

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

VINÍCIUS SOARES BARCO

**RELAÇÃO ENTRE OS HORMÔNIOS ENDÓCRINO-
PANCREÁTICOS E LEPTINA NAS CÉLULAS DAS
ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATAS ADULTAS
SUBMETIDAS À DIETA HIPERLIPÍDICA ADVINDAS DE
MÃES DIABÉTICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” - Campus de
Botucatu - para obtenção do título de Mestre
em Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Franciane Quintanilha Gallego

Coorientadora: Profa. Dra. Yuri Karen Sinzato

Coorientadora: Profa. Dra. Isabela Lovizutto Iessi

**Botucatu
2022**

VINÍCIUS SOARES BARCO

**RELAÇÃO ENTRE OS HORMÔNIOS ENDÓCRINO-
PANCREÁTICOS E LEPTINA NAS CÉLULAS DAS
ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATAS ADULTAS
SUBMETIDAS À DIETA HIPERLIPÍDICA
ADVINDAS DE MÃES DIABÉTICAS**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” - Campus de Botucatu - para
obtenção do título de Mestre em
Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Débora C. Damasceno Meirelles dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Franciane Quintanilha Gallego

Coorientadora: Profa. Dra. Yuri Karen Sinzato

Coorientadora: Profa. Dra. Isabela Lovizutto Iessi

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Barco, Vinícius Soares.

Relação entre os hormônios endócrino-pancreáticos e leptina nas células das ilhotas pancreáticas de ratas adultas submetidas à dieta hiperlipídica advindas de mães diabéticas / Vinícius Soares Barco. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Débora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos
Coorientador: Franciane Quintanilha Gallego
Coorientador: Isabela Lovizutto Iessi
Capes: 20603002

1. Dieta hiperlipídica. 2. Diabetes. 3. Pâncreas. 4. Roedores como animal de laboratório.

Palavras-chave: Descendentes; Diabete; Dieta hiperlipídica; Pâncreas; Roedores.

*Dedico este trabalho a minha família
por todo amor, carinho e apoio.*

Dedicatória

Aos meus pais, **Alexandra Oliveira Soares Barco e Gilberto Barco**, por me apoiarem em toda minha trajetória dentro e fora da Pós-Graduação. Sem vocês, não estaria onde estou! Agradeço por todo amor e carinho que nunca me faltaram.

Aos meus irmãos, **Maria Fernanda Soares Barco e Victor Hugo Soares Barco**, pelo companheirismo de toda a vida. Obrigado pela força que só vocês conseguem me proporcionar.

À minha **família**, que me apoiou em todos esses anos dentro da Universidade. Agradeço aos meus avós, tios (as) e primos (as) por sempre estarem ao meu lado.

Agradecimentos

Aos membros do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO), em especial a minha orientadora **Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno**, pela enorme contribuição em meu crescimento pessoal e profissional nestes cinco anos de laboratório.

Às minhas coorientadoras, **Profa. Dra. Franciane Quintanilha Gallego**, **Profa. Dra. Yuri Karen Sinzato** e **Profa. Dra. Isabela Lovizutto Iessi**, pelos ensinamentos sobre a técnica de imunoistoquímica e pelas discussões do presente trabalho envolvendo o pâncreas endócrino, diabetes e dieta hiperlipídica.

Aos alunos do LAPGO, **Verônyca G. Paula**, **Larissa L. da Cruz**, **Eduardo Klöppel**, **Carolina Gamito Capaes** e **Maysa Rocha de Souza**, pelos trabalhos que realizamos juntos, companheirismo e pelo clima agradável dentro do laboratório.

Aos moradores da **República RadioTreparia (RT)**, por estar presente em minha rotina, mesmo após a Graduação.

Às moradoras da **República Renegadas**, em especial à **Livia L. Bakanovas**, por me acompanhar nesta reta final do Mestrado.

Ao professor **Dr. Gustavo Tadeu Volpato (Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT)**, pela ajuda e contribuição nas discussões durante esses anos.

Aos membros de minha banca do Exame Geral de Qualificação, **Profa. Dra. Rafaianne Q. Moraes-Souza (UFMT)** e **Prof. Dr. Wellerson Scarano (IBB/Unesp)**, pelas sugestões que contribuíram para melhoria do texto para apresentação da Dissertação de Mestrado.

Aos membros titulares que irão compor a banca de minha Dissertação de Mestrado, **Profa. Dra. Camila R. C. Corrêa (FMB/Unesp)** e **Profa. Dra. Rafaienne Q. Moraes-Souza (UFMT)**, pelas futuras contribuições na referida dissertação.

À Coordenação da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) e aos assistentes técnicos acadêmicos (ASA), em especial ao **Sr. Danilo Chaguri**, pela manutenção dos biotérios e organização de nosso laboratório, e ao **Jurandir Antônio** pelos cuidados com os animais, limpeza e manutenção dos biotérios.

Aos **funcionários da Biblioteca da Unesp de Botucatu** pela atenção durante o período do Mestrado e pela elaboração da ficha catalográfica.

Aos **servidores, docentes e alunos da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP)**, em especial do Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia, representados pela Sra. **Janete Aparecida Herculano Nunes Silva**, Sra. **Solange Sako Cagliari** e **Diego Cezario B. de Oliveira**, por permitirem que este trabalho fosse realizado.

Aos servidores do **Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP)** da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP) e ao **Prof. Dr. José Eduardo Corrente**, pelos ensinamentos e análises em Bioestatística.

Aos **docentes do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP)**, que me proporcionaram uma educação de qualidade e uma formação profissional de excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (**CAPES**), pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo auxílio financeiro concedido ao projeto “guarda-chuva” (Auxílio Regular - Processo Número: 2016/25207-5), sob responsabilidade da Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno.

Por fim, aos **animais**, que por meio de suas vidas possibilitaram a realização deste estudo.

E a **todos** que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento e realização deste estudo.

Apresentação Pessoal

Vinícius Soares Barco

Graduado no curso de Ciências Biomédicas pelo Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) (2017 – 2020). Participante da Comissão de Apoio do 20º Encontro Nacional de Biomedicina (ENBM). Participante da Comissão Organizadora do 21º, 22º e 23º Encontro Nacional de Biomedicina (ENBM). Ex-*trainee*, Ex-assessor e Ex-diretor da Empresa Júnior do Instituto de Biociências (IBB JR.) nas gestões 2016-2019. Vencedor do Projeto HUB - Desafio Empreenda Botucatu de 2017. Realizou atividades de Iniciação Científica (IC) no Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO), lotado na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP no período de 2018 a 29/02/2020, com bolsa de IC financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo Número: 2018/14260-8, vigência do projeto de 01/03/2019 a 29/02/2020), sob a orientação da Profa. Dra. Débora C. Damasceno. O projeto de IC intitulado *“Biodistribuição de nanopartículas magnéticas em ratas prenhes e em seus recém-nascidos”* foi desenvolvido em parceria com docentes do IBB/Unesp. Desenvolve pesquisas com modelos animais para avaliar as repercussões do diabetes materno em sucessivas gerações de ratas, especialmente com estudos voltados para o pâncreas. Em março de 2020, ingressou no Programa de Pós-graduação em Tocoginecologia da FMB/Unesp para desenvolver o projeto intitulado *“Relação entre os hormônios endócrino-pancreáticos e leptina nas células das ilhotas pancreáticas de ratas adultas submetidas à dieta hiperlipídica advindas de mães diabéticas”*. Candidato aprovado para cursar a Pós-graduação em Tocoginecologia (FMB/Unesp) a partir de março de 2022, sob a orientação da Profa. Débora C. Damasceno. É membro do Grupo de Pesquisa do CNPq “Estresse oxidativo e Anomalias congênitas” liderado pela Profa. Débora C. Damasceno.

DIABETE MATERNO E EXPOSIÇÃO À DIETA HIPERLIPÍDICA APÓS O DESMAME: EFEITO NA RELAÇÃO DOS HORMÔNIOS ENDÓCRINO-PANCREÁTICOS, RECEPTOR DE LEPTINA, MORTE E PROLIFERAÇÃO CELULAR NA VIDA ADULTA DE RATAS



Drug and Chemical Toxicology

Publishes research on toxicology, risk assessment, implications of exposure to toxic agents, safety evaluations and practical relevance of toxicological data.



Citation metrics

- **3.356 (2020) Impact Factor**

Este manuscrito será submetido à revista DRUG AND CHEMICAL TOXICOLOGY após apreciação dos membros da banca da defesa de Dissertação de Mestrado.

Resumo

RESUMO

O ambiente intrauterino e a influência de fatores após o nascimento podem influenciar o desenvolvimento embrionário e a vida adulta dos descendentes, aumentando o risco para o aparecimento de doenças. O objetivo foi avaliar a relação entre as células endócrino-pancreáticas e receptor de leptina das ilhotas do pâncreas de descendentes adultas submetidas à dieta hiperlipídica advindas de ratas diabéticas. Foram utilizadas ratas Sprague Dawley, filhas de diabéticas, e expostas à dieta hiperlipídica (DHL) desde o desmame até a vida adulta (120 dias). Foram constituídos quatro grupos experimentais (n=5 animais/grupo): 1) descendentes de mães não-diabéticas (controle) expostas à dieta padrão (FContDP), 2) descendentes de mães não-diabéticas que foram expostas à dieta hiperlipídica (FContDHL), 3) descendentes de mães diabéticas e que foram expostas à dieta padrão (FModDP), 4) descendentes de mães diabéticas que foram expostas à dieta hiperlipídica (FModDHL). Na vida adulta, todas as ratas foram submetidas ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e, aos 120 dias de vida, as ratas foram anestesiadas e eutanasiadas para coleta do pâncreas para análise imunoistoquímica para os hormônios endócrino-pancreáticos, caspase-3 clivada, Ki-67 e receptor de leptina. Não houve diferença na área das ilhotas pancreáticas entre os quatro grupos experimentais. Os grupos FContDHL e FModDP apresentaram um aumento na porcentagem de células imunomarcadas para insulina e uma diminuição na porcentagem e intensidade de marcação para somatostatina. Já o grupo FModDHL apresentou um aumento na porcentagem de células imunomarcadas para insulina e um aumento na porcentagem de células e intensidade de marcação para glucagon. Os três grupos experimentais que sofreram os insultos apresentaram aumento na imunomarcação para Ki-67. As ratas FContDHL apresentaram aumento da porcentagem de células imunomarcadas para caspase-3 clivada, enquanto o grupo FMod DP teve redução destas. Já, os grupos FModDP e FModDHL mostraram menor imunomarcação para o receptor de leptina no pâncreas endócrino. Houve aumento progressivo da glicemia nos grupos FContDHL, FModDP e FModDHL em relação ao grupo controle. Portanto, a associação entre diabetes materno e/ou administração de dieta hiperlipídica promove alterações na relação entre a tríade hormonal pancreática e receptores de leptina no pâncreas endócrino de descendentes na vida adulta. Por sua vez, estas alterações nas ilhotas pancreáticas não são capazes de causar a diminuição na glicemia da prole, contribuindo para o desenvolvimento de intolerância à glicose na vida adulta, mostrando a necessidade de um controle glicêmico antes da prenhez e o oferecimento de uma dieta balanceada para os descendentes.

Palavras-chave: diabetes, dieta hiperlipídica, pâncreas, roedores, descendentes.

Sumário

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	19
2 - OBJETIVOS	27
3 – MATERIAIS E MÉTODO	29
4 – RESULTADOS	40
5 – DISCUSSÃO	55
6 - CONCLUSÃO	64
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8 – ANEXOS	74

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

Fatores ambientais e maternos atuam no início da vida e podem repercutir na vulnerabilidade a doenças e no processo da saúde na vida adulta (GLUCKMAN *et al.*, 2010), conforme verificado em estudos clínicos e experimentais (HANSON & GLUCKMAN, 2014). Isso mostra que o organismo é susceptível a eventos específicos que ocorrem durante uma janela crítica do desenvolvimento, a qual poderá alterar sua trajetória com efeitos persistentes no fenótipo do indivíduo (BARKER, 2007; RABADÁN-DIEHL & NATHANIELSZ, 2013) de acordo com o conceito denominado Origens Fetais das Doenças Adultas (do inglês *Fetal Origins of Adult Disease – FOAD*) (BARKER, 2007).

Posteriormente, diversos estudos mostraram que o processo de saúde e de doença na vida adulta não provêm somente de eventos que ocorrem durante o desenvolvimento embriofetal, mas também de todo o período de desenvolvimento, infância e adolescência (SUZUKI, 2018). Portanto, insultos durante o período perinatal podem programar o indivíduo para alterações negativas ou positivas em sua saúde em estágios mais avançados da vida (HANSON & GLUCKMAN, 2014), conceituando esta hipótese mais recente como Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (do inglês *Developmental Origins of Health and Disease – DOHaD*) (HANSON & GLUCKMAN, 2014). Dentre estes insultos, podemos mencionar o *Diabetes mellitus* (DM), tipos de alimentação e obesidade, que afetam negativamente o ambiente intrauterino e alteram o desenvolvimento e o metabolismo embriofetal (RINAUDO & WANG, 2012).

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não sintetiza insulina suficiente ou sua ação é ineficiente no organismo (*World Health Organization - WHO*, 2021). A Associação Americana de Diabetes (ADA) destaca diversas classes de DM, dentre elas *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), que se caracteriza pela destruição autoimune das células beta (β)-pancreáticas, levando à deficiência absoluta na síntese de insulina; *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), caracterizado pela resistência insulínica e secreção inadequada de insulina pelas células β -pancreáticas e o DM gestacional, que se caracteriza por intolerância à glicose diagnosticada na gravidez (ADA, 2021).

Durante a gestação diabética, diversos efeitos adversos podem ocorrer

na vida adulta dos descendentes, como o risco aumentado para o desenvolvimento de obesidade, DM2 e características da síndrome metabólica (BURLINA *et al.*, 2019). Os mecanismos fisiopatológicos relacionados ao diabetes e às suas complicações ainda não estão totalmente esclarecidos e estudos em humanos são limitados não só por razões éticas, mas também devido à influência de variáveis incontroláveis, tais como dieta, fatores socioeconômicos, nutricionais e genéticos (LÓPEZ-SOLDADO & HERRERA, 2003). Portanto, há necessidade do desenvolvimento e emprego de modelos experimentais adequados para melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas alterações adaptativas e aparecimento de possíveis doenças para o animal diabético e/ou para seus descendentes em diferentes idades.

Embora o desenvolvimento de modelos experimentais para indução do diabetes seja necessário, a compreensão das diferenças e semelhanças entre os animais de laboratório (murinos: ratos e camundongos) e humanos também é relevante. Com relação a este estudo, cabe destacar que as ilhotas pancreáticas representam de 1 a 4% de todo o pâncreas com uma distribuição parcialmente homogênea por todo o órgão tanto em humanos como nos roedores (DOLENŠEK *et al.*, 2015). Entretanto, a microarquitetura das ilhotas pancreáticas difere entre as duas espécies. O pâncreas endócrino de roedores é organizado em um padrão *mantle-core*, i. e., as células β -pancreáticas (que sintetizam e secretam insulina) estão localizadas no centro das ilhotas. Já as células alfa (α) e delta (δ)-pancreáticas, que sintetizam e secretam glucagon e somatostatina, respectivamente, estão localizadas na periferia das ilhotas pancreáticas (DOLENŠEK *et al.*, 2015). Em humanos, além do padrão *mantle-core* em ilhotas pequenas (<100 μ m de diâmetro), as células endócrinas podem estar dispersas de forma desorganizada nas ilhotas pancreáticas maiores (DOLENŠEK *et al.*, 2015).

Para reproduzir a glicemia do DM2, a indução do diabetes em ratos pode ser feita no período neonatal, sendo este modelo experimental denominado de diabetes moderado (GALLEGO *et al.*, 2018). A presença de diabetes moderado durante a prenhez de ratas pode comprometer o desenvolvimento pancreático dos descendentes e a maturação pós-natal das células endócrinas das ilhotas pancreáticas (IESSI *et al.*, 2016). O primeiro mês pós-natal de ratos é um período de muitas alterações no pâncreas endócrino, dentre elas a replicação das células

β -pancreáticas no período perinatal. À medida que novas células são geradas, sofrem maturação, o que confere habilidade de secretar insulina pelas células β -pancreáticas de acordo com os níveis glicêmicos (MÁRQUEZ-AGUIRRE *et al.*, 2015). Um dos métodos para caracterizar a atividade proliferativa de células é a análise da proteína Ki-67. Esta proteína é expressa no núcleo da célula durante o ciclo celular, exceto para a fase G0 (GRAEFE *et al.*, 2019), o que significa que as células que não se dividem saem do ciclo celular e entram em senescência (fase G0) (POON, 2016).

