



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

Franciane Quintanilha Gallego Souza

**Repercussão do diabetes moderado no estresse
oxidativo e hormônios pancreáticos ao longo da vida
de ratas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutor(a) em
Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia.

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Débora Cristina Damasceno
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Yuri Karen Sinzato

**Botucatu
2018**

Franciane Quintanilha Gallego Souza

Repercussão do diabetes moderado no estresse
oxidativo e hormônios pancreáticos ao longo da
vida de ratas

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutor(a) em
Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia.

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Débora Cristina Damasceno
Coorientador(a):Prof(a).Dr(a). Yuri Karen Sinzato

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Souza, Franciane Quintanilha Gallego.

Repercussão do diabete moderado no estresse oxidativo e
hormônios pancreáticos ao longo da vida de ratas /
Franciane Quintanilha Gallego Souza. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Débora Cristina Damasceno

Coorientador: Yuri Karen Sinzato

Capes: 40101150

1. Ilhotas pancreáticas. 2. Stress oxidativo. 3.
Diabetes mellitus. 4. Prenhez. 5. Rato como animal de
laboratório.

Palavras-chave: Diabete; Estresse oxidativo; Ilhotas
pancreáticas; Prenhez; Ratas.

“Deus transforma choro em sorriso, dor em força,
fraqueza em fé e sonho em realidade”

(Autor desconhecido)

Dedicatórias

Á **DEUS**, por nunca me abandonar e me carregar em seu colo, transformando minha jornada em momentos leves, verdadeiros e insubstituíveis!

Aos meus pais, **Elisabeth Quintanilha Gallego** e **José Gallego Masaia**, por me darem o dom da vida, me ensinarem o certo e o errado, por me apoiarem sempre em todos os momentos! Sem vocês eu não conseguiria! Amo vocês!

Ao meu marido, **Bruno de Castro Silva Souza**, por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis, por me amar quando nem eu mesma me amava, por me incentivar, por acreditar no meu potencial, por viver todos os dias ao meu lado! Te amo!

Agradecimientos

Á minha orientadora, Profa. Dra. **Débora Cristina Damasceno**, por se tornar muito mais que minha orientadora, por abrir as portas de sua casa, por ser amiga, mãe, confidente! Obrigada pela caminhada durante esses sete anos, pelos ensinamentos dentro e fora do laboratório, pelas broncas muitas vezes necessárias, por confiar em mim e no meu trabalho! Os ensinamentos que adquiri com você estará ao meu lado por toda a vida! E espero um dia poder retribuir tudo o que você fez e faz por mim! Obrigada!

Á minha coorientadora, Profa. Dra. **Yuri Karen Sinzato**, pelo apoio, ajuda, ensinamentos, amizade! Você faz parte de toda minha caminhada e de tudo que aprendi no laboratório! Obrigada!

As minhas amigas **Aline Netto**, **Isabela Lovizutto Iessi**, **Silvana Barroso corvino**, por fazerem parte dessa caminhada, tanto dentro como fora do laboratório! Deus coloca anjos em nossas vidas, os quais chamamos de amigos! As palavras são insuficientes para dizer o quanto vocês são importantes na minha vida e o quanto eu agradeço por tudo que vocês fizeram e fazem por mim! Amo vocês!

Á minha amiga e parceira de experimentos, **Carolina Abreu Miranda**, por me ajudar, me apoiar e me substituir sempre que necessário! Sem você, esse doutorado não seria possível!

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia **Aline Bueno, Aline Netto, Ana Paula Campos, Carolina Abreu Miranda, Eduardo Klöppel, Fernanda Piculo, Giovana Vesentini, Nathália Macedo, Rafael Bottaro Gelaleti e Verônyca Gonçalves Paula**, pelos anos de convivência! Alguns presenciaram minha jornada mais tempo que outros, mas todos vocês contribuíram para que essa caminhada fosse mais alegre! Obrigada!

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, e **Marta Regina Russo Sarzi** pelo auxílio nas técnicas morfológicas.

Á Profa. Dra. **Noeme Sousa Rocha** por ceder seu laboratório e equipamentos para a realização deste projeto e a técnica do laboratório de rotina de Patologia da FMVZ_Botucatu,

Maria Valéria Dalanezi, pela ajuda no processo de inclusão em parafina dos materiais.

Ao professor **Rogelio Hernandez Pando** pelas discussões imunoistoquímicas das amostras de pâncreas.

Ao professor **Wellerson Rodrigo Scarano** por abrir as portas de sua sala sempre que eu pedi ajuda, por todos os ensinamentos no estágio docência, pelas discussões sobre o trabalho.

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 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 Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Sra. **Solange Sako**.

Aos funcionários da biblioteca da UNESP, em especial à Sra. **Rosimeire Aparecida Vicente (Rose)** e **Rosângela Aparecida Lobo**, pela confecção da ficha catalográfica.

Aos participantes da banca de qualificação e de defesa da dissertação, Prof. Dr. **Alex Rafacho**, Profa. Dra. **Isabela Lovizutto Iessi**, Prof. Dr. **Wellerson Rodrigo Scarano**, Profa. Dra. **Marcela Marcondes Pinto Rodrigues** pela disponibilidade, críticas e sugestões.

À **CAPES** pela concessão da bolsa, permitindo total dedicação a execução desse estudo.

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

Sumário

CAPÍTULO 1 - Análise morfológica das ilhotas pancreáticas de ratas diabéticas durante a janela crítica de desenvolvimento pós-natal

Resumo.....	15
Introdução.....	16
Materiais e Método.....	17
Resultados.....	22
Discussão.....	33
Conclusão.....	34
Referências.....	35

CAPÍTULO 2 - Resposta das ilhotas pancreáticas à associação diabetes e prenhez em ratas

Resumo.....	39
Introdução.....	40
Materiais e Método.....	41
Resultados.....	45
Discussão.....	55
Conclusão.....	57
Referências.....	58

ANEXO.....	62
-------------------	-----------

Capítulo 1

ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATAS
DIABÉTICAS DURANTE A JANELA CRÍTICA DE DESENVOLVIMENTO PÓS-
NATAL

PANCREATIC ISLETS MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF DIABETIC RATS
DURING POSTNATAL DEVELOPMENT CRITICAL WINDOW

Franciane Quintanilha Gallego ¹, Carolina Abreu Miranda ¹, Yuri Karen Sinzato ¹,
Isabela Lovizutto Iessi ¹, Bruna Dallaqua ²,
Rogelio Hernandez Pando ³, Débora Cristina Damasceno ^{1*}

¹ Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia, Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil

² Faculdade DeVry Ruy Barbosa (Grupo DeVry Brasil), Salvador, Bahia, Brasil

³ Departamento de Patología, Instituto Nacional Salvador Zubirán, Cidade do México, México

*Correspondência: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP
Distrito de Rubião Júnior, s/n
Telefone: 55 14 38801631
CEP: 18.618-970
Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil
Email: damascenofmb@gmail.com

RESUMO

Introdução: Durante o período neonatal de ratos, o pâncreas endócrino sofre remodelamento, com aumento de proliferação e diminuição da secreção de insulina em relação aos animais adultos, sendo considerado uma janela crítica de desenvolvimento que determina a fisiologia do pâncreas no organismo e possíveis doenças na vida adulta, dentre elas o diabetes. Sendo assim, o presente estudo visa compreender os mecanismos envolvidos e a relação existente entre as células α , β e δ durante o período crítico de desenvolvimento do pâncreas em ratas com diabetes de intensidade moderada.

Objetivo: Avaliar temporalmente o padrão de distribuição das células endócrinas pancreáticas bem como de algumas enzimas antioxidantes em ilhotas de ratas com e sem diabetes durante a janela crítica de desenvolvimento pós-natal. **Materiais e método:** Para a indução do diabetes com níveis glicêmicos de menor intensidade, os recém-nascidos fêmeas receberam a *streptozotocin* (STZ) (100 mg/kg de peso corporal via subcutânea) no primeiro dia de vida. As fêmeas controle receberam apenas o tampão de citrato. O critério de inclusão para o grupo diabético foi glicemia ≥ 400 mg/dL no dia 5 de vida (D5) e, para o grupo controle, glicemia < 120 mg/dL. Os animais de ambos os grupos foram mortos em momentos diferentes: D10, D15 e D30. Foi realizado a coleta de sangue (dosagem de insulina sérica e biomarcadores do estresse oxidativo) e do pâncreas (análise morfológica). Os anticorpos utilizados para análise imunoistoquímica foram: anti-insulina, anti-glucagon, anti-somatostatina, anti-superóxido dismutase 1 (SOD1), anti-glutathione peroxidase (GSH-Px). Para todas as comparações foi considerado o limite mínimo de significância de $p < 0,05$. **Resultados:** O peso corpóreo, concentração de insulina sérica e massa de células α , β e δ aumentaram de acordo com a idade em ambos os grupos estudados. Houve correlação negativa entre a porcentagem de células marcadas para insulina e somatostatina em D10, relação inversa entre células α e β em todos os dias estudados e correlação positiva entre as células α e δ em D10 e D15. A intensidade de marcação para SOD1 foi menor nas ilhotas dos animais diabéticos em todos os momentos estudados e no D10 e D30 para GSH-Px. **Conclusão:** O diabetes no primeiro mês de vida de ratas fêmeas Wistar interferiu no ganho de peso corporal fisiológico do animal, afetou a citoarquitetura das ilhotas pancreáticas e com localização alterada das células δ dentro da ilhota, prejudicando a estrutura mantle-core presente em roedores. Além disso, presença de hiperglicemia causou diminuição das enzimas antioxidantes nas ilhotas pancreáticas destes animais. Sendo assim, estas alterações morfológicas pancreáticas decorrentes do diabetes durante a janela crítica do desenvolvimento podem contribuir para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes na vida adulta.

Palavras-chave: Insulina, somatostatina, glucagon, enzimas antioxidantes, pâncreas, diabetes, ratas.

INTRODUÇÃO

As ilhotas pancreáticas constituem um micro órgão especializado e correspondem à porção endócrina do pâncreas, sendo compostas pelas células alfa (α), beta (β), epsilon (γ), delta (δ) e PP (Kordowich *et al.*, 2009). Estas células se comunicam via junções *GAP* ou via secreção parácrina (Brereton *et al.*, 2015). As células pancreáticas endócrinas e seus hormônios apresentam função regulatória entre si. As células β -pancreáticas sintetizam e secretam insulina, já as células α e δ (células não- β) secretam glucagon e somatostatina respectivamente (Kordowich *et al.*, 2009). A citoarquitetura das ilhotas de humanos e de roedores são semelhantes entre si e apresentam uma estrutura “*mantle-core*”, na qual as células β são circundadas pelas demais células da ilhota pancreática (células não- β) (Bonner-Weir *et al.*, 2015).

A localização das células pancreáticas α e δ de mamíferos ao lado dos capilares sanguíneos possibilita o reconhecimento de alterações glicêmicas, as quais são transmitidas das células não- β para as células β através do sangue, o que influencia a secreção de insulina (Bonner-Weir & Orci, 1982; Ohtani *et al.*, 1986; Samols *et al.* 1986; Liu *et al.*, 1993; Brunicaudi *et al.*, 1996; Nyman *et al.*, 2008; Pfeifer *et al.*, 2014). Desta forma, a insulina e o glucagon atuam coordenadamente para controlar a homeostase da glicose. Para isso, a insulina diminui os níveis glicêmicos e o glucagon os aumenta quando necessário (Kordowich *et al.*, 2009). Para que haja ajustes finos no controle da secreção de insulina e de glucagon, a somatostatina tem seu papel na regulação da glicemia de forma indireta (Bousquet *et al.*, 2004).

Há evidências que a hiperglicemia induz aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) devido ao aumento da entrada de redutores na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (Giacco & Brownlee, 2010). ERO desempenha um papel importante na patogênese da perda das células β -pancreáticas no *Diabetes mellitus* (DM). A célula β -pancreática necessita de um meio intracelular rico em oxigênio, pois utiliza o catabolismo de glicose para atender suas necessidades energéticas, o que também fornece energia para a síntese e secreção de insulina em resposta ao aumento da glicose sanguínea, permitindo que a glicose seja utilizada pelos tecidos periféricos (Lenzen, 2008). No entanto, as células produtoras de insulina apresentam baixa defesa contra a toxicidade dos radicais livres, com capacidade limitada das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) para inativar ERO (Lenzen *et al.*, 1996; Tiedge *et al.*, 1997). Sendo assim, as células β são mais susceptíveis ao estresse oxidativo, o que possibilita alterações na expressão e secreção de insulina, bem como no aumento de apoptose, agravando ainda mais o quadro hiperglicêmico (Robertson, 2004).

Estudos experimentais demonstram que mudanças ambientais nas janelas críticas do desenvolvimento podem levar o organismo a sofrer alterações estruturais e funcionais, possibilitando o aparecimento de doenças na vida adulta, dentre elas o DM (Lucas, 1998). O período neonatal é considerado uma janela crítica do desenvolvimento do pâncreas em mamíferos. Em roedores, durante o período de lactação, ocorre maior oferta de carboidratos e de lipídios (Scaglia *et al.*, 1997; Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2006). Este maior aporte de carboidratos e lipídios faz com que estimule o pâncreas endócrino, levando à alta taxa de proliferação celular das células β -pancreáticas (Scaglia *et al.*, 1997; Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2006), baixa sensibilidade à glicose e secreção de insulina (Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2006), sendo considerado um período de remodelamento pancreático.

Thyssen *et al.* (2006) administraram droga beta-citotóxica (streptozotocin) em ratos machos no dia 4 de vida pós-natal e os ratos diabéticos apresentaram perda das células β -pancreáticas logo após a indução do diabetes, contudo, houve aumento da proliferação de células α e β e, após 20 dias, houve recuperação na porcentagem das células β -pancreáticas, mostrando que as células não- β participam do processo de recuperação das ilhotas pancreáticas em animais diabéticos.

Considerando os resultados obtidos sobre as alterações estruturais e funcionais das ilhotas pancreáticas no período pós-natal de ratos, fica evidente que a porção endócrina do pâncreas passa por uma janela crítica de desenvolvimento e que determinadas alterações podem possibilitar doenças na vida adulta, como o diabetes. Sendo assim, é relevante compreender os mecanismos envolvidos nestas alterações. Para isso, o presente estudo visa avaliar temporalmente o padrão de distribuição das células endócrinas pancreáticas bem como de enzimas antioxidantes em ilhotas de ratas com e sem diabetes durante a janela crítica de desenvolvimento pós-natal.

MATERIAIS E MÉTODO

1. Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem *Wistar* (Apêndice 1) mantidas sob condições controladas de temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($50\pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12h) no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia. Água filtrada e ração foram oferecidas *ad libitum*. Essas ratas foram acasaladas com machos normoglicêmicos (proporção de três fêmeas e um rato macho) para obtenção de recém-nascidos (RN) para composição dos grupos não-diabético (controle) e diabético (indução do diabetes com níveis glicêmicos de menor intensidade). Todos os procedimentos experimentais aplicados nesse

projeto foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp e foram aprovados sob número de Protocolo 1219/2017 (ANEXO 1).

2. Sequência experimental

2.1. Período de diabetogênese - Indução do diabetes

Após a obtenção de proles (fêmeas) recém-nascidas, oriundas do acasalamento de ratas normoglicêmicas conforme citado anteriormente, foi realizada a administração de 100 mg de *streptozotocin*/kg de peso corporal no dorso de cada animal por via subcutânea (Sinzato *et al.*, 2011) no primeiro dia de vida pós-natal (D1). Os filhotes fêmeas do grupo controle receberam no mesmo dia (D1) um volume do veículo (tampão citrato) correspondente ao do grupo que recebeu a droga diabetogênica. Como critério de inclusão, no 5º dia de vida, foi determinada a glicemia dos recém-nascidos através de uma pequena perfuração na extremidade distal da cauda do animal para obtenção de uma gota de sangue, que foi depositada em glicofita, a qual foi introduzida em glicosímetro convencional. Foram consideradas ratas diabéticas aquelas que apresentaram glicemia igual ou superior a 400 mg/dL. As fêmeas que não apresentaram glicemia igual ou superior a 400 mg/dL foram mortas por decapitação. Para o grupo controle, foram incluídas as fêmeas que apresentaram glicemia inferior a 120 mg/dL e a aferição da glicemia foi realizada similarmente à do grupo diabético. Além disso, foi realizado uma análise comparativa entre os animais controle somente para confirmar o estado diabético. Todos os recém-nascidos dos seus respectivos grupos experimentais foram mantidos com suas mães (preferencialmente um número máximo de oito recém-nascidos fêmeas por mãe, que equivale ao número de tetos funcionais para amamentação), sendo que destes, foram avaliados no máximo 5 filhotes/mãe para os dias de experimento D10 e D15 e 2 filhotes/mãe para o D30.

2.2. Grupos Experimentais

Sendo assim, os grupos experimentais foram constituídos por:

- Controle: composto por RN fêmeas que receberam tampão citrato em D1.
- Diabético: composto por RN fêmeas que receberam STZ em D1.

De acordo com os grupos experimentais para estudo no 10º, 15º dias pós-natal (fase de amamentação) e D30 (período pós-desmame), as RN fêmeas dos respectivos grupos foram anestesiadas com Thiopentax® e mortas por decapitação de forma aleatória em diferentes idades de vida (D10, D15 e D30), conforme mostra a Tabela 1 abaixo. Com relação aos dias de experimento, foi eleito D10 e D15 referente ao período de regeneração e D30, que representa

o período logo após a regeneração celular e possíveis alterações relacionadas ao período de desmame.

