

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

RAFAEL TEIXEIRA DO NASCIMENTO

**Estudo dos efeitos da combinação de hormônios esteroides e ácidos  
graxos sobre a fisiologia de células secretoras de insulina**

Dissertação de Mestrado Orientadora:  
Profa. Dra. Anna Karenina Azevedo Martins

SÃO PAULO  
2022

RAFAEL TEIXEIRA DO NASCIMENTO

**Estudo dos efeitos da combinação de hormônios esteroides e ácidos  
graxos sobre a fisiologia de células secretoras de insulina**

**Versão Original**

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Karenina Azevedo Martins.

SÃO PAULO

2022

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Escola de Artes, Ciências e Humanidades,  
com os dados inseridos pelo(a) autor(a)  
Brenda Fontes Malheiros de Castro CRB 8-7012; Sandra Tokarevicz CRB 8-4936

Nascimento, Rafael Teixeira do  
Estudo dos efeitos da combinação de hormônios  
esteroides e ácidos graxos sobre a fisiologia de  
células secretoras de insulina / Rafael Teixeira do  
Nascimento; orientadora, Anna Karenina Azevedo  
Martins. -- São Paulo, 2022.  
95 p: il.

Dissertacao (Mestrado em Ciências) - Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular,  
Escola de Artes, Ciências e Humanidades,  
Universidade de São Paulo, 2022.  
Versão corrigida

1. Diabetes gestacional. 2. Ácidos graxos. 3.  
Hormônios sexuais. 4. Células produtoras de  
insulina. 5. Lipotoxicidade. I. Martins, Anna  
Karenina Azevedo, orient. II. Título.

NASCIMENTO, R. T. **Estudo dos efeitos da combinação de hormônios esteroides e ácidos graxos sobre a fisiologia de células secretoras de insulina**. 2022. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022).

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Fernanda Cury Boaventura

Instituição: Universidade Cruzeiro do Sul

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Káthia Maria Honório

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Eduardo Rebelato Lopes de Oliveira

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Aos meus pais e minha tia, pelo persistente e incansável apoio.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Anna Karenina Azevedo Martins, minha orientadora, por toda a caminhada até aqui.

À Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo e toda a sua comunidade, de técnicos, funcionários, profissionais terceirizados, professores e alunos pela oportunidade do Mestrado e da convivência.

Processo n. 2018/22631-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos professores Fernando Abdulkader, Fernanda Ortis e Ângelo Carpinelli por me cederem seus espaços de trabalho sempre que precisei.

Às técnicas de laboratório mais atenciosas que pude encontrar pelo caminho: Isabel, Fernanda e Andressa. E ao amigo e bibliotecário Sidinei.

A todas e todos os meus colegas de bancada, Vandierle, Brisa, Daniela, Bruna, Gustavo, Jenifer, Izabela, Willian, Márcia, Davidson, Viviane, Amanda, Carloina, Flávia e Henrique e Bruno. Obrigado por tudo. Aprendi muito com vocês.

A todas e todos os companheiros de NEB – Núcleo de Estudos em Biociências.

Aos companheiros cientistas de dados, Luiz Felipe e Arthur. Seguimos juntos.

Aos companheiros de um monte de coisas, Giulia, Gi, Letícia, Gustavo, Arthur, Yuri, Bruno (CHCl<sub>3</sub>), Rafão e Bruno.

Aos meus grandes amigos e irmãos, Marcus e Frei Alex.

A importantes profissionais que me foram importantíssimos até aqui: Gabriel Parmezano e Marcos Jorge.

A duas queridas amigas de terras fluminenses que foram decisivas: Patrícia e minha ex-professora de Química Farmacêutica, Maria Abadia.

Às duas coisinhas que tornaram muito melhores meus dias: Hannah e Perrita.

A todas e todos que, por seu trabalho e existência, me permitiram esse estudo.

## RESUMO

NASCIMENTO, R. T. **Estudo dos efeitos da combinação de hormônios esteroides e ácidos graxos sobre a fisiologia de células secretoras de insulina**. 2022. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022).

O diabetes gestacional (DG) incide sobre 12-18% das gravidezes, com prevalência quatro vezes maior em mulheres obesas. Alterações na fisiologia do tecido adiposo têm sido relacionadas ao desenvolvimento de doenças metabólicas como o DG. Além disso, alterações hormonais importantes parecem também estar envolvidas na fisiopatologia da doença. **Objetivo:** Estudar os efeitos da incubação com hormônios esteroides progesterona e  $17\beta$ -estradiol combinados ou não aos ácidos graxos palmítico, esteárico e oleico sobre aspectos da fisiologia de células produtoras de insulina. **Métodos:** Foram utilizadas células produtoras de insulina da linhagem INS-1E e RIN-m5F. As células foram tratadas com diferentes concentrações do ácido palmítico (AP), por 24 ou 48h e para a análise dos efeitos dos hormônios esteroides, AP, AE e AO foram pré-incubadas com os ácidos graxos, por 24h, e em seguida tratadas com uma de duas combinações dos hormônios progesterona e estradiol (C1: concentrações hormonais em grávidas saudáveis; C2: concentrações observadas em grávidas com DG), por 24h adicionais. Ensaio de citometria avaliaram os parâmetros celulares de integridade de membrana plasmática e fragmentação de DNA e ensaios de espectroscopia de fluorescência avaliaram a produção de espécies reativas de oxigênio e a taxa de proliferação celular. **Resultados:** O AP apresentou efeito tóxico sobre ambas as linhagens e se mostrou dose- e tempo-dependente, e em células RIN-m5F, esse ácido graxo foi mais tóxico que AO e AE. Já na linhagem INS-1E, o efeito mais lesivo foi do AO (75%), seguido de AP (60%) e AE (20%). Em ambas as linhagens, AP se mostrou um potente indutor de fragmentação do material genético da célula. Fora o grupo de tratamento combinado de AO com C1 (AO+C1) para a linhagem INS-1E, nenhum outro grupo-teste apresentou indução de espécies reativas de oxigênio (e nenhum, no caso de células RINm5F). Os resultados na linhagem INS-1E

apontam para um efeito indutor de proliferação do ácido esteárico enquanto o grupo tratado com AO apresentou redução na taxa de proliferação. A combinação de AP e AE (mas não AO) com os hormônios sexuais aqui estudados mostrou um efeito positivo significativo, embora discreto. Na linhagem RINm5F, o grupo tratado com AO também apresentou redução dessa taxa. **Conclusões:** Os resultados sugerem a correção da hipótese segundo a qual o efeito combinado de progesterona em alta concentração (240nM) em combinação com estradiol (13nM) e ácidos graxos tem um importante papel na toxicidade e morte de células  $\beta$ . Os resultados ampliam o corpo de evidências que atestam o possível efeito citotóxico de lipídios combinados a hormônios da gravidez no DG.

**Palavras-chaves:** Diabetes gestacional. Ácidos graxos. Hormônios sexuais. Células produtoras de insulina. Lipotoxicidade.



## ABSTRACT

NASCIMENTO, R. T. **Study of the effects of the combination of steroid hormones and fatty acids on the proliferation and function of insulin-secreting cells. 2022.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022).

Gestational diabetes (GD) affects 12-18% of pregnancies, with a prevalence four times higher in obese women. Changes in adipose tissue physiology have been related to the development of metabolic diseases such as GD. In addition, important hormonal changes also seem to be involved in the pathophysiology of the disease. **Objective:** To study the effects of incubation with steroid hormones progesterone and 17 $\beta$ -estradiol combined or not with palmitic, stearic and oleic fatty acids on aspects of the physiology of insulin-producing cells. **Methods:** INS-1E and RIN-m5F Insulin-producing cells were used. Cells were treated with different concentrations of palmitic (AP) acid for 24 or 48h and for the analysis of the effects of steroid hormones, AP, AE and AO were pre-incubated with fatty acids for 24h, and then treated with one of two combinations of the hormones progesterone and estradiol (C1: hormone concentrations in healthy pregnant women; C2: concentrations observed in pregnant women with GD) for an additional 24h. Cytometry assays evaluated the cellular parameters of plasma membrane integrity and DNA fragmentation and fluorescence spectroscopy assays evaluated the production of reactive oxygen species and the rate of cell proliferation. **Results:** AP had a toxic effect on both strains that was dose- and time-dependent, and in RIN-m5F cells, this fatty acid was more toxic than AO and AE. In the INS-1E strain, the most harmful effect was AO (75%), followed by AP (60%) and AE (20%). In both strains, AP proved to be a potent inducer of fragmentation of the cell's genetic material. Apart from the combined treatment group of AO with C1 (AO+C1) for the INS-1E line, no other test groups showed induction of reactive oxygen species (and none in the case of RINm5F cells). The results in the INS-1E line point to a proliferation-inducing effect of stearic acid while the group treated with OA showed a reduction in the

proliferation rate. The combination of AP and AE (but not AO) with the sex hormones studied here showed a significant, albeit slight, positive effect. In the RINm5F lineage, the group treated with AO also showed a reduction in this rate.

**Conclusions:** The results suggest the correction of the hypothesis according to which the combined effect of high concentration progesterone (240nM) in combination with estradiol (13nM) and fatty acids plays an important role in the toxicity and death of  $\beta$  cells. The results add to the body of evidence attesting to the possible cytotoxic effect of lipids combined with pregnancy hormones in GD.

**Keywords:** Gestational diabetes. Fatty acids. Sex hormones. Insulin producing cells. Lipotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático dos efeitos dos ácidos graxos sobre a função e massa de células beta.....	17
Figura 2. Laços fisiopatológicos entre obesidade, inflamação e diabetes.....	18
Figura 3. Resistência à insulina e captação defectiva de glicose.....	24
Figura 4. Efeitos da ligação do $17\beta$ -estradiol a seus receptores celulares.....	27
Figura 5. Desenho experimental.....	31
Figura 6. Esquema geral de um banco ótico, jogo de espelhos e fotomultiplicadores e sistema integrado de um citômetro de fluxo.....	35
Figura 7. Histograma de análise de integridade de membrana.....	37
Figura 8. Histograma de análise de percentagem de células com DNA fragmentado.....	38
Figura 9. Fórmula estrutural do iodeto de propídio (PI) e esquema mostrando ligação do PI às bases do DNA.....	38
Figura 10. Diagrama de Jablonski.....	39
Figura 11. Espectros de emissão/absorção.....	40
Figura 12. O caminho da luz em uma leitora de placas.....	41
Figura 13. Toxicidade do AP em células INS-1E nos tempos 24h e 48h.....	45
Figura 14. Toxicidade do AP em células RIN-m5F nos tempos 24h e 48h....	47
Figura 15. Toxicidade do AP em diferentes concentrações e em combinação ou não com hormônios sexuais em células INS-1E.....	49
Figura 16. Toxicidade do AP em diferentes concentrações e em combinação ou não com hormônios sexuais em células RIN-m5F.....	52
Figura 17. Toxicidade de AE e AO $100\mu\text{M}$ em diferentes concentrações e em combinação ou não com hormônios sexuais em comparação com AP na mesma concentração e condições em células INS-1E.....	55
Figura 18. Toxicidade de AE e AO $100\mu\text{M}$ em diferentes concentrações e em combinação ou não com hormônios sexuais em comparação com AP na mesma concentração e condições em células RIN-m5F.....	58

<b>Figura 19. Efeito dos hormônios esteroides sobre a produção de EROs em células produtoras de insulina.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 20. Efeito dos hormônios esteroides e ácidos graxos sobre a produção de EROs em células produtoras de insulina.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 21. Efeito dos hormônios esteroides sobre a proliferação de células produtoras de insulina.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 22. Efeito dos hormônios esteroides e ácidos graxos sobre a proliferação de células produtoras de insulina.....</b>	<b>63</b>

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1. Concentrações dos hormônios esteroides nas duas combinações usadas para o tratamento das células INS-1E e RINm5F.....</b>	<b>34</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AMPc** – Adenosina monofosfato cíclico  
**AMPK** – Proteína quinase ativada por monofosfato adenosina  
**DM2** – Diabetes Mellitus tipo 2  
**GLUT 4** – Transportador de glicose tipo 4  
**NfκB** – Fator nuclear κB  
**OMS** – Organização Mundial da Saúde  
**PPAR** – Receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma  
**TAB** – Tecido adiposo branco  
**TA** – Tecido adiposo  
**TNF-α** – Fator de necrose tumoral *Alfa*  
**DG** – Diabetes gestacional  
**RI** – Resistência à insulina  
**IMC** – Índice de massa corporal  
**GSIS** – Secreção de insulina estimulada por glicose  
**AMPc** – Monofosfato cíclico de adenosina  
**ATP** – Trifosfato de adenosina  
**K<sub>ATP</sub>** – Canais de potássio sensíveis a trifosfato de adenosina  
**AGL** – Ácido (s) Graxo (s) Livre (s)  
**ER** – Retículo endoplasmático  
**FFAR** – Receptores de ácidos graxos livres  
**InsR** – Receptor de insulina  
**PKA** – Proteína quinase A  
**AKT** – Proteína quinase serina/treonina-específica (PKB)  
**PKC** – Proteína quinase C  
**ERK** – Quinase regulada por sinal extracelular  
**PI3K** – Fosfatidilinositol-3 quinase  
**MEK** – Quinase da proteína quinase ativada por mitógeno  
**mTORC** – Alvo do complexo da rapamicina dos mamíferos  
**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro  
**EROs (ROs)** – Espécies reativas de oxigênio  
**IKK** – Inibidor do fator nuclear κ  
**AG** – Ácido graxo  
**TG** – Triglicerídeo (s)  
**IRS 1 / 2** – Substrato do receptor de insulina 1 e 2  
**P<sub>4</sub>** – Progesterona  
**E<sub>2</sub>** – Estradiol  
**E<sub>3</sub>** – Estriol  
**ER-α/β** – Receptor de estrogênio *alfa* e *beta*  
**PGR** – Receptor de progesterona  
**ERE** – Elemento de resposta a estrogênio  
**Pdx1** – Fator promotor de insulina 1

**CREB** – Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico  
**miRNA** – Micro RNA  
**AP** – Ácido palmítico  
**AE** – Ácido esteárico  
**AO** – Ácido oleico  
**ctl** – Controle  
**RPMI 1640** – Meio de cultura RPMI 1640  
**etOH** – Etanol  
**SEM** – Erro padrão da média  
**P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub>** – Relação progesterona por estradiol  
**PI** – Iodeto de propídeo  
**ANOVA** – Análise de variância  
**RINm5F, INS-1E** – Linhagens celulares derivadas de insulinoma de rato.  
**SREBP1c** – Fator de transcrição 1c de ligação ao elemento regulador de esterol  
**IL** – interleucina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 OBESIDADE E DIABETES GESTACIONAL: DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS À FISIOPATOLOGIA</b> .....	15
<b>1.2 EXIGÊNCIAS DAS ADAPTAÇÕES GRAVÍDICAS SOBRE A CÉLULA <math>\beta</math></b> ...20	
<b>1.2.1 O crosstalking entre a célula <math>\beta</math> e o tecido adiposo branco</b> .....	23
<b>1.2.2 Hormônios da gravidez e DG</b> .....	24
<b>1.3 HIPÓTESE DE TRABALHO</b> .....	28
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	29
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	29
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	29
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
<b>3.1 LISTA DE REAGENTES</b> .....	30
<b>3.2 DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	30
<b>3.3 CULTIVO CELULAR E TRATAMENTOS</b> .....	31
<b>3.4. ANÁLISES DE PARÂMETROS CELULARES POR CITOMETRIA</b> .....	33
<b>3.5 TOXICIDADE DOS ÁCIDOS PALMÍTICO, ESTEÁRICO E OLEICO, COMBINADOS OU NÃO COM OS HORMÔNIOS PROGESTERONA E ESTRADIOL</b> .....	34
<b>3.6 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CELULARES E BIOQUÍMICOS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA</b> .....	38
<b>3.6.1 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)</b> ...40	
<b>3.6.2 Ensaio de proliferação celular</b> .....	41
<b>3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	42
<b>4 RESULTADOS</b> .....	43
<b>4.1 TOXICIDADE DOS ÁCIDOS PALMÍTICO, ESTEÁRICO E OLEICO, COMBINADOS OU NÃO COM OS HORMÔNIOS PROGESTERONA E ESTRADIOL</b> .....	43

<b>4.1.1 Toxicidade do AP em células produtoras de insulina.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.2 Toxicidade de AP em diferentes concentrações em combinação com os hormônios Progesterona e 17-β estradiol.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.3 Toxicidade de AE e AO 100μM em combinação com os hormônios Progesterona e 17-β estradiol e AP 100μM e suas combinações.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).....</b>	<b>59</b>
<b>4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....</b>	<b>62</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE A – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES EM CADA GRUPO DE TRATAMENTO.....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>94</b>



# 1 INTRODUÇÃO

Este trabalho contém um conjunto de dados, obtidos *in vitro*, cujo problema contextualiza-se na busca por entender as relações e possíveis potencializações entre a obesidade e o aumento fisiológico da progesterona observado na gravidez. Aqui, o problema é abordado a partir do estudo das linhagens de células  $\beta$  INS-1E e RINm5F, investigando-se a resposta dessas linhagens aos desafios com ácidos graxos (palmítico, esteárico e oleico) e os esteroides progesterona e  $17\beta$ -estradiol, avaliando-se morte celular, proliferação e produção de espécies reativas.

## 1.1 OBESIDADE E DIABETES GESTACIONAL: DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS À FISIOPATOLOGIA

A obesidade tem se configurado uma epidemia mundial (MITCHELL et al., 2011) e um dos mais sérios desafios à saúde pública dos países (WHO, 2019a). Os dados de 2019 da pesquisa Vigitel (Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por Inquérito Telefônico) atestam que o Brasil não é uma exceção nesse assunto: a frequência de adultos obesos variou entre 15% e 23% (BRASIL, 2020). A frequência de homens com obesidade variou de 16% a 25%, enquanto a de mulheres obesas variou de 14% a 26%.

O quadro preocupa ainda mais quando se analisa em perspectiva histórica a evolução da obesidade no país: o processo se desenrolou de forma significativamente desfavorável durante todo o período de 2006 a 2020, passando de 11% em 2006 para 20% em 2020, para homens (uma variação anual média de 0,6% ao longo de todo o período considerado) e de 12% (2006) para 21% (2020), para mulheres (uma variação anual média de 0,66%) (BRASIL, 2020).

A obesidade é uma condição caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal acarretando alterações metabólicas, dificuldades respiratórias e de locomoção. É também fator de risco para dislipidemias, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 (DM2) e alguns tipos de câncer. A etiologia da

obesidade é multifatorial (WANDERLEY & FERREIRA, 2010). Fatores genéticos, epigenéticos e ambientais interagem de distintas formas, levando ao desenvolvimento dessa condição.

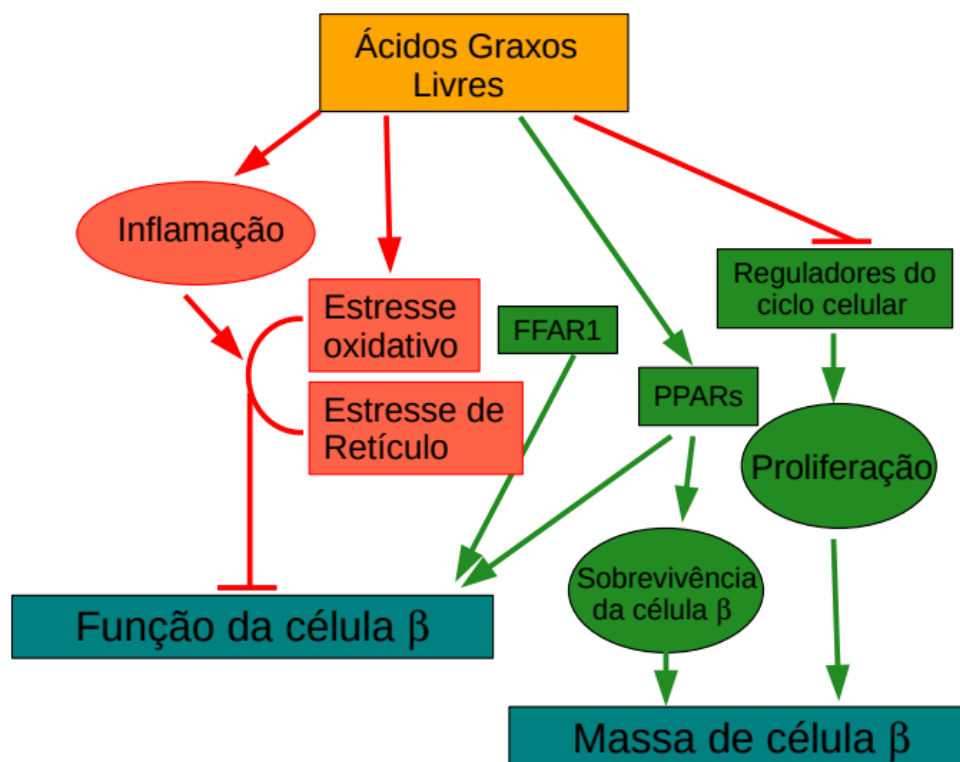
Entre tais fatores, a influência do ambiente, como disponibilidade de alimentos, atividade física, sedentarismo, o surgimento de tecnologias, bem como estresse e um novo estilo de vida inaugurados com a modernidade já são bem estudados (MITCHELL et al. 2011; WANDERLEY & FERREIRA, 2010). Ademais, a obesidade deve também ser considerada uma desordem nutricional e, por isso, perfeitamente possível de coexistir com outras deficiências, como deficiência de micronutrientes, o que acomete especialmente os mais empobrecidos (PEÑA & BACALLAO, 2000).

Sobre a fisiopatologia dessa condição, estudos como o de Hardy, Czech e Corvera (2012) relatam a participação do tecido adiposo, pela produção de adipocinas e citocinas inflamatórias no surgimento de resistência à insulina (RI) associada à obesidade. Além disso, está bem estabelecido que a quantidade excessiva de tecido adiposo é um fator de risco para o surgimento do diabetes tipo 2 (DM2), e cujo controle anabólico está bastante relacionado à insulina (LAVIOLA et al. 2006).

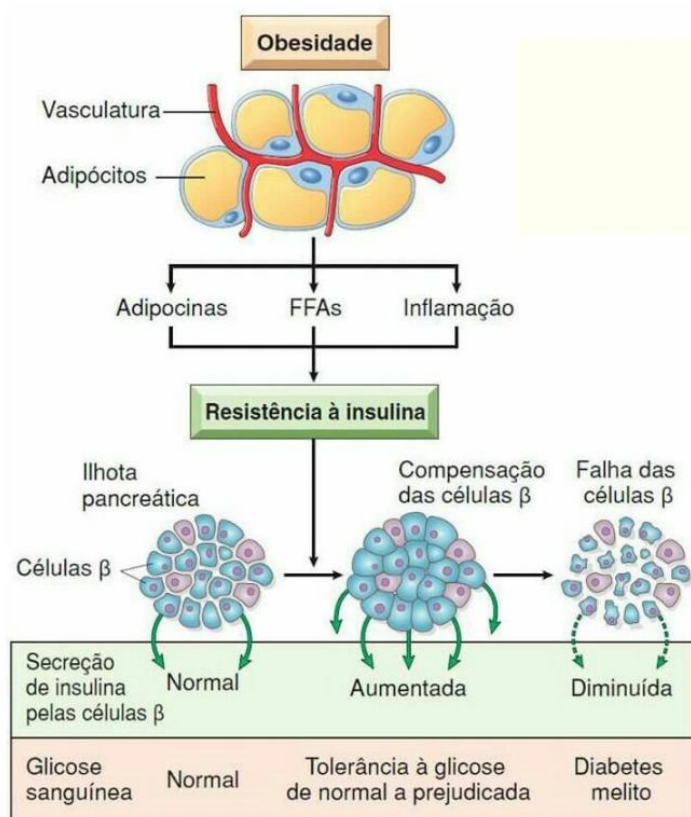
Com efeito, revisando a importância dos ácidos graxos na inflamação e RI no tecido adiposo branco (TAB), Kennedy et al. (2009) notam que o excesso de ácido palmítico expande o volume do TAB, aumenta a inflamação e apoptose através de estresse oxidativo e de retículo endoplasmático e leva à produção aumentada de ceramidas e espécies reativas de oxigênio (ROS); ademais, tem efeito disruptivo sobre a sensibilidade à insulina e sua sinalização no adipócito.

De modo geral, o DM2 é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica que se segue à resistência sistêmica à insulina. Diante da falha em compensar esse fato pelo incremento na secreção de insulina, as células  $\beta$  ficam expostas a altas concentrações de glicose e ácidos graxos livres e citocinas inflamatórias, o que resulta em estresse oxidativo ou de retículo, ativando vias de sinalização de morte na célula (ROJAS, et al., 2018). Dito de outro modo, o DM2 se manifesta quando as células  $\beta$  pancreáticas não podem mais fornecer insulina para compensar a resistência periférica a esse hormônio (ZHENQUI et al., 2018). Essa incapacidade pode estar relacionada à diminuição

da massa e/ou função de células  $\beta$ , que podem ser afetadas por predisposição genética, glicolipotoxicidade e/ou citocinas (NADAL et al., 2009). Yang e Li (2012), por exemplo, fazem notar que uma dieta rica em lipídios (HFD) tem se mostrado um dos fatores causadores da redução de função e massa de células  $\beta$  pancreáticas. As figuras 1 e 2 esquematizam em linhas gerais esse processo.



**Figura 1 – Desenho esquemático dos efeitos dos ácidos graxos sobre a função e massa de células beta.** Os ácidos graxos livres exercem efeitos positivos (verde) ou negativos (vermelho) sobre a função e massa de células  $\beta$ . Esses compostos atuam sobre a célula através da sinalização via seus receptores (como os PPARs e o FFAR1) que, em geral, medeiam efeitos positivos para a célula. Os efeitos negativos surgem da mediação de fatores perturbadores como inflamação, estresses celulares (oxidativo ou de RE) e, possivelmente de interrupção do ciclo celular, interferindo assim na proliferação (Adaptado de SHARMA e ALONSO, 2014.).



**Figura 2 – Laços fisiopatológicos entre obesidade, inflamação e diabetes.** A obesidade leva a um ambiente de inflamação com secreção de ácidos graxos livres e adipocinas e citocinas inflamatórias. Esse ambiente leva ao estabelecimento de um quadro de resistência à insulina (RI) que, tornada crônica, leva à falha na compensação da resposta das células β à RI e, por fim à falha e diminuição da massa de células (Adaptado de Robins. Patologia Básica. Cap. 20: sistema endócrino. 2017).

Estudos *in vitro* expõem igualmente alguma correlação entre tratamento com ácidos graxos e saúde da célula β. Por exemplo, Sargsyan e Bergsten (2011) compararam o efeito do tratamento de diferentes concentrações (0,25, 0,5 e 1,0 mM) de ácido palmítico, em baixa (5,5mM) e alta (25mM) concentração de glicose sobre ilhotas humanas intactas em células MIN6 e INS-1E por 48 horas. Segundo seus resultados, em células MIN6, a diferença entre as médias do controle e de células apoptóticas induzidas pelo tratamento com ácido palmítico em qualquer concentração de glicose, foram comparáveis e, por tanto, não significativa. Em células INS-1E a diferença na concentração de glicose foi importante. Quando expostas a 25mM de glicose, a oxidação do ácido palmítico decresceu 30% em ilhotas humanas e células MIN6 e diminuiu cerca de 80% em células INS-1E, indicando que a presença de glicose (em baixa ou alta concentração) propicia a lipotoxicidade que, entretanto, é mais importante e

significativa em células INS-1E. Os autores sugerem que nessas células, a inibição da CPT1 (carnitina palmitoiltransferase 1) pelo malonil-Coa, cuja formação é induzida pela glicose, inibe, por sua vez, a oxidação do ácido palmítico e conseqüente acumulação intracelular. Além disso, Karaskok et al. (2006), mostraram que a exposição crônica de células INS-1 ao palmitato (mas não ao oleato, ao menos não tanto quanto o palmitato, mas ainda assim citotóxico) provoca significativo estresse de retículo endoplasmático nessas células e, conseqüentemente, morte.

