Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Biologia Celular e Tecidual

Caroline Cruz de Oliveira

Análise de marcadores moleculares envolvidos na morte de células β pancreáticas em ilhotas
de animais em diferentes modelos de DM1

São Paulo

2018

Caroline Cruz de Oliveira

Análise de marcadores moleculares envolvidos na morte de células β pancreáticas em ilhotas de animais em diferentes modelos de DM1

Versão original

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Biologia celular e tecidual

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Fernanda Ortis

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cruz de Oliveira, Caroline

Análise de marcadores moleculares envolvidos na morte de células B pancreáticas em ilhotas de animais em diferentes modelos de DM1 / Caroline Cruz de Oliveira; orientadora Fernanda Ortis . -- São Paulo, 2018.

62 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Diabetes Mellitus do tipo 1 . 2. Insulite.
3. NF-kB. 4. Morte celular. 5. Estresse oxidativo.
I. , Fernanda Ortis, orientador. II. Título.

Nome: OLIVEIRA, Caroline Cruz de

Título: Análise de marcadores moleculares envolvidos na morte de células β pancreáticas em ilhotas de animais em diferentes modelos de DM1

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha querida mãe, Mirian, que sempre me apoiou e exemplificou resiliência, persistência e força de vontade em seus atos.

Ao meu marido, João, sempre muito atencioso.

Ao meu avô Oswaldo Cruz, que me ensinou o valor de um sorriso.

À memória de minha avó Izaulina, que sempre estará presente no meu coração.

Agradecimentos

O processo de aprendizagem que vivi nos últimos anos não teria sido possível se eu o tivesse tentado trilhar sozinha.

Agradeço à querida Profa. Fernanda Ortis por fazer muito mais do que simplesmente orientar meus passos no laboratório. Por ter me acolhido desde o nosso primeiro contato, me proporcionando aprendizados que os livros não ensinam, sempre muito otimista e dedicada, me motivando a aprender e estimulando meu pensamento crítico.

Aos Profs. Sérgio Ferreira de Oliveira e Maria Inês Borella, por ceder um espacinho dos seus laboratórios para que eu pudesse dar continuidade aos meus experimentos, além de sempre se preocuparem com o bom andamento do meu projeto.

À Dra. Sandra Mara Ferreira, por todas as dicas, protocolos e disponibilidade para ajudar sempre. Ao Cruz, que corrigiu meus erros de técnica e execução de diversas atividades, sempre com muita paciência, bom humor e dedicação, e que também se tornou um querido amigo.

Aos colegas do laboratório, que tornaram a vida cotidiana mais agradável. Ao Angelito, por me auxiliar a ser uma pessoa melhor através dos seus exemplos diários de dedicação e bondade. À Catharina, por estar sempre disponível a ajudar e por ter se tornado uma grande amiga. À Carol, pela companhia sempre agradável. À Elô pelos conselhos e conversas. À Aninha, por toda a sua alegria, que me encantou no momento em que a conheci. À Jaque, pelo carinho e amizade.

À minha mãe, que me proporcionou a base de quem eu sou hoje e jamais permitiu que eu desistisse dos projetos que comecei em minha vida, que não só me motivou a buscar meus sonhos, como me proporcionou subsídios para que eu o fizesse, me incentivando a trilhar meu próprio caminho. Ao meu esposo, João, por ser meu companheiro nessa caminhada, por sempre me apoiar e me ajudar a seguir em frente. Também por ser paciente com minhas lamúrias e me incentivar nos meus momentos de desânimo. À minha sogra, Neusa, que sempre tem uma palavra doce para me oferecer.

À todos meus familiares, em especial à avó Cida, tias Rosana e Lizele, tio Paulo e primas Bia, Bruna e Isabela, que sempre acreditaram no meu potencial e nunca me permitiram esquecer aonde estão minhas raízes, sempre me dando um motivo para olhar pra trás. Aos meus tios Viviane e Dickson, por sempre terem sido meus conselheiros, me ajudando a fazer escolhas difíceis, me apoiando e estimulando a fazer o meu melhor.

Epígrafe

“Sonho que se sonha só, é só sonho que se sonha só. Sonho que sonha junto é realidade.”

- Raul Seixas

Resumo

Oliveira CC. Análise de marcadores moleculares envolvidos na morte de células β pancreáticas em ilhotas de animais em diferentes modelos de DM1 [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2018.

O *Diabetes Mellitus* do tipo 1 (DM1) é uma doença metabólica multifatorial caracterizada por hiperglicemia e hipoinsulinemia crônicas, decorrentes da destruição progressiva das células β pelo sistema imunológico. Durante a progressão do DM1, as ilhotas de Langerhans são invadidas por células do sistema imune que secretam citocinas pró-inflamatórias, gerando um quadro denominado insulite. A exposição das células β a essas citocinas leva a ativação de diversas vias de sinalização que aumentam o estresse oxidativo e de retículo endoplasmático, contribuindo para a indução da morte das células β . Existem muitos estudos que investigam as vias moleculares que levam à destruição da célula β durante o DM1, contudo é necessário um melhor entendimento da regulação e contribuição dessas diferentes vias para o desenvolvimento dessa patologia para que se possa desenhar terapias mais apropriadas para impedir seu desenvolvimento ou até mesmo para se atingir uma cura. Algumas das dificuldades encontradas na aplicação desses estudos estão relacionadas ao fato de que eles são conduzidos em sua maioria em células β ou ilhotas isoladas em cultura. Sabe-se que há uma importante regulação entre os diferentes tipos celulares presentes na ilhota e também entre as células da ilhota e as células adjacentes a ela, o que, sem dúvida, influencia no destino da célula β frente a um ataque autoimune. Este trabalho visou aperfeiçoar o conhecimento acerca do comportamento das células da ilhota pancreática frente ao desenvolvimento do DM1, utilizando técnicas de imunomarcagem em cortes histológicos pancreáticos de três modelos animais de DM1. No primeiro modelo: “Influência do exercício físico na indução do DM1”, mostramos que o exercício físico é capaz de prevenir a destruição das células β e potencialmente estar envolvido na transdiferenciação celular para recuperação de células endócrinas na ilhota desses animais. No segundo modelo: “Efeito de NOX1 e NOX2 na viabilidade e função de células β ”, observamos que a presença dessas NADPH oxidases parece ter influência na estrutura e provavelmente na viabilidade de células β . No terceiro modelo: “Papel de HNF4 α na viabilidade e função das células β ”, mostramos que a imunomarcagem das ilhotas de animais KO para esse fator de transcrição nas células β é uma ferramenta de extrema importância para esse estudo. O desenvolvimento desse trabalho possibilita que a investigação de diferentes vias envolvidas na destruição das células β seja realizada no ambiente em que essas células se

encontram, permitindo avaliar a ativação de vias específicas, como por exemplo ativação de NF- κ B e validar os resultados observados em células isoladas.

Palavras-chave: *Diabetes Mellitus* do tipo 1. Insulite. NF- κ B. Morte celular. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Oliveira CC. Análise de marcadores moleculares envolvidos na morte de células β pancreáticas em ilhotas de animais em diferentes modelos de DM1 [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2018.

Type 1 *Diabetes Mellitus* (DM1) is a multifactorial metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia and hypoinsulinemia, which is due to the progressive and specific destruction of β cells by the immune system. During the progression of DM1, the islets of Langerhans are invaded by cells of the immune system that secrete proinflammatory cytokines, in a process called insulinitis. Exposure of β cells to these cytokines leads to the activation of several signaling pathways that increase oxidative and endoplasmic reticulum stress, contributing to the β -cell death. There are many studies that investigate the molecular pathways that lead to the destruction of the β -cell during DM1, but a better understanding of the regulation and contribution of these different pathways to the development of this pathology is necessary in order to design more appropriate therapies to prevent their development or even to achieve a cure. Some of the difficulties encountered in the application of these studies are related to the fact that they are conducted mostly on β -cells or isolated islets in cell culture. It is known that there is an important regulation between the different cell types present in the islet and also between the islet cells and the cells adjacent to it, which undoubtedly influences the fate of the β -cell against an autoimmune attack. This work aimed to improve the knowledge about the behavior of pancreatic islet cells in the development of DM1, using immunostaining techniques in pancreatic histological sections of three animal models of DM1. In the first model, "Influence of physical exercise on the induction of DM1", we showed that physical exercise is able to prevent the destruction of β cells and potentially be involved in cell transdifferentiation for the recovery of endocrine cells in the islet of these animals. In the second model, "Effect of NOX1 and NOX2 on viability and β cell function", we observed that the presence of these NADPH oxidases appears to influence the structure and probably the viability of β cells. "In the third model:" Role of HNF4 α in viability and β cell function, we show that the immunostaining of islets of KO animals for this transcription factor in β cells is a tool of paramount importance for this study. The development of this work enables the investigation to be performed in the environment of these cells, allowing to evaluate the activation of specific pathways and validate the results observed in isolated cells.

Key words: Type 1 *Diabetes Mellitus*. Insulinitis. NF- κ B. Cell Death. Oxidative stress.

Lista de figuras

Figura 1 – Imuno-histoquímica para insulina e glucagon em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: <i>Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM por MLDZ</i>	33
Figura 2 - Imuno-histoquímica para PCNA em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: <i>Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM por MLDZ</i>	34
Figura 3 - Imuno-histoquímica para NF- κ B em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: <i>Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM por MLDZ</i>	35
Figura 4 - Cortes histológicos de pâncreas de camundongos do modelo de estudo: <i>Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas</i>	37
Figura 5 – Imuno-histoquímica para insulina e glucagon em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: <i>Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas</i>	39
Figura 6 - Imuno-histoquímica para PCNA em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: <i>Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas</i> ...	40
Figura 7 - Imuno-histoquímica para NF- κ B em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: <i>Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas</i> ...	41
Figura 8 - Imuno-histoquímica para insulina e glucagon em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: <i>Avaliação do papel de HNF4α na viabilidade de células β pancreáticas</i>	43
Figura 9 - Imuno-histoquímica para PCNA e NF- κ B em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: <i>Avaliação do papel de HNF4α na viabilidade de células β pancreáticas</i>	44

Lista de abreviaturas e siglas

APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
DAB	Di-Amino-Benzidina
DM1	<i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 1
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 2
DNA	<i>Desoxirribonucleic Acid</i>
ERN	Espécie reativa de Nitrogênio
ERRO	Espécie Reativa de Oxigênio
GLUT2	<i>Glucose Transporter 2</i>
GTT	<i>Glucose Tolerance Test</i>
Hb A1C	Hemoglobina Glicada
HNF4 α	<i>Hepatic Nuclear Factor 4 α</i>
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
IL	Interleucina
INGAP	<i>Islet Neogenesis-associated Protein Pentadecapeptide</i>
iNOS	<i>Induced Nitric Oxide Sintasis</i>
I κ B	<i>Inhibitor Kappa B</i>
KO	<i>Knockout</i>
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
MLDZ	<i>Multiple Low Dose Streptozotocin</i>
MODY	<i>Maturit Onset Diabete of the Young</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor – kappa B</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PxG	<i>Peroxidase Glutacione</i>
RE	Retículo Endoplasmático
SOD	Superóxido Dismutase
STZ	<i>Streptozotocin</i>
TNF	<i>Tumoral Nuclear Factor</i>

Lista de símbolos

β

Beta

α

Alpha

γ

Gamma

κ

Kappa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Diabetes Mellitus.....	16
2.2. Inflamação e morte celular no DM1	17
2.3. Citocinas pró-inflamatórias e estresse celular	18
2.4. DM1, inflamação e exercício	19
2.5. Modelo de DM1 induzido por doses múltiplas e baixas de streptozotocina	20
2.6. MODY, HNF4 α e estresse de retículo endoplasmático	21
2.7. Regeneração da massa de células β em modelos animais	22
2.8. Importância do estudo de vias envolvidas na destruição, disfunção e regeneração das células β no ambiente das ilhotas pancreáticas	23
3. OBJETIVO	24
3.1 Objetivos específicos.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Modelos animais utilizados no estudo:	25
4.1.1. Animais submetidos a treinamento de exercício aeróbico antes e após a indução da morte de células β pancreáticas	25
4.1.1.1. Fase de adaptação (3 semanas).....	25
4.1.1.2. Fase de treino	26
4.1.1.3. Fase de manutenção do treino	26
4.1.2. Animais <i>knockout</i> (KO) para o gene NOX1 e NOX2	26
4.1.3. Animais nocaute (KO) específico em células β pancreáticas do gene HNF4 α	27
4.2. Indução ao diabetes	27
4.3. Teste de tolerância à glicose (GTT)	28
4.4. Análise histológica de ilhotas dos modelos animais estudados.....	28
4.4.1. Coleta de pâncreas e inclusão do tecido em parafina	28
4.4.2. Ensaios Histológicos	28
4.4.2.1. Coloração do tecido pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).	28