Após o desmame dos animais, ocorre um aumento na taxa de apoptose e, após o primeiro mês de vida pós-natal, as alterações diminuem (BONNER-WEIR *et al.*, 2016). Apoptose é um processo fisiológico que permite a manutenção da homeostase em organismos multicelulares (BERNARD *et al.*, 2019). A apoptose é uma via de morte celular não inflamatória mediada pela ativação de caspases e pode ocorrer tanto pela via extrínseca como pela via intrínseca (BARBER, 2001; TAYLOR *et al.*, 2008). A via extrínseca é ativada através da sinalização de receptores de morte celular localizados na membrana da célula, enquanto a via intrínseca é ativada por meio de danos mitocondriais (ROGERS *et al.*, 2017). Entretanto, ambas as vias convergem para a ativação da caspase-3 (TAYLOR *et al.*, 2008). A caspase-3 é uma cisteína-protease que exerce importante função na apoptose por meio da clivagem de proteínas-chave (OGANE *et al.*, 2018). Esta enzima é sintetizada como uma proenzima inativa, procaspase-3, sendo ativada por sua clivagem durante a apoptose, sendo a forma ativa denominada de caspase-3 clivada (OGANE *et al.*, 2018).

Com relação ao pâncreas endócrino de ratas com diabetes moderado, Gallego *et al.* (2019) realizaram uma análise temporal da morfologia pancreática de ratas (aos 5, 10, 15 e 30 dias de vida) e verificaram que as ratas apresentaram alterações morfológicas em suas ilhotas pancreáticas. Houve diminuição da área das ilhotas pancreáticas em ratas diabéticas com 5 dias de vida e também da porcentagem de células imunomarcadas para insulina quando estas ratas se encontravam com 10, 15 e 30 dias de vida. Além disso, as ratas diabéticas apresentaram um aumento na porcentagem de células imunomarcadas para glucagon e somatostatina com 10, 15 e 30 dias de vida. Quanto aos níveis glicêmicos, os animais diabéticos com 5 e 30 dias de vida apresentaram hiperglicemia. Quando o estudo foi realizado no 18º dia de prenhez, as ratas

diabéticas também apresentaram hiperglicemia e alterações morfológicas nas ilhotas pancreáticas semelhantes ao estudo sem prenhez de Gallego *et al.*, com a diminuição da porcentagem de células imunomarcadas para insulina e aumento da porcentagem de células imunomarcadas para glucagon e somatostatina (GALLEGO *et al.*, 2018).

Além do ambiente intrauterino desfavorável, o estilo de vida atual com alto consumo de gordura, redução da prática de atividades físicas, estresse e ansiedade são alguns dos vários fatores implicados no desenvolvimento de diabetes, obesidade e outros distúrbios metabólicos (KEITH *et al.*, 2006). O consumo de uma dieta rica em gorduras está relacionado ao aumento do risco para obesidade, diabetes e síndrome metabólica, sendo a resistência à insulina o aspecto fundamental na etiologia destes distúrbios (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006; GAMBINERI *et al.*, 2006; CORDNER & TAMASHIRO, 2015). Entretanto, há pouco entendimento sobre a faixa etária exata de tolerância às respostas adaptativas, mas sabe-se que as doenças se manifestam quando os nutrientes do ambiente pós-natal são consideravelmente diferentes daqueles aos quais o feto foi exposto no meio intrauterino (GLUCKMAN & HANSON, 2004).

Frente ao exposto e na tentativa de reproduzir a influência dos fatores ambientais no desenvolvimento de doenças, existem vários modelos experimentais, dentre eles o uso de dietas hiperlipídicas (DHL), associadas ou não a outros produtos, como açúcar (FERRON *et al.*, 2018) e alimentos ultraprocessados, não saudáveis, mas saborosos (por exemplo, bacon, *muffins* e biscoitos), chamada de dieta cafeteria, dieta de *junk food*, “dieta de supermercado” ou “dieta ocidental” (LALANZA & SNOEREN, 2021).

Considerando apenas a administração da dieta hiperlipídica, foram observadas alterações tanto em animais quanto em seus descendentes (CERF, 2018; GAWLIŃSKA *et al.*, 2021). Estudos mostram que ratos que receberam DHL durante a vida adulta apresentaram hiperglicemia e aumento do índice HOMA-IR (*Homeostasis model assessment* – modelo matemático que prediz a resistência à insulina pela medida da glicemia e insulina de jejum) (GELONEZE & TAMBASCIA, 2006; ROZA *et al.*, 2016; FRANCISQUETI *et al.*, 2017). O consumo de DHL durante a prenhez e lactação de ratas aumenta o ganho de peso corpóreo, causa intolerância à glicose (SRINIVASAN *et al.*, 2006; DESAI *et al.*, 2014) e resistência à insulina nos descendentes (DESAI *et al.*, 2014). Já os

descendentes de ratas, que consumiram dieta hiperlipídica somente durante a prenhez, também apresentaram alterações como hiperglicemia e redução no tamanho das células β -pancreáticas aos 21 dias de vida, prejudicando a secreção de insulina (CERF *et al.*, 2007).

Em relação à porcentagem de gordura utilizada nas dietas, não há consenso e os dados diferem entre os estudos. Com isso, a falta de informações adequadas sobre a composição das dietas é muito comum na literatura. As diferenças sutis existentes entre as dietas, como a fonte de gordura utilizada e as proporções de minerais e ácidos graxos podem afetar significativamente parâmetros metabólicos (PAULA *et al.*, 2021a). Consequentemente, a falta da padronização e de informações apropriadas nas metodologias dos artigos científicos sobre o preparo, constituintes e período de administração das dietas hiperlipídicas tornam a reprodutibilidade dos experimentos desafiadora (MORAES-SOUZA *et al.*, 2021).

Estudos realizados em nosso laboratório de pesquisa mostraram que a exposição de descendentes de ratas diabéticas a um ambiente intrauterino hiperglicêmico associada à ingestão de uma dieta hiperlipídica após o desmame promoveu o aumento do peso relativo de gordura visceral (PAULA *et al.*, 2021b) e do número de adipócitos hipertrofiados (SAULLO *et al.*, 2021), confirmando o quadro de resistência à insulina. Estes fatores levaram a uma disfunção do perfil lipídico por meio do aumento das concentrações de colesterol total, triglicerídeos e da lipoproteína VLDL (do inglês – *Very Low Density Lipoprotein*) e também uma disfunção do perfil imunológico destes animais, evidenciado pela diminuição das concentrações das citocinas IL-6 e IL-10 (PAULA *et al.*, 2021b). Estas alterações favoreceram o desenvolvimento da resistência à insulina, confirmado pelo aumento do índice TyG (modelo matemático que prediz a resistência à insulina) (PAULA *et al.*, 2021b).

Há evidência que o excesso de gordura na dieta aumenta o conteúdo lipídico do tecido adiposo e não-adiposo, que pode resultar em lipotoxicidade, levando à disfunção e morte celular (WEISBERG *et al.*, 2003). O tecido adiposo atua como um órgão endócrino e parácrino altamente especializado, tendo efeito local e sistêmico (GNIULI *et al.*, 2008). Entre os diferentes hormônios liberados pelos adipócitos, chamados de adipocinas, a leptina desempenha um papel fundamental no controle da ingesta alimentar no hipotálamo e no gasto

energético, regulando a saciedade e o peso corporal (MARGETIC *et al.*, 2002; NISWENDER & SCHWARTZ, 2003). Embora vários fatores modulem a secreção de leptina, seus níveis plasmáticos são frequentemente proporcionais à massa corporal gorda (MARGETIC *et al.*, 2002). Sua ação é mediada pela ativação do receptor de leptina (LepR), que é altamente expresso no hipotálamo e cerebelo, bem como em outros tecidos envolvidos no metabolismo, como o fígado, tecido adiposo e o pâncreas endócrino (ANUBHUTI & ARORA, 2008).

Notavelmente, a leptina pode inibir a expressão e secreção de insulina nas células β -pancreáticas, regulando a homeostase da glicose diretamente por sua ação no pâncreas endócrino (MORIOKA *et al.*, 2007; COVEY *et al.*, 2006). Uma vez que a insulina também estimula a liberação de leptina a partir dos adipócitos, existe um *feedback* bidirecional entre as células β -pancreáticas e o tecido adiposo. Já foi proposto em trabalhos anteriores que a desregulação desta comunicação possa ter papel no desenvolvimento do diabetes em indivíduos obesos (MORIOKA *et al.*, 2007; COVEY *et al.*, 2006).

Apesar das células alfa (α) e delta (δ)-pancreáticas expressarem o LepR, a função da leptina nestas células ainda é incerta (PEREIRA *et al.*, 2021). No diabetes, a secreção de glucagon e somatostatina não responde adequadamente às alterações da glicose, o que leva a problemas adicionais no controle dos níveis de glicose em pacientes e ratos diabéticos, além das dificuldades derivadas do mau funcionamento das células β (DUNNING *et al.*, 2007; QUESADA *et al.*, 2008; IESSI *et al.*, 2016). A leptina foi revelada como um importante modulador da homeostase da glicose por ação direta sobre as células β , mas há evidências também de que a leptina também poderia ter um papel na diminuição da secreção de glucagon nas células α (PEREIRA *et al.*, 2021). Há evidência de que a função das células α pode ser modulada pelo tecido adiposo pela via de sinalização de leptina.

Pelo fato de não existirem trabalhos visando o estudo da tríade hormonal (insulina, glucagon e somatostatina) pancreática em descendentes de diabéticas, expostos ou não a uma dieta hiperlipídica e sua relação com o receptor de leptina, este estudo pretende realizar uma discussão de forma integrada entre os três principais hormônios pancreáticos e a relação de morte e proliferação celular dessas células, e fazer um paralelismo com a situação

humana atual sobre a alta incidência de diabetes intergeracional e do aumento do consumo de dieta rica em gorduras, visando explicar os mecanismos das alterações observadas em trabalhos prévios realizados em nosso laboratório. Nossa hipótese é que as ratas expostas a um ambiente intrauterino hiperglicêmico e submetidas à dieta rica em gorduras após o desmame apresentem alterações nas imunomarcações das células endócrino-pancreáticas e que haja o comprometimento do acoplamento da leptina a seu receptor, interferindo no processo de morte e divisão celular das células beta, alfa e delta.

Objetivos

2 - OBJETIVOS

2.1 – *Objetivo Geral*

Avaliar a relação entre as células endócrino-pancreáticas e receptor de leptina das ilhotas do pâncreas de descendentes adultas submetidas à dieta hiperlipídica advindas de ratas diabéticas.

2.2 – *Objetivos Específicos – relacionados às ratas-filhas:*

- ✓ Estabelecer e relacionar a área das ilhotas pancreáticas com marcadores hormonais das ilhotas pancreáticas, de proliferação (Ki-67) e morte celular (Caspase -3 clivada).
- ✓ Determinar e avaliar a porcentagem de células endócrino-pancreáticas imunomarcadas por insulina, glucagon, somatostatina, Caspase-3, Ki-67 e receptor de leptina.
- ✓ Determinar e analisar a intensidade de marcação da tríade hormonal pancreática (insulina, glucagon e somatostatina).
- ✓ Calcular e interpretar a área sob a curva (em inglês AUC = *area under the curve*) glicêmica.
- ✓ Relacionar os dados sobre as imunomarcações dos diferentes parâmetros analisados utilizando análises de correlação estatística.

Materiais e Método

3 – MATERIAIS E MÉTODO

Trata-se de um subprojeto incluído em um projeto maior (“guarda-chuva”) intitulado “Avaliação de descendentes expostas ao diabetes moderado intraútero, submetidas à dieta hiperlipídica no período pós-natal e tratadas com mistura de cálcio e vitamina D durante a prenhez (Processo FAPESP 2016/25207-5)”, sob responsabilidade da Profa. Dra. Débora C. damasceno. Este projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP (Protocolo Número 1218-2017).

Os procedimentos realizados do item 3.1 ao 3.4 relacionados ao manuseio e cuidado dos animais e à coleta das amostras já haviam sido executados anteriormente por outros integrantes da nossa equipe de pesquisa, mas foram inseridos neste texto para melhor compreensão da sequência metodológica. Portanto, para desenvolvimento deste estudo, foi realizada a confecção de lâminas histológicas para as análises morfológicas (Hematoxilina/Eosina e imunoistoquímica) do tecido pancreático já coletados e a interpretação de dados obtidos com estas análises e a reação com outros parâmetros obtidos em estudos anteriores.

Para melhor compreensão da sequência do experimento realizado no projeto maior e parte deste estudo, foi organizado um fluxograma apresentado como Figura 1.

3.1 – Sequência experimental (Figura 1).

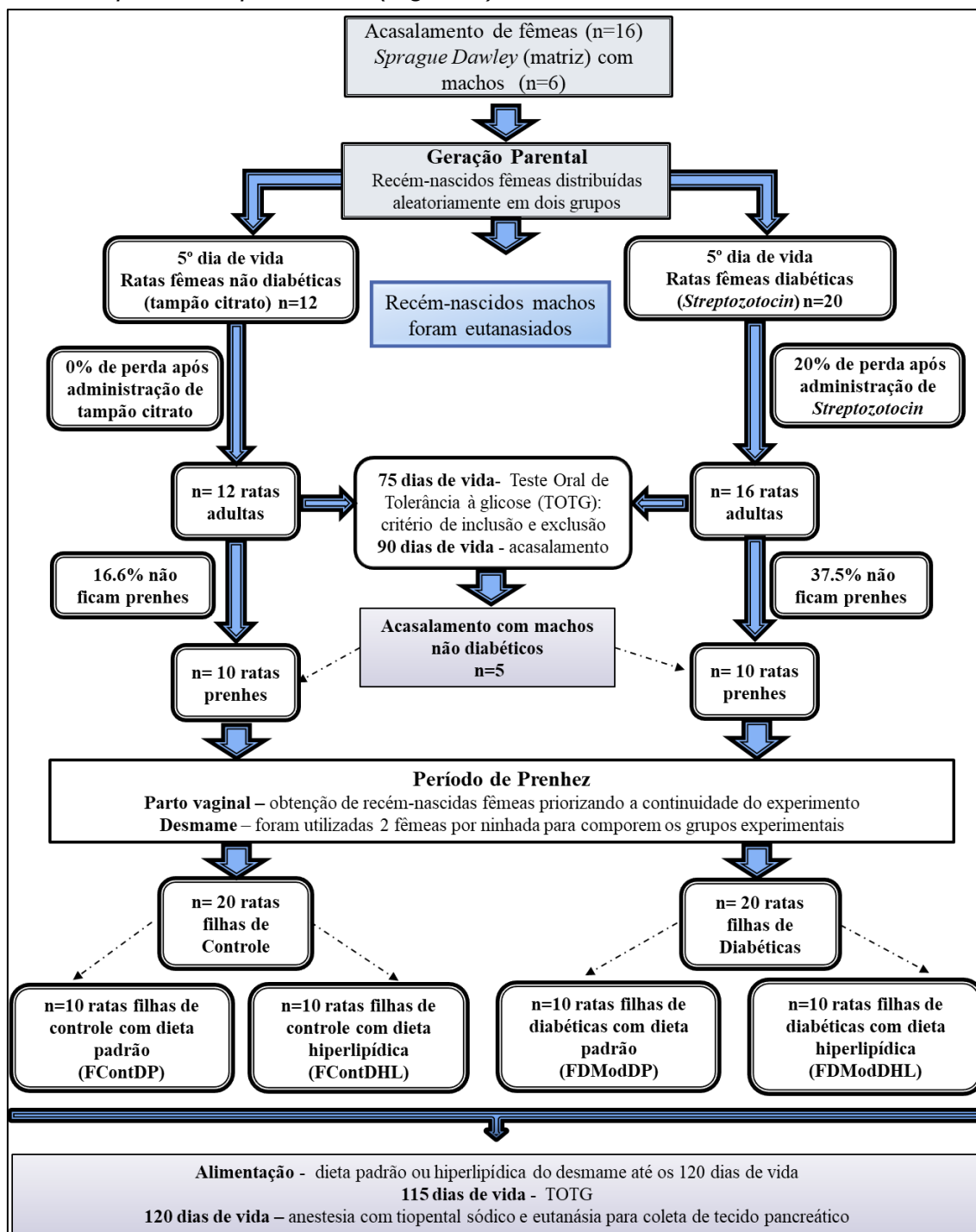


Figura 1. Sequência experimental.