Spacek et al. (2008) mostraram que células INS-1E quando em concentração de glicose na faixa fisiológica conseguem regular até o máximo a taxa de fosforilação oxidativa. Em estudos do mesmo grupo com ácido linoleico, os autores mostraram que esse lipídio provoca desacoplamento mitocondrial e conseqüente comprometimento da secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) e a função de sensor de glicose da célula. Azevedo-Martins et al. (2006), apresentaram uma comparação da toxicidade de diferentes ácidos graxos (saturados e insaturados) em células RINm5F. Variando independentemente do tamanho da cadeia carbônica, quantidade de insaturação ou abundância, o estudo ordena os ácidos testados por toxicidade, sendo o ácido palmítico de longe o mais tóxico, seguido por linoleico,  $\gamma$ -linoleico, oleico, esteárico e eicosapentanoico. Na seqüência, mostrou que a toxicidade de ácidos graxos saturados e insaturados depende em parte ou está relacionada ao estado de fosforilação das quinases Akt, ERK e PKC $\delta$ . Entretanto, nas condições experimentais do estudo, um curto período de exposição das células RINm5F a esses ácidos graxos não foi suficiente para induzir toxicidade, já que estariam ativadas essas “vias de sobrevivência” da célula  $\beta$  (NOUAILHETAS SIMON, 2008).

O diabetes gestacional (DG) é uma das mais comuns complicações da gestação reconhecida, rotineiramente, no segundo trimestre da gravidez, podendo desaparecer após o nascimento e cuja prevalência, nos últimos anos, tem chegado a 12-18% de todas as gravidezes (DALFRÀ *et al*, 2020). No Brasil, estima-se que a prevalência de DG seja aproximadamente 18% (casos detectados no Sistema Único de Saúde – SUS). Além disso, a doença é cerca

de quatro vezes mais prevalente em mulheres obesas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define o diabetes gestacional (DG) como hiperglicemia detectada primeira vez durante a gravidez e diagnosticada por valores de corte da glicemia mais baixos que para o DM2 (WHO, 2019a). De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), a mulher grávida é diagnosticada com DG se a glicemia de jejum for maior ou igual a 92 mg/dL e menor que 126 mg/dL (SBD, 2017).

Os dados epidemiológicos disponíveis fundamentam a ideia de que a adiposidade excessiva pode estar na base do desenvolvimento também do DG. A Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) propõe alguns fatores como associados a um maior risco de desenvolver hiperglicemia durante a gravidez (que, entretanto, não são recomendados para fins de rastreamento do DG), como o sobrepeso ou obesidade (índice de massa corporal, IMC, maior ou igual a 30Kg/m<sup>2</sup>), alterações metabólicas antecedentes (como hipertriglicidemia) e antecedentes obstétricos (como a ocorrência de DG em gravidez anterior) (OPAS, 2017).

No entanto, muito há a se conhecer sobre a interação entre o excesso de adiposidade e a incapacidade da ilhota pancreática em compensar as alterações gravídicas, o que pode explicar a maior prevalência de DG em mulheres obesas.

## **1.2 EXIGÊNCIAS DAS ADAPTAÇÕES GRAVÍDICAS SOBRE A CÉLULA $\beta$**

Durante a gravidez, a necessidade de alimentar o feto e dar suporte ao seu contínuo crescimento faz com que o organismo materno se adapte física, fisiológica e bioquimicamente (SKLEMPE, 2013). Isso ocorre em dois momentos distintos da gravidez (HERRERA, 2000; ZENG, LIU, LI, 2017; MOYCE e DOLINSKY, 2018). A primeira é uma fase anabólica, nos primeiros dois trimestres, marcada pela estocagem de energia principalmente na forma de depósitos de gordura no tecido adiposo. O que se caracteriza por alterações no metabolismo desses compostos (TREBOTIC et al., 2015). Segue-se a ela, uma fase catabólica, no último trimestre da gravidez, quando aqueles depósitos de gordura são preferencialmente quebrados para satisfazer as necessidades

energéticas da mãe, sendo a glicose poupada para uso do feto (TREBOTIC et al., 2015).

Por conta disso, a resistência à insulina (RI) é uma ocorrência natural e transiente nessa última fase da gravidez (MOYCE e DOLINSKY, 2018). Definida como a relativa perda da habilidade de órgãos-alvo como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo responderem à concentração normal de insulina circulante (SONAGRA et al, 2014; KAMPMANN, 2019), a RI durante a gravidez saudável pode ser mediada por vários fatores, embora o mecanismo do seu desenvolvimento não seja completamente conhecido (HODSON et al., 2013; KAMPMANN, 2019).

A diminuição da sensibilidade à insulina pode depender de fatores como a elevação na concentração de hormônios como a progesterona ( $P_4$ ) e o 17  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), tanto quanto de citocinas produzidas pelo tecido adiposo branco (TAB) – algumas não exclusivas dele como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (ILs) e outras exclusivamente secretadas pelo TAB (SONAGRA et al, 2014). Entretanto, não é possível afirmar que um hormônio isolado possa explicar o aparecimento de RI na gravidez – com efeito, estradiol, prolactina, cortisol, hormônio de crescimento placentário (hPGH) e lactogênio placentário humano (hPL) já foram descritos como mediadores do processo (KAMPMANN et al, 2019).

Tem se visto que concentrações elevadas de citocinas, TNF- $\alpha$ , por exemplo, contribuem com a RI na gravidez pelo aumento da fosforilação de resíduos de serina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), bem como a diminuição da atividade tirosina quinase do receptor de insulina (InsR) (KAMPMANN et al, 2019). Com efeito, já se propôs que citocinas estejam relacionadas ao aumento da ativação da quinase c-Jun N-terminal (JNK), proteína quinase C (PKC) e fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), com a consequente fosforilação dos resíduos de serina (BARBOUR et al, 2007). Isso parece valer tanto para mulheres com tolerância normal à glicose quanto para mulheres com DG (KAMPMANN et al, 2019).

Nesse sentido, esse estado de resistência à insulina na mãe deverá ser contrabalanceado pelo aumento da secreção do hormônio e, por conseguinte,

da capacidade da célula  $\beta$ , seja pelo aumento dessa capacidade, seja pelo aumento da população dessas células. Esse complexo balanço permite um pronto e preciso fluxo de alimentos da mãe para o feto, até o fim da gravidez (BAEYENS, 2017).

Ainda não se sabe o que faz com que algumas mulheres desenvolvam DG, nem o que leva, nessa condição, à não adaptação das células  $\beta$  pancreáticas às exigências da gravidez (NADAL et al., 2009). É fato que as demandas nutricionais e metabólicas da gravidez levam a adaptações bioquímicas da célula  $\beta$  a fim de compensar a RI e falhas nesse processo adaptativo levam ao DG (MOYCE e DOLINSKY, 2018). Ademais, é bastante plausível que a morte dessas células por apoptose esteja envolvida no processo, uma vez que pode ser disparada por vários mecanismos como lipotoxicidade (AZEVEDO-MARTINS et al., 2006), ativação de receptores de ácidos graxos livres (AGL), bem como estresse mitocondrial (YOON et al., 2018) e de retículo endoplasmático (ER) (NUNES et al, 2014; YOON et al., 2018).

Com efeito, glicolipotoxicidade – geralmente produzida por obesidade materna pré-existente e ganho excessivo de peso durante a gestação – é um conceito central aqui. Combinado com uma prolongada exposição a citocinas pró-inflamatórias (SZLAPINSKI & HILL, 2021), isso poderia levar a respostas disruptivas da célula  $\beta$  e hiperglicemia – muito embora dados disponíveis sejam pouco claros com relação a mulheres com DG (MOYCE & DOLINSKY, 2018).

Ademais, não só a glicolipotoxicidade como também a ação de adipocinas e vias de sinalização defectivas têm sido postuladas como importantes fatores contribuintes para a disfunção e morte de células  $\beta$  no DG (HILL & SZLAPINSKI, 2020). Acrescente-se o fato de que efeitos danosos dos ácidos graxos (como esquematizado na Figura 1) são produzidos num ambiente de alta concentração de glicose, entre eles, como já posto, inflamação, estresse oxidativo, nitrosativo e de retículo endoplasmático, apoptose e, menos certo, autofagia (SHARMA & ALONSO, 2014).



### 1.2.1 O crosstalking entre a célula $\beta$ e o tecido adiposo branco

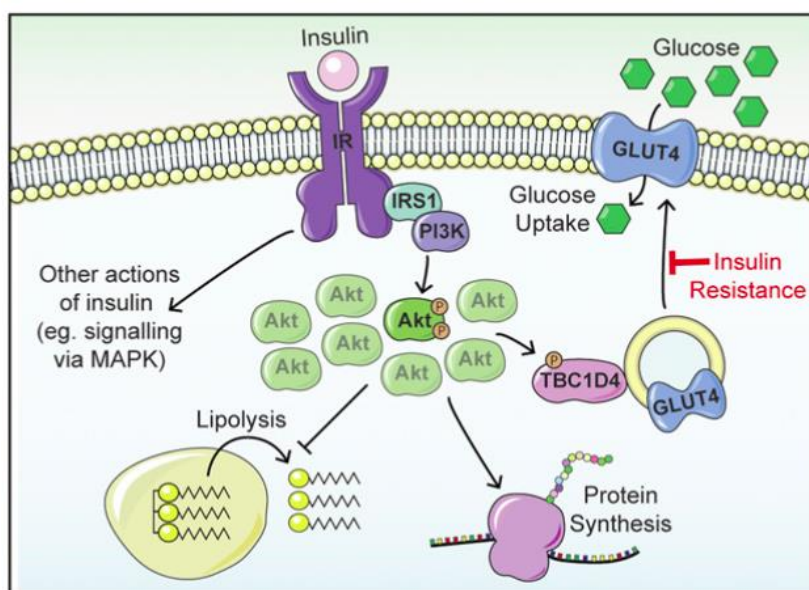
O principal secretagogo da insulina é a glicose, embora outros fatores possam amplificar e regular a secreção desse hormônio (KOMATSU et al., 2013). O modelo chamado “acoplamento metabolismo-secreção” (MAECHLER et al., 1997) foi a primeira demonstração de que a ativação do metabolismo mitocondrial poderia exercer efeito sobre a secreção de insulina. Do mesmo modo que o metabolismo mitocondrial, incretinas como o peptídeo 1 semelhante a glucagon (GLP-1) (MÁTIS et al, 2018), o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) (DONG et al., 2016), e o glutamato (YOKOY et al., 2016) são sinais importantes na amplificação da secreção da insulina. Além dessas moléculas, adipocinas são importantes no metabolismo e homeostase de lipídios e da glicose e na regulação da massa e função de células  $\beta$ . Justamente por causa disso, o TAB desempenha um importante papel no surgimento e desenvolvimento do DG: é o principal local de estocagem de lipídios e secreção de adipocinas ligadas a essa condição.

A disfunção do tecido adiposo é um laço fisiopatológico importante entre diabetes e obesidade (Wójcik et al., 2014). Além disso, foi mostrado que, *in vitro*, ácidos graxos livres (AGL) são capazes de induzir estresse oxidativo, de retículo endoplasmático e autofagia em células  $\beta$  (SHARMA e ALONSO, 2014). Assim, o TAB tem um importante papel sobre o metabolismo, a homeostase da energia, a sensibilidade à insulina por tecidos periféricos (DIMITRIADIS; BOUTATI; RAPTIS, 2007) e a secreção desse hormônio por células  $\beta$ . Por outro lado, a insulina exerce um papel crítico no anabolismo, inibindo a lipólise, regulando a lipogênese e, logo, o crescimento e diferenciação do TAB, e modulando a liberação de algumas adipocinas e a expressão de fatores de transcrição em adipócitos (LAVIOLA et al., 2006a).

É conhecida a relação inversa entre o conteúdo de gordura corporal e a sensibilidade à insulina, bem como o fato de o aumento da disponibilidade de ácidos graxos causar efeitos adversos sobre essa última (FRAYN, 2001). Já se mostrou que não é a obesidade *per se*, mas disfunções metabólicas do TAB como baixa expressão de GLUT-4, perfil de adipocinas alterado e aumento no volume do adipócito que são os determinantes de resistência sistêmica à insulina

(HAMMARSTEDT; GRAHAM; KAHN, 2012). Por sua vez, Shimobayashi et al. (2018) mostraram que a RI precede a inflamação no TAB. A instalação de RI, causada pela obesidade, promove no TAB o acúmulo de macrófagos M1, secretores de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ .

Fazakerley et al. (2018), do mesmo modo, analisando a literatura, sugerem que defeitos na sinalização proximal da insulina (defeitos em InsR, IRS ou AKT) nos tecidos adiposo e muscular, são antes consequência que causa da RI, como mostrado na Figura 3. Os autores indicam que tais prejuízos no transporte da glicose podem ser causados por distúrbios intracelulares, como alterações no perfil lipídico celular (com aumento de ceramidas e diacilglicerol), estresse de retículo endoplasmático, função mitocondrial alterada e produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs).



**Figura 3 – Resistência à insulina e captação defectiva de glicose.** Segundo Fazakerley et al (2018), a resistência à insulina não é devida a um defeito geral da via de sinalização a esse hormônio. A insulina sinaliza via Akt-quinase a regulação de processos importantes como lipólise, síntese proteica e transporte de glicose para dentro da célula, via translocação do transportador de glicose GLUT-4. Esse último processo é tornado defectivo no quadro de resistência à insulina. Traduzir

### 1.2.2 Hormônios da gravidez e DG

É conhecido que a RI, durante uma gravidez saudável, aumenta cerca de 50 a 60% (LACROIX, M., KINA, E. & HIVERT, MF. 2013). Isso deve-se à

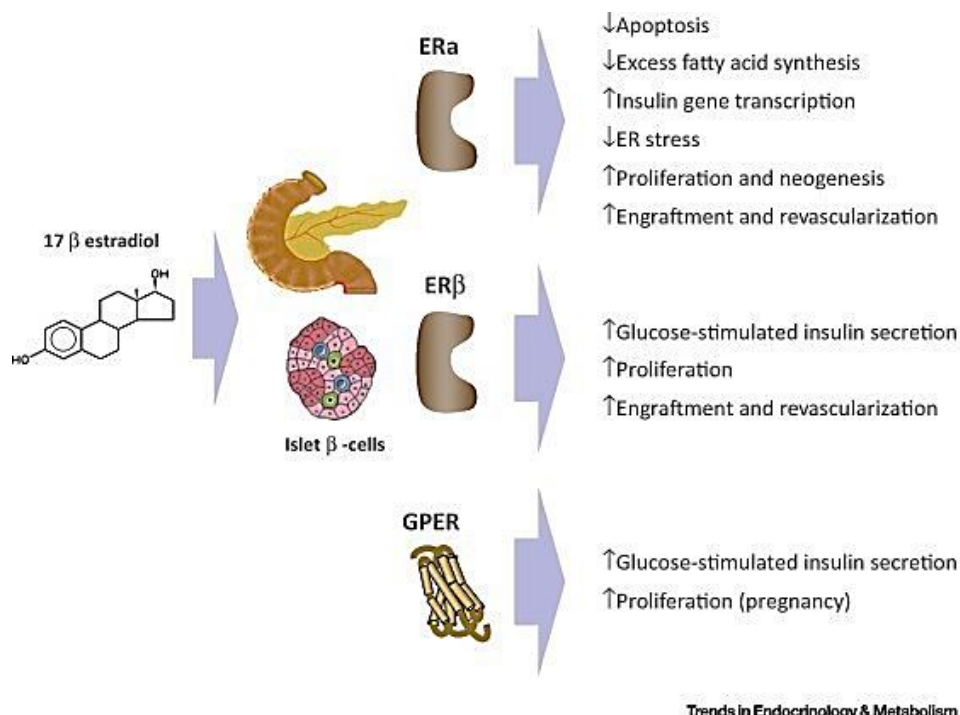
complexas alterações endócrino-metabólicas que ocorrem no organismo materno em face do aumento na demanda por nutrientes da unidade feto-placentária. Assim, por exemplo, ocorrem alterações como o aumento da massa de células  $\beta$  e elevação nas concentrações circulantes de hormônios placentários com progesterona e  $17\beta$ -estradiol (NAPSO; YONG; LOPEZ-TELLO 2018). Sendo que, as alterações nas concentrações de estradiol e progesterona afetam a função da célula  $\beta$ , dado o fato de que ela expressa receptores para esses hormônios.

O estradiol tem efeitos sobre a biossíntese da insulina e sobre a GSIS. A ligação do hormônio a seu receptor citoplasmático  $ER\alpha$  potencializa a transcrição do gene da insulina e aumenta os estoques dessa (TIANO et al., 2011). Nadal et al. (2009) notam que, em ilhotas de camundongos,  $E_2$  dispara a síntese de  $GMPc$ , que ativa a proteína quinase G (PKG). Essa, por sua vez, leva ao fechamento dos canais de  $K_{ATP}$ , o que provoca despolarização da membrana e abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC). O aumento da concentração citosólica de íons cálcio provoca dois efeitos: por um lado, a secreção de insulina e, por outro, a rápida ativação de CREB, um fator transcricional envolvido na divisão e sobrevivência de células  $\beta$ .

Além de ativar  $ER\alpha$  e  $ER\beta$ , no citoplasma,  $E_2$  se liga e ativa também o receptor 30 acoplado a proteína G (GPR-30), também chamado receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER). Sharma e Prossnitz (2011), trabalhando com linhagem MIN6 de células  $\beta$ , mostraram que a ligação de  $E_2$  a GPER aumenta a secreção de insulina em baixa e alta concentrações de glicose. No estudo foi mostrado que GPER medeia a liberação de insulina, por um lado, pela transativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), que por sua vez ativa ERK e, por outro, pelo bloqueio da via da PI3K/Akt. Santos et al. (2016) mostraram que em fêmeas de camundongos C57 BL/6J ovariectomizadas a GSIS foi reduzida de modo independente da baixa produção de insulina ou ATP mitocondrial. Nesses animais, foi observado baixo conteúdo de  $ER\beta$  e proteínas ligadas à secreção de insulina (Synt-1A e Snap-25), todas restauradas quando da suplementação com  $E_2$ .

Também já foram mostrados os efeitos protetores do 17- $\beta$  estradiol ( $E_2$ ) e seus receptores ( $ER_{\alpha}$ ,  $\beta$ ) sobre células  $\beta$  (TIANO et al., 2011; ZHENQUI et al., 2018;). O  $E_2$  aumenta a expressão do gene da insulina, eleva a sensibilidade a esse hormônio e protege a célula  $\beta$  em condição de glicolipototoxicidade. Esses efeitos são mediados pela ligação ao  $ER_{\alpha,\beta}$  e independentes da ligação a um elemento de resposta a estrogênio (ERE).

Além de proteger a célula  $\beta$  de apoptose induzida por glicolipototoxicidade, estresse de retículo endoplasmático (ZHENQUI et al., 2018) e estresse oxidativo, Kooiptwut et al. (2018) mostraram que em células INS-1E e em ilhotas de camundongos, o hormônio diminui a expressão do RNAm dos genes e proteínas de BTG2, p-53 e Bax, todas envolvidas na apoptose de célula  $\beta$  em condições de hiperglicemia. A proteína p-53 atua como fator transcricional de genes apoptóticos como Bax. BTG2 é uma proteína supressora de tumor antiproliferativa envolvida em funções celulares, progressão do ciclo celular, crescimento, diferenciação e apoptose. Os autores sugerem ainda que esses efeitos do estradiol são mediados pelos seus receptores nucleares e pelos receptores acoplados à proteína G. A Figura 4 resume, em linhas gerais, a ação da ligação do estradiol a seus receptores celulares na célula  $\beta$ .



**Figura 4 – Efeitos da ligação do 17 $\beta$ -estradiol a seus receptores celulares.** A ligação do hormônio a seus receptores (os intracelulares,  $ER_{\alpha}$ ,  $\beta$  e o acoplado à proteína G, o GPER, na

membrana plasmática) na célula  $\beta$  leva a efeitos biológicos, alguns deles aqui descritos (tomado de MAUVIS-JARVAIS, 2016).

Já a progesterona ( $P_4$ ), em humanos, tem seus efeitos mediados por duas isoformas de receptores intracelulares, PRB (ativador de genes-alvo) e PRA (um repressor de PRB) e por receptores de membrana como o PGRMC-1. Esse último está envolvido na sinalização da progesterona a partir da membrana. Não é claro ainda se se trata de um receptor específico de  $P_4$  ou um componente de um receptor de membrana de  $P_4$  que atua como proteína adaptadora (ZHANG et al., 2014). Já foi encontrado que  $P_4$  aumenta a secreção de insulina nas ilhotas em resposta a administração de glicose em animais.

Zhang et al. (2014) encontraram que PGRMC-1 aumenta a secreção de insulina induzida por GLP-1 (GIIS) por um mecanismo dependente de AMPc e outro independente, em que PGRMC-1 interage com o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), que é transativado pelo receptor de GLP-1 (GLP-1R). Segundo o grupo, há evidências de que a via EGFR/PI3K medeia GIIS.

Zhou et al. (2013) encontraram que  $P_4$  aumentou os níveis de p-ERK (a forma fosforilada da proteína quinase regulada por sinal extracelular 1/2) induzida por citocinas pró-inflamatórias e de proteína p-53 em células MIN6, diminuindo sua viabilidade. É sabido que  $P_4$  regula negativamente a proliferação celular pela modulação dos níveis de p-53 (ZHOU et al., 2013). Estudos como os de Nunes et al. (2014) têm implicado a participação da progesterona ( $P_4$ ) e seu receptor (PGR) na disfunção e redução da massa de células  $\beta$ .

Numa série de artigos de revisão, Bernal-Mizrachi et al. (2014) buscaram sumarizar o que se tinha até então sobre vias de sinalização intracelular relacionadas a proliferação em células  $\beta$  de roedores e comparando com os poucos dados existentes sobre células  $\beta$  humanas. Os autores mostram que a ligação de  $E_2$  com seus receptores extranucleares  $ER\alpha$  e  $ER\beta$  produz efeitos a partir da interação com proteínas citosólicas como Src, ERK, AMPK ou fatores de transcrição como STAT3. Ainda, o receptor ligado a proteína G (GPR30 ou GPER) diminui a expressão de miRNA 338-3p, o que está relacionado ao aumento da proliferação em células  $\beta$  (chegando a níveis comparáveis aos da

gestação). Em células humanas, embora a ligação E<sub>2</sub>/ERs esteja relacionada a sobrevivência celular, função e efeitos antiapoptóticos, não são conhecidos efeitos sobre a proliferação, nem a regulação do miRNA 338-3p.

O mesmo a equipe assinalou para a ligação de P<sub>4</sub> a seus receptores (o artigo não inclui os receptores de membrana). Foi notado que *in vivo*, tanto em roedores machos como fêmeas, o hormônio induz a proliferação de células  $\beta$ , o que não se nota em trabalhos *in vitro*. Foi igualmente mostrado que em ilhotas de roedores deficientes em receptores de P<sub>4</sub>, esse esteroide não afeta a expressão do miRNA 338-3p. Na comparação com humanos, Bernal-Mizrachi (2014) afirmam que não foram descritos efeitos proliferativos sobre células  $\beta$ .

### 1.3 HIPÓTESE DE TRABALHO

O presente trabalho está fundamentado sobre duas premissas:

1. A pré-incubação de células INS-1E e RINm5F com ácidos graxos aumentará a sensibilidade dessas células aos possíveis efeitos negativos da combinação de progesterona e estradiol;

2. O aumento de quase quatro vezes na concentração de progesterona na razão P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub> combinada aos efeitos sensibilizadores dos ácidos graxos, piora os parâmetros celulares aqui avaliados.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estudar os efeitos da incubação com hormônios esteroides progesterona e 17 $\beta$ -estradiol combinados ou não aos ácidos graxos palmítico, esteárico e oleico sobre aspectos da fisiologia de células produtoras de insulina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a toxicidade dos ácidos palmítico (AP), esteárico (AE) e oleico (AO), isoladamente ou em combinação com progesterona e 17 $\beta$ -estradiol nas linhagens INS-1E e RINm5F;
- Avaliar os efeitos da incubação com ácidos graxos e hormônios esteroides sobre a produção de espécies reativas de oxigênio nas linhagens estudadas;
- Investigar a proliferação de células INS-1E e RINm5F nas condições de cultivo acima mencionadas.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

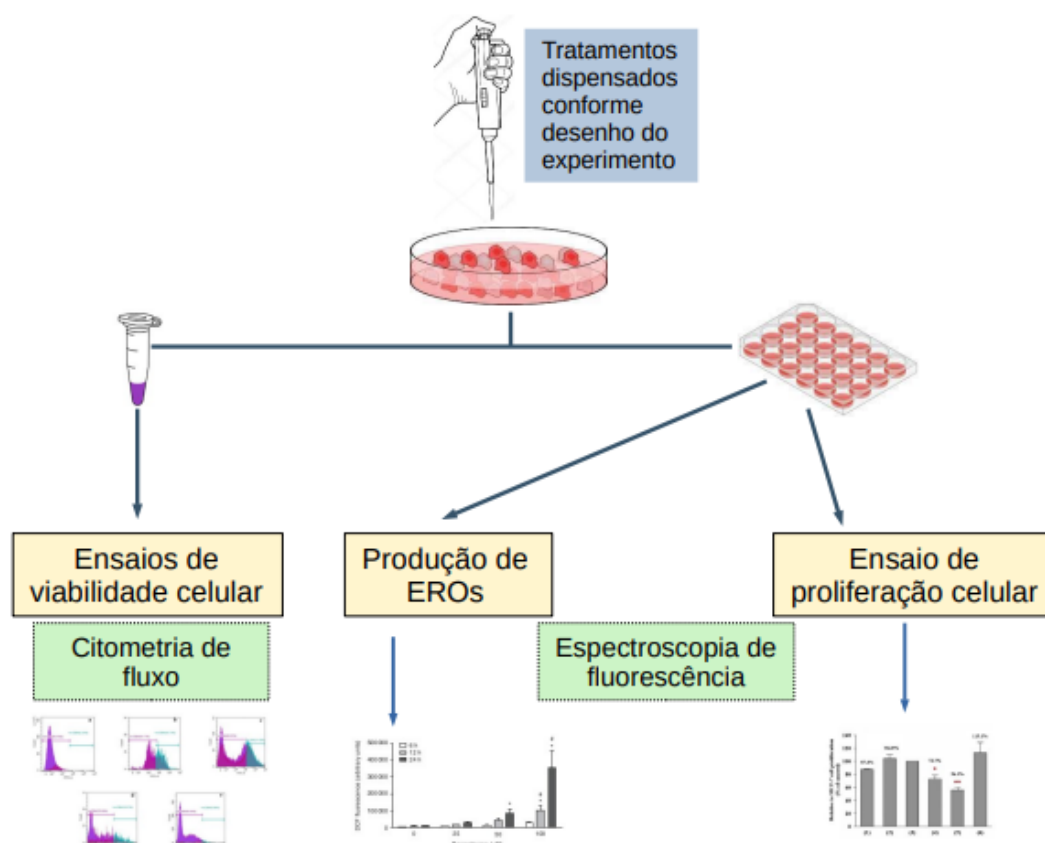
### **3.1 LISTA DE REAGENTES**

Meio de cultura RPMI-1640, Soro Fetal Bovino (SFB), penicilina e estreptomicina, piruvato de sódio, Hoechst 33342, diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA) e Red Direct Cyquant foram comprados da Thermo-Fischer Scientific (Massachusetts, USA), HEPES (Invitrogen, Massachusetts, USA), iodeto de propídio (PI), 2-mercapto-etanol, progesterona, estradiol, Triton X-100, RU-486, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido oleico foram comprados da (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), citrato de sódio, bicarbonato de sódio foram comprados da (Merck, Darmstadt, Alemanha).

