

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/02/2022.

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

Carolina Abreu Miranda

**Avaliação de fatores de crescimento envolvidos no
pâncreas endócrino de ratas com diabetes moderado em
diferentes momentos da vida**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em
Tocoginecologia.
Área de Concentração: Ciências da
Saúde

Orientadora: **Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno**
Coorientadora: **Profa. Dra. Yuri Karen Sinzato**

**Botucatu
2020**

Carolina Abreu Miranda

Avaliação de fatores de crescimento envolvidos no
pâncreas endócrino de ratas com diabetes moderado
em diferentes momentos da vida

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em
Tocoginecologia.
Área de Concentração: Ciências da
Saúde.

Orientadora: **Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno**

Coorientadora: **Profa. Dra. Yuri Karen Sinzato**

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Miranda, Carolina Abreu.

Avaliação de fatores de crescimento envolvidos no pâncreas endócrino de ratas com diabete moderado em diferentes momentos da vida / Carolina Abreu Miranda. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Débora Cristina Damasceno
Coorientador: Yuri Karen Sinzato
Capes: 40103005

1. Pâncreas. 2. Glândulas endócrinas. 3. Ilhotas pancreáticas. 4. Diabetes mellitus. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Diabete; Fator de crescimento; Fator de transcrição; Ilhotas pancreáticas; Rato.

Dedicatória

Ao povo brasileiro que com seu suor e trabalho diário financiaram esse trabalho.

Agradecimientos

A **Deus** que permitiu que tudo isso acontecesse, me dando saúde, coragem e força para me fazer superar as dificuldades que apareceram ao longo do caminho.

Aos meus pais **Carlos Roberto de Miranda** e **Marlei Abreu Ferreira Miranda** e irmãos **Felipe**, **Rafael** e **Júlio**, por sempre me apoiarem, sonharem junto comigo, pela confiança e por compreender a minha ausência ao longo de todos esses anos longe de casa. Por saber que independente da distância, estamos sempre juntos e conectados pelos milhões de cabos e conexões que nos faz sentir mais próximos.

Aos meus familiares que tanto lutaram e sonharam comigo cada passo que tenho dado desde a minha graduação. Em especial aos meus avós **Osmar Dias de Miranda** e **Maria Clélia de Miranda**, minha tia e madrinha querida **Juscélia Dias de Miranda Dantas** e meus primos queridos, quase irmãos **Tiago** e **Vinícius**. Que sempre me acolhem com tanto carinho, mesmo depois de tantos dias longe e me alegram com seus áudios e chamadas de vídeo quando a saudade aperta.

À minha orientadora, Profa. Dra. **Débora Cristina**

Damasceno, que me recebeu e me acolheu em uma das etapas mais importantes da minha vida profissional. Pela confiança no meu trabalho e pelas puxadas de orelha tão necessárias. Pela dedicação em me ensinar um pouquinho do que é ser cientista e mulher. Muito obrigada!

À minha coorientadora, Profa. Dra. **Yuri Karen Sinzato**, pela ajuda, ensinamentos e paciência ao longo desse percurso. Obrigada!

À querida amiga e parceira de experimentos, **Franciane Quintanilha Gallego Souza**, por responder minhas mensagens desesperadas de ajuda e por todo o apoio em todos os momentos que pensei em desistir ou deixar de tentar. Devo muito dessa conquista a você! Muito obrigada!

Aos meus amigos queridos **Tatiele Schonholzer, Lucas Venturini, Kleber Eduardo, João Pedro, Carolina Saullo, Loraine Gollino, Thierres Santos, Juliana de Carvalho, Pedro Manzi** que fazem parte dessa trajetória chamada vida e faz com que as coisas pareçam mais leves e fáceis de se encarar.

Agradeço especialmente à **Verônyca Gonçalves** que

dividiu um pedacinho da vida dela comigo e que guardo um carinho especial pelo tempo compartilhado, pelas conversas e desabafos.

Ao **Eduardo Klöppel** pela amizade e pela companhia. Por me apoiar nos meus momentos mais difíceis e sempre me confortar. Além de compartilhar comigo o amor da nossa cachorrinha “**Pizza**”.

Às amigas que fiz durante meu período de intercambio **Vanessa Iurif** e **Leda Muzzi**, que fizeram com que os dias frios e escuros de Copenhagen fossem mais fáceis de suportar. Obrigada pela companhia e pelas risadas.