3.2 - Sequência experimental da geração parental

O objetivo da geração parental foi criar um ambiente intrauterino hiperglicêmico levando à programação fetal a partir da indução do diabetes moderado.

3.2.1 –Tipo de estudo e animais

Foi realizado um estudo experimental de carácter prospectivo e analítico.

Foram utilizados ratos da linhagem *Sprague Dawley*, fêmeas e machos, pesando em torno de 200 g e 250 gramas (g), respectivamente, adquiridos do Biotério da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB_UNICAMP) e mantidos no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp sob condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($60\pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12h). Os animais foram mantidos em número de três por caixas de polipropileno (41x34x16 cm) com maravalha autoclavada e com enriquecimento ambiental (bolas de papel). Água filtrada e ração foram oferecidas *ad libitum*. Os procedimentos e manuseio de animais utilizados neste estudo estão de acordo com as orientações fornecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP (Protocolo Nº 1218/2017).

3.2.2 - Indução do diabetes moderado

Para a indução do diabetes moderado (DMod), as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente por geração de números randômicos por um *software* de computador (<https://www.randomizer.org>). Para isso, foi utilizada a droga β -citotóxica *Streptozotocin* (STZ, Sigma Aldrich®), na dose de 70 mg/kg, aplicada nas ratas com cinco dias de vida via subcutânea no período da manhã (KISS *et al.*, 2009 - modificado). As fêmeas do grupo não-diabético (controle) receberam volume do veículo (tampão citrato – 0,01 M, pH 4,5) correspondente ao do grupo que recebeu a droga diabetogênica no mesmo dia. Após a indução, as ratas recém-nascidas continuaram com suas mães (máximo de oito fêmeas = número de tetas funcionais para aleitamento) até o término do período de amamentação (21 dias).

3.2.3 - Confirmação do diabetes moderado e critérios de inclusão e exclusão

Aos 75 dias de vida das ratas, o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) foi realizado como critério de inclusão das ratas nos grupos com diabetes moderado e controle (SINZATO *et al.*, 2021). No início da manhã, a ração foi retirada de todas as ratas que foram submetidas ao TOTG. Após seis horas de jejum, foi coletada uma gota de sangue por um pequeno corte na extremidade da cauda das ratas para determinação glicêmica (tempo 0). Logo após, as ratas receberam solução de glicose (0,2 g/mL) via intragástrica (*gavage*) na dose de 2,0 g/kg de peso corpóreo. Decorridos 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de glicose, as glicemias foram determinadas em glicosímetro convencional, com valores limites $\geq 200\text{mg/dL}$, onde um valor alterado confirma o diabetes. Para as ratas do grupo controle foram considerados três valores limites $< 140\text{mg/dL}$. Os animais que receberam o STZ e apresentaram o TOTG inalterado e as ratas do grupo não-diabético que apresentaram TOTG alterado foram anestesiadas, eutanasiadas e excluídas do estudo.

3.2.4 - Período de acasalamento, prenhez e amamentação

Aos 90 dias de vida, as ratas controles e diabéticas foram distribuídas três a três em caixas de polipropileno, forradas com maravalha e com enriquecimento ambiental, na presença de um rato macho saudável. O procedimento para acasalamento teve duração máxima de 15 dias para cada animal que corresponde a pelo menos três ciclos estrais. Nas manhãs seguintes (7h-9h da manhã), os ratos machos foram removidos e o esfregaço vaginal foi realizado. A presença de espermatozoides nas lâminas confirmou o diagnóstico de prenhez, que foi considerado o dia zero de prenhez (GALLEGO *et al.*, 2018). Ratas que não acasalaram após os 15 dias foram consideradas inférteis e excluídas do estudo (PAULA *et al.*, 2021b). Durante a prenhez, as ratas foram mantidas em caixas individuais e a prole foi obtida por parto vaginal. Após o nascimento, os recém-nascidos machos foram eutanasiados e as recém-nascidas fêmeas (duas fêmeas por mãe para haver diversidade de filhotes/grupo) foram mantidas com suas mães desde a lactação até o período de desmame (21 dias de vida). Após

o desmame, esses animais foram distribuídos nos grupos experimentais correspondentes às suas mães. As ratas fêmeas foram priorizadas para a análise dos efeitos transgeracionais relacionados à prenhez.

3.3 - Sequência experimental dos descendentes oriundos de mães com diabetes moderado (DMod) e não-diabéticas (controle)

3.3.1 - Grupos experimentais

Logo após o desmame, as descendentes fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=5 animais/grupo): 1) ratas descendentes de mães controle e que receberam dieta padrão após o desmame (FContDP); 2) ratas descendentes de mães controle e que receberam dieta hiperlipídica após o desmame (FContDHL); 3) ratas descendentes de mães Dmod e que receberam dieta padrão após o desmame (FDMoDP) e 4) ratas descendentes de mães Dmod e que receberam dieta hiperlipídica após o desmame (FDMoDHL).

3.3.2 - Tratamento com dieta padrão ou hiperlipídica

As ratas descendentes de mães controles e diabéticas receberam aleatoriamente dieta padrão (controle) comercial (28,54% Kcal de proteína, 62,65% Kcal de carboidrato, 8,7% Kcal de gordura – ração comercial de rato, Purina®, Brasil) ou dieta hiperlipídica (23,43% Kcal de proteína, 46,63% Kcal de carboidratos, 30% Kcal de gordura) (FRANCISQUETI *et al.*, 2017 – modificado) com relação à proporção de gordura e carboidratos. A dieta foi administrada desde o desmame até a vida adulta (120 dias de vida pós-natal) para compor os quatro grupos experimentais.

A DHL (Figura 2) foi preparada em nossa Instituição, suplementada com vitaminas e minerais e a fonte de gordura utilizada foi a banha de porco. Após o preparo, a ração foi mantida sob refrigeração até o momento do consumo dos animais. Devido ao fato de as dietas apresentarem características visuais que permitem facilmente sua distinção, o cegamento dos cuidadores e/ou dos investigadores não foi possível de ser realizado.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Informação	Tipo de dieta	
	Dieta Padrão	Dieta Hiperlipídica
Energia (kcal/g)	4,02	4,93
Mistura (%/100 g)	7,45	3,65
Matéria seca (%/100 g)	92,55	96,35
Minerais (% matéria seca)	6,66	2,84
Proteína crua (% matéria seca)	25,76	26,77
Extrato etéreo (% matéria seca)	3,49	15,19
Fibra crua (% matéria seca)	43,63	45,42



Figura 2. Ração hiperlipídica. Fonte: do autor

3.3.3 - Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e área sob a curva (AUC)

Aos 115 dias de vida, foi realizado o TOTG. Após jejum de 6 horas, a glicemia sérica foi avaliada no momento 0 (jejum) pela coleta de sangue por um pequeno corte na extremidade da cauda do animal. Após a sobrecarga de glicose, as glicemias foram avaliadas aos 30, 60 e 120 min (SINZATO *et al.*, 2021). A resposta total da glicose foi avaliada pela estimativa do cálculo da área sob a curva (AUC), usando o método trapezoidal (TAI, 1994).

3.4 - Morte dos animais e coleta das amostras

Aos 120 dias de vida, as ratas de cada grupo foram avaliadas quanto à fase do ciclo estral e as fêmeas em diestro (avaliação realizada por esfregaço vaginal) foram mantidas em jejum de 6 horas. Em seguida, foram levadas ao laboratório e anestesiadas com tiopental sódico (Thiopentax®- dose de 120 mg/kg de peso corpóreo) via intraperitoneal (PAULA *et al.*, 2021b) e pesadas em balança semi-analítica. Em seguida, as ratas foram colocadas em decúbito dorsal, submetidas à decapitação para coleta de sangue da região do pescoço e laparotomia para coleta de tecido pancreático. Os descendentes machos não foram utilizados neste estudo, mas foram doados a outros pesquisadores do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB)/Unesp para trabalhos em parceria.

3.5 – Análise morfológica das ilhotas pancreáticas

Os pâncreas foram retirados, pesados (n= 5 pâncreas por grupo) e colocados em solução fixadora (formalina tamponada) por 24h e, em seguida, acondicionadas em etanol 70%. Os tecidos pancreáticos foram desidratados em imersões subsequentes de concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em soluções de xilol, incluídos em parafina e cortes de 5µm de espessura foram obtidos usando micrótomo rotativo. Para realização da análise histológica convencional foi utilizado o microscópio Leica® e, para mensuração da área das ilhotas, foi usado o *software ImageJ* (NIH, EUA – livre acesso). Os fragmentos foram desparafinizados, corados com hematoxilina e eosina (H&E) e, em seguida, as lâminas foram montadas. Para análise imunoistoquímica, os cortes foram incubados com anticorpos específicos anti-insulina, anti-glucagon, anti-somatostatina, anti-caspase-3 clivada, anti-Ki-67 e anti-receptor de leptina. A recuperação antigênica foi realizada na panela de pressão Elite Bistro® com

solução de citrato (pH 6,0) por 30 min para os anticorpos anti-insulina, anti-glucagon, anti-caspase-3 clivada e anti-Ki-67 e por 20 min para o anticorpo anti-receptor de leptina. Para anticorpo anti-somatostatina, não foi realizada a recuperação antigênica. O bloqueio de peroxidase endógena (Dako®, CA, USA) foi realizado por 20 min em estufa 27°C para todos os anticorpos. Para o bloqueio de proteínas inespecíficas, foi utilizado o bloqueio pronto para uso *Protein Block* (Dako®, CA, USA) por 30 min em estufa 27°C para todos os anticorpos, com exceção do anticorpo anti-Ki-67. O bloqueio com leite desnatado (Molico®, Brasil) por 1 hora em temperatura ambiente e o bloqueio com peróxido de hidrogênio 3% diluído em metanol por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente foram feitos para os anticorpos anti-Ki-67 e anti-receptor de leptina. As diluições para os anticorpos primários foram: 1:10.000 para anti-insulina (Abcam®, EUA, Código: ab8304 incubação por duas horas em estufa 27°C); 1:500 para anti-glucagon (Abcam®, EUA, Código: ab8055 - incubação por uma hora em estufa 27°C), 1: 2000 para anti-somatostatina (Dako®, EUA, Código: a0566 - incubação *overnight* em geladeira a 4°C), 1:50 para anti-caspase-3 clivada (Cell Signalling Technology®, EUA, Código: 9661S - incubação *overnight* em geladeira a 4°C), 1:300 para anti-Ki-67 (Elabscience®, EUA, Código E-AB-22027 – incubação *overnight* em geladeira a 4°C) e 1:200 para anti-receptor de leptina (Elabscience®, EUA, Código: E-AB-33552 – incubação *overnight* em geladeira a 4°C). Após a incubação com o anticorpo primário, o anticorpo secundário (Histofine, Germany) foi adicionado por 30 min em estufa 27°C. As lâminas foram coradas com DAB (3,3-diaminobenzidina) por 3 min à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram contra-coradas por hematoxilina de Harris e montadas.

As imagens foram capturadas usando o sistema de imagens computadorizado (Software KS-300, versão 3.0, Zeiss®), integrado à câmera digital imagem (CCD-IRIS / RGB, Sony®, China) e microscópio (DMR, Leica®, Brasil). As células das ilhotas pancreáticas foram identificadas e classificadas pela presença de marcação citoplasmática para os anticorpos anti-insulina, anti-glucagon, anti-somatostatina e anti-receptor de leptina, marcação perinuclear para o anticorpo anti-caspase-3 clivada e marcação nuclear para o anticorpo anti-Ki-67.

Todas as reações foram acompanhadas de seus respectivos controles positivos e negativos (Material Suplementar em Anexo). As imagens foram analisadas por um avaliador cego utilizando o *software ImageJ* (NIH, EUA – livre acesso) pela contagem do número de células positivas e negativas para os anticorpos. A porcentagem da imunomarcacão para cada parâmetro foi feita pela razão entre o número de células marcadas e o número total de células multiplicado por 100 (GALLEGO *et al.*, 2018). Para avaliação da síntese dos hormônios insulina, glucagon e somatostatina no pâncreas endócrino, foi feita a análise de intensidade de marcação pelo *software ImageJ* (NIH, EUA – livre acesso) (GALLEGO *et al.*, 2018).

3.6 – Cálculo do tamanho amostral e análise estatística

Considerando os quatro grupos experimentais, baseado nos experimentos anteriores realizados em nosso laboratório com poder de 90% e confiabilidade de 95%, o tamanho amostral foi de 5 ratas por grupo. Os resultados foram estatisticamente analisados para comparação entre as médias dos grupos e estabelecida as possíveis relações entre valores normais ou alterados das diferentes variáveis com auxílio de um especialista em Bioestatística. Em relação à quantidade de células imunomarcadas, foram calculados 5 pâncreas/grupo, sendo analisadas 10 ilhotas por pâncreas perfazendo um total de 50 ilhotas/grupo. Para cada ilhota, foram analisadas pelo menos 100 células, perfazendo um total de 5.000 células/grupo. O cálculo foi realizado considerando um poder de 90% e confiabilidade de 95% pelo programa STATISTICA 10.0.

Para análise comparativa da intensidade de marcação para insulina, glucagon, somatostatina e glicemia da AUC, o Teste de Distribuição Gama seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Wald foi utilizado pois a distribuição dos dados foi assimétrica. Para as análises das áreas das ilhotas pancreáticas e porcentagens de células imunomarcadas para Ki-67, caspase-3 clivada e receptor de leptina, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey. Para comparar as porcentagens de células imunomarcadas para glucagon e somatostatina, foi realizado o Teste de Distribuição Binomial Negativa seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Wald. Para a porcentagem de células

imunomarcadas para insulina, foi utilizado o ajuste por Distribuição de Poisson seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Wald. Para correlação entre as variáveis do estudo, foi feito o Teste de Correlação de Pearson. Para todas as comparações, foi considerado limite mínimo de significância estatística de $p < 0,05$.

Resultados

4 – RESULTADOS

4.1 – *Análise morfológica das ilhotas pancreáticas*

4.1.1 – *Área das ilhotas pancreáticas*

Em relação à área das ilhotas pancreáticas, não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos experimentais (Figura 3).

4.1.2 – *Porcentagem de células imunomarcadas para insulina*

Como mostra a Figura 4, os animais dos grupos FContDHL, FModDP e FModDHL apresentaram maior porcentagem de células imunomarcadas para insulina (Figuras 4B, 4C e 4D) em comparação ao grupo FContDP (Figura 4A). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa da porcentagem de células imunomarcadas para insulina entre os grupos FContDHL, FModDP e FModDHL.