4.4.2.2. Imunomarcção em ilhotas pancreáticas	29
4.4.2.3. Avaliação das marcações	29
4.4.2.4. Análise estatística	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM1 por MLDZ..	31
5.2. Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas	36
4.3. Avaliação do papel de HNF4 α na viabilidade de células β pancreáticas	42
6. DISCUSSÃO	45
6.1. O exercício protege as células β da destruição induzida por MLDZ	45
6.2. Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas	47
6.3 Avaliação do papel de HNF4 α na viabilidade de células β pancreáticas	48
7. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	61

1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes Mellitus* do tipo 1 (DM1) é uma doença metabólica autoimune que tem como principais características a hiperglicemia e hipoinsulinemia em decorrência de defeitos na síntese ou secreção de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas (1). O DM1 representa de 5 a 10% dos casos de *Diabetes Mellitus* e sua incidência vem crescendo ao redor do mundo (2). Ainda não existe uma cura para essa doença, sendo que a única terapia disponível no momento para controle dos níveis glicêmicos nesses pacientes é a administração de insulina exógena diariamente, dieta e exercício (3). Essa terapia demanda grande disciplina, remediando apenas os sintomas agudos associados a hiperglicemia. Uma vez que o controle da glicemia é muito delicado, ocasionalmente pode haver um descontrole dos níveis glicêmicos, sendo que a hiperglicemia de longo prazo leva a complicações que aumentam a mortalidade e morbidade da doença (4,5). Isso, aliado ao fato de não haver cura para o DM1, leva à dependência desse tratamento pelo resto da vida, o que impacta brutalmente na qualidade de vida desses pacientes. Além disso, há também um grande impacto social e econômico, uma vez que o DM1 afeta a população em idade produtiva, visto que este acomete principalmente crianças e jovens adultos. Não se sabe exatamente quais são as causas que levam ao desenvolvimento do DM1, contudo diversos estudos já mostraram que ela é uma doença multifatorial cujo desenvolvimento envolve mecanismos genéticos e ambientais que desencadeiam uma resposta autoimune nas ilhotas pancreáticas, levando à morte das células β e, conseqüentemente, à deficiência de insulina (6–9).

Outra alternativa para o tratamento, ou até mesmo a cura, desses indivíduos seria o transplante de ilhotas, porém hoje essa é uma terapia ineficiente tanto em relação às complicações associadas a imunossupressão, como à baixa oferta de doadores, além das dificuldades de manutenção da função dessas ilhotas nos receptores (10–13). Frente a esses problemas uma nova abordagem tem sido estudada visando a restauração da massa funcional de células beta. Essa abordagem ganhou força devido a estudos em diferentes modelos animais que demonstraram que é possível induzir a regeneração da massa funcional de células beta por diferentes mecanismos que poderiam envolver um aumento na proliferação de células beta pré-existentes (14), neogênese de células beta originadas de células tronco localizadas nos ductos pancreáticos (15) ou trans-diferenciação de outros tipos celulares presentes tanto no pâncreas endócrino como no pâncreas exócrino (16,17).

Sabe-se que no DM1 as ilhotas pancreáticas apresentam um infiltrado imunológico cujas principais células presentes são macrófagos e linfócitos T auto-reativos, que secretam citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, levam a uma inflamação local denominada insulite (5,8,13–10). Contudo ainda é necessário um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos tanto na destruição como na regeneração das células β frente a um ataque autoimune para desenhar terapias visando não apenas a prevenção de sua destruição como também a regeneração e manutenção de uma massa de células β funcionais.

Durante a insulite diversas vias de sinalização são ativadas nas células β pancreáticas em resposta às citocinas presentes no infiltrado imunológico. Dentre elas está a via do NF- κ B, um fator de transcrição que, quando ativado nesse contexto inflamatório, leva a indução de genes relacionados com ativação de diversas vias que levam à morte celular (9-10–13). Estudos realizados em camundongos demonstraram que a ausência do NF- κ B leva a proteção das células β da morte induzida por streptozotocina, mostrando que sua ativação tem um importante papel no desenvolvimento do DM1 (11,14,24). A ativação do NF- κ B leva a ativação de genes como o da NO (do inglês “*Nitric oxide*”) sintase induzida (iNOS), que aumenta o estresse celular a partir da produção de óxido nítrico (NO) (20,22,25). Além disso, o contexto inflamatório do DM1 leva a um aumento do estresse oxidativo nas células β , aumentando ainda mais a morte celular por apoptose (26–28).

Diversos modelos de estudo buscam investigar os mecanismos que conduzem as células β à morte no DM1, contudo boa parte deles é conduzido em linhagens celulares ou em ilhotas isoladas em cultura primária. Já é sabido que existe uma grande importância do estudo das células no seu ambiente nativo, uma vez que o contato delas com esse ambiente influencia significativamente as respostas celulares. Nosso grupo vem investigando os mecanismos de morte da célula β dentro do contexto do DM1, tendo desvendado algumas vias importantes para sua destruição em modelos *in vitro*. Este trabalho, por sua vez, busca avaliar se esses marcadores têm expressão semelhante também em modelos *in vivo*, considerando o contexto tecidual e fisiológico no qual as ilhotas pancreáticas estão inseridas. Além de avaliar marcadores de diferenciação e proliferação para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na preservação e/ou regeneração de células β funcionais após um insulto imuno-mediado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Diabetes Mellitus

O *Diabetes Mellitus* é uma doença metabólica de caráter heterogêneo caracterizada pela hiperglicemia crônica devido a falhas na síntese ou ação da insulina (1,29). Existem, dois tipos principais de *Diabetes*: o *Diabetes* Tipo 1 (DM1) e o *Diabetes* Tipo 2 (DM2). O DM2 é o mais incidente e acomete principalmente adultos e idosos; enquanto o DM1 tem menor incidência, acometendo principalmente crianças e jovens de até 20 anos, com grande impacto em sua qualidade de vida.

Indivíduos que apresentam DM1 têm como principais sintomas poliúria, polidipsia, perda de peso, ocasionalmente polifagia e visão turva, sendo seu diagnóstico baseado na avaliação da glicemia de jejum, glicemia após ingestão de glicose oral (teste de tolerância à glicose, GTT) e/ou avaliação da hemoglobina glicada (Hb A1C) - que indica as variações glicêmicas dos últimos 120 dias - além da dosagem de auto-anticorpos (1,2). Uma vez diagnosticados com DM1, o tratamento indicado a esses pacientes é a administração de doses diárias de insulina exógena, dieta e exercício físico (3). Esse tratamento tem como objetivo manter níveis glicêmicos normais, contudo ele exige um grande auto controle e disciplina, não sendo sempre eficiente, o que eventualmente gera complicações devido ao fato de aumentarem a mortalidade e morbidade da doença, além de não existir cura para a mesma, de modo que os pacientes se tornam dependentes de insulina exógena até o fim da vida (2,3).

O conhecimento sobre o desenvolvimento do DM1 vem principalmente de observações em modelos animais da doença, assim como de estudo de vias em células *in vitro*, visto que o quadro de desenvolvimento em humanos leva anos até a detecção de seus sintomas (5,10). Em modelos animais, observa-se um quadro inflamatório local nas ilhotas pancreáticas que contribui com o aumento da morte das células beta (18). Esse quadro inflamatório é conhecido como insulite e nele se observa a formação de um infiltrado de células imunológicas no microambiente da ilhota. Esse infiltrado imunológico, por sua vez, é responsável pela secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF) e o interferon- γ (IFN- γ) (18,30).

Todo o quadro inflamatório que é gerado durante a insulite leva à ativação de diversas vias de sinalização relacionadas com a morte das células β , tal como a via do fator nuclear-kappa B (NF- κ B), um fator de transcrição que, quando ativado nesse contexto inflamatório,

contribui amplamente para a indução da apoptose (18). Além disso, esse aumento da inflamação local das ilhotas pancreáticas leva a indução tanto de estresse oxidativo como também do estresse de retículo endoplasmático (RE) nas células β , ativando vias de sinalização que contribuem com sua morte (18, 8, 12,29).

Muito se discute sobre como o DM1 é iniciado, contudo ainda não se sabe ao certo quais os mecanismos que levam a essa patologia. Acredita-se que ela pode ser derivada de uma reação autoimune dos linfócitos T circulantes ou presentes nos linfonodos pancreáticos após a exposição desses a uma molécula similar aos antígenos de superfície presentes nas células β ; ou, ainda em decorrência de infecções virais ou fatores relacionados à dieta (4–6). É sabido, porém, que durante o desenvolvimento da DM1, células apresentadoras de antígenos (APC's), em particular as células dendríticas, conduzem antígenos derivados das células β para os linfonodos pancreáticos, onde ativam os linfócitos T que, ao reencontrar esses antígenos nas ilhotas pancreáticas, lá ficam retidos, iniciando a resposta autoimune (6,32). Existem evidências de que esses antígenos são decorrentes da morte de células beta ocasionada pelo remodelamento tecidual que ocorre durante o período neonato e primeira infância, o que também justificaria uma maior incidência dessa patologia em crianças (32,33).

2.2. Inflamação e morte celular no DM1

Já é sabido que a morte das células β durante o desenvolvimento da DM1 se dá principalmente por apoptose e que este tipo de morte celular também pode ser induzido por estresse tecidual (6,23). Além disso, essas células também apresentam uma maior sensibilidade para fatores estressores – como espécies reativas de oxigênio (ERO's) e de nitrogênio (ERN's) - quando comparada com outras células de mamíferos (27).

Durante a insulite, o microambiente das ilhotas pancreáticas é alterado devido a presença de um infiltrado de células imunológicas, tais como macrófagos e linfócitos T auto-reativos (6). Os macrófagos presentes nesse infiltrado liberam uma quimiocina chamada de fator de inibição de migração de macrófagos (MIF, do inglês “macrophage migration inhibitory factor”) que recruta outras células relacionadas tanto com a imunidade inata quanto com a imunidade adquirida, com um consequente aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF, Interleucina -1 β (IL-1 β) e IFN- γ (34). Esses mediadores pró-inflamatórios levam à ativação de vias pró-apoptóticas, em especial à via do NF- κ B que

possui um caráter pro-apoptótico nesse contexto (20,22,23,32,35). Corroborando com isso, camundongos knockout para NF- κ B são resistentes à indução da DM1 por doses baixas e múltiplas de streptozotocina, além de apresentarem menores níveis de citocinas pró-inflamatórias tais como a IL-12 e o TNF- α , quando comparados com animais que expressam o NF- κ B (21,24).

O NF- κ B é um fator de transcrição composto por duas subunidades formadas por proteínas da família Rel (21). Esse fator de transcrição é mantido no citoplasma pelas proteínas da família I κ B (do inglês “*inhibitor κ B*”), que impedem sua migração para o núcleo e consequentemente a transcrição de seus genes-alvo (36,37). Esse fator de transcrição pode ser ativado por duas vias, uma denominada canônica, ou clássica; e outra denominada não-canônica (38). Durante o DM1, observa-se a ativação do NF- κ B tanto pela via canônica (39) como pela via não-canônica (22,37) e essas duas vias tem um importante papel na ativação da transcrição e manutenção da expressão de genes relacionados com a indução da morte celular e inflamação (20–22,39,40).

Esse conjunto, morte das células β e expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias leva a um aumento da resposta inflamatória no ambiente da ilhota, contribuindo ainda mais para sua destruição (8).