Quadro 1. Delineamento experimental considerando os períodos experimentais:

Não-Diabético (Controle)	F ₀ -Morte no 10º dia de vida (D10) (n=10)
	F ₀ -Morte no 15º dia de vida (D15) (n=10)
	F ₀ -Morte no 30º dia de vida (D30) (n=10)
Diabético	F ₀ -Morte no 10º dia de vida (D10) (n=10)
	F ₀ -Morte no 15º dia de vida (D15) (n=10)
	F ₀ -Morte no 30º dia de vida (D30) (n=10)

3. *Peso e glicemia*

No dia da coleta das amostras de sangue e pâncreas, os animais permaneceram 6 horas em jejum. Após esse período, os animais foram pesados em balança convencional e a glicemia foi determinada através de uma pequena perfuração na extremidade distal da cauda do animal para obtenção de uma gota de sangue, que foi depositada em glicofita, a qual foi introduzida em glicosímetro convencional.

4. *Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)*

Com 28 dias de vida, as ratas foram submetidas ao TOTG para avaliação do desenvolvimento de alterações do metabolismo glicêmico, um marcador empregado rotineiramente na clínica para diagnóstico do diabetes. Após seis horas de jejum, foi coletada uma gota de sangue por punção venosa na cauda das ratas para determinação glicêmica (tempo 0). Em seguida, as ratas receberam solução de glicose (0,2 g/mL) via intragástrica (*gavage*) na dose de 2,0 g/kg de peso corpóreo. Decorridos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de glicose, as glicemias foram determinadas. Essas medidas também foram utilizadas para estimativa da área total sob a curva usando matematicamente o método trapezoidal (Mello *et al.*, 2001).

5. *Obtenção das amostras de sangue e pâncreas*

Após confirmação dos sinais que evidenciaram o procedimento anestésico com tiopental sódico, os animais foram decapitados de acordo com os grupos experimentais para obtenção de amostras de sangue oriundas da região do pescoço (método de dessangramento). As amostras de sangue foram coletadas em tubos secos para processamento para análise sérica de insulina e glucagon e, em tubos contendo heparina, para dosagem de biomarcadores de

estresse oxidativo. Em seguida, os animais foram submetidos à laparotomia para coleta do pâncreas.

5.1. Determinação sérica de insulina, glucagon e frutossamina

As amostras de sangue total foram centrifugadas a 1575 x g durante 10 minutos a 4°C. Após esse procedimento, o soro foi obtido e armazenado em freezer a -80°C até a determinação de insulina (Crystal Chemical® - Código: 90060) e glucagon (Sigma Aldrich® - Código: RAB0202) seguindo as instruções dos fabricantes dos *kits* comerciais específicos.

As concentrações séricas de frutossamina (marcador de proteína sérica glicada) foram avaliadas pelo serviço do Laboratório Clínico da FMVZ_Unesp Botucatu.

5.2. Análise morfológica do pâncreas

As amostras de pâncreas obtidas nos diferentes dias de experimento foram pesadas e fixadas em formaldeído 10% por 24 horas e, em seguida, acondicionadas em etanol 70%. Os fragmentos foram processados e incluídos em parafina para corte em micrótomo rotativo no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ_Unesp).

Análise imunoistoquímica (IHQ)

Para a técnica de IHQ, os pâncreas foram cortados em cinco seções de 5µm cada. Os anticorpos primários foram anti-insulina, anti-glucagon e anti-somatostatina, para avaliação dos hormônios das ilhotas pancreáticas, anti-superóxido dismutase 1, anti-glutathione peroxidase, para avaliação das enzimas antioxidantes. A recuperação antigênica foi realizada na panela de pressão Elite Bistro® com solução de citrato (pH 6,0) por 30 minutos para os anticorpos anti-insulina e anti-glucagon e, por 20 minutos, para anti-superóxido dismutase 1, anti-glutathione peroxidase. Para o anticorpo anti-somatostatina, não foi realizada a recuperação antigênica. O bloqueio da peroxidase endógena (*Peroxidase inhibitor containing hydrogen peroxide and 15 mM sodium azide - Dako®*) foi realizado por 40 minutos em temperatura ambiente para todos os anticorpos. Para o bloqueio de proteínas inespecíficas, foi utilizado *Protein Block (0.25% casein in PBS, containing carrier protein and 15 mM sodium azide - Dako®)* durante 30 minutos em estufa a 27°C. O bloqueio com leite desnatado 8% (Molico®) foi utilizado para os anticorpos anti-superóxido dismutase 1 e anti-glutathione peroxidase por uma hora à temperatura ambiente. As diluições para os anticorpos primários foram: anti-insulina (Abcam®, Código: ab8304) 1: 10.000 (incubação por uma hora em estufa a 27°C), anti-glucagon (Abcam®, Código: ab8055) 1:500 (incubação por duas horas em estufa a 27°C), anti-somatostatina (DAKO®, Código: a0566) 1:2000 (incubação *overnight* em geladeira a

4°C), anti-Ki-67 (anti-Ki67_Spring®) 1:100 (incubação *overnight* em geladeira a 4°C), anti-superóxido dismutase 1 (Abcam®, ab16831) 1:200 (24 horas a 4°C), anti-glutathione peroxidase (Abcam®, ab22604) 1:400 (24 horas a 4°C). Após a incubação do anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário (*Histofine*) por 30 minutos em estufa a 27°C. Para a revelação da peroxidase, foi utilizado o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidine) por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram contra-coradas em hematoxilina de Mayer e montadas.

As imagens foram capturadas através do sistema computadorizado de imagem (*Software* KS-300, versão 3.0, Zeiss®), que recebe imagem por câmera digital (CCD-IRIS/RGB, Sony®), acoplada a microscópio (DMR, Leica®) e a contagem de células foi realizada através do *software ImageJ*®. A porcentagem de células presentes em cada ilhota pancreática foi calculada pela razão entre o número de células imunomarcadas e o número de células totais e o valor obtido foi multiplicado por 100.

$$\text{Porcentagem (\% de células marcadas)} = \frac{\text{Número de células marcadas}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

6. *Análise Estatística*

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do especialista em Bioestatística do Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp. Para o cálculo do tamanho amostral (n), foi realizado esquema em fatorial com delineamento inteiramente casualizado, sendo estabelecido um “n” de 10 animais/grupo para cada período de vida. Para análise imunoistoquímica, o cálculo foi estimado em seis animais/grupo para cada período, com análise mínima de 10 ilhotas /animal/pâncreas. Para comparação entre o peso total, glicemia, concentração de insulina sérica, concentração de glucagon sérico foi utilizado o Teste de Distribuição Gama. A porcentagem de células imunomarcadas para insulina, glucagon e somatostatina foi utilizado Poisson. O peso relativo do pâncreas foi analisado pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey. A correlação de Pearson foi utilizada para analisar as correlações entre a porcentagem de células marcadas para insulina, somatostatina e glucagon. A intensidade da marcação para Superóxido Dismutase 1 (SOD1) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px) foram analisados por teste de Distribuição Gama. Para todas as comparações foi considerado limite mínimo de significância estatística de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Para confirmar modelo de indução do diabetes em ratas recém-nascidas, foi realizada uma análise comparativa entre animais diabéticos e não-diabéticos no D5 de vida, que caracteriza o início do processo de regeneração pancreática. Com relação aos animais diabéticos, foi verificado que, após a indução (D5), houve aumento da glicemia (Diabético = 520 ± 118 *versus* Controle = 92 ± 20 mg/dL). Esses animais também apresentaram aumento da concentração sérica de insulina (Diabético = $1,029 \pm 0,60$ *versus* Controle = $0,21 \pm 0,06$ mg/dL) e glucagon (Diabético = $0,74 \pm 0,34$ *versus* Controle = $0,43 \pm 0,08$ ng/mL). Em relação a análise morfológica, as ratas diabéticas mostraram perda da citoarquitetura, com a perda do formato circular característico e apresentando extensões a sua volta, abrangendo não somente as células do pâncreas endócrino, mas também células do ducto e ácinos. Houve diminuição na porcentagem de células β (Diabético = $27,34 \pm 7,95$ *versus* Controle = $50,50 \pm 8,75$) e aumento na porcentagem de células imunomarcadas para glucagon (Diabético = $49,07 \pm 11,96$ *versus* Controle = $27,29 \pm 8,45$) e somatostatina (Diabético = $30,31 \pm 10,45$ *versus* Controle = $16,51 \pm 6,58$). Em relação as enzimas antioxidantes, as ratas diabéticas no D5 apresentaram diminuição na intensidade de marcação para SOD1 em relação ao controle (Diabético = 4707 ± 1941 *versus* Controle = 229915 ± 185114).

A comparação entre os animais dos grupos experimentais (controle e diabético) nos diferentes dias de vida foi representada a seguir. Os animais diabéticos apresentaram menor peso em relação ao grupo controle em D10 e D30 (Figura 1). Em relação a glicemia dos animais, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 2).

As ratas diabéticas apresentaram dois pontos alterados (30 e 60 minutos) em relação ao grupo controle durante o TOTG (Figura 3A). Houve diferença significativa na AUC entre os grupos avaliados (Figura 3B). Além das alterações glicêmicas verificadas após sobrecarga de glicose, os animais diabéticos com 30 dias apresentaram maiores concentrações de frutossamina (Diabético = $102,35 \pm 4,71$ *versus* C = $73,31 \pm 3,19$ $\mu\text{mol/l}$), confirmando hiperglicemia nestes animais nas últimas três semanas.

A concentração de insulina sérica dos animais controle e diabéticos em D10, D15 e D30 está representada na Figura 4. As ratas diabéticas apresentaram menor concentração de insulina sérica no D15 quando comparado ao grupo controle (Figura 4).

Em relação a concentração sérica de glucagon (Figura 5), houve maiores níveis desse hormônio no D30 em relação aos demais dias do grupo controle. A comparação entre grupos mostrou que as ratas diabéticas tiveram maiores níveis de glucagon nos dias D10 e D15 quando comparados com os respectivos dias de vida do grupo controle (Figura 5).

A Figura 6 representa a porcentagem de células β pancreáticas das ratas do grupo controle e diabéticas. As ratas diabéticas apresentaram menor porcentagem de células β em relação ao grupo controle em todos os dias avaliados (Figura 6A). Independente do grupo (controle e diabético), as células β estavam localizadas no centro da ilhota pancreática (Figura 6B e C).

Em relação à porcentagem de células δ (Figura 7), o grupo diabético apresentou maior porcentagem de células imunomarcadas para somatostatina em todos os momentos avaliados em relação ao grupo controle (Figura 7A). No grupo controle, as células imunomarcadas para somatostatina permaneceram na periferia da ilhota pancreática (Figura 7B) e, foi possível observar maior quantidade de células δ dispersas no interior das ilhotas pancreáticas das ratas diabéticas (Figura 7C).

No pâncreas das ratas diabéticas, houve maior porcentagem de células α -pancreáticas em todos os dias avaliados em comparação ao grupo controle (Figura 8A). Em todos os momentos, nos diferentes grupos, foi possível observar que as células α estavam localizadas na periferia da ilhota pancreática (Figura 8B e C).

Tabela 1 representa as correlações entre os diferentes tipos de células (β , δ , α) em D10, D15 e D30. Com relação à correlação entre a porcentagem de células β e α , foi observada correlação negativa em todos os dias estudados (Tabela 1). Houve correlação negativa significativa entre a porcentagem de células marcadas para insulina e somatostatina em D10. Foi encontrada correlação positiva entre as células α e δ em D10 e D15 (Tabela 1).

As ratas diabéticas apresentaram menor intensidade de marcação para SOD1 em D10, D15 e D30 em relação ao grupo controle (Figura 9A). Quanto à GSH-Px, o grupo diabético teve menor intensidade de marcação para GSH-Px em D10 e D30 (Figura 10A) quando comparado as ratas do grupo controle nos respectivos dias de vida.

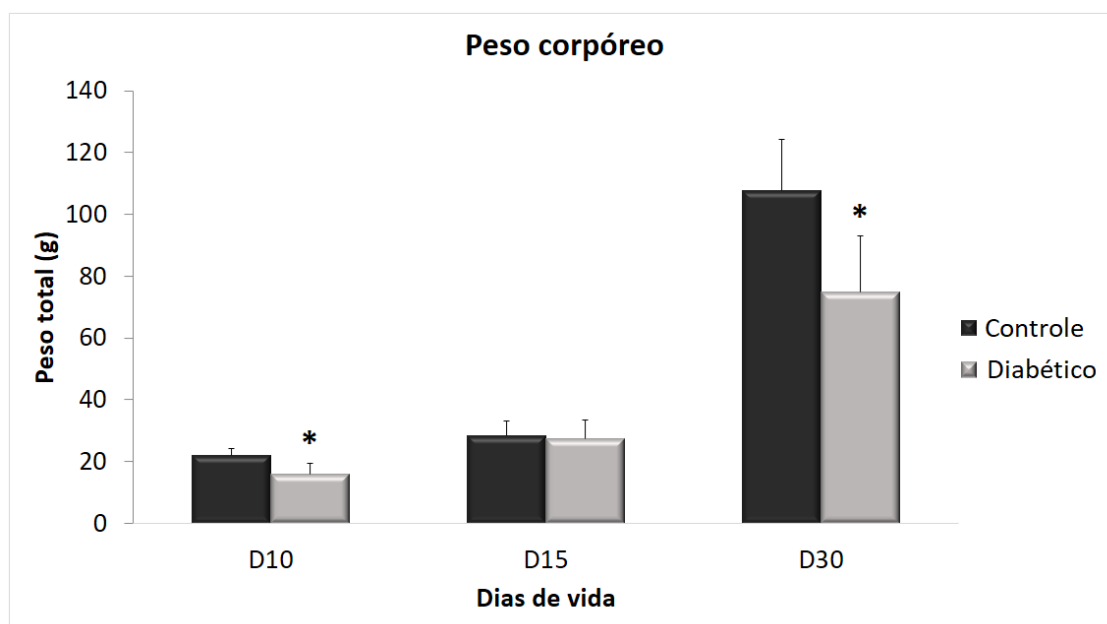


Figura 1. Comparação entre o grupo controle e diabético com relação ao peso (g) dos animais nos diferentes dias de vida (n = 10 animais/grupo/momento).

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (Distribuição Gama).

* $p < 0,05$ – comparado ao grupo Controle.

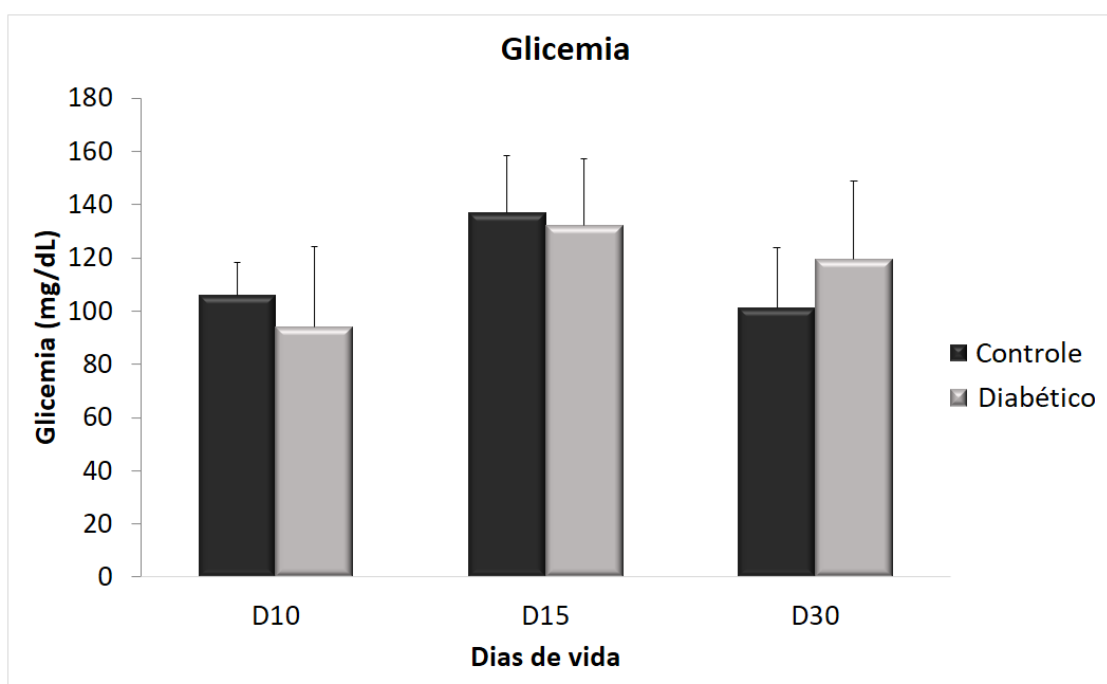


Figura 2. Comparação entre o grupo controle e diabético com relação à glicemia (mg/dL) dos animais nos diferentes dias de vida

$p > 0,05$ – sem diferença estatística.