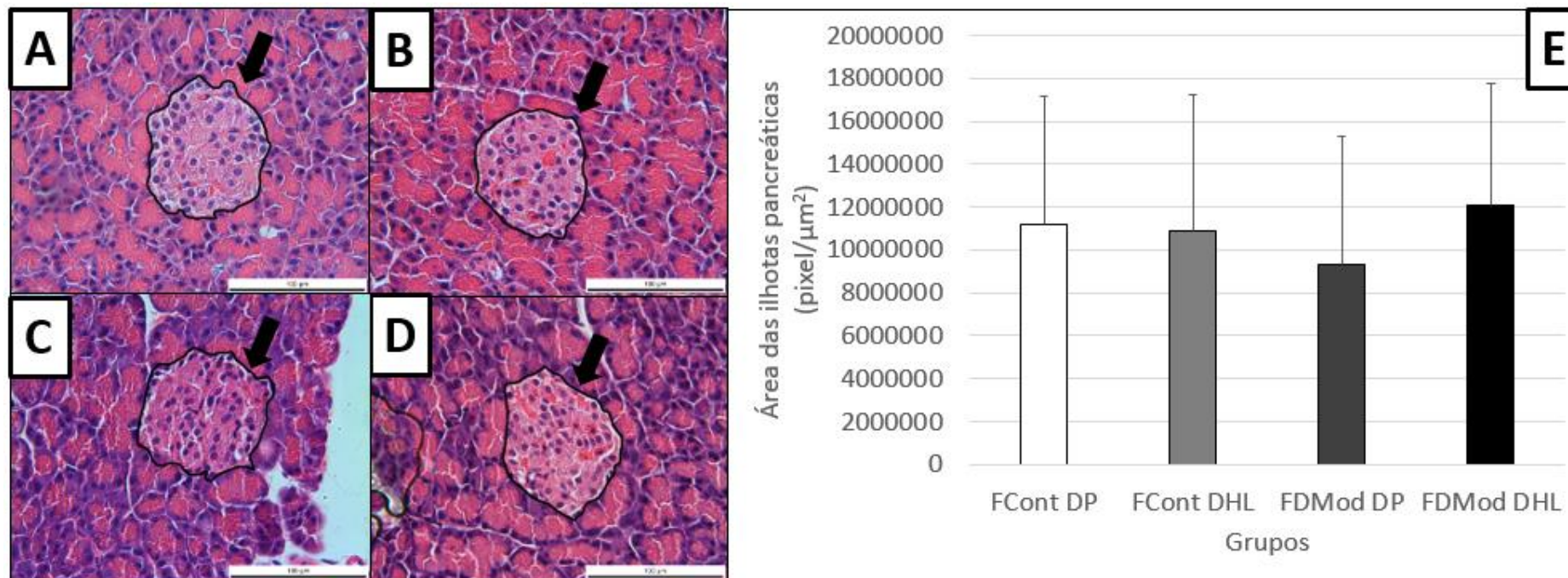


Figura 3. Área das ilhotas pancreáticas (H&E) de ratas filhas de mães controles (FCont) e mães diabéticas (FMod) submetidas à dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DHL) após o desmame até a vida adulta (120 dias de vida). (A) Fotomicrografia de ilhota pancreática do grupo FContDP; (B) Grupo FContDHL; (C) Grupo FModDP; (D) Grupo FModDHL; (E) Área das ilhotas pancreáticas (pixel/μm²). A seta e o contorno em preto em cada micrografia representam as ilhotas pancreáticas. Aumento de 40x.

Dados apresentados como média ± desvio-padrão (n=5 animais/grupo; n=50 ilhotas/grupo).

P > 0.05 – sem diferença estatisticamente significativa.

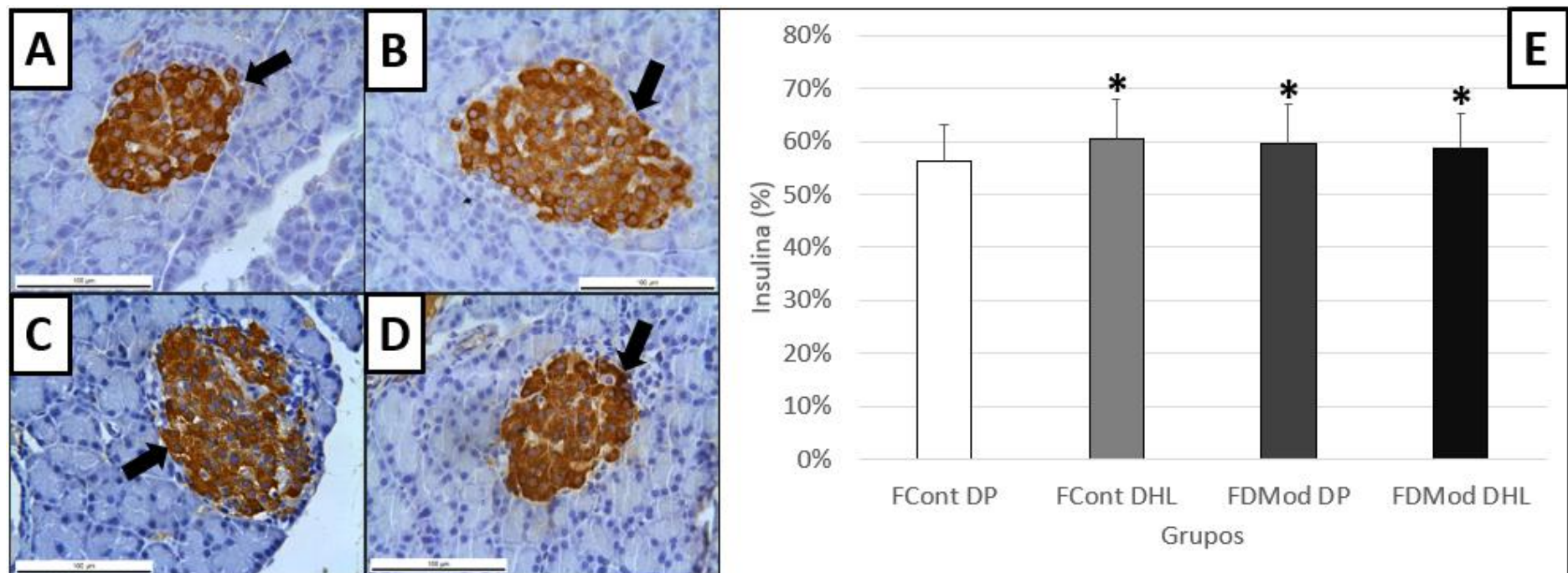


Figura 4. Porcentagem de células imunomarcadas anti-insulina de ratas filhas de mães controles (FCont) e mães diabéticas (FMod) submetidas à dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DHL). (A) Fotomicrografia de ilhota pancreática imunomarcada para insulina do grupo FContDP; (B) Grupo FContDHL; (C) Grupo FModDP; (D) Grupo FModDHL; (E) Porcentagem (%) de células imunomarcadas para insulina. A seta preta em cada micrografia destaca as imunomarcações nas ilhotas pancreáticas. Aumento de 40x.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão ($n=5$ animais/grupo; $n=50$ ilhotas/grupo nos grupos FContDP, FContDHL e FModDP; $n=47$ ilhotas/grupo no grupo FModDHL).

* $p<0,05$ – comparado ao grupo FContDP (ajuste pelo Teste de Distribuição de Poisson, seguido pelo Teste de Comparações Múltiplas de Wald).

4.1.3 – Porcentagem de células imunomarcadas para glucagon

As ratas do grupo FModDHL (Figura 5D) apresentaram aumento da porcentagem de células imunomarcadas para glucagon em relação aos demais grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos FContDHL e FModDP em relação ao grupo FContDP (Figuras 5A, 5B e 5C).

4.1.4 – Porcentagem de células imunomarcadas para somatostatina

Quanto à imunomarcção de somatostatina, os grupos FContDHL e FModDP (Figuras 6B e 6C) apresentaram uma menor porcentagem de marcação em comparação à do grupo FContDP. Os animais do grupo FModDHL mostraram aumento na porcentagem de células imunomarcadas para somatostatina em relação aos grupos FContDHL e FModDP (Figuras 6A e 6D).

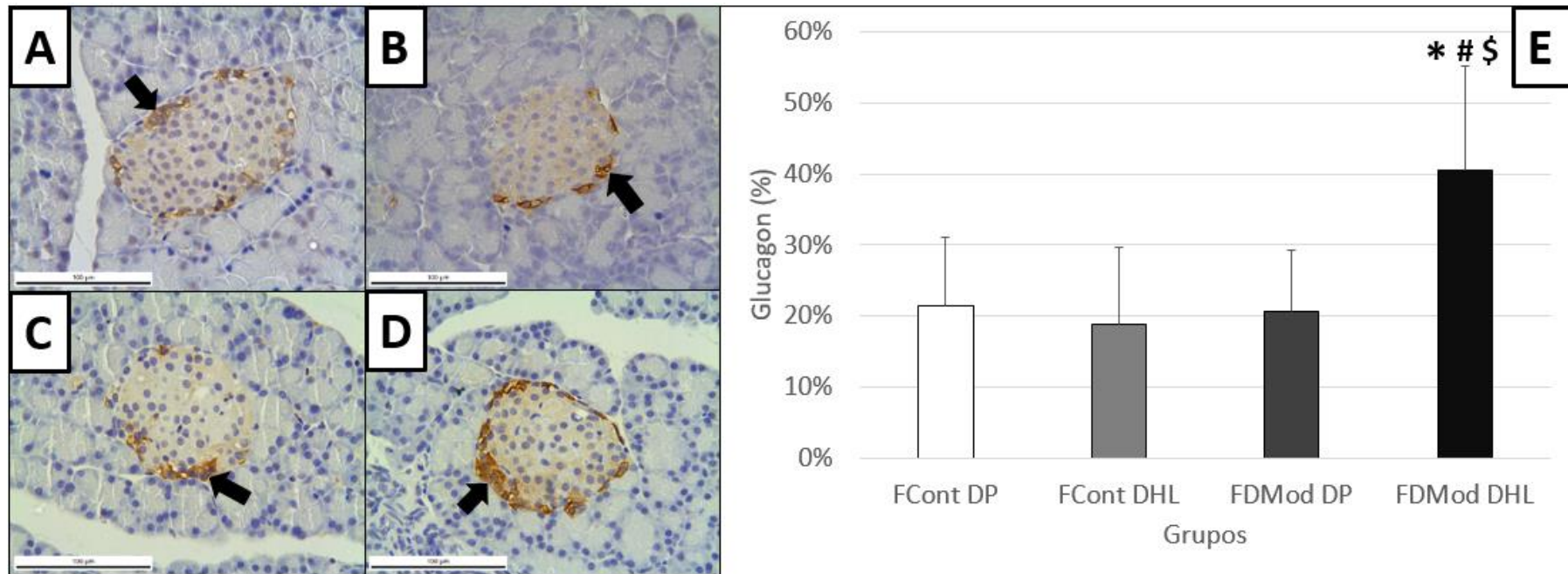


Figura 5. Porcentagem de células imunomarcadas anti-glucagon de ratas filhas de mães controles (FCont) e mães diabéticas (FMod) submetidas à dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DHL). (A) Fotomicrografia de ilhota pancreática imunomarcada para glucagon do grupo FContDP; (B) Grupo FContDHL; (C) Grupo FModDP; (D) Grupo FModDHL; (E) Porcentagem (%) de células imunomarcadas para glucagon. A seta preta em cada micrografia destaca as imunomarcações nas ilhotas pancreáticas. Aumento de 40x.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão ($n=5$ animais/grupo; $n=50$ ilhotas/grupo).

* $p<0,05$ -comparado ao grupo FContDP; # $p<0,05$ - comparado ao grupo FContDHL; \$ $p<0,05$ - comparado ao grupo FModDP (Teste de Distribuição Binomial negativa seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Wald).

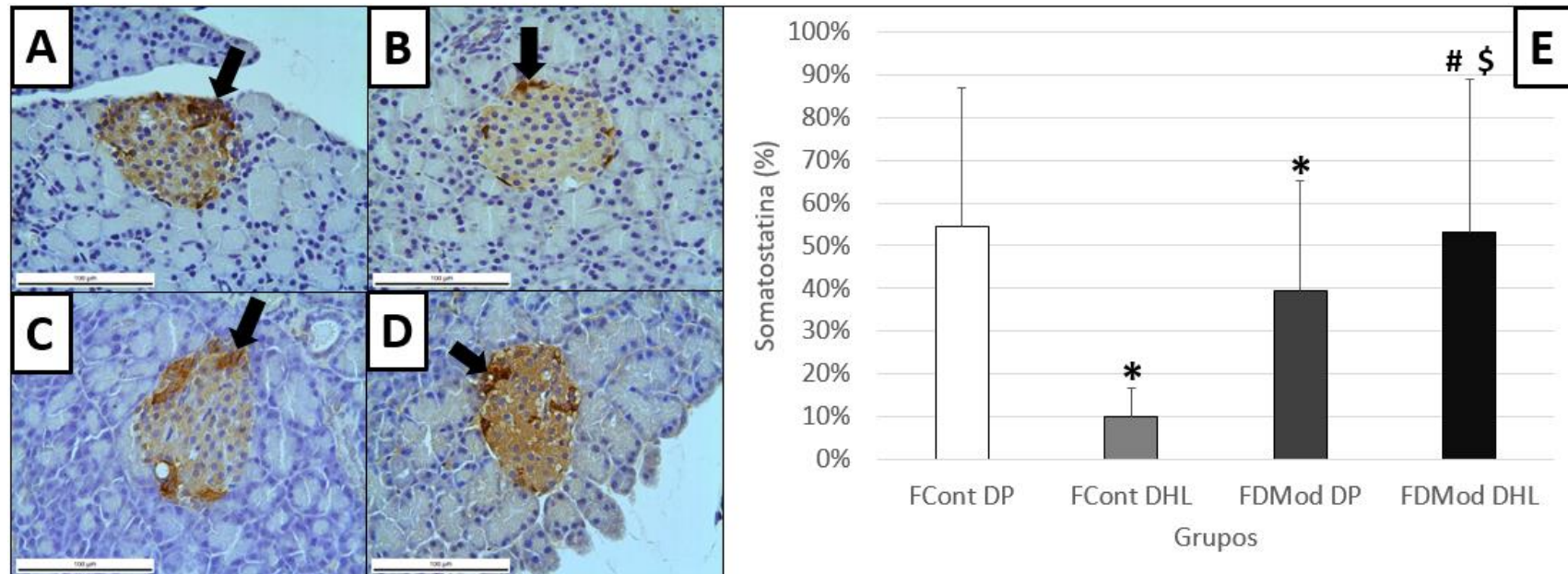


Figura 6. Porcentagem de células imunomarcadas anti-somatostatina de ratas filhas de mães controles (FCont) e mães diabéticas (FMod) submetidas à dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DHL). (A) Fotomicrografia de ilhota pancreática imunomarcada para somatostatina do grupo FContDP; (B) Grupo FContDHL; (C) Grupo FModDP; (D) Grupo FModDHL; (E) Porcentagem (%) de células imunomarcadas para somatostatina. A seta preta em cada micrografia destaca as imunomarcações nas ilhotas pancreáticas. Aumento de 40x.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão ($n=5$ animais/grupo; $n=50$ ilhotas/grupo nos grupos FContDP, FContDHL e FModDP; $n=46$ ilhotas/grupo no grupo FModDHL).

* $p<0,05$ – comparado ao grupo FContDP; # $p<0,05$ – comparado ao grupo FContDHL; \$ $p<0,05$ – comparado ao grupo FModDP (Teste de Distribuição Binomial negativa seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Wald).

4.1.5 – Porcentagem de células imunomarcadas para Ki-67

Na figura 7, os grupos FContDHL, FModDP e FModDHL (Figuras 7B, 7C e 7D) apresentaram um aumento na imunomarcação para Ki-67 quando comparados com grupo FContDP (Figura 7A). Além disso, o grupo FModDHL apresentou uma menor porcentagem de células imunomarcadas para Ki-67 em relação ao grupo FModDP e uma maior imunomarcação em comparação com o grupo FContDHL.

4.1.6 - Porcentagem de células imunomarcadas para caspase-3 clivada

Em relação à imunomarcação para caspase-3 clivada, os animais do grupo FContDHL (Figura 8B) apresentaram um aumento da porcentagem de células imunomarcadas em comparação com o grupo FContDP (Figura 8A). O grupo FModDP (Figura 8C) apresentou uma diminuição da imunomarcação para caspase-3 clivada quando comparado com o grupo controle. Já as ratas do grupo FModDHL (Figura 8D) apresentaram um aumento na porcentagem de células imunomarcadas para caspase-3 clivada em relação aos grupos FContDP e FModDP.