2.3. Citocinas pró-inflamatórias e estresse celular

A ativação de NF- κ B pelas citocinas IL-1 β ou TNF, proveniente do infiltrado imunológico, é responsável pelo aumento da atividade de iNOS e, consequentemente, pelo aumento dos níveis de óxido nítrico (NO, do inglês “*nitric oxide*”) nas células beta (27). Foi demonstrado por Pirot, Eizirik e Cardozo (41) que o IFN- γ potencializa a morte celular induzida por estresse de RE na linhagem celular INS-1E. Isso porque, o aumento de ERNs está relacionado com o aumento do estresse de RE, o que culmina na morte celular (42). Além disso, já é sabido que esse fator de transcrição apresenta alta sensibilidade às EROs e ERNs e é ativado quando há um aumento dessas moléculas em diferentes tipos celulares (26,42). Por outro lado, o NF- κ B também é ativado em resposta a citocinas pró-inflamatórias e age induzindo a transcrição de genes que aumentam a concentração de EROs e ERNs (19,38,43). Deste modo, quando ativado, o NF- κ B não apenas sustenta como também amplifica a resposta autoimune nas ilhotas pancreáticas durante a DM1 (22,23,25).

As células β pancreáticas tem alta atividade metabólica e, em decorrência disso, uma alta produção de EROs. Contudo, a capacidade das enzimas catalase, glutathiona peroxidase

(PxG, do inglês “*Peroxidase Glutathione*”) e superóxido dismutase (SOD), responsáveis pela neutralização de EROs e ERNs, é limitada e, em quadros que apresentam um aumento dessas moléculas, se observa um aumento proporcional da morte celular por apoptose, como é o caso da DM1 (28). As EROS podem ser formadas de diferentes maneiras nas células, uma delas é através da família das NADPH oxidases (NOX), a qual possui várias isoformas (44–47). Dessas a NOX1, NOX2 e NOX4 são expressas em células β pancreáticas (48). Muito vem sendo discutido e demonstrado sobre a importância das diferentes isoformas de NOX na estrutura e função dessas células, porém a possível influência da ativação dessas diferentes isoformas sobre a viabilidade das células β frente a um insulto inflamatório ainda não é totalmente entendida e gera um grande interesse. Já é sabido que a NOX-1, quando estimulada por citocinas pró-inflamatórias, aumenta significativamente a sua atividade e, desta forma, aumenta também o conteúdo de EROs nas células e consequentemente o estresse celular (49,50). Diferentes estudos mostram, ainda, que a NOX1 parece estar relacionada com a disfunção das células β expostas a citocinas pró-inflamatórias (27,51), porém o uso de inibidores pouco específicos para as diferentes isoformas tem sido um obstáculo para confirmação desses resultados. Portanto, o uso de animais KO para as isoformas NOX1 (52) e NOX2 (53) possibilita o estudo isolado do papel dessas diferentes enzimas em ilhotas de animais expostos a condições de inflamação.

2.4. DM1, inflamação e exercício

O exercício físico vem sendo utilizado como um importante coadjuvante no tratamento de DM1, uma vez que sua prática regular diminui a glicemia devido à captação de glicose pelas células independente da presença de insulina (54,55). Além desse importante efeito, recentemente tem se observado que o exercício físico antagoniza o estresse oxidativo observado no DM1 devido à indução de fatores antioxidantes, tendo esse efeito sido observado em crianças com DM1 (56). Além disso, também já foi observado que o exercício modula o quadro inflamatório através de modificações nos leucócitos circulantes e da secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias (55,57,58). Outros estudos têm mostrando que a prática de exercícios regulares diminui o quadro inflamatório nas ilhotas pancreáticas e que isso se deve em parte ao fato de que, após o exercício, se observa um aumento de IL-6 (59,60) que neste contexto tem função anti-inflamatória, levando a um aumento de outras citocinas com essa mesma ação, como a IL-10 e a IL-13 (59,61,62). Sabe-se que essas

alterações se relacionam intimamente com a intensidade, a duração e o tipo de exercício realizado (58), porém ainda não se sabe ao certo quais os mecanismos moleculares envolvidos nesses processos ou se esses efeitos moduladores do exercício se estendem a longo prazo.

2.5. Modelo de DM1 induzido por doses múltiplas e baixas de streptozotocina

Muitos dos estudos *in vivo* sobre DM1 se baseiam na indução farmacológica da doença em animais, especialmente roedores, por streptozotocina (63,64). A streptozotocina é um fármaco cuja estrutura molecular é análoga à glicose e, por isso, ela é capaz de se ligar aos receptores GLUT2 nas células β e, devido a sua toxicidade, destruir essas células (63). A indução do DM pode se dar por diferentes modos de administração da streptozotocina, sendo que os mais comuns se utilizam de uma única dose, com alta concentração do fármaco, que leva à morte de uma grande quantidade de células β de uma única vez (64). Apesar de muito utilizado em modelos de DM2, esse modelo não parece ser tão eficiente na mimetização do DM1, visto que, nessa forma da doença, a morte celular acontece de forma lenta e gradual, conforme a inflamação se estabelece nas ilhotas pancreáticas (6,20,23,35). Portanto, um modelo baseado em doses baixas e múltiplas de streptozotocina (MLDZ, do inglês “*multiple low-dose streptozotocin*”) foi estabelecido para o estudo do DM1 (65,66). Esse modelo vem sendo utilizado por diversos grupos de pesquisa e já existem evidências de que ele mimetiza o desenvolvimento do DM1 em animais de experimentação de modo mais parecido ao que se observa em pacientes (63,66).

O MLDZ consiste na administração de doses sub-diabetogênicas de streptozotocina ao longo de um período de 5 a 7 dias, após o qual os animais desenvolvem DM1, que é confirmado pela hiperglicemia crônica e resistência à glicose aferida no teste de tolerância à glicose (GTT, do inglês “*glucose tolerance test*”). Essa utilização de doses sub-diabetogênicas de streptozotocina por um período contínuo leva a indução de um processo inflamatório semelhante à insulite nas ilhotas pancreáticas, além do desenvolvimento do DM1 ao final desse período. Portanto, esse é considerado um modelo adequado para o estudo *in vivo* do desenvolvimento do DM1, bem como a sua fisiopatologia e os processos moleculares envolvidos no estabelecimento da doença.

2.6. MODY, HNF4 α e estresse de retículo endoplasmático

Recentemente, vem sendo descrita uma nova modalidade de DM, o MODY (do inglês, “Maturity Onset Diabetes of the Young”), que está associado a alterações genéticas de caráter autossômico dominante e incide principalmente em adolescentes e adultos com até 25 anos de idade (67). O MODY corresponde a aproximadamente 10% dos casos de DM1 e os indivíduos com essa modalidade de DM frequentemente são diagnosticados erroneamente com DM1, contudo, no MODY, os pacientes não desenvolvem um processo autoimune (28,67,68).

Existem diversos tipos de MODY e cada um deles está relacionado com uma alteração genética específica. Já foi descrito na literatura que existe uma relação entre o subtipo 1 da doença (MODY1) e mutações do gene do HNF4 α (do inglês, “*hepatocyte nuclear factor-4*”), um importante fator de transcrição relacionado com a homeostase do retículo endoplasmático (RE) (69). O HNF4 α é expresso principalmente no fígado, rins e pâncreas, onde regula diversas funções celulares (67). No pâncreas, esse fator de transcrição está relacionado com a regulação de diversos genes, dentre eles alguns que codificam proteínas relacionadas com a secreção de insulina estimulada por glicose, tais como o receptor de glicose dependente de insulina GLUT-2 (do inglês “*glucose transporter-2*”), as enzimas relacionadas com o transporte de glicose e a glicólise, respectivamente, aldolase e piruvato quinase (68–71).

Foi demonstrado por Sato e colaboradores (72) em um estudo realizado com a linhagem celular MIN6 (células β pancreáticas) que quando há uma superexpressão do HNF4 α ocorre um aumento da indução da apoptose por estresse de RE. Além disso, esse trabalho também demonstrou que o knockdown de HNF4 α nessa linhagem celular leva à proteção das células da apoptose induzida por estresse de RE, demonstrando, desta maneira, um importante papel do HNF4 α na regulação da homeostase do RE. Contudo, pouco ainda é sabido sobre os mecanismos relacionados a esse papel protetor do HNF4 α em células β e são necessárias maiores investigações acerca desse assunto para entender melhor como essa proteção acontece não apenas em nível molecular, como também a influência desses mecanismos no funcionamento das células β .

A linhagem de camundongos InsCre.HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$ é uma linhagem geneticamente modificada cujo knockout do gene do HNF4 α é induzido após o nascimento dos animais e é específico para as células β pancreáticas. Essa linhagem é produzida através da tecnologia de engenharia genética em que o sítio Cre/lox de recombinação é ativado

farmacologicamente pela injeção de Tamoxifen e, a partir daí, o gene do HNF4 α é deletado nas células β (73,74). Essa deleção acontece exclusivamente nessas células porque o sítio de recombinação Cre/lox está localizado na região promotora do gene da insulina, que é expresso exclusivamente nesse tipo celular (69). A utilização desse modelo no estudo do DM1 é de grande proveito, uma vez que ela permite a deleção do HNF4 α exclusivamente nas células β e, também, que essa inibição seja induzida na vida pós-natal, o que impede que mecanismos compensatórios sejam desenvolvidos nas células a fim de garantir a homeostase tecidual.

A avaliação do papel do HNF4 α na fisiopatologia do DM é de grande interesse, visto que esse fator de transcrição está relacionado com o controle da expressão de diversos genes que agem na manutenção da função pancreática (69–71). Além disso, o desequilíbrio da expressão do HNF4 α parece estar relacionado com alterações no fenótipo das células das ilhotas pancreáticas, em especial as células β , o que interfere de forma significativa na arquitetura das ilhotas, bem como na manutenção do perfil diferenciados das células que a compõem (75–78). Desta forma, a utilização do modelo apresentado acima é de grande valia para esclarecer melhor o papel do HNF4 α na manutenção da função pancreática, bem como na arquitetura das ilhotas.

2.7. Regeneração da massa de células β em modelos animais

Sabe-se que a taxa de proliferação das células β é baixa em condições normais, contudo, em situação de grande perda da massa dessas células em função de uma injúria pode haver um aumento da proliferação desse tipo celular (15). Para tanto, são acionados mecanismos moleculares que buscam restaurar a massa funcional dessas células. É sabido que em casos de perda de grande massa de células β , células já diferenciadas da ilhota podem sofrer transdiferenciação em células secretoras de insulina (17). Além disso, células tronco presentes no pâncreas exócrino podem originar novas células β , a fim de restaurar a massa funcional de células secretoras de insulina nas ilhotas pancreáticas (79). Diversos sinalizadores de progressão do ciclo celular podem estar envolvidos nesses processos supracitados. Dentre eles, o PCNA (do inglês “*proliferating cell nuclear antigen*”), que é uma proteína cuja expressão é aumentada na fase S do ciclo celular (80). Essa proteína tem um importante papel na regulação da replicação do DNA e já foi descrita como um marcador de proliferação celular (81).

Já vem sendo demonstrado em modelos *in vitro* e em cultura primária de ilhotas pancreáticas que há um aumento da expressão do PCNA e de outros marcadores da progressão do ciclo celular em ilhotas expostas a ambientes desfavoráveis, tais como hiperglicemia ou ao polipetídeo INGAP (do inglês “*islet neogenesis- associated protein pentadecapeptide*”), que aumenta a secreção de insulina, levando a um quadro de estresse celular (82,83). Contudo, ainda se faz necessário confirmar esses achados em modelos *in vivo*, considerando que o microambiente da ilhota pode interferir nas respostas moleculares diante de alterações teciduais, tais como as que acometem as ilhotas durante o DM1.

2.8. Importância do estudo de vias envolvidas na destruição, disfunção e regeneração das células β no ambiente das ilhotas pancreáticas

Muito se investiga acerca dos mecanismos relacionados com a insulite e o DM1, porém esses estudos são, em sua maioria, conduzidos em linhagens de células β (*in vitro*) ou em ilhotas isoladas de animais (*in vivo*). Considerando-se, contudo, que o microambiente da ilhota exerce uma grande influência na função das células β , é de suma importância avaliar o comportamento dessas células em diferentes modelos animais, visando elucidar os conhecimentos sobre o desenvolvimento e estabelecimento do DM1. Portanto, este estudo visou avaliar a sinalização relacionada com a morte das células β no contexto da ilhota inserida no tecido pancreático, a fim de validar *in vivo* conhecimentos já descritos na literatura, além de investigar novos mecanismos relacionados com o desenvolvimento e estabelecimento da DM1 a partir de diferentes modelos experimentais.

3. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar, em diferentes modelos animais de DM1, massa de célula β e α assim como marcadores da proliferação e morte celular nas ilhotas pancreáticas, considerando os efeitos do microambiente e estrutura das ilhotas.

3.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito do exercício físico nas ilhotas de animais com DM1, induzido por doses múltiplas e baixas de streptozotocina, avaliando a massa de células α e β , assim como proliferação e morte de células presentes nessas ilhotas através de ensaios de imunohistoquímica;
- b) Avaliar a importância das enzimas NOX1 e NOX2, nas ilhotas de animais com DM1, induzido por doses baixas e múltiplas de streptozotocina, avaliando a massa de células α e β , assim como a proliferação e morte das células presentes nas ilhotas através de ensaios de imunohistoquímica;
- c) Avaliar a importância do fator de transcrição HNF4 α nas ilhotas de animais com knockout desse gene exclusivamente em células β , avaliando a massa de células α e β , assim como a proliferação e morte celular das células presentes nas ilhotas através de ensaios de imunohistoquímica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As metodologias empregadas *in vivo* neste projeto foram submetidas para aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP processo CEUA nº: 066/2015.

A parte de experimentação animal (4.1 a 4.3) faz parte de outros projetos do Laboratório do Estudo dos Mecanismos Moleculares da Morte das Células β pancreáticas nomeados: a); Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM por MLDZ; b) Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas e c) Avaliação do papel de HNF4 α na viabilidade de células β pancreáticas, e são descritos em mais detalhes abaixo. A segunda parte da metodologia apresentada (item 3.4) refere-se diretamente ao que foi desenvolvido nesse estudo.

4.1. Modelos animais utilizados no estudo:

4.1.1. Animais submetidos a treinamento de exercício aeróbico antes e após a indução da morte de células β pancreáticas

Foram utilizados camundongos machos linhagem C57BL/6 (6-7 semanas de idade, com 19-27g) adquiridos da Anilab animais de laboratório criação e comércio (Paulínia/SP, Brasil) que foram mantidos pelo Biotério do Departamento de Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo em gaiolas coletivas (até quatro animais por gaiola) à temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ sob ciclo de iluminação (claro/escuro) de 12/12 horas. O protocolo de treinamento utilizado neste estudo foi adaptado do protocolo descrito por Paula e colaboradores (84), lembrando que um mesmo número de animais foi manipulado similarmente aos animais treinados, porém deixados sem treinamento, como controle.

4.1.1.1. Fase de adaptação (3 semanas)

Nas primeiras duas semanas os animais permaneceram no biotério sem qualquer manipulação, com água e ração *ad libitum* para minimizar o estresse do transporte e se adaptar ao ambiente. Após ambientação os animais passaram por uma fase de adaptação ao treino, de

uma semana, com uma adaptação ao tapete rolante (AVS projetos- SP, Brasil), passando por cinco sessões de exercício leve com velocidade constante de 10 m/min iniciando com 10 minutos e progredindo ao longo da semana com a adição de 10 min/dia.

4.1.1.2. Fase de treino

Após a fase da adaptação e para determinar a carga de trabalho durante a fase de treino, todos os animais foram submetidos a um teste de velocidade máxima, cuja média dos valores foi utilizada para definir a prescrição do treino. O protocolo de exercício físico consistiu em 60 min/dia de corrida em tapete rolante a uma intensidade correspondente à aproximadamente 70% da velocidade máxima, por 5 dias por semana durante 3 semanas. O grupo sedentário (controle) permaneceu em suas gaiolas durante o período de treinamento.

4.1.1.3. Fase de manutenção do treino

Nessa fase os animais treinados continuaram o treino de 60 min/dia de corrida em tapete rolante a uma intensidade de aproximadamente 70% da velocidade máxima durante 5 dias/semana no período de indução ao diabetes. Após esse período alguns animais, tanto os treinados como controle, foram submetidos à indução ao diabetes, seguida do GTT e ao teste de tolerância à insulina (ITT) e, após confirmação do diabetes, foram eutanasiados para a coleta do pâncreas e realização dos experimentos.

4.1.2. Animais *knockout* (KO) para o gene NOX1 e NOX2

Foram utilizados camundongos *knockout* para os genes (KO) NOX1 e NOX2 machos, com aproximadamente 60 a 90 dias de vida, obtidos em parceria com o Laboratório de Sinalização Redox da professora Lúcia Rossetti Lopes e com o Laboratório de Neurobiologia Celular do professor Luiz Roberto G. de Britto, respectivamente. Os animais foram mantidos pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo em gaiolas coletivas (até quatro animais por gaiola) à temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ sob ciclo iluminação (claro/escuro) de 12/12 horas. Os animais foram submetidos

à indução ao diabetes, seguida do GTT e, após confirmação do diabetes (aproximadamente 7 dias), foram eutanasiados para a coleta do pâncreas e realização dos experimentos.

4.1.3. Animais nocaute (KO) específico em células β pancreáticas do gene HNF4 α

Para obtenção dos camundongos InsCre.HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$ foi realizado o cruzamento das matrizes homozigotas para o gene HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$ e heterozigotas para o gene InsCre, conforme descrito por Feil e col (74). Os animais foram mantidos pelo Biotério do Departamento de Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo em gaiolas coletivas (até quatro animais por gaiola) à temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ sob ciclo iluminação (claro/escuro) de 12/12 horas. Eventualmente, os animais foram pareados para o sexo e mantidos em gaiolas coletivas (um macho e uma fêmea por gaiola). As ninhadas provenientes do cruzamento foram desmamadas com 21 dias de vida e genotipadas para a confirmação da homozigose, e então foram separadas em dois grupos: a) Animais InsCre.HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$ e b) Animais controle (HNF4 $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$). Para a indução de nocaute específico em células β pancreáticas os animais machos de ambos os grupos receberam injeção por via intraperitoneal com 75mg/Kg de peso de Tamoxifen (#T5648, Sigma-Aldrich) diluído em óleo de gergelim (#3547-250, Sigma-Aldrich), por 5 dias consecutivos (75). Uma semana após a última injeção de Tamoxifen os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT), onde foi aferida a sua curva glicêmica a fim de confirmar a queda da função das ilhotas pancreáticas, condizente com indução de nocaute de HNF4 α nas células β . Uma semana após o GTT os animais foram eutanasiados, seu tecido pancreático foi coletado, fixado em formaldeído 4% e incluído em bloco de parafina e foi submetido a ensaios histológicos.

4.2. Indução ao diabetes

A indução ao diabetes se deu pelo protocolo de doses múltiplas e baixas de Streptozotocina (MLDZ), conforme previamente descrito (66). Foram feitas injeções de streptozotocin (STZ (Sigma-Aldrich)) por via intraperitoneal, a uma dose de 40mg/kg, por 5 dias consecutivos. No grupo controle foi administrada solução tampão sem STZ. Para avaliar as alterações na função pancreática, a concentração da glicose sanguínea foi aferida, inicialmente 4 dias após a última injeção e, a partir daí, em dias alternados. A hiperglicemia foi definida como uma concentração de glicose periférica maior que 200mg/dl em animais em restrição alimentar de pelo menos 8h em três medidas sequenciais.

4.3. Teste de tolerância à glicose (GTT)

Para o teste de tolerância à glicose (GTT) os animais foram deixados em jejum por 10 a 12 horas e foi aferida sua glicemia de jejum. Foi feita uma injeção intraperitoneal de glicose diluída em solução salina (NaCl à 0.9%) a uma dose de 1g/kg de peso corporal. A glicemia dos animais foi novamente aferida após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Os animais foram alimentados novamente, voltando às condições normais do biotério imediatamente.

4.4. Análise histológica de ilhotas dos modelos animais estudados

4.4.1. Coleta de pâncreas e inclusão do tecido em parafina

Após a eutanásia dos animais o pâncreas (porção final/cauda) foi coletado e imerso em banho de paraformaldeído ((Sigma-Aldrich) 4%, pH 7.4, 4°C) durante 24 horas. Após esse período os tecidos foram processados em banhos de etanol (70, 80, 95 e 100%, respectivamente) e xilol absoluto e incluídos em parafina. Foram feitos cortes seriados no tecido (5,0 µm de espessura) com micrótomo rotativo/semiautomático (Leica Biosystems) que foram estendidos em lâminas tratadas com poli-L-lisina (lâmina de vidro, SPlab) para ensaios imunológicos ou para coloração com Hematoxilina-Eosina.

4.4.2. Ensaios Histológicos

4.4.2.1. Coloração do tecido pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

Os tecidos depositados em lâminas tratadas com poli-L-lisina foram desparafinizados em xilol absoluto, hidratados em banho de álcool etílico (100, 95 e 70%, respectivamente) e então corados por Hematoxilina e Eosina e selados em goma de Damar. As lâminas foram fotodocumentadas em microscópio de luz (Axioskop 2 - Zeiss Primo Star Binocular) e analisadas com o auxílio do software ImageJ (NIH).

4.4.2.2. Imunomarcação em ilhotas pancreáticas

Os tecidos depositados em lâminas tratadas com poli-L-lisina foram desparafinizados em xilol absoluto, hidratados em banhos de álcool etílico (100, 95 e 70%, respectivamente) e submetidos aos ensaios de imunohistoquímica, que se utilizam dos seguintes passos: bloqueio de peroxidases endógenas (peróxido de hidrogênio a 10% em temperatura ambiente); exposição do epítipo antigênico (tampão citrato de sódio e Tween20 (Synth) 0,3% a 95°C, pH=6,02); bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos ([PSB e BSA 5%] e soro de cabra na proporção de 50%:50%); incubação do anticorpo primário ou solução de diluição (PSB e BSA 5%) sem anticorpo para o controle negativo da reação; incubação com anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase; revelação com Diamino-Benzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio a 30% (Synth); contracoloração com Hematoxilina de Mayer; e selagem em Goma de Damar. As lâminas foram foto-documentadas em microscópio de luz (Axioskop 2 - Zeiss Primo Star Binocular) e distribuição FIJI (85) do software ImageJ (NIH).

Os anticorpos primários utilizados foram anticorpo anti-insulina (1:500, doado pelo Dr. Leclercq-Meyer, Université Libre de Bruxelles, Belgium) e anti-glucagon (1:500, Dako North America); anti-NF- κ B p65 (1:200, Santa Cruz); anti-PCNA (1:200, ABCAM). O anticorpo secundário utilizado foi anti-rabbit peroxidase-labeled (1:200, Santa Cruz).

4.4.2.3. Avaliação das marcações

Os cortes histológicos foram analisados e fotodocumentados em microscópio de luz (Axioskop 2 - Zeiss Primo Star Binocular) e a quantificação foi realizada utilizando o software AXIOVISION rel.4.8 (Material Science Software for Research and Engineering, ZEISS Germany). As lâminas foram documentadas através de foto-micrografias com a objetiva no aumento de 10X para as lâminas coradas por HE; e de 40X para as lâminas submetidas aos ensaios de imunohistoquímica. A quantificação das áreas específicas foi feita com ajuda do software ImageJ (NIH) para o HE e com o *plugin* FIJI (85) desse software para os ensaios de imunohistoquímica. Para as análises morfométricas das lâminas submetidas a coloração por HE, foram utilizados três cortes seriados que foram analisados em relação a área total da ilhota (AI) corrigida pela área total do tecido (AT). Para a análise de marcação específica dos

diferentes tipos celulares, células α e β - imunomarcadas para insulina e glucagon, respectivamente, a área marcada especificamente para insulina (AI) ou para glucagon (AG) foi comparada a área total de ilhota. Finalmente, para marcação de PCNA e NF- κ B os núcleos marcados foram comparados ao número de núcleos totais na ilhota, evidenciados pela DAB, gerando um valor percentual de núcleos marcados.

4.4.2.4. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ SEM (erro padrão da média). As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas usando o teste *t* de Student (não-pareado), programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, inc., San Diego, CA, USA). A diferença foi considerada estatisticamente significativa com valor de $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM1 por MLDZ

A indução do DM1 foi confirmada após a glicemia de jejum dos animais permanecer aumentada (maior ou igual a 200mg/dl) por três dias consecutivos (ANEXO A). A marcação positiva para insulina em ilhotas de animais induzidos ao modelo de DM1 por MLDZ (Diabéticos) é significativamente diminuída quando comparada a marcação observada em ilhotas de animais Controle (Figura 1). O exercício físico não altera a quantidade de células β presentes nas ilhotas, porém tem a capacidade de prevenir a diminuição da marcação de células positivas para insulina nas ilhotas de animais Diabéticos (Figura 1). Interessantemente, ilhotas de animais Diabéticos apresentaram uma maior marcação para glucagon, comparados a ilhotas de animais Controle (Figura 1). Além disso, observa-se uma tendência a diminuição da marcação por glucagon em ilhotas de animais Treinados (Figura 1).