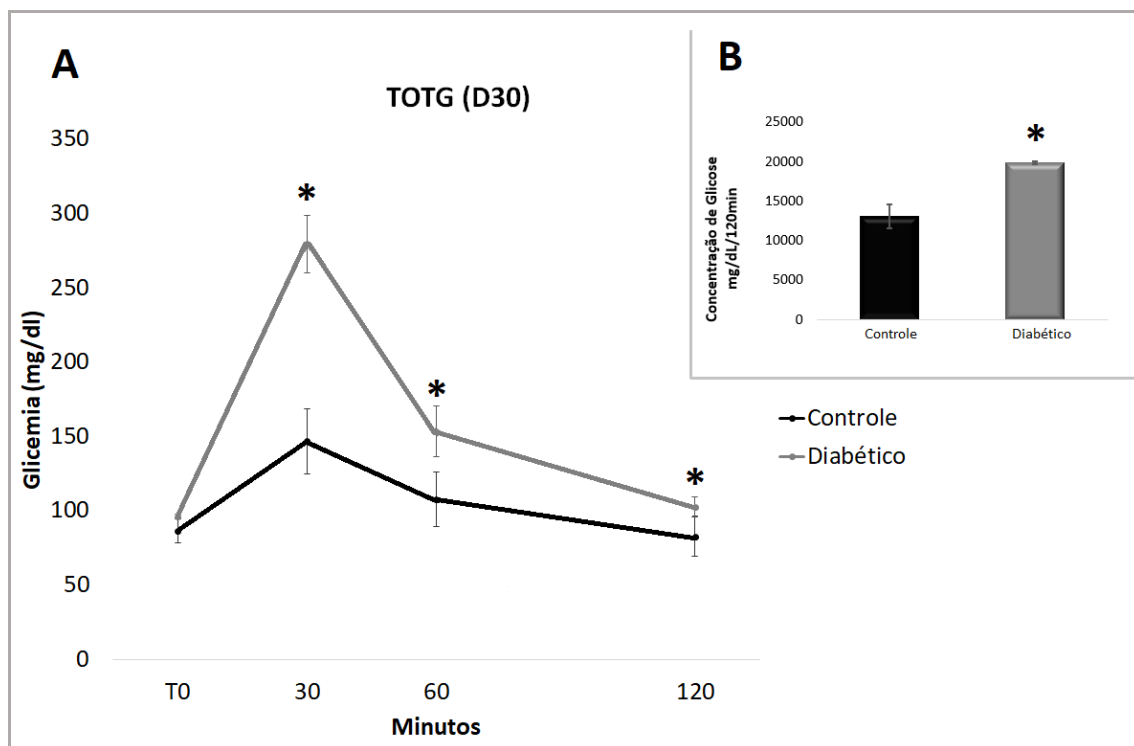


Figura 3. A – Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) no D28 de vida. B – Área sob a curva no dia D28 de vida.

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=10$ animais/grupo/momento).

* $p<0,05$ - comparado ao grupo controle (Teste t com medidas repetidas para TOTG).

* $p<0,05$ - comparado ao grupo controle (Teste t para área sob a curva – AUC).

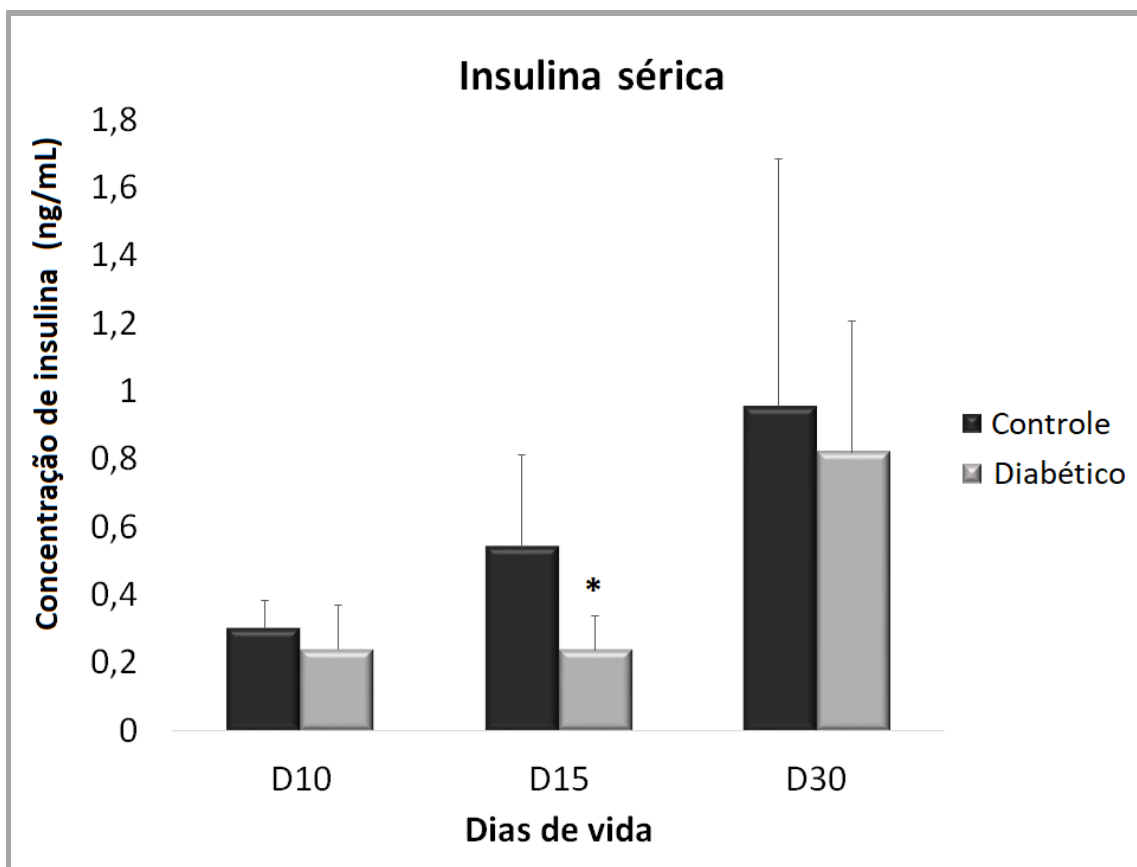


Figura 4 Comparação entre o grupo controle e diabético com relação à insulina sérica (ng/mL) dos animais nos diferentes dias de vida (n= 5 animais/grupo/momento). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (Distribuição Gama). * $p < 0,05$ – comparado ao grupo Controle.

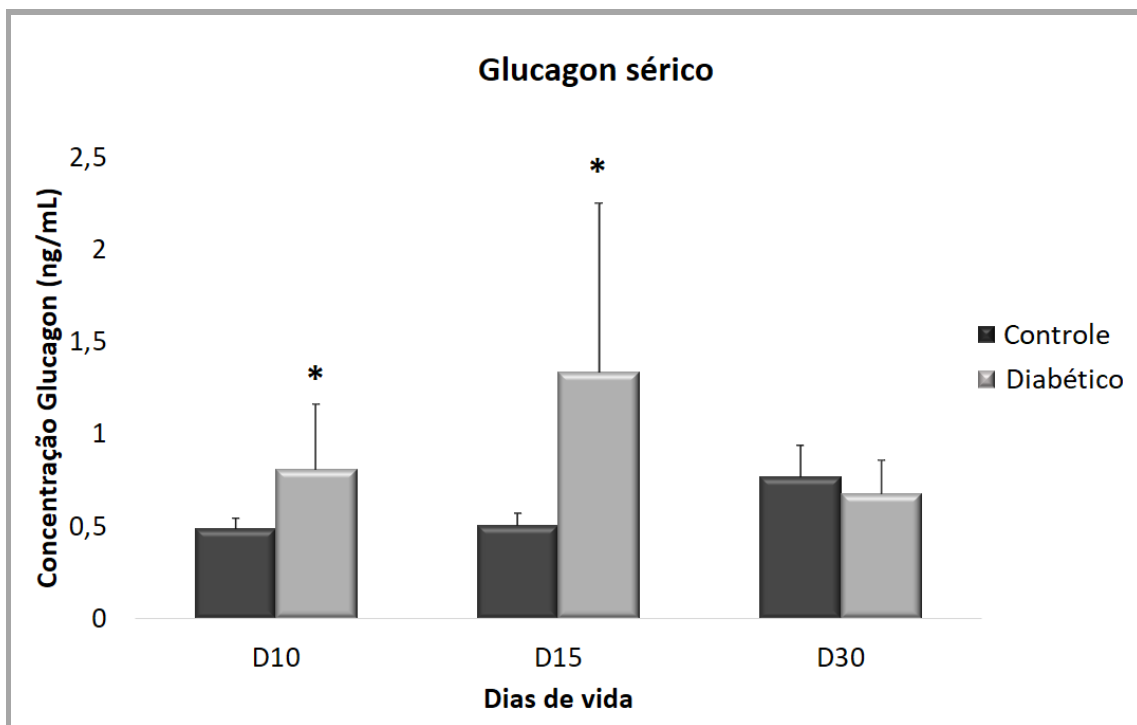


Figura 5. Comparação entre o grupo controle e diabético com relação ao glucagon sérico (ng/mL) dos

animais nos diferentes dias de vida (n= 5 animais/grupo/momento).
 Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (Distribuição Gama).
 *p<0,05 – comparado ao grupo Controle.

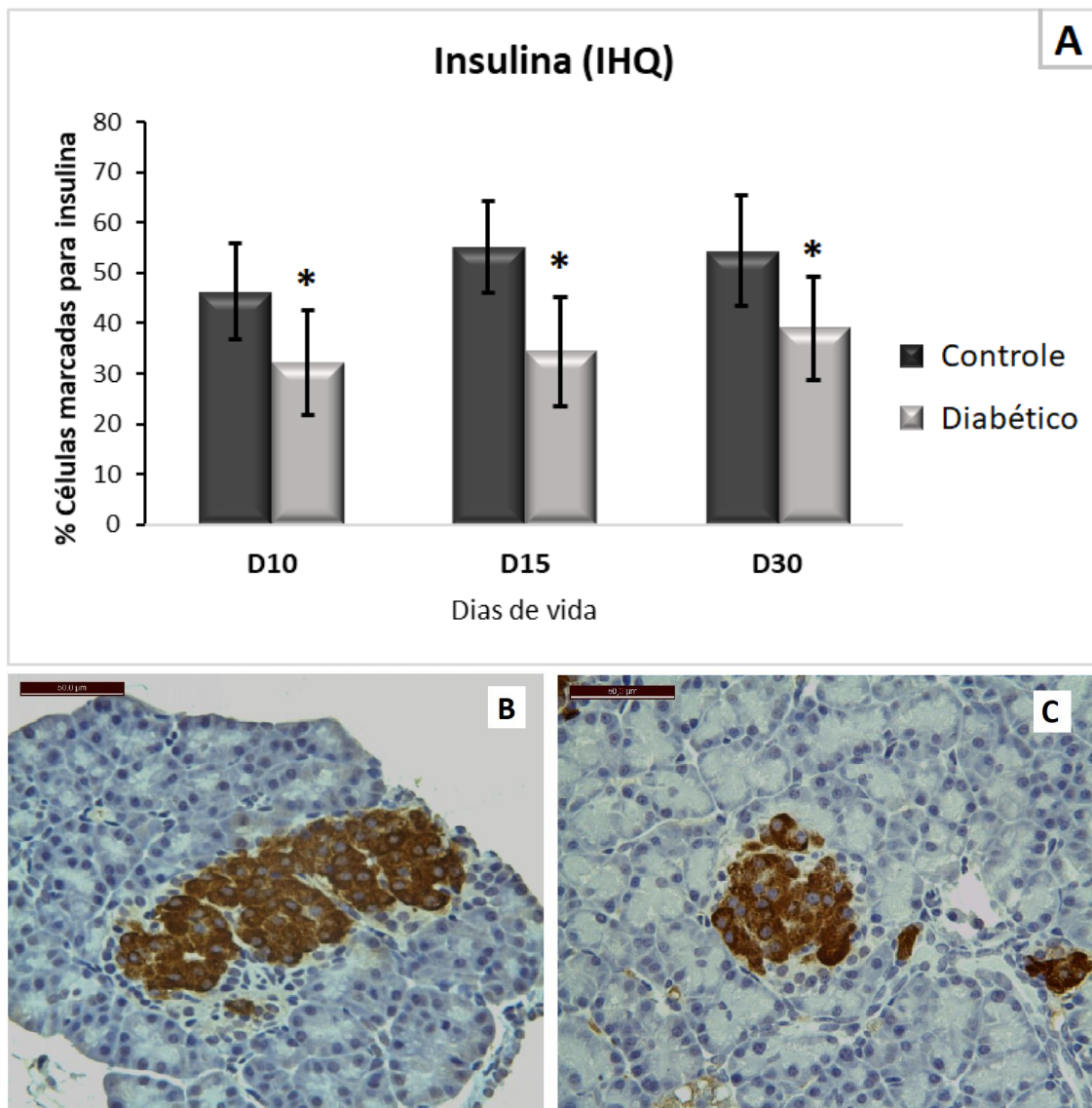


Figura 6. Imunomarcção para insulina (células β) nas ilhotas pancreáticas dos animais do grupo controle e diabético. A- Comparação entre a porcentagem de células imunomarcadas para insulina do grupo controle e diabético nos diferentes dias de vida (n= 100 ilhotas/momento/grupo). B- Imunomarcção para insulina no centro da ilhota pancreática do grupo controle (D30) (Aumento 40x). C- Imunomarcção para insulina no centro da ilhota pancreática do grupo diabético (D30) (Aumento 40x).

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (Poisson).

*p<0,05 – comparado ao grupo Controle.

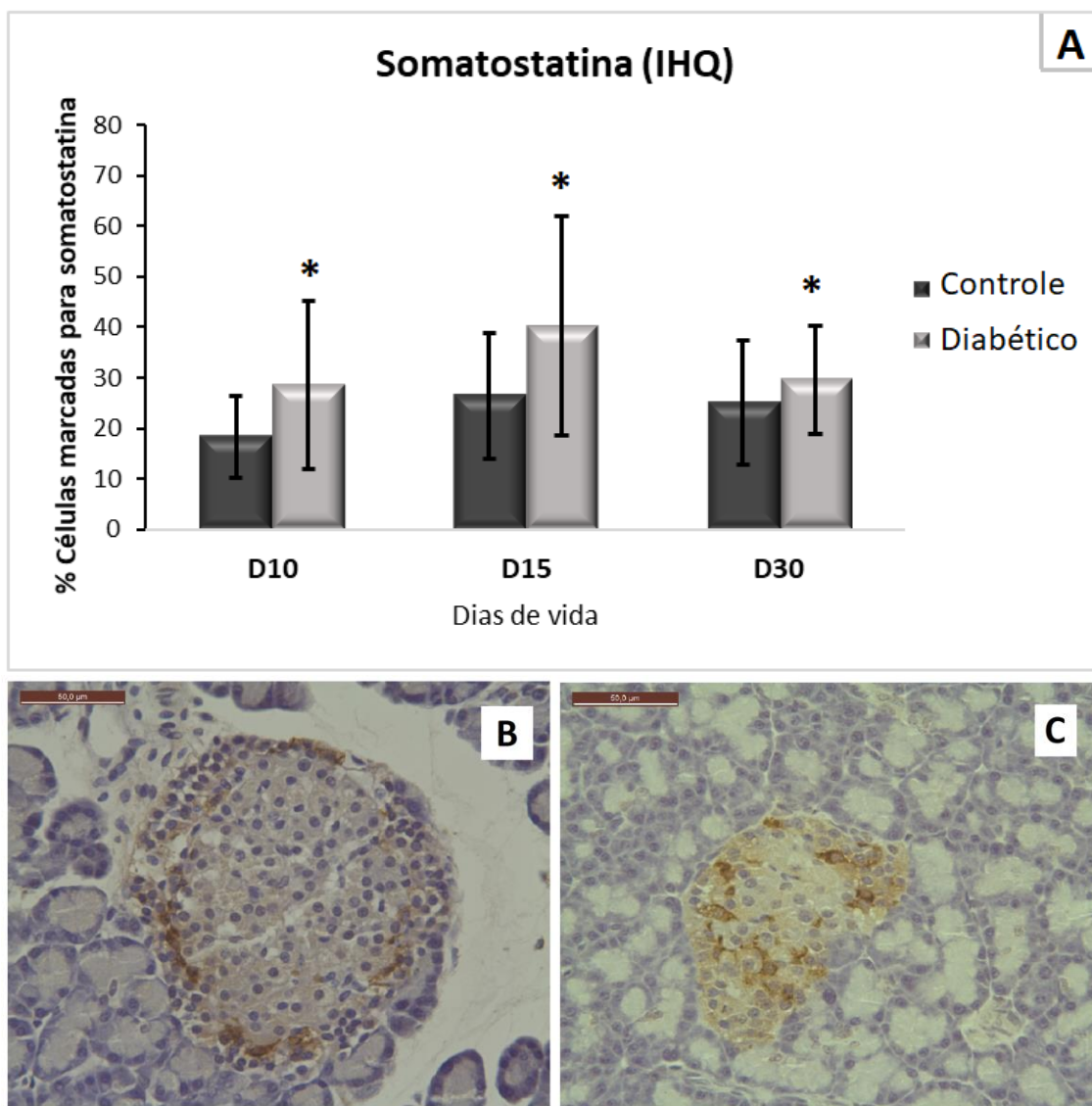


Figura 7. Imunomarcção para somatostatina (células δ) nas ilhotas pancreáticas dos animais do grupo controle e diabético. A- Comparação entre a porcentagem de células imunomarcadas para somatostatina do grupo controle e diabético nos diferentes dias de vida ($n= 100$ ilhotas/momento/grupo). B- Imunomarcção para somatostatina na periferia da ilhota pancreática no grupo controle (D30) (Aumento 40x). C- Imunomarcção para somatostatina no centro da ilhota pancreática no grupo diabético (D30) (Aumento 40X).

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (Poisson).

* $p<0,05$ – comparado ao grupo Controle.