Aos assistentes de suporte acadêmico (ASA) da **Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEx)** da Faculdade de Medicina de Botucatu, especialmente aos Srs. **Danilo Chaguri**, **Carlos Roberto Gonçalves de Lima**, **José Márcio Cândido** e **Jurandir Antônio**, pela manutenção dos biotérios, limpeza e cuidados com os animais, **Marta Regina Russo Sarzi** pelo auxílio nas técnicas morfológicas, **Leandro Alves dos Santos** e **Ana Paula Dória P. da Cruz** pelo auxílio com as análises de microscopia confocal.

À Profa. Dra. **Luciane Alarcão Dias-Melício** por ceder o aparelho de microscopia confocal e orientações quanto às análises e qualidade das imagens.

Ao Prof. Dr. **Sérgio Luís Felisbino**, por ter cedido os reagentes de imunofluorescência e ao **Caio César Damasceno Monção** pela assistência durante a padronização da técnica de imunofluorescência.

À Profa. Dra. **Noeme Sousa Rocha** por ceder seu laboratório e equipamentos para a realização deste projeto e à técnica do Laboratório de Rotina de Patologia da FMVZ_Botucatu, **Maria Valéria Dalanezi**, pela ajuda no processo de inclusão em parafina dos materiais.

Ao Prof. Dr. **Rogelio Hernandez Pando** por ceder os anticorpos BMP-2 e BMP-7 e colaboração na elaboração dos escritos.

Ao Prof. Dr. **Sebastián SanMartín**, que me recebeu de braços abertos para um estágio de curta-duração em seu laboratório na **Universidade de Valparaíso – Chile**, por ceder o espaço, reagentes e tempo para a discussão do meu trabalho. Agradeço também ao Prof. **Juan Varas** que me ajudou na padronização de alguns dos anticorpos, me

ensinando sobre técnicas de coloração histológicas.

E ao Pós-Doc **Ivo Carrasco** que me orientou nos meus primeiros dias em Valparaíso.

Ao Prof. Dr. **Jens Høirris Nielsen** e **Nils Billestrup**, que me receberam com muito afeto por 6 meses na **Universidade de Copenhagen – Dinamarca**. Por cederem o espaço e contribuírem significativamente nas discussões relacionadas ao meu projeto e pela oportunidade de aprender novas técnicas que muito agregam à minha experiência acadêmica. Agradeço também à responsável técnica Sra. **Helle Fjvordvang** que com muita paciência me ensinou as mais diversas técnicas e me apresentou um pouquinho da cultura dinamarquesa. À Pós Doc **Michala Prause** pela paciência e boas discussões científicas. Às colegas de pesquisa e laboratório que fiz lá **Min Qiao** e **Rikke Rejnholdt Jensen** pelas conversas e jantares tão agradáveis.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em especial ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e ao Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO)** pela acolhida e concessão das dependências e aparelhos durante a realização deste trabalho.

À toda a equipe do **Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP)** da **Faculdade de Medicina**, especialmente ao Prof. Dr. **José Eduardo Corrente**, pelo auxílio no cálculo do delineamento experimental e das análises estatísticas do estudo.

Aos funcionários da **Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu**, em particular à secretária do Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia, Sra. **Solange Sako**.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa da dissertação, Prof. Dr. **Luis Antonio Justulin Junior**, Prof. Dr. **Sebastián SanMartín**, Profa. Dra. **Franciane Quintanilha**, Prof. Dr. **Rogelio Hernandez Pando** pela disponibilidade, críticas e sugestões.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de pesquisa, Processo nº 88882.432893/2019-01, permitindo total dedicação a execução desse estudo.

À **CAPES** pela concessão da bolsa do **Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE)**, Processo nº 88881.187613/2018-01 que permitiu a realização do estágio

de pesquisa no exterior, ampliando meus conhecimentos e horizontes dentro da pesquisa.

Aos **animais**, que cederam suas vidas para a realização deste trabalho, contribuindo cada dia mais com a ciência.