Ilhotas de animais Diabéticos também apresentaram uma diminuição da marcação de PCNA no núcleo, indicando menor proliferação, quando comparado a marcação observada em ilhotas de animais controle (Figura 2). Essa diminuição é prevenida pelo treinamento físico, com uma tendência a um aumento da proliferação nessas ilhotas (Figura 2). Interessante notar que essa marcação aparece mais forte em células da periferia das ilhotas (Figura 2A).

A indução do Diabetes leva a um aumento na marcação de NF- κ B (p65) no núcleo de células das ilhotas pancreáticas, quando comparado a animais controle (Figura 3), novamente esse aumento é prevenido pelo treinamento (Figura 3), com uma tendência a diminuir ainda mais essa marcação quando comparado ao controle.

B

Figura 1– Imuno-histoquímica para insulina e glucagon em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: *Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM por MLDZ*. **A**: Figuras representativas das marcações para cortes obtidos de 4 animais por grupo de: Controle; Diabético; Treinado e Treinados Diabéticos. Os pâncreas foram fixados, incluídos em parafina, seccionados e imunomarcados para Insulina ou Glucagon, conforme indicado na figura, a marcação foi revelada por DAB e peróxido de hidrogênio. **B**: Gráfico da quantificação das áreas marcadas para insulina (AI) ou glucagon (AG) corrigida para área total de ilhota (AT), os valores são apresentados como média $\pm$ SEM para os grupos controle (C), diabético (D), treinado (T) e treinado diabético (TD). * $p < 0,05$ vs controle, por teste-t não pareado.

B

Figura 2 - Imuno-histoquímica para PCNA em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: *Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM por MLDZ*. **A**: Figuras representativas das marcações para cortes obtidos de 4 animais por grupo de: Controle (C); Diabético (D); Treinado (T) e Treinados Diabéticos (TD). Os pâncreas foram fixados, incluídos em parafina, seccionados e imunomarcados para PCNA, conforme indicado na figura, a marcação foi revelada por DAB e peróxido de hidrogênio. **B**: Gráfico da quantificação do número de núcleos marcados para PCNA em relação ao número de núcleos totais observados na mesma ilhota (% de núcleos PCNA), os valores são apresentados como média ± SEM para os grupos controle (C), diabético (D), treinado (T) e treinado diabético (TD). * $p < 0,001$ vs controle, por teste-t não pareado.

Figura 3 - Imuno-histoquímica para NF- κ B em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: *Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM por MLDZ*. **A**: Figuras representativas das marcações para cortes obtidos de 4 animais por grupo de: Controle; Diabético; Treinado e Treinados e Diabéticos. Os pâncreas foram fixados, incluídos em parafina, seccionados e imunomarcados para NF- κ B (p65), conforme indicado na figura, a marcação foi revelada por DAB e peróxido de hidrogênio. **B**: Gráfico da quantificação do número de núcleos marcados para NF- κ B (p65) em relação ao número de núcleos totais observados na mesma ilhota (% de núcleos NF- κ B), os valores são apresentados como média $\pm$ SEM para os grupos controle (C), diabético (D), treinado (T) e treinado diabético (TD). * $p < 0,05$ vs controle, por teste-t não pareado.

5.2. Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas

A indução do DM1 foi confirmada após a glicemia de jejum dos animais permanecer aumentada (maior ou igual a 200mg/dl) por três dias consecutivos (ANEXO B). Parece haver uma diminuição da área de ilhota nos animais diabéticos, induzidos por MLDZ, porém esse resultado não é estatisticamente significativo devido ao baixo número de animais avaliados. Apesar disso, observamos uma tendência ao aumento de área de ilhotas nos animais KO tanto para NOX1 como para NOX2, esses dados deverão ser melhor avaliados no futuro (Figura 4).

Como esperado, a indução ao DM1 leva a uma diminuição na marcação de insulina em ilhotas tanto de animais controle como dos KO (knockout) para NOX1 e NOX2, ainda que não estatisticamente diferente, provavelmente devido ao número de animais estudado (Figura 5). A ausência de NOX1 ou NOX2 não parece afetar a quantidade de marcação para insulina, porém o uso do inibidor de NOX1, Apocinina (APO) leva a uma diminuição nessa marcação (Figura 5). Para o glucagon, observamos uma tendência ao aumento dessa marcação em ilhotas de animais KO, principalmente nos animais diabéticos, quando comparado a ilhotas de animais controle. Interessantemente, isso não foi observado nas ilhotas de animais tratados com APO (Figura 5).

Observamos marcação para PCNA e NF- κ B nas ilhotas dos animais estudados, a marcação para PCNA parece estar mais forte nas regiões periféricas nos animais não Diabéticos (Figura 6), porém devemos ainda quantificar esses resultados. Para NF- κ B parece haver um aumento da marcação em ilhotas de animais Diabéticos (Figura 7), mas esse resultado também ainda precisa ser melhor analisado.

Figura 4 - Cortes histológicos de pâncreas de camundongos do modelo de estudo: *Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas*. Os pâncreas coletados foram fixados, incluídos em parafina, seccionados e corados por hematoxilina e eosina. **A:** Figuras representativas de cortes obtidos de 4 animais por grupo de: controle (C); Diabéticos (D); tratados com apocinina (APO); animais knockout para NOX1 (KO1); animais knockout para NOX1 diabéticos (KO1D); animais knockout para NOX2 (KO2D); animais knockout para NOX2 diabéticos (KO2D). **B:** O gráfico da média $\pm$ SEM da área das ilhotas (AI)/área de pâncreas (AT) obtida para cada grupo, n=4 por grupo.

A

Figura 5– Imuno-histoquímica para insulina e glucagon em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: *Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas*. **A**: Figuras representativas das marcações para cortes obtidos de 3 animais por grupo de: Controle (C); Diabético (D); tratados com apocinina (APO); knockout para NOX1 (KO1); knockout para NOX1 diabéticos (KO1D); knockout para NOX2 (KO2D); knockout para NOX2 diabéticos (KO2D). Os pâncreas foram fixados, incluídos em parafina, seccionados e imunomarcados para Insulina ou Glucagon, conforme indicado na figura, a marcação foi revelada por DAB e peróxido de hidrogênio. **B**: Gráfico da quantificação das áreas marcadas para insulina (AI) ou glucagon (AG) corrigida para área total de ilhota (AT), os valores são apresentados como média $\pm$ SEM para cada grupo.

Figura 6 - Imuno-histoquímica para PCNA em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: *Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas*. São apresentadas figuras representativas das marcações para cortes obtidos de 3 animais por grupo de: Controle (C); Diabético (D); knockout para NOX1 (KO1); knockout para NOX1 diabéticos (KO1D); knockout para NOX2 (KO2D); knockout para NOX2 diabéticos (KO2D). Os pâncreas foram fixados, incluídos em parafina, seccionados e imunomarcados para PCNA, a marcação foi revelada por DAB e peróxido de hidrogênio.

Figura 7 - Imuno-histoquímica para NF- κ B em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: *Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas*. São apresentadas figuras representativas das marcações para cortes obtidos de 3 animais por grupo de: Controle (C); Diabético (D); knockout para NOX1 (KO1); knockout para NOX1 diabéticos (KO1D); knockout para NOX2 (KO2D); knockout para NOX2 diabéticos (KO2D). Os pâncreas foram fixados, incluídos em parafina, seccionados e imunomarcados para NF- κ B (p65), a marcação foi revelada por DAB e peróxido de hidrogênio.

4.3. Avaliação do papel de HNF4 α na viabilidade de células β pancreáticas

A indução do KO de HNF4 α por tamoxifen foi obtida, confirmada por GTT (ANEXO C), que mostrou uma intolerância à glicose nos animais HNF4 α ^{-/-} comparados aos animais controle (heterozigotos para a sequência Cre que, mesmo na presença do tamoxifen, não apresenta o KO induzido - HNF4 α ^{+/-}). Além disso, dados do nosso laboratório (não apresentados), mostram que as ilhotas desses animais apresentaram diminuição na expressão de HNF4a. Lembrando que esse KO é específico de células β , então outras células da ilhota expressam esse fator de transcrição e, portanto, a diminuição da expressão proteica de HNF4 α observada em *western blotting* corresponde ao lisado proteico total das ilhotas, e não somente as células β , onde pode haver uma completa inibição desse fator de transcrição.

A marcação dessas ilhotas para insulina e glucagon foi realizada com sucesso, porém temos o resultado de somente 1 animal para o grupo controle heterozigoto e 2 animais com o KO induzido. Nesses resultados iniciais o que mais chamou a atenção foi que a marcação tanto de insulina como de glucagon para os animais HNF4 α ^{-/-} foi mais central, diferindo dos animais controle (Figura 8).

Obtivemos marcação tanto para PCNA como para NF- κ B (p65) (figura 9), mas esses dados ainda devem ser analisados e o número de animais por grupo deve ser aumentado.

Figura 8 - Imuno-histoquímica para insulina e glucagon em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: *Avaliação do papel de HNF4α na viabilidade de células β pancreáticas*. São apresentadas figuras representativas das marcações para cortes obtidos de 1 animal Controle e dois animais KO para HNF4α (HNF4α^{-/-}). Os pâncreas foram fixados, incluídos em parafina, seccionados e imunomarcados para Insulina ou Glucagon, conforme indicado na figura, a marcação foi revelada por DAB e peróxido de hidrogênio.

Figura 9 - Imuno-histoquímica para PCNA e NF-κB em cortes de Pâncreas de camundongos do modelo de estudo: *Avaliação do papel de HNF4α na viabilidade de células β pancreáticas*. São apresentadas figuras representativas das marcações para cortes obtidos de 1 animal Controle e dois animais KO para HNF4α (HNF4α^{-/-}). Os pâncreas foram fixados, incluídos em parafina, seccionados e imunomarcados para PCNA ou NF-κB (p65), conforme indicado na figura, a marcação foi revelada por DAB e peróxido de hidrogênio.

6. DISCUSSÃO

6.1. O exercício protege as células β da destruição induzida por MLDZ

O exercício físico preveniu a diminuição da marcação de insulina - correspondente as células β funcionais - induzida pelo tratamento com MLDZ, que leva conhecidamente à destruição das células β quando há um ambiente pró-inflamatório nas ilhotas pancreáticas (63–65). Interessantemente, o MLDZ também leva à um aumento da marcação para glucagon - correspondente à massa de células α funcionais nessas ilhotas - o que também é prevenido pelo exercício físico. Esse dado corrobora com dados da literatura que mostram que, quando há uma queda da expressão de insulina, as células α aumentam a expressão do glucagon, uma vez que a insulina tem função inibitória sobre a secreção de glucagon (86,87). Essa descompensação, contudo, ocorre apenas em uma fase inicial da queda da insulina sendo que após algum tempo, a secreção do glucagon também tende a se desequilibrar (88). Esses achados, portanto, corroboram com o efeito protetor do exercício, que parece ser capaz de resgatar a função correta tanto nas células β como nas células α presentes na ilhota.

O exercício físico também preveniu a diminuição da marcação para PCNA, uma proteína relacionada com a proliferação celular, em ilhotas de animais com DM1 induzido por MLDZ. Dados da literatura mostram que o aumento da proliferação celular está relacionado à uma repopulação de células da ilhota, principalmente de células β em modelos de DM (79,89), portanto, nossos dados indicam que o reestabelecimento da proliferação nessas células da ilhota pode ser benéfico nesse modelo. Essa proliferação pode estar acontecendo tanto diretamente nas células β presentes nas ilhotas, como em outros tipos celulares. De fato, a marcação para PCNA nas ilhotas dos animais treinados diabéticos é mais presente na periferia, onde se localizam as células α em roedores (90). Existem diferentes mecanismos envolvidos no reaparecimento das células β em ilhotas de modelos animais, que implicam em basicamente 3 tipos principais: i) aumento da proliferação de células β (14); ii) proliferação e diferenciação de células tronco presentes no tecido pancreático em células β (15); iii) transdiferenciação de células α em células β (17). Esses mecanismos são observados em diferentes situações, comumente ocasionadas por injúrias, no tecido pancreático que interferem na homeostase desse tecido.

