]. 2012 Feb;153(2):759–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22147012>
 163. Peluso JJ, Pappalardo A. Progesterone regulates granulosa cell viability through a protein kinase G-dependent mechanism that may involve 14-3-3sigma. *Biol Reprod* [Internet]. 2004;71(6):1870–8. Available from: <http://www.biolreprod.org/content/71/6/1870.abstract>
 164. Mansouri MR, Schuster J, Badhai J, Stattin EL, Lösel R, Wehling M, et al. Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Hum Mol Genet.* 2008;17(23):3776–83.
 165. Wu W, Shi SQ, Huang HJ, Balducci J, Garfield RE. Changes in PGRMC1, a potential progesterone receptor, in human myometrium during pregnancy and labour at term and preterm. *Mol Hum Reprod.* 2011;17(4):233–42.

ANEXO A – SIGLA DOS GENES ESTUDADOS

Alb - Albumina

Als2 – homólogo da esclerose lateral amiotrófica

Aox 1 – Aldeído oxidase 1

Apc – Polipose adenomatose coli

Apoe – Apolipoproteína E

Cat – Catalase

Ccl5 – Ligante 5 de CC quimiocina

Ccs – Chaperona de cobre para superóxido dismutase

Ctsb - Catepsina B

Cyba – Citocromo b-245, alfa polipeptídeo

Cygb - Citoglobina

Dhcr24 – 24-desidrocolesterol redutase

Dnm2 – Dinamina 2

Duox 1 - Dual oxidase 1

Duox 2 - Dual oxidase 2

Ehd2 – Conteúdo 2 do domínio EH (alfa hélice da proteína E)

Epx - Eosinofil peroxidase

Ercc2 - Reparo da excisão por complementação cruzada 2

Ercc6 - Reparo da excisão por complementação cruzada 6

Fancc - Anemia Fanconi anemia

Fmo2 - Flavina monooxygenase 2

Fth1 - Ferritina, polipeptídeo pesado 1

Gclc - Glutamato-cisteína ligase, subunidade catalítica

Gclm - Glutamato cisteína ligase, subunidade modificadora

Gpx1 - Glutathione peroxidase 1

Gpx2 - Glutathione peroxidase 2

Gpx3 - Glutathione peroxidase 3

Gpx4 - Glutathione peroxidase 4

Gpx5 - Glutathione peroxidase 5

Gpx6 - Glutathione peroxidase 6

Gpx7 - Glutathione peroxidase 7

Gsr - Glutathione redutase

Gstk1 - Glutathione S-transferase kappa 1
Gstp1 - Glutathione S-transferase pi 1
Hba1 - Hemoglobina alfa
Hmox1 - Heme oxygenase 1
Hspa1a – Proteína choque-térmico a1a
Idh1 - Isocitrato desidrogenase 1
Ift172 – Homólogo ao transporte intraflagellar 172
Krt1 - Keratina 1
LOC367198 - Similar a proteína Serina/Treonina quinase ATR
Lpo - Lactoperoxidase
Mb - Mioglobina
Mpo - Mieloperoxidase
Ncf1 – Fator citosólico de neutrófilo 1
Ncf2 - Fator citosólico de neutrófilo 2
Ngb - Neuroglobina
Nos2 – Óxido nítrico sintase 2
Nox4 - NADPH oxidase 4
Noxa1 – Ativador de NADPH oxidase 1
Noxo1 – Organizador de NADPH oxidase 1
Nqo1 - NAD(P)H desidrogenase quinona 1
Nudt1 – Nucleosídeo difosfato tipo 1
Park7 – Doença de Parkinson 7
Prdx1 - Peroxirredoxina 1
Prdx2 - Peroxirredoxina 2
Prdx3 - Peroxirredoxina 3
Prdx4 - Peroxirredoxina 4
Prdx5 - Peroxirredoxina 5
Prdx6 - Peroxirredoxina 6
Prnp - Proteína Prion
Psmb5 - Subunidade de proteassoma beta tipo 5
Ptgs1 – Prostaglandina endoperoxídeo sintase 1
Ptgs2 - Prostaglandina endoperoxídeo sintase 2
Rag2 – Gene de reativação da recombinação 2
Scd1 - esteroil-Coenzima A desaturase 1