### **3.2 DESENHO EXPERIMENTAL**

A seguir, na Figura 5, estão resumidos os procedimentos experimentais que avaliaram os diferentes parâmetros celulares estudados nesse trabalho. Após cultivo das duas linhagens de células produtoras de insulina RINm5F e INS-1E e tratamentos conforme descrito no texto, viabilidade celular e fragmentação de DNA, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proliferação celular foram avaliados de acordo com as técnicas mostradas e igualmente descritas no texto.





**Figura 5 – Desenho experimental.** As células serão submetidas aos tratamentos em placas de cultivo e incubadas conforme protocolos abaixo descritos. Em seguida, serão avaliadas segundo os ensaios mostrados.

### 3.3 CULTIVO CELULAR E TRATAMENTOS

A utilização de linhagens celulares como modelo experimental tem suas potencialidades e limitações. Por um lado, por se tratar de linhagem de origem tumoral, essas células podem ter características alteradas, conteúdo cromossomal anormal, mutações, expressão gênica alterada, afetando funções nativas e a responsividade da célula a certos estímulos. Por outro lado, a utilização de linhagens confere consistência e reprodutibilidade aos trabalhos, permitindo que várias condições sejam testadas antes de se transpor os ensaios para modelos animais. Isso representa um esforço de adaptação à doutrina dos 3 Rs em pesquisa básica (SKELIN; RUPNIK; CENCIC, 2010).

Em artigo datado de junho de 1980, Gazdar *et al.* dão notícia do estabelecimento de novas linhagens de células secretoras de insulina e somatostatina estabelecida de tumor de ilhota pancreática de rato. A linhagem RIN-r é derivada de insulinoma de ratos NEDH induzido por altas doses de irradiação de raio-x e transplantado em ratos NEDH. Heterotransplantes de células do tumor em camundongos *nude* BALB/c deram origem à linhagem RIN-m (GAZDAR *et al.*, 1980). Embora a linhagem parental secrete ambos os hormônios, o subclone 5F secreta predominantemente insulina, embora se mostre irresponsivo à glicose como secretagogo (BHATHENA *et al.*, 1982). Além da RINm5F descrita acima, outra utilizada neste trabalho, a linhagem INS-1E foi desenvolvida pelo laboratório do Professor Pierre Maechler (CASIMIR, CHAFFARD, MAECHLER, 2019) a partir de clonagem da linhagem INS-1, isolada de insulinoma de rato também induzido por radiação. Segundo Merglen *et al.* (2004), essa linhagem mantém fenótipo estável por mais de cem passagens. Seu conteúdo médio de insulina (entre as passagens 40 e 100) foi de  $2,30 \pm 0,11 \mu\text{g}/10^6$  células, o que corresponde a cerca de 10% de uma célula  $\beta$  de rato. Em passagens maiores, o conteúdo de insulina cai, mas não em detrimento de sua responsividade à glicose. Os autores fazem notar ainda que células INS-1E mantêm as propriedades de comunicação célula-célula, importante à função própria da célula  $\beta$  (MERGLEN *et al.*, 2004).

Células RINm5F, gentilmente cedidas pelo laboratório de Bioquímica Clínica, na ocasião chefiado pelo Prof. Sigurd Lenzen, da Universidade de Hannover, foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) SFB, 100 mg/ml de estreptomicina, 100 IU/ml de penicilina e 2g/L de bicarbonato de sódio. As células INS-1E, cedidas pela Profa. Fernanda Ortis (ICB I – USP), com a anuência do professor Dr. Pierre Maechler, do Departamento de Fisiologia Médica da Universidade de Genebra, foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 5% (v/v) SFB inativado por calor, 100 mg/ml de estreptomicina, 100 IU/ml de penicilina, 2g/L de bicarbonato de sódio, piruvato de sódio 1 mM, HEPES 10 mM e de 2-mercapto-etanol 50  $\mu\text{M}$ . Ambas as linhagens foram semeadas em placas de 24 ou 96 poços.

Progesterona ( $P_4$ ) e estradiol ( $E_2$ ) foram combinados para mimetizar o estado metabólico, no segundo trimestre, de uma gravidez normal (Combinação

1, C1 – GOH et al., 2016; ABDUL-SATTAR et al., 2016) e uma gravidez com diabetes gestacional (Combinação 2, C2 - DE HERTOOGH et al., 1976) em mulheres. As concentrações são mostradas na tabela 1. Além disso, C1 e C2 foram combinadas ou não com diferentes ácidos graxos (palmítico (AP), esteárico (AE) e oleico (AO) na concentração de 0,1 mM. Esteroides e ácidos graxos foram dissolvidos em etanol 99%. A concentração final de etanol no meio não excedeu 0,5% e não afetou os resultados experimentais (AZEVEDO-MARTINS et al, 2006; NUNES, et al, 2014). Além disso, o apêndice A traz a composição das soluções utilizadas em cada grupo de tratamento.

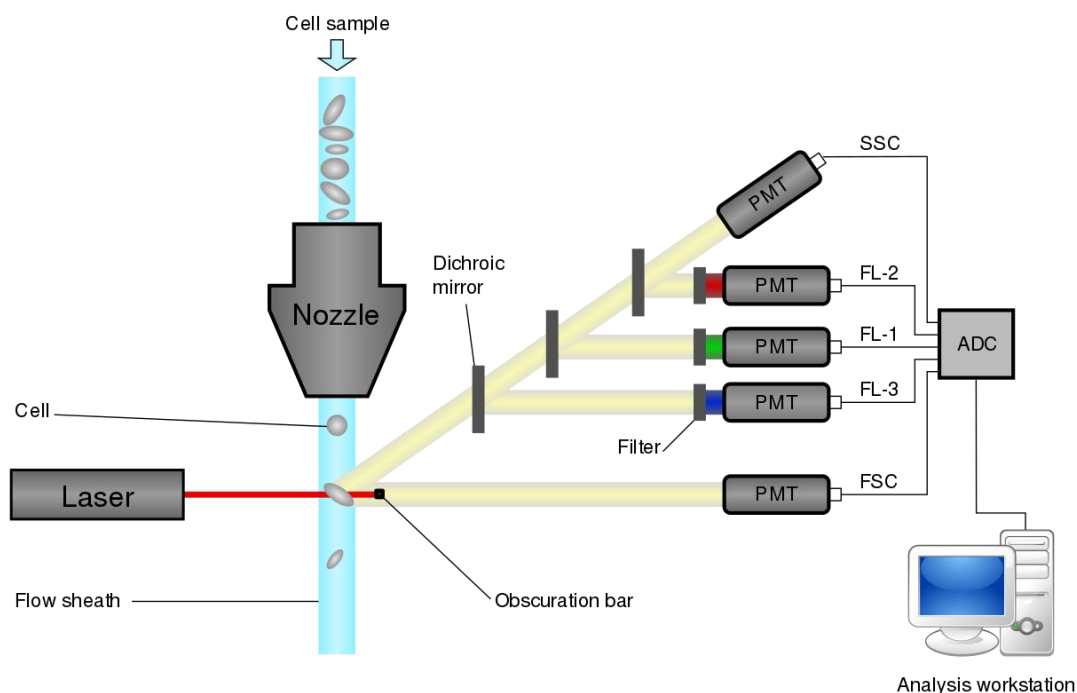
	[P <sub>4</sub> ]	[E <sub>2</sub> ]	Condição metabólica
<b>C1</b>	65 nM	13 nM	Gravidez saudável
<i>Ref.</i>	(GOH et al, 2016)	(ABDUL-SATTAR et al., 2016)	
<b>C2</b>	240 nM	13 nM	Gravidez com DG
<i>Ref.</i>	(DE HERTOOGH et al., 1976)	(DE HERTOOGH et al., 1976)	

**Tabela 1 – Concentrações dos hormônios esteroides nas duas combinações usadas para o tratamento das células INS-1E e RINm5F.** C1, combinação em que os hormônios esteroides em cultura estão nas concentrações correspondentes ao segundo trimestre de uma gravidez saudável em mulheres, e C2, combinação 2 em que os hormônios esteroides em cultura estão nas concentrações correspondentes ao segundo trimestre de uma gravidez em mulheres com DG.

### 3.4. ANÁLISES DE PARÂMETROS CELULARES POR CITOMETRIA

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a contagem e avaliação de vários parâmetros físicos e processos bioquímicos de diversos tipos celulares (NUNEZ, 2001), baseando-se na interação de moléculas de interesse com compostos fluorescentes (fluorocromos) ou que dão origem, como resultado de uma reação, a compostos fluorescentes. Conforme mostrado na Figura 6, esses compostos, quando excitados por laser emitido de uma fonte (laser azul, 488 nm) no equipamento, emitem determinado comprimento de onda que, capturado por filtros adequados (DM) é captado por fotomultiplicadores (FL 1, 2, 3, 4, SSC,

FSC). Os sinais luminosos são traduzidos em sinais elétricos e enviados a um computador. A análise desses sinais gera um gráfico (histograma) que mostra a intensidade da fluorescência emitida.



**Figura 6 – Esquema geral de um banco óptico, jogo de espelhos e fotomultiplicadores e sistema integrado de um citômetro de fluxo.** As células que descem pelo bocal (nozzle) e atravessam o ponto de análise (interseção entre fluxo de líquido (flow sheath) e feixe de laser 488 nm. A luz que emerge daí é o sinal. Ao redor do ponto de análise estão jogos de lentes e espelhos dicróicos que coletam esse sinal, focalizado agora em tubos fotomultiplicadores (PMT). Todo o sinal coletado é traduzido e analisado pelo computador. (Fonte da imagem: <https://www.pngwing.com/pt/free-png-ygkoo>).

### 3.5 TOXICIDADE DOS ÁCIDOS PALMÍTICO, ESTEÁRICO E OLEICO, COMBINADOS OU NÃO COM OS HORMÔNIOS PROGESTERONA E ESTRADIOL

A toxicidade de AP, AE, AO e dos hormônios  $P_4$  e  $E_2$  sobre células INS-1E e RINm5F foi determinada avaliando-se a integridade de membrana e a fragmentação de DNA dessas células, frente aos tratamentos com essas moléculas.

Células de ambas as linhagens foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de  $1,0 \times 10^5$  células/poço e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h (e em alguns casos, 48h), as células receberam tratamento com meio novo contendo as soluções designadas. As leituras foram realizadas 24 ou 48h após o tratamento.

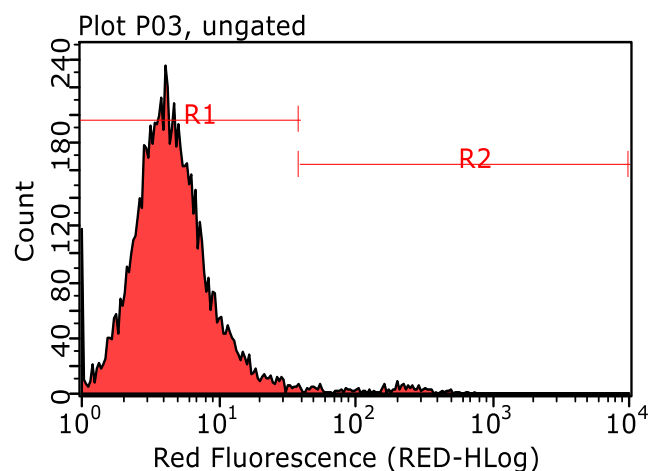
No dia da análise por citometria, o meio de cada poço foi retirado para um microtubo. Cada poço foi lavado com 200 µL de PBS, que foram removidos para o microtubo. As células que permaneceram aderidas à placa foram tripsinizadas com 100µL de tripsina 0,05% e incubadas por 1 min. A fim de neutralizar a tripsina, o meio separado em microtubos foi devolvido aos poços de origem e misturados gentilmente. Após isso, o conteúdo de cada tubo foi dividido por dois, 650 µL em cada microtubo. As amostras destinadas à análise de integridade de membrana plasmática foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 300 µL de PBS. A cada tudo foram adicionados 5 µL de solução de iodeto de propídio (50 µg/mL). Em seguida, a fluorescência foi detectada no canal FL2 (fluorescência laranja-avermelhada – 585/42 nm). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra.

Já as amostras destinadas à análise de fragmentação de DNA, foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 min, sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 300 µL de tampão Nicoleti (0,1% Triton X-100, 0,1% citrato de sódio, iodeto de propídio 50 µg/mL e água deionizada). Os tubos foram cobertos com papel-alumínio e incubados *overnight* a 4°C. Após esse período, a fluorescência foi detectada conforme acima.

Foi utilizado o citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Millipore Corporation, Hayward, USA) e o software EasyCyte System (Millipore Corporation, Hayward, USA).

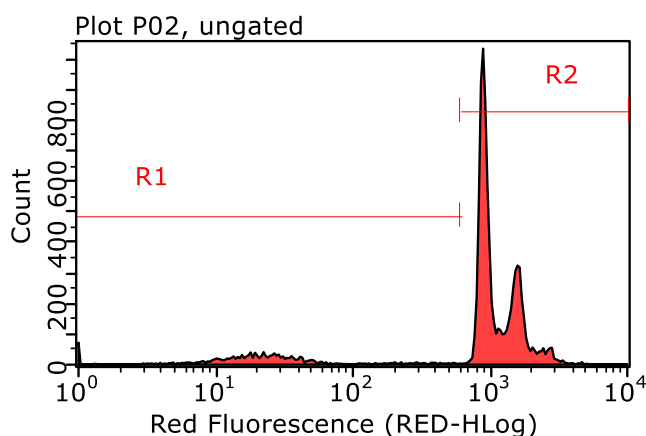
Logo abaixo, a Figura 7 ilustra a análise do resultado de uma amostra avaliada para integridade de membrana celular. A análise por citometria produz um histograma plotado como logarítmo da intensidade de fluorescência vermelha (RED-Hlog) *versus* contagem de eventos por canal (*Count*). As marcações R1 e R2 delimitam, respectivamente, as regiões de baixa e alta fluorescência. Nessa figura, o limite dessas regiões está marcado um pouco

acima de  $10^1$ , significando que antes dele, na região de baixa fluorescência, estão as células com membrana plasmática íntegra e acima desse limite, as células com membrana comprometida.



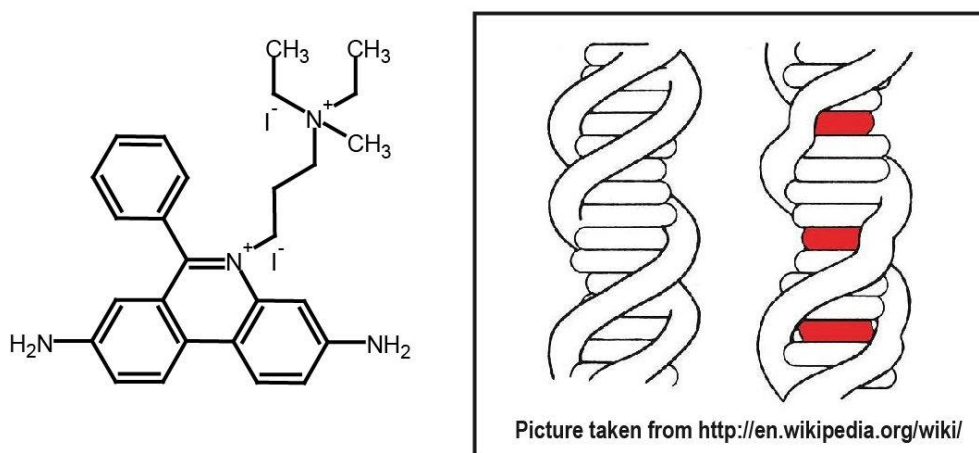
**Figura 7 – Histograma de análise de integridade de membrana**

Por sua vez, a figura 8 ilustra a análise do resultado de uma amostra avaliada para percentagem de células com DNA fragmentado. Do mesmo modo, aqui, análise por citometria produz um histograma logaritmo da intensidade de fluorescência vermelha (RED-Hlog) *versus* contagem de eventos por canal (*Count*). Outra vez, as marcações R1 e R2 delimitam, respectivamente, as regiões de baixa e alta fluorescência. Mas agora, o limite dessas regiões está marcado mais para além de  $10^2$ , significando que antes dele, na região de baixa fluorescência, estão as células que apresentam DNA fragmentado (e por tanto um sinal bem menos intenso em termos de fluorescência) e acima desse limite, as células com DNA íntegro (ou seja, uma única molécula grande o suficiente para gerar um sinal em alta fluorescência).



**Figura 8 – Histograma de análise de percentagem de células com DNA fragmentado.**

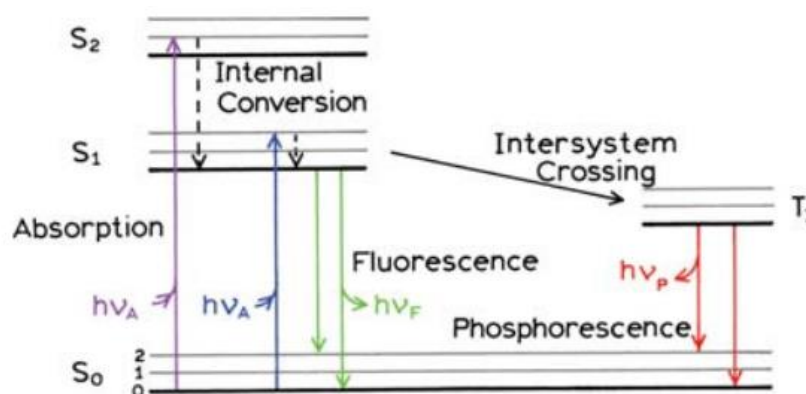
Importante notar que uma vez dentro da célula, o PI se intercala com as bases do DNA, com pouca ou nenhuma afinidade por sequências específicas, como mostrado na Figura 9. Para que seja possível a passagem de PI pela membrana, as células coletadas foram incubadas, por 1h, em solução contendo, além do PI, citrato de sódio a 0,1% e detergente Triton X-100, 0,1% PBS (RICCARDI; NICOLLETTI, 2006). Após a marcação com PI, foi determinada a fluorescência de 10.000 eventos, utilizando-se o citômetro citado acima.



**Figura 9 – Fórmula estrutural do iodeto de propídio (PI) e esquema mostrando ligação do PI às bases do DNA.** O PI é um corante fluorescente intercalante, que se liga inespecificamente às bases do DNA. Em solução aquosa, sua excitação máxima ocorre em 493nm (azul-verde) e emissão máxima em 636nm (vermelho). Após ligação ao DNA, essa relação é aumentada para 535nm (verde)/617 nm (laranja-vermelho). Como não é permeável à membrana plasmática, cora somente o DNA de células com membrana danificada, o que o torna útil para diferenciar células vivas e células já comprometidas (Fonte da imagem: <https://en.wikipedia.org/wiki/>).

### 3.6 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CELULARES E BIOQUÍMICOS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

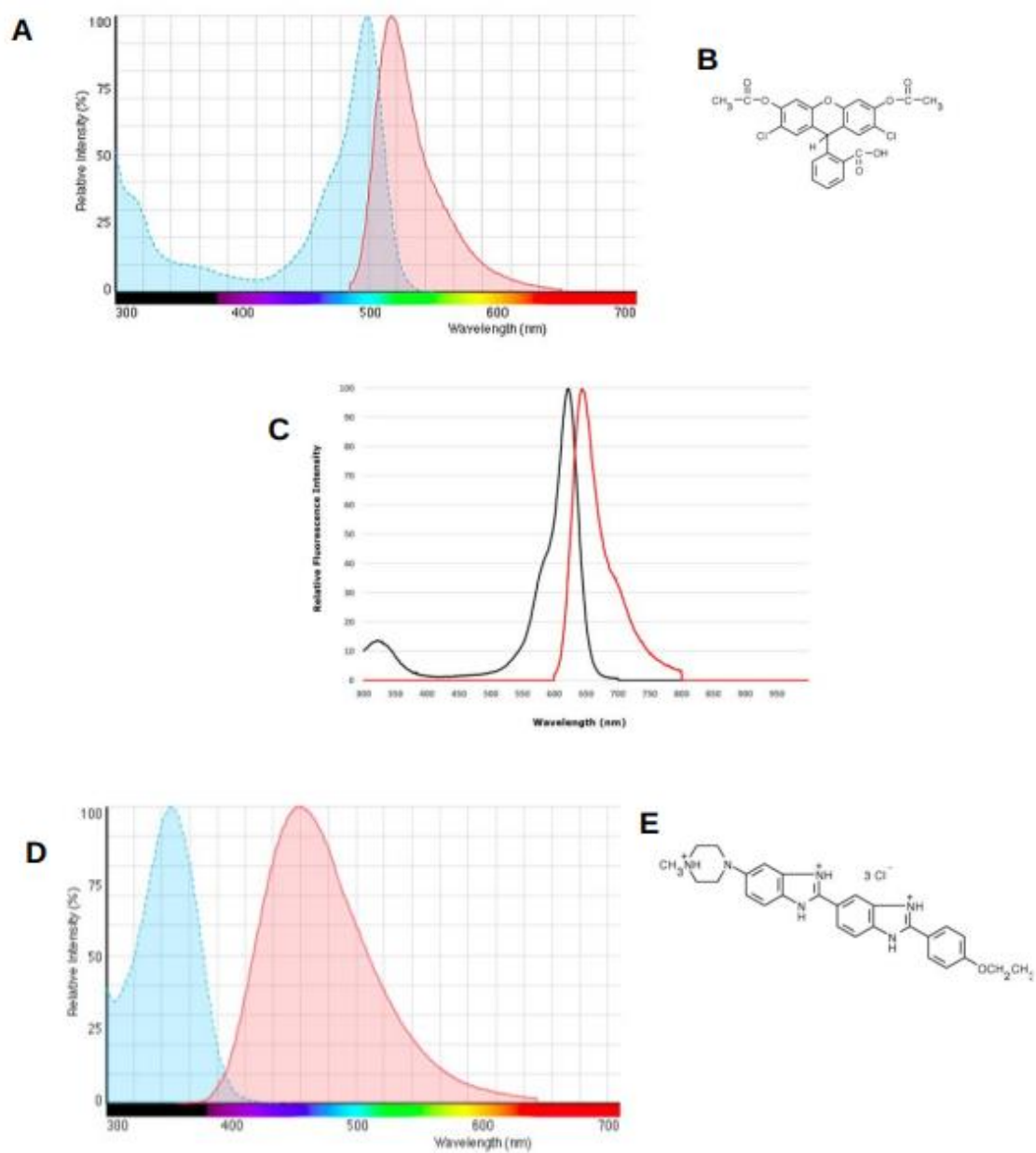
Fluorescência é um tipo de luminescência (emissão de luz por alguma substância) e está esquematizada na Figura 10. Nesse fenômeno, um elétron desemparelhado, após excitado, continua assim e sem mudar a orientação do seu *spin*. Com isso, acontece o rápido retorno desse elétron ao estado fundamental e a respectiva emissão de um fóton, em determinado comprimento de onda, normalmente, do espectro visível. As substâncias que fluorescem são chamadas fluoróforos e, no caso dos experimentos em biologia, em que são usados como sondas intracelulares, fluoróforos extrínsecos.



**Figura 10 – Diagrama de Jablonski.** É mostrado um esquema geral do fenômeno da fluorescência. A excitação de um elétron em singleto o faz passar do estado fundamental ao excitado, retornando rapidamente para esse e emitindo luz e às vezes calor. (Fonte da imagem: Joseph R. Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3<sup>rd</sup> Ed. Springer Science).

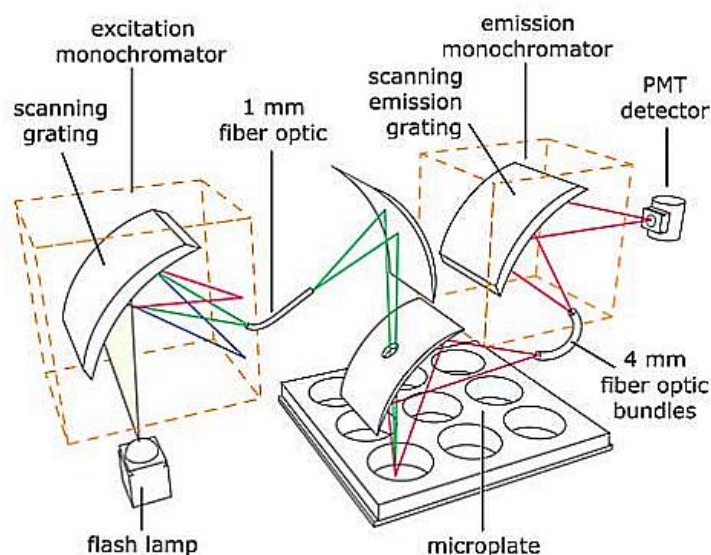
Em linhas gerais, um espectro de emissão (Figura 11) é a distribuição dos comprimentos de onda de uma emissão em um único comprimento de onda de excitação constante. Por outro lado, um espectro de excitação é a dependência da intensidade de emissão, medida em um único comprimento de onda de emissão, após a varredura do comprimento de onda de excitação. Assim, por exemplo, tem-se o espectro do H<sub>2</sub>DCFDA e do Cyquant Direct red®.





**Figura 11 – Espectros de emissão/absorção. A e B,** Espectro de emissão/absorção e estrutura química do H<sub>2</sub>DCFDA; **C,** Espectro de emissão/absorção do Cyquant Direct Red®; **D e E,** Espectro de emissão/absorção e estrutura química do Hoechst 33342 (Fonte das imagens: site da ThermoFischer).

No caso de um espectrofotômetro de fluorescência do tipo “leitora de placas” (Figura 12), a fonte de luz é uma lâmpada de xenônio (“*flash lamp*”). O comprimento de onda de excitação desejado é selecionado usando um dispositivo que transmite uma determinada faixa de comprimento de onda chamado monocromador. Um espelho com um orifício transmite a excitação. A fluorescência, que ocorre em todas as direções, é direcionada para a óptica do detector (PMT detector, na figura) pelo mesmo espelho. Leitores de microplacas são normalmente usados para medições de intensidade em um grande número de amostras.



**Figura 12 – O caminho da luz em uma leitora de placas.** (Fonte da imagem: Joseph R. Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3hd. Ed. Springer Science).

### 3.6.1 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O H<sub>2</sub>DCFDA é utilizado nesse ensaio como uma sonda fluorescente permeante à célula capaz de mostrar a produção de EROs. O H<sub>2</sub>DCFDA um composto não-fluorescente passa a emitir fluorescência após oxidação por esterases celulares, produzindo um composto livre dos grupos acetato. A intensidade (medida em unidades arbitrárias) é uma indicação do número de células que estão em um estado oxidativo. O ensaio é normalizado com coloração por Hoechst 33342, que mostra em azul somente células vivas.