Já é sabido que, em situações de perda de grande de massa das células β , pode haver uma transdiferenciação de outras células presentes na ilhota em células β , a fim de restaurar a função pancreática normal (91,92). Um estudo realizado por Thorel e colaboradores (17) mostrou que,

em roedores, as células α podem se transdiferenciar em células β quando um grande volume de célula β é perdido. Um outro estudo realizado por Ye et al (93) mostrou que houve essa mesma adaptação em ilhotas pancreáticas de peixe-zebra após a indução da morte de um grande número de células β . Uma possível explicação para nossos dados seria, então, que a prevenção da queda dos níveis de insulina nos animais treinados com DM1 induzido poderia se dar em função da transdiferenciação de células α em células β . Além disso, é possível especular que as células α que estão proliferando futuramente poderão se transdiferenciar em células β .

Mostramos aqui, que a marcação para NF- κ B (p65) no núcleo (o que indica que esse fator de transcrição está ativo) aumenta em ilhotas de animais induzidos ao DM1 por MLDZ. A ativação de NF- κ B em células β em um contexto pro-inflamatório está relacionada ao desenvolvimento do DM1 (21,24,39,40), e leva a morte especificamente das células β (6,23,39). Desta forma, esse resultado mostra que o MLDZ induz a morte das células β . Interessantemente, também observamos que essa marcação é diminuída em animais diabéticos treinados, indicando mais uma vez um efeito benéfico do exercício.

Diversos estudos vêm mostrando a importância do exercício no tratamento do DM1 devido à modulação anti-inflamatória que a prática regular de exercício físico proporciona ao indivíduo diabético (58,59,94). Já é sabido que o NF- κ B participa da sustentação do sinal pró-apoptótico em modelos de DM1 através da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, aumentando a inflamação local, e da indução de genes relacionados com o estresse de RE (23,38). O NF- κ B também é ativado por citocinas pró-inflamatórias no DM1, o que contribui ainda mais para a morte celular (25). Uma queda dos níveis das citocinas pró-inflamatórias em função da prática de exercícios durante o DM1, como é relatado na literatura, poderia levar à diminuição da ativação do NF- κ B induzido por citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, reduzir a morte celular no DM1 (57,58,94). Portanto, a queda da marcação desse fator de transcrição observada é benéfica não apenas para a viabilidade das células β , como também para a diminuição da inflamação e de seus efeitos maléficos nas ilhotas pancreáticas (18,21,23,35,38,39). Outros estudos demonstraram, ainda, que a ausência do NF- κ B - seja ela em animais KO ou em *knockdown* em linhagens celulares - leva a uma proteção das células β da morte em um contexto inflamatório, novamente mostrando que a diminuição da ativação desse fator de transcrição está relacionada com a proteção da morte das células β , o que colabora com os dados aqui apresentados (24,95–98).

Juntos, esses dados indicam que o exercício não apenas induz a proliferação das células nas ilhotas pancreáticas submetidas ao MLDZ, como também pode estar prevenindo a morte das mesmas e, dessa maneira, diminuindo os malefícios do DM1 para a função pancreática e

colaborando com dados da literatura que já apontam o exercício não apenas como um coadjuvante ao tratamento de DM1, mas como uma escolha menos invasiva de tratamento, visto que a administração de insulina se dá por injeção subcutânea (5). Além disso, o exercício físico traz diversos efeitos benéficos para a função pancreática e para a diminuição da inflamação local nas ilhotas, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (57,61,99,100).

6.2. Avaliação do papel de NOX1 e NOX2 na viabilidade de células β pancreáticas

Após a indução do DM1 observamos uma tendência de diminuição da área das ilhotas pancreáticas tanto dos animais diabéticos, como dos animais KO para NOX1 diabéticos e para NOX2 diabéticos. Essa tendência, contudo, não é observada nos animais KO para NOX1 e para NOX2 não diabéticos. Semelhante ao que observamos nos animais KO não diabéticos, os animais tratados com Apocinina, - um inibidor da NOX1 que age de modo a impedir a ação dessa enzima (101,102) – parecem não apresentar uma variação na área das ilhotas. Uma possível explicação para isso seria que houve uma adaptação dos organismos KO e, uma vez que diferentes isoformas da NOX são expressas nas células β , pode ocorrer uma compensação funcional quando uma dessas isoformas é deletada ainda no período de desenvolvimento (48). Os animais tratados com Apocinina, por sua vez, sofrem a inibição da NOX1 no período pós-natal, de modo transiente, e, portanto, essa compensação não deve acontecer nesses animais.

A marcação para insulina, tanto nos animais diabéticos como nos animais tratados com Apocinina tende a ser menor do que nos animais controle, ressaltando a importância da NOX1 para a função pancreática e viabilidade das células β . Sabe-se que a ativação sustentada da NOX1 pode levar à disfunção das células β e que a queda da ativação dessa enzima diminui a secreção de insulina estimulada por glicose (49,50,103,104). Também já se sabe que a exposição prolongada das células β a altos níveis de glicose, como acontece no DM1, pode levar a um aumento da atividade das NOX o que levaria a um aumento dos níveis de ROS nessas células; e que esse aumento pode estar relacionado tanto com o aumento da atividade mitocondrial resultante do metabolismo de glicose (intoxicação celular por glicose), como pela indução da secreção de insulina dependente de glicose (105–107). Portanto, na ausência dessa enzima, a secreção de insulina é prejudicada, o que pode aumentar ainda mais os níveis glicêmicos e colaborar com a morte das células β por intoxicação relacionada à glicose. Além disso, o aumento da atividade das NOX está relacionado com o aumento da morte celular por apoptose (108) e, considerando que no DM1 a atividade dessas enzimas é induzida pelo aumento da glicemia (106), essa enzima também pode estar colaborando para a progressão da

doença. Interessantemente, os animais KO para NOX1 e NOX2 não tiveram queda na marcação de insulina e, como já discutido anteriormente, esses animais podem desenvolver um mecanismo de compensação em função da ausência de uma das isoformas da enzima, não afetando, desta maneira, a secreção de insulina na ausência de apenas uma das isoformas da NOX.

Como esperado, os animais diabéticos apresentaram um aumento na marcação para glucagon nas ilhotas pancreáticas. Já nos animais tratados com apocinina esse aumento não foi observado, o que colabora com dados da literatura que mostram que as NOX estão relacionadas com a secreção de insulina e que, mesmo na presença de um inibidor para alguma dessas enzimas, a síntese de outros hormônios nas ilhotas pancreáticas não deve ser alterada (49,103,104,109).

Em relação aos marcadores de proliferação (PCNA) e morte celular (NF- κ B), assim como foi observado no modelo de exercício, a marcação para PCNA na periferia das ilhotas pode estar relacionada com uma tentativa de realizar a manutenção da massa funcional de células nas ilhotas pancreáticas através da transdiferenciação das células α em células β secretoras de insulina. Além disso, um aparente aumento da marcação para NF- κ B nos animais diabéticos colabora com essa hipótese, visto que o aumento da taxa de morte celular leva ao estímulo da proliferação para que se restaure a homeostase tecidual (79). Contudo, ainda é necessário avaliar esses resultados para que se confirme quantitativamente o que está sendo observado nas lâminas histológicas.

6.3 Avaliação do papel de HNF4 α na viabilidade de células β pancreáticas

Nossos resultados ainda são preliminares, mas mesmo com um número reduzido de animais foi observado que a deleção do HNF4 α parece modificar a arquitetura das ilhotas, o que mostra que pode haver um papel desse fator de transcrição na manutenção dessa arquitetura mesmo após o desenvolvimento. Sabe-se que a manutenção das ilhotas pancreáticas se dá por diferentes fatores, tais como o fenótipo diferenciado de cada um dos tipos células que a compõe e os genes reguladores desse fenótipo (76,77,90). Foi observado por Hamilton e colaboradores (78) que pacientes com alterações no gene do HNF4 α apresentam modificações no fenótipo das células β , o que poderia resultar em alterações na organização das ilhotas. Também já foi descrito na literatura que, em modelos *in vitro* o HNF4 α tem um importante papel na

manutenção do fenótipo diferenciado das células β (76) e que, alterações na expressão desse fator de transcrição podem culminar na perda desse fenótipo (77).

Alinhado ao que se observou na arquitetura da ilhota, tanto a marcação para insulina como para glucagon que foi observada na região central das ilhotas dos animais KO induzido indica uma desorganização nessas ilhotas, visto que, em roedores, a marcação para glucagon, que corresponde às células α , comumente se dá na região periférica das ilhotas, onde essas células se localizam (90). Essas observações mostram, ainda, a importância da realização de estudos *in vivo*, visando avaliar o ambiente da ilhota como um todo e, em especial nesse modelo, o relacionamento das células β com o ambiente no qual elas estão inseridas. Além disso, é interessante avaliar se, quando da indução do DM1, essas modificações hipotetizadas a partir de estudos *in vitro* se confirmam.

As ilhotas dos animais com deleção do HNF4 α revelaram marcação tanto para proliferação (PCNA), como para morte (NF- κ B) celular. Assim como sugerimos para os modelos de DM1 induzido, nesse modelo também pode haver uma transdiferenciação de outros tipos celulares em células secretoras de insulina a fim de restaurar a massa de células funcionais nas ilhotas, visto que o HNF4 α tem um importante papel na secreção de insulina em resposta à glicose e sua deleção prejudica a regulação da secreção de insulina pelas células β (68,69). Dados do nosso laboratório mostram, ainda, que a deleção do HNF4 α específica em células β de camundongos leva à proteção da morte celular induzida por citocinas em cultura primária (dados não publicados), o que indica um importante papel desse fator de transcrição na progressão do DM. Esses dados colaboram com o que foi observado por Sato e colaboradores (72) em um estudo que mostrou que, quando a queda da expressão do HNF4 α foi induzida em células β cultivadas, houve uma queda da morte celular, enquanto que, quando da superexpressão desse fator de transcrição, observou-se um aumento da morte dessas células por apoptose. Juntos, esses dados indicam que o HNF4 α pode exercer importante papel na homeostase das células β e na regulação da função e organização das ilhotas pancreáticas.

Sabe-se que o HNF4 α é um fator de transcrição com importante papel na manutenção da função e diferenciação das células β (75). Além disso, esse fator de transcrição também desempenha uma importante função no controle da homeostase do RE (72), e está relacionado com a transcrição de genes importantes para o desempenho correto da função pancreática, além de induzir genes relacionados com o metabolismo de glicose e a síntese de insulina induzida por glicose (69–71). Por isso, o estudo *in vivo* de vias relacionadas a esse fator de transcrição é de grande importância para entender melhor o papel por ele exercido no DM1. A utilização de um modelo de KO induzível no período pós-natal para o HNF4 α é de grande relevância,

considerando que esse modelo de KO evita que mecanismos de compensação sejam desenvolvidos pelas células para balancear a ausência dessa proteína e permite o estudo das ilhotas em seu ambiente natural, onde a mesma sofre influência do meio em que está inserida.

7. CONCLUSÕES

Muitos estudos de DM1 *in vivo* se baseiam na cultura primária de ilhotas pancreáticas, contudo, sabe-se que essas ilhotas não sobrevivem a um grande período em cultura celular, visto que essas são retiradas de seu ambiente natural e sofrem grande estresse celular, o que leva à sua morte. Esse trabalho buscou avaliar diferentes modelos de DM1 a fim de demonstrar a importância da utilização de modelos em animais, visto que esses modelos permitem a investigação de mecanismos fisiopatológicos da doença em um ambiente capaz de mimetizar o quadro observado em pacientes. Faz-se necessário aperfeiçoar os métodos aqui utilizados, contudo nossos resultados indicam que há uma grande importância na observação das ilhotas em seu ambiente natural, bem como na influência que esse ambiente exerce sobre elas e vice-versa.