Vimp - Selenoproteína S
Sepp1 - Selenoproteína P
Serpinb1b – Inibidor peptidase de serina (ou cisteína), membro 1b
Slc38a1 – Família 38 dos carregadores de solute, membro 1
Slc38a5 – Família 38 dos carregadores de solute, membro 5
Sod1 - Superóxido dismutase 1, solúvel
Sod2 - Superóxido dismutase 2, mitocondrial
Sod3 - Superóxido dismutase 3, extracelular
Sqstm1 - Sequestosoma 1
Srxn1 - Sulfiredoxina 1
Tpo - Tireoperoxidase
Txn1 - Tiorredoxina 1
Txnip – Proteína de interação com tiorredoxina
Txnrd1 - Tiorredoxina redutase 1
Txnrd2 - Tiorredoxina redutase 2
Ucp2 – Proteína desacopladora 2
Ucp3 - Proteína desacopladora 3
Vim - Vimentina

**ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO
ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM INTERNATIONAL JOURNAL**

**Estrogens modulate progesterone receptor expression and may
contribute for progesterone-mediated apoptotic β -cell death**

Nathália Ruder Borçari¹, Jeniffer Farias dos Santos¹, Sarah Ingrid Farias dos Santos², Felipe Santiago Chambergo Alcalde¹, Anna Karenina Azevedo-Martins¹ and Viviane Abreu Nunes¹

¹ School of Arts, Sciences and Humanities, USP, São Paulo, SP, Brazil

² Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, MG, Brazil

Corresponding author: Viviane Abreu Nunes

Email: vanunes@ib.usp.br, +55 (11) 3091-8828

School of Arts, Sciences and Humanities of University of Sao Paulo

Av. Arlindo Bettio, 1000, Ermelino Matarazzo, CEP 03170-050, Sao Paulo, SP, Brazil

Abstract

The use of progesterone to prevent preterm delivery has been related to the increased risk to gestational diabetes (GD) development. We have shown previously that PG is able to trigger β -cells death and estrogens potentiated this progesterone effect. Since the expression of progesterone receptors (PR) is under control of estrogens in some tissues, we hypothesized that these hormones could regulate PR expression in pancreatic β -cells. The aim of this work was to evaluate the effect of estriol and estradiol on the regulation of the PRB (a physiologically active cytosolic receptor) and of PGRMC1 (the membrane component 1) expression in insulin-producing RINm5F cells. Cells were treated with the steroids hormones (estriol and 17 β -estradiol) in pregnancy physiological or pharmacological concentrations for 6 or 24 h. RNA was extracted by TRIzol® method. Gene expression was analyzed by quantitative PCR using specific primers for PRB and PGRMC1. Treatment of cells

with estriol or estradiol by 6 h slightly affected PGRMC1 expression. In contrast, 0.1, 1.0 and 10 μ M estriol treatment for 6 h increased PRB expression by 15, 28 and 8-fold, respectively in comparison to untreated cells. Expression of PR was less affected after incubation of RINm5F cells for 24 h with the estrogens. These results confirmed that estrogens can regulate the expression of PR also in pancreatic cells, which may represent a mechanism to modulate progesterone action in these cells. The presented data may contribute for the better understanding of the interaction between steroid hormones and insulin producing cells, opening perspectives to the future treatment and therapeutic strategies for the GD management.

Key words: progesterone, estrogens, progesterone receptors, β -cells, gestational diabetes

Abbreviations

Ct: crossing threshold; E: estriol; ETD: estradiol; GD: gestational diabetes; GC: gene of control; GI: gene of interest; HPRT: phosphoribosyltransferase; PBS: phosphate-buffered saline; PI: propidium iodide; PG: progesterone; PR: progesterone receptor, PGRMC1: progesterone receptor membrane component 1; PRA: progesterone receptor isoform A; PRB: progesterone receptor isoform B; TNF- α : tumor necrosis factor alpha.

Introduction

Among the complications in pregnancy, gestational diabetes (GD) is one of the most common, affecting about 3-7% of pregnant women (39) GD is a condition characterized by intolerance to carbohydrates resulting in hyperglycemia, which may persist after delivery (125) According to the study of Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (126) and the International Diabetes Federation (127), the pregnant women with GD, when untreated, have increased risk of premature rupture of membranes and preterm delivery. The fetus, on the other hand, has an increased chance to develop respiratory distress syndrome, cardiomyopathy, polycythemia, hypocalcemia and hypomagnesemia, hypoglycemia and macrosomia.

The GD pathophysiology is still unknown, but many studies have focused on the understanding of the action of specific hormones in pregnancy and its relationship

to changes in carbohydrate metabolism during this period (128,129). Regardless, it has been shown that progesterone, whose high levels in the second trimester overlaps with GD onset, could contribute to insufficient insulin secretion to the increased demands of pregnancy (39). High progesterone levels have been also correlated with the development of glucose abnormalities in pregnancy and progesterone receptor-knockout mice are found to have improved glucose tolerance (130).

