

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Avaliação do perfil proteômico das ilhotas pancreáticas isoladas  
da prole submetida à restrição proteica materna: possíveis  
relações com o metabolismo**

**Ana Beatriz Leite Lorente**  
Discente

**Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Jr**  
Orientador

**Prof. Dra. Débora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos**  
Coorientadora

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Avaliação do perfil proteômico das ilhotas pancreáticas isoladas  
da prole submetida à restrição proteica materna: possíveis  
relações com o metabolismo**

**Ana Beatriz Leite Lorente**  
Discente

**Prof. Dr. Luís Antonio Justulin Jr**  
Orientador

**Prof. Dra. Débora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos**  
Coorientadora

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título  
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia  
Estrutural e Funcional.

**Orientador:** Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

**Botucatu - SP**  
**2025**

L868a	<p>Lorente, Ana Beathriz Leite</p> <p>Avaliação do perfil proteômico das ilhotas pancreáticas isoladas da prole submetida à restrição proteica materna: possíveis relações com o metabolismo / Ana Beathriz Leite Lorente. -- Botucatu, 2025</p> <p>52 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu</p> <p>Orientador: Luis Antonio Justulin</p> <p>Coorientadora: Débora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos</p> <p>1. Má nutrição materna. 2. DOHaD. 3. Pâncreas. 4. Ilhotas. 5. Proteômica. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

## **Impacto potencial desta pesquisa**

### **Título da dissertação: Avaliação do perfil proteômico das ilhotas pancreáticas isoladas da prole submetida à restrição proteica materna: possíveis relações com o metabolismo**

Muito se sabe que uma alimentação saudável, que contenha todos os nutrientes necessários para o funcionamento do organismo, é fundamental para uma boa qualidade de vida. Por um outro lado, uma má alimentação pode levar a uma série de doenças chamadas de síndromes metabólicas, como o diabetes tipo 2, e alguns tipos de cânceres na vida adulta e no envelhecimento. Doenças essas que têm aumentado de incidência por diferentes fatores, entre os quais o crescente cenário de insegurança alimentar e aumento do consumo de alimentos ultraprocessados, pobres em nutrientes. Os hábitos alimentares durante a gravidez também são muito importantes, por ter efeitos não só para a mãe, mas por serem determinantes para a qualidade da saúde dos filhos. Dessa forma, quando nos deparamos com uma dieta pobre em proteínas durante a gestação, precisamos estar atentos às consequências que isso tem na saúde do organismo, o que inclui em como essa condição pode afetar o desenvolvimento do pâncreas, órgão central na regulação do metabolismo. Alguns estudos já evidenciam que o consumo insuficiente de proteínas na gestação leva a alterações estruturais no pâncreas dos filhos, ainda em útero materno. Como alterações, nota-se a diminuição do número de células beta, responsáveis por produzir insulina. Como esse hormônio é responsável por captar a glicose no sangue, o organismo passa a ter dificuldade de metabolizar glicose, que, por consequência, pode acarretar no desenvolvimento do diabetes tipo 2. Isso gera consequências para toda a vida do indivíduo e, por conta disso, é preciso compreender com maior profundidade como a má nutrição materna pode afetar a saúde do indivíduo ao longo do tempo, gerando conhecimento para dar suporte para a criação de políticas públicas que possam ajudar a reverter esse cenário, que sobrecarrega o Sistema Único de Saúde (SUS).

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Avaliação do perfil proteômico das ilhotas pancreáticas isoladas da prole submetida à restrição proteica materna: possíveis relações com o metabolismo

**AUTORA:** ANA BEATHRIZ LEITE LORENTE

**ORIENTADOR:** LUIS ANTONIO JUSTULIN JUNIOR

**COORIENTADORA:** DEBORA CRISTINA DAMASCENO MEIRELLES DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia Celular Estrutural e Funcional pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIS ANTONIO JUSTULIN JUNIOR (Participação Presencial)  
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Profa. Dra. ARIANE LEITE ROZZA (Participação Presencial)  
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Profa. Dra. VERÔNICA GONÇALVES PAULA (Participação Virtual)  
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia / Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Botucatu, 25 de fevereiro de 2025

Maria Victória Ramalho da Cunha  
Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-Graduação  
Instituto de Biociências de Botucatu

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha família,  
pelo apoio constante e carinho de sempre.

## **Agradecimentos especiais**

À minha mãe Ana Leite, meus avós Eglantina Leite e Geraldo Leite, meu irmão, Lucas Lorente, minhas irmãs Sophia e Ana Júlia, meu tio, Geraldo Júnior - Por serem meu alicerce, compartilharem meus sonhos e me ajudarem a torná-los realidade. Amo vocês.

Ao meu orientador, Luis Antonio Justulin Junior, por ter sido um guia constante e inspirador durante esses últimos 5 anos. Agradeço, em especial, por confiar este projeto a mim e por todo o suporte desde seu planejamento até sua materialização. Sua orientação transformou sonhos em realidade, e sou profundamente grata por isso.

À Débora Cristina Damasceno, pela coorientação e por todo o suporte durante este trabalho. Trabalhar contigo me fez ter uma admiração crescente pela profissional que é.

À Cristina Aguayo-Mazzucato pela supervisão da minha pesquisa nos Estados Unidos, por me receber tão bem em seu laboratório. Obrigada por ter acreditado em mim e por todo suporte antes, durante e pós internacionalização.

À Franciane Quintanilha, por todo suporte desde o início do projeto e por fazer das experimentações um espaço de aprendizado e troca. Entre conversas e ensinamentos, meu olhar para o pâncreas—e, em especial, para as ilhotas—se transformou. Agradeço com carinho por tantas aulas.

Agradeço ao Luiz Marcos Frediani por todo o auxílio desde minha primeira iniciação científica até este momento, pelas reuniões, conversas e conselhos. Sem o seu apoio, essa entrega não seria possível. Ao Renato Mattos, pelo suporte constante ao longo desses anos. À Micheli Lima e ao Hector Baptista, pela convivência e apoio diário. À minha grande amiga Gabriela de Castro, por me ensinar a comemorar cada conquista. Agradeço por estarem presentes nos meus melhores e piores dias da pós-graduação, tornando o caminho mais leve. Sou grata pelos momentos compartilhados, pelos cafés, risadas e pelo trabalho em equipe. Cada um de vocês contribuiu para meu crescimento em todos os aspectos da vida, e se tornaram grandes amigos. Tenho um carinho imenso por todos.

E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Mestrado (2023/06412-0) e da Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (2024/00451-7).

## **Agradecimentos**

Agradeço aos membros da banca de qualificação e de defesa, Franciane Quintanilha Galego, Ariane Leite Rozza, Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos, Verônyca Gonçalves Paula, pela disponibilidade e todas as contribuições valiosas à versão final deste trabalho.

Agradeço a todos os docentes e funcionários do Departamento de Morfologia, especialmente os professores Maeli Dal Pai, Wellerson Rodrigo Scarano, Luis Fernando Barbisan, Sérgio Luis Felisbino, Flávia Karina Delella pela convivência diária, apoio e inspiração acadêmica.

Agradeço a todos os colegas do DBMOL, aos antigos, Ketlin Colombelli, Ana Carolina Camargo, Flávia Bessi, em especial ao Sérgio Alexandre, por terem me inspirado a seguir essa trajetória. E aos novos Flávia Maciel, Isabelle Tenori e aos alunos de iniciação científica. Agradeço ao Matheus Naia, Hector Batista e Luisa Annibal pelo apoio na finalização do preparo de amostras durante meu período no exterior.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO), por toda parceria durante as coletas de ilhota pancreática e imuno-histoquímicas. Obrigada por proporcionarem um ambiente de trabalho tão acolhedor em tão pouco tempo, espero que essa parceria se estenda e se fortaleça nos trabalhos conseguintes.

Agradeço aos colegas do Beta Cell Aging Lab. Kanako Iwasaki, por me guiar nos experimentos mais desafiadores, pela confiança e por todas as conversas sobre ciência e vida. Susan Bonner-Weir e Jennifer Hollister-Lock, pela receptividade e suporte. Sebastian Peña, Chris Cahill, Françesko Hela, Idris Syed e Graham Grisedale, que, de formas singulares, em conjunto, enriqueceram essa experiência ímpar. Agradeço especialmente a Laura Monaco, pelo acolhimento dentro e fora do laboratório e pela amizade construída e Sandra Le, que, mesmo dividindo pouco tempo juntas, foi essencial nesse ciclo. Obrigada por tornarem o trabalho, os cafés, os almoços e as sessões de quebra-cabeça momentos de aprendizado e troca.

Agradeço aos colegas do Departamento de Morfologia, especialmente aos integrantes dos laboratórios de Biologia do Músculo Estriado (LBME), Desreguladores Endócrinos e Carcinogênese Experimental (LabDECA) e Carcinogênese Química e Experimental (LCQE). Aos egressos e alunos atuais, por contribuírem para a construção de tudo que tornou este momento possível. Agradeço em especial a Ariana Musa de Aquino, Erika Stefani Perez, Felipe

Leonardo Fagundes, Gabriel Bacil Prata, Letícia Lopes de Oliveira, Letícia Soares Batista e Paula Paccielli Freire pela inspiração, pelas trocas e pelo apoio ao longo dessa jornada.

Agradeço ao professor Rafael Henrique Nóbrega e à professora Daniela Carvalho pela oportunidade de realizar meu primeiro PAADES. Essa vivência estreitou ainda mais minha relação com o ensino, reforçando meu interesse e compromisso com a formação acadêmica.

Agradeço aos idealizadores da Liga Acadêmica de Biologia do Desenvolvimento e Saúde (LABIDS) pelo convite para integrar a primeira diretoria de Marketing e à sua primeira gestão, pelo trabalho realizado em conjunto.

Aos amigos Alice Campos, Beatriz Porcari, Camila Granero e Carolina Rezende, por, apesar da distância, se manterem presentes. Seu apoio e amizade foram fundamentais ao longo deste caminho. Agradeço também a Jéssica Garcia e a Luiza Gonzalez pelo suporte essencial nas etapas de internacionalização. E, em especial, a Ana Baggio, por todos os momentos compartilhados e pela amizade que tornou Boston mais feliz e leve.

Agradeço à seção técnica da Pós-Graduação e a todos os servidores por todo suporte durante o decorrer do desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos (001).

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

## **Lista de abreviações**

**AGE/RAGE** – Advanced Glycation End-products/Receptor for Advanced Glycation End-products (Produtos Finais de Glicação Avançada/Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada)

**AKT** – Serine/Threonine Kinase (Quinase Serina/Treonina)

**AMBIC** – Ammonium Bicarbonate (Bicarbonato de Amônio)

**AMPK** – AMP-Activated Protein Kinase (AMP-Proteína Quinase Ativada)

**BSA** – Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)

**CAT** – Catalase

**Células  $\alpha$**  – Células Alfa

**Células  $\beta$**  – Células Beta

**Células  $\delta$**  – Células Delta

**Células PP** – Células de Polipeptídeo Pancreático

**DAB** – 3,3-Diaminobenzidine (3,3-Diaminobenzidina)

**DM2** – Diabetes Mellitus do Tipo 2

**DNA** – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

**DP** – Desvio Padrão

**DPN** – Dia Pós-Natal

**DTT** – Dithiothreitol (Ditiotreitól)

**DOHaD** – Developmental Origins of Health and Disease

**E** – Dia Embrionário

**ERK** - Extracellular Signal-Regulated Kinase

**ERK1/2** – Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2

**FOXO1** – Forkhead Box O1 (Fator de Transcrição da Família Forkhead Box)

**GLUT-2** – Glucose Transporter Type 2 (Proteína Transportadora de Glicose do Tipo 2)

**GSH** – Glutathione (Glutationa)

**GSH-Px** – Glutathione Peroxidase (Glutationa Peroxidase)

**HDL** – High-Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidade)

**HE** – Hematoxylin and Eosin (Hematoxilina-eosina)

**IL-1 $\beta$**  – Interleukin-1 Beta (Interleucina-1 Beta)

**IGF1** – Insulin-like Growth Factor 1 (Fator de Crescimento Insulin-like 1)

**IGF2** – Insulin-like Growth Factor 2 (Fator de Crescimento Insulin-like 2)

**JAK/STAT** – Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (Janus Quinase/Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição)

**JNK** – c-Jun N-terminal kinase

**LC-MS/MS** – Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry  
(Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas/Espectrometria de Massas em Tandem)

**MAPK** – Mitogen-Activated Protein Kinase (Via da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno)

**miR-15b** – microRNA 15b

**miRNAs** – microRNAs

**mTOR** – mammalian Target of Rapamycin

**NF- $\kappa$ B** – Nuclear Factor Kappa-B (Fator Nuclear Kappa-B)

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** – Superoxide Anion (Ânion Superóxido)

**OH<sup>-</sup>** – Hydroxyl Radical (Radical Hidroxila)

**PDE** – Proteínas Diferencialmente Expressas

**PPAR $\gamma$**  - Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$

**RPM** – Restrição Proteica Materna

**RPGL** – Restrição Proteica Gestacional e Lactacional

**ROS** – Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

**RNA** – Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

**SOD** – Superoxide Dismutase (Superóxido Dismutase)

**TFA** – Trifluoroacetic Acid (Ácido Trifluoracético)

**SUS** – Sistema Único de Saúde

## **Lista das Figuras**

**Figura 1.** Representação dos componentes do sistema oxidante e antioxidante.

**Figura 2.** Modelo de remodelação do desenvolvimento.

**Figura 3.** Representação da estrutura das ilhotas pancreáticas e distribuição da proporção celular de células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e PP em roedores e humanos.

**Figura 4.** Representação da embriogênese do pâncreas em roedores.

**Figura 5.** Delineamento experimental.

**Figura 6.** Ilhota Pancreática Isolada.

**Figura 7.** Dados biométricos da prole no DPN 21.

**Figura 8.** Dados metabólicos da prole no DPN 21.

**Figura 9.** Fotomicrografias do pâncreas coradas com hematoxilina-eosina (HE).

**Figura 10.** Imagens representativas da imuno-histoquímica e respectivas quantificações utilizando anticorpos anti-insulina (células  $\beta$ ), anti-glucagon (células  $\alpha$ ) e anti-somatostatina (células  $\delta$ ) em ilhotas pancreáticas no 21º dia pós-natal.

**Figura 11.** Dados da Atividade das Enzimas Antioxidantes no pâncreas da prole no DPN 21.

**Figura 12.** Fotografia dos animais com escala de referência para padronização das medidas.

**Figura 13.** Controle-negativo das imunomarcações usando anticorpos: (A) anti-insulina; (B) anti-glucagon e (C) anti-somatostatina.

## **Lista das tabelas**

**Tabela 1.** Composição das dietas Padrão ou Normoproteica (AIN76A) e Hipoproteica (AIN-93).

**Tabela 2.** Informações sobre anticorpos primários, recuperação de antígenos, diluições e períodos de incubação empregados na análise imuno-histoquímica

**Tabela 3.** Classificação das ilhotas em relação ao tamanho e sua contagem por grupo.

## **RESUMO**

O conceito DOHaD (Origens Desenvolvimentistas Da Saúde e da Doença) visa estabelecer a correlação entre a incidência de doenças na vida adulta e no envelhecimento em função aos eventos sofridos durante o início do desenvolvimento. Um dos modelos mais utilizados para estudos de DOHaD é a restrição proteica materna (RPM) em roedores. Estudos experimentais já demonstram que ela é responsável pelo baixo peso ao nascimento, diminuição do depósito de gorduras, alteração dos níveis séricos de hormônios e de fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento da prole, além de estar relacionada ao desenvolvimento de síndromes metabólicas na vida adulta. Dada a relevância do pâncreas na manutenção da homeostasia sistêmica, nos parece essencial investigar, de maneira global, o impacto da RPM sobre a morfofisiologia pancreática, relacionando essas alterações a vias que podem estar ligadas ao surgimento de disfunções pancreáticas e metabólicas ao longo da vida. Para isso, foram utilizados filhotes machos de ratas Sprague Dawley, distribuídos em dois grupos experimentais: controle (CTR, n=10) e restrição proteica gestacional e lactacional (RPGL, n=10). As ratas de ambos os grupos foram alimentadas durante a gestação e lactação com rações contendo, respectivamente, 17% e 6% de proteína. No momento do desmame (DPN 21), os animais foram anestesiados e eutanasiados. O sangue (n=8) e o pâncreas foram coletados, sendo este último dissecado e destinado a diferentes análises. Para a avaliação morfológica, uma parte do pâncreas foi fixada (n=6), enquanto outra foi digerida com colagenase para isolamento de ilhotas pancreáticas (n=3), seguido de extração de proteína e análise proteômica por espectrometria de massas (LC-MS/MS), com quantificação proteica por Western blot. A restrição proteica materna resultou em menor peso corporal e pancreático persistente até o DPN21, além de redução na frequência de ilhotas maiores no grupo RPGL. Esses efeitos foram acompanhados por alterações nos níveis hormonais, com a diminuição nos níveis de glicemia, diminuição na secreção de insulina e aumento na secreção de glucagon, bem como uma redução na atividade enzimática de SOD e CAT, aumento do estresse oxidativo, sugerindo um impacto na homeostase glicêmica e no risco de disfunções metabólicas ao longo da vida.