Células INS-1E e RINm5F ( $2 \times 10^4$  células por poço) foram semeadas em placas de 96 poços pretas com fundo transparente. Após tratamento, ambas as placas foram incubadas com 0,1mL de solução de diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA)  $10\mu\text{M}$  e de Hoechst 33342  $15,4\mu\text{M}$  por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Após a incubação, as placas foram analisadas em um espectrofotômetro Synergy HTX (Biotek, Winooski, Vermont, USA) em  $\lambda_{\text{exc}} = 480\text{nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 520\text{nm}$  (DCF-DA) and  $\lambda_{\text{exc}} = 350\text{nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 461\text{nm}$  (Hoechst). Os dados foram normalizados pela coloração com Hoechst 33342, que cora de azul somente núcleos de células vivas. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência de DCF.

### 3.6.2 Ensaio de proliferação celular

Neste ensaio são utilizados uma sonda fluorescente vermelha (CyQuant®) capaz de se ligar ao DNA e permeante à célula e um supressor de fluorescência, ao qual a célula é impermeável. A sonda e o supressor são misturados, adicionados às células, incubados por uma hora e, em seguida, a fluorescência medida. A sonda entra em todas as células, mas o supressor só entra em células com membranas comprometidas. Ao entrar aí, o supressor de fluorescência desfaz o sinal da sonda fluorescente, resultando na detecção de apenas células viáveis.

Células INS-1E e RINm5F ( $2 \times 10^4$  células por poço) foram semeadas em placas de 96 poços pretas com fundo transparente. Após tratamento, ambas as placas foram incubadas com 0,1mL de solução *CyQuant Direct 2X detection reagent* por 1h a  $37^\circ\text{C}$ . Após a incubação, as placas foram analisadas em um espectrofotômetro Synergy HTX (Biotek, Winooski, Vermont, USA) em  $\lambda_{\text{exc}} = 622\text{nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 645\text{nm}$ . O *CyQuant Direct 2X detection reagent* se produz combinando em um tubo de 15mL, 117mL de PBS ou meio de cultura, 0,048mL de *CyQuant Direct nucleic acid stain* e 0,24mL de *CyQuant Direct background supressor*. Após misturada bem, a solução pode ser deixada a temperatura ambiente até que seja usada – seu sinal é estável por até sete horas. Os dados

foram plotados em uma curva de fluorescência x número de células e expressos em unidades arbitrárias de fluorescência de CyQuant Direct Red®.

### **3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM. As análises estatísticas foram levadas a cabo por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de teste de Tukey para comparações múltiplas. A análise comparada no tempo foi realizada por ANOVA de duas vias, seguida de teste de Tukey para comparações múltiplas, avaliando a diferença de médias em cada tratamento e tempo. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (Graphpad, San Diego, CA, USA).

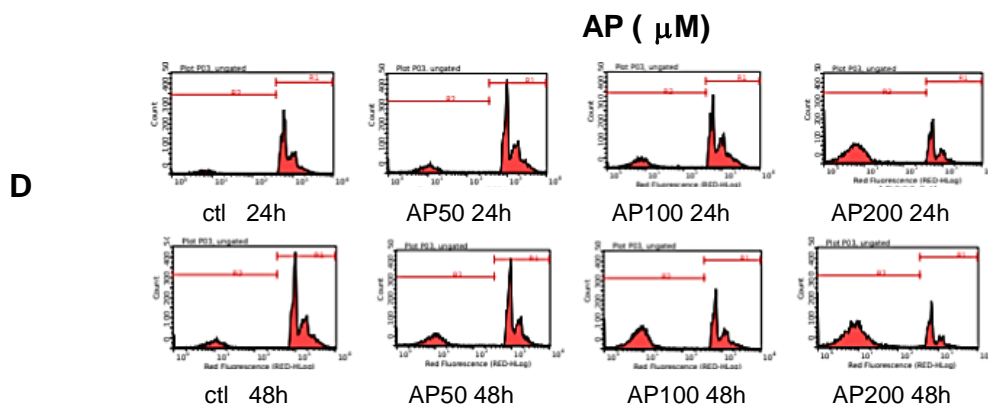
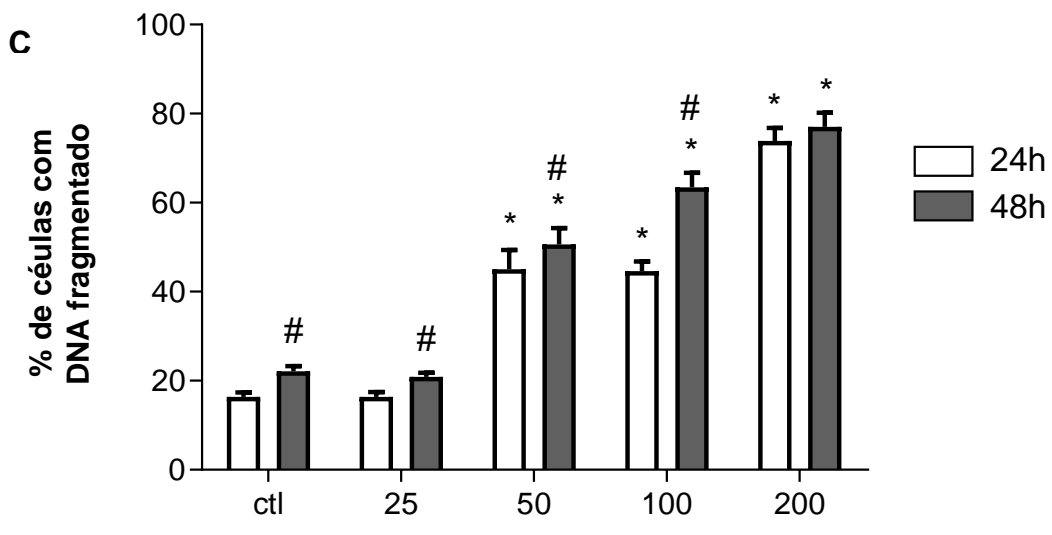
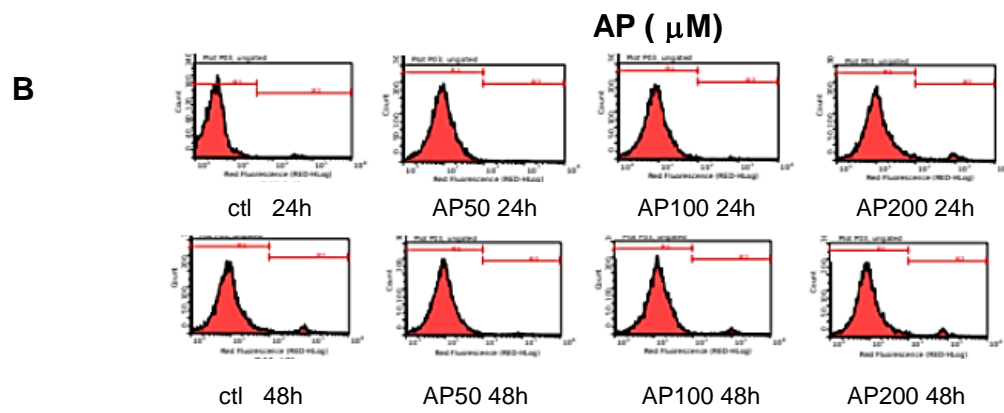
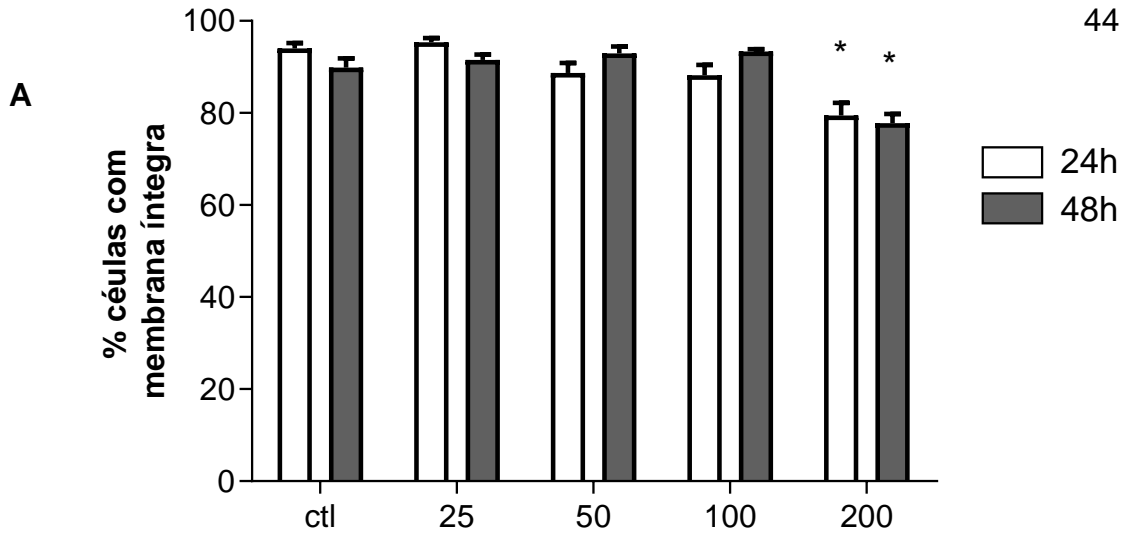
## 4 RESULTADOS

### 4.1 TOXICIDADE DOS ÁCIDOS PALMÍTICO, ESTEÁRICO E OLEICO, COMBINADOS OU NÃO COM OS HORMÔNIOS PROGESTERONA E ESTRADIOL

#### 4.1.1 Toxicidade do AP em células produtoras de insulina

A fim de testar a hipótese de que o tratamento com ácidos graxos sensibilizaria as células secretoras de insulina, comprometendo sua saúde e função, foi primeiro testado o efeito da exposição das duas linhagens aqui utilizadas como modelo experimental à toxicidade crônica do ácido palmítico (AP) em diferentes concentrações, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 200 $\mu$ M e tempos (24h e 48h).

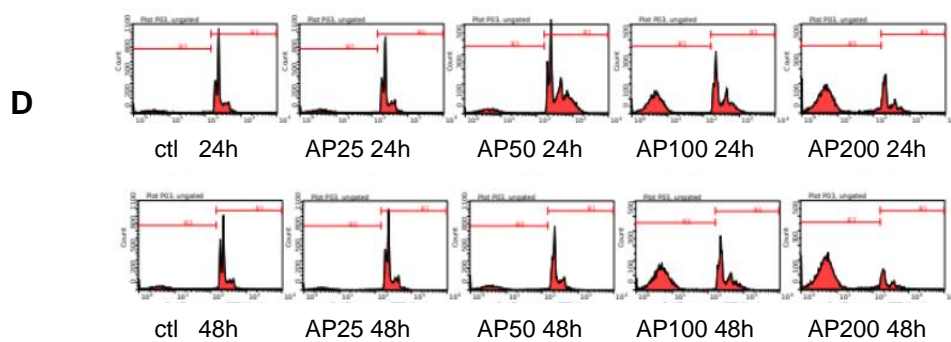
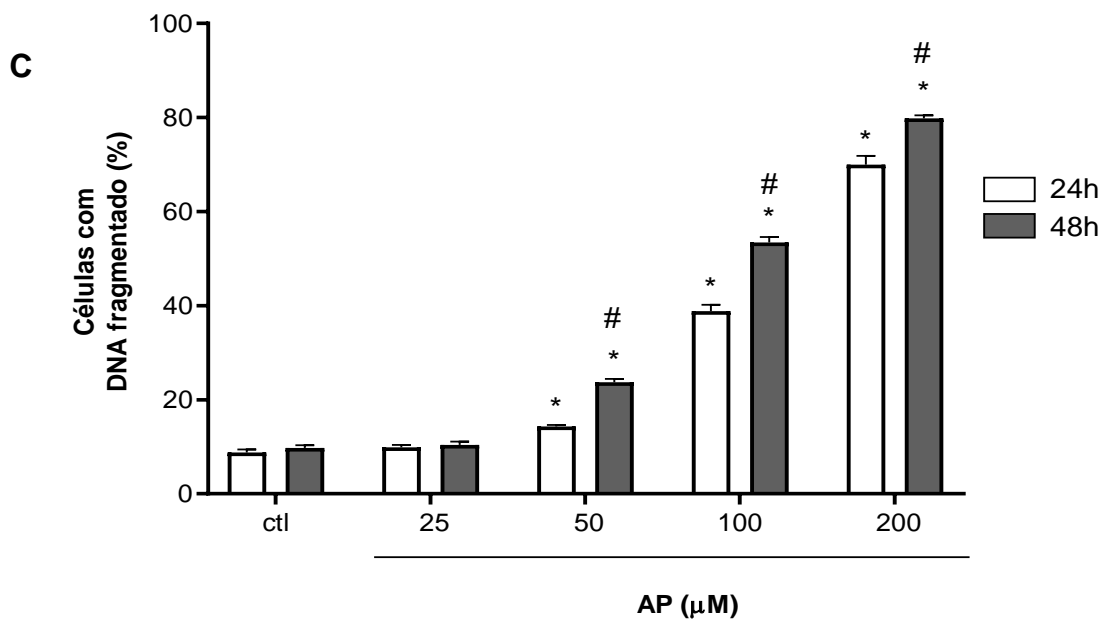
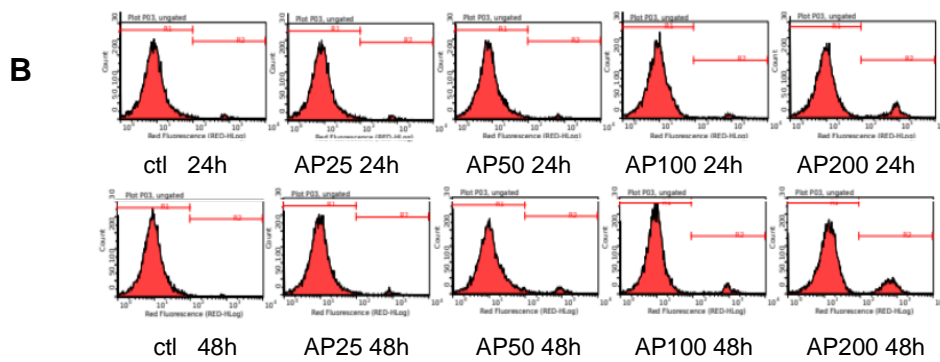
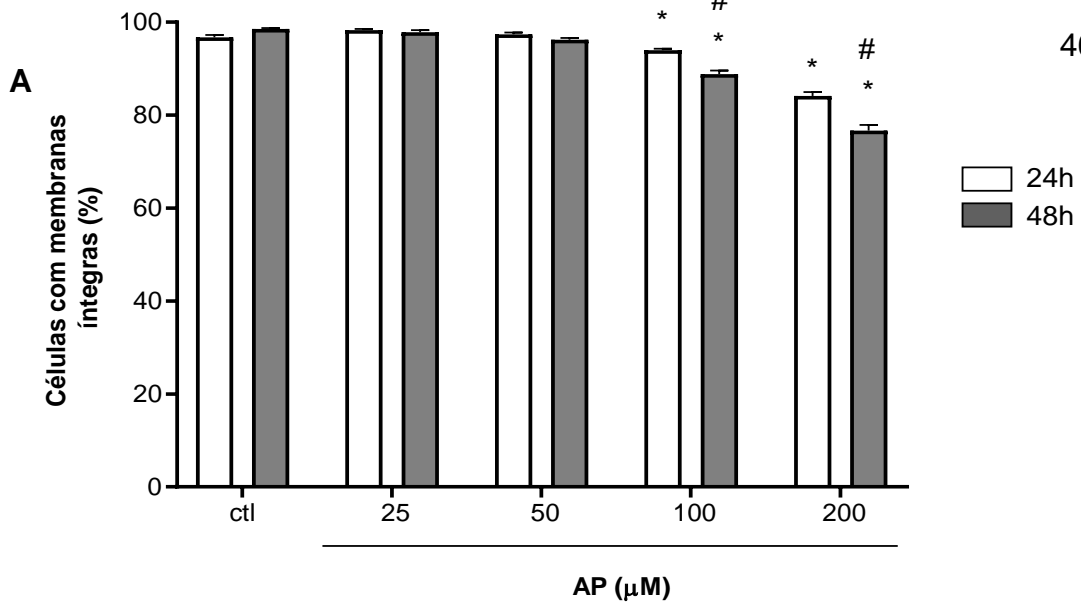
A Figura 13 mostra os resultados obtidos nas leituras por citometria que avaliaram a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e a porcentagem de células com DNA fragmentado após 24 e 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de ácido palmítico na linhagem INS-1E (n=4).



**Figura 13 – Toxicidade do AP em células INS-1E nos tempos 24h e 48h.** **A.** Porcentagem de células com membrana íntegra. **B.** Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados por 24h com AP em diferentes concentrações. **C.** Porcentagem de células com DNA fragmentado. **D.** Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados por 24h com AP em diferentes concentrações (n = 4). \*  $p < 0,05$  comparado aos respectivos controles de 24h ou 48h. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado por 24h.

A incubação de células INS-1E com AP, tanto por 24h como por 48h nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu$ M não provocou perda relevante na integridade de membrana dessas células, diferente do que se observou após as incubações com 200  $\mu$ M desse ácido graxo (Figura 13A). Além disso, não houve interação significativa entre tratamento e tempo de incubação. No entanto, ao avaliar-se a porcentagem de fragmentação de DNA em células tratadas com esse ácido graxo, observou-se um crescente percentual de células com DNA fragmentado em todos os grupos tratados. Ademais, houve interação entre tratamento e tempo significativa e é possível observar o efeito crônico da incubação com AP nas concentrações testadas (Figura 13C).

A Figura 14 mostra os resultados obtidos nas leituras citométricas que avaliaram a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e a porcentagem de células com DNA fragmentado realizadas 24 horas e 48 horas após os tratamentos com diferentes concentrações de ácido palmítico na linhagem RINm5F (n=4).





**Figura 14 – Toxicidade do AP em células RIN-m5F nos tempos 24h e 48h.** **A.** Porcentagem de células com membrana íntegra. **B.** Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados por 24h com AP em diferentes concentrações. **C.** Porcentagem de células com DNA fragmentado. **D.** Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados por 24h com AP em diferentes concentrações (n=4). \*  $p < 0,05$  comparado aos respectivos controles de 24h ou 48h. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado por 24h.

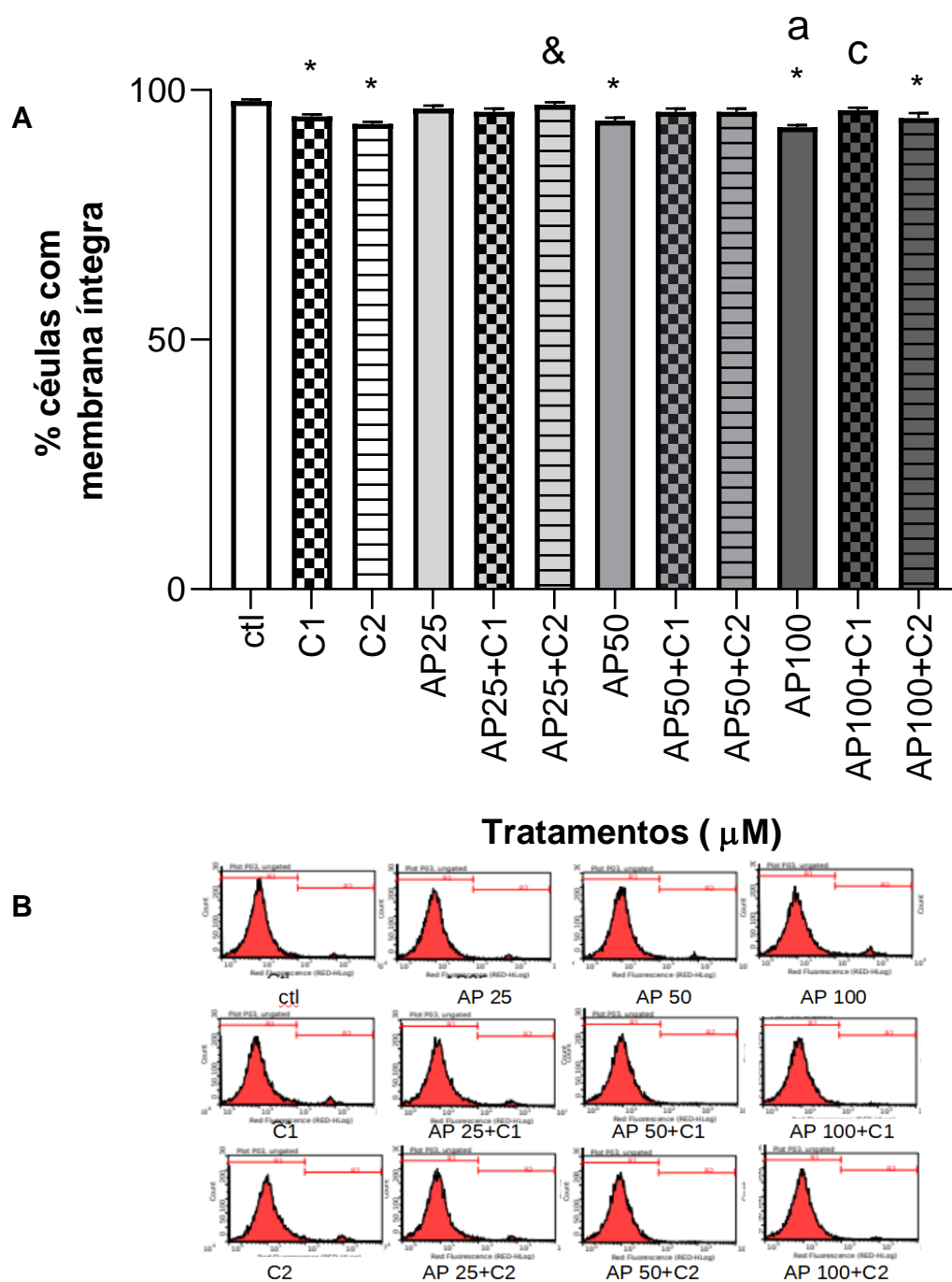
A incubação tanto por 24h como por 48h de células RINm5F com AP em diferentes concentrações levou a uma diminuição significativa no número de células viáveis nas concentrações de AP 100 $\mu$ M e 200 $\mu$ M no primeiro caso (24h) e 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 200 $\mu$ M, no segundo (48h) e foi identificada interação significativa entre tratamento e tempo de incubação para os dois últimos tratamentos, no primeiro caso (Figura 14A) e nas concentrações 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 200 $\mu$ M para o tempo 48h (Figura 14 C)

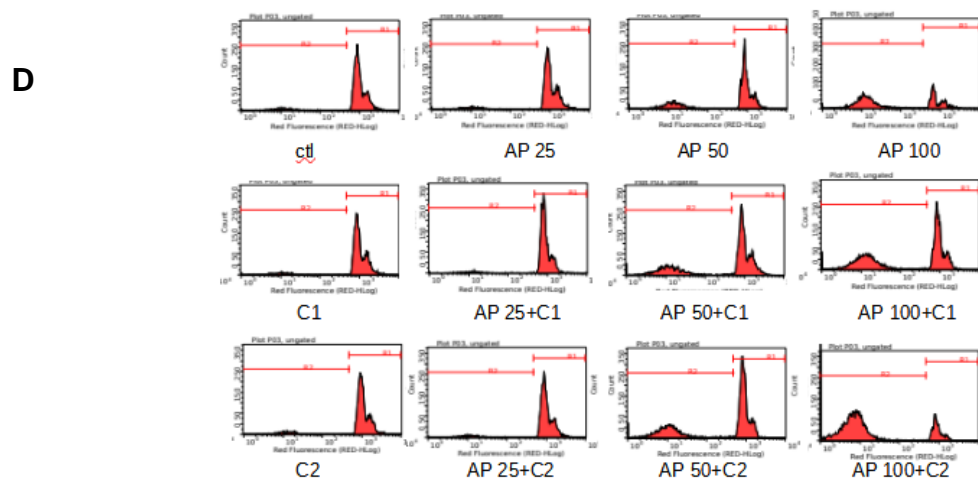
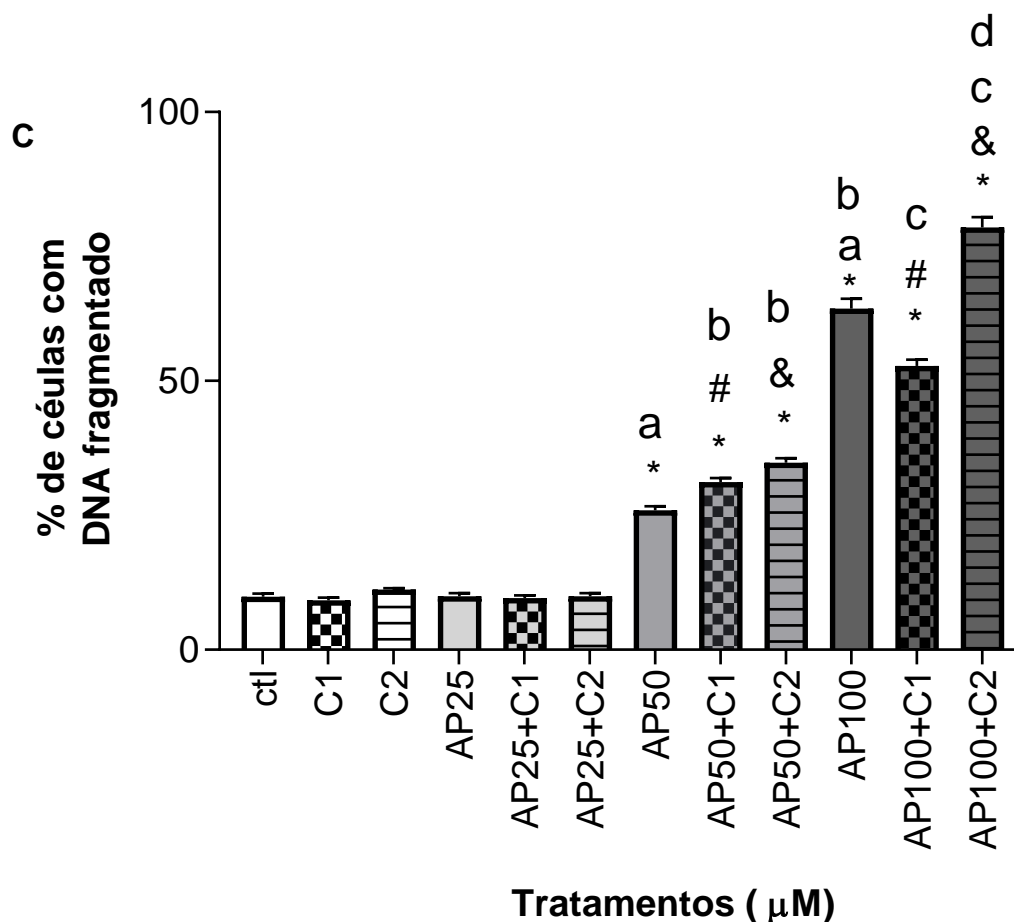
A avaliação da percentagem de fragmentação de DNA em células tratadas com esse ácido graxo, mostrou também um crescente percentual de células com DNA fragmentado a partir da concentração 50 $\mu$ M. Aqui houve também interação entre tempo de tratamento e concentração de AP significativa nas concentrações 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 200 $\mu$ M e é possível observar o efeito crônico da incubação com AP nas concentrações testadas (Figura 14C).