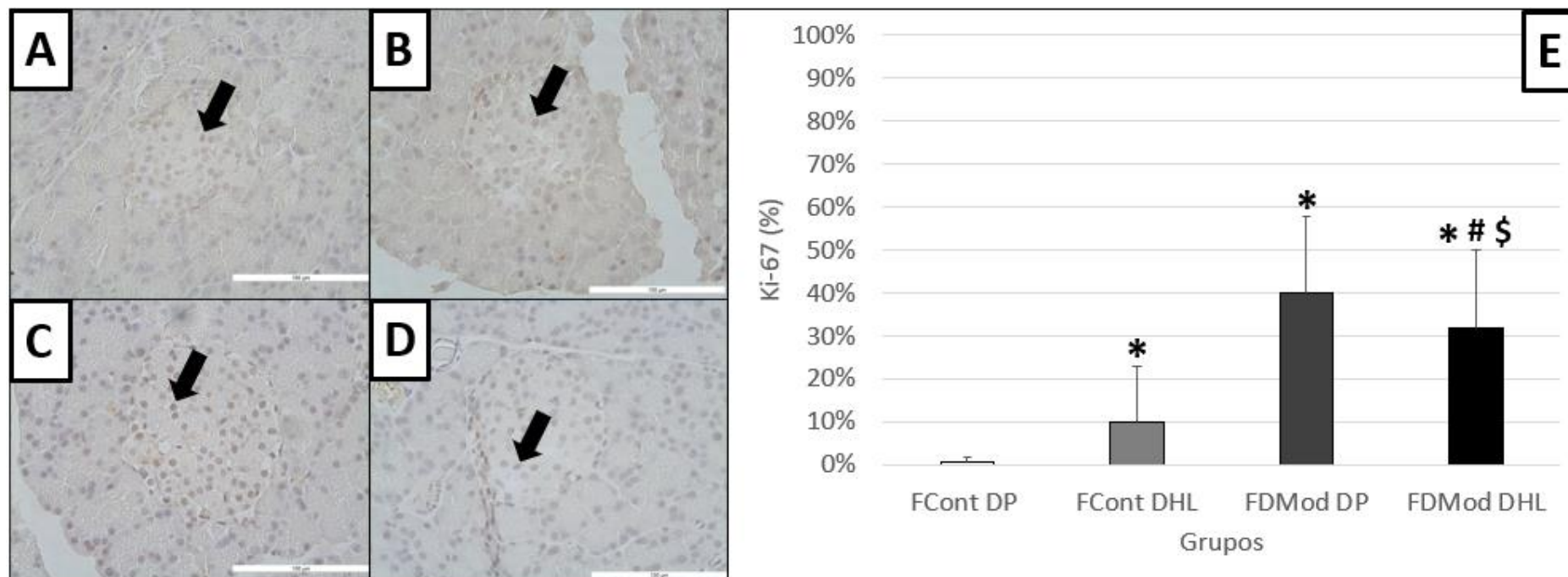


Figura 7. Porcentagem de células imunomarcadas anti-Ki-67 de ratas filhas de mães controles (FCont) e mães diabéticas (FMod) submetidas à dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DHL). (A) Fotomicrografia de ilhota pancreática imunomarcada para Ki-67 do grupo FContDP; (B) Grupo FContDHL; (C) Grupo FModDP; (D) Grupo FModDHL; (E) Porcentagem (%) de células imunomarcadas para Ki-67. A seta preta em cada micrografia destaca as imunomarcações nas ilhotas pancreáticas. Aumento de 40x.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão ($n=5$ animais/grupo; $n=50$ ilhotas/grupo nos grupos FContDP e FModDHL; $n=30$ ilhotas/grupo no grupo FContDHL; $n=45$ ilhotas/grupo no grupo FModDP).

* $p<0,05$ – comparado ao grupo FContDP; # $p<0,05$ – comparado ao grupo FContDHL; \$ $p<0,05$ – comparado ao grupo FModDP (ANOVA seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

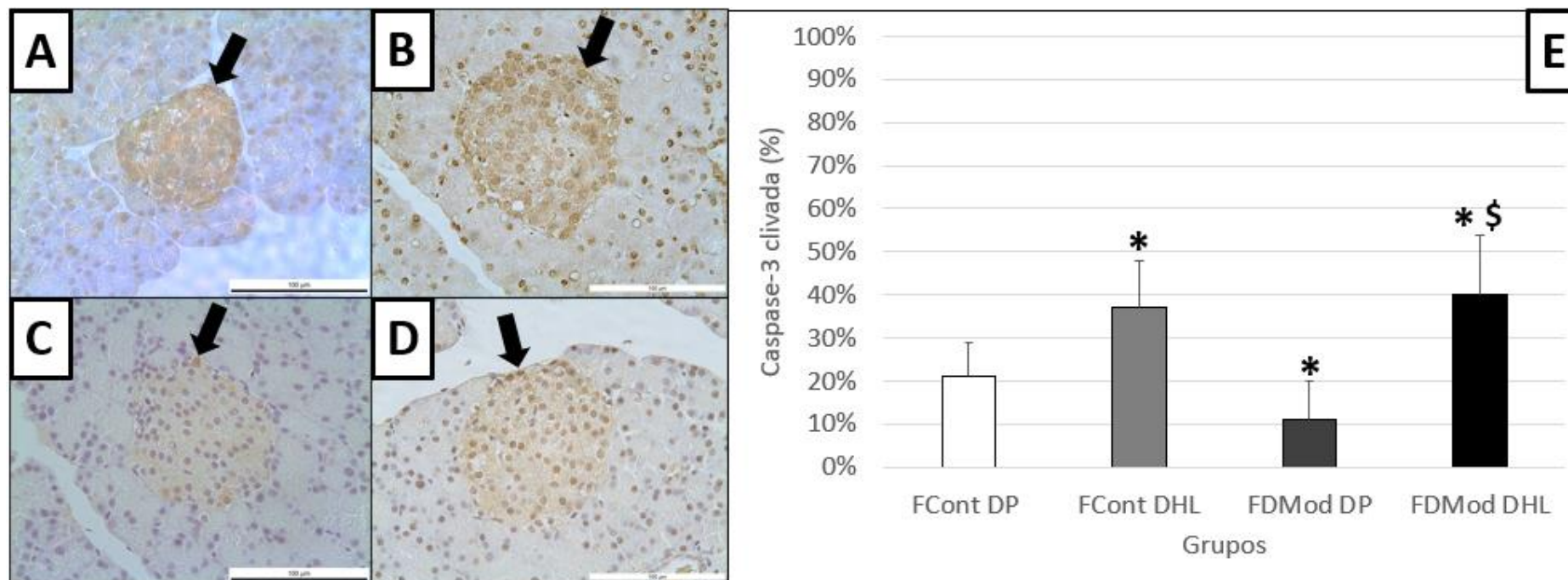


Figura 8. Porcentagem de células imunomarcadas anti-caspase-3 clivada de ratas filhas de mães controles (FCont) e mães diabéticas (FMod) submetidas à dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DHL). (A) Fotomicrografia de ilhota pancreática imunomarcada para caspase-3 clivada do grupo FContDP; (B) Grupo FContDHL; (C) Grupo FModDP; (D) Grupo FModDHL; (E) Porcentagem (%) de células imunomarcadas para caspase-3 clivada. A seta preta em cada micrografia destaca as imunomarcações nas ilhotas pancreáticas. Aumento de 40x.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão ($n=5$ animais/grupo; $n=50$ ilhotas/grupo nos grupos FContDP e FModDHL; $n=42$ ilhotas/grupo no grupo FContDHL; $n=49$ ilhotas/grupo no grupo FModDP).

* $p<0,05$ – comparado ao grupo FContDP, \$ $p<0,05$ – comparado ao grupo FModDP (ANOVA seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

4.1.7 - Porcentagem de células imunomarcadas para receptor de leptina

Os grupos de descendentes de diabéticas FModDP (Figura 9C) e FModDHL (Figura 9D) apresentaram uma diminuição de células imunomarcadas para receptor de leptina nas ilhotas pancreáticas em comparação com o grupo FContDP (Figura 9A). Além disso, as ratas do grupo FModDHL apresentaram uma diminuição na imunomarcagem para receptor de leptina em relação grupo FContDHL (Figura 9B).

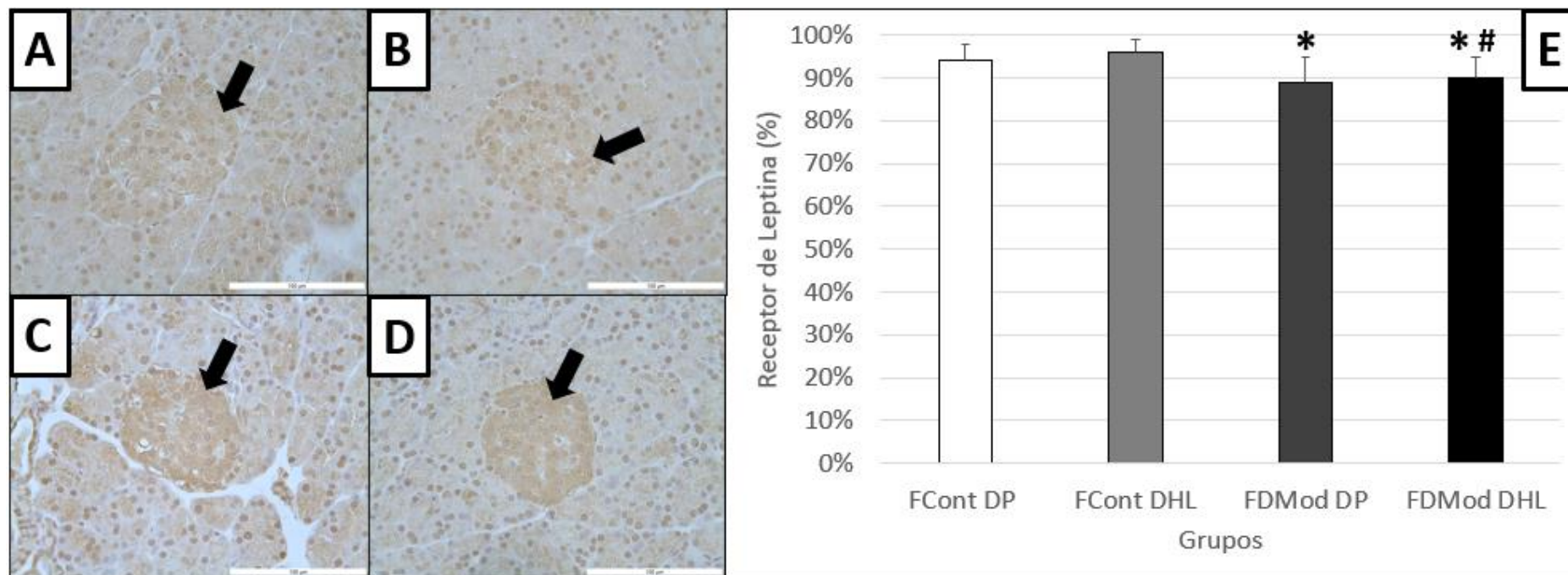


Figura 9. Porcentagem de células imunomarcadas anti-receptor de leptina de ratas filhas de mães controles (FCont) e mães diabéticas (FMod) submetidas à dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DHL). (A) Fotomicrografia de ilhota pancreática imunomarcada para receptor de leptina do grupo FContDP; (B) Grupo FContDHL; (C) Grupo FModDP; (D) Grupo FModDHL; (E) Porcentagem (%) de células imunomarcadas para receptor de leptina. A seta preta em cada micrografia destaca as imunomarcações nas ilhotas pancreáticas. Aumento de 40x.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão ($n=5$ animais/grupo; $n=50$ ilhotas/grupo nos grupos FContDP, FContDHL e FModDHL; $n=44$ ilhotas/grupo no grupo FModDP).

* $p<0,05$ – comparado ao grupo FContDP; # $p<0,05$ – comparado ao grupo FContDHL (ANOVA seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

4.1.8 – Intensidade de marcação para insulina

Em relação à intensidade de marcação para insulina, não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais (Figura 10A).

4.1.9 – Intensidade de marcação para glucagon

Na figura 10B, os grupos FContDHL e FModDP apresentaram menor intensidade de marcação para glucagon em comparação ao grupo FContDP. Já, o grupo FModDHL apresentou um aumento na intensidade de marcação para este hormônio em relação aos demais grupos experimentais.

4.1.10 – Intensidade de marcação para somatostatina

As ratas dos grupos FContDHL e FModDP apresentaram uma diminuição na intensidade de marcação para somatostatina em comparação ao grupo FContDP. O grupo FModDHL teve menor intensidade de marcação para este mesmo hormônio em relação aos grupos FConHL e FModDP (Figura 10C).

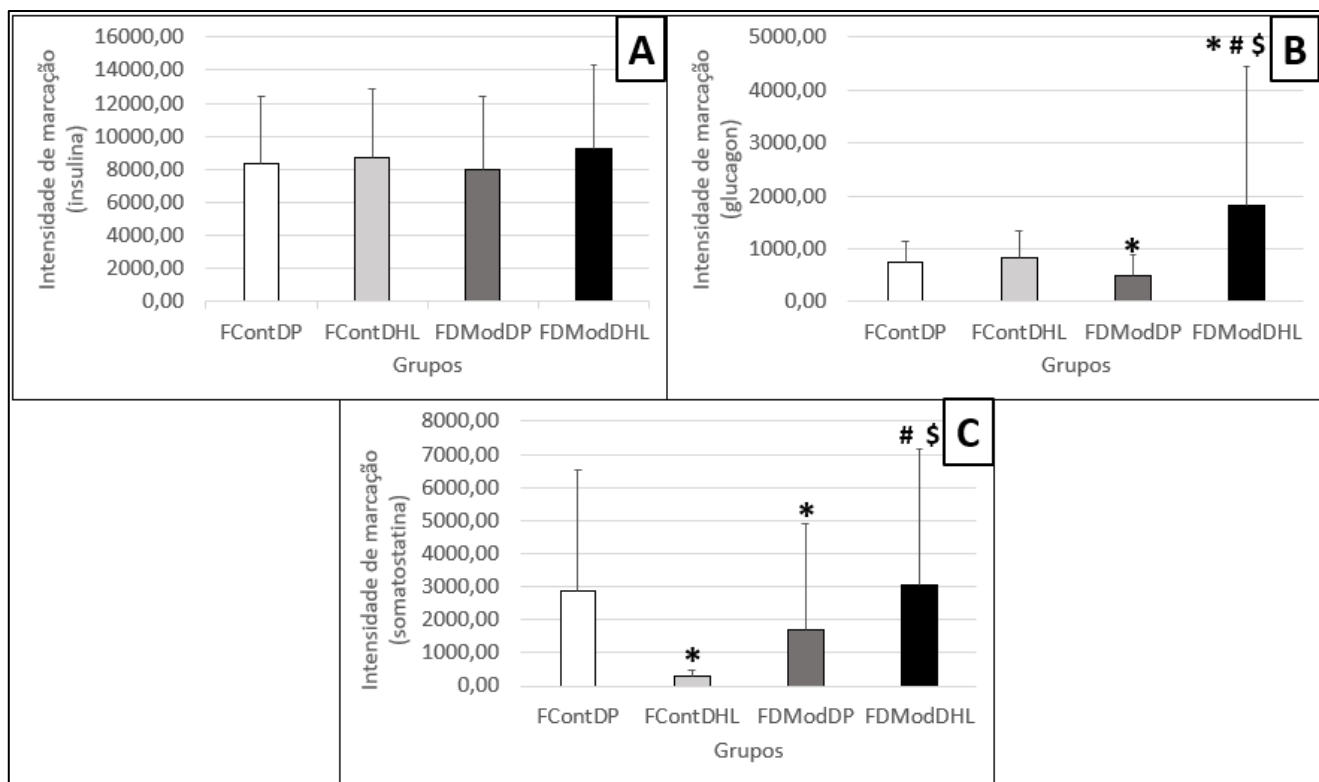


Figura 10. Intensidade de marcação para insulina (A), glucagon (B) e somatostatina (C) de ratas filhas de mães controles (FCont) e mães diabéticas (FMod) submetidas à dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DHL).

Dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão ($n=5$ ratas/grupo; $n=50$ ilhotas/grupo nos grupos FContDP, FContDHL FModDHL e $n=47$ ilhotas/grupo no grupo FModDP para insulina; $n=50$ ilhotas/grupo nos grupos FContDP e FModDHL, $n=46$ ilhotas/grupo no grupo FContDHL e $n=47$ ilhotas/grupo no grupo FModDP para glucagon; $n=50$ ilhotas/grupo nos grupos FContDP, FContDHL e FModDHL e $n=46$ ilhotas/grupo no grupo FModDP para somatostatina).

* $p<0,05$ - comparado ao grupo FContDP, # $p<0,05$ – comparado ao grupo FContDHL, \$ $p<0,05$ - comparado ao grupo FModDP (Teste de Distribuição Gama seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Wald).

4.2 – Área sob a curva (AUC) obtida das medidas glicêmicas dos testes orais de tolerância à glicose (TOTG)

Houve um aumento progressivo nas concentrações de glicose circulante nos grupos FContDHL, FModDP e FModDHL em relação ao grupo FContDP, sendo mais exacerbada no grupo FModDHL em relação aos demais grupos durante os 120 min percorridos do teste (Figura 11).