**Palavras-chave:** Má nutrição materna; DOHaD; Pâncreas; Ilhotas; Proteômica; Ratos.

## **ABSTRACT**

The DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) concept aims to establish the correlation between the incidence of diseases in adulthood and aging based on events that occur during early development. One of the most widely used models for DOHaD studies is maternal protein restriction (MPR) in rodents. Experimental studies have shown that MPR is responsible for low birth weight, decreased fat deposition, altered serum hormone levels, and changes in growth factors essential for offspring development, in addition to being linked to the development of metabolic syndromes in adulthood. Given the relevance of the pancreas in maintaining systemic homeostasis, it seems essential to investigate, in a comprehensive manner, the impact of MPR on pancreatic morphophysiology, relating these changes to pathways that may be associated with the emergence of pancreatic and metabolic dysfunctions over the lifespan. For this purpose, male offspring of Sprague-Dawley rats were used and assigned to two experimental groups: control (CTR, n=10) and gestational and lactational protein restriction (RPGL, n=10). Dams from both groups were fed diets containing 17% and 6% protein during gestation and lactation, respectively. At weaning (postnatal day 21, DPN21), the animals were anesthetized and euthanized. Blood (n=8) and pancreas samples were collected, with the latter dissected for different analyses. For morphological evaluation, part of the pancreas was fixed (n=6), while another portion was digested with collagenase for pancreatic islet isolation (n=4), followed by protein extraction and proteomic analysis via mass spectrometry (LC-MS/MS), with protein quantification by Western blot. Maternal protein restriction resulted in persistently lower body and pancreatic weight until DPN21, along with a reduced frequency of larger islets. These effects were accompanied by changes in hormone levels, including reduced blood glucose levels, decreased insulin secretion, and increased glucagon secretion, as well as a reduction in the enzymatic activity of SOD and CAT, and increased oxidative stress, suggesting an impact on glucose homeostasis and a higher risk of metabolic dysfunctions later in life.

**Keywords:** Maternal malnutrition; DOHaD; Pancreas; Islets; Proteomics; Rats.

## Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Origens do Desenvolvimento de Doenças: A Abordagem DOHaD e a Programação Fetal	18
1.2	Programação Fetal por Restrição Proteica Materna (RPM).....	20
1.3	Pâncreas e Restrição Proteica Materna.....	23
1.4	Dados “ômicos”.....	27
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DA TEMÁTICA.....	29
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivos específicos.....	29
4	METODOLOGIA.....	31
4.1	Animais de experimentação.....	31
4.2	Análises hormonais.....	32
4.3	Análises morfológicas.....	33
4.3.1	Morfometria.....	33
4.3.2	Análise imuno-histoquímica (IHQ).....	33
4.4	Análises séricas das enzimas antioxidantes.....	34
4.4.1	Catalase:.....	35
4.4.2	Glutathione Peroxidase (GSH):.....	35
4.4.3	Superóxido Dismutase (SOD):.....	35
4.5	Isolamento das Ilhotas Pancreáticas.....	35
4.6	Análise proteômica.....	36
4.6.1	Expressão proteica global por espectrometria de massas (LC-Ms/Ms).....	36
4.6.2	Extração e quantificação proteica.....	36
4.6.3	Preparo das amostras para Espectrometria de Massas (Shotgun).....	37
4.7	Análise estatística dos resultados.....	37
5	RESULTADOS.....	38
5.1	Dados biométricos.....	38
5.2	Parâmetros metabólicos da prole.....	39
5.3	Parâmetros morfométricos do pâncreas da prole.....	39
5.4	Imuno-histoquímica.....	41
5.5	Estresse Oxidativo.....	42

6	DISCUSSÃO .....	42
7	DIFICULDADES ENCONTRADAS .....	45
8	REFERÊNCIAS .....	46
9	ANEXOS.....	51
9.1	Imagens dos animais com escala de referência. ....	51
9.2	Fotomicrografias dos controles-negativos das amostras de ilhotas pancreáticas referentes aos marcadores utilizados neste estudo. ....	52

# 1 Introdução

## 1.1 Origens do Desenvolvimento de Doenças: A Abordagem DOHaD e a Programação Fetal

Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado que a exposição a condições adversas no período intrauterino — como dieta inadequada, poluição ambiental e fatores de estilo de vida, como estresse — estão associadas ao aumento no risco de doenças na vida adulta (Sulyok, Farkas e Bodis, 2023). Um marco nesse campo foram os trabalhos de David Barker e colaboradores na década de 1980. Por meio de análises de dados históricos de regiões da Inglaterra e País de Gales, foi observado que as áreas com maior mortalidade infantil também apresentavam uma maior incidência de doenças cardíacas isquêmicas na vida adulta, indicando uma relação diretamente proporcional entre esses fatores. Esses resultados indicaram que a nutrição e o ambiente nos primeiros anos de vida podem ter impactos duradouros na saúde cardiovascular. Além disso, a mortalidade infantil foi interpretada como um marcador de condições adversas precoces e um preditor de risco elevado para doenças cardíacas no futuro (England, Barker e Osmond, 1986).

Ainda na década de 1980, Barker e seus colaboradores realizaram um estudo de coorte na região de Hertfordshire, Inglaterra, entre 1911 e 1930. Eles identificaram que os indivíduos nascidos com baixo peso tinham 2,7 vezes mais risco de morrer por doenças cardíacas em comparação com aqueles nascidos com peso adequado (Barker *et al.*, 1989). Em análises subsequentes da mesma coorte, foi observado que os homens com peso reduzido ao nascer apresentaram maiores riscos de desenvolver hipertensão, diabetes tipo 2 (DM2) e resistência à insulina entre 64 e 75 anos de idade, evidenciando uma relação inversamente proporcional entre essas condições e o peso ao nascimento (Barker *et al.*, 1990; Hales e Barker, 1992)

Nesse contexto, Ravelli e seus colaboradores investigaram, em 1976, os efeitos da restrição alimentar durante o "Inverno da Fome Holandesa" nos filhos de mulheres que sofreram com a fome durante a 2ª Guerra Mundial, recebendo entre 400-800 calorias por dia em seu período mais crítico. Os resultados indicaram que, na vida adulta, os indivíduos expostos à desnutrição materna apresentaram padrões de composição corporal distintos, dependendo da fase gestacional em que ocorreram essas exposições. A desnutrição ocorrida no primeiro semestre da gestação esteve associada não só ao aumento significativo na incidência de obesidade como também à redução da tolerância à glicose, maior prevalência de doença coronária, aumento de lipídios circulantes e concentrações elevadas de fatores de coagulação sanguínea na prole em

comparação com aqueles não expostos à fome. Enquanto, aqueles cujas mães sofreram desnutrição na metade da gestação tiveram maior probabilidade de apresentar função renal prejudicada na vida adulta, e, aquelas que foram expostas a essa condição no último trimestre da gestação, apesar de apresentarem uma incidência reduzida de obesidade, tiveram maior associação a intolerância a glicose e ao DM2 (Ravelli, Stein Zena A e Susser, 1976; Roseboom, Rooij, de Painter, 2006).

Em decorrência dos achados sobre a exposição pré-natal à fome holandesa, foram conduzidos estudos em ratos para investigar com mais detalhes os efeitos da desnutrição materna no início da gestação. Os quais corroboraram a ideia de que a desnutrição gestacional precoce pode alterar permanentemente os mecanismos regulatórios de ingestão de energia e armazenamento de gordura, aumentando o risco de obesidade na vida adulta. Esses achados indicam que a desnutrição durante o início da gestação pode ter efeitos de longo prazo no metabolismo, modulando diferentes aspectos da síndrome metabólica, dependendo do momento da exposição durante o período gestacional (Ravelli *et al.*, 1999).

Esses resultados fundamentaram a “Hipótese de Barker”, que propõe que a restrição do crescimento intrauterino influencia o risco de doenças cardiovasculares e metabólicas na vida adulta (Barker *et al.*, 1990). Essa hipótese se desenvolveu a partir de pesquisas subsequentes, e o conceito "Programação Fetal" passou a ser usado para descrever o processo pelo qual a exposição a condições ambientais adversas, como uma nutrição inadequada, em períodos críticos do desenvolvimento, pode desencadear respostas adaptativas na fisiologia do organismo, deixando uma memória permanente dessa exposição com efeitos duradouros no organismo (Gluckman *et al.*, 2011).

A “hipótese do fenótipo econômico” tenta explicar esse fenômeno, ao sugerir que o feto se adapta ao ambiente de escassez nutricional durante o desenvolvimento para otimizar o uso dos nutrientes disponíveis. Embora esse cenário seja adaptativo para a sobrevivência do indivíduo em condições de escassez, pode se tornar prejudicial quando ele é mais exposto a um ambiente com abundância alimentar mais tarde na vida, o que pode aumentar o risco de doenças metabólicas, como DM2 e síndrome metabólica (Armitage *et al.*, 2004; Barker, 1995).

A teoria de Barker gerou um interesse crescente nas origens fetais de doenças adultas, culminando na criação da sociedade internacional DOHaD (Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença), que continua os estudos de como sinais ambientais impactam a saúde a longo prazo, com foco em respostas adaptativas fetais e possíveis mecanismos epigenéticos, fornecendo fundamentação teórica para entender a relação entre desenvolvimento fetal e doenças na vida adulta (Wadhwa *et al.*, 2009).

## 1.2 Programação Fetal por Restrição Proteica Materna (RPM)

A restrição proteica materna (RPM) gestacional e lactacional é um dos modelos mais utilizados em estudos de DOHaD (Jahan-Mihan *et al.*, 2015; Langley-Evans, 2019; Langley-Evans, Phillips e Jackson, 1994). Esse modelo se torna particularmente relevante no contexto da crescente insegurança alimentar global, particularmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde a deficiência nutricional — especialmente de proteínas — tem se tornado uma preocupação crescente, impulsionada por fatores como pobreza, acesso limitado a alimentos nutritivos e restrições na oferta alimentar (Burki, 2022; Vipin, Blesson e Yallampalli, 2022).

Nesse cenário, estudos indicam que a exposição a RPM gestacional e/ou lactacional é responsável pelo baixo peso ao nascimento na prole (Colombelli *et al.*, 2017; Santos, S. A. A. *et al.*, 2019). Esses indivíduos, ao apresentarem crescimento pós-natal acelerado (*catch-up growth*), têm maior propensão a desenvolver resistência à insulina e DM2 na idade adulta (Berends *et al.*, 2013, 2018; Kesavan e Devaskar, 2019).

Estudos demonstram que a RPM também provoca alterações órgão-específicas que comprometem a morfologia e funcionalidade dos tecidos ao longo da vida. No fígado, houve redução da proliferação celular e alterações no padrão de expressão gênica (Campisano *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2018; Ramadan, Alshiraihi e Al-karim, 2013). No cérebro, a RPM afeta a arquitetura, bioquímica e as proporções neuronais (Gould *et al.*, 2018). Os rins apresentam menor número de néfrons durante a vida (Rizzi *et al.*, 2017), enquanto os pulmões exibem número reduzido de alvéolos, vascularização prejudicada e alterações na produção de surfactante (Khazaei *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2014).

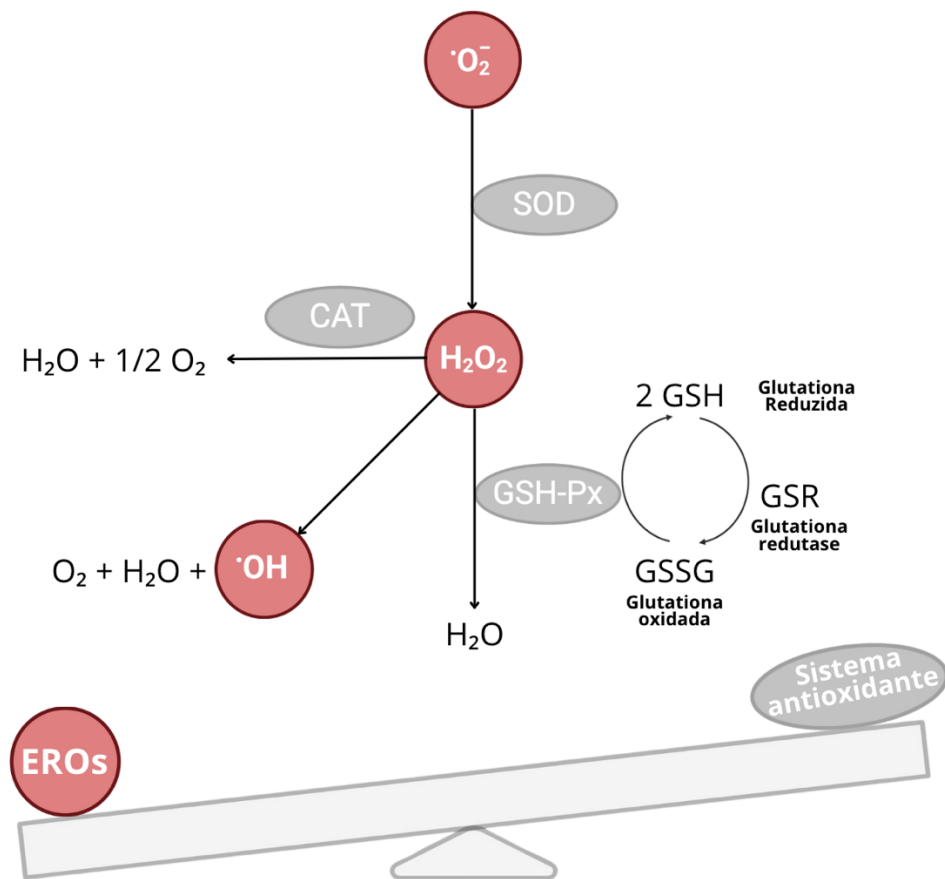
Além disso, o desenvolvimento sexual e reprodutivo dos descendentes é comprometido, com redução da fertilidade, puberdade alterada e alterações no sistema genital, tanto em machos quanto em fêmeas (Zambrano *et al.*, 2014). No sistema genital masculino, o epidídimo apresenta alterações morfológicas e morfométricas (Cavariani *et al.*, 2019; Santos, T. de M. *et al.*, 2019). Há ainda atraso no desenvolvimento prostático e aumento da incidência de câncer com o envelhecimento (Colombelli *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2020; Santos, S. A. A. *et al.*, 2019). A musculatura esquelética exibe padrões alterados (Cabeço *et al.*, 2012; Valente *et al.*, 2021), e as ilhotas pancreáticas apresentam menor número de células  $\beta$  e secreção reduzida de insulina e alteração na capacidade antioxidante, tornando-as mais vulneráveis ao estresse oxidativo, o que contribui para a disfunção mitocondrial e o desequilíbrio nas enzimas antioxidantes (Morimoto, 2012; Su *et al.*, 2016; Theys, Clippe, *et al.*, 2009).

No nível sistêmico, a RPM é um fator crucial para o desenvolvimento de síndromes metabólicas ao longo da vida (Jahan-Mihan *et al.*, 2015), modulando o metabolismo da glicose (Zheng *et al.*, 2017), os níveis séricos de leptina (Qasem *et al.*, 2016; Zambrano *et al.*, 2006) e moléculas inflamatórias como IL-1 $\beta$  (Tarry-Adkins *et al.*, 2018). Há ainda impacto nos níveis hormonais esteroides (Rinaldi *et al.*, 2013; Santos, S. A. A. *et al.*, 2019) e nas vias de sinalização de insulina, IGF1 e IGF2 (Berends *et al.*, 2018; Colombelli *et al.*, 2017; Santos, S. A. A. *et al.*, 2019).

Há evidências de que a RPM pode alterar o perfil da expressão gênica, alterando marcas de metilação do DNA em promotores de genes essenciais, modificações de histonas e miRNAs, além de impactar outros mecanismos de regulação epigenética (Langley-Evans, 2019).