REFERÊNCIAS¹

1. Care D, Suppl SS. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetesd2018. Diabetes Care. 2018;41(January):S13–27.
2. Diabetes DOF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2012;35(SUPPL. 1).
3. Care D, Suppl SS. 4 . Lifestyle Management : Standards of Medical Care in Diabetes d 2018. 2018;41(January):38–50.
4. The diabetes control and complications trial research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin denpedent diabetes mellitus. N Engl J Med. 1993;329:987–94.
5. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. Lancet [Internet]. 2014;383(9911):69–82. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
6. Mathis D, Vence L, Benoist C. B-Cell Death During Progression To Diabetes. Nature. 2001;414(6865):792–8.
7. Höglund P, Mintern J, Waltzinger C, Heath W, Benoist C, Mathis D. Initiation of Autoimmune Diabetes by Developmentally Regulated Presentation of Islet Cell Antigens in the Pancreatic Lymph Nodes. J Exp Med [Internet]. 1999;189(2):331–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192987&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.189.2.331>
8. Trudeau JD, Dutz JP, Arany E, Hill DJ, Fieldus WE, Finegood DT. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? Diabetes [Internet]. 2000;49(1):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10615942>
9. Scaglia L, Cahil C, Finegood D, Bonner-Weir S. Apoptosis Participates in the Remodelling of the Endocrine Pancreas. Endocrinology [Internet]. 1997;138(4):1736–41. Available from: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/endo.138.4.5069>
10. Shapiro AMJ, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation. N Engl J Med [Internet]. 2006;355(13):1318–30. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa061267>
11. Rother KI, Harlan DM. Challenges facing islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes mellitus. J Clin Invest [Internet]. 2004;114(7):877–83. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa061267>
12. A.m. j ames s hapiro , m.b., b.s., j onathan r.t. l akey , p h .d., e dmond a. R yan , m.d., g regory s. K orbitt , p h .d., e llen t oth , m.d., garth l. W arnock , m.d., n orman m. K neteman , m.d., and r ay v. R ajotte ph. . Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N engl j med. 2000;343:230–8.

* De acordo com Estilo Vancouver

13. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005;54(7):2060–9.
14. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than β -cell differentiation. *Nature*. 2004;429(model 3):41–6.
15. Xu X, D'Hoker J, Stangé G, Bonn S, De Leu N, Xiao X, et al. β Cells Can Be Generated from Endogenous Progenitors in Injured Adult Mouse Pancreas. *Cell*. 2008;132(2):197–207.
16. Chera S, Baronnier D, Ghila L, Cigliola V, Jensen JN, Gu G, et al. Diabetes Recovery By Age-Dependent Conversion of Pancreatic δ -Cells Into Insulin Producers Simona. 2015;514(7523):503–7.
17. Fabrizio Thorel, Virginie Npote, Isabelle Avril, Kenji Kohno, Renaud Desgraz, Simona Chera and PLH. Conversion of Adult Pancreatic α -cells to β -cells After Extreme β -cell Loss. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;10(4):403–11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC2768754/pdf/nihms151335.pdf>
18. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulitis and B-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(4):219–26.
19. Ortis F, Naamane N, Flamez D, Ladrie L, Moore F, Cunha D a, et al. Cytokines interleukin-1b and TNF-a regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary beta cells. *Diabetes* [Internet]. 2010;59:358–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934004>
20. Ortis F, Cardozo AK, Crispim D, Strting J, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL. Cytokine-Induced Proapoptotic Gene Expression in Insulin-Producing Cells Is Related to Rapid, Sustained, and Nonoscillatory Nuclear Factor- κ B Activation. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2006;20(8):1867–79. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2005-0268>
21. Lamhamedi-Cherradi S-E, Zheng S, Hilliard B a, Xu L, Sun J, Alsheadat S, et al. Transcriptional regulation of type I diabetes by NF-kappa B. *J Immunol* [Internet]. 2003;171(9):4886–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568969>
22. Meyerovich K, Fukaya M, Terra LF, Ortis F, Eizirik DL, Cardozo AK. The non-canonical NF- κ B pathway is induced by cytokines in pancreatic beta cells and contributes to cell death and proinflammatory responses in vitro. *Diabetologia*. 2016;59(3):512–21.
23. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death - The signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001;44(12):2115–33.
24. Eldor R, Yeffet A, Baum K, Doviner V, Amar D, Ben-Neriah Y, et al. Conditional and specific NF- B blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2006;103(13):5072–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508166103>
25. Ortis F, Miani M, Colli ML, Cunha DA, Gurzov EN, Allagnat F, et al. Differential usage of NF- κ B activating signals by IL-1 β and TNF- α in pancreatic beta cells. *FEBS Lett*. 2012;586(7):984–9.
26. Drews G, Krippeit-Drews P, Dufer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2010;460(4):703–18.

27. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable β -cell. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2008;36(3):343–7. Available from: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST0360343>
28. Maiese K. New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015(Dm):46–9.
29. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the DESCRIPTION OF DIABETES CATEGORIES OF GLUCOSE. *Diabetes Care* [Internet]. 2003;26(suppl 1):5–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502614>
30. Zipris D. Innate immunity and its role in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008;15(4):326–31.
31. Guerrero-hernández A, Leon-aparicio D, Chavez-reyes J, Olivares-reyes JA, Dejesus S. Cell Calcium Endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *Cell Calcium* [Internet]. 2014;56(5):311–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2014.08.006>
32. Xie Z, Chang C, Zhou Z. Molecular Mechanisms in Autoimmune Type 1 Diabetes: a Critical Review. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2014;47(2):174–92. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12016-014-8422-2>
33. Green EA, Eynon EE, Flaveirti RA. Local expression of TNF α in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. *Immunity*. 1998;9(5):733–43.
34. Stojanovic I, Saksida T, Stosic-Grujicic S. Beta cell function: The role of macrophage migration inhibitory factor. *Immunol Res*. 2012;52(1–2):81–8.
35. Kim K, Lee M. Recent progress in research on beta-cell apoptosis by cytokines. *Front Biosci (Landmark Ed)* [Internet]. 2009;14(Jan 1):657–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273093>
36. Karin M. The Beginning of the End: I B Kinase (IKK) and NF- B Activation. *J Biol Chem* [Internet]. 1999;274(24):27339–42. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.274.39.27339>
37. Meyerovich K, Ortis F, Cardozo AK. The non-canonical NF- κ B pathway and its contribution to β -cell failure in diabetes. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 2018;61(2):F1–6. Available from: <https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/61/2/JME-16-0183.xml>
38. Gasparini C, Feldmann M. NF- κ B as a Target for Modulating Inflammatory Responses. *Curr Pharm Des*. 2012;18:5735–45.
39. Melloul D. Role of NF- κ B in β -cell death: Figure 1. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2008;36(3):334–9. Available from: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST0360334>
40. Salem HH, Trojanowski B, Fiedler K, Maier HJ, Schirmbeck R, Wagner M, et al. Long-term IKK2/NF- κ B signaling in pancreatic β -cells induces immune-mediated diabetes. *Diabetes*. 2014;63(3):960–75.
41. Pirot P, Eizirik DL, Cardozo AK. Interferon- γ potentiates endoplasmic reticulum stress-

- induced death by reducing pancreatic beta cell defence mechanisms. *Diabetologia*. 2006;49(6):1229–36.
42. Meares GP, Fontanilla D, Broniowska KA, Andreone T, Lancaster JR, Corbett JA. Differential responses of pancreatic β -cells to ROS and RNS. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2013;304(6):E614–22. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00424.2012>
 43. Pieper GM, Roza AM, Henderson JD, Zhu YR, Lai CS. Spatial distribution and temporal onset of NF- κ B activation and inducible nitric oxide synthase within pancreatic islets in the pre-diabetic stage of genetic, diabetic-prone BB rats: Attenuation by drug intervention decreases inflammatory cell infiltration. *Inflamm Res*. 2004;53(1):22–30.
 44. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* [Internet]. 1999;93(5):1464–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029572>
 45. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2014;76:208–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046>
 46. Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, Gorąca A. The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012;60(4):277–94.
 47. Bedard K, Krause K-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* [Internet]. 2007;87(1):245–313. Available from: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00044.2005>
 48. Rebelato E, Mares-Guia TR, Graciano MFR, Labriola L, Britto LRG, Garay-Malpartida HM, et al. Expression of NADPH oxidase in human pancreatic islets. *Life Sci* [Internet]. 2012;91(7–8):244–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.07.004>
 49. Weaver JR, Taylor-Fishwick DA. Regulation of NOX-1 expression in beta cells: A positive feedback loop involving the Src-kinase signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2013;369(1–2):35–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.01.011>
 50. Weaver JR, Grzesik W, Taylor-Fishwick DA. Inhibition of NADPH oxidase-1 preserves beta cell function. *Diabetologia* [Internet]. 2015 Jan 3 [cited 2018 Aug 21];58(1):113–21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-014-3398-2>
 51. Weaver JR, Holman TR, Imai Y, Jadhav A, Kenyon V, Maloney DJ, et al. Integration of pro-inflammatory cytokines, 12-lipoxygenase and NOX-1 in pancreatic islet beta cell dysfunction. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2012;358(1):88–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.03.004>
 52. Gavazzi G, Banfi B, Deffert C, Fiette L, Schappi M, Herrmann F, et al. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett*. 2006;580(2):497–504.
 53. Pollock JD, Williams DA, Gifford MAC, Li LL, Du X, Fisherman J, et al. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet*. 1995;9(2):202–9.
 54. Tonoli C, Heyman E, Roelands B, Buyse L, Cheung SS, Berthoin S, et al. Effects of Different Types of Acute and Chronic (Training) Exercise on Glycaemic Control in Type 1 Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. [Review]. *Sport Med* [Internet]. 2012;42(12):1059–80. Available from:

- <http://link.springer.com/article/10.1007/BF03262312%5Cnhttp://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF03262312.pdf>
55. Ikeda SI, Tamura Y, Kakehi S, Sanada H, Kawamori R, Watada H. Exercise-induced increase in IL-6 level enhances GLUT4 expression and insulin sensitivity in mouse skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2016;473(4):947–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.159>
 56. Rosa JS, Galassetti PR. Altered molecular adaptation to exercise in children with type 1 diabetes: Beyond hypoglycemia. *Pediatr Diabetes*. 2009;10(3):213–26.
 57. Oharomari LK, de Moraes C, Navarro AM. Exercise Training but not Curcumin Supplementation Decreases Immune Cell Infiltration in the Pancreatic Islets of a Genetically Susceptible Model of Type 1 Diabetes. *Sport Med - Open*. 2017;3(1).
 58. Glaucia Regina Borba-Murad1 JCBKBPC, Clairce Luzia Salgueiro-Pagadigorria 2 RBB 3, Souza RS dos SF da S 4 and HM de. Type 1 diabetes: can exercise impair the autoimmune event? The L-arginine/glutamine coupling hypothesis. *Cell Biochem Funct*. 2008;26(April 2007):406–433.
 59. Osório J. Diabetes: IL-6 mediates the protective effects of exercise on β cells. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2015;11(4):193. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.12>
 60. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and Diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2005;54(suppl2):S114 LP-S124. Available from: http://diabetes.diabetesjournals.org/content/54/suppl_2/S114.abstract
 61. Russell MA, Cooper AC, Dhayal S, Morgan NG. Differential effects of interleukin-13 and interleukin-6 on Jak/STAT signaling and cell viability in pancreatic beta-cells. *Islets* [Internet]. 2013;5(2):95–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23510983>
 62. Paula FMM, Leite NC, Vanzela EC, Kurauti MA, Freitas-Dias R, Carneiro EM, et al. Exercise increases pancreatic β -cell viability in a model of type 1 diabetes through IL-6 signaling. *FASEB J* [Internet]. 2015;29(5):1805–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609426>
 63. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537–46.
 64. Diab RAH, Fares M, Abedi-Valugerdi M, Kumagai-Braesch M, Holgersson J, Hassan M. Immunotoxicological effects of streptozotocin and alloxan: In vitro and in vivo studies. *Immunol Lett* [Internet]. 2015;163(2):193–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2014.12.006>
 65. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-Induced Pancreatic Insulitis : New Model of Diabetes Mellitus Streptozotocin-Induced Pancreatic Insulitis : New Model of Diabetes Mellitus. *Adv Sci*. 1976;193(4251):415–7.
 66. Leiter EH. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(January):630–4.
 67. Anik A, Çatli G, Abaci A, Böber E. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): An update. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015;28(3–4):251–63.