Sumário

CAPÍTULO 1 - "INFLUENCE OF THE DIABETS ON GROWTH AND TRANSCRIPTION FACTORS INVOLVED IN THE CELL REMODELING ON NEONATAL RATS"	16
ABSTRACT	17
INTRODUCTION	18
METHODS.....	19
<i>Animals</i>	19
<i>Diabetes Induction</i>	20
<i>Experimental Groups</i>	20
<i>Blood and pancreas sample collection</i>	22
<i>Serum insulin measurement</i>	22
<i>Islet pancreatic cell morphology</i>	22
<i>Statistical analysis</i>	26
RESULTS	26
DISCUSSION	34
REFERENCES.....	39
CAPÍTULO 2 - "GROWTH AND TRANSCRIPTION FACTORS INVOLVED IN PANCREATIC ENDOCRINE CELL ADAPTATION OF MILDLY DIABETIC ADULT FEMALE RATS"	49
ABSTRACT	50
INTRODUCTION	51
METHODS	52
<i>Animals</i>	53
<i>Diabetes Induction</i>	53
<i>Experimental Groups</i>	53
<i>Oral Glucose Tolerance Test</i>	54
<i>Blood and pancreas sample collection</i>	54
<i>Serum insulin, glucagon and glycated hemoglobin determinations</i>	54
<i>Islet pancreatic cell morphology</i>	55
<i>Statistical analysis</i>	57
RESULTS	60
DISCUSSION	67
CONCLUSION	69
REFERENCES.....	71
ATTACHMENT	76
ETHICS COMMITTEE CERTIFICATE	77

Acknowledgments

The authors thank Mr. Danilo Chaguri, the technician responsible for the Laboratory of Experimental Research in Gynecology and Obstetrics for the handling of the animals and assistance in the surgeries; Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha for lending your laboratory and equipment for the histological processing of samples; Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino for reagents yielding for immunofluorescence; Mr Caio Cesar Damasceno Monção for assistance during immunofluorescence standardization; Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melício for enabling the use of confocal microscope; Mr. Leandro Alves dos Santos and Ms. Ana Paula Dória P. Cruz for assistance during image analysis obtained from confocal microscope; Prof. Dr. José Eduardo Corrente for design and statistical analysis.

REFERENCES

1. Bonner-Weir S, Sullivan BA, Weir GC. Human Islet Morphology Revisited: Human and Rodent Islets Are Not So Different After All. *J Histochem Cytochem. Histochemical Society Inc.*; 2015;63:604–12.
2. Arrojo e Drigo R, Ali Y, Diez J, Srinivasan DK, Berggren PO, Boehm BO. New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. *Diabetologia. Springer Verlag*; 2015. p. 2218–28.
3. Prentki M, Nolan CJ. Islet β cell failure in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 2006. p. 1802–12.
4. Dor Y, Glaser B. Beta-cell dedifferentiation and type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2013;368:572–3.
5. Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes.* 1974;23:889–95.
6. Bonner-Weir S, Trent DF, Honey RN, Weir GC. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes*; 1981 [cited 2019 Nov 19];30:64–9.
7. White V, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Capobianco E, González E.

- Oxidative stress and altered prostanoid production in the placenta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Reprod Fertil Dev*; 2002;14:117–23.
8. Gallego FQ, Miranda CA, Sinzato YK, Iessi IL, Dallaqua B, Pando RH, et al. Temporal analysis of distribution pattern of islet cells and antioxidant enzymes for diabetes onset in postnatal critical development window in rats. *Life Sci*; 2019;226:57–67.
 9. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51:216–26.
 10. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MR. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*; 1963;29:91–8.
 11. Sinzato YK, Gelaleti RB, Volpato GT, Rudge MVC, Herrera E, Damasceno DC. Streptozotocin-induced leukocyte DNA damage in rats. *Drug Chem Toxicol*; 2018;43:165–8.
 12. Triadou N, Portha B, Picon L, Rosselin G. Experimental chemical diabetes and pregnancy in the rat. Evolution of glucose tolerance and insulin response. *Diabetes*; 1982;31:75–9.
 13. Weir GC, Bonner-Weir S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann N Y Acad Sci*. Blackwell Publishing Inc.; 2013;1281:92–105.
 14. Talchai C, Xuan S, Lin H V., Sussel L, Accili D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell*. 2012;150:1223–34.
 15. St-Onge L, Wehr R, Gruss P. Pancreas development and diabetes. *Curr Opin Genet Dev*; 1999;9:295–300.
 16. Klein D, Álvarez-Cubela S, Lanzoni G, Vargas N, Prabakar KR, Boulina M, et al. BMP-7 induces adult human pancreatic exocrine-to-endocrine conversion. *Diabetes*. 2015;64:4123–34.
 17. Bruun C, Christensen GL, Jacobsen MLB, Kanstrup MB, Jensen PR, Fjordvang H, et al. Inhibition of beta cell growth and function by bone morphogenetic proteins. *Diabetologia*; 2014;57:2546–54.
 18. Gallego FQ, Sinzato YK, Miranda CA, Iessi IL, Dallaqua B, Volpato GT, et al. Pancreatic islet response to diabetes during pregnancy in rats. *Life Sci*; 2018;214:1–10.

19. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol*; 2000;182:311–22.
20. Dutta S, Bonner-Weir S, Montminy M, Wright C. Regulatory factor linked to late-onset diabetes? *Nature*. 1998;392:560.
21. Zhu Y, Liu Q, Zhou Z, Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther*; 2017;8:240.
22. Van Assche FA, Aerts L, Prins F De. A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*; 1978;85:818–20.
23. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology*; 1992;130:1459–66.
24. Sorenson R, Brelje T. Adaptation of Islets of Langerhans to Pregnancy: β -Cell Growth, Enhanced Insulin Secretion and the Role of Lactogenic Hormones. *Horm Metab Res*; 1997;29:301–7.
25. Santos TMM, Sinzato YK, Gallego FQ, Iessi IL, Volpato GT, Dallaqua B, et al. Extracellular HSP70 levels in diabetic environment in rats. *Cell Stress and Chaperones*; 2015;20:595–603.
26. Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care*; 1994;17:152–4.
27. Nagasao J, Yoshioka K, Amasaki H, Tsujio M, Ogawa M, Taniguchi K, et al. Morphological changes in the rat endocrine pancreas within 12 h of intravenous streptozotocin administration. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol*. 2005;34:42–7.
28. Cubillos V, López C, Alberdi A. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de páncreas en perros diabéticos inducidos con aloxano. *Arch Med Vet. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile*; 2008;40:169–77.
29. Bakir M, Geyikoglu F, Koc K, Cerig S. Therapeutic effects of oleuropein on cisplatin-induced pancreas injury in rats. *J Cancer Res Ther*; 2018;14:671–8.

30. Song I, Patel O, Himpe E, Muller CJF, Bouwens L. Beta cell mass restoration in alloxan-diabetic mice treated with EGF and gastrin. *PLoS One*. 2015;10:1–17.
31. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*. 1992;25:31–40.
32. McKenna B, Guo M, Reynolds A, Hara M, Stein R. Dynamic recruitment of functionally distinct Swi/Snf chromatin remodeling complexes modulates Pdx1 activity in Islet β cells. *Cell Rep*; 2015;10:2032–42.
33. Iñíguez G, Gallardo P, Castro JJ, Gonzalez R, Garcia M, Kakarieka E, et al. Klotho Gene and Protein in Human Placentas According to Birth Weight and Gestational Age. *Front Endocrinol (Lausanne)*; 2018;9:797.
34. Weir GC, Bonner-Weir S. Five of stages of evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 2004.
35. Maclean N, Ogilvie RF. Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. *Diabetes. American Diabetes Association*; 1955;4:367–76.
36. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*.; 2003;52:102–10.
37. Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, et al. Selective β -Cell Loss and α -Cell Expansion in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab*; 2003;88:2300–8.
38. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. Pancreatic β -cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab*.; 2008. p. 32–42.
39. Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G, Hiriart M. Restructuring of Pancreatic Islets and Insulin Secretion in a Postnatal Critical Window. Maedler K, editor. *PLoS One*; 2006;1:e35.
40. Nielsen JH, Haase TN, Jaksch C, Nalla A, Sørensen B, Nalla AA, et al. Impact of fetal and neonatal environment on beta cell function and development of diabetes. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2014;93:1109–22.
41. Dror V, Nguyen V, Walia P, Kalynyak TB, Hill JA, Johnson JD. Notch

- signalling suppresses apoptosis in adult human and mouse pancreatic islet cells. *Diabetologia*; 2007;50:2504–15.
42. Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: A pathophysiologic and therapeutic makeover. *J. Clin. Invest.* 2012. p. 4–12.
 43. Qadir MMF, Álvarez-Cubela S, Klein D, Lanzoni G, García-Santana C, Montalvo A, et al. P2RY1/ALK3-expressing cells within the adult human exocrine pancreas are bmp-7 expandable and exhibit progenitor-like characteristics. *Cell Rep.* 2018;22:2408–20.
 44. Calvier L, Chouvarine P, Legchenko E, Hoffmann N, Geldner J, Borchert P, et al. PPAR γ Links BMP2 and TGF β 1 Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells, Regulating Cell Proliferation and Glucose Metabolism. *Cell Metab.* Cell Press; 2017;25:1118-1134.e7.