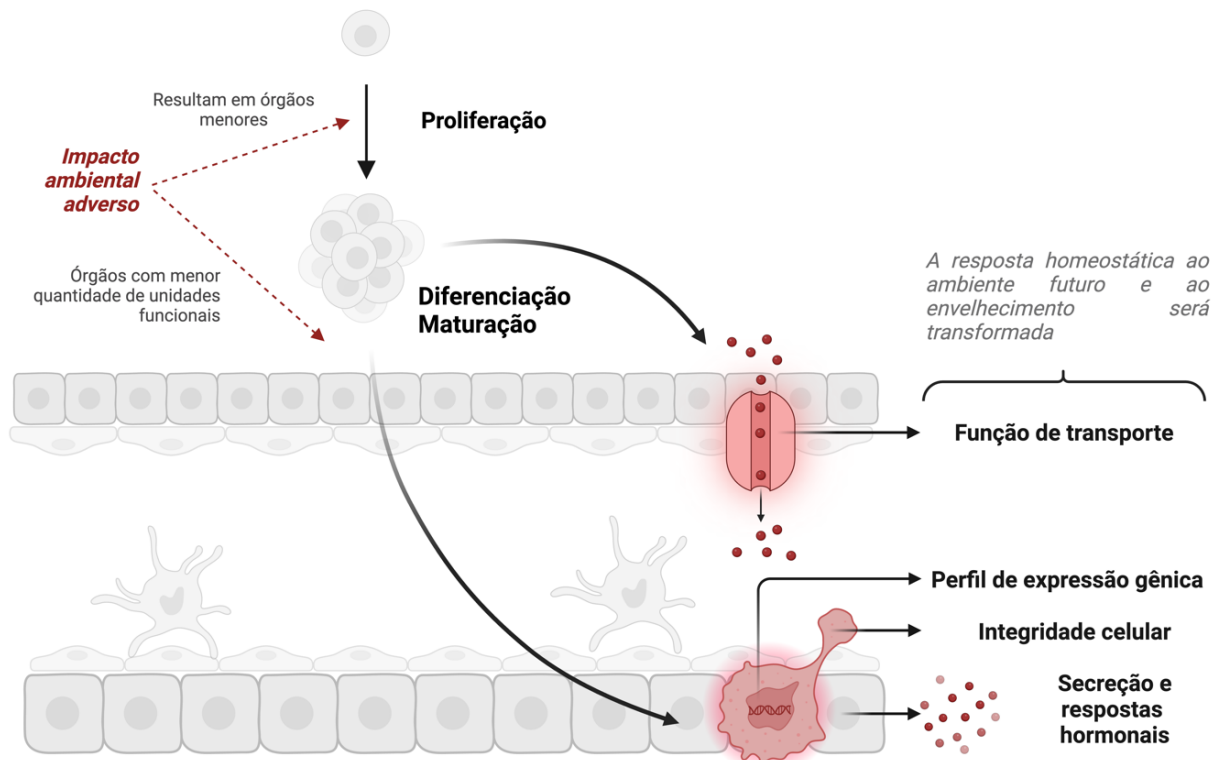
O estresse oxidativo é um fator importante nesse processo, agindo como modulador epigenético desses mecanismos. Ele ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e radicais hidroxila ( $OH^-$ ), componentes fisiológicos importantes na homeostase biológica, supera a capacidade do sistema de defesa antioxidante, resultando em danos celulares. Com elétrons desemparelhados em sua camada externa, esses elementos reativos interagem com lipídeos, proteínas e DNA, promovendo alterações estruturais que levam a lesões celulares, como peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e danos ao material genético, além de ativar vias de sinalização como NF- $\kappa$ B, MAPK e AGE/RAGE (Pham-Huy, He e Pham-Huy, 2008; Yaribeygi *et al.*, 2020).

Em condições normais, as células dispõem de mecanismos intrínsecos de defesa antioxidante, como enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona (GSH) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) (Pham-Huy, He e Pham-Huy, 2008; Tain e Hsu, 2024; Yaribeygi *et al.*, 2020). A SOD converte o superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é então neutralizado em uma etapa subsequente. Essa função ocorre de maneira sinérgica com as glutathionas, outro componente importante no controle do estresse oxidativo celular (Miao e Clair, St., 2009; Warner, 1994). Já a catalase (CAT) desempenha a função de decompor o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ), protegendo as células contra o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, um processo crítico para manter a integridade celular (Glorieux e Calderon, 2017; Nandi *et al.*, 2019) (Figura 1). Contudo, em condições adversas, como a RPM, quando esse mecanismo de defesa não acontece, as espécies reativas de oxigênio podem desencadear uma série de reações que resultam em danos celulares oxidativos.



**Figura 1. Representação dos componentes do sistema oxidante e antioxidante.**  $O_2^{\cdot-}$ , ânion superóxido;  $OH^{\cdot}$ , radical hidroxila;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrogênio; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GSH-Px, glutathione peroxidase. Adaptado de (Liu *et al.*, 2023).

Os mecanismos mais prováveis que explicam esses efeitos estão relacionados à interferência nas fases de proliferação e diferenciação/maturação celular. A RPM durante essas etapas de desenvolvimento tecidual pode resultar em tecidos menores e com menor número de unidades funcionais, respectivamente. Isso compromete a resposta homeostática, resultando em alterações permanentes na estrutura e função dos tecidos. Conforme ilustrado na Figura 2, essas mudanças são evidenciadas em diferentes níveis, resultando em danos à integridade celular e levando à alteração tanto das funções teciduais quanto da capacidade homeostática, o que pode ser determinante para o curso do envelhecimento, predispondo o organismo a uma trajetória de saúde ou a disfunções na vida adulta (Langley-Evans, 2019)

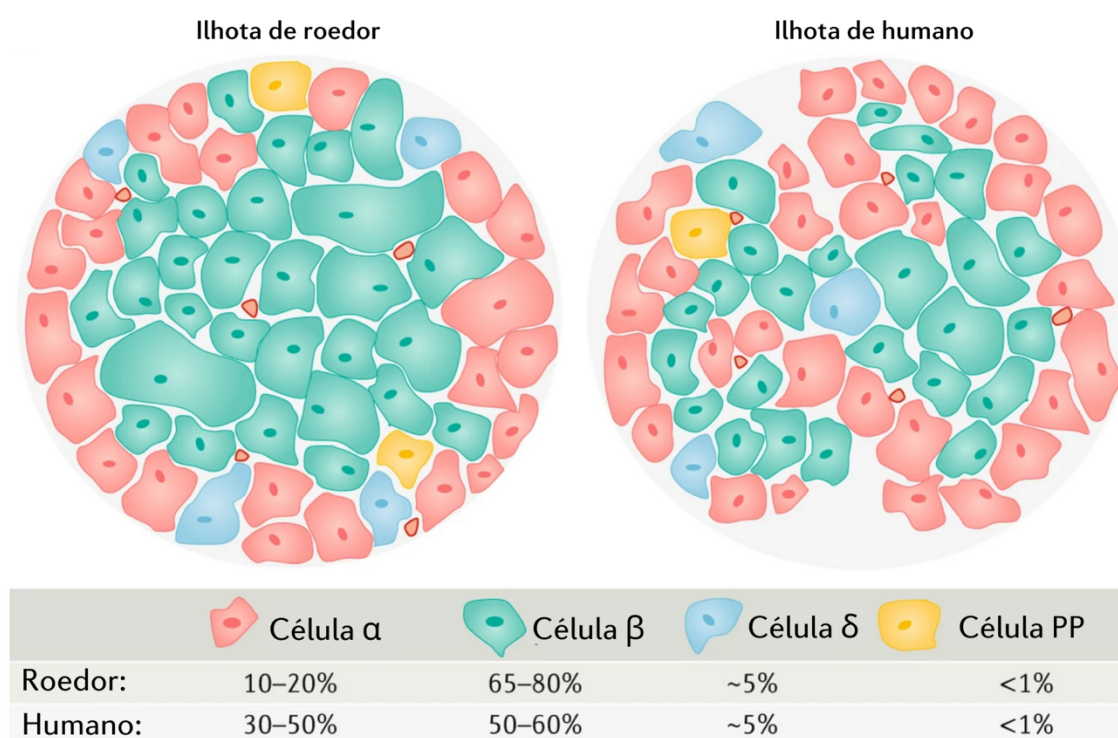


**Figura 2. Modelo de remodelação do desenvolvimento.** Órgãos e tecidos se desenvolvem seguindo um padrão genético. Condições adversas, como a RPM, podem interromper esse padrão, afetando a proliferação e diferenciação celular, o que resulta em tecidos com menos unidades funcionais e alterações permanentes na estrutura e função dos órgãos (Adaptado de Langley-Evans, 2020).

### 1.3 Pâncreas e Restrição Proteica Materna

O pâncreas é uma glândula mista situada anteriormente ao estômago, entre o duodeno e o baço, tendo uma parte endócrina e outra exócrina. A região exócrina, composta principalmente por glândulas acinosas, é responsável pela produção, armazenamento e secreção do suco pancreático, secreção aquosa de bicarbonato e enzimas digestivas. A liberação das enzimas no duodeno, estimulada pelos hormônios colecistocinina (CCK) e secretina, ocorre por meio dos ductos pancreáticos e desempenha um papel crucial na digestão do quimo ácido ((Röder *et al.*, 2016; Valente *et al.*, 2024; Zhou e Melton, 2018). Já o pâncreas endócrino consiste em um conjunto de células que formam ilhotas pancreáticas, incluindo células  $\alpha$ , células  $\beta$ , células  $\delta$  e células de polipeptídeo pancreático (PP). Essas células produzem individualmente glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídeo pancreático, respectivamente. A interação dessas células é essencial para a regulação das respostas metabólicas do organismo (Bakhti, Böttcher e Lickert, 2019).

O número e a massa das ilhotas pancreáticas variam em função da idade e do peso. Em humanos, são encontrados entre 1 e 15 milhões de ilhotas, com mais da metade sendo constituída por células  $\beta$ . As células  $\alpha$ , por sua vez, representam de 30 a 50% de sua composição, estando distribuídas por toda a sua extensão (Campbell e Newgard, 2021). Em roedores, há em média 2.000 ilhotas, com distribuição celular caracterizada pela predominância das células  $\beta$ , que constituem de 65 a 80% da composição e estão situadas no núcleo central. As células  $\alpha$ , em menor quantidade, localizam-se na periferia, juntamente com as células  $\delta$ ,  $\epsilon$  e PP, que formam uma camada externa ao redor do núcleo (Campbell e Newgard, 2021; Corbin *et al.*, 2021) (Figura 3).



**Figura 3. Representação da estrutura das ilhotas pancreáticas e distribuição da proporção celular de células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e PP em roedores e humanos.** Adaptado de Campbell, et. al, 2021.

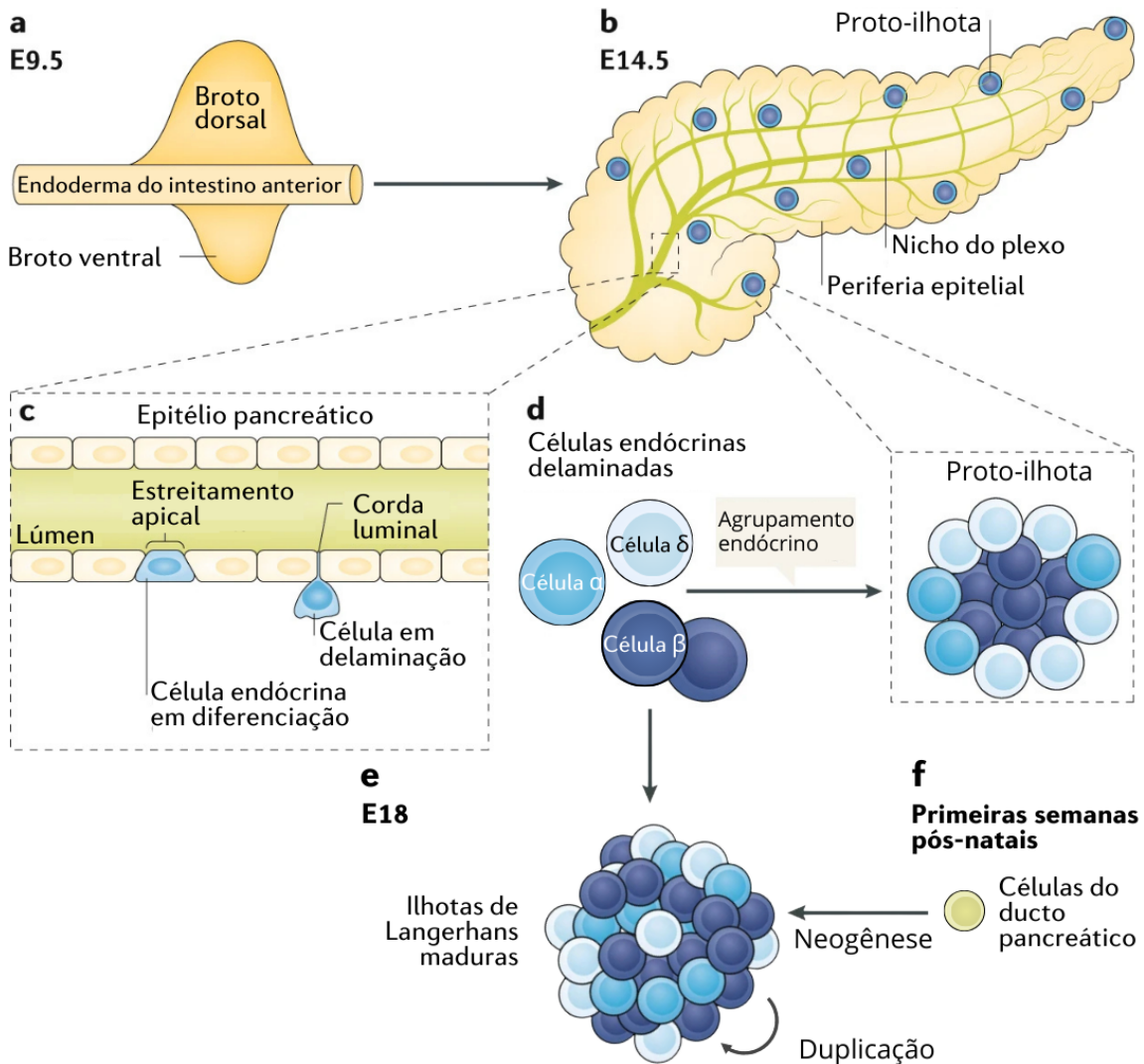
Esse complexo sistema de células endócrinas e exócrinas se desenvolve ao longo de um processo altamente coordenado, e alterações nesse desenvolvimento, tanto antes quanto após o nascimento, podem ser prejudiciais à formação e à função do pâncreas. Como evidenciado por Jabary *et al.*, (2023) ao avaliar os efeitos da restrição do crescimento fetal na morfologia das ilhotas pancreáticas e na função metabólica em ratos, observaram que ratos machos alimentados com boa nutrição pós-natal apresentaram ilhotas dismórficas e fibróticas, o que levou à dislipidemia e intolerância à glicose. Nos animais que receberam nutrição pobre após a restrição do crescimento não houve normalização da tolerância à glicose. Esses achados destacam a

importância do desenvolvimento pancreático adequado, que ocorre em diferentes estágios durante o período embrionário e pós-natal.

Mamíferos têm pâncreas com histologia e modo de desenvolvimento semelhantes (Slack, 1995). O desenvolvimento do pâncreas em camundongo pode ser classificado em três estágios. Na transição primária, a indução do pâncreas começa no dia embrionário (E) 8,5, com a formação de brotos ventral e dorsal a partir do endoderma, gerando células progenitoras que se diferenciam em células ductais, endócrinas e exócrinas. A primeira onda de formação celular endócrina gera células  $\alpha$  produtoras de glucagon. Na transição secundária, por volta de E12,5, ocorre a formação de estruturas de microlúmen, que se fundem em uma rede luminal contínua, e os progenitores se diferenciam em diferentes tipos de células endócrinas, principalmente em células  $\beta$ . A transição terciária, que começa em E16.5, envolve remodelação e maturação das células diferenciadas. Entre E18 e 18.5, células PP emergem e persistem até a vida adulta. As células endócrinas delaminam, migram para o tecido exócrino vizinho e formam aglomerados, que se expandem progressivamente, formando as ilhotas pancreáticas. (Bakhti, Böttcher e Lickert, 2019; Cleaver e Dor, 2012; Dassaye, Naidoo e Cerf, 2016). Após o nascimento, o pâncreas endócrino continua seu desenvolvimento, com um crescimento acelerado marcado pela maturação das ilhotas e a geração de novas células  $\beta$  por duplicação e neogênese durante as primeiras semanas pós-natais. A introdução da ração à dieta láctea e as alterações hormonais relacionadas ao desmame desempenham um papel fundamental para esse processo. (Bonner-Weir, Aguayo-Mazzucato e Weir, 2016). Durante esse período, as proporções de células  $\beta$  e  $\alpha$  aumentam significativamente entre os DPNs 17 a 20 (CALZADA et al., 2016).