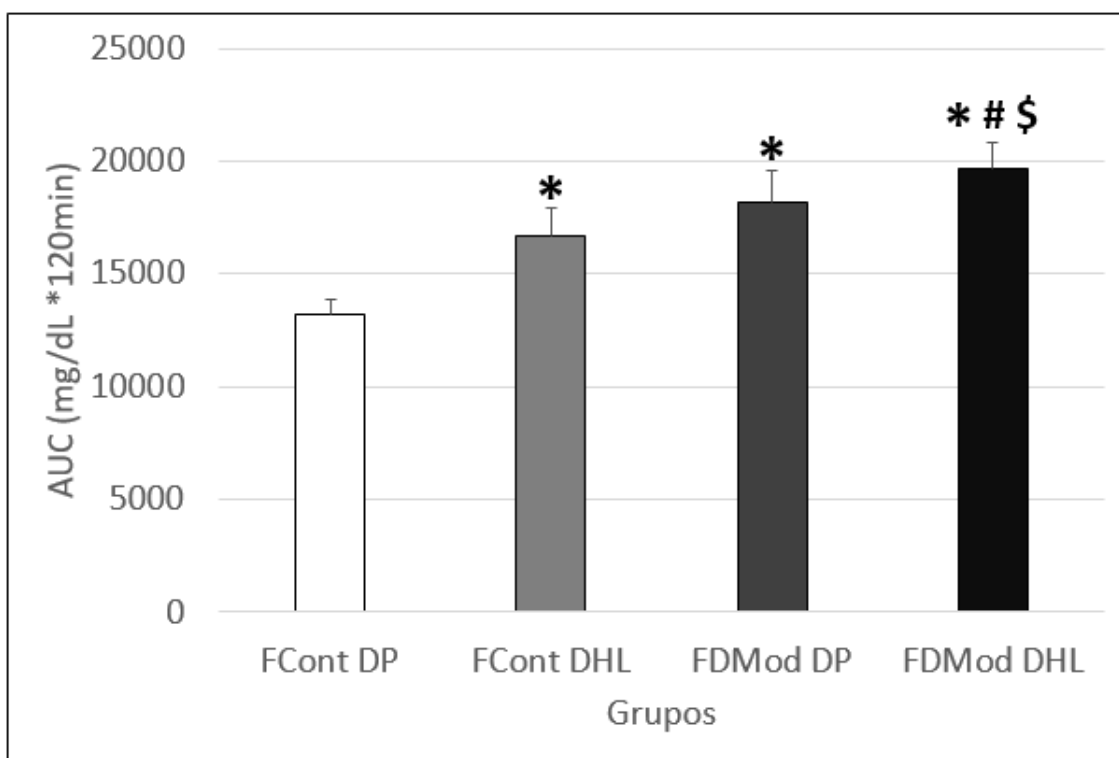


Figura 11. Área sob a curva (AUC) de ratas filhas de mães controles (FCont) e mães diabéticas (FMod) submetidas à dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DHL).

Dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10 ratas/grupo).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo FContDP, # $p < 0,05$ - comparado ao grupo FContDHL, \$ $p < 0,05$ - comparado ao grupo FModDP (Teste de Distribuição Gama seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Wald).

4.3 – Análise de correlação entre as diferentes variáveis do estudo

O teste de correlação de Pearson mostrou uma correlação positiva entre a proporção de células imunomarcadas para caspase-3 clivada e a de receptor de leptina ($r=0,32$, $p=0,0154$). Houve correlação negativa entre a razão de Ki-67 e a do receptor de leptina ($r= -0,32$, $p<0,001$). A proporção de células imunomarcadas para Ki-67 apresentou correlação negativa com a de somatostatina ($r= -0,33$, $p=0,0143$). Foi verificado uma correlação positiva ($r=0,42$, $p=0,0003$) entre glucagon e somatostatina nas análises de imunoistoquímica.

Discussão

5 – DISCUSSÃO

Para avaliar a existência de paralelismo entre a situação humana atual com as repercussões do diabetes intergeracional e o consumo de dieta rica em gorduras, este estudo analisou a estrutura morfológica das ilhotas pancreáticas de descendentes adultas de ratas com e sem diabetes. Nosso estudo, apresenta achados inéditos sobre a associação entre a exposição à hiperglicemia materna durante a fase intrauterina e o consumo de dieta hiperlipídica após o desmame, considerando a avaliação integrada dos três principais hormônios endócrino-pancreáticos, o balanço entre morte e proliferação celular, o metabolismo da glicose e a relação com o receptor de leptina em descendentes fêmeas em idade adulta. Foram verificadas alterações morfofisiológicas nas ilhotas pancreáticas após o primeiro insulto (hiperglicemia intrauterina) e/ou após o segundo (dieta hiperlipídica). Entretanto, estas mudanças não foram suficientes para levar à normoglicemia nestas descendentes. Isto sugere que descendentes expostas a um ambiente intrauterino inadequado podem desenvolver distúrbios metabólicos na vida adulta, como a intolerância à glicose, que pode perpetuar como um ciclo vicioso de doenças metabólicas por diferentes gerações (TOZOUR *et al.*, 2020).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o ambiente intrauterino hiperglicêmico prejudicou o desenvolvimento embriofetal de descendentes de ratas desde a fase de pré-implantação do embrião devido a um quadro de estresse oxidativo materno e disfunções do metabolismo da glicose (BUENO *et al.*, 2020), utilizando o mesmo modelo experimental para indução do diabetes nas ratas-mães. Além disso, outro grupo de ratas diabéticas, analisadas ao final da prenhez, tiveram recém-nascidos com concentrações anormais dos hormônios pancreáticos, como a diminuição dos níveis circulantes de glucagon e somatostatina, indicando o início do comprometimento da homeostase da glicose (IESSI *et al.*, 2016). Já no 10º dia de vida, os neonatos também apresentaram diminuição na concentração sérica de somatostatina similarmente ao dia do nascimento, enquanto que os níveis de glucagon circulante foram aumentados para os mesmos níveis do grupo controle (IESSI *et al.*, 2016). Os descendentes de ratas diabéticas avaliados na idade adulta (120 dias de vida) apresentaram hiperlipidemia, que leva à lipotoxicidade das células endócrinas pancreáticas, podendo estar relacionada com o comprometimento da secreção

de insulina pelas células β -pancreáticas. Associado à disfunção das células beta-pancreática, estas descendentes adultas apresentaram resistência à insulina (PAULA *et al.*, 2021b). Portanto, todas estas alterações, desde o período de pré-implantação até a vida adulta, são cruciais para o estabelecimento da intolerância à glicose nas descendentes adultas de ratas diabéticas.

Visando compreender melhor estas alterações que levam a um metabolismo de glicose comprometido, o presente estudo foi realizado utilizando amostras do pâncreas endócrino de descendentes fêmeas expostas à hiperglicemia materna e ao consumo de dieta hiperlipídica pós-natal. Não houve alteração na área das ilhotas pancreáticas entre os grupos experimentais. Este achado é controverso na literatura, pois um estudo realizado por Li *et al.* (2020) mostrou que camundongos machos que consumiram uma dieta hiperlipídica por oito semanas apresentaram aumento na área das ilhotas pancreáticas devido a uma adaptação compensatória frente à administração de DHL. Já outro estudo mostrou que ratos machos recém-nascidos e descendentes de diabéticas apresentaram aumento na área das ilhotas pancreáticas (AGARWAL *et al.*, 2019). Entretanto, esta adaptação não se manteve quando estes descendentes de diabéticas atingiram a vida adulta (15 semanas de vida), visto que não foram observadas alterações no número e área das ilhotas pancreáticas (AGARWAL *et al.*, 2019), o que corrobora nosso achado.

Com relação ao aumento da porcentagem de células imunomarcadas para insulina nos descendentes de diabéticas (FModDP e FModDHL), sugere-se que este aumento do número de células que sintetizam e secretam este hormônio pelas células β -pancreáticas seja uma resposta ao estado de resistência à insulina (RI), que foi confirmada pelo aumento do índice TyG (marcador de RI) anteriormente por Paula *et al.* (2021b). Portanto, se a insulina é um hormônio não-atuante nos tecidos periféricos ou se estes tecidos não a reconhecem, a RI é deflagrada. Saullo *et al.* (2021) verificaram que os animais do grupo FContDHL apresentaram maior quantidade de células adiposas grandes. Células adiposas hipertrofiadas sintetizam e secretam maiores quantidades de adipocinas pró-inflamatórias (ROSENBAUM & LEIBEL, 2014), relacionadas ao quadro de resistência à insulina, caracterizado pela ineficiência da ação da insulina nos tecidos-alvo (PETERSEN & SHULMAN, 2018), podendo levar a comorbidades na prole.

As células α -pancreáticas são responsáveis por sintetizar e secretar o glucagon que, por sua vez, aumenta a concentração de glicose no sangue (RÖDER *et al.*, 2016). A preservação da porcentagem de células e da intensidade de imunomarcacão para glucagon no grupo FContDHL, observada em nosso estudo, sugere que o consumo de dieta rica em gordura não foi capaz de induzir alteracão na imunomarcacão para glucagon nestes animais nesta fase da vida nas condições experimentais empregadas. Não há relatos na literatura sobre a imunomarcacão para glucagon em animais alimentados somente com dieta hiperlipídica, o que tornam inéditos os achados de nosso estudo. Entretanto, estudo conduzido em camundongos e ratos adultos submetidos a uma dieta *high-fat/high-sucrose* (dieta composta por 70% de gordura e 14% sacarose por 12 semanas) não mostrou diferenças no número e distribuicão de células imunomarcadas para glucagon (KURITA *et al.*, 2019). Em outro estudo, não houve alteracão da razão de células α -pancreáticas após administracão de uma dieta composta por 45% de gordura e 17% de sacarose por 12 semanas (AGARWAL *et al.*, 2019).

Descendentes machos nascidos de mães diabéticas e submetidos à dieta padrão não apresentaram alteracão na fração de células α -pancreáticas na vida adulta, o que corrobora nossos resultados do grupo FModDP em relacão à porcentagem de células imunomarcadas para glucagon (AGARWAL *et al.*, 2019). Entretanto, estudos mais específicos são necessários para explorar como a exposicão a um ambiente intrauterino hiperglicêmico pode alterar a intensidade de marcação para este hormônio na fase adulta destas descendentes.

As descendentes FModDHL apresentaram aumento na porcentagem de células e intensidade de marcação para glucagon. Pelo fato de ser um hormônio hiperglicemiante (RÖDER *et al.*, 2016), a síntese elevada de glucagon, evidenciada pelo aumento da intensidade de marcação, contribuiu para uma glicemia elevada nestes animais. Além disso, Paula *et al.* (2021b) observaram que descendentes adultas nascidas de ratas diabéticas e que foram submetidas à dieta hiperlipídica após o desmame também apresentaram diminuicão do índice HOMA- β e da secreção de insulina. Nossos achados mostram que o grupo FModDHL apresentou um aumento na porcentagem de células marcadas para insulina nas ilhotas pancreáticas, o que sugere que a disfunção das células β -

pancreáticas neste grupo se deve a uma secreção de insulina comprometida. Portanto, a diminuição da secreção de insulina associada ao aumento da síntese de glucagon é determinante para que haja uma glicemia ainda mais acentuada nestes animais.

O balanço preciso das funções da tríade endócrino-hormonal no pâncreas regula a glicemia e o metabolismo energético. A somatostatina sintetizada e secretada pelas células δ -pancreáticas e outros tecidos têm chamado bastante a atenção por ser responsável por inibir a secreção de insulina e glucagon visando a manutenção da homeostase da glicose (RORSMAN & HUISING, 2018). Em nosso estudo, foi verificada a diminuição da porcentagem de células imunomarcadas e intensidade de marcação para somatostatina nos grupos FContDHL e FModDP, mostrando comprometimento da atividade hormonal destas células. Este achado corrobora os resultados contrários de porcentagem de imunomarcação para insulina nestes animais.

Além disso, foi verificada, neste estudo, uma correlação negativa entre a proporção de células imunomarcadas para somatostatina e a marcação de Ki-67 para análise da proliferação das células δ -pancreáticas. Foi encontrado que, à medida que a proporção destas células marcadas diminui nos grupos FContDHL e FModDP, há aumento das taxas de divisão celular nas outras células, possivelmente das células β , pela diminuição da influência inibitória da somatostatina sobre as células β -pancreáticas (RORSMAN & HUISING, 2018). Este dado favorece a compreensão para o aumento da imunomarcação de insulina, da presença de RI e intolerância à glicose nestes animais. Um estudo realizado em camundongos fêmeas adultas (16-18 semanas de vida), submetidas a uma dieta hiperlipídica (60% de gordura), mostrou que não houve alterações na concentração de somatostatina nas ilhotas pancreáticas (determinada por radioimunoensaio) e nem no número de células imunomarcadas para somatostatina (KELLARD *et al.*, 2020). Por outro lado, foi observada uma diminuição na secreção de somatostatina em ilhotas isoladas nestes camundongos fêmeas submetidas à DHL (KELLARD *et al.*, 2020), o que corrobora a ideia de que o consumo de uma dieta rica em gorduras contribui para a disfunção das células δ -pancreáticas.

Estudos envolvendo dieta hiperlipídica e/ou ambiente intrauterino materno para determinação de somatostatina ainda são escassos na literatura, o que torna este estudo inédito e relevante quanto à avaliação da imunomarcação para a tríade nas ilhotas pancreáticas de ratas adultas prejudicadas pelos dois tipos de insultos aplicados (hiperglicemia materna e consumo de DHL pós-natal).

O balanço entre proliferação e morte das células das ilhotas pancreáticas é essencial para a manutenção da homeostase, dentre elas da glicose. Entretanto, o consumo de uma dieta rica em gorduras pode comprometer este equilíbrio (AHRÉN *et al.*, 2010). Foi observado que as ratas dos grupos FContDHL e FModDHL apresentaram uma disfunção entre proliferação e morte de células endócrino-pancreáticas, evidenciado pela razão entre as imunomarcações para caspase-3 clivada e Ki-67 em cada grupo. O excesso de ácidos graxos livres circulantes, devido ao aumento do consumo de gordura, pode se acumular em órgãos como o pâncreas pelo fato do tecido adiposo estar sobrecarregado (PAULA *et al.*, 2021b). O acúmulo de gotículas de gordura no tecido pancreático, tanto na porção endócrina quanto na exócrina, foi observado no grupo FContDHL, o que dificultou as análises imunoistoquímicas para os marcadores de morte e de proliferação celular. Além disso, a literatura mostra que este aumento nos níveis de ácidos graxos livres no pâncreas estimula a produção de espécies reativas de oxigênio, causando uma disfunção progressiva das células β -pancreáticas, que compromete a secreção de insulina e até a morte destas células (HABER *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 2010; YUAN *et al.*, 2013; FLISTER *et al.*, 2018). Considerando estes achados, sugere-se que o consumo da dieta hiperlipídica após o desmame, além de contribuir para a disfunção das células β -pancreáticas (favorecendo a intolerância à glicose) também podem aumentar a taxa de apoptose nas células das ilhotas pancreáticas de descendentes fêmeas.

Ao contrário do observado nos outros grupos, as descendentes de diabéticas (FModDP) apresentaram uma maior proliferação de células endócrinas do pâncreas através da razão entre as porcentagens de células imunomarcadas para caspase-3 clivada e Ki-67. Este achado sugere que descendentes expostas à hiperglicemia materna podem ser induzidas a uma maior taxa de proliferação celular na vida adulta a fim de atenuar, mas sem sucesso, a disfunção de células β -pancreáticas, resistência à insulina e

intolerância à glicose. Não há estudos na literatura que avaliem imunomarcações para caspase-3 clivada e Ki-67 em descendentes de diabéticas, seja com consumo de DHL ou não, o que torna os achados deste trabalho inéditos. Entretanto, Abdulwahab *et al.* (2021) realizaram um estudo em que ratas com diabetes induzido quimicamente por STZ apresentaram aumento na porcentagem de células imunomarcadas para caspase-3 por conta de um quadro de estresse oxidativo que, por sua vez, favoreceu a morte das células endócrino-pancreáticas, diferentemente do encontrado em nosso estudo.