Accordingly, Rebarber et al. (40) studied the incidence of GD among pregnant women who have received weekly doses of 250 mg progesterone intramuscularly for preterm delivery prevention. The results showed that the incidence of DG was higher in women who received progesterone (12.9%) compared to the control group (4.9%). Many studies, in contrast, have suggested a possible antidiabetic effect of estrogens. Le May et al. (37) demonstrated that estradiol, through the binding to ER α receptor, protected β -cells from apoptosis induced by oxidative damage. Another report showed that mice treated with estradiol showed β -cell hypertrophy, preventing diabetes development (131)

The molecular mechanism involved in the progesterone action in DG scenario has not yet been clarified, however we have shown that progesterone is able to induce pancreatic β -cell death by an oxidative stress-dependent mechanism (62). Although estradiol and estriol have been related to cell protection from oxidative stress induced-apoptosis, these hormones potentiated progesterone effect on β -cell death when used in pharmacological concentrations, even though they were proved to be much less toxic than progesterone (62).

In humans, the effects of progesterone are mediated by two distinct forms of the progesterone receptor (PR). They are transcribed from a single gene by alternate initiation of transcription from two distinct promoters (132), giving rise to transcripts that encode two protein isoforms, PRA and PRB. These proteins are identical in sequence, except that PRA lacks 164 amino acids at the N-terminus, making it shorter than PRB (133). There is evidence that both isoforms are functionally distinct. PRB is a strong activator of target genes, while PRA is a dominant repressor of the form B. Consequently, PRA high expression might result in a decreased responsiveness to progesterone (134).

PR proteins are expressed in a variety of human tissues, including the uterus, mammary gland, brain, pancreas, bone, ovary and testis (135–140). The abundant

expression of PR indicates the general physiological effects that progesterone can exert in a variety of organs throughout the body. Specifically, in β -cells the presence of PR in normal islets ranged from 5 to 20%, which suggest that progesterone may have a regulatory effect on the functional activity of the endocrine pancreas (141).

PR expression and therefore the sensitivity to progesterone are under estrogens control. During pregnancy, plasma concentration of estradiol, the most potent estrogen, increase about 100 times, and of estriol about 1000 times compared to pre-pregnancy levels (142). These hormones are able to increase the PR expression in most target tissues, while progesterone decreases. Accordingly, it has been shown that the amount of PR protein is increased during proestrus or administration of exogenous estrogen in the mammalian uterus (143) and other animal models (144,145). Corroborating this hypothesis, Bryś et al. (146) investigated the influence of administration of estriol for 14 days on the expression of PR in the endometrium, myometrium and vagina. Results showed that in women treated with estriol there was a significant increase in the expression of PR in the endometrium in comparison to control group.

Regarding to non-genomic mechanisms, progesterone membrane receptors have been also recently described in vertebrates (147). The expression of these receptors has been identified in tissues where the action of progesterone is less understood, including β -cells (148). Among these, the progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) has been identified as an important novel mediator of progesterone function, being demonstrated that PGRMC1 is differentially expressed in fetal membranes among pregnant women and diminished in preterm delivery (149). Wang et al. (150) reported that the decrease in PGRMC1 expression and its translocation from a perinuclear location could contribute to a functional progesterone withdrawal that may ultimately initiate parturition. However, little is known about this receptor role in pancreatic tissue, and specifically in β -cells.

As progesterone effect on β -cell death was previously shown to be enhanced by estrogen, we showed here that estriol - the most prevalent estrogen in pregnancy -, and estradiol modulate the expression of PRB and PGRMC1 in insulin secreting RINm5F cells. These results should contribute to a better understanding of the DG pathophysiology, opening perspectives for the development of hormonal-based strategies for prevention and treatment of this disease.

Material and Methods

Cell culture

Insulin producing RINm5F cells (a cell lineage derived from rat insulinoma) were maintained in RPMI-1640 supplemented with 24 mM sodium bicarbonate, 2 mM glutamine, 20 mM HEPES, 10 U/ml penicillin and 10 mg/ml streptomycin, 10% fetal bovine serum under humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂.

Progesterone and estrogens toxicity assay on RINm5F cells

To confirm the toxicity of progesterone and estrogens on RINm5F cells, experiments to evaluate cell membrane integrity loss and DNA fragmentation were performed. RINm5F cells were incubated with estriol, 17- β estradiol and progesterone (diluted in ethanol) in different concentrations (0.1, 1.0 and 10 μ M), for 6 or 24 h. Progesterone and estriol were used at physiological (0.1 and 1.0 μ M) and pharmacological concentrations (10 μ M). Estradiol was used at the same concentrations, which are all pharmacological. After the incubation period, cells were collected by trypsinization and used in the different experiments.