Esse processo de diferenciação celular prepara o pâncreas para a regulação de funções metabólicas essenciais, como o controle dos níveis de glicose no sangue. Após a ingestão de alimentos, a secreção de insulina é estimulada, resultando em hiperinsulinemia. Isso desencadeia uma série de respostas metabólicas integradas, iniciadas pela translocação do transportador GLUT4 para a membrana plasmática. Nos músculos, isso ocorre quando a insulina se liga ao seu receptor, ativando a cascata de sinalização que envolve a fosforilação do IRS-1, ativação da PI3K e fosforilação da proteína Akt. A ativação da Akt promove o tráfego das vesículas contendo GLUT4 do interior da célula para a membrana, permitindo a entrada de glicose nos miócitos. Esse processo também ocorre em outros tecidos sensíveis à insulina, como o tecido adiposo e o fígado, onde a translocação de GLUT4 facilita a captação de glicose e contribui para o controle da glicemia (Norton *et al.*, 2022).

Em indivíduos com metabolismo glicêmico normal, esse processo equilibra a concentração plasmática de glicose em até duas horas (DeFronzo, 1988; Ferrannini e DeFronzo, 2015; Norton *et al.*, 2022). O aumento da insulina plasmática juntamente à elevação da concentração plasmática de glicose faz com que as concentrações plasmáticas de glucagon diminuam (Norton *et al.*, 2022). Nesse contexto, compreender o equilíbrio entre esses hormônios é fundamental, pois uma resposta hiperinsulinêmica associada à resistência à insulina pode ativar a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), promovendo o aumento do crescimento e proliferação de células lisas vasculares, inflamação e aterogênese, além de vários outros efeitos sistêmicos (DeFronzo, 2010). A figura abaixo (Figura 4) demonstra a embriogênese do pâncreas.



**Figura 4. Representação da embriogênese do pâncreas em roedores.** O desenvolvimento do pâncreas começa com a formação dos brotos dorsal e ventral a partir do endoderma do intestino anterior (a). Na transição secundária, o epitélio pancreático se organiza em uma estrutura ramificada com um núcleo de plexo (b). Células endócrinas derivadas dos progenitores do plexo se diferenciam e se desprendem do lúmen epitelial (c), formando proto-ilhotas (d) que darão origem às ilhotas pancreáticas na transição terciária (e). Novas células  $\beta$  são formadas tanto pela

duplicação de células pré-existentes quanto pela nova diferenciação de células do ducto pancreático nas primeiras semanas pós-natais (f). E equivale a dia embrionário. Adaptado de Bakhti, et. al, 2019.

Estudos que investigaram a relação da RPM com o pâncreas descreveram que ratos de 28 semanas de idade, submetidos à RPM (dieta com 9% de proteína) durante a gestação e lactação, apresentavam aumento na proporção de enzimas pancreáticas, indicando um possível papel da RPM em lesões pancreáticas (Sarles *et al.*, 1987). Outro estudo demonstrou que, ao serem incubadas em meio contendo secretagogos, as ilhotas pancreáticas de ratos machos submetidos à RPM gestacional no DG 21.5 apresentaram redução na secreção de insulina após sete dias de cultivo (Dahri *et al.*, 1991). Ainda foi descrito que ratos submetidos à RPM na gestação e lactação, apresentam ilhotas pancreáticas irregulares, com menor quantidade de células  $\beta$ , podendo a RPM ser um dos fatores de risco para a incidência de diabetes mellitus não-insulino dependente (DM2) na vida adulta (Berney *et al.*, 1997; Ignácio-Souza *et al.*, 2013; Serpente *et al.*, 2022). Calzada e seus colaboradores (2016) avaliaram a morfologia pancreática e a quantidade de células  $\alpha$  e  $\beta$  no pâncreas de animais submetidos à RPM no DPN 7, 14, 21, 36 e 110, e estes autores observaram diminuição da proporção de células  $\beta$  no DPN 21, com um aumento na proporção de células  $\alpha$ , no entanto, essa proporção de células apresentava plasticidade ao longo do período analisado (CALZADA *et al.*, 2016). Ainda, estudos descreveram a modulação epigenética do pâncreas de animais submetidos à RPM, no qual foram descritos uma série de microRNAs, como miR-15b, e vias de sinalização alteradas, como da proliferação e ciclo celular, secreção de insulina e disfunção pancreática (Dumortier *et al.*, 2014; Sosa-Larios, Cerbón e Morimoto, 2015; Su *et al.*, 2016). No estudo de Li *et al.*, (2024) foi observado que a RPM gestacional e lactacional teve um impacto negativo no metabolismo da glicose na prole adulta, resultando em tolerância à glicose prejudicada, secreção de insulina diminuída e redução na proliferação de células  $\beta$ , fatores determinantes para o desenvolvimento do DMT2 na vida adulta/envelhecimento.

#### **1.4 Dados “ômicos”**

A última década foi marcada por grandes avanços nos estudos de sequenciamento em larga escala baseadas na combinação de “omas” (transcriptoma, MicroRNoma, metiloma, proteoma, metaboloma). Estas metodologias, associadas a ferramentas de bioinformática, têm auxiliado na análise de grande volume de dados, e de forma integrativa, dos mecanismos moleculares envolvidos tanto no desenvolvimento normal, como em condições patológicas. Neste contexto, as plataformas "multi-ômicas" desempenham papel central na identificação de redes moleculares desreguladas em resposta à exposição no início da vida. Alfano *et al.* (2020)

por meio de análises integrativas de metiloma, transcriptoma, metaboloma e inflamassoma a partir de amostras de cordão umbilical, identificaram a desregulação de redes metabólicas relacionadas ao colesterol como um mecanismo central na modulação do peso ao nascimento, onde o aumento de colesterol HDL foi associado ao maior peso ao nascimento.

Estudos recentes têm destacado a importância da proteômica no estudo das alterações relacionadas ao diabetes, especialmente no contexto do pâncreas endócrino (Topf *et al.*, 2013), além de estabelecer um conjunto de proteínas relevantes para condições relacionadas ao diabetes (Schvartz *et al.*, 2015). Nesse contexto, Ahmed *et al.* (2005) foram os primeiros a estudar o proteoma de ilhotas humanas, identificando 66 proteínas específicas das células nessas regiões. Metz *et al.*, (2006) usou uma abordagem a partir do 2D LC-Ms/Ms para caracterizar o proteoma de ilhotas de amostras mistas de um biobanco, identificando na ordem de 3.600 proteínas como JAK/STAT, AKT, ERK1/2, receptor de integrina, NF-kB, entre outros, regulando vias de inflamação, crescimento, proliferação celular, metabolismo e biossíntese de proteínas, entre outros.

À medida que a literatura acumula esses dados sobre as ilhotas pancreáticas, com foco em diversas patologias, torna-se evidente a importância de investigar como fatores externos, como uma dieta materna inadequada, podem impactar o proteoma das ilhotas pancreáticas na prole. Nesse sentido, é fundamental compreender como condições como a RPM podem alterar o perfil proteico dessas células, modulando não apenas a morfofisiologia do pâncreas, mas também afetando o ambiente sistêmico de forma ampla.

## **2 Justificativa e relevância da temática**

O pâncreas é frequentemente analisado em estudos DOHaD devido à sua associação com condições adversas durante a gestação e a primeira infância, que contribuem para o surgimento de síndromes metabólicas na vida adulta e no envelhecimento (Barouki *et al.*, 2012; Hoffman, Reynolds e Hardy, 2017; Mericq *et al.*, 2016). No entanto, a relação entre os efeitos da RPM e suas consequências ao longo da vida pós-natal, até o envelhecimento, ainda não foram totalmente elucidadas.

Considerando a importância da dieta materna, o contexto de fome e insegurança alimentar, além dos dados que demonstram efeitos sistêmicos e em diversos órgãos pela RPM, torna-se fundamental investigar como essa condição pode modular a morfofisiologia pancreática, especialmente durante períodos críticos do desenvolvimento, desde início da vida, quando as ilhotas pancreáticas estão em processo de maturação e adaptação. Esse período de transição pode representar uma janela de suscetibilidade a alterações que se perpetuam ao longo do desenvolvimento, com potenciais implicações para o surgimento de disfunções metabólicas na vida adulta.

Dessa forma, a abordagem integrativa desta proposta busca identificar vias moleculares alteradas pela RPM, a partir da análise do proteoma das ilhotas pancreáticas isoladas e sua correlação com a sua morfofisiologia. Essa proposta busca avançar no entendimento da biologia pancreática em resposta à RPM, que poderão trazer contribuições científicas.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar e integrar o perfil global de expressão proteica aos aspectos morfológicos e funcionais das ilhotas pancreáticas de ratos machos submetidos à restrição proteica materna (RPM) aos 21 dias de idade pós-natal (DPN 21).

### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o impacto da RPM na organização histológica do pâncreas endócrino nos ratos jovens machos (DPN21);
- Avaliar o perfil hormonal no pâncreas endócrino e a resposta hormonal sistêmica de ratos machos submetidos à RPM;

- Analisar a atividade de enzimas antioxidantes no pâncreas total de animais jovens submetidos à RPM;
- Isolar as ilhotas pancreáticas dos animais controle e submetidos à RPM no DPN21;
- Identificar o perfil global de expressão proteica das ilhotas pancreáticas de animais jovens submetidos à RPM;
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas (PDEs) nas ilhotas pancreáticas de animais submetidos à restrição proteica materna;
- Caracterizar as vias metabólicas e ontológicas associadas as PDEs;
- Correlacionar o perfil global de expressão proteica com os parâmetros morfofuncionais do pâncreas de ratos jovens;
- Validações *in silico* a partir de bancos de dados públicos.

**Observação:** Os objetivos destacados acima, não puderam ser alcançados ao longo do trabalho conforme informação detalhada no tópico “dificuldades encontradas”.

## 4 Metodologia

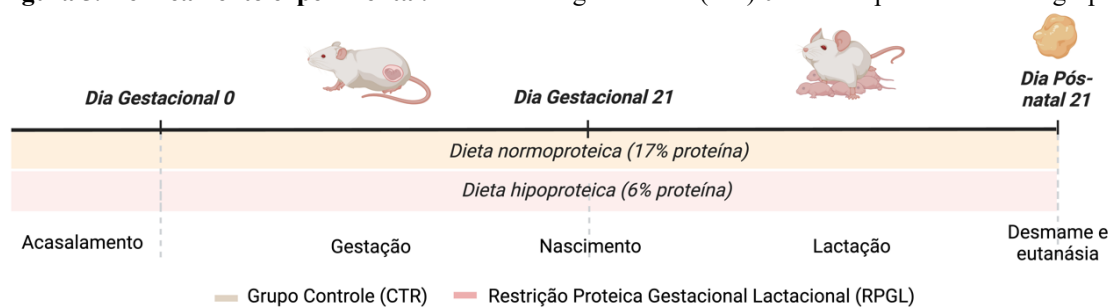
### 4.1 Animais de experimentação

Ratos *Sprague Dawley* machos e fêmeas adultos foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP. Os animais e suas proles foram mantidos no Biotério de Pequenos mamíferos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Setor Morfologia, IBB/UNESP Botucatu, em caixas de polietileno, dois animais por caixa, com substrato de maravalha autoclavada, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 25°C, sendo fornecida água filtrada e ração *ad libitum*.

Após o período de adaptação, os ratos foram distribuídos de maneira aleatória para compor os grupos experimentais. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos na pesquisa animal e a legislação brasileira e foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso Animal do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP (protocolo CEUA 5119280121).

O acasalamento foi facilitado durante a noite em um arranjo de harém (1 macho para 3 fêmeas, animais com 90 dias de idade). Após constatação da prenhez, 20 ratas foram colocadas em gaiolas individuais e alimentadas com ração padrão para ratos (grupo controle - CTR, n=10, 17% de proteína) ou com ração hipoproteica durante toda a gestação e lactação (grupo restrição proteica gestação e lactação - RPGL, n=10, 6% de proteína). A ração utilizada foi a AIN-93 modificada, de acordo com REEVES et al. (1993).

**Figura 5. Delineamento experimental.** Ratas no dia gestacional (DG) 0 foram separadas em dois grupos: Grupo



Controle (CTR) que receberam ração normoproteica (barra amarela), grupo Restrição Proteica Gestacional Lactacional (RPGL) que receberam ração hipoproteica (barra vermelha) durante a gestação e lactação.

Foram utilizados para a fase experimental quatro filhotes machos de cada mãe. Imediatamente após o nascimento houve a padronização do número de animais para oito filhotes por rata (proporção entre machos e fêmeas de 1:1 sempre que possível), de forma que não ocorresse alterações no cuidado da mãe com a prole. No dia pós-natal 21 (DPN 21) os filhotes foram pesados e eutanasiados. A eutanásia foi realizada por perda de consciência

utilizando anestésico (ketamina e xilazina, na proporção 3:1), seguida de decapitação. Para os animais cujas ilhotas pancreáticas foram isoladas, a aplicação do anestésico foi feita por injeção intramuscular, enquanto para os demais, foi realizada via intraperitoneal. O sangue foi coletado e o pâncreas dissecado, pesado e congelado a -80°C, fixado em Methacarn (PUCHTLER et al., 1970) e formaldeído para produção de lâminas histológicas ou digerido por colagenase para isolamento de ilhotas pancreáticas. As formulações das rações se encontram descritas na Tabela 1. Estas formulações já foram utilizadas por nosso grupo em outros dados publicados em COLOMBELLI et al., 2017; RINALDI et al., 2013; SANTOS et al., 2019a, 2020.

**Tabela 1.** Composição das dietas Padrão ou Normoproteica (AIN76A) e Hipoproteica (AIN-93)

<b>Ingredientes</b>	<b>Normoproteica 17 % de proteína (g/kg)</b>	<b>Hipoproteica 6 % de proteína (g/kg)</b>
Caseína (84% de proteína)	202	71,5
Amido	397	480
Dextrina	130,5	159
Sacarose	100	121
L-cistina	3	1
Fibra pH 101 ou pH 102 (microcelulose)	50	50
Óleo de soja	70	70
Mistura de sais AIN93G**	35	35
Mistura de vitaminas AIN93G**	10	10
Cloridrato de Colina ou Bitartarato de Colina	2,5	2,5

\*\* para reconhecer composição detalhada do mix de sais e vitaminas, consultar REEVES et. al., 1993.  
A dieta é elaborada pela empresa PragSoluções (PragSoluções, Jaú, SP, Brasil)

## 4.2 Análises hormonais

A partir deste ponto, todas as análises bioquímicas e morfométricas foram realizadas de forma cega. Amostras de sangue da prole masculina (n = 8) foram centrifugadas (4000 RPM por 20 min) e o soro foi armazenado a -20 °C até ser utilizado. Os níveis de insulina (Merck Millipore®, EZRMI-13k, MA, USA, sensibilidade: 0.2 ng/mL) e glicose (Laborlab®, 177013, MG, Brasil) foram dosados. Um leitor de placas ELISA (Epoch™, Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA) foi usado para a quantificação desses hormônios em placas de 96 poços seguindo o protocolo da folha de dados.

### **4.3 Análises morfológicas**

#### **4.3.1 Morfometria**

Amostras de pâncreas de animais no DPN21, provenientes dos diferentes grupos experimentais (n=6), foram pesadas e fixadas em methacarn (70% metanol, 20% clorofórmio e 10% ácido acético) por 4 horas. Em seguida, o material foi desidratado em uma série crescente de etanóis, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast. Cortes com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo, transferidos para lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso.

As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise geral da estrutura glandular. Imagens da extensão total do pâncreas foram capturadas com objetiva de 20x. As médias dos grupos foram calculadas a partir de quatro seções de cada pâncreas, com um intervalo mínimo de 50 µm entre elas. Para cada seção, foram determinados o número total de ilhotas, a área de cada ilhota e a distribuição das ilhotas por tamanho.