#### **4.1.2 Toxicidade de AP em diferentes concentrações em combinação com os hormônios Progesterona e 17- $\beta$ estradiol**

Obtidos os resultados dos efeitos da exposição por 24h e 48h ao ácido palmítico, foram testadas a extensão da interferência desse ácido graxo sozinho ou em duas combinações com progesterona e estradiol, mimetizando o quanto possível as concentrações fisiológicas (C1) e no DG (C2), conforme mostrado na tabela 1. Seguidamente a essa triagem, foi selecionada a concentração de 100 $\mu$ M a fim de comparar seus efeitos aos de outros dois ácidos graxos, isoladamente ou combinados a C1 e C2. Com isso, se avaliaria melhor a hipótese de essa combinação ter efeito deletério ainda mais pronunciado sobre a saúde e função da célula  $\beta$ . Os resultados dessa triagem foram importantes para decidir sobre a concentração de AP e dos outros ácidos graxos nos experimentos seguintes.

A Figura 15 mostra os resultados obtidos nas leituras citométricas que avaliaram porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e porcentagem de células com DNA fragmentado realizadas 24 horas após os tratamentos com ácido palmítico em diferentes concentrações e em combinação ou não com hormônios sexuais para a linhagem INS-1E (n=4).





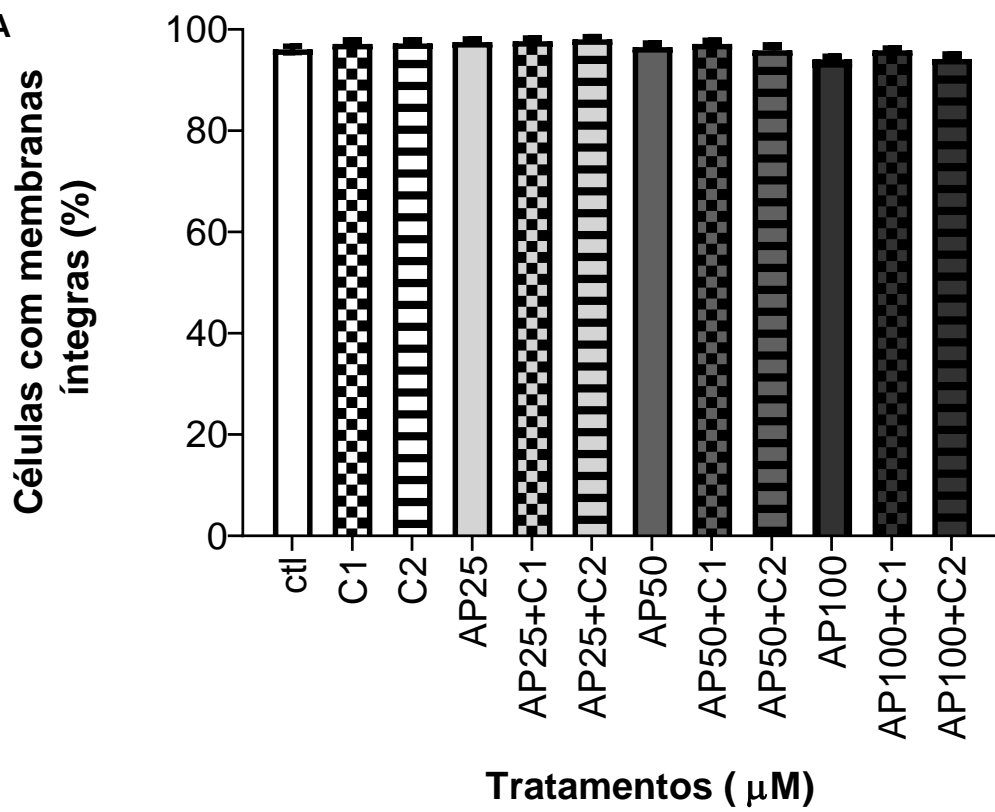
**Figura – 15. Toxicidade do AP em diferentes concentrações e em combinação ou não com hormônios sexuais em células INS-1E. A.** Percentagem de células com membrana íntegra. **B.** Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados com AP em diferentes concentrações e combinado ou não com hormônios. **C.** Percentagem de células com DNA fragmentado. **D.** Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados com AP em diferentes concentrações e combinado ou não com hormônios (n=4). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle; #  $p < 0,05$  comparado a C1; &  $p < 0,05$  comparado a C2; a  $p < 0,05$  comparado a AP25; b  $p < 0,05$  comparado a AP50; c  $p < 0,05$  comparado a AP100; d  $p < 0,05$  comparado a AP +C1.

A incubação de células INS-1E com os tratamentos designados produziu perda estatisticamente significativa de integridade da membrana plasmática nos grupos C1, C2, AP50, AP100 e AP100+C2 respectivamente com relação ao controle (tratado apenas com etanol 0,5%). Além disso, o grupo tratado com AP 100 $\mu$ M teve uma redução significativa em relação ao grupo tratado com AP 25  $\mu$ M. A figura 15A permite ainda observar que foi detectado um aumento na porcentagem de células com membrana íntegra tanto o grupo AP25+C2, em relação a C2, como o grupo AO100+C1, em relação a AP100.

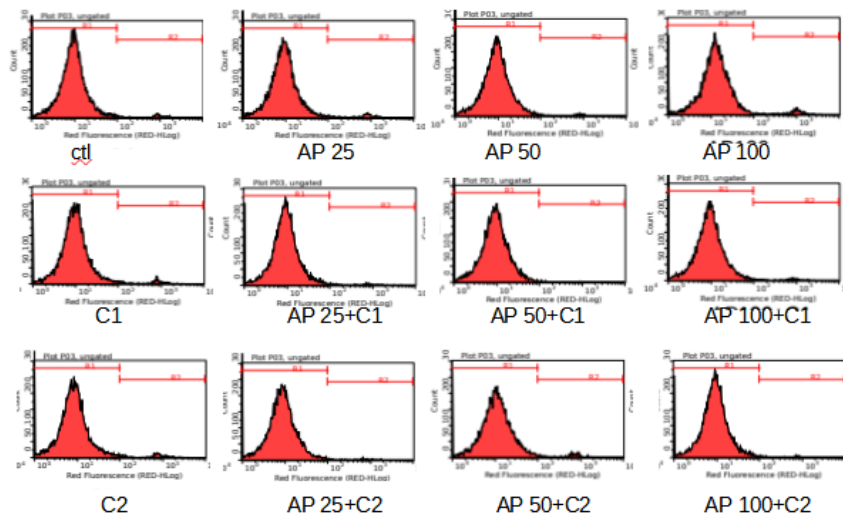
Relativamente à porcentagem de células com material genético fragmentado, nos grupos tratados com AP 25  $\mu$ M e suas combinações não foi detectada qualquer diferença com relação ao controle. Entretanto, todos os grupos subsequentes apresentaram um grau maior e estatisticamente significativo de fragmentação de DNA em relação ao controle (ctl). Do mesmo modo, as combinações AP+C1 (50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M) e AP+C2 (50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M) também mostraram significativo aumento de fragmentação de DNA em relação a C1 e C2 respectivamente. O aumento na porcentagem de fragmentação do material genético da célula também apareceu na comparação entre os grupos não combinados com hormônios AP50 e AP100 entre si e em relação a AP25. Já na comparação dentro de cada família de AP, observou-se aumento significativo de AP50+C1 e AP50+C2 em relação a AP50, mas nenhuma diferença entre eles; do mesmo modo, houve um aumento significativo de AP100+C2 e uma diminuição de AP100+C1 em relação a AP100 e dessa vez foi detectada diferença significativa entre essas duas combinações de AP com hormônios.

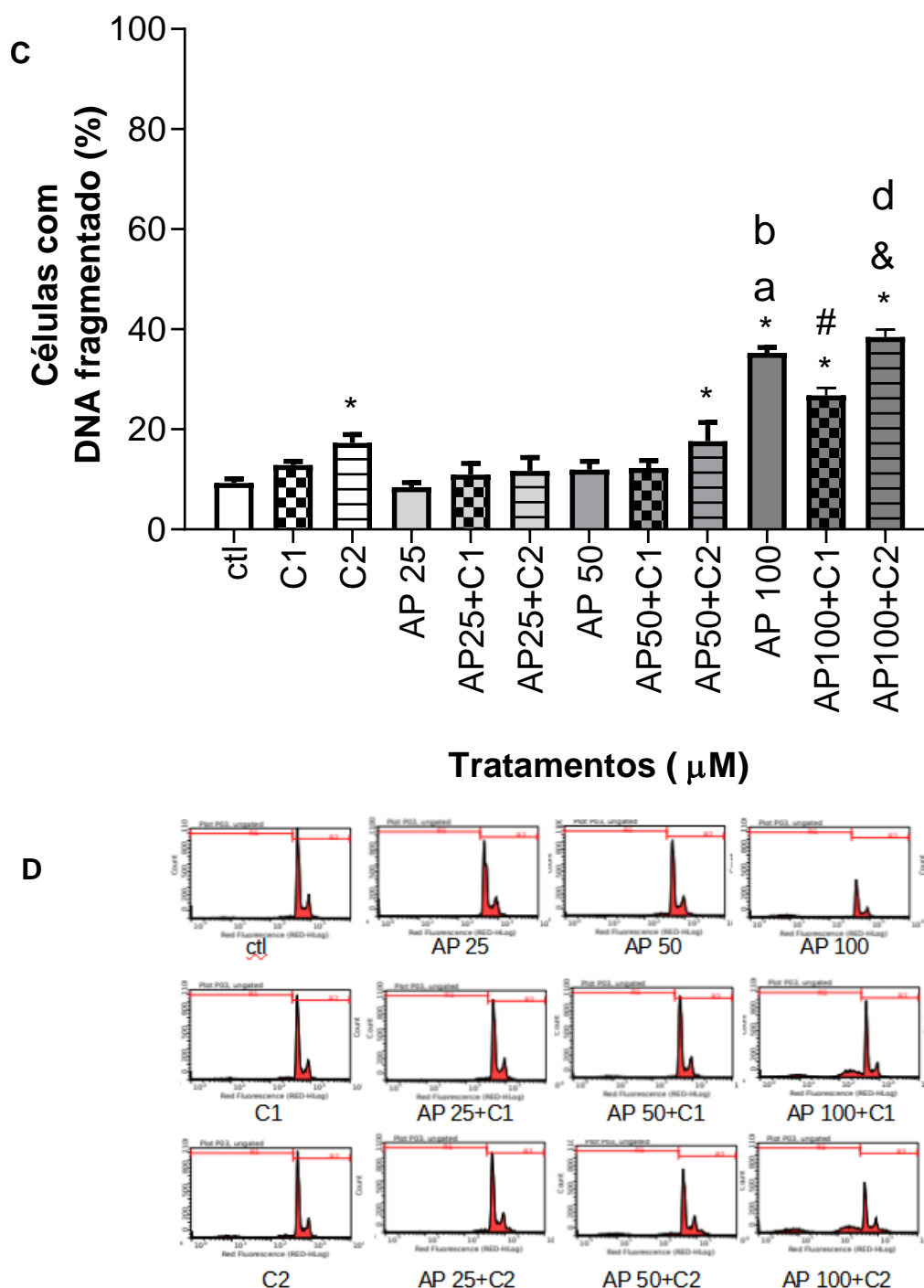
A Figura 16 mostra os resultados obtidos nas leituras citométricas que avaliaram porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e porcentagem de células com DNA fragmentado realizadas 24 horas após os tratamentos com ácido palmítico em diferentes concentrações e em combinação ou não com hormônios sexuais para a linhagem RIN-m5F (n=4).

A



B





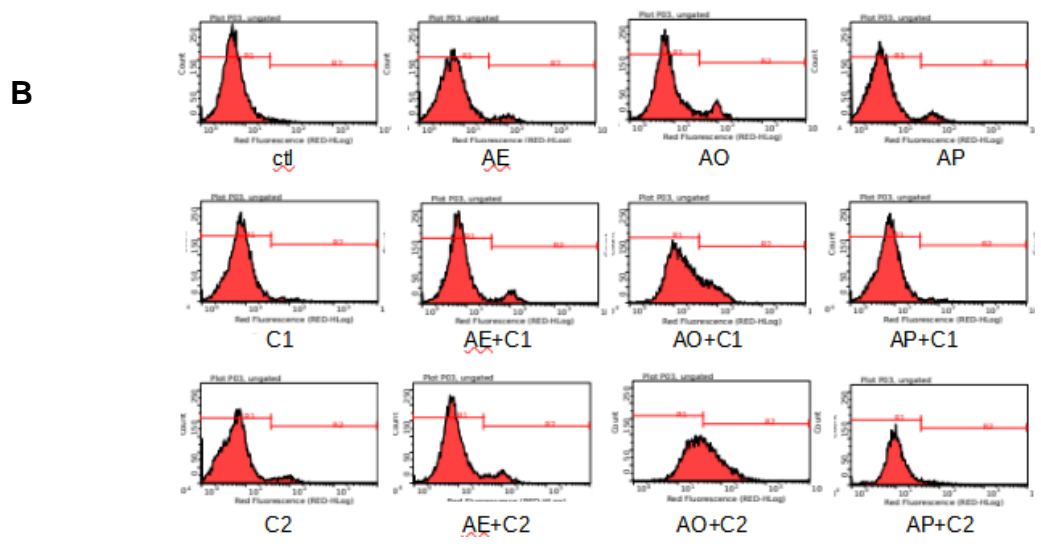
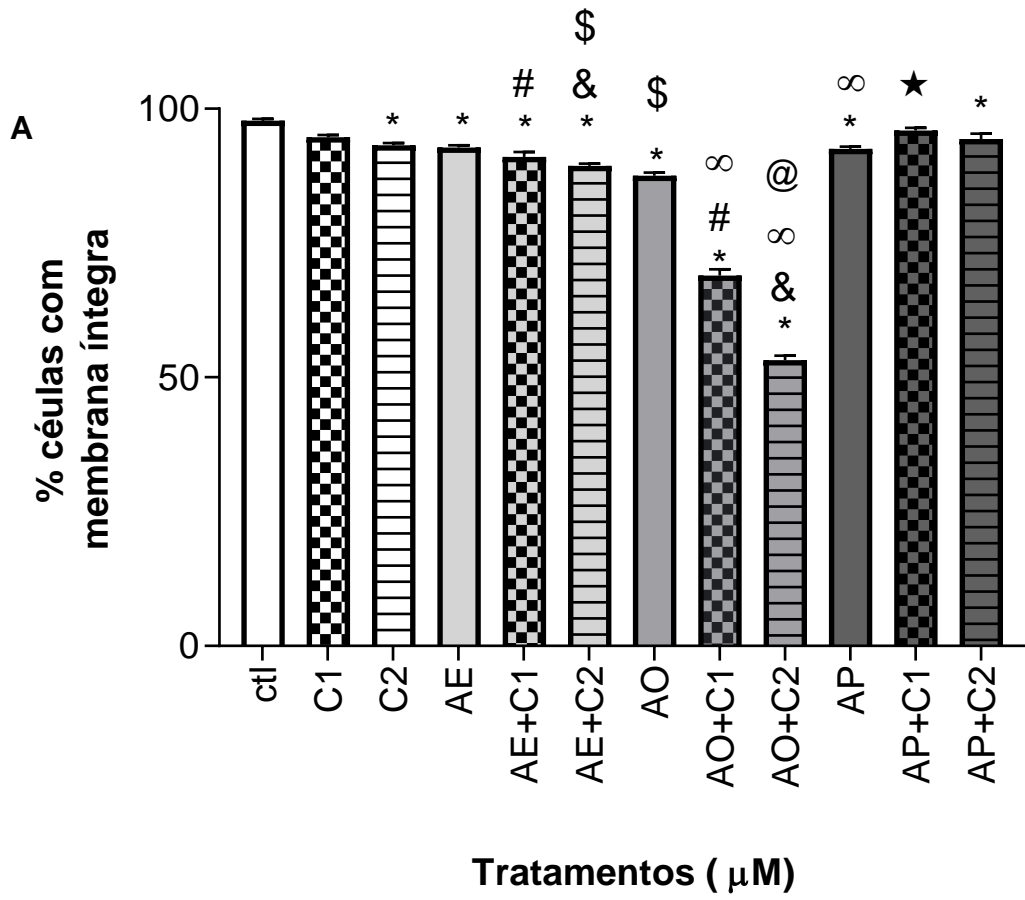
**Figura – 16. Toxicidade do AP em diferentes concentrações e em combinação ou não com hormônios sexuais em células RIN-m5F. A.** Porcentagem de células com membrana íntegra. **B.** Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados com AP em diferentes concentrações e combinado ou não com hormônios. **C.** Porcentagem de células com DNA fragmentado. **D.** Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados com AP em diferentes concentrações e combinado ou não com hormônios (n=4). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle; #  $p < 0,05$  comparado a C1; &  $p < 0,05$  comparado a C2; a  $p < 0,05$  comparado a AP25; b  $p < 0,05$  comparado a AP50; d  $p < 0,05$  comparado a AP +C1.

A incubação de células RIN-m5F com os tratamentos designados não produziu perda estatisticamente significativa de integridade da membrana plasmática em nenhum dos grupos, como consta na Figura 16A. Por outro lado, a Figura 16C mostra que foi detectada diferença significativa na porcentagem de células com material genético fragmentado em alguns grupos com relação ao controle: C2, AP50+C2, AP100, AP100+C1 e AP100+C2. Na comparação com os grupos C1 e C2, somente as duas combinações de AP100 apresentaram aumento, respectivamente, AP100+C1 e AP100+C2 – que, inclusive, apresentaram diferença significativa entre si. Por fim, o grupo tratado com AP 100 $\mu$ M mostrou diferença significativa importante entre os grupos AP25 e AP50. Aqui, o grupo AP+C2 apresentou a maior fragmentação (38%) em relação ao grupo AP+C1 (27%) e AP (35%).

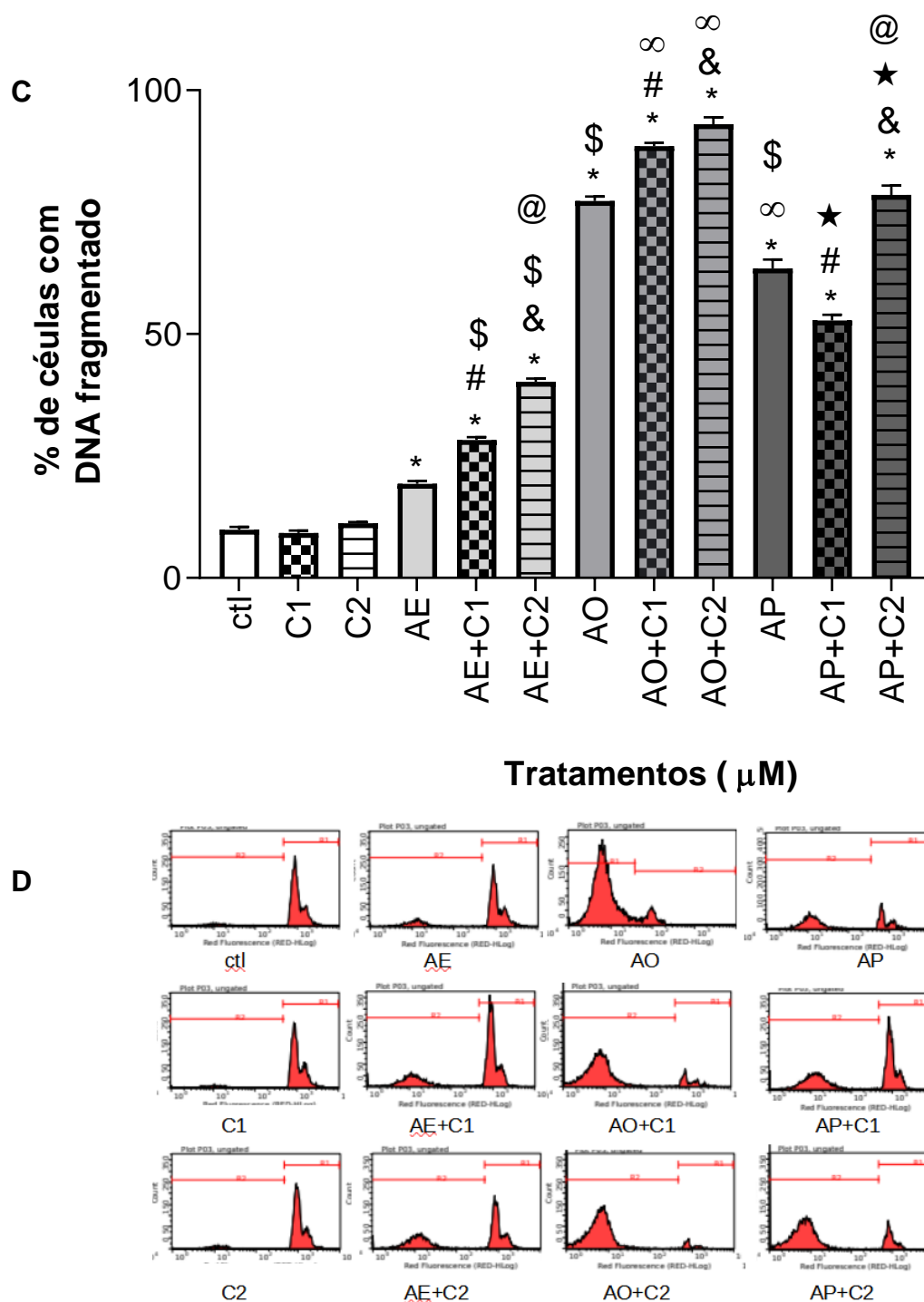
Tais resultados obtidos para as duas linhagens foi considerado ao se decidir pela concentração 100 $\mu$ M para o tratamento das células tanto com AP quanto com os outros ácidos graxos e as respectivas combinações.

#### **4.1.3 Toxicidade de AE e AO 100 $\mu$ M em combinação com os hormônios Progesterona e 17- $\beta$ estradiol e AP 100 $\mu$ M e suas combinações**

A Figura 17 mostra os resultados obtidos nas leituras citométricas que avaliaram porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e porcentagem de células com DNA fragmentado realizadas 24 horas após os tratamentos com AE, AO e AP 100 $\mu$ M combinados ou não com hormônios sexuais na linhagem INS-1E (n=4).





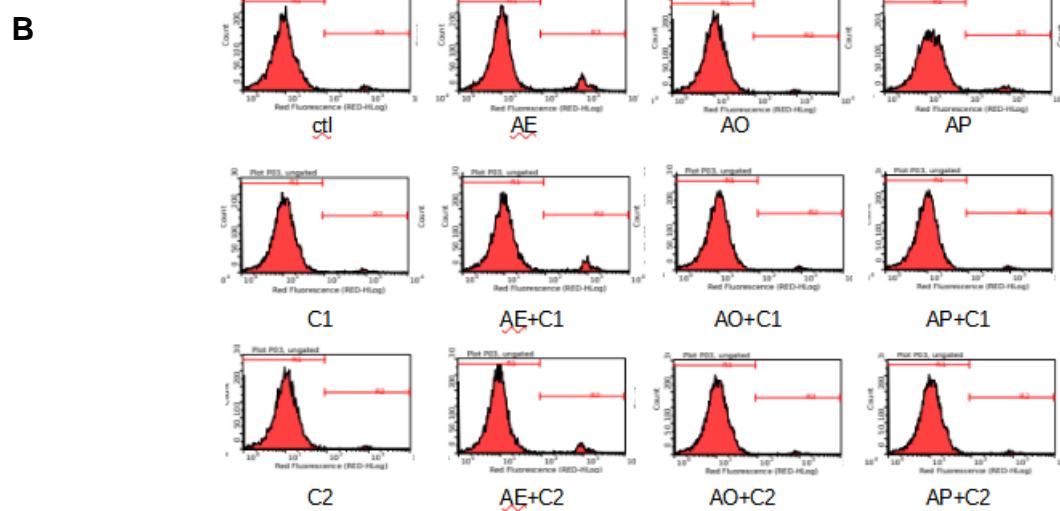
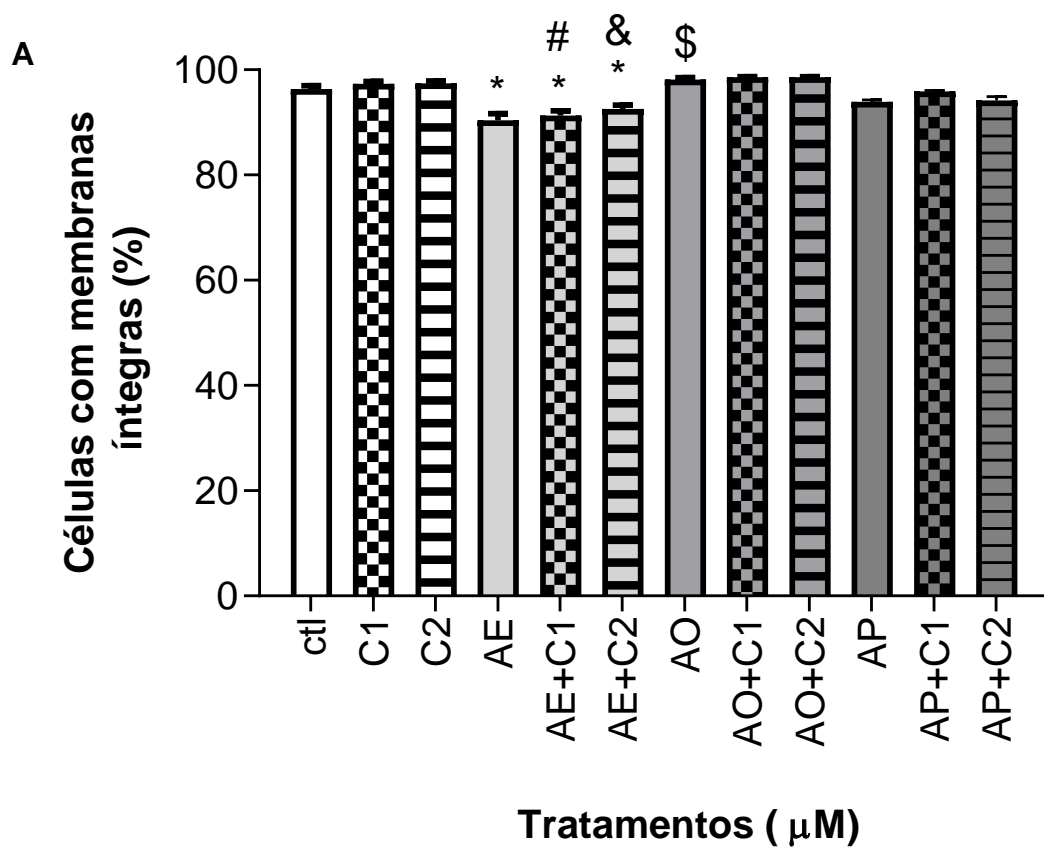


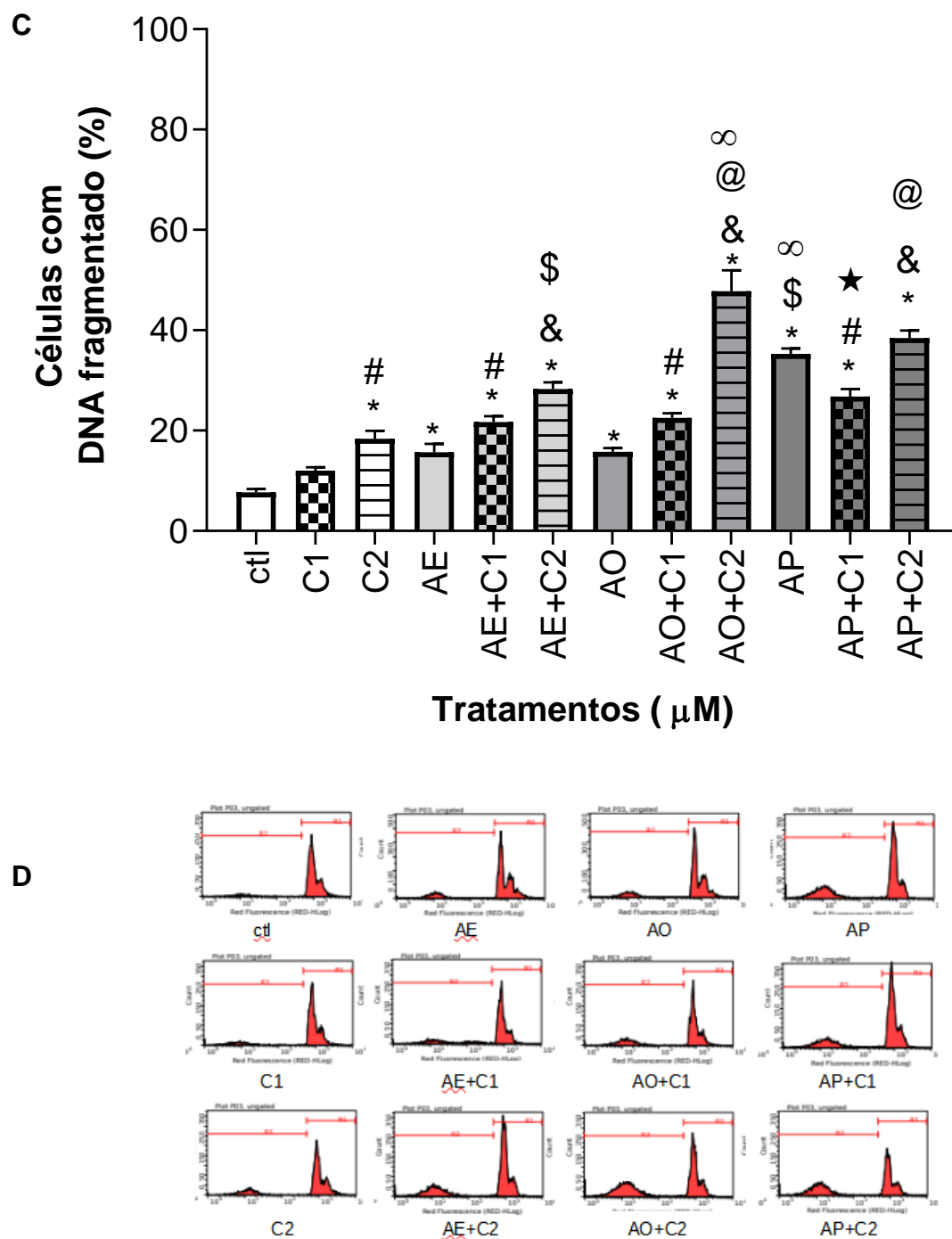
**Figura – 17. Toxicidade de AE e AO 100μM em diferentes concentrações e em combinação ou não com hormônios sexuais em comparação com AP na mesma concentração e condições em células INS-1E. A. Porcentagem de células com membrana íntegra. B. Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados com ácidos graxos combinados ou não com hormônios. C. Porcentagem de células com DNA fragmentado. D. Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados com ácidos graxos combinados ou não com hormônios (n=4). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle; #  $p < 0,05$  comparado a C1; &  $p < 0,05$**

comparado a C2; ★  $p < 0,05$  comparado com AP; \$  $p < 0,05$  comparado com AE; ∞  $p < 0,05$  comparado com AO; @  $p < 0,05$  comparado com AE+C1, AO+C1 ou AP+C1.