Cell membrane integrity loss assay

Cells were centrifuged at 400 x g for 5 min at 4°C and the pellet was suspended in 500 μ l phosphate-buffered saline (PBS). Subsequently, 5 μ l of propidium iodide (PI) solution (1 mg/ml in PBS) were added and cells were analyzed using a Guava flow cytometer (Millipore Corporation, Hayward, CA, USA) according to Nicoletti et al. (1991). Fluorescence was measured using the FL2 channel (orange–red fluorescence 585/42 nm). A total of 10,000 events was analyzed per sample. Cells with PI fluorescence were evaluated using the InCyte software (Millipore Corporation, Hayward, CA, USA).

DNA fragmentation assay

Apoptotic cells were evaluated by DNA fragmentation and loss of nuclear DNA content assay using the fluorochrome PI (151). After trypsinization, cells were centrifuged at 1,000 rpm for 5 min at 4°C. The pellet was gently added to 300 μ l hypotonic solution containing 50 μ g/ml PI, 0.1% sodium citrate and 0.1% Triton X-100. Cells were then analyzed by flow cytometry. A total of 10,000 events was

analyzed per sample. Cells with PI fluorescence were evaluated by using the InCyte software (Millipore Corporation, Hayward, CA, USA).

Evaluation of progesterone receptors expression by quantitative PCR

Total RNA extraction

RINm5F cells were plated onto 6-well plates (10^5 cells per well) in a final volume of 2 ml and maintained in the culture conditions. After 48 h of plating, cells were treated with estriol or 17β -estradiol at the concentrations of 0.1, 1.0 and 10 μ M for 6 or 24 h. Following these periods of incubation, cultures were washed with ice cold PBS and cells were lysed by the addition of 500 μ l of TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Cell lysates were immediately frozen at -80°C for RNA extraction.

After thawing, samples were incubated at 30°C for 5 min and added of 50 μ L of chloroform. After brief vortexing and incubation at 30°C for 2 min, samples were centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min. The aqueous phase was transferred to a sterile tube, which was added of 250 μ L of isopropyl alcohol. Mixtures were incubated for 10 min at 30°C and thereafter centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min. The supernatants were discarded and pellets were added of 500 μ L of 70% ethanol. The samples were centrifuged at $7,500 \times g$ for 15 min. Pellets were resuspended in 30 μ L of ultrapure water. Samples were maintained at -80°C .

Complementary DNA obtaining

RNA samples were reverse transcribed with SuperScript® III First-Strand Synthesis System, according to manufacturer's recommendation (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Briefly, for cDNA synthesis, 8 μ l of RNA solution (2.5 μ g) were mixed with Oligo dT18 50 μ M (1.0 μ l) and a mixture of 10 mM dNTPs (1.0 μ l). Samples were incubated for 5 min at 65°C . Then, they were added of 10 x RT Buffer (2.0 μ l), RnaseOUT 40 U/ μ l (1.0 μ l), 25 mM MgCl_2 (4.0 μ l), 0.1 M DTT (2.0 μ l), and SuperScript® III RT 200U/ μ l (1.0 μ l) in a final volume of 20 μ l. Reverse transcription was carried out for 50 min at 50°C . The reaction was completed by heating at 85°C for 5 min. cDNA samples were kept at -20°C for the future experiments.

Primers designing

A set of primers were specifically designed for the progesterone receptors PRB and PGRMC1 cDNA as verified using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Primer sequences are shown in the **Table 1**.

Sequence	
PRB F	Forward: GCA TCG TCT GTA GTC TCG CCA ATA C
PRB R	Reverse: GCT CTG GGA TTT CTG CTT CTT CG
PGRMC1 F	Forward: ACT TCA CCC CTG CCG AAC TAA G
PGRMC1 R	Reverse: TCA TCC TTC AGT GCT TCT TTG TCC
HPRT F	Forward: CTC ATG GAC TGA TTA TGG ACA GGA C
HPRT R	Reverse: GCA GGT CAG CAA AGA ACT TAT AGC C

Table 1. Primer sequences

Quantitative PCR (qPCR)

cDNA and primer optimal concentration were firstly determined. qPCR was performed using SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Briefly, 2.5 µl-aliquots of diluted cDNA (1:8) were mixed with the primers at a final concentration of 200 nM and 5 µl of Platinum SYBR® Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Reactions were developed with 40 thermal cycles of 95°C for 20 sec, 56°C for 30 sec, and 72°C for 55 sec using the Eco™ Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA, USA). The cycle in which the reaction crosses the threshold (Ct) of the gene of interest (GI) was correlated with the amount of target mRNA. The hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene was used as control (GC). The value of Ct_{GC} was subtracted from the value of the Ct_{GI}, resulting in ΔCt value, which represents the relative amount of the GI transcript. The increasing in gene expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ and gene expression was presented in relation to the control (cells treated with ethanol – the vehicle for progesterone dilution).

