



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DAILSON NOGUEIRA DE SOUZA

EFEITOS DO EXCESSO DE GLICOCORTICOIDES PRÉ-NATAL SOBRE O
REMODELAMENTO FISIOLÓGICO DA ILHOTA PANCREÁTICA MATERNA
MEDIADO PELA UPR

CAMPINAS

2016

DAILSON NOGUEIRA DE SOUZA

EFEITOS DO EXCESSO DE GLICOCORTICOIDES PRÉ-NATAL SOBRE O
REMODELAMENTO FISIOLÓGICO DA ILHOTA PANCREÁTICA MATERNA
MEDIADO PELA UPR

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SILVANA AUXILIADORA BORDIN DA SILVA
COORDENADOR: Prof. Dr. GABRIEL FORATO ANHÊ

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO DAILSON NOGUEIRA DE SOUZA, E ORIENTADO PELA
PROF. DR^a. SILVANA AUXILIADORA BORDIN DA SILVA.

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 159658/2015-2; CAPES, 01-P-3488/2014; CAPES, 01-P-4348/2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

So89e Souza, Dailson Nogueira, 1985-
Efeito do excesso de glicocorticoides pré-natal sobre o remodelamento fisiológico da ilhota pancreática materna mediado pela UPR / Dailson Nogueira de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Silvana Auxiliadora Bordin da Silva.

Coorientador: Gabriel Forato Anhô.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Dexametasona. 2. Gravidez. 3. Ilhotas pancreáticas. 4. Apoptose. 5. Resposta a proteínas não dobradas. I. Silva, Silvana Auxiliadora Bordin da. II. Anhô, Gabriel Forato, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of glucocorticoid excess in the last third of pregnancy on physiological remodeling of maternal pancreatic islet mediated of UPR

Palavras-chave em inglês:

Dexamethasone

Pregnancy

Islets of langerhans

Apoptosis

Unfolded protein response

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Silvana Auxiliadora Bordin da Silva [Orientador]

Marco Aurélio Ramirez Vinolo

Camilo de Lellis-Santos

Data de defesa: 21-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

DAILSON NOGUEIRA DE SOUZA

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. SILVANA AUXILIADORA BORDIN DA SILVA

COORIENTADOR: Prof. Dr. GABRIEL FORATO ANHÊ

MEMBROS:

1. PROF^a. DR^a. SILVANA AUXILIADORA BORDIN DA SILVA – ICB/USP

2. PROF. DR. MARCO AURÉLIO RAMIREZ VINOLO – IB/UNICAMP

3. PROF. DR. CAMILO DE LELLIS-SANTOS – UNIFESP

Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 21/07/2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a meus pais e a toda minha família que, mesmo durante todas as dificuldades que encontramos durante esta caminhada, ajudaram-me a permanecer firme e continuar lutando.

Agradeço aos professores Silvana e Gabriel que me orientaram e me mostraram o mundo da pesquisa, apoiando e ensinando muito durante estes dois anos.

Agradeço a todos os meus amigos do laboratório, Junia, Danilo, Carol Solon, Priscilla, Juliana, Filipe, Caio e Rodrigo por todos os momentos de alegria e aprendizado, proporcionando um ambiente favorável para minha formação.

Agradeço também a todos os alunos e funcionários do Departamento de Farmacologia da Unicamp que, direta ou indiretamente, tornaram possível a realização desse projeto.

Agradeço também à CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

A gravidez é caracterizada por uma série de modificações fisiológicas maternas para se adaptar tanto à presença do feto quanto às alterações características da gravidez. Uma das alterações ocorridas nesse período é a resistência periférica à insulina, que leva ao aumento do volume e proliferação de células β . O período pós-parto é caracterizado por um aumento da apoptose deste tipo celular e, considerando que o remodelamento funcional do pâncreas ocorre numa estreita janela para a manutenção da homeostasia energética materna, aventamos que o excesso de glicocorticoides pode alterar esse remodelamento e, a longo prazo, impactar na resposta secretora apropriada. Neste trabalho, verificamos a participação da UPR (*Unfolded Protein Response*) e apoptose frente ao excesso de glicocorticoide, no remodelamento pancreático pós-natal. Para isso, foram realizadas dosagens bioquímicas (glicemia randômica, colesterol, triglicérides, insulina), hormonal no periparto (estradiol) e, além disso, ilhotas pancreáticas foram utilizadas para avaliação da apoptose (citometria, PCR, Western Blot). Nossos resultados mostram que o excesso de glicocorticoides no final da prenhez reduz a expressão da via da UPR (ATF4, CHOP), associado com a diminuição da expressão de TRB3 e aumento da pAKT, com conseqüente redução da fragmentação de DNA. O tratamento com glicocorticoides leva também à redução da expressão de genes pró-apoptóticos (CD40L e Cidea) tanto no período gestacional (20 dias de prenhez) quanto no terceiro dia de lactação.