Foi considerada como ilhota qualquer estrutura com diâmetro igual ou superior a 60 µm (Bonner-weir *et al.*, 1982). As ilhotas foram arbitrariamente classificadas em pequenas (menos de 5.000 µm<sup>2</sup>), médias (entre 5.000 e 10.000 µm<sup>2</sup>) e grandes (mais de 10.000 µm<sup>2</sup>) (Chamson-Reig *et al.*, 2006). O número de ilhotas foi expresso por milímetro quadrado de área pancreática total. As áreas das ilhotas foram medidas utilizando o software ImageJ.

#### **4.3.2 Análise imuno-histoquímica (IHQ)**

Para esta análise, foram utilizadas amostras de pâncreas de animais eutanasiados no DPN21 dos diferentes grupos experimentais (n=5). As amostras foram pesadas, fixadas em formaldeído 4% por 24 horas e, posteriormente, armazenadas em etanol 70%. Após processamento e inclusão em Paraplast, o pâncreas foi seccionado em três seções de 5 µm cada e coletado em lâminas silanizadas. Essas lâminas foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas a recuperação antigênica, quando necessário, seguidas do bloqueio da peroxidase endógena com inibidor contendo peróxido de hidrogênio e azida sódica 15 mM (Dako®) por 40 minutos em temperatura ambiente. O bloqueio de proteínas não específicas foi realizado com Protein Block (0,25% de caseína em PBS, contendo proteína carreadora e 15 mM de azida sódica - Dako®) por 30 minutos a 27 °C. seguido de incubação com o anticorpo primário (Tabela 2). Para o controle negativo, a albumina sérica bovina (BSA) substituiu o anticorpo primário, garantindo a verificação da especificidade da marcação.

**Tabela 2.** Informações sobre anticorpos primários, recuperação de antígenos, diluições e períodos de incubação empregados na análise imuno-histoquímica.

Anticorpos primários	Código	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
Anti-Insulina	Abcam®, Código: ab8304	1:10000	Recuperação antigênica na panela de pressão Elite Bistro® com solução de citrato (pH 6,0) por 30 min	2 horas em 27 °C
Anti-Glucagon	Elabscience®, Código: E-AB-16421	1:500	Recuperação antigênica na panela de pressão Elite Bistro® com solução de citrato (pH 6,0) por 30 min	1 hora em 27 °C
Anti-Somatostatina	DAKO®, Código: a0566	1:2000	Livre de recuperação antigênica	Durante a noite na geladeira a 4 °C

Após a incubação com o anticorpo primário, o anticorpo secundário (Histofine) foi adicionado por 30 minutos em estufa a 27 °C. A marcação foi revelada com o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina) (1:50) por 3 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram, então, contracoradas com hematoxilina de Mayer e montadas.

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional e fotodocumentados por meio de um sistema computadorizado de imagem (Software KS-300, versão 3.0, Zeiss®), utilizando uma câmera digital (CCD-IRIS/RGB, Sony®) acoplada ao microscópio (DMR, Leica®). Dez ilhotas foram selecionadas aleatoriamente para análise em cada pâncreas, totalizando 50 ilhotas por grupo. Para a análise morfológica, foram selecionadas aleatoriamente ilhotas em todo o pâncreas (cabeça, corpo e cauda). Essas ilhotas tinham pelo menos dez células e não foi estipulado um limite máximo de células, com pelo menos dez células cada, sem limite máximo de células. A porcentagem de células positivas para insulina, glucagon e somatostatina foi calculada pela razão entre o número de células imunomarcadas e o total de células, com a contagem realizada no ImageJ. O valor obtido foi multiplicado por 100 (Quintanilha Gallego *et al.*, 2024).

#### 4.4 Análises séricas das enzimas antioxidantes

As análises das enzimas antioxidantes séricas foram realizadas no pâncreas total dos animais no DPN 21 (n=6). As amostras foram extraídas e homogeneizadas em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação, contendo um coquetel de inibidores de protease. Em seguida, as

amostras foram centrifugadas a 12.000 RPM por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para determinação enzimática (Lucena Périco *et al.*, 2022). As amostras foram quantificadas por métodos colorimétricos:

#### **4.4.1 Catalase:**

A atividade da catalase foi determinada pelo método descrito por (Aebi, 1984). As amostras foram diluídas 1:40 em *Sample Buffer*. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro a 540nm.

#### **4.4.2 Glutathione Peroxidase (GSH):**

Foi realizada pelo método descrito por Faure et al. (1995). As amostras foram diluídas 1:10 em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 412nm.

#### **4.4.3 Superóxido Dismutase (SOD):**

Foi realizada pelo método descrito por (Winterbourn *et al.*, 1975), as amostras foram diluídas 1:15 em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). A leitura foi realizada em espectrofotômetro 560nm, a 37 °C, durante 10 minutos, com leituras realizadas a cada minuto.

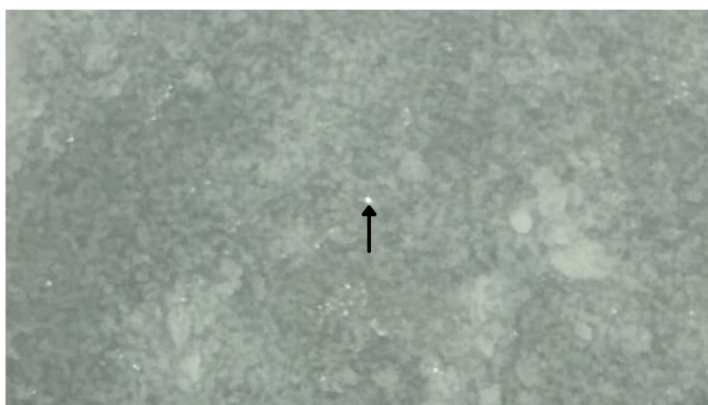
#### **4.5 Isolamento das Ilhotas Pancreáticas**

Para cada rato (n=3), foi pesado 10,5mg de Collagenase (C9263 Sigma-Aldrich) e posteriormente diluído em 15 mL de Hanks (H8264 Sigma-Aldrich) gelado (0,7 mL de collagenase/mL de Hanks). Este preparo antecedeu o procedimento do isolamento das ilhotas, sendo reservado na geladeira até o momento da coleta.

Para o isolamento das ilhotas destinadas à extração de proteína, os animais foram anestesiados e submetidos a uma incisão mediana no abdômen, permitindo a exposição da parte superior do fígado. Posteriormente, os animais foram posicionados com a cabeça voltada para a barriga, facilitando a identificação do ducto pancreático. A seção final do ducto, próxima ao intestino, foi pinçada com auxílio de uma pinça Halsted, enquanto a seção inferior foi mantida livre. Em seguida, a agulha de uma *butterfly* foi inserida no ducto pancreático, e uma linha foi passada por baixo do ducto com o auxílio de uma pinça anatômica serrilhada. Após a inserção da agulha, a linha foi amarrada ao ducto e à agulha para evitar deslocamentos durante a injeção da solução de collagenase.

Em seguida, 15 mL da solução contendo Hanks e colagenase foram injetados no pâncreas, causando sua distensão conforme a solução era administrada. Após esse processo, a pinça Halsted foi solta, e o pâncreas inflado foi cuidadosamente removido, evitando a coleta de tecidos adjacentes. Posteriormente, foi transferido para um tubo Falcon® de 15 mL e incubado em banho-maria a 37 °C por 20 minutos. Em seguida, foi adicionada solução de Hanks gelada até completar o volume de 15 mL, seguida de agitação vigorosa por 1 minuto. O tubo foi então mantido sobre gelo por 2 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi removido, e aproximadamente 2 mL de solução de Hanks foram adicionados ao precipitado. O conteúdo foi novamente decantado por 2 minutos no gelo. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado transferido para uma placa de Petri preta.

As ilhotas pancreáticas foram então isoladas manualmente com o auxílio de uma pipeta de 20 µL sob estereomicroscópio binocular com iluminação superior, sendo pescadas 100 ilhotas por animal. Por fim, as ilhotas foram transferidas para outra placa preta, onde foi realizada uma repescagem para garantir a remoção de quaisquer tecidos residuais na amostra (Figura 6). (GALLEGO *et al.*, 2024 – em revisão).



**Figura 6. Ilhota Pancreática Isolada.** Imagem de ilhota pancreática isolada no DPN21, capturada em contraste com placa de Petri preta e sinalizada pela seta.

## 4.6 Análise proteômica

### 4.6.1 Expressão proteica global por espectrometria de massas (LC-Ms/Ms)

As análises proteômicas estão sendo realizadas junto ao Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia, USP-Bauru.

### 4.6.2 Extração e quantificação proteica

As ilhotas pancreáticas dos diferentes grupos experimentais (n=3/grupo) foram homogeneizadas em vórtex na geladeira por 5 minutos de 100 mg de tecido em 500-1000µL de

tampão de lise (7M Uréia, 2M Tiouréia e 40 mM de DTT em AMBIC 50mM - Sigma-Aldrich cat #533005), em seguida passando por ultrassom com água a 4 graus Celsius por 5 minutos e, na sequência, centrifugação refrigerada a 14000 rpm, por 30 minutos. O ciclo foi repetido por 3 vezes. Ao final, o sobrenadante foi coletado. Em seguida, foi realizado o Teste de Bradford, para a quantificação total de proteínas utilizando o kit Quick Start TM Bradford Protein Assay (Bio-rad, Hercules, CA, EUA), em duplicata, segundo descrito na literatura (Bradford, 1976).

#### **4.6.3 Preparo das amostras para Espectrometria de Massas (Shotgun)**

As amostras foram subdivididas em alíquotas de 50 µL contendo 200 a 250 µg de proteínas, completado com AMBIC 50 mM até compor o volume final de 50 µL. Foi adicionado 25 µL de uma solução RapiGest SF 0,2% (Waters cat#186001861), seguido da agitação em vórtex e 10 µL AMBIC 50 mM. Em seguida, a amostra foi transferida para um bloco aquecido (37°C) e incubada por 30 minutos. Após esse período, o tubo foi centrifugado (função pulso). Foram adicionados ditioneitol (DTT) na concentração de 5 mM na amostra (BioRad, cat# 161-0611) e, novamente, foi feita agitação em vórtex. O tubo foi transferido para um bloco aquecido (37°C) e incubado por 40 min. Após esse período, a amostra permaneceu em temperatura ambiente por 2 min, sendo centrifugada em seguida (função pulso). Foi adicionado, então, iodoacetamida (IAA) na concentração de 10 mM (GE #17-1319-01 RPN6302), e foi feita agitação em vórtex. As amostras foram incubadas no escuro à temperatura ambiente por 30 min. Foram adicionados 40 µL de solução de tripsina (Pierce™ Trypsin Protease, MS Grade (90057) em 50 mM AMBIC, procedendo-se imediatamente para a digestão a 37°C overnight (por 14 horas). Após a digestão, foram adicionados 10 µL de TFA 5% (Sigma-Aldrich #80457 - 10 mL), seguido de agitação em vórtex. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C, por 90 minutos. Posteriormente foi realizada a centrifugação em 14000 rpm, a 6°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para um outro Eppendorf® para então ser iniciado o protocolo com as colunas C18Spin (Peptide Cleanup C18 Spin Columns #51882750 Marca: Agilent). Após finalização do protocolo, a amostra foi seca e enviada para análise. No momento da injeção no espectrômetro de massas, as amostras serão ressuspensas em acetonitrila 3% e ácido fórmico 0,1%.

#### **4.7 Análise estatística dos resultados**

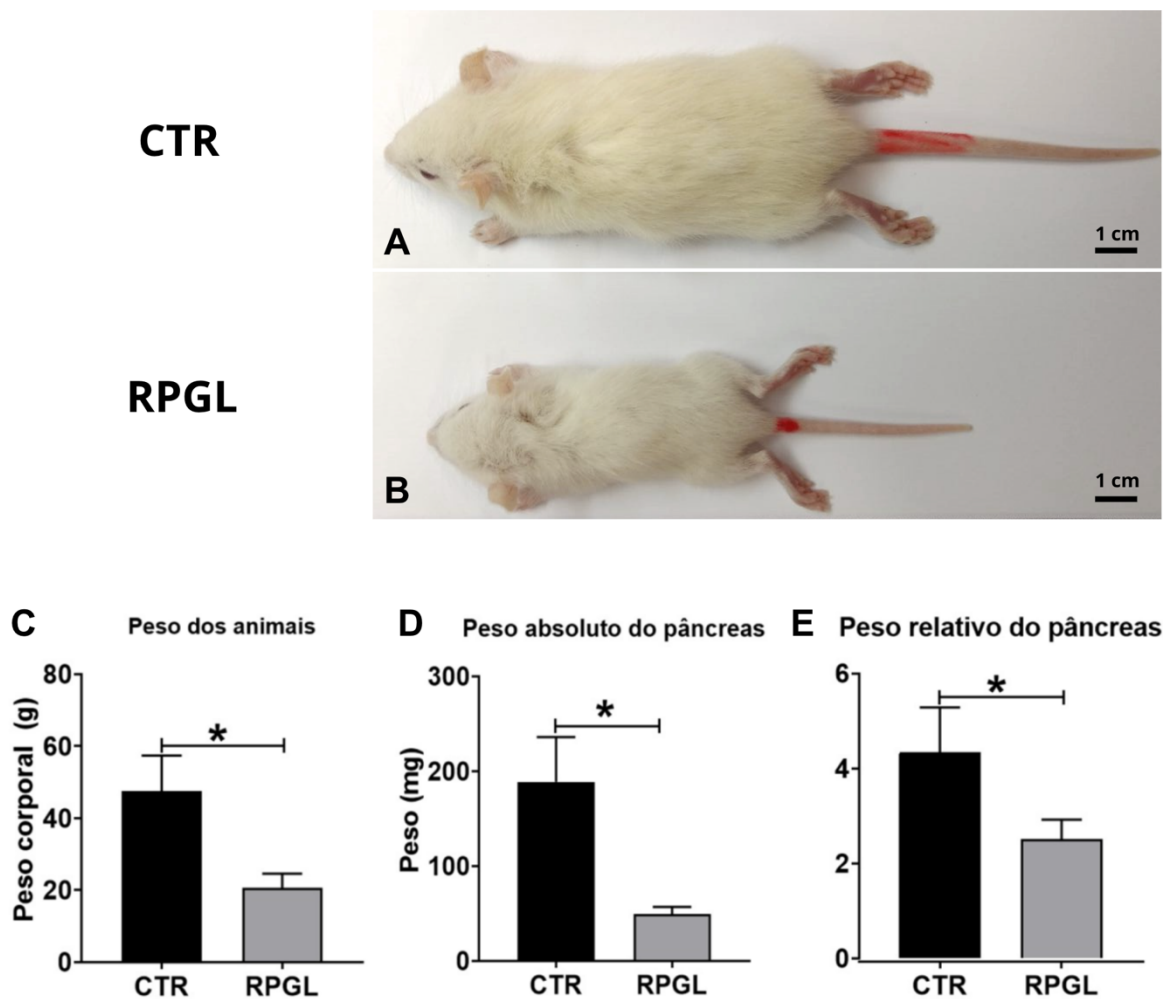
Os testes estatísticos foram realizados com o software GraphPadPrism® (versão 8.00, Graph Pad, Inc., San Diego, CA). Os resultados foram submetidos à análise de normalização (teste de Shapiro-Wilk), seguido de teste “t” Student (para os dados paramétricos) ou teste de

Mann-Whitney (para dados não paramétricos). Os dados foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 Resultados

### 5.1 Dados biométricos

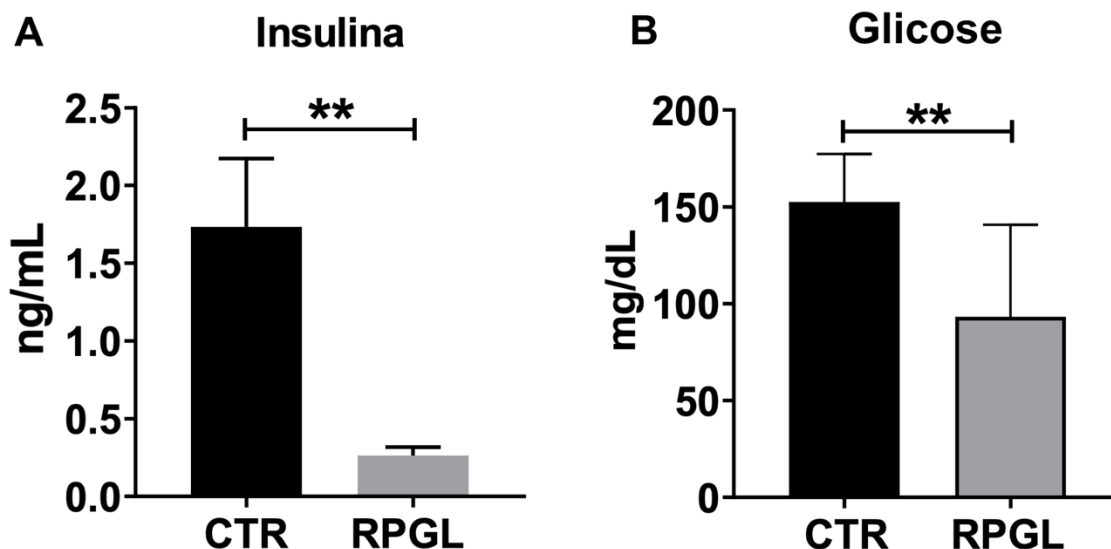
Os parâmetros biométricos da prole no DPN 21 revelaram uma redução no peso corporal dos animais do grupo RPGL em comparação ao grupo CTR (Figura 7 C), como ilustrado nas figuras 7 A e B. Além disso, os dados referentes ao pâncreas indicaram uma diminuição tanto no peso absoluto quanto no peso relativo dos animais RPGL em relação aos do grupo CTR (Figuras 7 D-E).