Statistical analysis

Cell viability and DNA fragmentation data were analyzed by one-way ANOVA plus Tukey's test for multiple comparisons. Gene expression data were analyzed by two-way ANOVA plus Bonferroni post-test. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

Results

Toxicity assay of progesterone and estrogen

Cultures were incubated with the progesterone, estriol or estradiol at different concentrations for 6 or 24 h. As showed in the **Figure 1**, in the tested concentrations, these steroid hormones did not drive cells to necrosis, which was evaluated by cell membrane integrity loss.

Figure 1. Effect of progesterone and estrogens on cell viability. Cells were incubated with the hormones at different concentrations for 6 or 24 h. Cell viability was evaluated, by flow cytometry, by the loss of plasma membrane integrity using PI. Data are presented as mean $\pm$ SEM of three experiments in duplicates. Differences were analyzed by ANOVA + Bonferroni's test and considered significant at $p < 0.05$. Progesterone, E: Estriol, ETD: Estradiol.

The effect of steroid hormones on RINm5F cells was also evaluated by DNA fragmentation analysis. The data showed that 10 μ M progesterone, when incubate for 24 h with the cells, caused a significant DNA fragmentation in comparison to the treatment for 6 h, in approximately 20% of cells (**Figure 2**). Also, 0.1 μ M estradiol triggered DNA fragmentation in more than 25% of cells, whereas 1.0 μ M and 10 μ M estradiol in almost 60% of cells in comparison to cells incubated with ethanol (control). Estriol was the only steroid that did not promote DNA fragmentation in RINm5F cells in any concentration or time of incubation.

Figure 2. Effect of progesterone and estrogens on DNA fragmentation of RINm5F cells. Cells were incubated with the hormones, at different concentrations for 6 or 24 h. Data are presented as mean $\pm$ SEM of three individual experiments in duplicates. Differences were analyzed by ANOVA + Bonferroni's test and considered significant at $p < 0.05$. (*) statistically different from untreated cells for the same time point; (#) differs from 6 h for the same treatment. PG: Progesterone, E: Estradiol, ETD: Estradiol.

Progesterone receptors expression

It was analyzed the expression of PRB and PGRMC1, by quantitative PCR, after estrogens treatment. Estradiol at the concentrations of 0.1, 1.0 and 10 μ M modulated PRB expression in 15, 28 and 8-fold, respectively, after 6 h of incubation with RINm5F cells in comparison to control (**Figure 3**). The maximum effect on PRB expression was in the incubation with 1.0 μ M estradiol, which corresponds to a pregnancy physiological concentration. This hormone did not cause significant changes in PRB expression when incubated for 24 h. Similarly, 17 β -estradiol had a minor effect on PRB expression in RINm5F cells in all tested concentrations and in both time points.

Figure 3. PRB expression evaluation by quantitative PCR. Cells were treated with estriol or 17 β -estradiol in physiological (0.1 μ M) or pharmacological (1.0 and 10 μ M) concentrations for 6 or 24 h. After, cells were collected by trypsinization and total RNA was extracted by TRIzol® method. Expression was analyzed by quantitative PCR. HPRT was used as internal control gene. Results are shown as means + SEM of three experiments performed in duplicates. S/C: ratio Sample/Control. (*) statistically different from untreated cells for the same time point; (#) differs from 6 h for the same treatment. E: Estriol, ETD: Estradiol.

PGRMC1 expression in RINm5F cells was also slightly modified by estriol and estradiol treatments for 6 or 24 h (**Figure 4**). Estriol at a final concentration of 10 μ M caused an enhancement of 4-fold in the expression of PGRMC1. Similar to PRB results, estriol showed an early effect in comparison to incubation for 24 h. Estradiol, in contrast, did not show a significant effect on PGRMC1 expression in both time points.

Figure 4. PGRMC1 expression evaluation by quantitative PCR. Cells were treated with estriol or estradiol in physiological (0.1 μ M) or pharmacological (1 and 10 μ M) concentrations for 6 and 24 h. After, cells were collected by trypsinization and total RNA was extracted by TRIzol® method. Expression was analyzed by real time PCR. HPRT was used as internal control gene. Results are shown as means + SEM of three experiments performed in duplicates. S/C: ratio Sample/Control. (*) statistically different from untreated cells for the same time point. E: Estriol, ETD: Estradiol.