A incubação por 24h de células ins-1E com AE e AO 100 $\mu$ M associados ou não com uma das duas combinações de hormônios sexuais (C1 e C2) mostrou que os três ácidos graxos (associados ou não com hormônios, à exceção da combinação AP+C1) e C2 isoladamente provocaram uma diminuição significativa no número de células viáveis em relação ao controle, tratado somente com o veículo (Figura 17A). As maiores porcentagens de células com perda de integridade de membrana foram verificadas para AO e suas combinações: 12% (AO), 31% (AO+C1) e 47% (AO+C2) em comparação com o controle (ctl), apenas 2%. Já ao avaliar-se a porcentagem de fragmentação de DNA em células tratadas como mencionado, observou-se que o tratamento tanto com AE como com AO ou AP 100 $\mu$ M, associados ou não com qualquer uma das duas combinações de progesterona e estradiol provocou um aumento significativo da população de células com DNA fragmentado, sendo AO mais tóxico (77%) que AP (63%), mais tóxico que AE (20%) (Figura 17B). Do mesmo modo, as respectivas combinações com hormônios esteroides foram crescentemente tóxicas: AE+C2, 40% comparado com AE+C1, 28%; AO+C2, 90% comparado com AO+C1, 88% e AP+C1, 53% contra AP+C2, 59%. Desses, somente o grupo AP+C1 apresentou menor porcentagem de fragmentação em relação ao respectivo ácido graxo.

A Figura 18 mostra os resultados obtidos nas leituras citométricas que avaliaram porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e porcentagem de células com DNA fragmentado realizadas 24 horas após os tratamentos com ácidos esteárico e oleico em combinação com hormônios sexuais para a linhagem RINm5F (n=4).



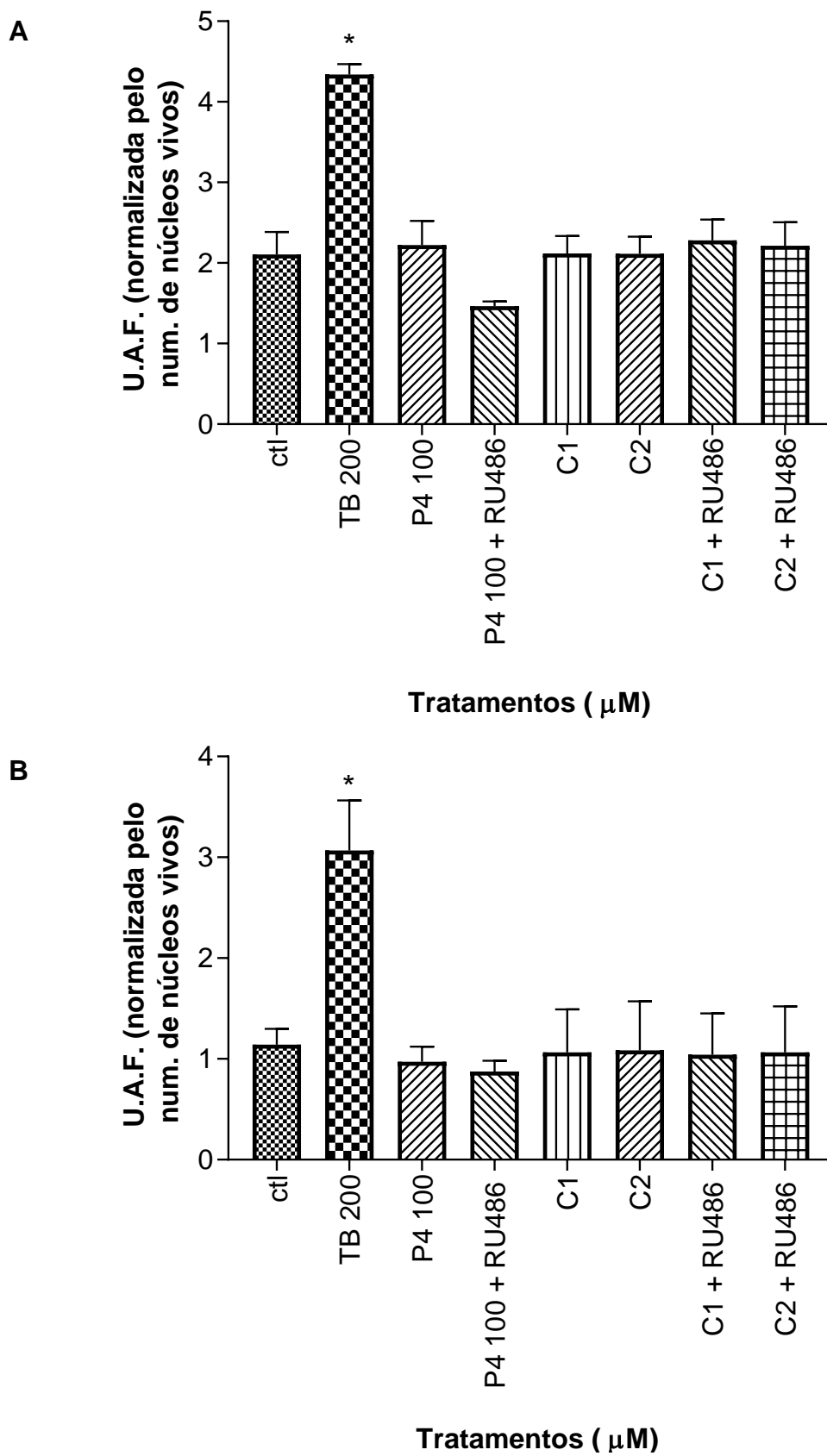


**Figura 18 – Toxicidade de AE e AO 100µM em diferentes concentrações e em combinação ou não com hormônios sexuais em comparação com AP na mesma concentração e condições em células RIN-m5F. A.** Porcentagem de células com membrana íntegra. **B.** Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados com ácidos graxos combinados ou não com hormônios. **C.** Porcentagem de células com DNA fragmentado. **D.** Histogramas representativos de cada um dos grupos tratados com ácidos graxos combinados ou não com hormônios (n=4). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle; #  $p < 0,05$  comparado a C1; &  $p < 0,05$  comparado a C2; ★  $p < 0,05$  comparado com AP; \$  $p < 0,05$  comparado com AE; ∞  $p < 0,05$  comparado com AO; @  $p < 0,05$  comparado com AE+C1, AO+C1 ou AP+C1.

A incubação por 24h de células RINm5F com AE e AO 100 $\mu$ M associados ou não com uma das duas combinações de hormônios sexuais (C1 e C2) levou à significativa perda da integridade de membrana plasmática somente nos grupos tratados com AE associado ou não com hormônios (respectivamente, 10%, 9% e 8% ) provocaram uma diminuição significativa no número de células viáveis em relação ao controle (4%) (Figura 18A). No entanto, ao avaliar-se a porcentagem de fragmentação de DNA em células tratadas como mencionado, observou-se que o tratamento tanto com AE como com AO ou AP 100 $\mu$ M, associados ou não com qualquer uma das duas combinações de progesterona e estradiol provocou um aumento significativo da população de células com DNA fragmentado: AE+C2, 28%, AE+C1, 22% e AE, 16%; AO+C2, 48%, AO+C1, 23% e AO, 16%; AP+C2, 38% contra AP+C1, 27%, AP, 35%. Desses, somente o grupo AP+C1 apresentou menor porcentagem de fragmentação em relação ao respectivo ácido graxo (Figura 18B).

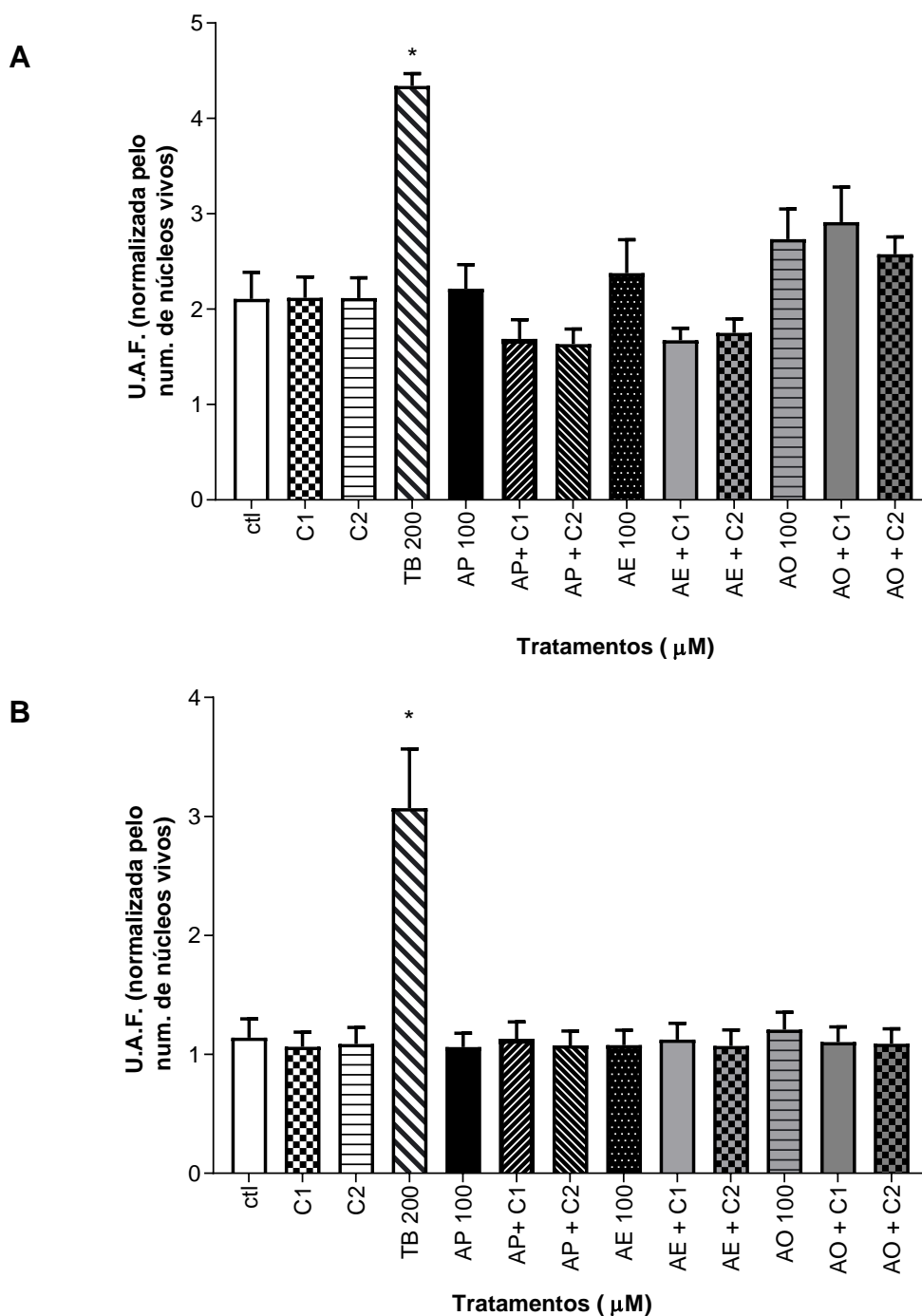
#### **4.2 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)**

Uma vez que em C1 e C2 os hormônios estão em uma concentração mais próxima do fisiológico ou do DG, respectivamente (cf. tabela 1), isso resulta em um maior potencial de translacionar esses resultados para a condição metabólica avaliada. O resultado é mostrado na Figura 19. Além disso, a Figura 20 mostra o resultado do experimento de avaliação da produção de EROs para as linhagens INS-1E e RINm5F (n=5, cada).



**Fig. 19 – Efeito dos hormônios esteroides sobre a produção de EROs em células produtoras de insulina. A.** Resultado com a linhagem INS-1E (n=5). **B.** Resultado com a

linhagem RINm5F (n=5). TB, \*  $p < 0,05$  em relação ao controle (ctl). TB = terc-butil hidroperóxido 200 $\mu$ M, controle positivo de produção de EROs. RU 486 = mifepristona 75 $\mu$ M (quando tratado com P<sub>4</sub> 100 $\mu$ M) ou 1 $\mu$ M (quando co-incubado com C1 ou C2), antagonista da progesterona.

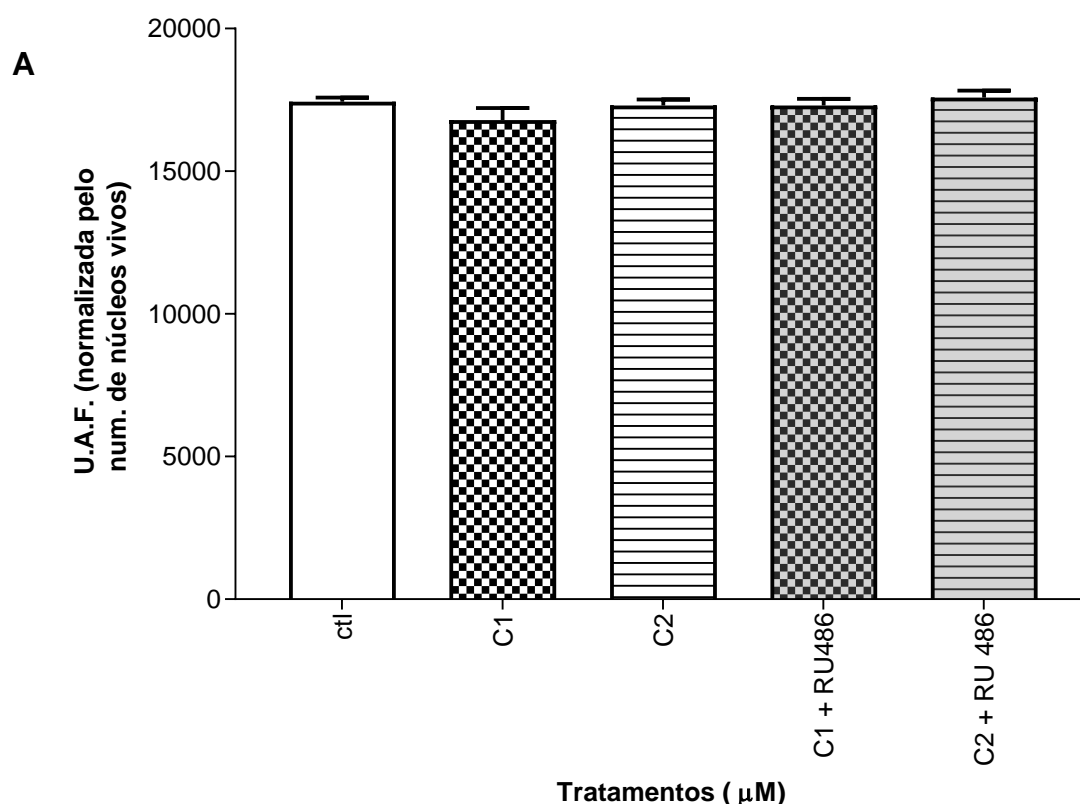


**Fig. 20 – Efeito dos hormônios esteroides e ácidos graxos sobre a produção de EROs em células produtoras de insulina. A.** Resultado com a linhagem INS-1E (n=5) **B.** Resultado para a linhagem RINm5F (n=5), \*  $p < 0,05$  em relação ao controle (ctl).

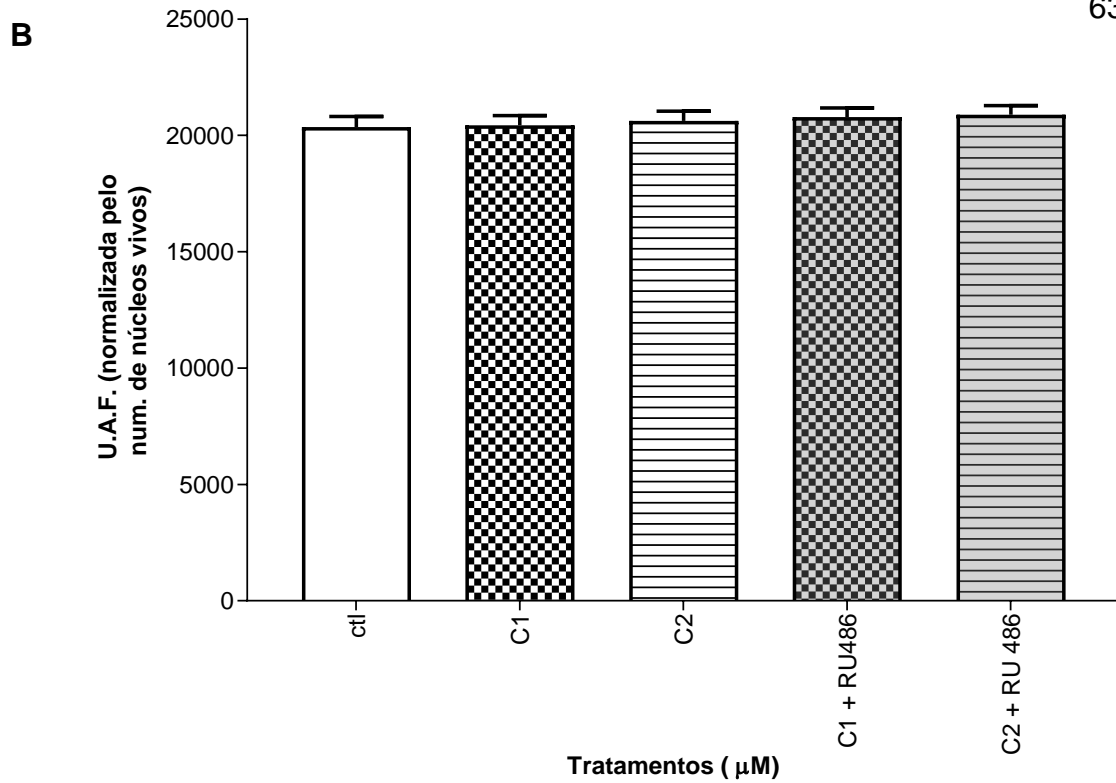
De modo geral, como mostrado na figura 20, a presença ou não de ácidos graxos combinados ou não com hormônios esteroides não alterou a produção de espécies reativas de oxigênio em nenhuma das duas linhagens de célula  $\beta$  utilizadas.

### 4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

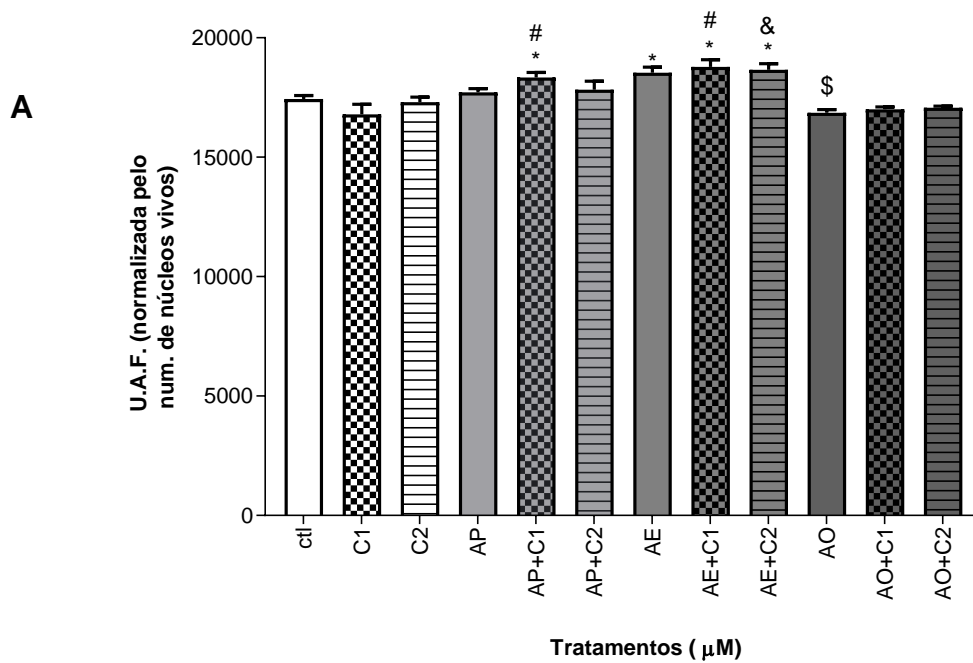
Afim de avaliar a interferência da progesterona nas concentrações C1 e C2 na taxa de proliferação das linhagens, as células foram tratadas com mifepristona (RU 486), um antagonista de  $P_4$ . Entretanto, não foi detectada alteração significativa, como mostrado na figura 21 abaixo. E a figura 22 mostra o resultado dos experimentos de proliferação celular conduzidos com as linhagens INS-1E e RINm5F (n=5, cada).

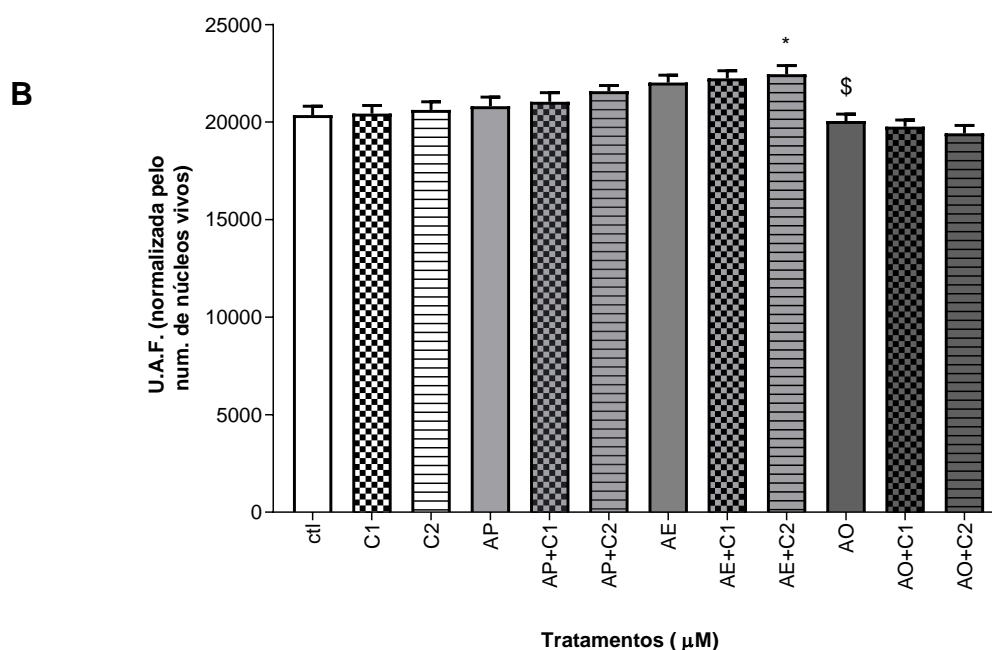






**Figura 21 – Efeito dos hormônios esteroides sobre a proliferação de células produtoras de insulina. A.** Resultado com a linhagem INS-1E(n=5) **B.** Resultado com a linhagem RINm5F (n=5). RU 486 1 $\mu\text{M}$ .





**Figura 22 – Efeito dos hormônios esteroides e ácidos graxos sobre a proliferação de células produtoras de insulina. A.** Resultado com a linhagem INS-1E (n=5). **B.** Resultado com a linhagem RINm5F (n=5). \* p < 0,05 em relação ao controle (ctl); # p < 0,05 em relação a C1; & p < 0,05 em relação a C2; \$ p < 0,05 em relação a AE.

Em células INS-1E, não só a combinação com C2, mas todo o conjunto de grupos tratados com ácido esteárico apresentaram alteração significativa na taxa de proliferação da linhagem em relação ao grupo controle. Ademais, a combinação de ácido palmítico + C1 também apresentou aumento significativo em relação ao controle. Além disso, os grupos tratados com a combinação de ácido palmítico + C1 e ácido esteárico + C1 apresentaram um aumento significativo, embora discreto, em relação à taxa de proliferação do grupo tratado somente com a combinação C1 de hormônios. Ainda, o grupo tratado com a combinação AE + C2 também mostrou significância estatística com relação ao grupo tratado com a combinação C2 de hormônios, e o grupo tratado com ácido oleico, teve uma redução na taxa de proliferação estatisticamente significativa em relação ao grupo AE (mas não ao controle). Para a linhagem RINm5F, fora o grupo tratado com a combinação de ácido esteárico + C2, que mostrou um aumento da ordem de 10% na taxa de proliferação em relação ao grupo controle (ctl) e o grupo tratado com AO que também apresentou redução significativa em relação ao grupo tratado com AE, nenhum outro grupo apresentou alteração significativa na taxa de proliferação.