Palavras-chave: Dexametasona. Gravidez. Ilhotas pancreáticas. Apoptose. UPR.

ABSTRACT

Pregnancy is characterized by a series of physiologicalmaternal changes to adapt to the fetus presence and the characteristic changes of pregnancy. One of the changes in this period is peripheral insulin resistance, which leads to increased volume and proliferation of β cells. The postpartum period is characterized by increased apoptosis of this cell type and, considering that the functional remodeling of the pancreashappens in a close time window to maintain maternal energy homeostasis, we hypothesized that excess of glucocorticoids can change this remodeling and, in the long-term, impact the appropriate secretory response. In this work we see the participation of the UPR (Unfolded Protein Response) and apoptosis compared to excess glucocorticoids, in postpartum pancreatic remodeling. For this was carried out biochemical tests (random glucose, cholesterol, triglycerides, insulin), peripartum hormone (estradiol) and, moreover, pancreatic islets were used for assessment of apoptosis (flow cytometry, PCR, Western blot). Our results show that excess glucocorticoid reduces the expression of important UPR pathway (ATF4, CHOP), associated with decreasedTRB3 expression and increased pAKT, with consequent reduction in DNA fragmentation. Treatment with glucocorticoids also leads to reduced expression of pro-apoptotic genes (CD40L and Cidea) both during pregnancy (20 days of pregnancy) and at the third day of lactation.

Keywords: Dexamethasone. Pregnancy. Pancreatic islet. Apoptosis. UPR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alteração da massa e volume de células β pancreáticas durante a gestação.....	17
Figura 2 - Vias de sinalização da UPR.....	19
Figura 3. Desenho experimental de tratamento com dexametasona	32
Figura 4. Desenho experimental de tratamento com dexametasona e associado ao tamoxifeno.....	32
Figura 5. Desenho experimental para protocolo em vigésimo dia gestacional (G20).....	33
Figura 6. Evolução do peso gestacional durante tratamento com dexametasona ...	42
Figura 7. Evolução do peso gestacional durante tratamento com dexametasona e associado com tamoxifeno	43
Figura 8. Ganho de peso de neonatos	44
Figura 9. Ganho de peso de neonatos	45
Figura 10. Dosagens bioquímicas após 8 horas de jejum	47
Figura 11. Dosagens bioquímicas realizadas randomicamente	48
Figura 12. Dosagens de 17- β estradiol (E2) no vigésimo dia gestacional	49
Figura 13. Fragmentação de DNA em L3.....	50
Figura 14. Fragmentação de DNA em L3.....	51
Figura 15. Fragmentação de DNA em G20.....	51
Figura 16. Porcentagem de eventos de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	52
Figura 17. Western Blot.....	53
Figura 18. Western Blot.....	54
Figura 19. Array de apoptose L3-Dex vs L3	56
Figura 20. Array de apoptose L3-Dex-T vs L3.....	57

Figura 21. Array de apoptose L3-Dex-T vs Le-Dex	58
Figura 22. Array de apoptose (comparativo multigrupos – L3)	59
Figura 23. Array de apoptose G20-dex vs G20-veículo.....	60
Figura 24. Array de apoptose (comparativo multigrupos – G20)	61
Figura 25. Análise da expressão gênica de CD40L em L3 e Cidea em G20.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de neonatos por grupo.....	46
Tabela 2 – Quantidade de fetos por grupo	46
Tabela 3 – Regulação gênica L3-Dex vs L3	55
Tabela 4 – Regulação gênica L3-Dex vs L3	56
Tabela 5 – Regulação gênica L3-Dex-T vs L3-Dex	58
Tabela 6 - Regulação gênica G20-Dex vs G20-Veículo	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase

AP-1 – Activator Protein-1

ATF4 – activating transcription fator 4

ATF5 – activating transcription fator 5

ATF6 – Activating Transcription Fator 6

Bad – BCL2-associated agonist of cell death

Bax – Bcl2-associated X protein

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2

Bcl2L11 (BIM) – Bcl2-like protein 11

Bcl-xL – B-cell lymphoma-extra Large

Bid – BH3 interacting domain death agonist

BiP/GRP78 – Binding Immunoglobulin Protein/ Glucose-Regulated Protein of 78 KDa

bZip – Basic Leucine Zipper

CD40L – CD40 ligante

cDNA – DNA complementar

CHOP – C/EBP homologous protein

Cidea – Cell death-inducing DFFA-like effector a

DBD – Domínio de Ligação de DNA

E2 – 17 β -estradiol

eIF2 α – eucaryotic translation initiation fator 2 alpha

ELISA – Enzyme-LinkedImmunisorbentAssay

ERAD – Degradação Associada ao Retículo Endoplasmático

ERE – Elemento de Resposta aos Estrógenos

ER α – Receptor de Estrógeno alfa

ER β – Receptor de Estrógeno beta

GPER – Proteína G Acoplada ao Receptor de Estrógeno

GR – Receptor de Glicocorticoide

HPA – Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal

IRE-1 – Inositol-Requiring Protein-1 α

JNK – c-Jun N-terminal Kinases

Mcl-1 – Myeloid cell leukemia sequence 1

mRNA – RNA mensageiro

NF- κ B – Nuclear Factor kappa B

NICHD – Instituto Nacional da Saúde Infantil e Desenvolvimento Humano

NK – Natural Killer

pAKT – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase phosphorylation

PBA – Ácido 4-fenilbutírico

PCR – Polymerase chain reaction

PERK – Protein Kinase RNA (PKR)-like ER Kinase

qPCR – quantitative PCR

RE – Retículo Endoplasmático

RIDD – Regulated IRE1-dependent Decay

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

S1P – lado 1 da protease

S2P – lado 2 da protease

TNF α – Tumor Necrosis Factor alpha

TRAF2 – TNF Receptor-Associated Fator-2

TRB3 – Tribble 3

UPR – Unfolded Protein Response

Xbp-1 – X-Box Binding Protein-1

Sumário

INTRODUÇÃO	16
UPR no restabelecimento da homeostasia do retículo endoplasmático	18
IRE1	20
PERK	21
ATF6	22
UPR no remodelamento pancreático	22
Uso de glicocorticoides durante a gravidez.....	23
Excesso de glicocorticoides no final da gestação	24
Ensaio <i>in vitro</i> da ação de dexametasona.....	25
Ensaio, <i>in vitro</i> , da ação de 17 β -estradiol (E2).....	26
Receptores de Glicocorticoides (GR) e de Estrógeno (ER)	27
Vias de apoptose em células β	28
Relação entre uso de Glicocorticoides e CD40L e TNF α	29
OBJETIVOS	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
Animais	31
Tratamento com dexametasona	34
Tratamento com dexametasona associado ao tamoxifeno	34
Dosagens bioquímicas.....	35
Dosagens Hormonais.....	35
Isolamento de ilhotas	35
Fragmentação do DNA	36
Quantificação da produção das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	37
Western Blot	38
Extração de RNA	39
Análise da Expressão Gênica em Larga Escala	40

Análise estatística	41
RESULTADOS	42
Evolução do peso gestacional	42
Evolução do peso médio de neonatos	43
Média de nascimentos por grupo	45
Dosagens bioquímicas.....	46
Dosagem hormonal.....	48
Fragmentação de DNA	49
Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	52
Western Blot	52
Array de apoptose.....	55
DISCUSSÃO	63
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	79

INTRODUÇÃO

A gravidez é caracterizada por uma série de modificações fisiológicas maternas para se adaptar tanto à presença do feto quanto às alterações características da mesma. Dentre as adaptações ocorridas, observa-se a resistência periférica à insulina, que leva a um aumento da secreção de insulina estimulada pela glicose, assim como à diminuição do limiar de estimulação da glicose (1-4). Essas adaptações culminam com o aumento da proliferação e volume das células β pancreáticas (5). Uma vez que, em roedores, células β correspondem de 65-80% das células nas ilhotas pancreáticas a massa de células β é dinamicamente regulada, mantendo-se sob um delicado equilíbrio entre regeneração e apoptose (6).