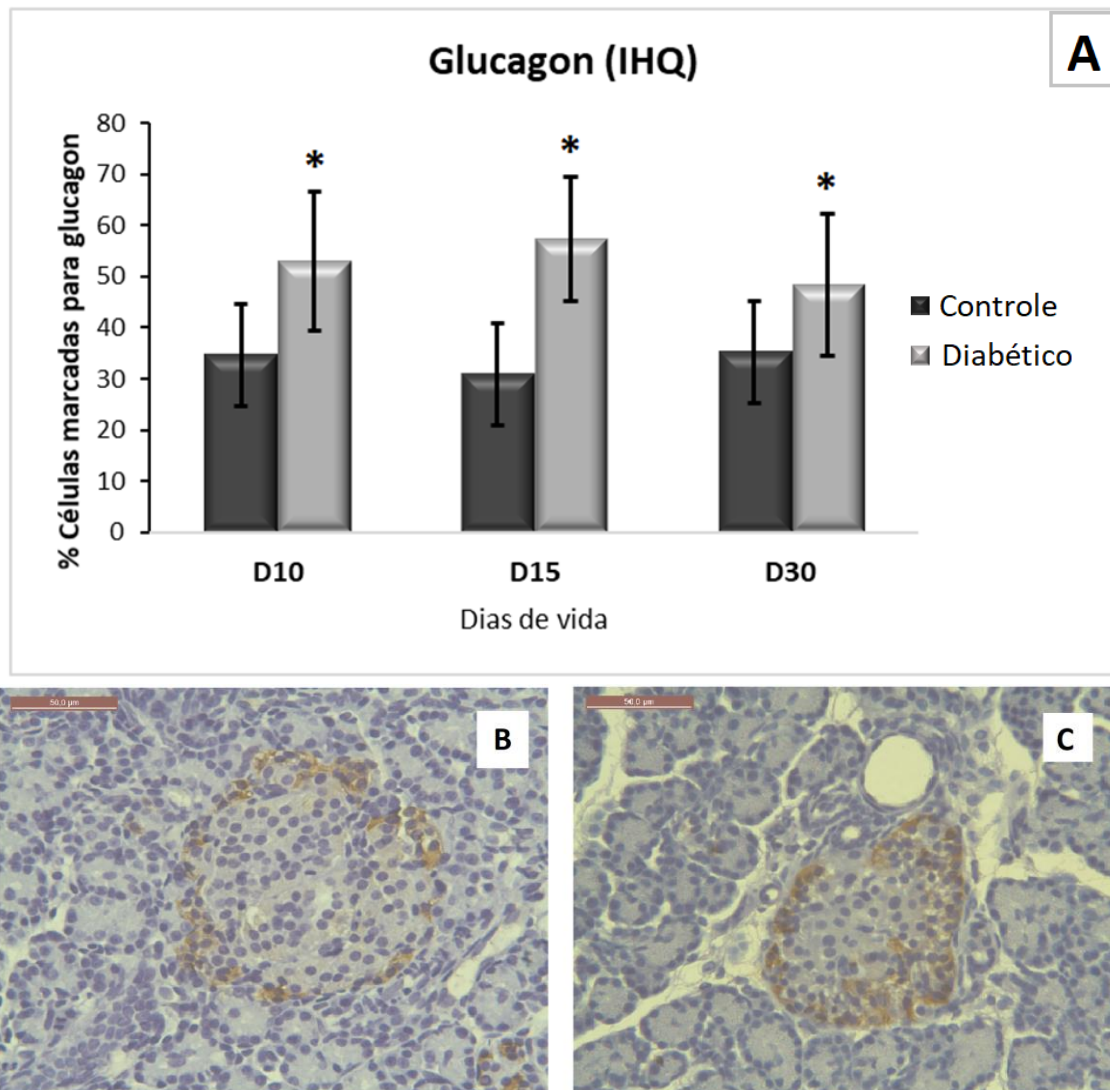


Figura 8. Imunomarcção para glucagon (células δ) nas ilhotas pancreáticas dos animais do grupo controle e diabético. A- Comparação entre a porcentagem de células imunomarcadas para glucagon do grupo controle e diabético nos diferentes dias de vida (n= 100 ilhotas/momento/grupo). B- Imunomarcção para glucagon na periferia da ilhota pancreática do grupo controle (D30) (Aumento 40x). C- Imunomarcção para glucagon na periferia da ilhota pancreática do grupo diabético (D30) (Aumento 40X).

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (Poisson).

*p<0,05 – comparado ao grupo Controle.

Tabela 1. Correlação entre a porcentagem de células β , α , δ -pancreáticas nos diferentes dias de vida.

	D10	D15	D30
Célula β x Célula α	$r^2 = -0,32787$ ($p=0,001$)	$r^2 = -0,48011$ ($p<0,0001$)	$r^2 = -0,50396$ ($p<0,0001$)
Célula β x Célula δ	$r^2 = -0,37485$ ($p=0,0015$)	$r^2 = -0,15599$ ($p=0,1670$)	$r^2 = -0,2163$ ($p=0,0729$)
Célula α x Célula δ	$r^2 = 0,50793$ ($p=0,0002$)	$r^2 = 0,22550$ ($p=0,0443$)	$r^2 = 0,20436$ ($p=0,0897$)
Correlação de Pearson			

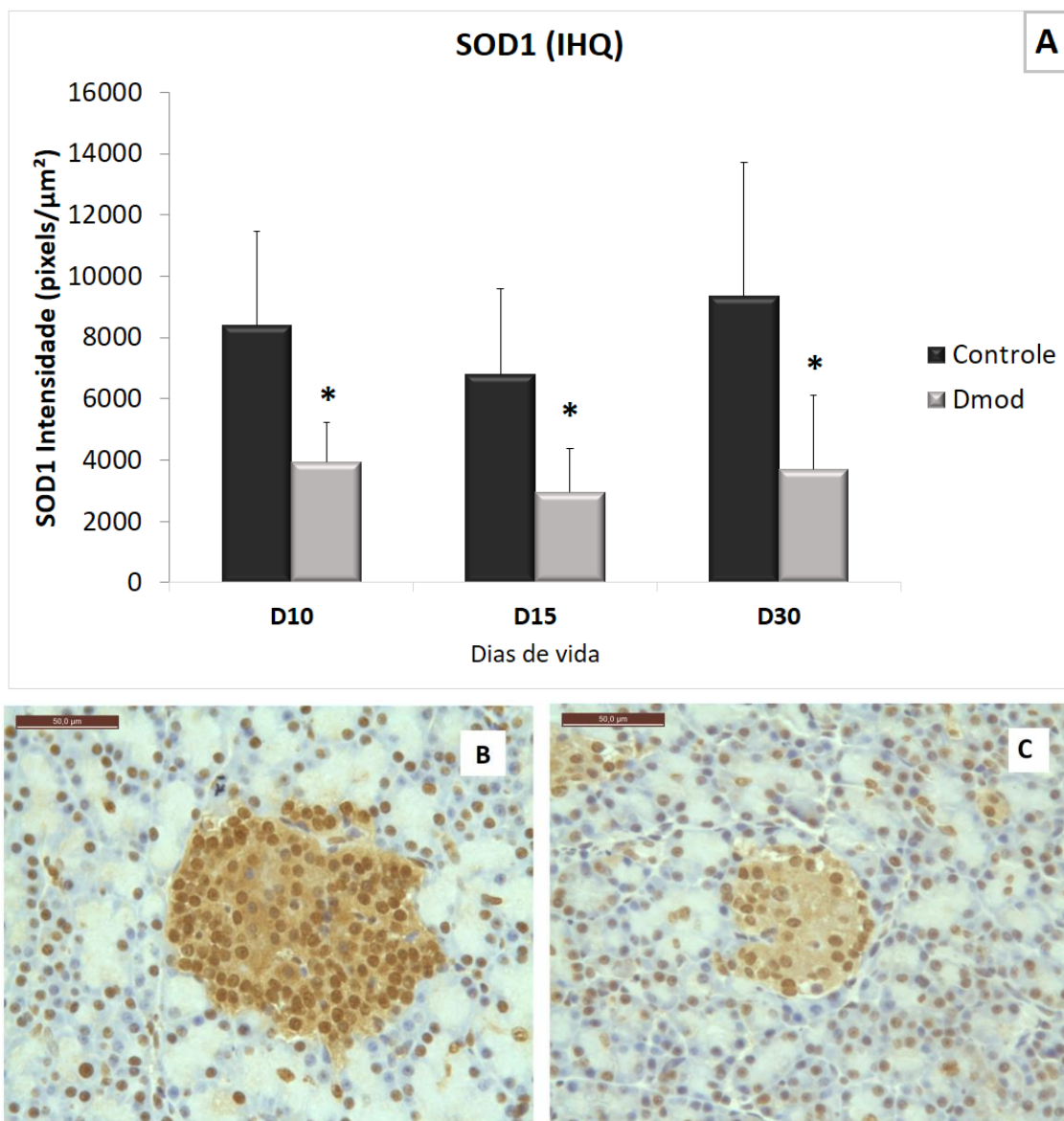


Figura 9. Imunomarcção para SOD1 nas ilhotas pancreáticas dos animais do grupo controle e diabético. A- Comparação entre a intensidade de marcação para células imunomarcadas com SOD1 nas ilhotas pancreáticas dos animais do grupo controle e diabético. B- Imunomarcção nuclear e citoplasmática para SOD1 em ilhota pancreática do grupo controle (D30) (Aumento 40X). C- Imunomarcção nuclear e citoplasmática para SOD1 em ilhota pancreática do grupo diabético (D30) (Aumento 40X).

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (Distribuição Gama).

* $p < 0,05$ – comparado ao grupo Controle.

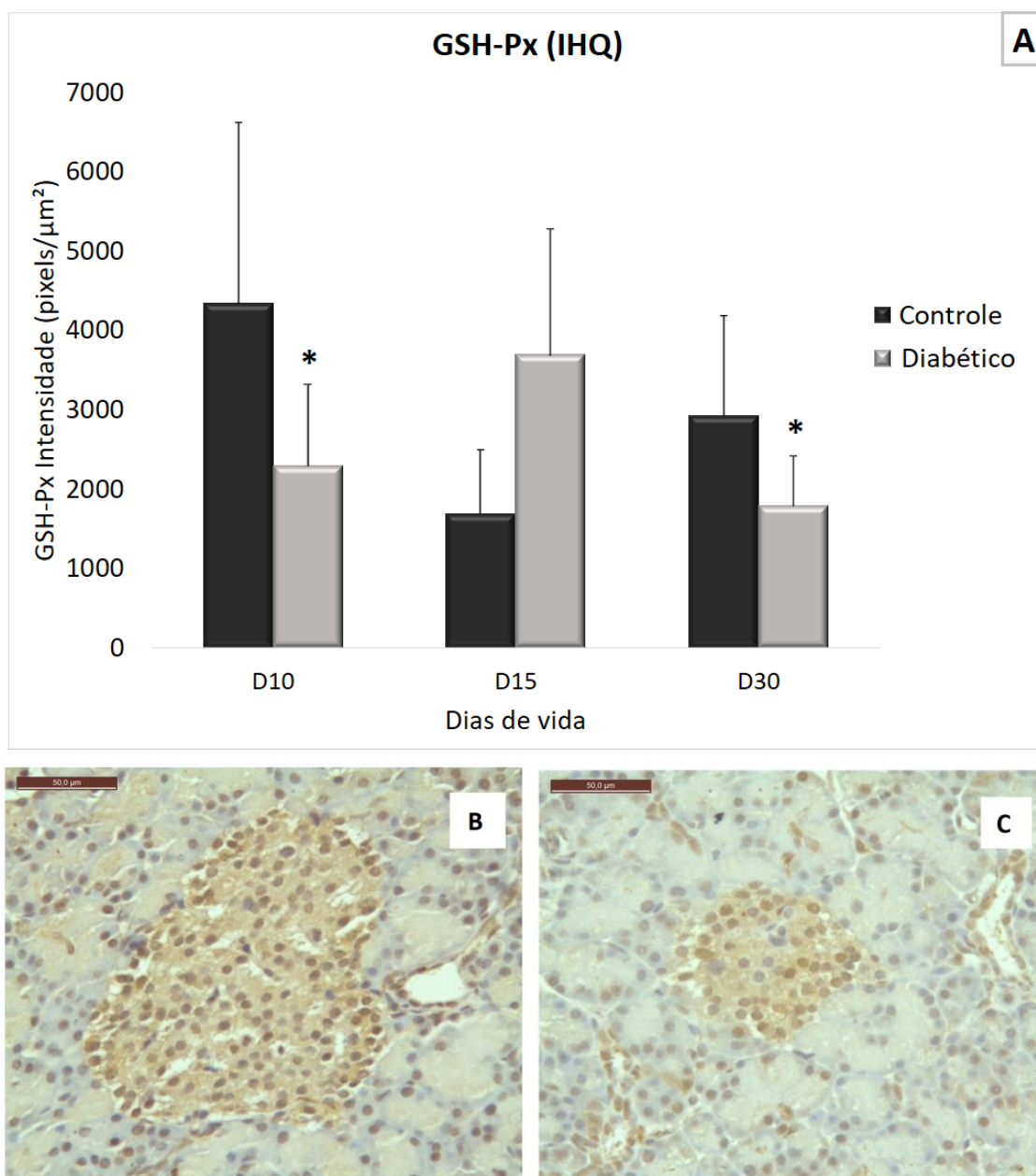


Figura 10. Imunomarcção para GSH-Px nas ilhotas pancreáticas dos animais do grupo controle e diabético. A- Comparação entre a intensidade de marcação para células imunomarcadas com GSH-Px nas ilhotas pancreáticas dos animais do grupo controle e diabético. B- Imunomarcção nuclear e citoplasmática para GSH-Px em ilhota pancreática do grupo controle (D30) (Aumento 40X). C- Imunomarcção nuclear e citoplasmática para GSH-Px em ilhota pancreática do grupo diabético (D30) (Aumento 40X).

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (Distribuição Gama).

* $p < 0,05$ – comparado ao grupo Controle.

DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que o dia D15 foi relevante para observar as alterações pancreáticas nos animais com diabetes induzido quimicamente por agente beta-citotóxico (streptozotocin). Neste dia, a diminuição dos níveis séricos de insulina e aumento do glucagon mostram que, nesta fase, o pâncreas ainda não foi capaz de restaurar a secreção de insulina. Em D15, também houve aumento no padrão de marcação da enzima glutathione peroxidase, possivelmente tentando compensar as alterações existentes na reestruturação das ilhotas pancreáticas. Entretanto, isso não foi suficiente visto que as imunomarcações com insulina foram reduzidas e houve aumento da marcação de glucagon e de somatostatina em todos os períodos analisados.

Embora as ratas diabéticas tenham apresentado ganho de peso corpóreo progressivo, este aumento foi menor em relação ao controle. As ratas diabéticas tiveram menor porcentagem de marcação de insulina em todos momentos estudados e menor concentração de insulina sérica no D15, além disso, houve aumento porcentagem de marcação de glucagon e de somatostatina e aumento nos níveis séricos de glucagon até o dia 15 de vida. Thyssen *et al.* (2006) também observaram aumento de porcentagem de células não- β e nos níveis séricos de glucagon nos primeiros 20 dias de vida em ratos machos que receberam STZ no 4º dia do nascimento. Além disso, estudos com pacientes diabéticos (DM2) observaram aumento de níveis séricos de glucagon e na massa de células α -pancreáticas (Baron *et al.*, 1987; Reaven *et al.*, 1987; Iki & Pour, 2007; Bosco *et al.*, 2010). Um dos mecanismos que poderia estar relacionado ao aumento da glicemia nestes animais seria o aumento da secreção de glucagon.

Adicionalmente, nossos achados demonstraram que houve correlação negativa entre a porcentagem de células marcadas para insulina e somatostatina no 10º dia de vida, relação inversa entre células β e α em todos os dias estudados e correlação positiva entre as células α e δ nos dias 10 e 15, sugerindo que as células β podem estar se desdiferenciando em outro tipo celular. Talchai *et al.* (2012) observaram que, em camundongos diabéticos geneticamente modificados (*db/db*), um subconjunto de células β desdiferenciadas sofre conversão para outros tipos de células, principalmente células α . Esta desdiferenciação pode ser devido à perda do fator de transcrição FoxO1 presente na hiperglicemia. O FoxO1 ativa outro fator de transcrição Pdx-1, que é regulador-chave da expressão gênica da insulina quando localizados no núcleo. Este fato pode fornecer explicação para a relação inversamente proporcional entre células β e células α no diabetes.

Além disso, o modelo experimental utilizado nesse estudo mostrou que as ratas diabéticas apresentaram diminuição da intensidade de marcação para SOD1 em todos os

momentos avaliados e diminuição de GSH-Px nos dias 10 e 30 de vida. O quadro de estresse oxidativo associado à diminuição das enzimas antioxidantes tem sido observado em estudos com diabetes clínico e experimental (O'Brien BA *et al.*, 1996; Low *et al.*, 1997). Células β de ratos machos adultos foram isoladas e colocadas em diferentes concentrações de glicose para analisar as enzimas antioxidantes e a presença de ERO. Foi observado que células β , responsivas à glicose, apresentam diminuição dos níveis de SOD em altas concentrações de glicose (300 mg/dL) (Geert *et al.*, 2005). No entanto, neste estudo, a avaliação com marcadores de lipoperoxidação é necessária para confirmar o quadro de estresse oxidativo nos animais diabéticos durante o primeiro mês de vida.