## 5. DISCUSSÃO

Linhagens de células tumorais imortalizadas são modelos experimentais baratos, fáceis de cultivar e manter e comumente utilizados em pesquisas em laboratório. Embora sejam mantidas muitas das características do tecido de origem dessas células, devem ser notadas diferenças importantes relacionadas a alterações genéticas (SINHA, SCHULTZ e SANDER, 2015) – e é de se especular se também no caso das respostas dessas células, muitas vezes a um mesmo estímulo ambiental. E isso porque as linhagens acabam por adquirir mudanças adicionais devido ao processo de imortalização e durante o crescimento e manutenção em cultura (SINHA, SCHULTZ e SANDER, 2015).

Não obstante, como já se disse, a utilização de linhagens confere consistência e reprodutibilidade aos trabalhos, permitindo que várias condições sejam testadas antes de se translacionar os ensaios para modelos animais (SKELIN; RUPNIK; CENCIC, 2010). Neste trabalho as linhagens de células produtoras de insulina RINm5F e INS-1E foram estudadas frente aos estímulos dos hormônios esteroides progesterona e  $17\beta$ -estradiol, isoladamente ou em combinação com ácidos graxos.

O ácido palmítico (AP, C:16) é o éster de ácido graxo mais abundante no plasma sanguíneo. Em humanos saudáveis esse ácido graxo é encontrado na faixa entre  $1,648 \pm 0,488\text{mM}$  (ABDELMAGID et al., 2015) e  $2,655 \pm 0,735\text{mM}$  (SERGEANT, et al., 2016). Em camundongos normais esse valor é de  $444,7\mu\text{M}$ , enquanto em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica esse valor chega a  $572\mu\text{M}$  e em ratos, em média,  $143\mu\text{M}$  (PERSSON et al., 2010). Por essa abundância, o ácido palmítico tem sido utilizado para estudos *in vitro* de mecanismos de lipotoxicidade em células  $\beta$  (CIREGIA et al., 2015; AZEVEDO-MARTINS, 2006). O seu conteúdo no organismo parece estar controlado em torno de uma concentração muito bem definida (CARTA et al, 2017). Além disso, o excesso de ácido palmítico causa não só expansão do tecido adiposo branco (TAB) como também aumenta, em adipócitos e no músculo esquelético, a inflamação e apoptose, possivelmente por aumento do estresse de retículo

endoplasmático, bem como geração de espécies reativas de oxigênio e ceramidas (KENNEDY et al., 2009).

Além disso, pelo fato de os ácidos graxos estarem envolvidos em uma grande gama de doenças crônicas e por sua reconhecida habilidade em modificar o status de risco da doença (ABDELMAGID et al, 2015), foram considerados nesse trabalho também os ácidos oleico (AO) e esteárico (AE), respectivamente, o segundo e o terceiro ácidos graxos mais abundantes no organismo humano. De acordo com o perfil levantado por Abdelmagid et al (2015), o ácido oleico (AO) está presente no plasma na concentração média de 1285 $\mu$ M e o ácido esteárico (AE), na concentração média de 490 $\mu$ M.

No presente estudo, observou-se que a toxicidade apresentada pelo ácido palmítico em células INS-1E e RINm5F foi expressa de modo dependente da dose e, em alguma extensão, do tempo de tratamento. Em células INS-1E, o tempo não interferiu na integridade das membranas plasmáticas das células, mas seu efeito se fez patente quando se avaliou a porcentagem de células com DNA fragmentado e somente nos grupos tratados com AP 50 e 100  $\mu$ M. Por sua vez, o efeito deletério sobre a integridade de membrana plasmática foi observado em células RINm5F nos grupos tratados com AP nas concentrações 100 $\mu$ M e 200 $\mu$ M. Com efeito, células RINm5F apresentaram o mesmo comportamento dose-dependente em um estudo de lipotoxicidade de diferentes ácidos graxos por 24h (AZEVEDO-MARTINS et al., 2006). Células INS-1E, assim, em princípio, parecem mais resistentes que células RIN-m5F à perda de integridade e de membrana, causada por esse ácido graxo.

Com efeito, a perda de integridade da membrana tem grande impacto na homeostase, função e sobrevivência da célula. Entretanto, as células estão equipadas com uma robusta maquinaria que cuida de manter essa integridade (DIAS e NYLANDSTED, 2021), um processo eficiente e veloz e que até por isso é um desafio à avaliação do estado da membrana (AMMENDOLIA et al, 2021). Não obstante, é já conhecido que a agregação, dentro e fora da célula, de  $\beta$ -amilina, uma proteína secretada em menor quantidade junto com a insulina e capaz de auxiliar a regulação da glicemia, pode formar estruturas semelhantes a poros, comprometendo a integridade da membrana. E fatores como lipídios podem exacerbar o dano. Ademais, há ainda a possibilidade de esses agregados

induzirem apoptose por um influxo citotóxico de cálcio ou hiperativação de CAPN2 (AMMENDOLIA et al, 2021) ou calpaína 2, um gene relacionado à apoptose. Uma melhor caracterização entre o tratamento com ácidos graxos e a formação dessas estruturas de agregados de  $\beta$ -amilina não foi objeto desse estudo. Resta ainda especular se a aparente maior resistência de células INS-1E à perda de integridade de membrana frente aos tratamentos está em alguma medida relacionada a maior eficiência de mecanismos de reparo de danos causados à membrana plasmática.

A partir do tratamento de células RINm5F por 24h com diferentes concentrações de AP, Azevedo-Martins (2006) encontrou que nas concentrações 100 e 200 $\mu$ M, esse ácido graxo induziu perda de integridade de membrana da mesma ordem de grandeza que as mesmas concentrações aqui utilizadas para ambas as linhagens. Resultado semelhante foi obtido na porcentagem de células com DNA fragmentado. Enquanto os autores encontraram cerca de 25% (AP 50 $\mu$ M), 60% (AP 100 $\mu$ M) e 80% (AP 200  $\mu$ M) de células com o material genético fragmentado (Azevedo-Martins et al., 2006), no presente estudo observou-se 45%, 45% e 74% respectivamente, para células INS-1E e 16% (AP 50 $\mu$ M), 40% (AP 100 $\mu$ M) e 71% (AP 200  $\mu$ M) no caso de células RINm5F.

Entretanto, isso não parece ocorrer na mesma proporção para todas as linhagens de células  $\beta$ . Sargasyan e Bergsten (2011) mostraram que a fragmentação do DNA causada por AP é bem mais extensa em células INS-1E que em células da linhagem MIN6 ou ilhotas humanas isoladas: cerca de 4,5 vezes o controle em células INS-1E, duas vezes o controle em células MIN6 e 1,5 vezes em ilhotas humanas (tratamentos por 24h com AP 0,5mM) – embora não tenha registrado diferença quando tratadas com AP 0,25mM. Não obstante, no presente trabalho, células das linhagens INS-1E e RIN-m5f responderam de modo semelhante seja aos tratamentos com AP 100 ou 200 $\mu$ M, embora não se tenha dados sobre os comportamentos em concentrações maiores.

Martino et al. (2012) investigaram o efeito de crescentes concentrações de ácido palmítico (0,1, 0,5 e 1mM) sobre a ativação de autofagia, um mecanismo não apoptótico de morte celular, que leva à degradação massiva de componentes citoplasmáticos (proteínas e organelas) em células INS-1E, ilhotas

humanas e de ratos. Foi mostrado que em células INS-1E, bem como em ilhotas humanas e de ratos, após 12h de incubação com o ácido graxo, há significativa redução de viabilidade celular de maneira dependente da dose (muito mais intensa nas concentrações 0,5 e 1mM). Com isso, os autores mostraram que AP pode representar um potente ativador do processo de autofagia.

Não obstante seus resultados mostrem o efeito da concentração de AP na morte de células  $\beta$ , Martino et al. (2012) trazem à baila um mecanismo de morte celular diferente do aqui sugerido. Com efeito, a fragmentação do DNA é um marcador bioquímico e importante indicativo de morte celular por apoptose (ZHANG e XU, 2000). É bem provável que mudanças bioquímicas, como a fragmentação do DNA cromossomal, durante esse processo de morte celular seja um modo de garantir que as células mortas tenham um impacto mínimo na sua vizinhança (ZHANG e XU, 2000). Assim, a avaliação desse parâmetro juntamente com a análise da integridade de membrana permite sugerir que a toxicidade do ácido palmítico tanto em células INS-1E como em RINm5F se dê também através de morte por apoptose, além possivelmente da autofagia, como sugerido por Martino et al (2012).

Tais resultados ensejaram, por sua vez, a pesquisa pela toxicidade das duas concentrações 50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M e uma ainda menor (25 $\mu$ M) de AP em co-tratamento com uma das duas combinações de P<sub>4</sub> e E<sub>2</sub>.

A diferença de toxicidade entre o tratamento com AP50 $\mu$ M e AP100 $\mu$ M, tanto para células RINm5F quanto para células INS-1E foram da ordem de duas vezes, fato, de modo geral, corroborado pelo trabalho de Azevedo-Martins et al. (2006) que encontraram uma diferença cerca de três vezes maior entre a produção de fragmentação do material genético de células RINm5F também entre essas duas concentrações de AP, respectivamente 50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M, o que sugere que os resultados aqui apresentados são consistentes e estão em linha com a literatura. Algo, entretanto, que não foi pesquisado e aparece na literatura (Römer et al., 2021) é o fato de concentrações mais abaixo de 100 $\mu$ M apresentarem efeitos benéficos.

Azevedo-Martins et al (2006) mostraram ainda que AP 100 $\mu$ M (60%) provocou uma fragmentação do DNA quase quatro vezes maior que AE 100 $\mu$ M (15%) e quase 6 vezes maior que AO 100 $\mu$ M (10%). Embora no presente

trabalho a diferença tenha sido mais discreta, ainda assim em células RIN-m5F, o tratamento com AP produziu cerca de duas vezes mais fragmentação do material genético da célula que AE e AO que não apresentaram diferença significativa entre si. Por outro lado, um resultado bem diferente está apresentado na linhagem INS-1E, com o efeito mais lesivo atribuído ao AO (75%), seguido de AP (60%) e AE (20%), que mostrou somente uma discreta diferença em relação ao grupo controle.

Esses resultados vêm, por sua vez, ilustrar o que já fora dito sobre possíveis divergências nas respostas de linhagens de um mesmo tipo celular a um mesmo estímulo (SINHA, SCHULTZ e SANDER, 2015), como também mostrou Sargasyan e Bergsten (2011).

O trabalho de Acosta-Montaño *et al* (2019) trataram células RINm5F com diferentes concentrações (0 a 600 $\mu$ M) de ácidos graxos saturados. Os resultados obtidos pelo grupo, entretanto, sugerem que nas concentrações aqui trabalhadas (entre 25 e 100 $\mu$ M) há nenhuma diferença detectável entre os efeitos citotóxicos de AP e AE, ao contrário do que os resultados apresentados na seção anterior mostraram. A diferença provavelmente é devida à utilização de BSA como agente complexante ao passo que no presente trabalho as soluções de ácidos graxos e hormônios foram diluídas em etanol P.A., cuja concentração final nas soluções de tratamento não excedeu 0,5%. O artigo de Eitel *et al* (2002), vai no mesmo sentido e mostra resultado de análise de citometria que não detectou diferença significativa na porcentagem de células com material genético fragmentado entre células RIN 1046-38 tratadas com AP e AE em concentração de 250 $\mu$ M. Do mesmo modo, a preparação das soluções de ácidos graxos deu-se por complexação com BSA, embora a diferença entre AP / AE e AO (2%) esteja na ordem de 10 vezes.

No presente trabalho, em ambas as linhagens utilizadas de célula  $\beta$ , o ácido palmítico se mostrou um potente indutor de fragmentação do material genético da célula, assim como o ácido oleico se mostrou o mais potente em células INS-1E. Esse resultado reproduz em certa medida o que vem expresso no trabalho de Nemezc *et al* (2019), que mostraram que AP 250 $\mu$ M é cerca de duas vezes mais tóxico que AO 250 $\mu$ M.

Além disso, em linhas gerais, o resultado tendeu a se manter para as combinações dos ácidos graxos com as duas misturas de hormônios esteroides, exceção feita às combinações de AP. Nunes et al (2014) encontraram que a progesterona é capaz de induzir apoptose em células RIN-m5f quando administrada a essas células. O estudo, porém, trabalha com concentrações suprafisiológicas do hormônio (entre 5 e 100 $\mu$ M). No presente trabalho operando em concentrações na ordem de nM (10<sup>-6</sup>M) e, logo, mais próximas da fisiológica observou-se que P<sub>4</sub> ainda assim induziu morte nas duas linhagens de células produtoras de insulina.

Todos os grupos em que ácidos graxos estavam combinados com uma das duas misturas de hormônios foram, para as duas linhagens, estatisticamente diferentes do controle e dos grupos C1 e C2, o que aponta para interferência da mistura P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub>, seja aumentando, seja atenuando o efeito tóxico do ácido graxo. Para células INS-1E as combinações de AO ou AE com hormônios foram crescentemente tóxicas, com o grupamento AO (AO, AO+C1 e AO+C2) cerca de duas a três vezes mais tóxico que o grupamento AE. O grupamento AP parece menos consistente com relação a esse crescimento, embora, em definitivo, o tratamento AP+C2 foi mais lesivo que os outros dois do mesmo grupamento. Entretanto, o mesmo padrão se repete para o grupamento AP em células RIN-m5F, ou seja, o tratamento com AP+C1 parece atenuar o efeito lesivo de AP, ao contrário do grupo AP+C2, que aprofunda esse efeito.

Tais resultados sugerem a correção da hipótese que orienta este trabalho e segundo a qual o efeito combinado de progesterona em alta concentração (240nM) em combinação com estradiol e ácidos graxos (e, portanto, na condição de DG) tem um importante papel na toxicidade e morte de células  $\beta$ . Entretanto, em células RIN-m5F a toxicidade dos grupos combinados se mostrou bem mais discreta, talvez resultado de uma maior resistência da linhagem aos tratamentos, o que parece ainda pouco investigado.

A análise dos resultados de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) mostrou-se mais desafiadora. Ao contrário do que apontou um estudo anterior do nosso grupo (NUNES, 2014), não foi reproduzido aqui qualquer efeito pró-oxidante da progesterona na concentração 0,1mM, divergência talvez gerada por diferenças na padronização do experimento.



Ahangapour et al (2014) trabalharam com células  $\beta$  de ilhotas de camundongos, mantidas em meio de cultura após extraídas. Após pré-incubação de 48h com progesterona  $0,5\mu\text{M}$  e expostas a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$   $500\mu\text{M}$ ) foi observado um marcante aumento nos níveis de catalase e superóxido dismutase, enzimas antioxidantes, em comparação com o controle positivo de estresse ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Tais achados levaram os autores a suspeitar do efeito protetor da progesterona contra os efeitos do estresse oxidativo produzido pelo peróxido. Mas o aumento nos níveis de enzimas antioxidantes não exclui necessariamente a indução de EROs.

Por outro lado, os estudos de Fedotcheva *et al* (2012) e Itagaki *et al* (2005) ambos com células hepáticas, dão conta do efeito indutor de EROs da progesterona. No primeiro, houve produção mitocondrial de peróxido e superóxido quando incubadas com piruvato e malato, mas não com succinato. No segundo trabalho, células estreladas hepáticas (HSC) extraídas de ratos foram cultivadas por 7 dias, ao fim dos quais foram incubadas por 24h com estradiol (ordem de  $10^0$  e  $10^1\text{nM}$ ) ou progesterona (ordem de  $10^0$  e  $10^1\text{nM}$ ) e após outras 24h, tratadas com peróxido de hidrogênio afim de induzir a produção de EROs. Os autores observaram que o pré-tratamento com  $\text{E}_2$ , de modo dependente da dose, diminuiu tanto a atividade de enzimas produtoras de superóxido (NADH e NADPH oxidases) como a geração de EROs, além da redução dos níveis de enzimas antioxidantes como catalase e glutathione peroxidase. Contrariamente, o tratamento com  $\text{P}_4$  também induziu de forma dependente da dose a geração de EROs, peroxidação de lipídios e a diminuição dos níveis de enzimas antioxidantes via ativação de NADH e NADPH oxidases. Para os autores, os dados sugerem que estradiol e progesterona têm efeitos contrários em relação à indução de estresse oxidativo na célula. Os efeitos pró-oxidantes e antioxidantes foram observados em células tratadas com antagonistas tanto do estradiol (ICI 182,780) como da progesterona (RU 486). Dong et al (2016) também reportaram os efeitos antagônicos de  $\text{E}_2$  e  $\text{P}_4$  na produção de estresse oxidativo.

Outra questão a ser considerada é a concentração de ácidos graxos capaz de induzir estresse oxidativo na célula. Aqui não há um consenso. Uma revisão publicada por Römer, Linn e Petry (2021) nota que a indisponibilidade de

informação detalhada sobre concentrações específicas de ácidos graxos livres no pâncreas dificulta a escolha de concentrações experimentais mais adequadas para se emular um ambiente de lipotoxicidade nos modelos utilizados. Embora, seguem notando, alguns autores julgam a faixa de 0,5 a 2mM como a mais adequada para simular lipotoxicidade no DM2.

Com efeito, os dados encontrados mostram alguma variabilidade quanto a isso. O trabalho de Cohen *et al* (2015) mostra somente uma discreta diferença entre o controle e o grupo tratado com AP na concentração de 125 $\mu$ M. Em Nemezc *et al* (2019) essa diferença se afasta um pouco para AP 150 $\mu$ M. E, por fim, em Yuan *et al* (2010) uma diferença significativa aparece somente em 500 $\mu$ M. Além disso, o trabalho de Yousif (2019) também não observou qualquer diferença entre o grupo controle e o tratado com AP 100 $\mu$ M.

Neste trabalho, fora o grupo de tratamento combinado de ácido oleico com C1 (AO+C1) para a linhagem INS-1E, nenhum outro grupo-teste apresentou indução de espécies reativas de oxigênio (e grupo algum, no caso de células RIN-m5F). Os dados aqui obtidos quando cotejados com os outros trabalhos acima descritos podem sugerir que o tratamento combinado dos dois hormônios esteroides tenham anulado seus efeitos, com o E<sub>2</sub> inibindo a ação de enzimas pró-oxidantes (ITAGAKI *et al*, 2005) e P4, agindo em sentido contrário e induzindo a produção de espécies reativas, como propôs Fedotcheva *et al* (2012), embora não se possa, sem investigação, excluir a possibilidade aventada por Ahangapour *et al* (2014), em que o hormônio poderia ter elevado os níveis de enzimas antioxidantes. Além disso, deve-se considerar o fato de que as concentrações de ácidos graxos fossem inefetivas para produzir por si só qualquer resposta de produção de EROs.

Os resultados aqui obtidos na linhagem INS-1E apontam para um efeito indutor de proliferação do ácido esteárico enquanto o grupo tratado com AO apresentou o comportamento contrário, com redução na taxa de proiferação. Se um aumento na taxa de proliferação causado por AE não foi notado para a linhagem RIN-m5F, o grupo tratado com AO também apresentou redução dessa taxa. Ainda nas células INS-1E, a combinação de AP e AE (mas não AO) com os hormônios sexuais aqui estudados mostrou um efeito positivo significativo, embora discreto, em relação aos controles C1 e C2 (com exceção de AP+C2).

Segundo Sharma e Alonso (2014, cf. Figura 1), costuma ser menos caracterizado como efeito deletério da lipotoxicidade a diminuição da taxa de expansão de células  $\beta$  pela inibição da proliferação celular. Os autores mostram igualmente que tais dados também têm sido contraditos por trabalhos que destacam a ação de ácidos graxos livres como promotores da expansão compensatória de células  $\beta$ . Por exemplo, Brelje et al (2008) observaram um efeito sinérgico de AP (400 $\mu$ M) e prolactina na indução de proliferação de ilhotas de rato, tendo antes observado que essa concentração de AP também induz significativamente proliferação. Já os trabalhos de Maedler et al (2003) e Pascoe et al (2012) mostram o efeito lesivo de AP. No primeiro caso, ilhotas humanas foram cultivadas em baixa e alta concentrações de glicose com AP (0,8mM) ou AO (2,1mM). Em baixa glicose, AP produziu uma queda de 50% na taxa de proliferação enquanto em alta, não foi percebida variação significativa e o contrário foi observado para AO, quase na mesma proporção. Mas em ambos os casos, uma combinação de AP e AO se mostrou significativamente indutora de proliferação celular. Os resultados de Pascoe et al (2012) com células INS-1 tratadas com AP ou AO 400 $\mu$ M vão na mesma direção e mostram que AP, mas não AO, produz uma significativa queda na taxa de proliferação celular. No presente trabalho, por outro lado, AO causou significativa redução na taxa de proliferação das duas linhagens.

Com efeito são pouco conclusivos e controversos os resultados encontrados na literatura sobre indução de proliferação, especialmente com relação ao ácido esteárico que, no presente trabalho induziu um significativo e discreto aumento na taxa de proliferação de células INS-1E.

Revisando o papel dos hormônios esteroides sobre crescimento, sobrevivência e função da célula  $\beta$ , Mauvais-Jarvis (2016) nota que a matéria é controvertida e os achados, muitas vezes, discrepantes entre si. Nunes et al (2014) encontraram para células RINm5F que P<sub>4</sub> somente na concentração de 100 $\mu$ M e após 48h de incubação foi capaz de induzir diminuição significativa na taxa de proliferação celular. A publicação de Sorenson, Brelje e Roth (1993) mostrou que para ilhotas de ratos, a progesterona (3,18 $\mu$ M) não apresentou efeitos significativos na proliferação celular, enquanto o tratamento com estradiol

(3,67 $\mu$ M) dobrou a taxa de proliferação em relação ao controle. Por outro lado, Nieuwenhuizen (1999) mostrou que, em ratas tratadas com progesterona estimulou a proliferação de células pancreática, mas Sutter-Dub (2002) relata que células INS-1 tratadas com uma quantidade de estradiol da ordem de  $10^{-3}$  da anterior não tiveram sua taxa de proliferação alterada.

É bem elucidativo o trabalho de Dong et al (2016) em que células MIN6 foram tratadas com 100nM de E<sub>2</sub>, 1000nM de P<sub>4</sub> ou a combinação de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> nas mesmas concentrações por 24h. Os autores encontraram que somente os grupos tratados com os hormônios isolados apresentaram aumento no número de células viáveis, ao contrário do grupo tratado com a combinação E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub>, que apresentou queda na taxa de proliferação. A partir desses resultados, os autores sugerem que os dois hormônios tenham efeitos antagônicos. Os autores observam ainda que o tratamento com E<sub>2</sub> isoladamente não aumentou a proliferação, mas pôde diminuir a taxa de apoptose induzida, por exemplo, por estresse oxidativo. Além disso, sugerem que a capacidade de E<sub>2</sub> estimular o receptor de progesterona (PR) amplifica os efeitos deletérios da estimulação P<sub>4</sub>/PR, reduzindo por sua vez a viabilidade celular.

Entretanto, consistente com os resultados de Dong et al (2016) somente os grupos combinados de AO e hormônios esteroides, já que os tratamentos AP+C1, AE+C1 e AE+C2 em células INS-1E e o tratamento AE+C2 em células RIN-m5F mostraram um aumento na taxa de proliferação, mesmo que muito discreto, em relação ao grupo controle.

O quadro geral formado pelos dados aqui obtidos parece dar conta da correção da hipótese que norteou esse trabalho, a saber, que a pré-incubação das duas linhagens de células produtoras de insulina aqui utilizadas com ácidos graxos e a combinação desses com uma das duas misturas de progesterona e estradiol (C1 e C2, respectivamente, em concentrações fisiológicas e equivalentes a uma gravidez com DG) tornam essas células mais sensíveis aos possíveis efeitos deletérios das combinações C1 e C2 sobre sua viabilidade, inferida através dos parâmetros celulares aqui estudados.

Ácidos graxos, mesmo que em concentrações ainda pouco tóxica em relação ao ideal considerado por alguns autores (0,5mM), embora seja essa ainda uma questão em aberto, foram tóxicos e implicaram em uma taxa maior

de morte celular em relação ao controle. Entretanto, esses resultados não parecem se refletir, ao menos em toda sua extensão, na avaliação da produção de EROs e na taxa de proliferação, o que pode ter sido um resultado combinado tanto da concentração de AGs, que pode ter sido insuficiente para induzir alguma produção significativa de EROs como dos efeitos antagônicos de Estradiol e Progesterona, presentes em cada mistura C1 e C2, que foram combinadas a esses AGs.

## 6 CONCLUSÕES

- Ao avaliar a toxicidade dos ácidos considerados nesse trabalho, isoladamente ou em combinação com progesterona e  $17\beta$ -estradiol nas linhagens INS-1E e RINm5F, AP apresentou efeito tóxico sobre ambas as linhagens de modo dose- e tempo-dependente, e em células RIN-m5F, esse ácido graxo foi mais tóxico que AO e AE. Na linhagem INS-1E, o efeito mais lesivo foi do AO, seguido de AP e AE. AP se mostrou um potente indutor de fragmentação do material genético da célula. Além disso, parece haver interferência da mistura  $P_4/E_2$ , na maior parte das vezes aumentando o efeito tóxico do ácido graxo.
- De modo geral não foi detectada produção de espécies reativas de oxigênio induzida pelos tratamentos. Talvez, tanto a concentração escolhida de AGs tenha sido insuficiente para induzir produção de EROs, quanto um efeito concorrente entre os hormônios  $P_4$  e  $E_2$  que tendeu à anulação mútua de efeitos sobre essa produção.
- Em células INS-1E houve um efeito indutor de proliferação de AE isolado ou combinado com hormônios e de AP combinado com hormônio, ao passo que o efeito contrário foi produzido por AO. Em células RINm5F, o AO também parece ter induzido redução da taxa de proliferação.
- Os dados obtidos no presente trabalho parecem seguir no sentido da literatura até aqui produzida, ampliando o corpo de evidências que atestam o possível efeito citotóxico de lipídios combinados a hormônios da gravidez, mas também deixam questões relativas a mecanismos seja de produção de tais efeitos lesivos, seja da tentativa de contorno ou reparo a danos sofridos pelos tratamentos.

## REFERÊNCIAS

ABDELMAGID, S. A. et al. (2015) Comprehensive Profiling of Plasma Fatty Acid Concentrations in Young Healthy Canadian Adults. PLoS ONE 10(2): e0116195. doi:10.1371/journal.pone.0116195.

ABDUL SATTAR, S.A. et al. Gestational diabetes mellitus and hormonal alteration. Iraqi J Pharm Sci, Vol.25(1) 2016.

ABU-FARHA, M.; AL MADHOUN, A.; ABUBAKER, J. The Rise and the Fall of betatrophin/ANGPTL8 as an Inducer of  $\beta$ -Cell Proliferation. Journal of Diabetes Research. Volume 2016, Article ID 4860595. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4860595>.

ADAMSKA, A. et al. Serum Concentrations of Betatrophin and Its Association with Indirect Indices of Insulin Resistance and Beta Cell Function in Women with Polycystic Ovary Syndrome. International Journal of Endocrinology Volume 2017, Article ID 2316986.

AGUIRRE, P. Socioanthropological aspects Of obesity in poverty. In: Obesity and Poverty: A New Public Health Challenge. Scientific Publication nº 576. Washington D.C.: Pan American Health Organization, 2000.