Discussion

The steroid hormones, progesterone and estrogens, have been implicated in the β -cell physiology exerting direct effects on insulin secretion (141) and islet-cell proliferation (37) through the binding to their specific receptors (152). Furthermore, Picard et al. (38) suggested that the hormonal particularities of pregnancy, and more specifically the progesterone, might contribute to the poor adaptation of insulin secretion (141) to the increased requirements during pregnancy.

In contrast to the progesterone effects, data from human and animal studies indicated that 17 β -estradiol prevents a decrease in insulin production in diabetic states (37). Also, estradiol, in pharmacological concentrations, protected human pancreatic islets from apoptosis induced by proinflammatory cytokines *in vitro* (153), suggesting that the antidiabetic action of estradiol might be due, at the least in part,

to the β -cell apoptosis prevention.

We have already demonstrated that estriol, the main estrogen produced in pregnancy, was shown to be much less toxic to RINm5F cells than progesterone (62), but this hormone, at the pharmacological concentrations of 10 and 25 μ M, caused a significant reduction of cell viability after 48 h of incubation. Also, the coincubation of cells with 25 μ M estriol and 100 μ M progesterone enhanced the loss of cell membrane integrity in both time points (24 and 48 h) in comparison to the cultures incubated with the hormones individually.

Few studies have reported the effect of estriol and estradiol on the expression of PR in β -cells, but since estriol potentiated progesterone-induced RINm5F cell death (62), and some authors have found that estradiol administration induced PR expression in various tissues, including pancreas (154), we hypothesized that these estrogens could regulate the expression of the progesterone receptors - PRB and PGRMC1 - in β -cells, making these cells more sensitive to the progesterone action. Supporting this idea, Zhou et al. (155) found that progesterone-induced MIN6 cell apoptosis was reduced in the presence of the selective PR antagonist SC51089.

We found that estriol modulated PRB expression, being the maximum effect (30-fold increasing) observed with 1.0 μ M estriol, which corresponds to the pregnancy physiological concentration. On the other hand, 17 β -estradiol was not able to modulate PRB expression in RINm5F cells in both physiological and pharmacological concentrations, suggesting that the progesterone effect upon RINm5F cells is not dependent on this hormone directly.

Similarly, Diller et al. (156) showed that in MCF-7 cells, a cell lineage derived of ductal invasive carcinoma, estriol in a nanomolar range, upregulated PR expression, which was accompanied by an increase in the protein level of the receptor. Corroborating our results, Zheng and Lin (157) showed that estradiol did not present any effect on PR expression after 72 h of incubation with MCF-7 cells, mostly due to the complete abolishment of the estrogenic activity by the metabolic degradation of the hormone up to 80% over 24 h.

In addition to the investigation of the typical progesterone receptor PRB expression, we evaluated the modulation of PGRMC1, which is a progesterone receptor membrane component. We have shown that PGRMC1 expression in RINm5F cells was only lesser modified by estriol or estradiol treatments, even this

receptor seems to be very expressed in β -cells in terms of mRNA (data not shown). Estriol at a final concentration of 10 μ M caused an enhancement of 4-fold whereas estradiol did not present a significant effect on PGRMC1 expression in both time points. This result suggests that PGRMC1 expression is not directly affected by estradiol but can be modulated by estriol in a pharmacological concentration.

Originally, PGRMC1 has been investigated in ovarian and breast cancers, where progesterone exhibits an antiapoptotic activity. Nevertheless, PGRMC1-depleted cells exhibited apoptotic phenotype when treated with progesterone (158), suggesting a potential role of this receptor as a marker for neoplasia (159).

Little is known about the PGRMC1 function in insulin producing cells, as well as and in pregnancy and gestational diabetes scenario, but it has been shown that this receptor is expressed in human placenta, primarily in syncytiotrophoblasts, smooth muscle cells of the placental vasculature, and in villous capillaries during the pregnancy (160).

The function of PGRMC1 in preterm delivery prevention by progesterone treatment has been also studied. Despite the molecular mechanisms are not completely understood, it has been shown that progesterone and medroxyprogesterone 17-(MPA) inhibit apoptosis induced by TNF- α in fetal membranes, an event that combined to the extracellular matrix degradation by a matrix metalloproteinase (MMP-9) contribute to premature delivery (161). These authors showed that the binding of MPA to PGRMC1 decreases the expression of MMP-9, which corroborate the idea about the use of this hormone in preterm delivery prevention.