Portanto, concluímos que o diabetes no primeiro mês de vida de ratas fêmeas *Wistar* interferiu no ganho de peso corporal fisiológico do animal, afetou a citoarquitetura das ilhotas pancreáticas e com localização alterada das células δ dentro da ilhota, prejudicando a estrutura *mantle-core* presente em roedores. Além disso, presença de hiperglicemia causou diminuição das enzimas antioxidantes nas ilhotas pancreáticas destes animais. Sendo assim, estas alterações morfológicas pancreáticas, decorrentes do diabetes durante a janela crítica do desenvolvimento, podem contribuir para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes na vida adulta.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Danilo Chaguri, técnico responsável pelo Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia pelo manuseio dos animais e auxílio nas laparotomias e ao pós-graduando, Eduardo Klöppel, pelo auxílio nas dosagens bioquímicas.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- 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. *PLoS One*. 2006; 20(1):e35.
- Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes*. 1987;36:274-283.
- Bonner-Weir S, Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes*. 1982; 31:883-889.
- Bonner-Weir S, Sullivan BA, Weir GC. Human Islet Morphology Revisited: Human and Rodent Islets Are Not So Different After All. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(8):604-12.
- Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, Sgroi A, Muller YD, Giovannoni L, Parnaud G, Berney T. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*. 2010; 59:1202-1210.
- Bousquet C, Guillermet J, Vernejoul F, Lahlou H, Buscail L, Susini C. Somatostatin receptors and regulation of cell proliferation. *Dig Liver Dis*. 2004; 36(1): S2-7.
- Brunicardi FC, Stagner J, Bonner-Weir S, Wayland H, Kleinman R, Livingston E, Guth P, Menger M, McCuskey R, Intaglietta M, Charles A, Ashley S, Cheung A, Ipp E, Gilman S, Howard T, Passaro E, Jr. Microcirculation of the islets of Langerhans. Long Beach Veterans Administration Regional Medical Education Center Symposium. *Diabetes*. 1996; 45:385-392.
- Geert AM, Ying C, Simon H, Geert S, Mark VC, Daniel P. Glucose Suppresses Superoxide Generation in Metabolically Responsive Pancreatic β Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(21):20389–20396.
- Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1058-70.
- Iki K, Pour PM. Distribution of pancreatic endocrine cells including IAPP-expressing cells in non-diabetic and type 2 diabetic cases. *J Histochem Cytochem*. 2007;55:111-118.
- Kordowich S, Mansouri A, Collombat P. Reprogramming into pancreatic endocrine cells based on developmental cues. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 315(1-2): 11-8.
- Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radical Biology & Medicine*. 1996;20(3):463-466.
- Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans*. 2008 Jun;36(Pt 3):343-7.
- Lucas A. Programming by early nutrition. An experimental approach. *J Nutr*. 1998; 128: 401S–406S.
- Low PA, Nickander KK, Tritschler HJ. The role of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997; 46: 538–542.

Mello MAR, Souza T, Braga LR, Santos W, Ribeiro IA, Gobatto CA (2001). Glucose tolerance and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. *Physiol Chem Phys Med.* 33(1):63-71.

Nyman LR, Wells KS, Head WS, McCaughey M, Ford E, Brissova M, Piston DW, Powers AC. Real-time, multidimensional in vivo imaging used to investigate blood flow in mouse pancreatic islets. *J Clin Invest.* 2008;118:3790-3797.

O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin models. *J Pathol* 1996; 178: 176–181.

Ohtani O, Ushiki T, Kanazawa H, Fujita T. Microcirculation of the pancreas in the rat and rabbit with special reference to the insulo-acinar portal system and emissary vein of the islet. *Arch Histol Jpn.* 1986;49:45-60.

Pfeifer CR, Shomorony A, Aronova MA, Zhang G, Cai T, Xu H, Notkins AL, Leapman RD. Quantitative analysis of mouse pancreatic islet architecture by serial block-face SEM. *J Struct Biol.* 2004.

Reaven GM, Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Jaspan JB. Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in non obese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64:106-110.

Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem.* 2004 Oct 8;279(41):42351-4.

Samols E, Bonner-Weir S, Weir GC. Intra-islet insulin glucagon-somatostatin relationships. *Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1986;15:33-58.

Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology.* 1997;138(4):1736-41.

Sinzato YK, Damasceno DC, Laufer-Amorim R, Rodrigues MMP, Oshiiwa M, Taylor KN, Rudge MVC. Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha as predictors of alterations in the embryofetal organism and the placental development of diabetic rats. *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44(3), 206-11.

Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell.* 2012;150(6):1223-34.

Thyssen S, Arany E, Hill DJ. Ontogeny of regeneration of beta-cells in the neonatal rat after treatment with streptozotocin. *Endocrinology.* 2006; 147(5):2346-56.

Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes.* 1997 Nov;46(11):1733-42.

Capítulo 2

RESPOSTA DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS À ASSOCIAÇÃO DIABETE E PRENHEZ EM RATAS

PANCREATIC ISLET RESPONSE TO PREGNANCY AND DIABETES ASSOCIATION IN RATS

Franciane Quintanilha Gallego ¹, Yuri Karen Sinzato ¹, Carolina Abreu Miranda ¹,
Isabela Lovizutto Lessi ¹, Bruna Dallaqua ², Wellerson Rodrigo Scarano ³, Débora
Cristina Damasceno ^{1*}

¹ Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia, Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil

² Faculdade DeVry Ruy Barbosa (Grupo DeVry Brasil), Salvador, Estado da Bahia, Brasil

³ Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil

*Correspondência: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
 Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
 Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp
 CEP: 18618-970 - Distrito de Rubião Júnior, s/n
 Botucatu – São Paulo – Brasil
 Tel.: +55 14 38801631
 E-mail: damascenofmb@gmail.com

RESUMO

Introdução: Em condições fisiológicas, o organismo materno sofre adaptações durante a gestação para promover um desenvolvimento fetal apropriado. O conhecimento das adaptações pancreáticas durante a gravidez é relevante para entender os mecanismos envolvidos na falência das células beta (β) no estado diabético, gerando estresse oxidativo e afetando negativamente as trocas nutricionais maternas e fetais. **Objetivo:** Avaliar as adaptações nas ilhotas pancreáticas e o estresse oxidativo durante a prenhez para entender os mecanismos envolvidos no pâncreas endócrino e sua relação com o desempenho reprodutivo materno. **Métodos:** Para a indução do diabetes, os recém-nascidos fêmeas receberam a droga beta-citotóxica (*streptozotocin* - STZ) no primeiro dia de vida. No 17º dia de prenhez, foi realizado o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG). Com 18 dias de prenhez, as ratas foram anestesiadas e mortas para coleta de amostras de sangue, pâncreas e útero. O sangue foi coletado para determinação da concentração sérica de insulina e glucagon. O pâncreas foi processado para análises imunoistoquímica de insulina, glucagon, somatostatina, Ki-67 e PDX-1, superóxido dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase (GSH-Px) e malondialdeído (MDA). O útero gravídico foi pesado e dissecado para contagem de fetos vivos e mortos, números de implantação e perdas embrionárias e fetais. **Resultados/interpretação:** As ratas que receberam STZ apresentaram TOTG alterado, confirmando o estado diabético. Os pâncreas desses animais tiveram diminuição da área das ilhotas e porcentagem células imunomarcadas para insulina positiva, hipertrofia das células β e aumento da porcentagem de células não- β imunomarcadas para Ki-67 (proliferação celulares). Houve aumento na porcentagem de células imunomarcadas para glucagon e somatostatina e aumento nas concentrações séricas de insulina e glucagon. As ratas com diabetes apresentaram aumento na intensidade de marcação para MDA e diminuição para GSH-Px nas ilhotas pancreáticas. Houve aumento da porcentagem de perdas pré e pós-implantação nas ratas prenhes. **Conclusão:** A hiperglicemia em associação a prenhez levou a alterações nas ilhotas pancreáticas como quadro de estresse oxidativo, com diminuição da intensidade de células imunomarcadas para GSH-Px e aumento na intensidade de marcação para MDA, aumento na porcentagem de células não- β e aumento na proliferação celular nas ilhotas pancreáticas. As modificações presentes no pâncreas endócrino levaram a alterações metabólicas maternas, resultando em aumento na porcentagem de perdas pré e pós-implantação embrionárias.

Palavras-chave: prenhez, diabetes, pâncreas endócrino, Pdx-1, estresse oxidativo, ratas.

INTRODUÇÃO

As células do pâncreas endócrino e seus hormônios apresentam função regulatória entre si, sendo considerado um micro órgão especializado que regula a homeostase da glicose [1]. As células beta (β) adultas respondem dinamicamente ao aumento da demanda de insulina, expandindo sua massa funcional durante mudanças metabólicas, como a resistência à insulina [2], idade [3] e gravidez [4]. Ao final da gravidez, o hormônio lactogênio placentário induz a diminuição da sensibilidade à insulina nos tecidos maternos [5], favorecendo o fornecimento adequado de nutrientes para o crescimento fetal [6]. Paralelamente, o pâncreas materno adapta-se ao aumento da demanda de insulina através da proliferação de células β -pancreáticas [7, 8].

Dentre os marcadores estudados no processo de adaptação pancreática está o *Pancreatic and Duodenal Homeobox-1* (Pdx-1), regula a fenotipagem, síntese de insulina e em a proliferação de células β -pancreáticas [9]. Além disso, Pdx-1 é o principal fator de transcrição que regula a síntese de insulina estimulada pela glicose. Com o aumento da glicose intracelular, o Pdx-1 passa do citosol para o núcleo, ativando o gene responsável pela síntese de insulina [10, 11]. Células β -pancreáticas isoladas de pacientes diabéticos (*pos mortem*) e de camundongos modificados geneticamente (db/db) apresentam número reduzido de células marcadas para Pdx-1 no núcleo, sugerindo que o deslocamento do Pdx-1 do citoplasma para o núcleo pode ser importante para avaliar os mecanismos pelos quais ocorre a disfunção de células β em pacientes diabéticos [12]. No entanto, a patogênese da disfunção de células β no diabetes continua controversa [13].

As células produtoras de insulina apresentam capacidade limitada das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) para inativar ERO [14]. Estudos sugerem que o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) e a redução de defesas antioxidantes pode estar envolvido na etiologia, patologia e complicações crônicas do diabetes clínico e experimental [15].

Estudos demonstram que ratas prenhes com diabetes de intensidade moderada (glicemia entre 120-300 mg/dL) apresentam quadro aumento do marcador de lipoperoxidação (MDA) e diminuição das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px no sangue [16-18] e na placenta [18], que deflagrou no prejuízo na performance reprodutiva desses animais. No entanto, o estresse oxidativo não foi avaliado no pâncreas dessas ratas. Raza & John [19] observaram aumento da expressão proteica de ERO, aumento da lipoperoxidação de membrana e da enzima antioxidante GSH-Px, no pâncreas desses animais, demonstrando que este órgão estava sob condições de estresse. Contudo, as células das ilhotas pancreáticas não foram

avaliadas de forma isolada.

Sendo assim, a má adaptação do pâncreas endócrino frente à gravidez pode alterar as concentrações de glicose e de insulina no organismo materno, comprometendo o desenvolvimento e crescimento embrionário. No entanto, a patogênese da disfunção de células β no diabetes continua controversa. Estudos realizados anteriormente demonstraram que as células β -pancreáticas apresentam diminuição da defesa antioxidante e, que ratas diabéticas prenhes apresentam estresse oxidativo no sangue, placenta e pâncreas de maneira geral, mas sem enfoque na interação entre as células constituintes das ilhotas pancreáticas. Com isso, nós hipotetizamos que o estresse oxidativo, resultante da hiperglicemia materna, está envolvido na falha da adaptação do pâncreas endócrino frente a um estado diabético, que por sua vez afeta negativamente as trocas nutricionais maternas e fetais. Desta forma, o objetivo do presente estudo é avaliar as adaptações nas ilhotas pancreáticas e o estresse oxidativo durante a prenhez para entender os mecanismos envolvidos no pâncreas endócrino e sua relação com o desempenho reprodutivo materno.

MATERIAIS E MÉTODO

1. Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem *Wistar* mantidas sob condições controladas de temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($50\pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12h) no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia. Água filtrada e ração foram oferecidas *ad libitum*. Essas ratas foram acasaladas com machos normoglicêmicos (proporção de três fêmeas e um rato macho) para obtenção de recém-nascidos (RN) para composição dos grupos não-diabético (controle) e diabético (indução do diabetes). Todos os procedimentos experimentais aplicados nesse projeto foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp e foram aprovados sob número de Protocolo 1219/2017 (ANEXO 1).

2. Sequência experimental

2.1 Período de diabetogênese - Indução do diabetes

Após a obtenção de proles (fêmeas) recém-nascidas, oriundas do acasalamento de ratas normoglicêmicas conforme citado anteriormente, foi realizada a administração de 100 mg de *streptozotocin*/kg de peso corporal no dorso de cada animal por via subcutânea [20] no primeiro dia de vida (D1). Os filhotes fêmeas do grupo controle receberam no mesmo dia (D1) volume do veículo (tampão citrato) correspondente ao do grupo que recebeu a droga

diabetogênica. Como critério de inclusão, no 5º dia de vida, foi determinada a glicemia dos recém-nascidos através de uma pequena perfuração na extremidade distal da cauda do animal para obtenção de uma gota de sangue, que foi depositada em glicofita, a qual foi introduzida em glicosímetro convencional. Foram consideradas ratas diabéticas aquelas que apresentaram glicemia igual ou superior a 400 mg/dL. As fêmeas que não apresentaram glicemia igual ou superior a 400 mg/dL foram mortas por decapitação. Para o grupo controle, foram incluídas as fêmeas que apresentaram glicemia inferior a 120 mg/dL e a aferição da glicemia foi realizada similarmente à do grupo diabético. Todos os recém-nascidos dos respectivos grupos experimentais foram mantidos com suas mães (preferencialmente um número máximo de oito recém-nascidos fêmeas por mãe, que equivale ao número de tetos funcionais para amamentação), até o período de desmame.

2.2. Grupos Experimentais

Sendo assim, os grupos experimentais foram constituídos por:

- Controle: composto por RN fêmeas que receberam tampão citrato em D1.
- Dmod: composto por RN fêmeas que receberam STZ em D1.

2.3 Acasalamento e prenhez

As ratas adultas (90 dias de vida) dos grupos controle e diabético (diabete com níveis glicêmicos de menor intensidade) foram submetidas ao acasalamento durante 15 dias consecutivos, que compreende três ciclos estrais. Para isto, três fêmeas foram colocadas na presença de um macho no período *overnight*. Na manhã seguinte, os machos foram removidos e foi realizado o esfregaço vaginal. A presença de espermatozoides nas lâminas confirmou o diagnóstico de prenhez, sendo este considerado o dia zero de prenhez (D0) [21].

2.3.1 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

No 17º dia de prenhez, foi realizado o TOTG para avaliação do desenvolvimento de alterações do metabolismo glicêmico, um marcador empregado rotineiramente na clínica para diagnóstico do diabete. Após seis horas de jejum, foi coletada uma gota de sangue por punção venosa na cauda das ratas para determinação glicêmica (tempo 0). Em seguida, as ratas receberam solução de glicose (0,2 g/mL) via intragástrica (*gavage*) na dose de 2,0 g/kg de peso corpóreo. Decorridos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de glicose, as glicemias foram determinadas. Essas medidas também foram utilizadas para estimativa da área total sob a curva usando matematicamente o método trapezoidal [22].

3. Laparotomia – Coleta de pâncreas e performance reprodutiva materna

No 18º dia de prenhez, as fêmeas (Controle e Dmod) foram anestesiadas com tiopental

sódico (Thiopentax®) e, após confirmação dos sinais que evidenciaram o procedimento anestésico de acordo com as instruções do médico veterinário, os animais foram decapitados em guilhotina de acordo com os grupos experimentais para obtenção de amostras de sangue oriundas da região do pescoço (método de dessangramento). As amostras de sangue foram coletadas em tubos secos para processamento das análises de insulina e glucagon séricas. Em seguida, os animais foram submetidos à laparotomia para coleta dos cornos uterinos e do pâncreas.

3.1 Determinação sérica de insulina e glucagon

As amostras de sangue total foram centrifugadas a 1575 x g durante 10 minutos a 4°C. Após esse procedimento, o soro foi obtido e armazenado em freezer a -80°C até a determinação de insulina (*Crystal Chemical*® - Código: 90060) e glucagon (*Sigma Aldrich*® - Código: RAB0202) seguindo as instruções dos fabricantes dos kits comerciais específicos.

3.2 Análise da performance reprodutiva materna

Foi realizada laparotomia para retirada e exposição dos cornos uterinos para contagem de implantações, reabsorções (mortes embrionárias), fetos vivos e mortos. Os ovários também foram retirados para a contagem de corpos lúteos para avaliação indireta da ovocitação. A taxa de perda pré-implantação foi calculada por: $[\text{Número (N}^\circ\text{) de corpos lúteos} - \text{N}^\circ \text{ implantações}] / \text{N}^\circ \text{ corpos lúteos} \times 100$. A taxa de perda pós-implantação foi determinada por: $(\text{N}^\circ \text{ de implantações} - \text{N}^\circ \text{ de fetos vivos}) / \text{N}^\circ \text{ de implantações} \times 100$. A taxa de viabilidade fetal por foi determinada por: $\text{N}^\circ \text{ de fetos vivos} / \text{N}^\circ \text{ de implantações} [21]$.

3.3 Análise morfológica do pâncreas

As amostras de pâncreas obtidas nos diferentes dias de experimento foram pesadas e fixadas em formaldeído (P.A.) 10% por 24 horas e, em seguida, acondicionadas em etanol 70%. Os fragmentos foram processados e incluídos em parafina para corte em micrótomo rotativo no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ_Unesp). A coloração em hematoxilina e eosina (HE) foi realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ_Unesp). Após coloração em HE, foi realizada a análise morfológica (citoarquitetura da ilhota pancreática e área) em sistema computadorizado de imagem (*Software KS-300*, versão 3.0, Zeiss®), que recebe imagem por câmara digital (CCD-IRIS/RGB, Sony®), acoplada a microscópio (DMR, Leica®).