ARAÚJO, T.G., OLIVEIRA, A.G., SAAD, M. J. Insulin-resistance-associated compensatory mechanism ABDUL SATTAR, S.A. et al. Gestational diabetes mellitus and hormonal alteration. Iraqi J Pharm Sci, Vol.25(1) 2016.

ACOSTA-MONTANO, P. et al. Fatty Acid and Lipopolysaccharide Effect on Beta Cells Proteostasis and its Impact on Insulin Secretion. Cells 2019, 8, 884; doi:10.3390/cells8080884.

ADAMSKA, A. et al. Serum Concentrations of Betatrophin and Its Association with Indirect Indices of Insulin Resistance and Beta Cell

Function in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *International Journal of Endocrinology* Volume 2017, Article ID 2316986.

AGUIRRE, P. Socioanthropological aspects Of obesity in poverty. In: *Obesity and Poverty: A New Public Health Challenge*. Scientific Publication nº 576. Washington D.C.: Pan American Health Organization, 2000.

AHANGAPOUR, K et al. Progesterone and Cilostazol protect mice pancreatic islets from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2014), 13 (3).

AMMENDOLIA, D. A., BEMENT, W. M. and BRUMELL, J. H. Plasma membrane integrity: implications for health and disease. *BMC Biology* (2021) 19:71. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00972-y>.

ARAÚJO, T.G., OLIVEIRA, A.G., SAAD, M. J. Insulin-resistance-associated compensatory mechanisms of pancreatic beta cells: a current opinion. *Front. Endocrinol.*, 14 October 2013 |<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00146>.

AZEVEDO-MARTINS, A. K. et al. Fatty acid-induced toxicity and neutral lipid accumulation in insulin-producing RINm5F cells. *Toxicology in Vitro* 20 (2006) 1106–1113.

BAEYENS, L. et al.  $\beta$ -Cell Adaptation in Pregnancy. *Diabetes Obes Metab.* 2016. September ; 18(Suppl 1): 63–70. doi:10.1111/dom.12716.

BARBOSA et al. Metabolic syndrome, insulin resistance and other cardiovascular risk factors in university students. *Ciência & Saúde Coletiva*, 21(4):1123-1136, 2016.

BARBOUR, L. A. et al. Cellular Mechanisms for Insulin Resistance in Normal Pregnancy and Gestational Diabetes. *DIABETES CARE*, VOLUME 30, Supplement 2, July 2007. Doi: 10.2337/dc07-s202.



BHATHENA SJ, et al. Insulin, glucagon, and somatostatin receptors on cultured cells and clones from rat islet cell tumor. *Diabetes* 31: 521-531, 1982. PubMed: 6295859.

BERNAL-MIZRACHI, E. et al. Human b-Cell Proliferation and Intracellular Signaling Part 2: Still Driving in the Dark Without a Road Map. *Diabetes* Volume 63, March 2014.

BLEISCH, V.R.; MAYER, J.; DICKIE, M. M. Familial diabetes mellitus in mice, associated with Insulin resistance, obesity, and hyperplasia of the Islands of langerhans. *Am J Pathol.* 1952 Jun; 28(3): 369–385. PMID: 1937350.

BRELJE, T. C. et al. Beneficial effects of lipids and prolactin on insulin secretion and  $\beta$ -cell proliferation: a role for lipids in the adaptation of islets to pregnancy. *Journal of Endocrinology*, Volume 197: Issue 2. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0657>.

BORCARI, N. et al. Estrogens modulate progesterone receptor expression and may contribute to progesterone-mediated apoptotic  $\beta$ -cell death. *Endocrinol Metab Int J.* 2018;6 (2):142–147.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

CARTA, G., et al. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Front. Physiol.* 8:902. doi: 10.3389/fphys.2017.00902.

CASIMIR M, CHAFFARD G, MAECHLER P (2019) Resveratrol long-term treatment differentiates INS-1E beta-cell towards improved glucose response and insulin secretion. *Pflugers Arch – Eur. J. Physiol.* 471: 337–345

CHENG, K. K. Y. et al. Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing effects of adiponectin. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 28 (2014) 3–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2013.06.006>.

CIGNARELLI, A. et al. Insulin and insulin receptors in adipose tissue development. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 759; doi:10.3390/ijms20030759.

COHEN, G. Beta cell response to nutrient overload involves phospholipidremodelling and lipid peroxidation. *Diabetologia* (2015) 58:1333–1343 DOI 10.1007/s00125-015-3566-z.

DALFRÀ, M.G. *et al.* Genetics and Epigenetics: New Insight on Gestational Diabetes Mellitus. *Front. Endocrinol.* 11:602477. doi: 10.3389/fendo.2020.602477.

DE HERTOOGH, R; K. THOMAS, J. J.; HOET; I. VANDERHEYDEN. Plasma Concentrations of Unconjugated Estrone, Estradiol-17[3 and Estriol, and HCS throughout Pregnancy in Diabetics and Gestational Diabetics. *Diabetologia* 12, 455-461 (1976).

DIMITRIADIS, G.; BOUTATI, E.; RAPTIS, S. A. The Importance of Adipose Tissue in Diabetes Pathophysiology and Treatment. *Horm Metab Res* 2007; 39: 705 – 706. 2007. DOI 10.1055/s-2007-990269.

DIAS, C., NYLANDSTED, J. Plasma membrane integrity in health and disease:significance and therapeutic potential. *Cell Discovery* (2021) 7:4. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00233-2>.

DONG, F. et al. TCF7L2 involvement in estradioland progesterone-modulated islet and hepatic glucose homeostasis. *Scientific Reports.* 6:24859 2016. DOI: 10.1038/srep24859.

DORUK, M. et al. Serum adiponectin in gestational diabetes and its relation to pregnancy outcome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology.* Vol. 34, 2014 – Issue 6.

EBERT, T. et al. Betatrophin levels are increased in women with gestational diabetes mellitus compared to healthy pregnant controls. *European Journal of Endocrinology* (2015) 173, 1–7.

EITEL, K. et al. Different role of saturated and unsaturated fatty acids in b-cell apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299 (2002) 853–856.

FAZAKERLEY, D. J. et al. Muscle and adipose tissue insulin resistance: malady without mechanism? *The Journal of Lipid Research*. 2018,doi: 10.1194/jlr.R087510.

FEDOTCHEVA, T. A. et al. Effect of steroids hormones on production of reactive oxygen species in mitochondria. *Biophysics*, vol. 57, n. 6, (2012). ISSN 0006-3509.

FRAGA, P. L. et al. A interface entre o Diabetes Mellitus tipo II e a hipertensão arterial sistêmica: aspectos bioquímicos. *Cadernos UniFoa*. n. 20. Dezembro de 2012.

FRAYN, K. N. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proceedings of the Nutrition Society* (2001), 60, 375.380.

GAZDAR AF, et al. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3519-3523, 1980. PubMed: 6106192.

GOH et al.: Maternal obesity is associated with a low serum progesterone level in early pregnancy. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 31 Aug 2016, 27(3):97-100DOI: 10.1515/hmbci-2015-0030.

GUO, X. R. et al. ANGPTL8/betatrophin alleviates insulin resistance via the akt-GSK3 $\beta$  or Akt-FoxO1 pathway in HepG2 cells. *Experimental Cell Research* 345 (2016). 158-167.

GUSAROVA, V. et al. ANGPTL8 (Betatrophin) Does Not Control Pancreatic Beta Cell Expansion. *Cell*. 2014 October 23; 159(3): 691–696. doi:10.1016/j.cell.2014.09.027.

HAMMARSTEDT, A.; GRAHAM, T. E.; KAHN, B. B. Adipose tissue dysregulation and reduced insulin sensitivity in non-obese individuals with enlarged abdominal adipose cells. Hammarstedt et al. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2012, 4:42.

<http://www.dmsjournal.com/content/4/1/42>

HARDY, O. T; CZECH; CORVERA, S. What causes the insulin resistance underlying obesity? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. n. 19, v. 2, p. 81-87, 2012 doi: 10.1097/MED.0b013e3283514e13.

HERRERA, E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *European Journal of Clinical Nutrition* (2000) 54, Suppl 1, S47-S51.

HODSON, K. et al. Mechanism of insulin resistance in normal pregnancy. *Horm Metab Res* 2013; 45: 567–571. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1337988>.

ILOKI ASSANGA, S. B. et al. Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res*. Vol. 4(4) pp. 60-70, August 2013. DOI:10.5897/IJBMBC20. 13.0154.

INTERNATION DIABETES FEDERATION. The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. 2006.

JANJIC, D. et. al. Free Radical Modulation of Insulin Release in INS-1 Cells Exposed to Alloxan. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 57, pp. 639–648, 1999.

KADOWAKI, T.; YAMAMUCHI, T. Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocrine Reviews*, 2005, 26(3):439–451.

KAMPMANN, U. et al. Determinants of Maternal Insulin Resistance during Pregnancy: An Updated Overview. *Journal of Diabetes Research*. Volume 2019, Article ID 5320156, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/5320156>.

KARASKOV, E. et al. Chronic Palmitate But Not Oleate Exposure Induces Endoplasmic Reticulum Stress, Which May Contribute to INS-1 Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis. *Endocrinology* 147(7):3398 –3407. doi: 10.1210/en.2005-1494.

KASSI et al. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Medicine* 2011, 9:48. <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/9/48>.

KENNEDY, A. et al. Saturated Fatty Acid-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue: Mechanisms of Action and Implications. *J. Nutr.* 139: 1–4, 2009. Doi:10.3945/jn.108.098269.

KHAN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, August 2000. Volume 106. Number 4. 473 – 481.

KHARROUBI, I. et al. Free Fatty Acids and Cytokines Induce Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis by Different Mechanisms: Role of Nuclear Factor- $\kappa$ B and Endoplasmic Reticulum. *Endocrinology* 145(11):5087–5096. Doi: 10.1210/en.2004-0478.

KOMATSU, M. et al. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *Journal of Diabetes Investigation* Volume 4 Issue 6 November 2013.

KORZYŃSKA, A; ZYCHOWICZ, M. A Method of Estimation of the Cell Doubling Time on Basis of the Cell Culture Monitoring Data. *Biocybernetics and Biomedical Engineering* 2008, Volume 28, Number 4, pp. 75–82.

KOOIPTWUT, S. et al. Estradiol Prevents High Glucose-Induced  $\beta$ -cell Apoptosis by Decreased BTG2 Expression. *Scientific Reports*. (2018) 8:12256. DOI:10.1038/s41598-018-30698-x.

LACROIX, M., KINA, E. & HIVERT, MF. Maternal/Fetal Determinants of Insulin Resistance in Women During Pregnancy and in Offspring Over Life, *Curr Diab Rep*, n. 2, V. 13, p. 238–244, 2013.

LAŠT'OVÍČKA, J. Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers. *Cellular Immunology*. Volume 256, Issues 1–2, 2009, Pages 79-85.

LAVIOLA, L. et al. Insulin Signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *DIABETES*, VOL. 55, APRIL 2006b.

LAVIOLA, L. et al. Insulin signalling in human adipose tissue. *Archives of Physiology and Biochemistry*, April 2006a; 112(2): 82 – 88.

LIU, Z. et al. Dose- and Glucose-Dependent Effects of Amino Acids on Insulin Secretion from Isolated Mouse Islets and Clonal INS-1E Beta-Cells. *Rev Diabet Stud*. 2008;5(4):232–244.  
doi:10.1900/RDS.2008.5.232.

LOW, C.F. et al. Adiponectin SNP45TG is associated with gestational diabetes mellitus. *Arch Gynecol Obstet* (2011) 283:1255–1260 DOI 10.1007/s00404-010-1548-4.

LU, P. et al. Insulin upregulates betatrophin expression via PI3K/Akt pathway. *Scientific Reports*. 7: 5594. DOI:10.1038/s41598-017-06052-y.

MAECHLER, P. et al. Mitochondrial activation directly triggers the exocytosis of insulin in permeabilized pancreatic b-cells. *The EMBO Journal* Vol.16 No.13 pp.3833–3841, 1997.

MAEDLER, K. et al. Monounsaturated Fatty Acids Prevent the Deleterious Effects of Palmitate and High Glucose on Human Pancreatic -Cell Turnover and Function. 2003 Mar;52(3):726-33. doi: 10.2337/diabetes.52.3.726.

MARTINO, L. Palmitate Activates Autophagy in INS-1E  $\beta$ -Cells and in Isolated Rat and Human Pancreatic Islets. *PLoS ONE* 7(5): e36188. doi:10.1371/journal.pone.0036188

MAUVAIS-JARVIS, F. Role of sex steroids in  $\beta$ -cell function, growth and survival. *Trends Endocrinol Metab.* 2016 December ; 27(12): 844–855. doi:10.1016/j.tem.2016.08.008.

MÁTIS, G. et al. Comparative study on the modulation of incretin and insulin homeostasis by butyrate in chicken and rabbit. *PLoS ONE* 13(10): e0205512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205512>. 2018.

MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. et al. Adiponectin, Structure, Function and Pathophysiological Implications in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2006, Vol. 6, No. 6.

MERGLÉN, A. et al. Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology*, 2004 145(2): 667–678.

MITCHELL, N. et al. *Psychiatr Clin North Am.* 2011 December; 34(4): 717–732. doi:10.1016/j.psc.2011.08.005.

MOHAMMADI, T., PAKNAHAD, Z. Adiponectin Concentration in Gestational Diabetic Women: a Case-Control Study. *Clin Nutr Res.* 2017 Oct;6(4):267-276 <https://doi.org/10.7762/cnr.2017.6.4.267>.

MOYCE, B. L.; DOLINSKY, V. W. Maternal  $\beta$ -Cell adaptations in pregnancy and placental signalling: implications for gestational diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3467; doi:10.3390/ijms19113467.

NADAL, A. et al. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J Physiol* 587.21 (2009) pp 5031–5037. DOI: 10.1113/jphysiol.2009.177188.

NAPSO T, YONG HEJ, LOPEZ-TELLO J, SFERRUZZI-PERRI AN. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support

Pregnancy and Lactation. *Front Physiol.* 2018;9:1091. Published 2018 Aug 17. doi:10.3389/fphys.2018.01091.

NEMECZ M, et al. The Distinct Effects of Palmitic and Oleic Acid on Pancreatic Beta Cell Function: The Elucidation of Associated Mechanisms and Effector Molecules. *Front. Pharmacol.* 9:1554. doi: 10.3389/fphar.2018.01554

NIEUWENHUIZEN, A. G., et al. Progesterone stimulates pancreatic cell proliferation in vivo. *European Journal of Endocrinology* (1999) 140 256–263. ISSN 0804-4643.

NUNES, V. A. et al. Progesterone induces apoptosis of insulin-secreting cells: insights into the molecular mechanism. *Journal of Endocrinology* (2014) 221, 273–284. DOI: 10.1530/JOE-13-0202.

NUNEZ R. Flow cytometry: principles and instrumentation. *Curr Issues. Mol Biol.* 2001.Apr;3(2):39-45.

NUNEZ E. A. et al. Fatty Acids and Steroid Hormone Action. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* (1995) 52, 185-190.

NUNEZ E. A. Fmstaglandins Leukotnenes and Essential Fatty Acids (1993) 48.63-70.

OECD. Obesity update 2017. Disponível em: <[www.oecd.org/health/obesity-update.htm](http://www.oecd.org/health/obesity-update.htm)>. Acesso em 29 de setembro de 2019.

OLSZEWSKI, J.; SZCZUROWICZ, A.; WÓJCIKOWSKI, C. Changes in levels of human placenta lactogen (hPL), progesterone, and estriol in blood serum and estrogens in urine during gestational diabetes mellitus. *Ginekol Pol.* 1995 Mar;66(3):145-50.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE; FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE



GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil. Brasília, DF: OPAS, 2017. ISBN: 978-85-7967-118-0.

PALA, H. G. et al. Adiponectin levels in gestational diabetes mellitus and in pregnant women without glucose intolerance. *Adv Clin Exp Med*. 2015 Jan-Feb;24(1):85-92. doi: 10.17219/acem/38141.

PÁNICO, P. et al. Role of Calpain-10 in the Development of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Archives of Medical Research* 45 (2014) 103e115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.01.005>.

PASCOE, J. et al. Free Fatty Acids Block Glucose-Induced  $\beta$ -Cell Proliferation in Mice by Inducing Cell Cycle Inhibitors p16 and p18. *Diabetes*, Vol. 61, March 2012. DOI: 10.2337/db11-0991.

PEÑA, M.; BACALLAO, J. Obesity among the poor: an emerging problem in Latin America and the Caribbean. In: *Obesity and Poverty: A New Public Health Challenge*. Scientific Publication nº 576. Washington D.C.: Pan American Health Organization, 2000.

PERSSON, X-M. T., et al. Rapid measurement of plasma free fatty acid concentration and isotopic enrichment using LC/MS. *Journal of Lipid Research* Volume 51, 2010. DOI 10.1194/jlr.M008011.

PLOWS, J. F. et al. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3342.

RICCARDI, C., NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1, 1458–1461 (2006).

RÖMER, A., LINN, T. E PENTRY, S. Lipotoxic Impairment of Mitochondrial Function in  $\beta$ -Cells: A Review. *Antioxidants* 2021, 10, 293. <https://doi.org/10.3390/antiox10020293>.

ROJAS, J. et al. Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. *Journal of Diabetes Research*. Volume 2018, <https://doi.org/10.1155/2018/9601801>.

SANTOS, R. S. et al. Lacking of estradiol reduces insulin exocytosis from pancreatic b-cells and increases hepatic insulin degradation. *Steroids* 114 (2016) 16–24.

SARGSYAN, E. BERGSTEN, P. Lipotoxicity is glucose-dependent in INS-1E cells but not in human islets and MIN6 cells. *Lipids Health Dis*. 2011; 10:115. Published 2011 Jul 11. doi:10.1186/1476-511X-10-115.

SERGEANT, S. Impact of methods used to express levels of circulating fatty acids on the degree and direction of associations with blood lipids in humans. *British Journal of Nutrition* (2016), 115, 251–261. doi:10.1017/S0007114515004341.

SHARMA, G.; PROSSNITZ, E. R. Mechanisms of Estradiol-Induced Insulin Secretion by the G Protein-Coupled Estrogen Receptor GPR30/GPER in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Endocrinology*. 2011;152(8):3030–3039.

SHARMA, R. B.; ALONSO, L. C. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? *Curr Diab Rep* (2014) 14:492. DOI 10.1007/s11892-014-0492-2.

SHIMOBAYASHI, M. et al. Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2018;128(4):1538-1550. <https://doi.org/10.1172/JCI96139>.

SIDDIQA, A. et al. Visualizing the regulatory role of Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) in glucose and lipid metabolic pathways. *Genomics* 109 (2017) 408–418.

SINHA, R., SCHULTZ, N., SANDER, C. Comparing cancer cell lines and tumor samples by genomic profiles. *BioRxiv* 028159; doi: <https://doi.org/10.1101/028159>.

SKELIN, M.; RUPNIK, M.; CENCIC, A. Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research. *Altex* 27, 2/10, 2010.

SKLEMPE KOKIC IVA. Metabolic Adaptations in Pregnancy in Lean and Obese Women – A Literature Review. *Research in Obstetrics and Gynecology* 2013, 2(4): 37-47 DOI: 10.5923/j.rog.20130204.01.

SMITH, U.; KAHN, B. B. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *J Intern Med.* 2016 November; 280(5): 465–475. doi:10.1111/joim.12540.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. São Paulo: Clannad Editora Científica, 2017. ISBN: 978-85-93746-02-4.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. *Rev. Assoc. Med. Bras.* vol.54 no.6 São Paulo Nov./Dec. 2008.

SONAGRA, A. D. et al. Normal Pregnancy - A State of Insulin Resistance. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2014 Nov, Vol-8(11): CC01-CC03. DOI: 10.7860/JCDR/2014/10068.5081.

SORENSEN, R. L., BRELJE, T. C., ROTH, C. Effects of Steroid and Lactogenic Hormones on Islets of Langerhans: A New Hypothesis for the Role of Pregnancy Steroids in the Adaptation of Islets to Pregnancy. 1993 Nov;133(5):2227-34. doi: 10.1210/endo.133.5.8404674.

SPACEK, T. et al. Glucose-stimulated insulin secretion of insulinoma INS-1E cells is associated with elevation of both respiration and mitochondrial membrane potential. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (2008) 1522–1535.

SUTTER-DUB, M-T. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids* 67 (2002) 77–93. PII: S0039 - 128X (01) 00142-8.

ŚWIRSKA, J. et al. Gestational diabetes mellitus — literature review on selected cytokines and hormones of confirmed or possible role in its pathogenesis. *Ginekologia Polska* 2018, vol. 89, no. 9, 522–527.

SZLAPINSKI, S, HILL, J. Metabolic Adaptations to Pregnancy in Healthy and Gestational Diabetic Pregnancies: The Pancreas - Placenta Axis. *Current Vascular Pharmacology*. Volume 19 , Issue 2 , 2021. DOI: 10.2174/1570161118666200320111209.

TAO, C. et al. Regulation of glucose and lipid homeostasis by adiponectin: Effects on hepatocytes, pancreatic b cells and adipocytes. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 28 (2014) 43–58.

TIANO, J. P. et al. Estrogen receptor activation reduces lipid synthesis in pancreatic islets and prevents  $\beta$  cell failure in rodent models of type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2011;121(8):3331-3342. <https://doi.org/10.1172/JCI44564>.

TREBOTIC, L.K.; Circulating Betatrophin Is Strongly Increased in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus. *Plos One*, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0136701.

VRACHNIS, N. et al. Role of Adipokines and Other Inflammatory Mediators in Gestational Diabetes Mellitus and Previous Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Endocrinology* Volume 2012, Article ID 549748.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. *Ciênc. saúde coletiva* vol.15 no.1 Rio de Janeiro Jan. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232010000100024>.

WEINERT, L. S. et al. Diabetes gestacional: um algoritmo de tratamento multidisciplinar. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011;55/7. 435-445.

WÓJCIK, M. et al. The relationship between adipose tissue-derived hormones and gestational diabetes mellitus (GDM). *Endokrynologia Polska.* Tom/Volume 65; Numer/Number 2/2014. DOI: 10.5603/EP.2014.0019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Classification of diabetes mellitus. Geneva: WHO, 2019b. ISBN 978-92-4-151570-2.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diabetes research and clinical practice 103(2014)341–363.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <<https://www.who.int/nutrition/topics/obesity/en/>>. Acessado em 21 de outubro de 2019a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global report on diabetes. France: 2016. ISBN 978 92 4 156525 7.

YAMAMUCHI, T. et al. Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 28 (2014) 15–23.

YANG, H.; LI, X. The role of fatty acid metabolism and lipotoxicity in pancreatic  $\beta$ -cell injury: identification of potential therapeutic targets. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2012;2(4):396–402.

YOKOI, N. et al.  $\beta$ -Cell glutamate signaling: Its role in incretin-induced insulin secretion. *J Diabetes Investig* 2016; 7: 38–43. doi: 10.1111/jdi.12468.

YOON, S. O. et al. Fatty acid-induced lipotoxicity in pancreatic beta-cells during development of type 2 diabetes. *Front. Endocrinol.* 9:384.doi:10.3389/fendo.2018.00384

YOUSIF, M. D. Oleic Acid Attenuates Palmitic Acid-Induced Impairments in Mouse Blastocyst Development (2019). Electronic Thesis and Dissertation Repository. 6226. <https://ir.lib.uwo.ca/etd/6226>

YUAN H, ZHANG X, HUANG X, LU Y, TANG W, et al. (2010) NADPH Oxidase 2-Derived Reactive Oxygen Species Mediate FFAs-Induced Dysfunction and Apoptosis of  $\beta$ -Cells via JNK, p38 MAPK and p53 Pathways. *PLoS ONE* 5(12): e15726. doi:10.1371/journal.pone.0015726.

ZENG, Z; LIU, F; LI, S. Metabolic Adaptations in Pregnancy: A Review. *Ann Nutr Metab* 2017; 70:59–65. DOI: 10.1159/000459633.

ZHANG, M. et al. Progesterone Receptor Membrane Component 1 Is a Functional Part of the Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Receptor Complex in Pancreatic  $\beta$  Cells. *Molecular & Cellular Proteomics* 13.11 (2014).

ZHANG, J. H., XU, M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* 10, 205–211 (2000). <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290049>.

ZHENQUI, Z. et al. Estrogen Receptor Protects Pancreatic  $\beta$ -cells from Apoptosis by Preserving Mitochondrial Function and Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress. 2018. doi: 10.1074/jbc.M117.805069.

ZHOU, R. et al. Blockage of progesterone receptor effectively protects pancreatic islet beta cell viability. *Steroids* 78 (2013) 987–995.

## APÊNDICE A – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES EM CADA GRUPO DE TRATAMENTO

Nome do grupo	Composição da solução
Controle (ctl)	Meio de cultura
Controle etanol (ctl etOH)	Meio de cultura + etOH 0,5%
TB 200	Terc-Butil Hidroperóxido 200 $\mu$ M
P4 100 $\mu$ M	P4 100 $\mu$ M
P4 100 $\mu$ M + RU486	P4 100 $\mu$ M + RU486 75 $\mu$ M
C1	P4 65nM + E2 13nM + RU486 1 $\mu$ M
C2	P4 240nM + E2 13nM+ RU486 1 $\mu$ M
C1+RU486	P4 65nM + E2 13nM
C2+RU486	P4 240nM + E2 13nM
AP	AP 100 $\mu$ M
AP + C1	P4 65nM + E2 13nM + AP 100 $\mu$ M
AP + C2	P4 240nM + E2 13nM + AP 100 $\mu$ M
AE	AE 100 $\mu$ M
AE + C1	P4 65nM + E2 13nM + AE 100 $\mu$ M
AE + C2	P4 240nM + E2 13nM + AE 100 $\mu$ M
AO	AO 100 $\mu$ M
AO +C1	P4 65nM + E2 13nM + AO 100 $\mu$ M
AO + C2	P4 240nM + E2 13nM + AO 100 $\mu$ M

## APÊNDICE B



---

**ADENDO À CARTA DE ISENÇÃO Nº 02/21**

**Orientador(a): Profa. Dra. Anna Karenina Azevedo Martins**

**Orientando(a): Rafael Teixeira do Nascimento**

**Título do Projeto de Pesquisa:** "Avaliação do efeito protetor de adipocinas sobre a proliferação e função de células secretoras de insulina INS-1E frente ao tratamento com hormônios sexuais e/ou ácido palmítico."

**Novo Título do Projeto de Pesquisa:** "Estudo dos efeitos da combinação de hormônios esteroides e ácidos graxos sobre a proliferação e função de células secretoras de insulina."

**Instituição:** Escola de Artes, Ciências e Humanidades – EACH/USP

De acordo com a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, somente estão sujeitos à análise pelo CEUA os projetos de pesquisa ou atividade de ensino que envolvam animais do filo "Chordata", subfilo "Vertebrata".

O projeto pretende utilizar cultura de células de linhagem estabelecida, doadas pelo Departamento de Bioquímica Clínica da Escola de Medicina de Hanover, Alemanha.

Conforme avaliação do projeto original por este Comitê, declaro que, mesmo havendo alteração de título, o referido estudo não se enquadra nessas normas e, portanto, está isento de análise ou aprovação por esse CEUA.

Recomendo que o projeto seja submetido à Comissão Interna de Biossegurança da EACH-USP, para análise e autorização de atividades de pesquisa em regime de contenção com microrganismos geneticamente modificados.

Atenciosamente,

São Paulo, 29 de junho de 2022.



**Prof. Dr. Humberto Miguel Garay Malpartida**  
Vice-Coordenador  
Comissão de Ética em Uso de Animais em Experimentação  
EACH/USP