Sabe-se que, em roedores, o lactogênio placentário é considerado o primeiro hormônio a aumentar a função das células β pancreáticas (2), seguido por ação da prolactina (7). Como consequência da ação desses dois hormônios, o pâncreas endócrino passa por mudanças funcionais caracterizadas pelo aumento da secreção de insulina induzida pela glicose (8).

Todas as alterações morfo-funcionais observadas nas ilhotas pancreáticas, durante a gravidez, retornam ao normal após o parto (7). Já está bem estabelecido que, até dez dias após o parto, a massa de células β retorna a valores normais por aumento da taxa de apoptose, diminuição da proliferação, e redução do tamanho de células β (4). O aumento de apoptose associado à concomitante redução da proliferação da célula β materna é um reconhecido processo fisiológico do período pós-parto, que se estabelece entre de 48 e 72 horas depois do parto(9-11).

Na figura 1 (4) é possível observar um esquema das adaptações ocorridas na população de células β durante a prenhez em ratos. Nela observamos: (a) aumento da massa celular devido ao (b) aumento da replicação e (c) aumento da hipertrofia durante os dois primeiros terços da

gestação. Após o parto, a massa de célula β retorna a valores observados no estado não gravídico pelo (d) aumento da apoptose de célula β .

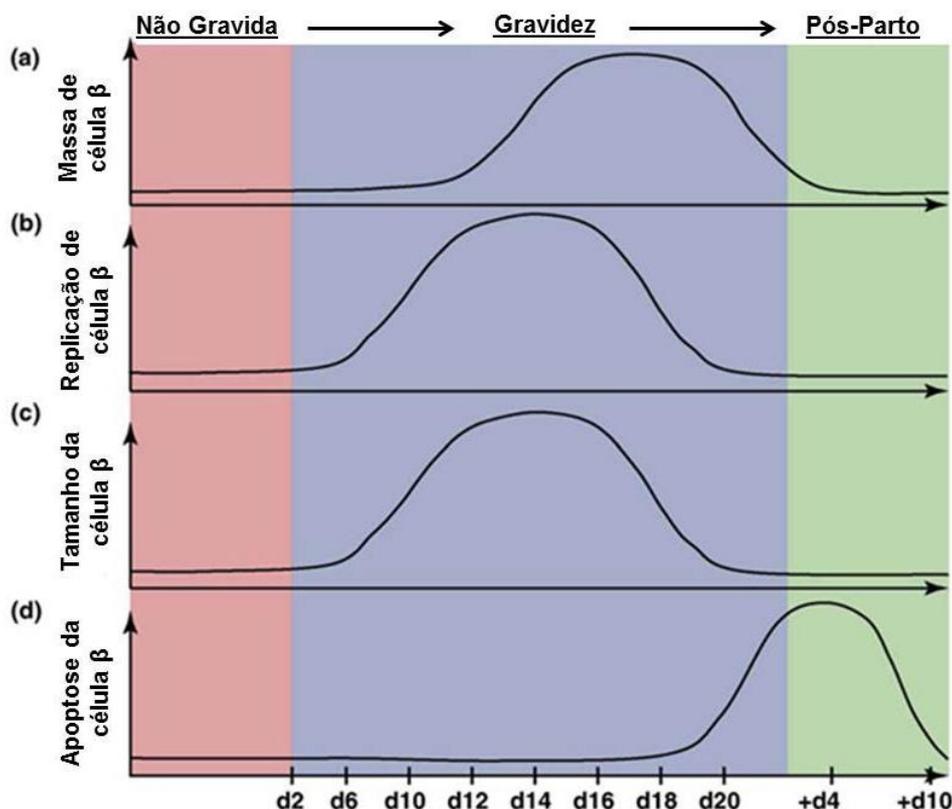


Figura 1 - Alteração da massa e volume de células β pancreáticas durante a gestação de ratos. Adaptado de: RIECK, S.; KAESTNER, K. H. Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 3, p. 151-8, Mar 2010. ISSN 1879-3061.

Aparentemente, esse *burst* de apoptose das ilhotas pancreáticas está relacionado com a UPR (*Unfolded Protein Response*). A UPR funciona como um importante sistema de sinalização celular desencadeado em decorrência do estresse de retículo endoplasmático, que responde às perturbações oxidativas em ilhotas de ratas no início da lactação (11-13).