Ao realizar uma comparação entre a área das ilhotas pancreáticas e a porcentagem das imunomarcações para caspase-3 clivada e Ki-67 nos grupos de descendentes que consumiram a DHL (FContDHL e FModDHL), pode-se notar que, mesmo com o favorecimento da morte das células endócrino-pancreáticas, houve a manutenção da área das ilhotas pancreáticas, o que sugere uma hipertrofia das células endócrinas do pâncreas. Este achado é corroborado pelo estudo de Gupta *et al.* (2017), em que camundongos machos alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas apresentaram um aumento do tamanho das células β -pancreáticas (hipertrofia). Considerando que também não houve diferença na área das ilhotas pancreáticas e um favorecimento da proliferação celular no grupo FModDP, sugere-se que as novas células endócrinas provenientes de replicação sejam menores nos descendentes de diabéticas que não consumiram uma dieta rica em gordura. Entretanto, ainda não existem relatos da literatura de que células endócrino-pancreáticas de ratas diabéticas ou de seus descendentes possam apresentar um tamanho reduzido associado a uma maior taxa de proliferação.

No presente estudo, foi observado que descendentes de diabéticas, independentemente da dieta administrada, apresentaram menor imunomarcação de células para receptor de leptina. Esta adipocina é um hormônio que possui papel fundamental na homeostase da glicose, pois age diretamente nas células β -pancreáticas inibindo a síntese e secreção de insulina (MARROQUÍ *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2021). As análises de correlação mostraram uma correlação positiva entre as imunomarcações para caspase-3 clivada e receptor de leptina e uma correlação negativa entre a porcentagem de células imunomarcadas para Ki-67 e receptor de leptina, achados que sustentam a diminuição da imunomarcação para este receptor nas ilhotas pancreáticas.

Considerando estes achados, sugere-se que a diminuição da ação da leptina nas ilhotas pancreáticas pode contribuir para o aumento da porcentagem de células imunomarcadas para insulina nos grupos FModDP e FModDHL. Já quando as descendentes de diabéticas são expostas a uma dieta rica em gordura, há um aumento no peso total de gordura corporal (SAULLO *et al.*, 2021), que por sua vez contribui para o aumento da concentração de leptina plasmática (HARRIS, 2014). Estudos mostram que a hiperleptinemia pode levar à resistência à insulina (PEREIRA *et al.*, 2021), também observado pelo aumento do índice TyG no grupo FModDHL em estudo realizado em nosso laboratório (PAULA *et al.*, 2021b), favorecendo o quadro de intolerância à glicose nestas descendentes. Entretanto, não há evidências na literatura de que níveis aumentados de leptina sérica pode induzir a diminuição da expressão de seus receptores nas ilhotas pancreáticas, sendo necessárias futuras investigações para avaliar esta relação.

Frente aos nossos achados, pode-se observar que os grupos FContDHL, FModDP e FModDHL apresentam resistência à insulina e disfunção das células β -pancreáticas. Como consequência destas alterações, há o desenvolvimento da intolerância à glicose nestas descendentes, sendo mais acentuada no grupo FModDHL devido ao aumento da síntese do hormônio glucagon. Em resposta a estas alterações metabólicas, há o aumento da porcentagem de células que sintetizam e secretam insulina nestes animais na tentativa de mitigar estas disfunções do metabolismo da glicose. O aumento da porcentagem de células imunomarcadas para insulina dos grupos FContDHL e FModDP é favorecido pela diminuição da síntese de somatostatina (diminuição da intensidade de marcação) e pela diminuição de receptores de leptina nos grupos FModDP e FModDHL. Portanto, estas adaptações no pâncreas endócrino, em resposta às alterações metabólicas, não são capazes de reduzir a glicemia em animais expostos a um ambiente intrauterino hiperglicêmico e/ou consumo de DHL pós-natal por conta do comprometimento dos mecanismos de contra regulação para a manutenção da homeostase da glicose.

Nesta investigação, foram evidenciados resultados favoráveis para o entendimento da programação fetal advinda da associação do insulto materno (diabete) e pós-natal (DHL), mas há limitações que devem ser mencionadas. Este estudo carece de um ensaio mais específico em ilhotas pancreáticas

isoladas para avaliação da secreção da tríade hormonal endócrino-pancreática em diferentes concentrações de glicose e da quantidade de hormônios presente nas ilhotas. Outra limitação é a ausência da realização de duplas marcações para os hormônios endócrino-pancreáticos para verificar se as células das ilhotas pancreáticas poderiam estar sintetizando mais de um hormônio concomitantemente, o que traria contribuições para a discussão das adaptações das ilhotas pancreáticas nestas descendentes. Além disso, as dosagens séricas e em homogenato de pâncreas dos hormônios insulina, glucagon, somatostatina, leptina, resistina e adiponectina contribuiriam para uma discussão mais integrada dos resultados em relação às vias ligadas à resistência à insulina.

Conclusão

6 - CONCLUSÃO

Portanto, a associação entre diabetes materno e/ou administração de dieta hiperlipídica promove alterações na relação entre a tríade hormonal pancreática e receptores de leptina no pâncreas endócrino de descendentes na vida adulta. Por sua vez, estas alterações nas ilhotas pancreáticas não são capazes de causar a diminuição na glicemia da prole, contribuindo para o desenvolvimento de intolerância à glicose na vida adulta, mostrando a necessidade de um controle glicêmico antes da prenhez e o oferecimento de uma dieta balanceada para os descendentes.

Referências Bibliográficas

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulwahab DA, El-Missiry MA, Shabana S, Othman AI, Amer ME. Melatonin protects the heart and pancreas by improving glucose homeostasis, oxidative stress, inflammation and apoptosis in T2DM-induced rats. *Heliyon*. 2021;7(3):e06474. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06474.
- Agarwal P, Brar N, Morriseau TS, Kereliuk SM, Fonseca MA, Cole LK, Jha A, Xiang B, Hunt KL, Seshadri N, Hatch GM, Doucette CA, Dolinsky VW. Gestational Diabetes Adversely Affects Pancreatic Islet Architecture and Function in the Male Rat Offspring. *Endocrinology*. 2019;160(8):1907-1925. doi: 10.1210/en.2019-00232.
- Ahrén J, Ahrén B, Wierup N. Increased β -cell volume in mice fed a high-fat diet: a dynamic study over 12 months. *Islets*. 2010;2(6):353-356. doi: 10.4161/isl.2.6.13619.
- American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2021;44(Suppl. 1):S152-S33.
- Anubhuti, Arora S. Leptin and its metabolic interactions: an update. *Diabetes Obes Metab*. 2008;10(11):973-993. doi: 10.1111/j.1463-1326.2008.00852.x.
- Aref AB, Ahmed OM, Ali LA, Semmler M. Maternal rat diabetes mellitus deleteriously affects insulin sensitivity and Beta-cell function in the offspring. *J Diabetes Res*. 2013;2013:429154. doi: 10.1155/2013/429154.
- Barazzoni R, Gortan Cappellari G, Ragni M, Nisoli E. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eat Weight Disord*. 2018;23(2):149-157. doi: 10.1007/s40519-018-0481-6.
- Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2001;8(2):113-126. doi: 10.1038/sj.cdd.4400823.
- Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med*. 2007;261(5):412-417. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x.
- Bernard A, Chevrier S, Beltjens F, Dosset M, Viltard E, Lagrange A, Derangère V, Oudot A, Ghiringhelli F, Collin B, Apetoh L, Feron O, Chen S, Arnould L, Végran F, Boidot R. Cleaved Caspase-3 Transcriptionally Regulates Angiogenesis-Promoting Chemotherapy Resistance. *Cancer Res*. 2019;79(23):5958-5970. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0840.
- Bonner-Weir S, Aguayo-Mazzucato C, Weir GC. Dynamic development of the pancreas from birth to adulthood. *Ups J Med Sci*. 2016;121(2):155-158. doi: 10.3109/03009734.2016.1154906.
- Bueno A, Sinzato YK, Volpato GT, Gallego FQ, Perecin F, Rodrigues T, Damasceno DC. Severity of prepregnancy diabetes on the fetal malformations and viability

- associated with early embryos in rats†. *Biol Reprod.* 2020;103(5):938-950. doi: 10.1093/biolre/ioaa151.
- Burlina S, Dalfrà MG, Lapolla A. Short- and long-term consequences for offspring exposed to maternal diabetes: a review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019;32(4):687-694. doi: 10.1080/14767058.2017.1387893.
- Cerf ME, Williams K, Chapman CS, Louw J. Compromised beta-cell development and beta-cell dysfunction in weanling offspring from dams maintained on a high-fat diet during gestation. *Pancreas.* 2007;34(3):347-353. doi: 10.1097/MPA.0b013e31802ee9ae.
- Cerf ME. High Fat Programming and Cardiovascular Disease. *Medicina (Kaunas).* 2018;54(5):86. doi: 10.3390/medicina54050086.
- Cordner ZA, Tamashiro KL. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiol Behav.* 2015;152(Pt B):363-371. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.06.008.
- Covey SD, Wideman RD, McDonald C, Unniappan S, Huynh F, Asadi A, Speck M, Webber T, Chua SC, Kieffer TJ. The pancreatic beta cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. *Cell Metab.* 2006;4(4):291-302. doi: 10.1016/j.cmet.2006.09.005.
- Desai M, Jellyman JK, Han G, Beall M, Lane RH, Ross MG. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;211(3):237.e1-237.e13. doi: 10.1016/j.ajog.2014.03.025.
- Després JP, Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 2006;14;444(7121):881-887. doi: 10.1038/nature05488.
- Diabetes. World Health Organization, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>. Acesso em: 15 de abr. 2021.
- Dolenšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets.* 2015;7(1):e1024405. doi: 10.1080/19382014.2015.1024405.
- Dunning BE, Gerich JE. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2007;28(3):253-283. doi: 10.1210/er.2006-0026.
- Ferron A, Francisqueti FV, Minatel IO, Silva C, Bazan S, Kitawara K, Garcia JL, Corrêa CR, Moreto F, Ferreira A. Association between cardiac remodeling and metabolic alteration in an experimental model of obesity induced by western diet. *Nutrients.* 2018;10(11):1675. doi:10.3390/nu10111675.
- Flister KFT, Pinto BAS, França LM, Coêlho CFF, Dos Santos PC, Vale CC, Kajihara D, Debbas V, Laurindo FRM, Paes AMA. Long-term exposure to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and

- potentiates de novo lipogenesis in weaned male mice. *J Nutr Biochem*. 2018;62:155-166. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.09.007.
- Francisqueti FV, Minatel IO, Ferron AJT, Bazan SGZ, Silva VDS, Garcia JL, de Campos DHS, Ferreira AL, Moreto F, Cicogna AC, Corrêa CR. Effect of Gamma-Oryzanol as Therapeutic Agent to Prevent Cardiorenal Metabolic Syndrome in Animals Submitted to High Sugar-Fat Diet. *Nutrients*. 2017;9(12):1299. doi: 10.3390/nu9121299.
- Gallego FQ, Miranda CA, Sinzato YK, Iessi IL, Dallaqua B, Pando RH, Rocha NS, Volpato GT, Damasceno DC. Temporal analysis of distribution pattern of islet cells and antioxidant enzymes for diabetes onset in postnatal critical development window in rats. *Life Sci*. 2019;226:57-67. doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.061
- Gallego FQ, Sinzato YK, Miranda CA, Iessi IL, Dallaqua B, Volpato GT, Scarano WR, SanMartín S, Damasceno DC. Pancreatic islet response to diabetes during pregnancy in rats. *Life Sci*. 2018;214:1-10. doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.046.
- Gambineri A, Vicennati V, Genghini S, Tomassoni F, Pagotto U, Pasquali R, Walker BR. Genetic variation in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 predicts adrenal hyperandrogenism among lean women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2295-2302. doi: 10.1210/jc.2005-2222.
- Gao R, Yang T, Zhang Q. δ -Cells: The Neighborhood Watch in the Islet Community. *Biology (Basel)*. 2021;10(2):74. doi: 10.3390/biology10020074.
- Gawlińska K, Gawliński D, Filip M, Przegaliński E. Relationship of maternal high-fat diet during pregnancy and lactation to offspring health. *Nutr Rev*. 2021;79(6):709-725. doi: 10.1093/nutrit/nuaa020.
- Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica [Laboratorial evaluation and diagnosis of insulin resistance]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(2):208-215. Portuguese. doi: 10.1590/s0004-27302006000200007.
- Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T. A conceptual framework for the developmental origins of health and disease. *J Dev Orig Health Dis*. 2010;1(1):6-18. doi: 10.1017/S2040174409990171.
- Gluckman PD, Hanson MA. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2004;9(5):419-425. doi: 10.1016/j.siny.2004.03.001.
- Gniuli D, Dalla Libera L, Caristo ME, Calvani R, Castagneto M, Mingrone G. High saturated-fat diet induces apoptosis in rat enterocytes and blunts GIP and insulin-secretive response to oral glucose load. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(5):871-874. doi: 10.1038/ijo.2008.9.

- Graefe C, Eichhorn L, Wurst P, Kleiner J, Heine A, Panetas I, Abdulla Z, Hoeft A, Frede S, Kurts C, Endl E, Weisheit CK. Optimized Ki-67 staining in murine cells: a tool to determine cell proliferation. *Mol Biol Rep.* 2019;46(4):4631-4643. doi: 10.1007/s11033-019-04851-2.
- Gupta D, Jetton TL, LaRock K, Monga N, Satish B, Lausier J, Peshavaria M, Leahy JL. Temporal characterization of β cell-adaptive and -maladaptive mechanisms during chronic high-fat feeding in C57BL/6NTac mice. *J Biol Chem.* 2017;292(30):12449-12459. doi: 10.1074/jbc.M117.781047.
- Haber EP, Curi R, Carvalho CR, Carpinelli AR. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2001; 45:219–227. doi: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302001000300003>.
- Hanson MA, Gluckman PD. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiol Rev.* 2014;94(4):1027-1076. doi: 10.1152/physrev.00029.2013.
- Harris RB. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(3):414-423. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.05.009.
- Iessi IL, Sinzato YK, Gallego FQ, Nielsen JH, Damasceno DC. Effect of Diabetes on Circulating Pancreatic Hormones in Pregnant Rats and Their Offspring. *Horm Metab Res.* 2016;48(10):682-686. doi: 10.1055/s-0042-114039.
- Keith SW, Redden DT, Katzmarzyk PT, Boggiano MM, Hanlon EC, Benca RM, Ruden D, Pietrobelli A, Barger JL, Fontaine KR, Wang C, Aronne LJ, Wright SM, Baskin M, Dhurandhar NV, Lijoi MC, Grilo CM, DeLuca M, Westfall AO, Allison DB. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obes (Lond).* 2006;30(11):1585-1594. doi: 10.1038/sj.ijo.0803326.
- Kellard JA, Rorsman NJG, Hill TG, Armour SL, van de Bunt M, Rorsman P, Knudsen JG, Briant LJB. Reduced somatostatin signalling leads to hypersecretion of glucagon in mice fed a high-fat diet. *Mol Metab.* 2020;40:101021. doi: 10.1016/j.molmet.2020.101021.
- Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, Takaku M, Takeno MA, Rudge MV, Damasceno DC. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr.* 2009;1(1):21. doi: 10.1186/1758-5996-1-21.
- Kurita Y, Ohki T, Soejima E, Yuan X, Kakino S, Wada N, Hashinaga T, Nakayama H, Tani J, Tajiri Y, Hiromatsu Y, Yamada K, Nomura M. A High-Fat/High-Sucrose Diet Induces WNT4 Expression in Mouse Pancreatic β -cells. *Kurume Med J.* 2019;65(2):55-62. doi: 10.2739/kurumemedj.MS652008.