**Figura 7. Dados biométricos da prole no DPN 21.** Fotos representativas dos animais CTR (A) e RPGL (B) no DPN21. (C) Peso corpóreo dos animais no grupo CTR e RPGL. (D) Peso absoluto do pâncreas em ambos os grupos experimentais. (E) Imagem representativa do peso relativo dos pâncreas. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,05$ .

## 5.2 Parâmetros metabólicos da prole

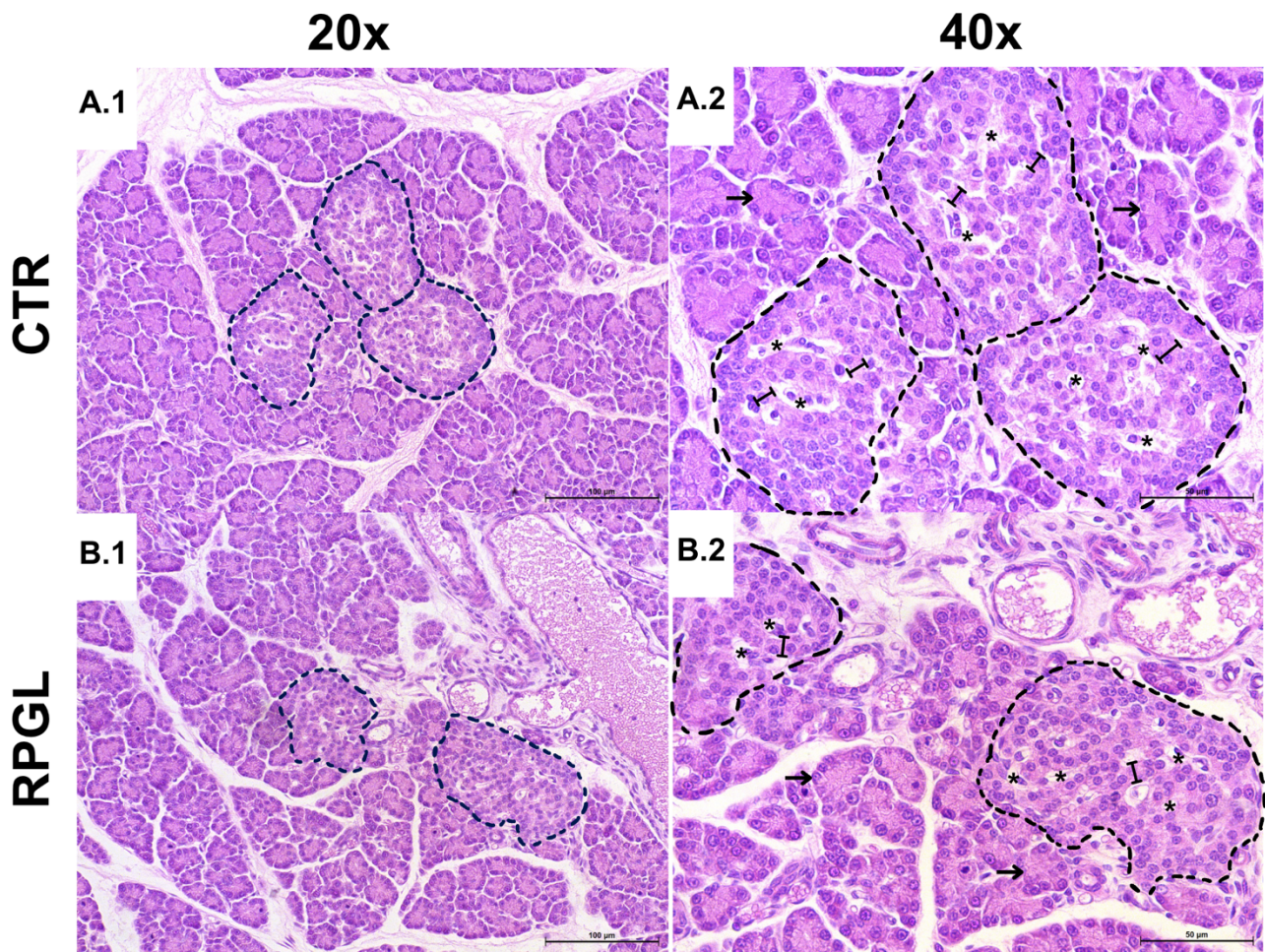
A análise dos parâmetros metabólicos da prole no DPN 21, em animais não submetidos ao jejum, revelou redução nas concentrações de insulina (Figura 8-A) e glicose plasmática (Figura 8-B) no grupo RPGL em comparação ao grupo CTR.



**Figura 8. Dados metabólicos da prole no DPN 21.** (A) Gráfico de barras mostrando a dosagem sérica de insulina dos animais no grupo CTR e RPGL. (B) Representação da glicose dos animais em ambos os grupos experimentais. Dados expressos em média ± desvio padrão. \*\*  $p < 0,01$ .

## 5.3 Parâmetros morfométricos do pâncreas da prole

Na Figura 9 estão representadas pranchas histológicas do pâncreas dos animais CTR e RPGL coradas com Hematoxilina-Eosina (Figura 9 A.1-B.2). As imagens evidenciam a morfologia das ilhotas pancreáticas, estruturas endócrinas compostas por células organizadas em cordões (indicados por traços), separadas por uma rede de capilares sanguíneos (indicados por asteriscos). As ilhotas estão circundadas por ácinos serosos, que constituem a porção exócrina do pâncreas (indicados por setas). A avaliação histológica revelou morfologia preservada das ilhotas pancreáticas em ambos os grupos, sem alterações evidentes na arquitetura das ilhotas ou na vascularização. A organização celular e a distribuição das ilhotas foram consistentes com o padrão esperado para a idade e o estágio de desenvolvimento dos animais.



**Figura 9. Fotomicrografias do pâncreas coradas com hematoxilina-eosina (HE).** As imagens mostram as ilhotas pancreáticas dos animais CTR (A.1 – A.2) e RPGL (B.1 – B.2). As ilhotas estão destacadas por círculos pontilhados e circundadas por ácinos exócrinos, indicados por setas. As células das ilhotas se organizam em cordões, indicados por traços, e são separadas por capilares sanguíneos, marcados por asteriscos. A.1 e B.1 – Aumento de 20x, barra de escala: 100 µm. A.2 e B.2 – Aumento de 40x, barra de escala: 50 µm.

Embora a análise histológica não tenha indicado alterações estruturais evidentes, a avaliação morfométrica permitiu quantificar diferenças na distribuição das ilhotas pancreáticas. Apesar da área das ilhotas não apresentar diferenças entre os grupos, a contagem das ilhotas pancreáticas no DPN 21 mostrou redução no número de ilhotas grandes ( $>10.000 \mu\text{m}^2$ ) no grupo RPGL em comparação ao grupo CTR (4,89% vs. 11,8%, respectivamente;  $p < 0,05$ ), sugerindo menor frequência de ilhotas grandes no grupo RPGL. Em contrapartida, as frequências de ilhotas médias ( $5.000\text{--}10.000 \mu\text{m}^2$ ) e pequenas ( $<5.000 \mu\text{m}^2$ ) foram semelhantes entre os grupos, com 40,44% e 54,67% no grupo RPGL, respectivamente, em comparação com 40,2% e 48,0% no grupo CTR (tabela 3).

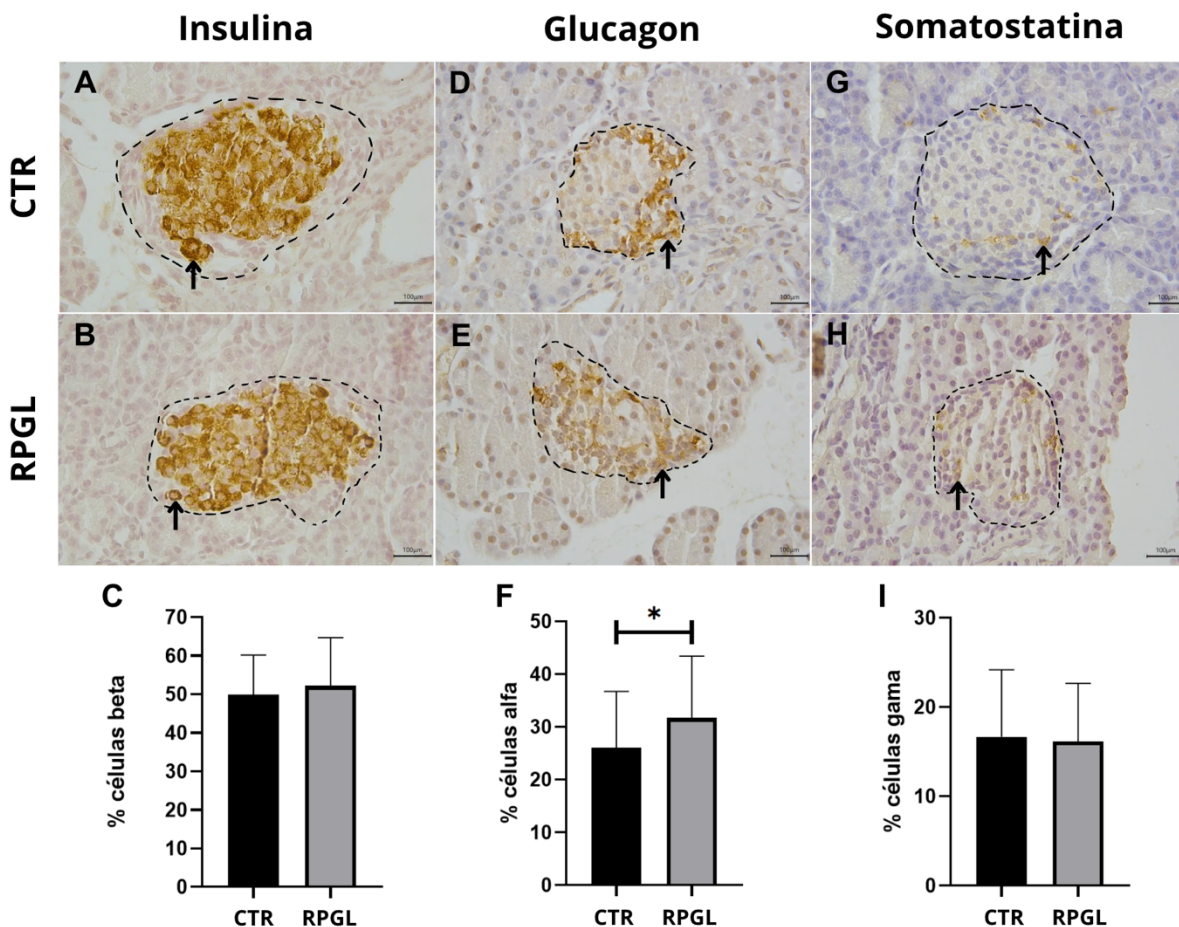
**Tabela 3.** Classificação das ilhotas em relação ao tamanho e sua contagem por grupo

Grupo	Parâmetro	Grande (>10.000 $\mu\text{m}^2$ )	Média (5.000-10.000 $\mu\text{m}^2$ )	Pequena (<5.000 $\mu\text{m}^2$ )	Total
Controle	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	13.360	6.611	3.327	229
	Número de ilhotas	27 (11.8%)	92 (40.2%)	110 (48.0%)	(100%)
Restrito	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	12.760	6.978	3.211	225
	Número de ilhotas	11 (4.89%)*	91 (40.44%)	123 (54.67%)	(100%)

Os dados foram expressos como média  $\pm$  DP; 15 a 65 ilhotas foram analisadas por animal. \*p<0,05.

#### 5.4 Imuno-histoquímica

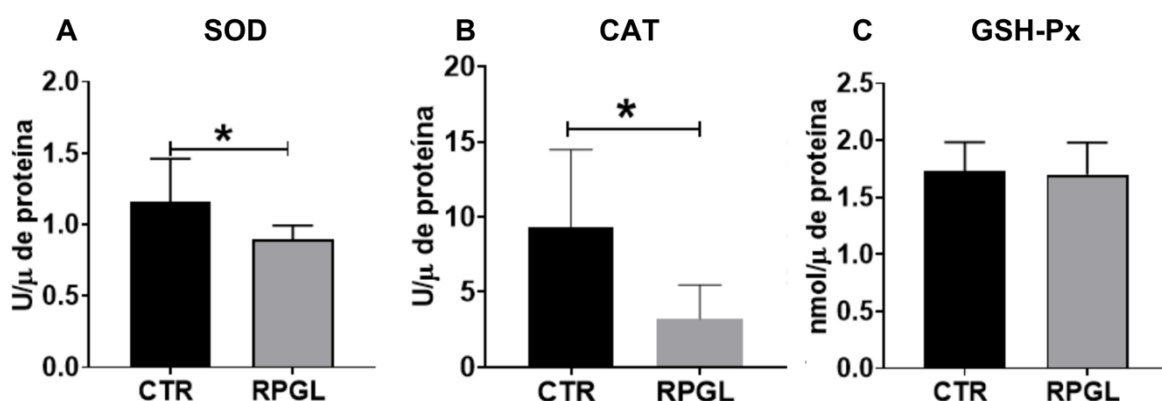
A imunomarcagem positiva para hormônios pancreáticos insulina, glucagon e somatostatina foi observada nos grupos controle e RPGL, conforme demonstrado na Fig. 8. As imagens obtidas foram utilizadas para quantificação das células positivas para cada hormônio. Embora não tenha sido observada diferença significativa nas porcentagens de células positivas para insulina (Fig. 10 - C) e somatostatina (Fig. 10 - I), uma maior porcentagem de células positivas para glucagon foi observada no pâncreas do grupo RPGL em comparação com o grupo CTR (Fig. 10 - F).



**Figura 10. Imagens representativas da imuno-histoquímica e respectivas quantificações utilizando anticorpos anti-insulina (células  $\beta$ ), anti-glucagon (células  $\alpha$ ) e anti-somatostatina (células  $\delta$ ) em ilhotas pancreáticas no 21º dia pós-natal. A e B – Fotomicrografias do pâncreas de animais CTR (A) e RPGL (B), evidenciando a imunomarcagem citoplasmática positiva para insulina no centro das ilhotas pancreáticas. C – Quantificação da área positiva para insulina. D e E – Fotomicrografias do pâncreas de animais CTR (D) e RPGL (E), mostrando a imunomarcagem citoplasmática de glucagon localizada predominantemente ao redor das ilhotas. F – Quantificação da área positiva para glucagon. G e H – Fotomicrografias do pâncreas de animais CTR (G) e RPGL (H), revelando a imunomarcagem citoplasmática de somatostatina, majoritariamente ao redor das ilhotas pancreáticas. I – Quantificação da área positiva para somatostatina. Exemplos de células imunomarcadas positivamente foram indicadas por setas. As ilhotas pancreáticas estão destacadas por círculos pretos tracejados. Aumento de 40 $\times$ , barra de escala: 100  $\mu$ m. \* $p$ <0,05.**

## 5.5 Estresse Oxidativo

A análise da atividade das enzimas antioxidantes no DPN 21 revelou redução da atividade enzimática da SOD e CAT (Figura 11A-B) nos animais do grupo RPGL em comparação ao grupo CTR. No entanto, não houve diferença estatística nos níveis de GSH-Px no pâncreas entre os grupos (Figura 11C).