3.4 Análise imunoistoquímica (IHQ)

Para a técnica de IHQ, os pâncreas foram cortados em oito seções de 5µm cada. Os anticorpos primários usados foram: anti-insulina, anti-glucagon e anti-somatostatina, para avaliação dos hormônios das ilhotas pancreáticas, anti-Ki-67 e anti-PDX-1 para avaliação da

proliferação pancreática e, anti-superóxido dismutase 1, anti-glutationa peroxidase e anti-malondialdeído para avaliação do quadro de estresse oxidativo. A recuperação antigênica foi realizada na panela de pressão Elite Bistro® com solução de citrato (pH 6,0) por 30 minutos para os anticorpos anti-insulina, anti-glucagon e anti-Ki-67 e, por 20 minutos para anti-superóxido dismutase 1, anti-glutationa peroxidase e anti-malondialdeído. Para os anticorpos anti-PDX-1 e anti-somatostatina não foi realizada a recuperação antigênica. O bloqueio da peroxidase endógena (*Peroxidase inhibitor containing hydrogen peroxide and 15 mM sodium azide* - Dako®) foi realizado por 40 minutos em temperatura ambiente para todos os anticorpos. Para o bloqueio de proteínas inespecíficas, foi utilizado *Protein Block (0.25% casein in PBS, containing carrier protein and 15 mM sodium azide* - Dako®) durante 30 minutos em estufa a 27°C. O bloqueio com leite desnatado 8% (Molico®) foi utilizado para os anticorpos anti-superóxido dismutase 1, anti-glutationa peroxidase e anti-malondialdeído por uma hora à temperatura ambiente. As diluições para os anticorpos primários foram: anti-insulina (Abcam®, Código: ab8304) 1: 10.000 (incubação por uma hora em estufa a 27°C), anti-glucagon (Abcam®, Código: ab8055) 1:500 (incubação por duas horas em estufa 27°C), anti-somatostatina (DAKO®, Código: a0566) 1:2000 (incubação *overnight* em geladeira a 4°C), anti-Ki-67 (anti-Ki67_Spring®) 1:100 (incubação *overnight* em geladeira a 4°C), anti-PDX-1 (Abcam®, ab47267) 1:500 (incubação por duas horas a 27°C), anti-superóxido dismutase 1 (Abcam®, ab16831) 1:200 (24 horas a 4°C), anti-glutationa peroxidase (Abcam®, ab22604) 1:400 (24 horas a 4°C), anti-malondialdeído (Abcam®, ab6463) 1:500 (24 horas a 4°C). Após a incubação do anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário (*Histofine*) por 30 minutos em estufa a 27°C. Para a revelação da peroxidase, foi utilizado o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina) por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram contra-coradas em hematoxilina de Mayer e montadas.

A imagens foram capturadas através do sistema computadorizado de imagem (*Software* KS-300, versão 3.0, Zeiss®), que recebe imagem por câmera digital (CCD-IRIS/RGB, Sony®), acoplada a microscópio (DMR, Leica®) e a contagem de células foi realizada através do *software ImageJ*®. A porcentagem células presentes na ilhota pancreática foi calculada pela razão entre o número de células imunomarcadas e o número de células totais e o valor obtido foi multiplicado por 100 [23].

$\text{Porcentagem (\%)} = \frac{\text{Número de células marcadas}}{\text{Número de células totais}} \times 100$
--

4. Análise Estatística

Para o cálculo do tamanho amostral (n), foi realizado esquema em fatorial com delineamento inteiramente casualizado com o auxílio do especialista em Bioestatística do Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp. Sendo estabelecido um “ n ” de 10 animais/grupo para cada período de vida. Para análise imunoistoquímica, o cálculo foi estimado em seis animais/grupo para cada período, com análise mínima de 10 ilhotas /animal/pâncreas.

Para comparação da concentração de glucagon, e área sob a curva foi utilizado o Teste T. As concentrações séricas de insulina foram analisadas por Distribuição Gama. O Teste Oral de tolerância à Glicose foi analisado pelo Teste-T com medidas repetidas. A área das ilhotas pancreáticas foi avaliada pela Distribuição Gama. Para imunomarcações para Ki-67 e porcentagens de células imunomarcadas para insulina, somatostatina e glucagon, foi utilizado teste de Poisson. A Distribuição Gama foi usada para comparação da imunomarcação para Pdx-1. A intensidade da marcação para Superóxido Dismutase 1 (SOD1), Glutathione Peroxidase (GSH-Px) e Malondialdeído (MDA) foi analisada por Teste t. A Correlação de Pearson foi utilizada para analisar a relação entre a porcentagem de imunomarcação para insulina e MDA. A análise de Contingência foi utilizada para avaliar a porcentagem de perdas pré e pós-implantação no dia 18 de prenhez. Para todas as comparações, foi considerado limite mínimo de significância estatística de $p < 0,05$.

RESULTADOS

As ratas do grupo Dmod apresentaram maior número de ilhotas pancreáticas ($47,75 \pm 17,29$) em comparação as ratas do grupo controle ($29,63 \pm 9,72$) ($p=0,0216$). A área total das ilhotas pancreáticas (Figura 1A) foi menor nas ratas diabéticas. A análise morfológica observada pela coloração em HE mostrou que as ilhotas pancreáticas de ambos os grupos apresentaram formato arredondado (Figuras 1B e C). As ratas prenhes diabéticas mostraram maior porcentagem de células imunomarcadas para Ki-67 no interior da ilhota pancreática (Figura 2A) e diminuição para Pdx-1 no núcleo das células da ilhota pancreática (Figura 2D) quando comparadas às ratas do grupo controle ($p < 0,05$).

A imunomarcação para os hormônios pancreáticos (insulina, glucagon e somatostatina) foi apresentada na Figura 3. Houve menor porcentagem (%) do número de células marcadas para insulina (célula β) (Figura 3A), maior porcentagem de células imunomarcadas para glucagon (Figura 3D) e somatostatina (Figura 3G) nas ratas prenhes diabéticas em comparação ao grupo controle. Independente do grupo, a imunomarcação para insulina (células β) foi

observada no centro das ilhotas pancreáticas (Figuras 3B e C), a imunomarcção para as células α (Figuras 3E e F) e δ (Figuras 3H e I) foi verificada na periferia das ilhotas pancreáticas.

A intensidade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase-1 (SOD1), Glutathione peroxidase (GSH-Px) e do marcador de lipoperoxidação Malondialdeído (MDA), foram representados na Figura 4. Foi observado que as ratas com diabetes aos 18 dias de prenhez apresentaram aumento de intensidade do anticorpo anti-MDA (Figura 4I) e diminuição na intensidade da marcação para o anticorpo anti-GSH-Px (Figura 4H) nas ilhotas pancreáticas quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$).

A Figura 5 representa a correlação negativa ($p = 0,01$) entre a porcentagem de células imunomarcadas para insulina (células β -pancreáticas) e a porcentagem de núcleos marcados para MDA nas ilhotas de ratas com 18 dias de prenhez.

A Figura 6 representa os ensaios bioquímicos realizados no estudo. No TOTG, as ratas do grupo Dmod apresentaram aumento da glicemia aos 15, 30 e 60 minutos após a sobrecarga de glicose em comparação às ratas controle (Figura 6A). Os níveis de glicose circulantes (AUC) durante o todo o teste TOTG (Figura 6B) foram maiores nas ratas Dmod ($20647,5 \pm 4862,10$ mg/dL/120min) quando comparadas ao grupo controle ($9876,25 \pm 1370,06$ mg/dL/120min). Houve diferença significativa em relação aos níveis séricos de insulina ($p < 0,05$). As ratas com diabetes apresentaram maior concentração sérica de glucagon (Figura 6D) em relação às ratas diabéticas ($p < 0,05$).

A porcentagem de ratas que apresentaram perdas pré e pós-implantação no dia 18 de prenhez foi representada na Figura 7. O grupo diabetes apresentou maior porcentagem de perdas pré e pós-implantação em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

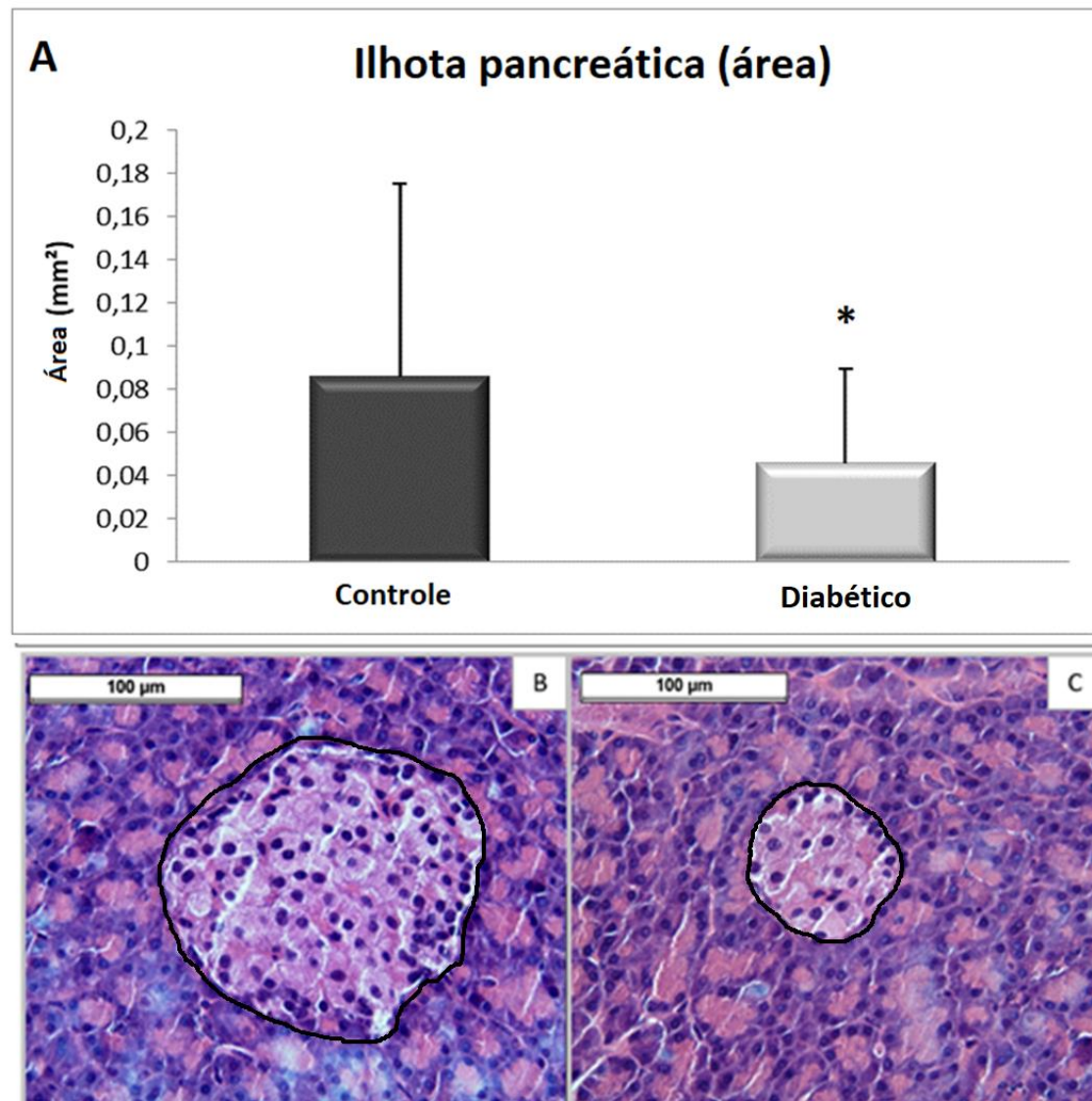


Figura 1. Área das ilhotas pancreáticas no dia 18 de prenhez. A – Área das ilhotas pancreáticas (milímetros quadrados). Fotomicrografia do pâncreas apresentando as ilhotas pancreáticas (circuladas em preto) e as células acinares. B – Fotomicrografia do pâncreas de ratas controle, mostrando a área das ilhotas pancreáticas de ratas controle em proporção normal. C - Fotomicrografia do pâncreas de ratas com diabete, mostrando diminuição da área das ilhotas pancreáticas. Coloração em Hematoxilina & Eosina (H&E). Aumento 20X.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n= 100 ilhotas/ grupo)

* $p < 0,05$ – diferença estatisticamente significativa (Distribuição Gama)

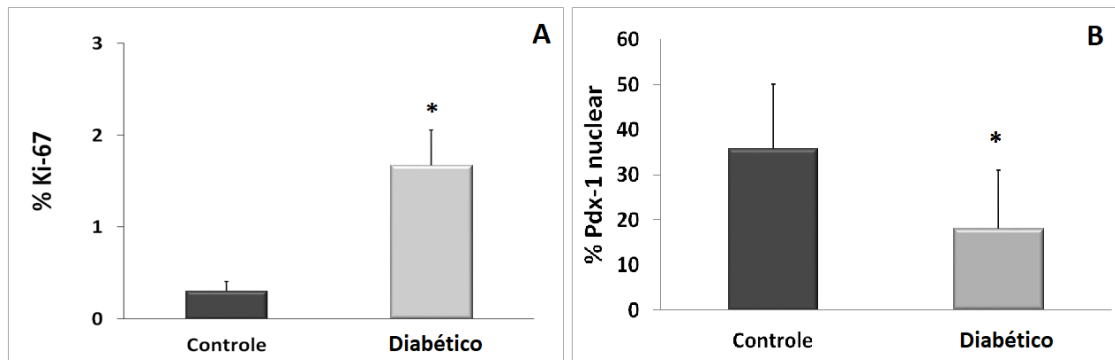


Figura 2. Marcação nuclear (Imunoistoquímica) para os anticorpos anti-Ki-67 e anti-Pdx-1 no dia 18 de prenhez. A – Comparação entre a porcentagem (razão entre o número de células marcadas para Ki-67/número total de células nas ilhotas pancreáticas x 100) em ambos os grupos experimentais. B – Comparação entre a porcentagem de células imunomarcadas para Pdx-1 nas ilhotas pancreáticas em ambos os grupos experimentais. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n= 100 ilhotas/grupo).

* $p < 0,05$ – comparado ao grupo controle (Poisson - para imunomarcção com anti-Ki-67).

* $p < 0,05$ – comparado ao grupo controle (Distribuição Gama - para imunomarcção com anti-Pdx-1).

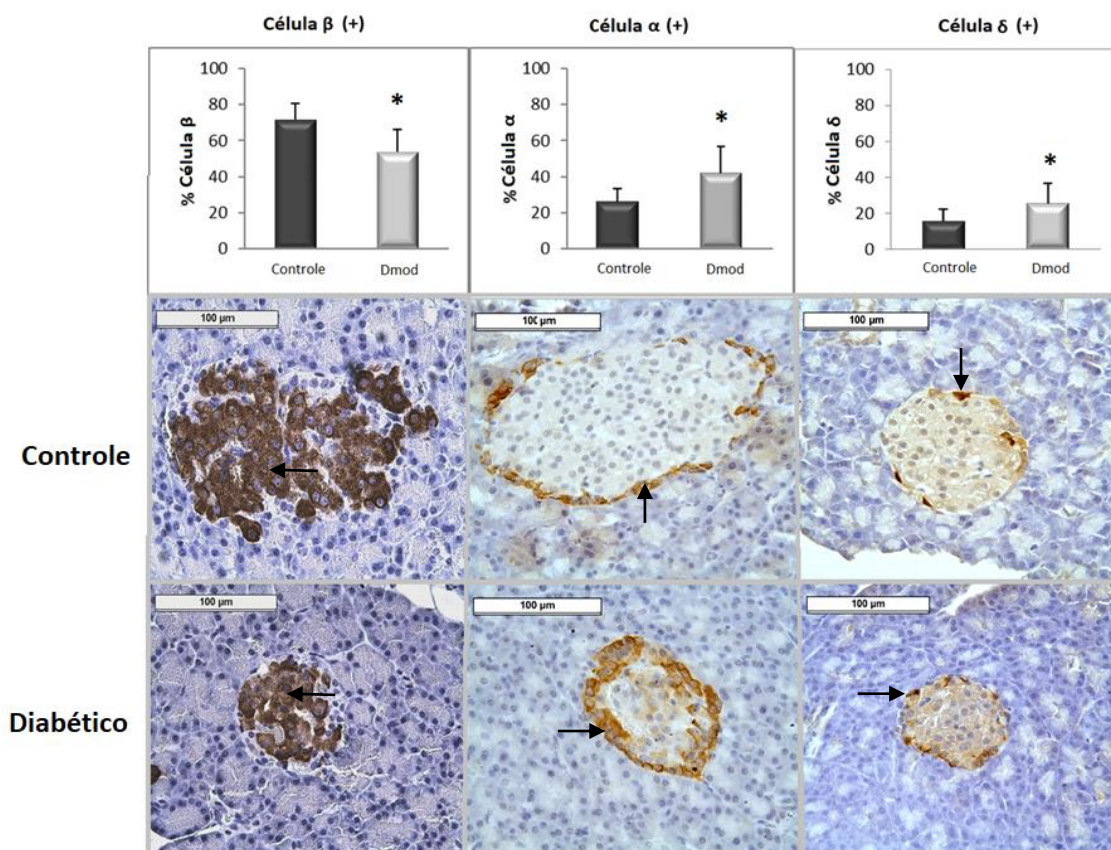


Figura 3. Imunoistoquímica para a imunomarcção citoplasmática (setas pretas) para anti-insulina (célula β), anti-glucagon (célula α) e anti-somatostatina (célula δ) nas ilhotas pancreáticas no dia 18 de prenhez. A - Comparação entre a porcentagem de insulina (razão entre o número de células marcadas para insulina/número total de células nas ilhotas pancreáticas x 100) em ambos os grupos experimentais. B e C - Fotomicrografia dos pâncreas de ratos controle (B) e com diabetes (C) mostrando a imunomarcção citoplasmática para insulina ao centro da ilhota pancreática. D - Comparação entre a porcentagem de glucagon (razão entre o número de células marcadas para glucagon/número total de células nas ilhotas pancreáticas x 100) em ambos os grupos experimentais. E e F - Fotomicrografia dos pâncreas de ratos controle (E) e com diabetes (F) mostrando a imunomarcção citoplasmática para glucagon ao centro da ilhota pancreática. G - Comparação entre a porcentagem de somatostatina (razão entre o número de células marcadas para somatostatina/número total de células nas ilhotas pancreáticas x 100) em ambos os grupos experimentais. H e I - Fotomicrografia dos pâncreas de ratos controle (H) e com diabetes (I) mostrando a imunomarcção citoplasmática para somatostatina ao redor da ilhota pancreática. Aumento 40X.