Additionally, Bali et al. (162) studied PGRMC1 modulation by steroid hormones in hippocampal regions of ovariectomized rats. Treatment with progesterone and estradiol for 4 or 30 days caused upregulation in PGRMC1 expression. According to Peluso et al. (163), the effect of progesterone binding to the PGRMC1 is mediated by a mechanism dependent of protein kinase G and the interaction with other binders such as the mRNA binding protein, serpin 1 (164). However, there is still no direct evidence of progesterone binding to PGRMC1 (165).

The function of PR in β -cells and its modulation by estrogens is still unclear, however, based on our results we suggest that the increasing in PRB expression induced by estriol could be associated to the responsiveness of these cells to progesterone action (62), even we did not examine the PRB expression in protein

level. We also demonstrated that PGRMC1, which is very well expressed in β -cells, was only slightly modulated by estrogens, indicating that, at least in these cells, other mechanisms and molecules are responsible for the regulation of PGRMC1 expression. Together, the data presented here should contribute to a better understanding of the pancreatic β -cell biology during pregnancy and GD pathophysiology, opening perspectives for different approaches and hormone-based therapeutic strategies for GD management.

Conclusion

In summary, we have shown that estriol increases the expression of PRB, which could potentiate the toxic effect of progesterone upon insulin producing RINm5F cells.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2016/14150-2).

Declaration of interest

We state that there is any financial or other potential conflict of interest.

References

1. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*. 2002;25:1862–1868.
2. Miranda P, Reis R. Diabetes mellitus gestacional. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54.
3. Lowe LP, Metzger BE, Dyer AR, et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *N Engl J Med*. 2008;358:1991–2002.
4. IDF. IDF Diabetes Atlas 7th edition, 2015.
5. Menicatti M, Prado CE, Fregonesi T. Diabetes gestacional: aspectos fisiopatológico tratamento. *Arq Cienc Saude Unipar*. 2006;10:105–111.
6. Nogueira AI. Diabetes Gestacional: perfil e evolucao de um grupo de pacientes do Hospital das Clinicas da UFMG. *Rev Med Minas Gerais*. 2001:32–41.
7. Brănișteanu DD, Mathieu C. Progesterone in gestational diabetes mellitus: guilty or not guilty? *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14(2):54–56.

8. Rebarber A, Istwan NB, Russo-Stieglitz K, et al. Increased incidence of gestational diabetes in women receiving prophylactic 17 α -hydroxyprogesterone caproate for prevention of recurrent preterm delivery. *Diabetes Care*. 2007;30(9):2277–2280.
9. Le May C, Chu K, Hu M, et al. Estrogens protect pancreatic β -cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(24):9232–9237.
10. Geisler JG, Zawulich W, Zawulich K, et al. Estrogen can prevent or reverse obesity and diabetes in mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Diabetes*. 2002;51(7):2158–2169.
11. Nunes VA, Portioli-Sanches EP, Rosim MP, et al. Progesterone induces apoptosis of insulin-secreting cells: insights into the molecular mechanism. *J Endocrinol*. 2014;221(2):273–824.
12. Louie MC, Seigny MB. Steroid hormone receptors as prognostic markers in breast cancer. *Am J Cancer Res*. 2017;7(8):1617–1636.
13. Kastner P, Krust A, Turcotte B, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*. 1990;9(5):1603–1614.
14. Arnett-Mansfield RL, DeFazio A, Wain GV, et al. Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium. *Cancer Res*. 2001;61(11):4576–4582.
15. Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*. 1997;18(4):502–519.
16. Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin Sci (Lond)*. 2000;98(2):217–240.
17. Graham JD, Clarke CL. Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer: Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells. *Breast Cancer Res*. 2002;4(5):182–186.
18. Ozawa H. Steroid Hormones, their receptors and neuroendocrine system. *J Nihon Med Sch*. 2005;72(6):316–325.
19. Tincello DG, Taylor AH, Spurling SM, et al. Receptor Isoforms That Mediate Estrogen and Progestagen Action in the Female Lower Urinary Tract. *J Urol*. 2009;181(3):1474–1482.
20. Han SJ, O'Malley BW, DeMayo FJ. An estrogen receptor α activity indicator model in mice. *Genesis*. 2009;47(12):815–824.
21. Straub SG, Sharp GWG, Meglasson MD, et al. Progesterone inhibits insulin secretion by a membrane delimited, non-genomic action. *Biosci Rep*.

2001;21(5):653–666.

22. Speroff L, Glass R, Kase N. Hormone biosynthesis, metabolism, and mechanism of action. *Clin Gynecol Endocrinol Infertil*. 3 ed, Baltimore: William and Wilkins; 1982, p. 1–41.