68. Kapoor RR, Heslegrave A, Hussain K. Congenital Hyperinsulinism due to mutations in HNF4A and HADH. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11(3):185–91.
69. Gupta RK, Vatamaniuk MZ, Lee CS, Flaschen RC, Fulmer JT, Matschinsky FM, et al. The MODY1 gene HNF-4 α regulates selected genes involved in insulin secretion. *J Clin Invest* [Internet]. 2005;115(4):1006–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761495> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1059446>
70. Markku Lehto, Per-Olof Bitzén, Bo Isomaa, Charlotta Wipemo, Ylva Wessman, Carol Forsblom, Tiinamaija Tuomi, Marja-Riitta Taskinen and LG. Mutation in the HNF-4 Gene Affects Insulin Secretion and Triglyceride Metabolism. *Diabetes*. 2000;49(January):126–30.
71. Stoffel M, Duncan SA. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997;94(24):13209–14. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.94.24.13209> <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.94.24.13209>
72. Sato Y, Hatta M, Karim MF, Sawa T, Wei FY, Sato S, et al. Anks4b, a novel target of HNF4 α protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *J Biol Chem*. 2012;287(27):23236–45.
73. Feil S, Krauss J, Thunemann M, Feil R. Genetic Inducible Fate Mapping in Adult Mice Using Tamoxifen-Dependent Cre Recombinases. In Humana Press, New York, NY; 2014 [cited 2018 Oct 8]. p. 113–39. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1215-5_6
74. Feil S, Valtcheva N, Feil R. Inducible Cre Mice. In Humana Press; 2009 [cited 2018 Oct 8]. p. 343–63. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-471-1_18
75. Moore BD, Khurana SS, Huh WJ, Mills JC. Hepatocyte nuclear factor 4 α is required for cell differentiation and homeostasis in the adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2016;311(2):G267–75. Available from: <http://ajpgi.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpgi.00195.2016>
76. Boj SF, Parrizas M, Maestro MA, Ferrer J. A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2001;98(25):14481–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.241349398>
77. Shih DQ, Stoffel M. Dissecting the transcriptional network of pancreatic islets during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2001;98(25):14189–91. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.251558998>
78. Hamilton AJ, Bingham C, McDonald TJ, Cook PR, Caswell RC, Weedon MN, et al. The HNF4A R76W mutation causes atypical dominant Fanconi syndrome in addition to a β cell phenotype. *J Med Genet*. 2014;51(3):165–9.
79. Collombat P, Xu X, Heimberg H, Mansouri A. Pancreatic beta-cells: From generation to regeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(8):838–44.
80. RODRIGO BRAVO and JULIO E. CELIS. A Search for Differential Polypeptide Synthesis THROUGHOUT THE CELL CYCLE OF HELA CELLS. *J Cell Biol*.

- 1980;84(March).
81. Kelman Z. PCNA: Structure, functions and interactions. *Oncogene*. 1997;14(6):629–40.
 82. Hsu S, Fu SH, Chen ST, Hsu BRS. Hyperglycemia In Vitro Up-Regulates Growth-Related Cell Cycle Proteins of Adult Mouse Pancreatic Islets. *Transplant Proc* [Internet]. 2009;41(1):339–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.087>
 83. Zha M, Zhang M, Shan S, Xu KF, Chen H, Xu XY, et al. Effects of islet neogenesis-associated protein pentadecapeptide on cell mass and insulin secretion of pancreatic β -cells. *J Endocrinol Invest*. 2012;35(7):634–9.
 84. Paula FMM, Leite NC, Vanzela EC, Kurauti MA, Freitas-Dias R, Carneiro EM, et al. Exercise increases pancreatic β -cell viability in a model of type 1 diabetes through IL-6 signaling. *FASEB J* [Internet]. 2015;29(5):1805–16. Available from: <http://www.fasebj.org/lookup/doi/10.1096/fj.14-264820>
 85. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open source platform for biological image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676–82.
 86. Weir GC, Knowlton SD, Atkins RF, McKennan KX, Martin DB. Glucagon secretion from the perfused pancreas of streptozotocin-treated rats. *Diabetes* [Internet]. 1976;25(4):275–82. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diabetes.25.4.275>
 87. Cooperberg BA, Cryer PE. Insulin reciprocally regulates glucagon secretion in humans. *Diabetes*. 2010;59(11):2936–40.
 88. Taborsky JR. GJ. the Physiology of glucagon. *J Diabetes Sci Technol*. 2010;4(6):1338–44.
 89. Cerf ME. Beta cell dynamics: Beta cell replenishment, beta cell compensation and diabetes. *Endocrine*. 2013;44(2):303–11.
 90. Arrojo e Drigo R, Ali Y, Diez J, Srinivasan DK, Berggren PO, Boehm BO. New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. *Diabetologia*. 2015;58(10):2218–28.
 91. Wang P, Fiaschi-Taesch NM, Vasavada RC, Scott DK, García-Ocaña A, Stewart AF. Diabetes mellitus-advances and challenges in human β -cell proliferation. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2015;11(4):201–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.9>
 92. Desgraz R, Bonal C, Herrera PL. β -Cell regeneration: The pancreatic intrinsic faculty. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2011;22(1):34–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2010.09.004>
 93. Ye L, Robertson MA, Hesselson D, Stainier DYR, Anderson RM. Glucagon Is Essential for Alpha Cell Transdifferentiation and Beta Cell Neogenesis. *Development* [Internet]. 2015;142(8):1407–17. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.117911>
 94. Pedersen BK, Fischer CP. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(3):265–71.
 95. Nagesha Guthalu Kondegowda, Rafael Fenutria, Ilana Pollack, Michael Orthofer,

- Adolfo Garcia-Ocaña¹, Josef Penninger⁴ and RCV. Osteoprotegerin and Denosumab Stimulate Human Beta Cell Proliferation through Inhibition of the Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) Pathway. *cell metab.* 2015;4(11):77–85.
96. Chan JY, Biden TJ, Laybutt DR. Cross-Talk between the unfolded protein response and nuclear factor- κ B signalling pathways regulates cytokine-Mediated beta cell death in MIN6 cells and isolated mouse islets. *Diabetologia.* 2012;55(11):2999–3009.
 97. Ogasawara A, Simizu S, Ito A, Kawai T, Saisho Y, Takei I, et al. Inhibition of NO-induced β -cell death by novel NF- κ B inhibitor (-)-DHMEQ via activation of Nrf2-ARE pathway. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013;433(2):181–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.062>
 98. Zheng S, Zhao M, Ren Y, Wu Y, Yang J. Sesamin suppresses STZ induced INS-1 cell apoptosis through inhibition of NF- κ B activation and regulation of Bcl-2 family protein expression. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2015;750:52–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.031>
 99. Russell MA, Morgan NG. The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic β -cell. *Islets.* 2014;6(3):1–10.
 100. Linnemann AK, Blumer J, Marasco MR, Battiola TJ, Umhoefer HM, Han JY, et al. Interleukin 6 protects pancreatic b cells from apoptosis by stimulation of autophagy. *FASEB J.* 2017;31(9):4140–52.
 101. Petrônio MS, Zeraik ML, Da Fonseca LM, Ximenes VF. Apocynin: Chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. *Molecules.* 2013;18(3):2821–39.
 102. Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11(1):95–102.
 103. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S, et al. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia.* 2007;50(2):359–69.
 104. Morgan D, Rebelato E, Abdulkader F, Graciano MFR, Oliveira-Emilio HR, Hirata AE, et al. Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic β -cells. *Endocrinology.* 2009;150(5):2197–201.
 105. Tsubouchi H, Inoguchi T, Inuo M, Kakimoto M, Sonta T, Sonoda N, et al. Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic β -cell line, MIN6-a role of NAD(P)H oxidase in β -cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;326(1):60–5.
 106. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, et al. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* [Internet]. 1999 Apr 1 [cited 2018 Oct 14];48(4):927–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102716>
 107. Tanaka Y, Gleason CE, Oseid EA, Hunter-Berger KK, Tran POT, Harmon JS, et al. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and ZDF rats by an antioxidant, N-acetyl-L-cysteine. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(3):10857–62.
 108. Yuan H, Zhang X, Huang X, Lu Y, Tang W, Man Y, et al. NADPH oxidase 2-derived

- reactive oxygen species mediate FFAs-Induced dysfunction and apoptosis of β -Cells via JNK, p38 MAPK and p53 pathways. PLoS One. 2010;5(12):1–9.
109. Weaver JR, Grzesik W, Taylor-Fishwick DA. Inhibition of NADPH oxidase-1 preserves beta cell function. Diabetologia. 2015;58(1):113–21.

ANEXOS

ANEXO A - Evolução da glicemia (mg/dl) e do peso corporal (g) dos animais submetidos ao protocolo de treinamento após a indução do DM1

Glicemia (mg/dl)					
	1° dia após STZ	3° dia após STZ	5° dia após STZ	7° dia após STZ	9° dia após STZ
C (n=4)	125,5	155	132,25	176,5	150
D (n=4)	159	192,75	242,5	281,25	267,75
T (n=4)	165,75	164,25	152,5	145	165,5
TD (n=4)	143,75	162,75	205,25	229	223,25

Tabela 1 - Evolução da glicemia dos animais submetidos ao protocolo de exercício após a indução do DM1 por STZ. A glicemia foi aferida com jejum de 4 horas, em dias alternados após a última injeção de STZ. Os animais foram considerados diabéticos quando a glicemia foi maior ou igual a 200mg/dl em três medições seguidas.

Peso Corporal (g)					
	1° dia após STZ	3° dia após STZ	5° dia após STZ	7° dia após STZ	9° dia após STZ
C (n=4)	24	23,75	24,25	24,25	24,5
D (n=4)	22,25	22,25	23	22,75	22,75
T (n=4)	23,5	23,5	24	24,75	24
TD (n=4)	24,5	25	25	25,25	25,25

Tabela 2 - Evolução do peso corporal dos animais submetidos ao protocolo de exercício após a indução do DM1 por STZ. Os valores mostrados correspondem à média do peso dos animais em cada grupo.

ANEXO B - Evolução da glicemia (mg/dl) e peso corporal (g) dos animais KO para NOX1 e NOX2 após a indução do DM1

Glicemia (mg/dl)						
	1° dia após STZ	3° dia após STZ	5° dia após STZ	7° dia após STZ	9° dia após STZ	11° dia após STZ
C (n=3)	163,2	180,2	167,4	181,6	158	178,6
D (n=3)	140	224,4	294,6	293,4	343	423,2
KO1 (n=3)	194,2	167,6	156,4	189	169,6	184,6
KO1D (n=3)	151	202	274	391	343,8	364,4
KO2 (n=3)	149,2	161,6	154	162,2	154,2	173,6
KO2D (n=3)	138,4	218,8	335,6	378,2	412	496,8

Tabela 3 - Evolução da glicemia dos animais KO para NOX1 e NOX2 após a indução do DM1 por STZ. A glicemia foi aferida com jejum de 4 horas, em dias alternados após a última injeção de STZ. Os animais foram considerados diabéticos quando a glicemia foi maior ou igual a 200mg/dl em três medições seguidas.

Peso Corporal (g)						
	1° dia após STZ	3° dia após STZ	5° dia após STZ	7° dia após STZ	9° dia após STZ	11° dia após STZ
C (n=3)	25	25,8	25,2	25	25,4	26,2
D (n=3)	24,2	24,6	24,4	24,2	24,2	25,2
KO1 (n=3)	27,4	27,2	26,6	27,4	27	27,6
KO1D (n=3)	26,2	26,2	26	26,6	26,4	26,6
KO2 (n=3)	24,2	24,2	24,2	24,2	24,4	25
KO2D (n=3)	23	23,3	24	23,2	23,2	24,6

Tabela 4 - Evolução do peso corporal dos animais KO para NOX1 e NOX2 após a indução do DM1 por STZ. Os valores mostrados correspondem à média do peso dos animais em cada grupo.

ANEXO C - Teste de tolerância à glicose realizado nos animais com KO para HNF4 α exclusivo nas células β após a indução do KO com Streptozotocina.

Figura 10 - Teste de tolerância à glicose (GTT) realizado nos animais com KO para HNF4 α exclusivo nas células β . O teste foi conduzido 7 dias após a indução do KO por Tamozen. Os valores mostrados correspondem à média da glicemia para os animais dos grupos HNF4 α ^{-/-} (n=2) e HNF4 α ^{-/+} (n=1) nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120.