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=100$ ilhotas/grupo).

* $p<0,05$ - comparado ao grupo controle (Poisson).

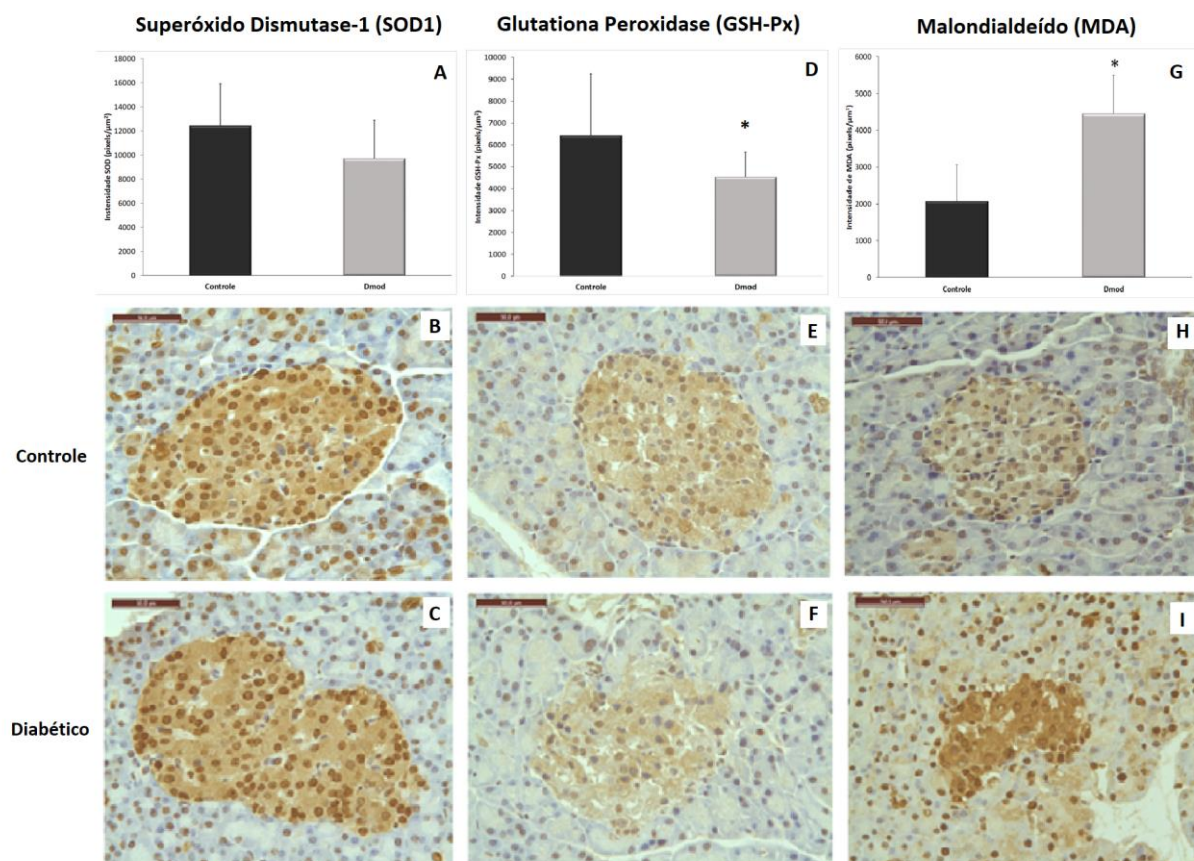


Figura 4. Imunomarcção para anticorpos anti-SOD1, anti-GSH-Px e anti-MDA nas ilhotas pancreáticas das ratas controle e diabéticas com 18 dias de prenhez. Aumento 40X. A – Comparação entre a intensidade de marcação para SOD1 nas ilhotas pancreáticas das ratas controle e diabéticas no dia 18 de prenhez. B e C – Imunomarcção para SOD1 nas ilhotas pancreáticas (citoplasmática e nuclear) de ratas controle (B) e com diabetes (C). D – Comparação entre a intensidade de marcação para GSH-Px nas ilhotas pancreáticas das ratas controle e diabéticas no dia 18 de prenhez. E e F – Imunomarcção para GSH-Px nas ilhotas pancreáticas (citoplasmática e nuclear) de ratas controle (E) e com diabetes (F). G – Comparação entre a intensidade de marcação para MDA nas ilhotas pancreáticas das ratas controle e diabéticas no dia 18 de prenhez. H e I – Imunomarcção para MDA nas ilhotas pancreáticas (citoplasmática e nuclear) de ratas controle (H) e com diabetes (I).

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n= 100 ilhotas/grupo).

* $p < 0,05$ – comparado ao grupo controle (Teste-T).

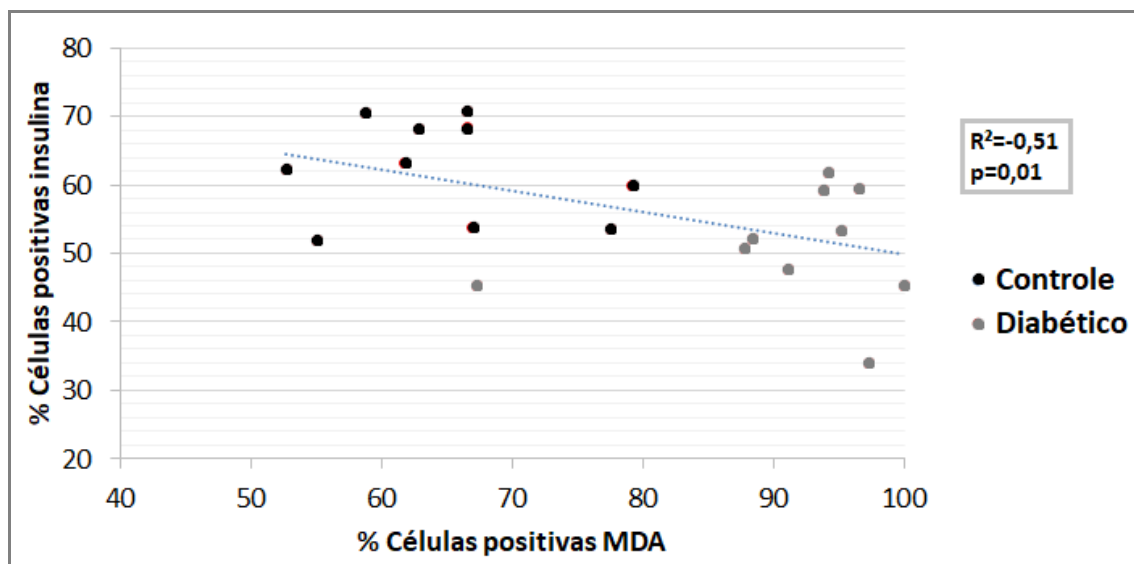


Figura 5. Correlação negativa entre células imunomarcadas para insulina e MDA nas ilhotas pancreáticas de ratas com 18 dias de prenhez.
Correlação de Pearson

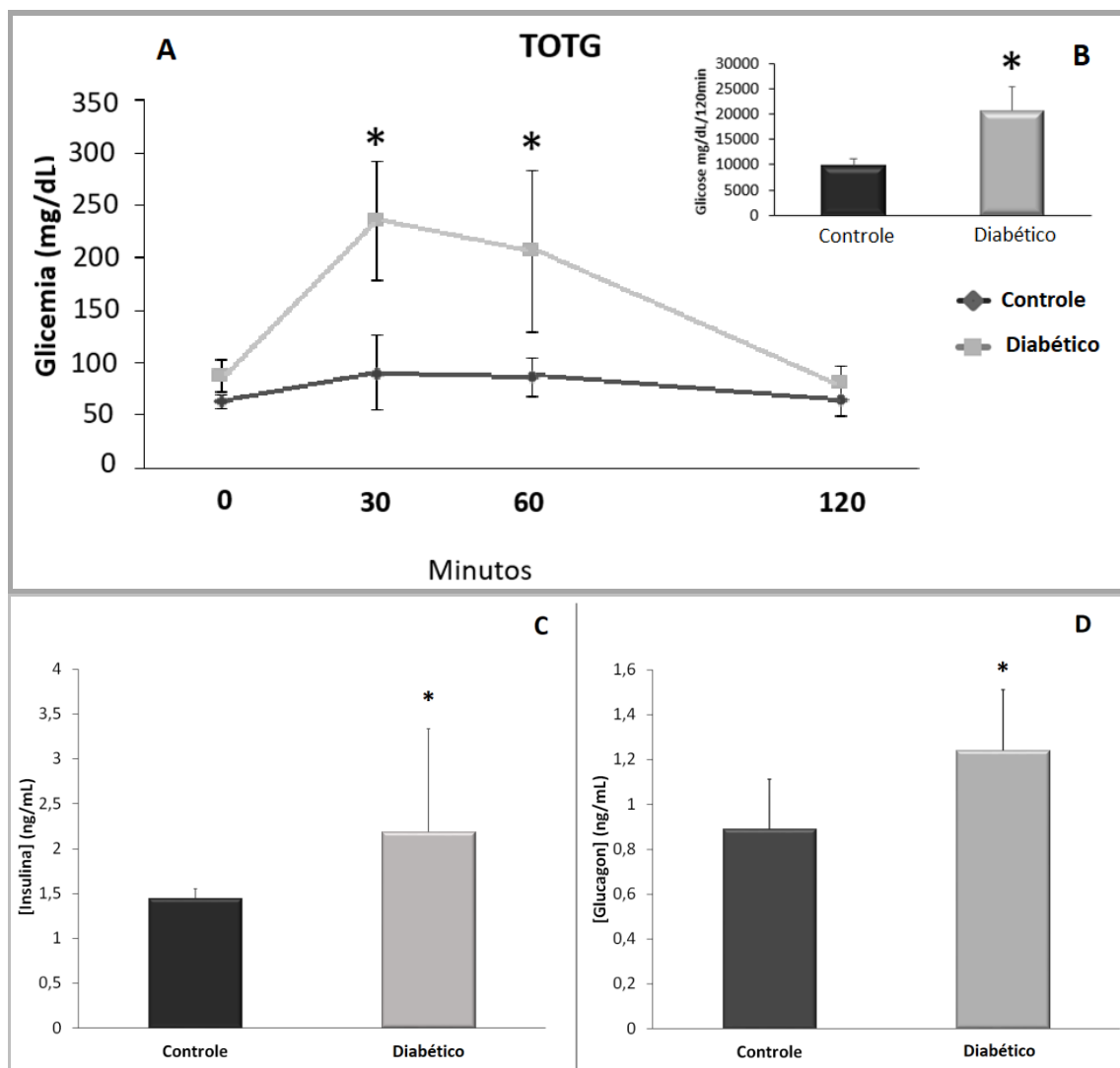


Figura 6. Ensaios bioquímicos. A – Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) no dia 17 de prenhez. B – Área sob a curva no dia 17 de prenhez. C – Concentração sérica de Insulina no dia 18 de prenhez. D – Concentração sérica de Glucagon no dia 18 de prenhez.

Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG):

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 10$ animais/grupo/momento).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo controle (Teste-T com medidas repetidas para TOTG).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo controle (Teste-T para área sob a curva - AUC e concentração sérica de glucagon).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo controle (Distribuição Gama para concentração sérica de insulina).

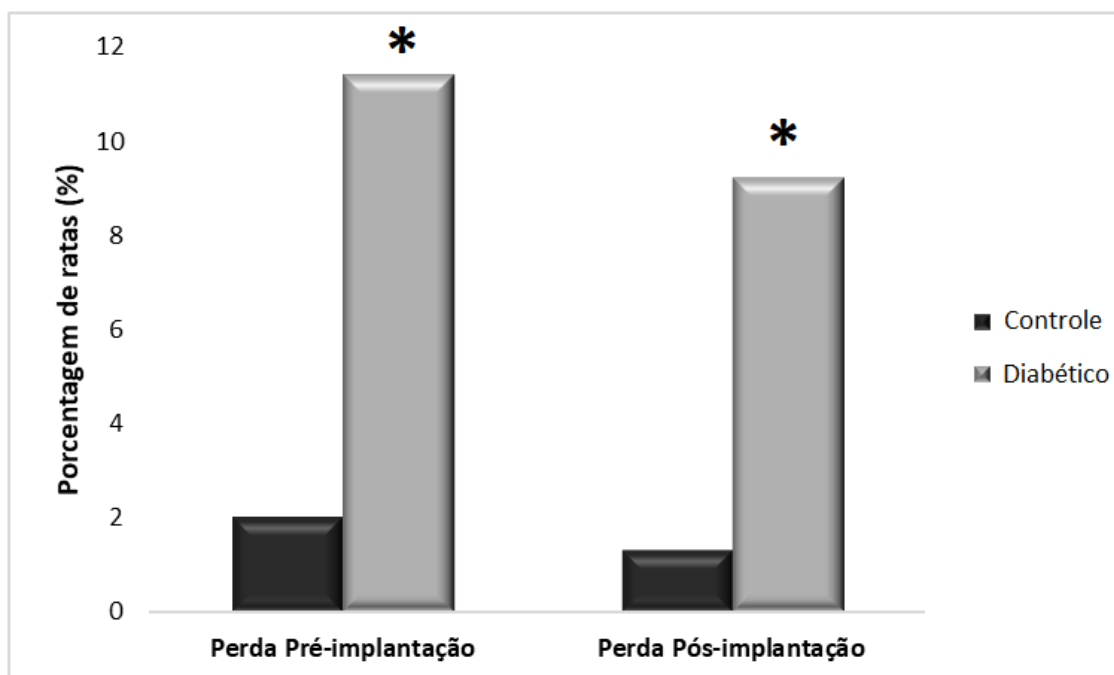


Figura 7. Porcentagem (%) de perdas pré e pós-implantação nas ratas controle e com diabetes no dia 18 de prenhez.

Dados expressos como porcentagem média.

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo controle (Análise de Contingência).

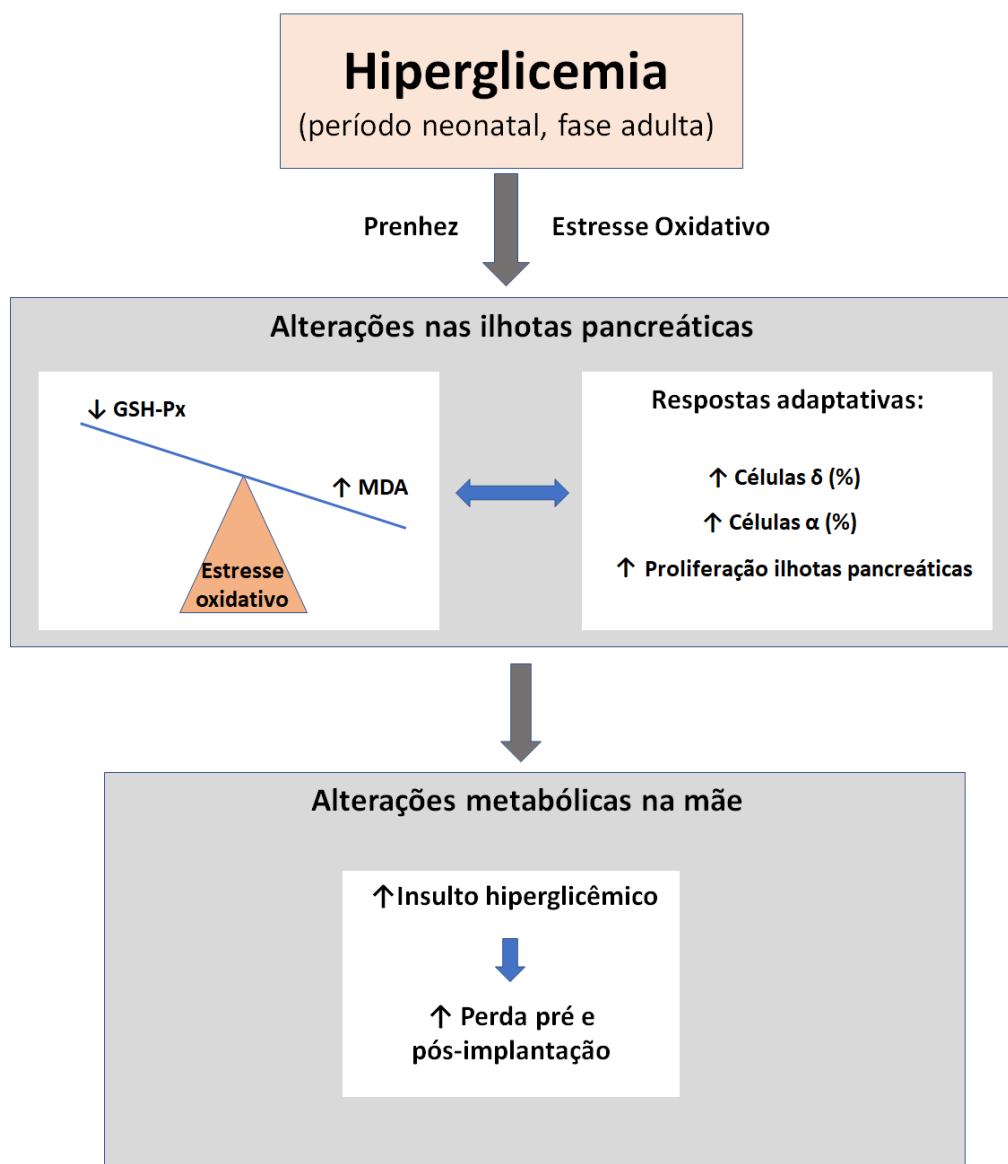


Figura 8. Ilustração dos mecanismos pelos quais a hiperglicemia leva a alterações pancreáticas e prejuízo no desempenho reprodutivo em ratas diabéticas prenhes.