Uma vez que o enovelamento de proteínas é um mecanismo redox-dependente, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) apresenta uma importante relação com a UPR podendo contribuir no

mecanismo pró-apoptótico(14). A adaptação funcional do retículo endoplasmático é extremamente importante na secreção de insulina pelas células β (6), já que a redução de volume celular pode ser um possível mecanismo para evitar a hipoglicemia materna no pós-parto.

UPR no restabelecimento da homeostasia do retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma importante organela especializada na biossíntese, trânsito e enovelamento de proteínas, além da biossíntese lipídica e homeostasia de cálcio (15-17). Neste contexto, apenas proteínas completamente formadas serão enviadas para o complexo de Golgi, para futuros processamentos, antes de irem para o destino final(18).

O trânsito de vesículas no interior da célula ocorre de forma coordenada para manutenção da homeostase e função das células. A maioria das proteínas secretoras entra pela primeira vez no RE para correto enovelamento e montagem. Para manter as funções do RE adequadas, as células possuem um sistema de controle de qualidade que envolve uma via de sinalização denominada UPR (*unfolded protein response*) (11-13).

Assim, um insulto homeostasia do RE irá impactar no maquinário de enovelamento de proteínas, resultando no acúmulo de proteínas não enoveladas ou mal enoveladas no seu lúmen(19). Essa perturbação na homeostasia leva ao estresse de RE e desencadeia o processo adaptativo UPR (17; 20). O objetivo da UPR é reestabelecer a homeostasia, aliviando o estresse através do aumento da capacidade de dobrar proteínas (expressão de chaperonas), e inibição da translação das proteínas promovendo sua degradação (17).

Proteínas mal dobradas são translocadas para o citoplasma e então degradadas pelos proteassomas, conhecidos como degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD) (15; 20). A UPR somente irá iniciar o processo de morte celular se a homeostasia não for recuperada após

longo período (15; 17; 21) através de três principais vias: (a) PERK (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*); (b) IRE-1 (*inositol-requiring protein-1 α*); (c) ATF6 (*activating transcription fator 6*) (17).

Em células sem estresse, o sensor de proteínas (PERK, IRE1, ATF6) se mantém no estado inativo pela associação da chaperona proteica do RE chamada BiP/GRP78 (*Binding Immunoglobulin Protein/Glucose-Regulated Protein of 78 KDa*) no domínio luminal. A BiP possui alta afinidade com proteínas mal dobradas e sua dissociação leva à auto-fosforilação da PERK e IRE1 e a transativação da ATF6, ocasionando a ativação da UPR (18; 19).

A figura 2 (15) traz um resumo das três vias relacionadas com a ativação da UPR em decorrência do estresse de RE.