23. Spencer TE, Bazer FW. Conceptus signals for establishing and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:49.

24. Ohta Y, Sato T, Iguchi T. Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the reproductive tract of adult female rats. *Biol Reprod*. 1993;48(1):205–213.

25. Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, et al. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*. 2001;122(6):965–979.

26. Bryś M, Szyłło K, Romanowicz-Makowska H, et al. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol. *Sao Paulo Med J*. 2009;127(3):128–133.

27. Mourot B, Nguyen T, Fostier A, et al. Two unrelated putative membranebound progestin receptors, progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and membrane progestin receptor (mPR) beta, are expressed in the rainbow trout oocyte and exhibit similar ovarian expression patterns. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4:6.

28. Pasanen S, Ylikomi T, Syvala H, et al. Distribution of progesterone receptor in chicken: Novel target organs for progesterone and estrogen action. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;135(1):79–91.

29. Guo M, Zhang C, Wang Y, et al. Progesterone Receptor Membrane Component 1 Mediates Progesterone-Induced Suppression of Oocyte Meiotic Prophase I and Primordial Folliculogenesis. *Sci Rep*. 2016;6:36869.

30. Wang R, Sheehan PM, Brennecke SP. Changes in myometrial expression of progesterone receptor membrane components 1 and 2 are associated with human parturition at term. *Reprod Fertil Dev*. 2016;28(5):618–627.

31. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991;139(2):271–279.

32. Teilmann SC, Clement CA, Thorup J, et al. Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. *J Endocrinol*. 2006;191(3):525–535.

33. Picard F, Wanatabe M, Schoonjans K, et al. Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta -cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(24):15644–15648.

34. Contreras JL, Smyth CA, Bilbao G, et al. 17 β -Estradiol protects isolated human pancreatic islets against proinflammatory cytokine-induced cell death: molecular mechanisms and islet functionality. *Transplantation*. 2002;74(9):1252–1259.
35. Kim SJ, An S, Lee JH, et al. Loss of Progesterone Receptor Expression Is an Early Tumorigenesis Event Associated with Tumor Progression and Shorter Survival in Pancreatic Neuroendocrine Tumor Patients. *J Pathol Transl Med*. 2017;51(4):388–395.
36. Zhou R, Yao X, Xu X, et al. Blockage of progesterone receptor effectively protects pancreatic islet β cell viability. *Steroids*. 2013;78(10):987–995.
37. Diller M, Schuler S, Buchholz S, et al. Effects of estriol on growth, gene expression and estrogen response element activation in human breast cancer cell lines. *Maturitas*. 2014;77(4):336–343.
38. Zheng ZY, Lin VC. Anti-estrogenic effect of unliganded progesterone receptor is estrogen-selective in breast cancer cells MCF-7. *Cancer Lett*. 2008;268(2):202–211.
39. Hornick JR, Spitzer D, Goedegebuure P, et al. Therapeutic targeting of pancreatic cancer utilizing sigma-2 ligands. *Surgery*. 2012;152(3 Suppl 1):S152–S156.
40. Kociszewska K, Czekaj P. New Insight into Progesterone-dependent Signalization. *Open Pharm Sci J*. 2017;4:11–22.
41. Zhang L, Kanda Y, Roberts DJ, et al. Expression of progesterone receptor membrane component 1 and its partner serpine 1 mRNA binding protein in uterine and placental tissues of the mouse and human. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;287(1-2):81–89.
42. Allen TK, Feng L, Grotegut CA, et al. Progesterone receptor membrane component 1 as the mediator of the inhibitory effect of progestins on cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 activity in vitro. *Reprod Sci*. 2014;21(2):260–268.
43. Bali N, Arimoto JM, Iwata N, et al. Differential responses of progesterone receptor membrane component-1 (Pgrmc1) and the classical progesterone receptor (Pgr) to 17 β -estradiol and progesterone in hippocampal subregions that support synaptic remodeling and neurogenesis. *Endocrinology*. 2012;153(2):759–769.
44. Peluso JJ, Pappalardo A. Progesterone regulates granulosa cell viability through a protein kinase G-dependent mechanism that may involve 14-3-3sigma. *Biol Reprod*. 2004;71(6):1870–1878.
45. Mansouri MR, Schuster J, Badhai J, et al. Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Hum Mol Genet*. 2008;17:3776–3783.
46. Wu W, Shi SQ, Huang HJ, et al. Changes in PGRMC1, a potential progesterone receptor, in human myometrium during pregnancy and labour at term and preterm.

Mol Hum Reprod. 2011;17(4):233–242.