DISCUSSÃO

A elucidação dos mecanismos responsáveis pelas mudanças nas células β antes e durante a prenhez é relevante para a compreensão da patogênese do diabetes. O presente estudo demonstrou que as ilhotas pancreáticas de ratas diabéticas diminuíam a intensidade de células imunomarcadas para GSH-Px, aumento na intensidade de marcação para MDA, aumento na porcentagem de células α e δ , aumento na proliferação celular nas ilhotas pancreáticas e diminuição na porcentagem de células β -pancreáticas. Além disso, houve dois pontos alterados no TOTG, aumento nas concentrações séricas de glucagon e insulina, e aumento na porcentagem de perdas pré e pós-implantação embrionárias.

Poucos estudos com diabetes e prenhez são encontrados na literatura, com isso, este trabalho contribuiu para avaliar o mecanismo pelo qual ocorre a má adaptação do pâncreas endócrino no diabetes em associação à prenhez. No entanto, não foi realizada a dupla marcação das células pancreáticas endócrinas para determinar qual a célula que está em proliferação, além disso, o cálculo da massa de células pancreáticas endócrinas não foi realizado.

No presente estudo, foi utilizado um modelo de diabetes com níveis glicêmicos de menor intensidade previamente padronizado em nosso laboratório [24, 25]. Para indução do diabetes em ratos, utilizou-se o STZ como agente químico diabetogênico. Durante o período neonatal (até o dia 17 de vida), o pâncreas endócrino de roedores tem alta taxa de proliferação celular, sendo este, um mecanismo fisiológico que ocorre no organismo, possibilitando adaptação pancreática conforme o crescimento do animal e possibilitando a homeostase da glicose na idade adulta [26, 27]. Além disso, as células β podem sofrer neogênese a partir de outras células ou através de precursores ductais, o que também contribui para a expansão da massa de células β durante o desenvolvimento do organismo [28]. Devido à proliferação fisiológica e à neogênese pancreática, ratos que são expostos ao STZ, no período neonatal, têm regeneração parcial das células β , resultando em hiperglicemia de intensidade leve a moderada na vida adulta destes animais [29].

Neste trabalho, observou-se que as ratas diabéticas prenhes apresentaram ilhotas pancreáticas com citoarquitetura arredondada, assim como encontrado na literatura [30]. No entanto, com diminuição da área total da porção endócrina. Além disso, houve diminuição na porcentagem de células β -pancreáticas e aumento da porcentagem das células imunomarcadas para glucagon e somatostatina. Estudo prévio realizado em ratas adultas (90 dias de vida) não-prenhes com diabetes também apresentam ilhotas pancreáticas com

citoarquitetura arredondada, diminuição da área e porcentagem de células β -pancreáticas de forma similar ao dos animais não-diabéticos (dados não publicados), comprovando que a prenhez foi a responsável pelo número reduzido de células β -pancreáticas, mesmo aumentando o número de células em proliferação no interior das ilhotas pancreáticas, conforme observado neste estudo. Portanto, este resultado sugere que a proliferação ocorreu em células não- β pancreáticas. No entanto, não houve uma análise de dupla marcação para confirmar esta hipótese e identificar o tipo celular em proliferação (α ou δ).

Embora não tenha sido realizada a análise de massa de células nas ilhotas pancreáticas, foi observado aumento da porcentagem de células α e δ -pancreáticas e aumento nas concentrações séricas de glucagon nas ratas prenhes diabéticas. Estudos com pacientes diabéticos (DM2) mostram aumento na massa de células α pancreáticas [31, 32] e aumento dos níveis séricos de glucagon [33, 34], mostrando que o diabetes também resulta da secreção excessiva de glucagon e não somente da falha das células β -pancreáticas. No entanto, não existem dados na literatura que confirmem estes achados utilizando esse modelo de diabetes na prenhez de ratas.

Diante dos resultados encontrados, vários mecanismos podem estar relacionados às alterações morfológicas e funcionais das ilhotas pancreáticas, dentre eles o fator de transcrição Pdx-1, que apresentou diminuição na porcentagem de células imunomarcadas em ratas diabéticas prenhes. Sabe-se que o Pdx-1 desempenha um papel central na sobrevivência das células β -pancreáticas e atua como regulador-chave da expressão gênica da insulina quando localizados no núcleo das células β -pancreáticas [10]. Ardestani *et al.* [12] também verificaram diminuição na porcentagem da imunomarcagem de insulina e de Pdx-1 nuclear em linhagens de células β de ratos que foram submetidas a altas concentrações de glicose (glicemia > 400 mg/dL). Estudos mostram que a hiperglicemia crônica, mesmo de intensidade moderada, induz a glicotoxicidade, resultando em disfunção e diminuição da massa de células β [35], tanto em modelos animais, como em humanos [36], sugerindo novamente que, a proliferação observada neste estudo, pode estar ocorrendo em células não- β .

O mecanismo que poderia justificar a redução da imunomarcagem de Pdx-1 no ambiente diabético é a presença de estresse oxidativo, induzido por hiperglicemia. Neste estudo, as ratas diabéticas prenhes tiveram diminuição na intensidade da marcação de GSH-Px e aumento na intensidade de marcação para MDA, confirmando o estado de estresse oxidativo. Além disso, houve correlação negativa de 50% entre a porcentagem de células imunomarcadas para insulina e MDA, que confirma que à medida que aumenta a lipoperoxidação, diminui o número de células β nas ilhotas pancreáticas. Vários estudos evidenciam o papel do estresse oxidativo na disfunção das células β [37, 38]. Kawamori *et al.*

[39] submeteram a linhagem de células β em 50 μ mol/L de H₂O₂ por 24h e foi verificado, através da expressão proteica, que houve diminuição de Pdx-1 no núcleo das células β -pancreáticas com o aumento do tempo de exposição ao peróxido de hidrogênio.

Estudos demonstram que durante a prenhez, as ilhotas pancreáticas maternas aumentam em número de células e/ou em tamanho para compensar as demandas fisiológicas da prenhez [40]. No presente estudo, a prenhez diabética causou aumento do número de ilhotas para compensar a redução do número destas células além do aumento das concentrações séricas de insulina e hiperglicemia. Os picos hiperglicêmicos existentes nestas ratas prenhes diabéticas levaram a alterações metabólicas, que repercutiram no organismo materno e na unidade feto-placentária. No presente estudo, houve aumento na porcentagem de perdas pré e pós-implantação embrionárias no grupo diabético. Estudos demonstram que a perda pré-implantação pode estar relacionada com a diminuição da concentração da proteína GM-CSF uterina nestas ratas [41], proteína a qual é secretada no lúmen uterino pelas células epiteliais do oviduto e útero, especialmente no período de pré-implantação, proporcionando o desenvolvimento e a sobrevivência do embrião [42]. Portanto, independentemente, da concentração de glicose e insulina em jejum estarem normais, o diabetes levou a alterações metabólicas que prejudicaram a implantação embrionária e o desenvolvimento de sua prole.

Com isso, observou-se que a hiperglicemia em associação a prenhez levou a alterações nas ilhotas pancreáticas como quadro de estresse oxidativo, com diminuição da intensidade de células imunomarcadas para GSH-Px e aumento na intensidade de marcação para MDA, aumento na porcentagem de células não- β e aumento na proliferação celular nas ilhotas pancreáticas. As modificações presentes no pâncreas endócrino levaram a alterações metabólicas maternas, resultando em aumento na porcentagem de perdas pré e pós-implantação embrionárias. Portanto, a associação entre o diabetes e a prenhez levou respostas adaptativas no pâncreas endócrino que não foram suficientes para controlar a homeostase da glicose, resultando em prejuízo no desempenho reprodutivo materno.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Danilo Chaguri, técnico responsável pelo Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia, pelo manuseio dos animais e auxílio nas laparotomias e ao pós-graduando, Eduardo Klöppel, pelo auxílio nas dosagens bioquímicas.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kordowich S, Mansouri A, Collombat P (2009). Reprogramming into pancreatic endocrine cells based on developmental cues. *Mol Cell Endocrinol* 315(1-2): 11-8.
2. Jetton TL, Lausier J, LaRock K, WE, Larmie B, Habibovic A, Peshavaria M, Leahy JL (2005). Mechanisms of Compensatory β -Cell Growth in Insulin-Resistant Rats. *Diabetes*. Aug; 54.
3. Matveyenko AV, Veldhuis JD, Butler PC. Adaptations in pulsatile insulin secretion, hepatic insulin clearance, and beta-cell mass to age-related insulin resistance in rats. *m J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Oct;295(4):E832-41.
4. Sorenson RL, Breije TC (1997). Adaptation of Islets of Langerhans to Pregnancy: β -Cell Growth, Enhanced Insulin Secretion and the Role of Lactogenic Hormones. *Horm. Metab. Res.* 29:301-307.
5. Kawai M, Kishi K (1999). Adaptation of pancreatic islet B-cells during the last third of pregnancy: regulation of B-cell function and proliferation by lactogenic hormones in rats. *European Journal of Endocrinology*. 141:419–425.
6. Handwerger S, Freemerk M (2000). The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Ped Endocrinol Metab*. 13:343-56.
7. Van Assche FA, Aerts L, De Prins F (1978). A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 85:818-20.
8. Sørensen B, Gaarn LW, Nalla A, Billestrup N, Nielsen JH (2014). Co-ordinated regulation of neurogenin-3 expression in the maternal and fetal pancreas during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 93(11):1190-7.
9. Gannon M, Ables ET, Crawford L, Lowe D, Offield MF, Magnuson MA, Wright CV (2008). Pdx-1 function is specifically required in embryonic beta cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Dev Biol*. Feb 15;314(2):406-17.
10. Petersen H, Peshavaria M, *et al.* (1998). Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett*. 431, 362–366.
11. Andrali SS, Sampley ML, Vanderford NL, Ozcan S (2008). Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β -cells. *Biochem. J*. 415, 1–10.
12. Ardestani A, Sauter NS, Paroni F, Dharmadhikari G, Cho JH, Lupi R, Marchetti P, Oberholzer J, Conte JK, Maedler K (2011). Neutralizing interleukin-1 β (IL-1 β) induces beta-cell survival by maintaining PDX1 protein nuclear localization. *J Biol Chem*. 286:17144-55.
13. Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D (2012). Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell*. 150(6):1223-34.
14. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radical Biology & Medicine*. 20(3):463-466.
15. Gerber PA, Rutter GA (2016). The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxidants & Redox signaling*. 00(00).

16. Yessoufou A, Soulaïmann N, Merzouk SA, Moutairou K, Ahissou H, Prost J, Simonin AM, Merzouk H, Hichami A, Khan NA (2006). N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring. *Int J Obes (Lond)*. May;30(5):739-50.
17. Dallaqua B, Saito FH, Rodrigues T, *et al.* (2012). Treatment with *Azadirachta indica* in diabetic pregnant rats: negative effects on maternal outcome. *J Ethnopharmacol*. 143(3): 805–811.
18. Spada AP, Damasceno DC, Sinzato YK, Campos KE, Faria PA, Dallaqua B, Calderon IM, Rudge MV, Rodrigues T (2014). Oxidative Stress in Maternal Blood and Placenta From Mild Diabetic Rats. *Reprod Sci*. Aug;21(8):973-977.
19. Raza H, John A (2004). Glutathione metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissues from streptozotocin-induced diabetic mothers. *Diabetes Metab Res Rev*. 04(20): 72–78.
20. Sinzato YK, Damasceno DC, Laufer-Amorim R, Rodrigues MMP, Oshiiwa M, Taylor KN, Rudge MVC (2011). Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha as predictors of alterations in the embryofetal organism and the placental development of diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 44(3):206-11.
21. Damasceno DC, Kempinas WG, Volpato GT, Consoni M, Rudge MVC, Paumgarten FJR. *Anomalias Congênitas: Estudos Experimentais*, 1ed. Coopmed, Belo Horizonte, 2008.
22. Mello MAR, Souza T, Braga LR, Santos W, Ribeiro IA, Gobatto CA (2001). Glucose tolerance and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. *Physiol Chem Phys Med*. 33(1):63-71.
23. Song I, Patel O, Himpe E, Muller CJF, Bouwens L (2015). Beta cell mass restoration in alloxan-diabetic mice treated with EGF and gastrin. *PLoS ONE*. 2010;(10).
24. Iessi IL, Sinzato YK, Gallego FQ, Nielsen JH, Damasceno DC (2016). Effect of Diabetes on Circulating Pancreatic Hormones in Pregnant Rats and Their Offspring. *Horm Metab Res*. 48(10): 682-686.
25. Santos TM, Sinzato YK, Gallego FQ, Iessi IL, Volpato GT, Dallaqua B, Damasceno DC (2015). Extracellular HSP70 levels in diabetic environment in rats. *Cell Stress Chaperones*. Jul;20(4):595-603.
26. Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S (1997). Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology*. 138(4):1736-41.
27. Aguayo-Mazzucato C, Koh A, El Khattabi I, Li WC, Toschi E, Jermendy A, Juhl K, Mao K, Weir GC, Sharma A, Bonner-Weir S (2011). MafA expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. *Diabetologia*. 54(3):583-93.
28. Lipsett M, Finegood DT (2002). Beta-cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats. *Diabetes*. Jun;51(6):1834-41.
29. Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G (1974). Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes*. 23(11): 889–895.
30. Bonner-Weir S, Sullivan BA, Weir GC. Human Islet Morphology Revisited: Human and Rodent Islets Are Not So Different After All. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(8):604-12.
31. Iki K, Pour PM (2007). Distribution of pancreatic endocrine cells including IAPP-expressing cells in non-diabetic and type 2 diabetic cases. *J Histochem Cytochem*. 55:111-118.

32. Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, Sgroi A, Muller YD, Giovannoni L, Parnaud G, Berney T (2010). Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*. 59:1202-1210.
33. Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG (1987). Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes*. 36:274-283.
34. Reaven GM, Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Jaspan JB (1987). Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in non obese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 64:106-110.
35. Poitout V, Robertson RP (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*. 29:351–366.
36. Wajchenberg BL (2007). Beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr Rev*. 28:187–218.
37. Ihara Y, Yamada Y, Toyokuni S, Miyawaki K, Ban N, Adachi T, Kuroe A, Iwakura T, Kubota A, Hiai H, Seino Y (2000). Antioxidant alpha-tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes. *FEBS Lett*. May 4;473(1):24-6.
38. Gorogawa S, Kajimoto Y, Umayahara Y, Kaneto H, Watada H, Kuroda A, Kawamori D, Yasuda T, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M (2002). Probucol preserves pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 57:1–10.
39. Kawamori D, Kajimoto Y, Kaneto H, Umayahara Y, Fujitani Y, Miyatsuka T, Watada H, Leibiger IB, Yamasaki Y, Hori M (2003). Oxidative Stress Induces Nucleo-Cytoplasmic Translocation of Pancreatic Transcription Factor PDX-1 Through Activation of c-Jun NH₂-terminal Kinase. *Diabetes*. Dec;52(12):2896-904.
40. Fujimoto K, Polonsky KS (2009). Pdx1 and other factors that regulate pancreatic β -cell survival. *Diabetes Obes Metab*. Nov;11(Suppl 4):30–37.
41. Bueno A, Sinzato YK, Rudge MVC, Damasceno DC (Em redação). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) uterine lumen concentrations during the early pregnancy of diabetic rats.
42. Hardy K, Spanos S (2002). Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J Endocrinol*. 172(2):221–236.

Anexo



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA





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

CERTIFICADO Nº 1219/2017-CEUA

Certificamos que a proposta intitulada **"Repercussão do diabetes moderado no estresse oxidativo e hormônios pancreáticos ao longo da vida de ratas"**, conduzida pela Pesquisadora: Franciane Quintanilha Gallego Souza, Orientada pela Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos, registrada com o nº 1219/2017, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 27 de abril de 2017.

Finalidade	() Ensino - (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2020
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos/Wistar
Nº de animais	204
Idade/Peso	Diferentes idades/depende da idade
Sexo	192 Fêmea/12 Machos
Origem	Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO)



Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente
Comissão de Ética/no Uso de Animais - CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1609 e-mail secretaria: ceua@fmb.unesp.br