- Lalanza JF, Snoeren EMS. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021;122:92-119. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.11.003.
- Li H, Park HM, Ji HS, Han J, Kim SK, Park HY, Jeong TS. Phenolic-enriched blueberry-leaf extract attenuates glucose homeostasis, pancreatic β -cell function, and insulin sensitivity in high-fat diet-induced diabetic mice. *Nutr Res.* 2020;73:83-96. doi: 10.1016/j.nutres.2019.09.005.
- López-Soldado I, Herrera E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Exp Diabetes Res.* 2003;4(2):107-118. doi: 10.1155/EDR.2003.107.
- Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(11):1407-1433. doi: 10.1038/sj.ijo.0802142.
- Márquez-Aguirre AL, Canales-Aguirre AA, Padilla-Camberos E, Esquivel-Solis H, Díaz-Martínez NE. Development of the endocrine pancreas and novel strategies for β -cell mass restoration and diabetes therapy. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(9):765-776. doi: 10.1590/1414-431X20154363.
- Marroquí L, Gonzalez A, Neco P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Ripoll C, Nadal A, Quesada I. Role of leptin in the pancreatic β -cell: effects and signaling pathways. *J Mol Endocrinol.* 2012;49(1):R9-17. doi: 10.1530/JME-12-0025.
- Moraes-Souza RQ, Vesentini G, Paula VG, Sinzato YK, Soares TS, Gelaleti RB, Volpato GT, Damasceno DC. Oxidative Stress Profile of Mothers and Their Offspring after Maternal Consumption of High-Fat Diet in Rodents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2021;1-18. doi: 10.1155/2021/9073859.
- Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT, Kulkarni RN. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest.* 2007;117(10):2860-2868. doi: 10.1172/JCI30910.
- Niswender KD, Schwartz MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol.* 2003;24(1):1-10. doi: 10.1016/s0091-3022(02)00105-x.
- Ogane N, Yasuda M, Kato H, Kato T, Yano M, Kameda Y, Kamoshida S. Cleaved caspase-3 expression is a potential prognostic factor for endometrial cancer with positive peritoneal cytology. *Cytopathology.* 2018;29(3):254-261. doi: 10.1111/cyt.12550.

- Paula VG, Sinzato YK, Moraes-Souza RQ, Soares TS, Souza FQG, Karki B, Andrade Paes AM, Corrente JE, Damasceno DC, Volpato GT. Metabolic changes in female rats exposed to intrauterine Hyperglycemia and post-weaning consumption of high-fat diet. *Biol Reprod.* 2021b: ioab195. doi: 10.1093/biolre/ioab195.
- Paula VG, Vesentini G, Sinzato YK, Moraes-Souza RQ, Volpato GT, Damasceno DC. Intergenerational high-fat diet impairs ovarian follicular development in rodents: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev.* 2021a: nuab049. doi: 10.1093/nutrit/nuab049.
- Pereira S, Cline DL, Glavas MM, Covey SD, Kieffer TJ. Tissue-Specific Effects of Leptin on Glucose and Lipid Metabolism. *Endocr Rev.* 2021;42(1):1-28. doi: 10.1210/endrev/bnaa027.
- Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 2018;98(4):2133-2223. doi: 10.1152/physrev.00063.2017.
- Poon RY. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. *Methods Mol Biol.* 2016;1342:3-19. doi: 10.1007/978-1-4939-2957-3_1.
- Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol.* 2008;199(1):5-19. doi: 10.1677/JOE-08-0290.
- Rabadán-Diehl C, Nathanielsz P. From Mice to Men: research models of developmental programming. *J Dev Orig Health Dis.* 2013;4(1):3-9. doi: 10.1017/S2040174412000487.
- Rinaudo P, Wang E. Fetal programming and metabolic syndrome. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:107-130. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153245.
- Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med.* 2016;48(3):e219. doi: 10.1038/emm.2016.6.
- Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat Commun.* 2017;8:14128. doi: 10.1038/ncomms14128.
- Rorsman P, Huising MO. The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(7):404-414. doi: 10.1038/s41574-018-0020-6.
- Rosenbaum M, Leibel RL. 20 years of leptin: role of leptin in energy homeostasis in humans. *J Endocrinol.* 2014;223(1):T83-96. doi: 10.1530/JOE-14-0358.
- Roza NA, Possignolo LF, Palanch AC, Gontijo JA. Effect of long-term high-fat diet intake on peripheral insulin sensibility, blood pressure, and renal function in female rats. *Food Nutr Res.* 2016;60:28536. doi: 10.3402/fnr.v60.28536.

- Saullo CM, Sinzato YK, Paula VG, Gallego FQ, Corrente JE, Iessi IL, Volpato GT, Damasceno DC. Exposure to maternal hyperglycemia and high-fat diet consumption after weaning in rats: repercussions on periovarian adipose tissue. *J Dev Orig Health Dis.* 2021;1-8. doi: 10.1017/S2040174421000672.
- Sinzato YK, Klöppel E, Miranda CA, Paula VG, Alves LF, Nascimento LL, Campos AP, Karki B, Hampl V, Volpato GT, Damasceno DC. Comparison of streptozotocin-induced diabetes at different moments of the life of female rats for translational studies. *Lab Anim.* 2021;55(4):329-340. doi: 10.1177/00236772211001895.
- Srinivasan M, Katewa SD, Palaniyappan A, Pandya JD, Patel MS. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(4):E792-799. doi: 10.1152/ajpendo.00078.2006
- Suzuki K. The developing world of DOHaD. *J Dev Orig Health Dis.* 2018;9(3):266-269. doi: 10.1017/S2040174417000691.
- Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care.* 1994;17(2):152-154. doi: 10.2337/diacare.17.2.152.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):231-241. doi: 10.1038/nrm2312.
- Tozour J, Hughes F, Carrier A, Vieau D, Delahaye F. Prenatal Hyperglycemia Exposure and Cellular Stress, a Sugar-Coated View of Early Programming of Metabolic Diseases. *Biomolecules.* 2020;10(10):1359. doi: 10.3390/biom10101359.
- Wei D, Li J, Shen M, Jia W, Chen N, Chen T, Su D, Tian H, Zheng S, Dai Y, Zhao A. Cellular production of n-3 PUFAs and reduction of n-6-to-n-3 ratios in the pancreatic beta-cells and islets enhance insulin secretion and confer protection against cytokine-induced cell death. *Diabetes.* 2010;59(2):471-478. doi: 10.2337/db09-0284.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-1808. doi: 10.1172/JCI19246.
- Yuan L, Li X, Li J, Li HL, Cheng SS. Effects of renin-angiotensin system blockade on the islet morphology and function in rats with long-term high-fat diet. *Acta Diabetol.* 2013;50(4):479-488. doi: 10.1007/s00592-010-0210-8.

Anexos

8 – ANEXOS

8.1 – Aprovação da CEUA - FMB/Unesp

Projeto de pesquisa “guarda-chuva”

		
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA	1963	Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1218/2017 -CEUA

Certificamos que a proposta intitulada: **“Avaliação de descendentes expostas ao diabetes moderado intraútero submetidas à dieta hiperlipídica no período pós-natal e tratadas com mistura de cálcio e vitamina D durante a prenhez”**, conduzida pela Pesquisadora Principal: **Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos**, com a colaboração de Gustavo Tadeu Volpato, Antônio Carlos Lalla, Arlindo Sérgio Gabriel, Carlos Roberto Gonçalves Lima, Danilo Chaguri, Franciane Quintanilha Gallego Souza, Marcos Rogério Pimentel, Raianne Queiroz de Moraes Souza, Thaígra de Sousa Soares, Verônyca Gonçalves Paula e Yuri Karen Sinzato, com o nº 1218/2017, **Subprojeto I : “Análise do perfil lipídico e estresse oxidativo de ratas expostas à hiperglicemia intraútero, dieta hiperlipídica no período pós-natal e tratadas com cálcio e vitamina D na prenhez”**, conduzido pela Pesquisadora: **Thaígra de Sousa Soares**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 27 de abril de 2017.

Inclusão do Subprojeto I – Aprovado em 12 de dezembro de 2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	29 de abril de 2019
Espécie/Linhagem/Raça	Rato Sprague Dawley
Nº de animais	412
Idade/Peso	4 a 400 gramas / Recém-nascidos e adulto
Sexo	Macho e Fêmea
Origem	Biotério Central da Unesp - Botucatu

Graziela Nogueira Bertani
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Prof. Ass. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.1608 e 3880.1609 E-mail Secretaria: ceua@fmb.unesp.br

8.2 Aprovação da inclusão do subprojeto (Mestrado de Vinícius S. Barco) e aprovação de seu nome, como colaborador pela CEUA, no projeto maior do grupo de pesquisa.



Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada pela Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

Ofício nº 025/2021 – CEUA – FMB/UNESP

Botucatu, 18 de dezembro de 2021.

Prezada Senhora,

Em atendimento ao documento enviado em 13 de dezembro de 2021, solicitando a inclusão do aluno e o Subprojeto referentes ao Projeto de Pesquisa **"AVALIAÇÃO DE DESCENDENTES EXPOSTAS AO DIABETE MODERADO INTRAUTERO, SUBMETIDAS À DIETA HIPERLIPÍDICA NO PERÍODO PÓS VITAMINA D DURANTE A PRENHEZ"** (Protocolo CEUA 1218/2017), considera **APROVADA** a solicitação com **Ad Referendum**.

Adicionalmente a aprovação da solicitação a CEUA não prevê a inclusão de nenhum animal adicional aos já solicitados no projeto de pesquisa **1218/2017**.

Aluno

Vinícius soares barco

Subprojeto

"Relação entre os hormônios endócrino-pancreáticos e leptina nas células das ilhotas pancreáticas de ratas adultas submetidas à dieta hiperlipídica advindas de mães diabéticas"

Atenciosamente,

Profa. Associada. Bertha Furlan Polegato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Ilustríssima Senhora

Profa. Débora Cristina Damasceno
Faculdade de Medicina de Botucatu

8.3 Fotomicrografias dos controles-negativos das amostras de ilhotas pancreáticas referentes aos marcadores utilizados neste estudo.

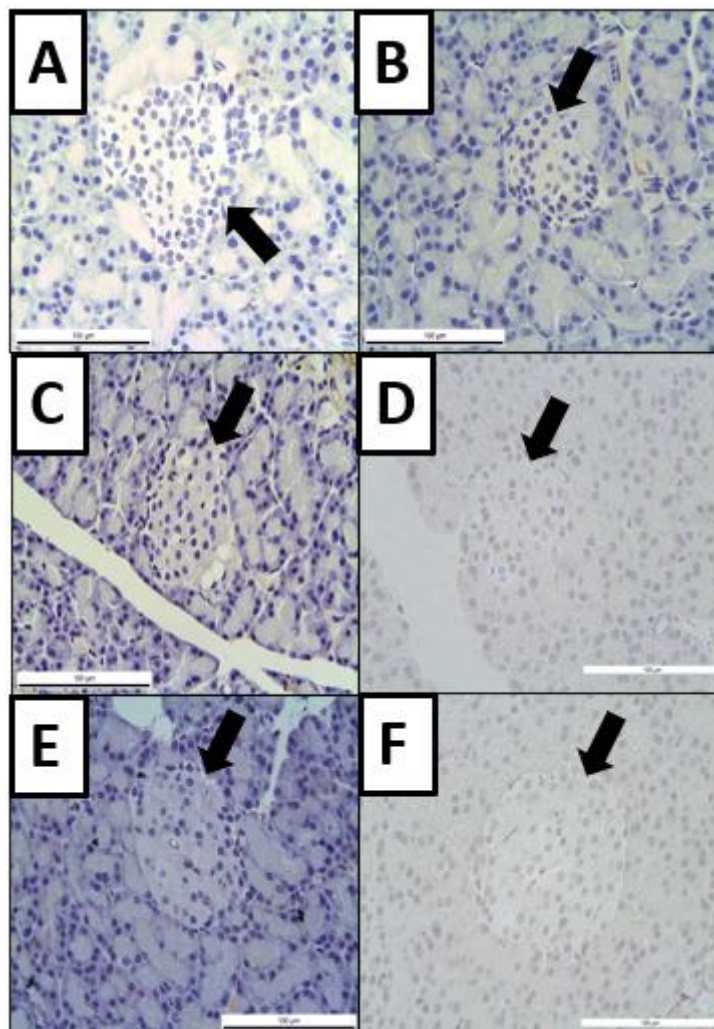


Figura 12. Controle negativo das imunomarcações usando anticorpos: **(A)** Anti-Insulina; **(B)** Anti-glucagon; **(C)** Anti-somatostatina; **(D)** Anti-Ki-67; **(E)** Anti-Caspase-3 clivada e **(F)** Anti-receptor de leptina. A seta preta em cada fotomicrografia destaca as ilhotas pancreáticas. Aumento de 40x.

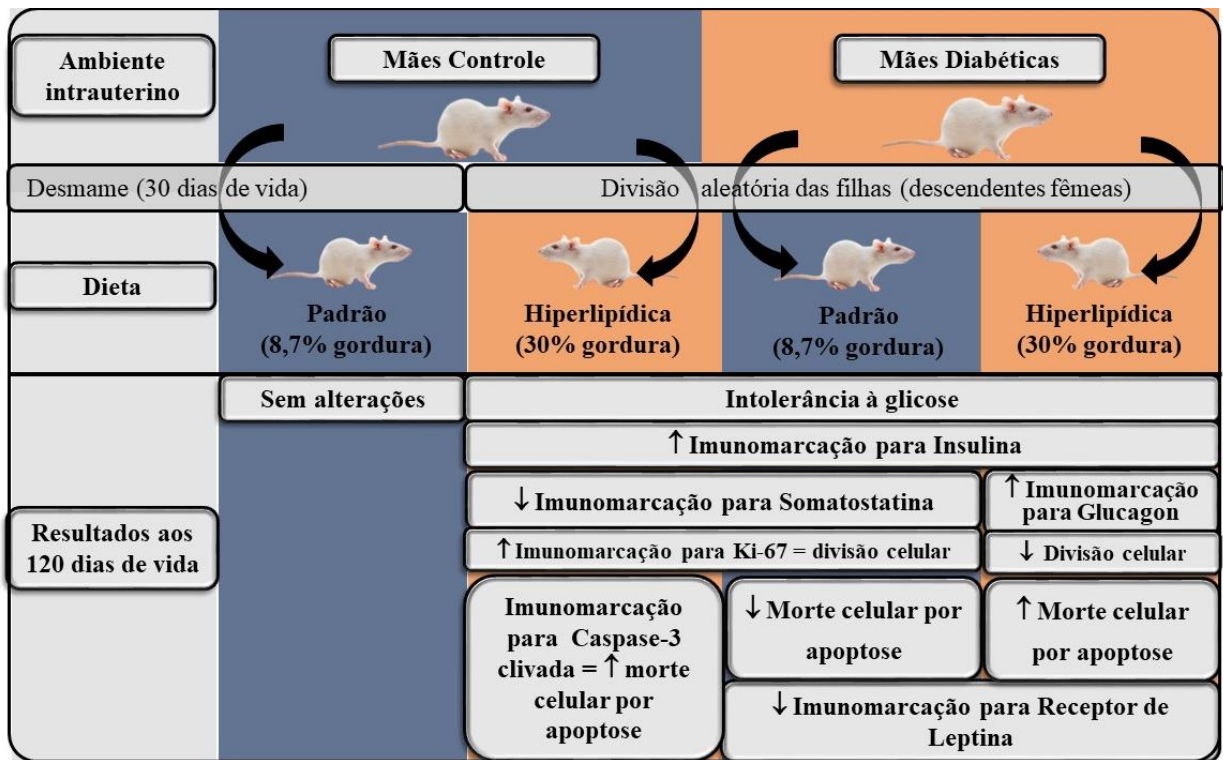


Figura 13. Gráfico resumido de todos os resultados obtidos de descendentes de ratas diabéticas e não-diabéticas e que foram expostas à dieta hiperlipídica do desmame até a vida adulta (120 dias de vida), mostrando que as ratas expostas apenas ao insulto da hiperglicemia materna apresentou resistência à insulina, intolerância à glicose e maior proporção de células endócrino-pancreáticas em processo de morte por apoptose. As filhas com 120 dias de vida de ratas com diabetes moderado tiveram intolerância à glicose, resistência à insulina confirmada não só por alterações da tríade insulina, gluagon e somatostatina, mas também pela menor expressão do receptor de leptina. Já as descendentes adultas (120 dias de vida) expostas aos dois insultos (hiperglicemia materna e dieta inadequada pós-desmame) apresentaram alterações mais marcantes na síntese dos hormônios da tríade e repercussão mais pronunciada da menor síntese do receptor de leptina e da morte das células das ilhotas pancreáticas por apoptose do que com os insultos isolados, contribuindo para maior agravamento de doenças na vida adulta destes descendentes fêmeas. Isto reforça o quadro mais acentuado de intolerância à glicose destas ratas, tendendo para o aparecimento do diabetes.