**Figura 11. Dados da Atividade das Enzimas Antioxidantes no pâncreas da prole no DPN 21.** Representação da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) (A), Catalase (CAT) (B) e Glutaciona Peroxidase (GSH-Px) no pâncreas dos animais dos grupos CTR e RPGL. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p$ <0,05.

## 6 Discussão

É amplamente reconhecido que condições adversas, como a restrição proteica materna (RPM), durante períodos críticos do desenvolvimento, como a proliferação e diferenciação celular, promovem o remodelamento tecidual, resultando em órgãos menores e número reduzido de unidades funcionais, respectivamente (Langley-Evans, 2015). Nesse contexto, estudos experimentais têm demonstrado que a RPM durante a gestação é um fator determinante para o baixo peso ao nascimento da prole (Colombelli *et al.*, 2017; Santos, S. A. A. *et al.*, 2019). Esse comprometimento tanto no crescimento quanto no metabolismo fetal está diretamente

relacionado aos distúrbios na homeostasia glicêmica, os quais impactam negativamente o desenvolvimento de órgãos e sistemas essenciais, como o pâncreas (Frantz *et al.*, 2011). Nossos resultados se alinham com essas evidências, demonstrando que a redução do peso corporal dos animais do grupo RPGL em comparação ao grupo CTR persiste até o dia pós-natal 21. Além disso, tanto o peso absoluto quanto o relativo do pâncreas também foram significativamente menores nos animais do grupo RPGL em relação ao controle, indicando que a RPM afeta estruturalmente a glândula pancreática.

Esses impactos se estendem à fração endócrina do órgão, com nossos resultados mostrando menor frequência de ilhotas maiores no grupo RPGL em relação ao grupo controle. Mudanças na massa e composição celular das ilhotas pancreáticas são resultantes do equilíbrio altamente regulado de apoptose, neogênese e proliferação das células que a compõem. Estudos descreveram que a deficiência em proteína leva a redução do número de células  $\beta$ , diminuição da liberação de insulina e intolerância à glicose e resistência à insulina na idade adulta (CALZADA *et al.*, 2016; KING *et al.*, 2019). Bautista e seus colaboradores (2019), que a RPM gestacional está associada ao atraso na diferenciação da glândula mamária materna e à produção de leite reduzida, afetando a ingestão de nutrientes pelos filhotes e comprometendo o desenvolvimento de múltiplos órgãos até o desmame. Nesse contexto, é também demonstrado que a massa diminuída de células  $\beta$  em indivíduos com baixo peso ao nascer está diretamente vinculada ao risco aumentado de desenvolvimento de DM2 (Sasaki *et al.*, 2020). Esse risco é ainda mais acentuado em indivíduos que, além de nascer com baixo peso, apresentam crescimento pós-natal acelerado (*catch-up growth*), o que os torna mais propensos a desenvolver resistência à insulina e outras complicações metabólicas na vida adulta (Agnoux *et al.*, 2015; Berends *et al.*, 2013), o que destaca a importância do padrão de crescimento pós-natal e sua influência no desenvolvimento de disfunções metabólicas. Nossos resultados corroboram essas observações, mas diferem de um estudo conduzido por Calzada *et al.* (2016), que, ao submeter ratas fêmeas à restrição proteica gestacional (10% de proteína) tenha observado aumento na presença de ilhotas maiores no grupo restrito em várias idades. Essa diferença pode ser atribuída às variações nas condições experimentais, como a porcentagem de proteína utilizada e o modelo animal adotado, onde a restrição não se estendeu à lactação.

Alterações nesta distribuição das ilhotas pancreáticas podem estar correlacionadas com as modificações observadas nos perfis hormonais. Em nosso estudo, além da redução na concentração de insulina e aumento nos níveis de glucagon, também observamos diminuição nos níveis de glicemia. Zambrano *et al.* (2006) e Fagundes *et al.* (2007) também descreveram

menor glicemia em ratos adultos submetidos a RPM gestacional e lactacional (10% e 8% de proteína, respectivamente). Além disso, observaram uma diminuição nos níveis (Fagundes *et al.*, 2007) e sensibilidade à insulina (Zambrano *et al.*, 2006), sugerindo que, apesar da restrição proteica, os sistemas metabólicos dos filhotes se adaptaram para regular melhor os níveis de glicose. Esse perfil pode estar relacionado à hipercorticosteronemia e ao aumento das catecolaminas, o que sugere um estado hipermetabólico, caracterizado por menor adiposidade e peso corporal, como descrito por Fagundes *et al.* (2007). Tais alterações podem também estar associadas ao aumento da expressão de PPAR $\gamma$  nas ilhotas pancreáticas de descendentes masculinos, conforme observado em estudos prévios com animais submetidos à restrição proteica materna gestacional (8% de proteína), por conta de seu papel na regulação do metabolismo, homeostase da glicose e biogênese mitocondrial, podendo reduzir níveis de insulina. Já foi descrito que o aumento da expressão de PPAR $\gamma$  pode aumentar a produção de ROS (Theys, Bouckenooghe, *et al.*, 2009; Theys *et al.*, 2011).

Isso mostra que essas alterações podem também estar relacionadas a diminuição das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) encontrada no grupo RPGL. Estudos na área de programação fetal, como os de Hedge *et al.* (1997) e Tarry-Adkins *et al.* (2009), destacam que as células  $\beta$ -pancreáticas são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo, em grande parte devido à sua programação mitocondrial. Essa maior vulnerabilidade resulta da combinação de alta demanda energética e baixos níveis de antioxidantes das células  $\beta$  aliados à depressão do sistema de defesa antioxidante, produção energética reduzida e aumento de espécies reativas de oxigênio causada pela RPM (Frantz *et al.*, 2011).

Esses danos vistos em animais submetidos a RPM parecem ser sexo-dependentes, com o perfil masculino apresentando maior comprometimento associados à redução da massa de células  $\beta$ , maior produção de ROS associados a alteração na expressão de proteínas e receptores mitocondriais cruciais no metabolismo celular e na regulação da homeostase energética (Frantz *et al.*, 2011; Reusens *et al.*, 2011). Esse desequilíbrio no sistema antioxidante ocorre por conta de sua modulação das principais vias reguladoras nas células  $\beta$  pancreáticas, como a ativação da AMPK, a inibição do mTOR e a ativação da JNK. Embora a ativação da AMPK a curto prazo exerça efeitos protetores, como a inibição do mTOR, e o aumento da autofagia e da liberação de insulina, a longo prazo, essa ativação pode ser prejudicial ao ativar o ERK e inibir o mTOR, o que resulta em uma redução da proliferação de células  $\beta$ . A desregulação do mTOR, por sua vez, induz a apoptose mitocondrial, disfunção mitocondrial e redução da secreção de

insulina. Finalmente, a ativação do JNK pode inibir vias que favorecem a translocação nuclear de Pdx1, levando à diminuição da deficiência das células  $\beta$  e à redução da insulina (Eguchi *et al.*, 2021).

Além disso, o aumento do estresse oxidativo também pode desencadear a ativação do FOXO1, levando à sua translocação para o núcleo celular, onde suprime a expressão do GLUT-2 (Salimi *et al.*, 2022), transportador necessário para a sinalização da glicose cuja supressão esta associada ao controle prejudicado da massa e função das células  $\beta$  (Thorens, 2015).

Dessa forma, o estresse oxidativo evidenciado pela redução de SOD e a CAT, sugere que essas enzimas podem estar sendo consumidas em excesso, o que resulta em dano tecidual potencial à glândula. Isso atrelado ao baixo peso dos animais, diminuição dos níveis de secreção de insulina e glicemia e aumento da secreção de glucagon demonstram que a RPM acarreta alterações estruturais, metabólicas e funcionais pancreáticas, podendo aumentar o risco de desenvolvimento de disfunções metabólicas ao longo da vida, como diminuição da secreção e resistência a insulina, fatores determinantes para o desenvolvimento do DM2. O estresse oxidativo parece ser um dos mecanismos centrais nesse processo, mas mais análises em relação as células  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\delta$  precisam ser feitas. Com a avaliação do perfil proteômico das ilhotas pancreáticas isoladas desses animais poderemos ter uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos responsáveis pelas alterações morfofuncionais descritas nesse trabalho.

## **7 Dificuldades encontradas**

Uma das principais dificuldades deste estudo foi a realização da análise proteômica, conduzida em parceria com o Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia, USP-Bauru. As amostras foram enviadas para análise em agosto de 2024; no entanto, os resultados ainda não foram disponibilizados devido a problemas técnicos no equipamento, que permanece inoperante até o presente. Essa situação comprometeu a obtenção e a interpretação dos dados proteômicos dentro do cronograma inicialmente planejado.

## 8 Referências

- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, 1984.
- AGNOUX, A. M. *et al.* Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: Potential role on pup growth and metabolic status. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 7, p. 784–795, 2015.
- AHMED, M.; FORSBERG, J.; BERGSTEN, P. Protein profiling of human pancreatic islets by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 3, p. 931–940, Maio 2005.
- ALFANO, R. *et al.* A multi-omic analysis of birthweight in newborn cord blood reveals new underlying mechanisms related to cholesterol metabolism. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 110, 1 set. 2020.
- ARMITAGE, J. A. *et al.* **Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: How strong is the evidence from experimental models in mammals?** **Journal of Physiology**, 1 Dez. 2004.
- BAKHTI, M.; BÖTTCHER, A.; LICKERT, H. **Modelling the endocrine pancreas in health and disease.** **Nature Reviews Endocrinology**. Nature Publishing Group, 1 mar. 2019.
- BARKER, D. J. *et al.* Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**, v. 298, p. 564–567, 4 mar. 1989.
- BARKER, D. J. P. *et al.* Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **BMJ**, v. 301, p. 259–262, 4 ago. 1990.
- \_\_\_\_\_. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, p. 171–4, Jul. 1995.
- BAROUKI, R. *et al.* Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. **Environmental health: a global access science source**, v. 11, n. 1, 2012.
- BERENDS, L. M. *et al.* Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 8, p. 1051–1057, ago. 2013.
- BERENDS, L. M. *et al.* Programming of central and peripheral insulin resistance by low birthweight and postnatal catch-up growth in male mice. **Diabetologia**, v. 61, n. 10, p. 2225–2234, 1 out. 2018.
- BERNEY, D. M. *et al.* The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. *The Journal of Pathology*, 183(1), 109–115 | 10.1002/(SICI)1096-9896(199709)183:1<109: AID-PATH1091>3.0.CO;2-B. **The Journal of Pathology**, p. 109–115, 1997.
- BONNER-WEIR, S. *et al.* **New Perspectives on the Microvasculature of the Islets of Langerhans in the Rat DIABETES.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/31/10/883/352038/31-10-883.pdf>>.
- BONNER-WEIR, S.; AGUAYO-MAZZUCATO, C.; WEIR, G. C. **Dynamic development of the pancreas from birth to adulthood.** **Upsala Journal of Medical Sciences.** Taylor and Francis Ltd, , 2 abr. 2016.
- BRADFORD, M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY.** [s.l: s.n.].
- BURKI, T. **Food security and nutrition in the world.** **The Lancet Diabetes and Endocrinology.** Elsevier Ltd, 1 set. 2022.
- CABEÇO, L. C. *et al.* Maternal protein restriction induce skeletal muscle changes without altering the MRFs MyoD and myogenin expression in offspring. **Journal of Molecular Histology**, v. 43, n. 5, p. 461–471, out. 2012.

- CALZADA, L. *et al.* Maternal protein restriction during gestation impairs female offspring pancreas development in the rat. **Nutrition Research**, v. 36, n. 8, p. 855–862, 1 ago. 2016a.
- \_\_\_\_\_. Maternal protein restriction during gestation impairs female offspring pancreas development in the rat. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, v. 36, n. 8, p. 855–862, 1 ago. 2016b.
- CAMPBELL, J. E.; NEWGARD, C. B. **Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion.** **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** Nature Research, 1 fev. 2021.
- CAMPISANO, S. E. *et al.* Protein malnutrition during fetal programming induces fatty liver in adult male offspring rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 73, n. 2, p. 275–285, 1 maio 2017.
- CAVARIANI, M. M. *et al.* Maternal protein restriction differentially alters the expression of AQP1, AQP9 and VEGFr-2 in the epididymis of rat offspring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 1 fev. 2019.
- CHAMSON-REIG, A. *et al.* Altered pancreatic morphology in the offspring of pregnant rats given reduced dietary protein is time and gender specific. **Journal of Endocrinology**, v. 191, n. 1, p. 83–92, out. 2006.
- CLEAVER, O.; DOR, Y. **Vascular instruction of pancreas development.** **Development (Cambridge)**, 15 ago. 2012.
- COLOMBELLI, K. T. *et al.* Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. **General and Comparative Endocrinology**, v. 246, p. 258–269, 15 maio 2017.
- CORBIN, K. L. *et al.* **A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment Revisited Biological Procedures Online.** BioMed Central Ltd, 1 dez. 2021.
- DAHRI, S. *et al.* Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. **Diabetes**, v. 40 Suppl 2, n. SUPPL. 2, p. 115–120, 1991.
- DASSAYE, R.; NAIDOO, S.; CERF, M. E. **Transcription factor regulation of pancreatic organogenesis, differentiation and maturation. Islets.** Taylor and Francis Inc, 2016.
- DEFRONZO, R. A. The Triumvirate: p-Cell, Muscle, Liver: A Collusion Responsible for NIDDM. **Diabetes**, 1 jun. 1988.
- DEFRONZO, R. A. **Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: The missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. Diabetologia.** Springer Verlag, 1 jul. 2010.
- DUMORTIER, O. *et al.* Maternal protein restriction leads to pancreatic failure in offspring: role of misexpressed microRNA-375. **Diabetes**, v. 63, n. 10, p. 3416–3427, 1 out. 2014.
- EGUCHI, N. *et al.* **The role of oxidative stress in pancreatic  $\beta$  cell dysfunction in diabetes.** **International Journal of Molecular Sciences.** MDPI AG, 2 fev. 2021.
- ENGLAND, I. N.; BARKER, W. D. J. P.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, v. 327, p. 1077–1081, 10 maio 1986.
- FAGUNDES, A. T. S. *et al.* Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 5, p. 922–928, nov. 2007.
- FAURE, P.; LAFOND, J.-L. **Analysis of Free Radicals in Biological Systems Favier et al. (ods) Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation.** [s.l: s.n.].
- FERRANNINI, E.; DEFONZO, R. A. **Insulin actions in vivo: glucose metabolism.** [s.l: s.n.].
- FRANTZ, E. D. C. *et al.* Transgenerational endocrine pancreatic adaptation in mice from maternal protein restriction in utero. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 3, p. 110–116, mar. 2011.
- GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. **Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach.** **Biological Chemistry.** Walter de Gruyter GmbH, 26 set. 2017.
- GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; LOW, F. M. **The role of developmental plasticity and epigenetics in human health. Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews,** mar. 2011.
- GOULD, J. M. *et al.* Mouse maternal protein restriction during preimplantation alone permanently alters brain neuron proportion and adult short-term memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 31, p. E7398–E7407, 31 jul. 2018.

- HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 53 (7), p. 595–601, jul. 1992.
- HEDGE, M. *et al.* Relation Between Antioxidant Enzyme Gene Expression and Antioxidative Defense Status of Insulin-Producing Cells. **Diabetes**, v. 46, nov. 1997.
- HOFFMAN, D. J.; REYNOLDS, R. M.; HARDY, D. B. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. **Nutrition reviews**, v. 75, n. 12, p. 951–970, dez. 2017.
- IGNÁCIO-SOUZA, L. M. *et al.* Protein restriction in early life is associated with changes in insulin sensitivity and pancreatic  $\beta$ -cell function during pregnancy. **The British journal of nutrition**, v. 109, n. 2, p. 236–247, 28 jan. 2013.
- JABARY, M. *et al.* Fetal growth restriction followed by early catch-up growth impairs pancreatic islet morphology in male rats. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.
- JAHAN-MIHAN, A. *et al.* **The role of maternal dietary proteins in development of metabolic syndrome in offspring.** **Nutrients**. MDPI AG, 6 nov. 2015.
- KESAVAN, K.; DEVASKAR, S. U. **Intrauterine Growth Restriction: Postnatal Monitoring and Outcomes** **Pediatric Clinics of North America**. W.B. Saunders, 1 abr. 2019.
- KHAZAEI, R. *et al.* Maternal protein restriction during perinatal life affects lung mechanics and the surfactant system during early postnatal life in female rats. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2019.
- KING, R. *et al.* Offspring of mice exposed to a low-protein diet in utero demonstrate changes in mTOR signaling in pancreatic islets of langerhans, associated with altered glucagon and insulin expression and a lower  $\beta$ -cell mass. **Nutrients**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2019.
- LANGLEY-EVANS, S. Nutrigenetics and the early life origins of health and disease. *Em: Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics: Fundamentals of Individualized Nutrition*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 113–119.
- LANGLEY-EVANS, S. C. **Nutrition in early life and the programming of adult disease: A review.** **Journal of Human Nutrition and Dietetics**. Blackwell Publishing Ltd, 1 jan. 2015.
- LANGLEY-EVANS, S. C.; PHILLIPS, G. J.; JACKSON, A. A. In utero exposure to maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of maternal blood pressure changes. **Clinical Nutrition**, v. 13 (5), p. 319–24, out. 1994.
- LI, Y. *et al.* A maternal low-protein diet impaired glucose metabolism and altered the lncRNA profiles of islets in adult offspring. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 128, 1 jun. 2024.
- LIU, X. *et al.* **Maternal protein restriction alters VEGF signaling and decreases pulmonary alveolar in fetal rats** **Int J Clin Exp Pathol**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.ijcep.com/>.
- LIU, Y. *et al.* **Signaling pathways of oxidative stress response: the potential therapeutic targets in gastric cancer** **Frontiers in Immunology**. Frontiers Media S.A., 2023.
- LUCENA PÉRICO, L. *et al.* Role of the antioxidant pathway in the healing of peptic ulcers induced by ischemia–reperfusion in male and female rats treated with *Eugenia punicifolia*. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 4, p. 1383–1394, 1 ago. 2022.
- MARTIN, L. J. *et al.* Maternal High-Protein and Low-Protein Diets Perturb Hypothalamus and Liver Transcriptome and Metabolic Homeostasis in Adult Mouse Offspring. **Frontiers in Genetics**, v. 9, 11 dez. 2018.
- MERICQ, V. *et al.* Long-term metabolic risk among children born premature or small for gestational age. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 50–62, ago. 2016.
- METZ, T. O. *et al.* Characterization of the human pancreatic islet proteome by two-dimensional LC/MS/MS. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 12, p. 3345–3354, dez. 2006.
- MIAO, L.; CLAIR, D. K. ST. **Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease.** **Free Radical Biology and Medicine**, 15 ago. 2009.
- MORIMOTO, S. Developmental programming of aging of isolated pancreatic islet glucose-stimulated insulin secretion in female offspring of mothers fed low-protein diets in pregnancy and/or lactation. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 3, n. 6, p. 483–488, 1 dez. 2012.
- NANDI, A. *et al.* Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.
- NORTON, L. *et al.* **Insulin: The master regulator of glucose metabolism.** **Metabolism: Clinical and Experimental**. W.B. Saunders, 1 abr. 2022.

- PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, p. 89–96, jun. 2008.
- QASEM, R. J. *et al.* Maternal protein restriction during pregnancy and lactation alters central leptin signalling, increases food intake, and decreases bone mass in 1 year old rat offspring. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 4, p. 494–502, 1 abr. 2016.
- QUINTANILHA GALLEGO, F. *et al.* Effect of transgenerational diabetes via maternal lineage in female rats. **Heliyon**, v. 10, n. 10, 30 maio 2024.
- RAMADAN, W. S.; ALSHIRAIHI, I.; AL-KARIM, S. Effect of maternal low protein diet during pregnancy on the fetal liver of rats. **Annals of Anatomy**, v. 195, n. 1, p. 68–76, jan. 2013.
- RAVELLI, A. C. *et al.* Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. **The American Journal of Clinical Nutrition**, nov. 1999.
- RAVELLI, G.-P.; STEIN ZENA A; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **The New England Journal of Medicine**, v. 295, p. 349–353, 12 ago. 1976.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. **AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet**. *J. Nutr.* [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article-abstract/123/11/1939/4722783>>.
- REUSENS, B. *et al.* **Maternal malnutrition programs the endocrine pancreas in progeny.** *American Journal of Clinical Nutrition.* **Anais.** 1 dez. 2011
- RINALDI, J. C. *et al.* Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. **Life Sciences**, v. 92, n. 13, p. 763–774, 19 abr. 2013.
- RIZZI, V. H. G. *et al.* Impact of long-term high-fat diet intake gestational protein-restricted offspring on kidney morphology and function. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, n. 1, p. 89–100, 1 fev. 2017.
- RÖDER, P. V. *et al.* **Pancreatic regulation of glucose homeostasis.** **Experimental & molecular medicine**, 11 mar. 2016.
- ROSEBOOM, T.; ROOIJ, S. DE; PAINTER, R. **The Dutch famine and its long-term consequences for adult health.** **Early Human Development**, ago. 2006.
- SALIMI, M. *et al.* Perinatal stress exposure induced oxidative stress, metabolism disorder, and reduced GLUT-2 in adult offspring of rats. **Hormones**, v. 21, n. 4, p. 625–640, 1 dez. 2022.
- SANTOS, S. A. A. *et al.* Maternal low-protein diet impairs prostate growth in young rat offspring and induces prostate carcinogenesis with aging. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 74, n. 6, p. 751–759, 16 maio 2019.
- SANTOS, S. A. A. *et al.* Identification of potential molecular pathways involved in prostate carcinogenesis in offspring exposed to maternal malnutrition. **Aging**, v. 12, 13 out. 2020.
- SANTOS, T. DE M. *et al.* Maternal protein restriction modulates angiogenesis and AQP9 expression leading to a delay in postnatal epididymal development in rat. **Cells**, v. 8, n. 9, 1 set. 2019.
- SARLES, H. *et al.* **Effect of Parental Malnutrition on Enzyme Content of Rat Pancreas.** **Digestive Diseases and Sciences.** [s.l.: s.n.].
- SASAKI, H. *et al.* Associations of birthweight and history of childhood obesity with beta cell mass in Japanese adults. **Diabetologia**, v. 63, n. 6, p. 1199–1210, 1 jun. 2020.
- SCHVARTZ, D. *et al.* The Human Diabetes Proteome Project (HDPP): The 2014 update. **Translational Proteomics**, v. 8–9, p. 1–7, 1 dez. 2015.
- SERPENTE, P. *et al.* Quantification of fetal organ sparing in maternal low-protein dietary models. **Wellcome open research**, v. 6, p. 218, 4 maio 2022.
- SLACK, J. M. W. Developmental biology of the pancreas. **Development**, v. 121, p. 1569–1580, 1995.
- SOSA-LARIOS, T. C.; CERBÓN, M. A.; MORIMOTO, S. Epigenetic alterations caused by nutritional stress during fetal programming of the endocrine pancreas. **Archives of medical research**, v. 46, n. 2, p. 93–100, 1 fev. 2015.
- SU, Y. *et al.* Maternal low protein isocaloric diet suppresses pancreatic  $\beta$ -cell proliferation in mouse offspring via miR-15b. **Endocrinology**, v. 157, n. 12, p. 4782–4793, 1 dez. 2016.
- SULYOK, E.; FARKAS, B.; BODIS, J. **Pathomechanisms of Prenatally Programmed Adult Diseases Antioxidants.** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 jul. 2023.

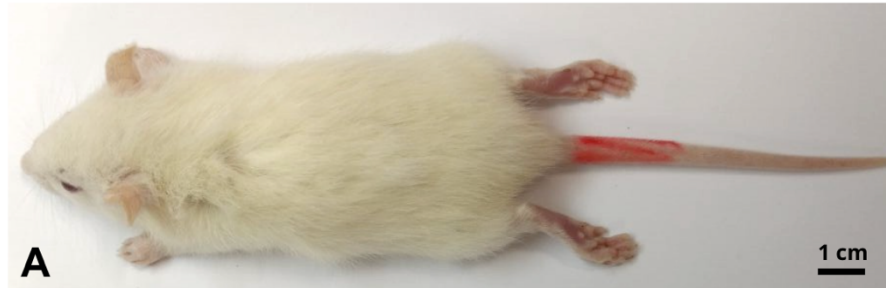
- TAIN, Y. L.; HSU, C. N. **Interplay between maternal nutrition and epigenetic programming on offspring hypertension.** *Journal of Nutritional Biochemistry*. Elsevier Inc., 1 maio 2024.
- TARRY-ADKINS, J. L. *et al.* Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to telomere shortening and increased markers of cell senescence in rat islets. *The FASEB Journal*, v. 23, n. 5, p. 1521–1528, maio 2009.
- TARRY-ADKINS, J. L. *et al.* Insulin-signalling dysregulation and inflammation is programmed trans-generationally in a female rat model of poor maternal nutrition. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- THEYS, N.; BOUCKENOOGHE, T.; *et al.* Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 297, p. 1516–1525, 2009.
- THEYS, N.; CLIPPE, A.; *et al.* Early low protein diet aggravates unbalance between antioxidant enzymes leading to islet dysfunction. *PLoS ONE*, v. 4, n. 7, 1 jul. 2009.
- THEYS, N. *et al.* Maternal malnutrition programs pancreatic islet mitochondrial dysfunction in the adult offspring. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 22, n. 10, p. 985–994, out. 2011.
- THORENS, B. **GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis.** *Diabetologia*. Springer Verlag, , 1 fev. 2015.
- TOPF, F. *et al.* **The Human Diabetes Proteome Project (HDPP): From network biology to targets for therapies and prevention.** *Translational Proteomics*. Elsevier B.V., 2013.
- VALENTE, J. S. *et al.* Maternal protein restriction changes structural and metabolic gene expression in the skeletal muscle of aging offspring rats. *Histology and Histopathology*, v. 36, n. 8, p. 853–867, 1 ago. 2021.
- VALENTE, R. *et al.* **Interactions between the Exocrine and the Endocrine Pancreas.** *Journal of Clinical Medicine*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 fev. 2024.
- VIPIN, V. A.; BLESSON, C. S.; YALLAMPALLI, C. Maternal low protein diet and fetal programming of lean type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes*, v. 13, n. 3, p. 185–202, 15 mar. 2022.
- WADHWA, P. D. *et al.* **Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms.** *Seminars in Reproductive Medicine*, set. 2009.
- WARNER, H. R. **SUPEROXIDE DISMUTASE, AGING, AND DEGENERATIVE DISEASE.** *Free Radical Biology & Medicine*. [s.l: s.n.].
- WINTERBOURN, C. C. *et al.* The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med*, v. 69, 1975.
- YARIBEYGI, H. *et al.* Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2020, 2020.
- ZAMBRANO, E. *et al.* A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *Journal of Physiology*, v. 571, n. 1, p. 221–230, fev. 2006.
- ZAMBRANO, E. *et al.* **Fetal programming of sexual development and reproductive function.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 25 jan. 2014.
- ZHENG, J. *et al.* Maternal low-protein diet modulates glucose metabolism and hepatic microRNAs expression in the early life of offspring. *Nutrients*, v. 9, n. 3, 1 mar. 2017.
- ZHOU, Q.; MELTON, D. A. **Pancreas regeneration.** *Nature*. Nature Publishing Group, 17 maio 2018.

## 9 Anexos

### 9.1 Imagens dos animais com escala de referência.

I.

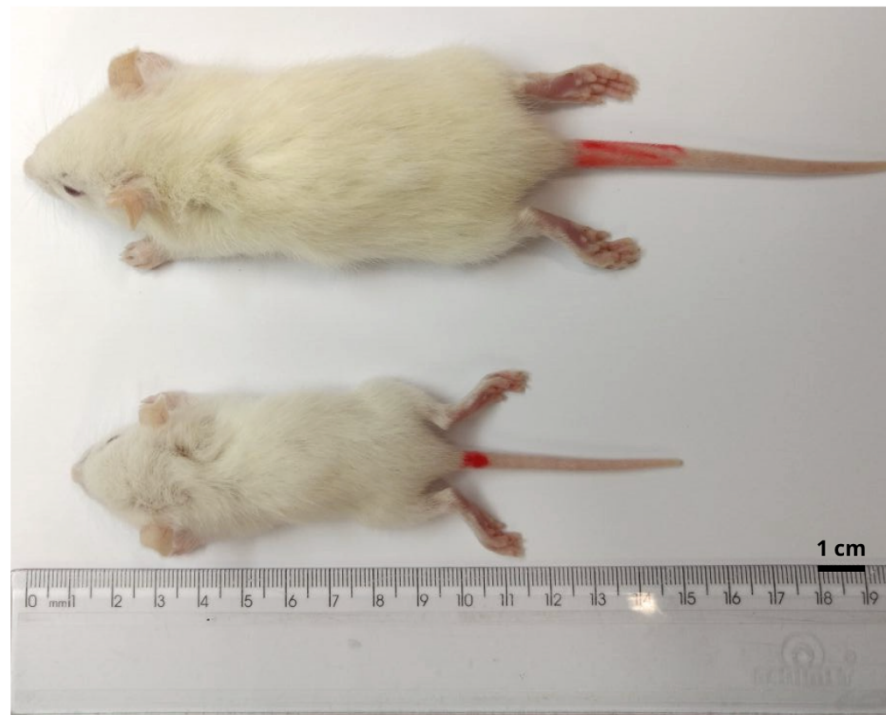
CTR



RPGL

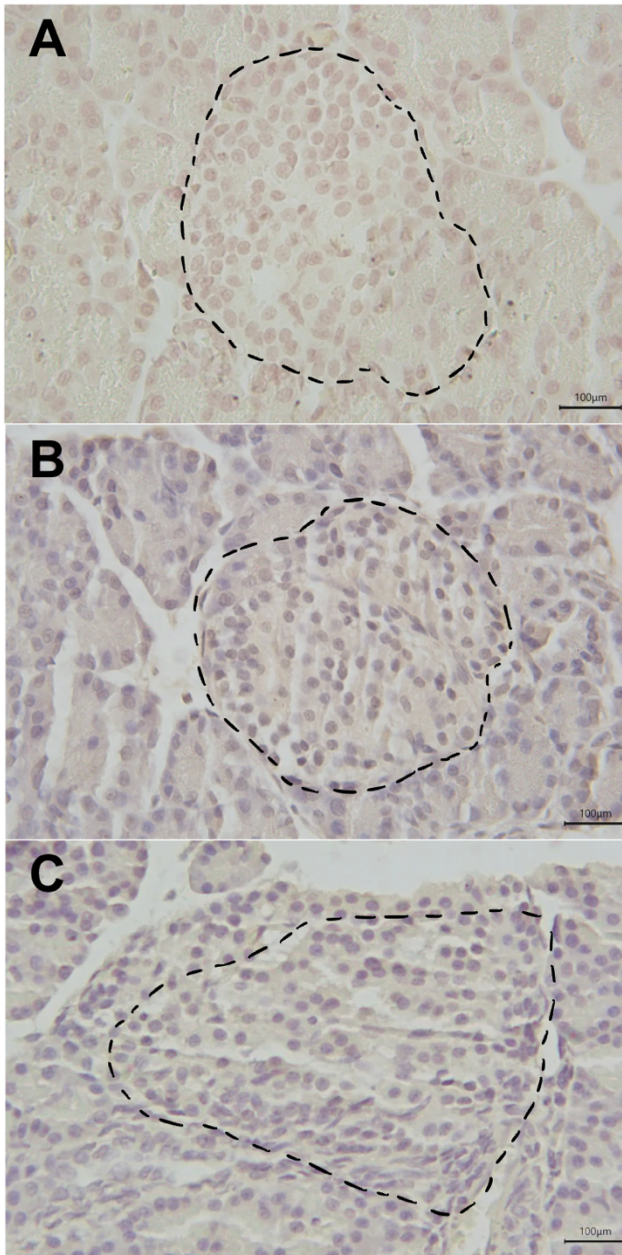


II.



**Figura 12. Fotografia dos animais com escala de referência para padronização das medidas.** Imagem I corresponde à versão utilizada no texto, enquanto II apresenta a imagem original com a escala de 1 cm. A escala encontra-se alinhada em ambas.

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



**Figura 13. Controle-negativo das imunomarcações usando anticorpos: (A) anti-insulina; (B) anti-glucagon e (C) anti-somatostatina. As ilhotas pancreáticas estão indicadas por intermédio do círculo pontilhado preto. Aumento de 40x. Barra de escala: 100 µm.**