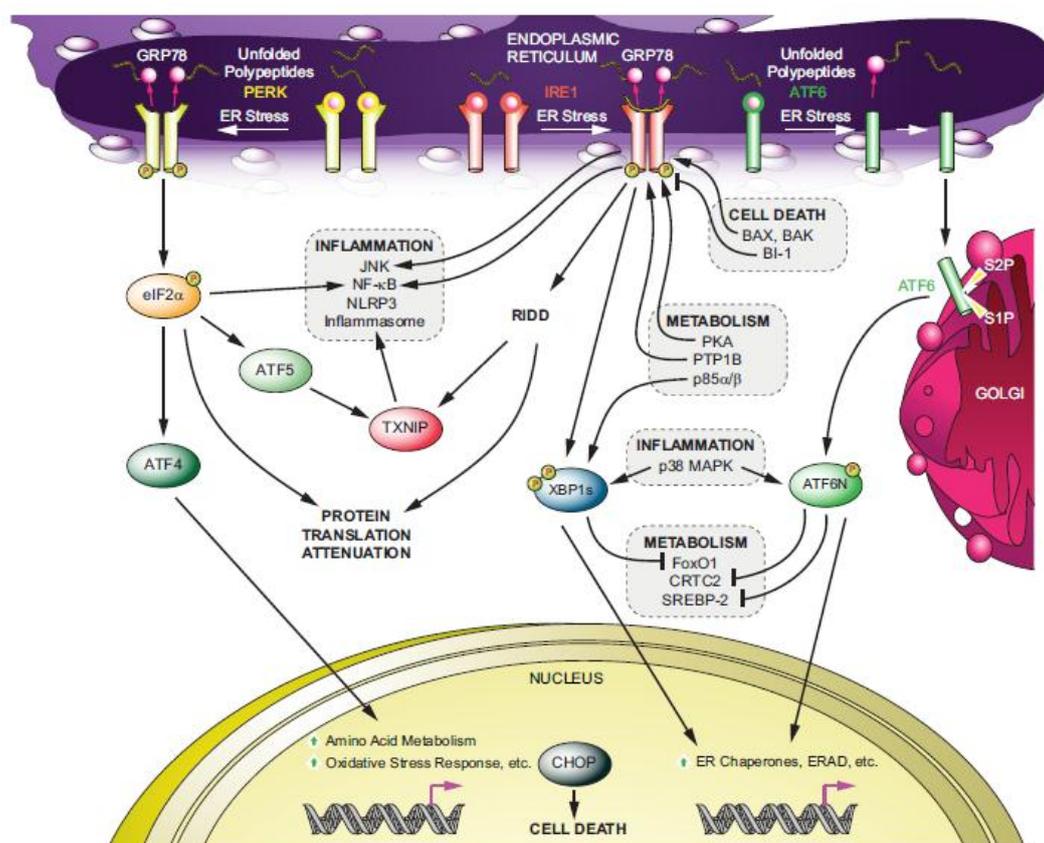


Figura 2 - Vias de sinalização da UPR. Fonte: LEE, J.; OZCAN, U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J Biol Chem*, v. 289, n. 3, p. 1203-11, Jan 2014. ISSN 1083-351X.

Uma falha da UPR em resolver a má formação de proteínas e manter a homeostasia do RE pode levar a um estresse permanente e, como consequência, determinar a falha e morte de células β no diabetes (22; 23).

IRE1

A proteína IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme*) é essencial para a resposta da UPR em mamíferos e plantas. Uma vez que é uma proteína transmembrana do RE, a IRE1 monitora a homeostase do RE por um domínio luminal sensível ao estresse de RE e desencadeia a UPR a partir de um domínio citoplasmático com ação de quinase e de um domínio com ação RNase. Em mamíferos existem duas isoformas da proteína IRE1: IRE1 α e IRE1 β , sendo a IRE1 α encontrada em todos os tecidos, enquanto que a expressão de IRE1 β está primariamente localizada nos intestinos e pulmões (15).

A ativação da IRE1 pode ocorrer via auto-fosforilação resultante da dissociação da BiP ou da ligação direta com uma proteína mal dobrada (17). Durante a resposta adaptativa, a IRE1 α conduz o RIDD (*Regulated IRE1-dependent Decay*) a translocar proteínas no RE, prevenindo futuros aumentos da demanda do dobramento de proteínas. Na tentativa de aumentar a capacidade de dobrar proteínas, a IRE1 α provoca o *splice* do mRNA do fator de transcrição Xbp-1 (*X-BoxBinding Protein-1*), que gera uma isoforma desta proteína que regula a transcrição de componentes de controle de qualidade do RE. Se a tentativa de restabelecer a homeostasia falhar, a IRE1 α cessa o *splice* do mRNA do Xbp-1 (24).

Porém, durante a fase de transição entre a adaptativa e a resposta apoptótica, a RIDD aumenta a intensidade do estresse do RE pela degradação seletiva, por exemplo, da chaperona BiP. Uma vez que o estresse atravessa o limite da RIDD, inicia-se a apoptose através da repressão de pré-mRNA anti-apoptóticos. Sendo a caspase-2 uma protease pró-apoptótica essencial para a execução da apoptose(24).

Foi observado também que durante o estresse do RE a IRE1 α ativa vias inflamatórias, incluindo JNK (*c-Jun N-terminal Kinases*) e NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*). A ativação da JNK associada ao TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor-2*)(15) e à fosforilação de JNK são fortes sinais para a apoptose da célula β (25).

PERK

PERK é uma proteína transmembrana do RE com domínio citoplasmático homólogo a outras quinases, e domínio luminal de ligação à chaperona BiP; no estresse do RE, BiP se dissocia, levando a homodimerização, auto-fosforilação e ativação do domínio quinase (15).

PERK fosforilada leva a fosforilação da serina 51 do eIF2 α (*eucaryotic translation initiation factor 2 alpha*) (26). Essa fosforilação reduz eficientemente a iniciação da translação proteica, uma vez que não irá promover a transformação de GDP em GTP, ou trazer o RNA metil transferase para o ribossomo 40S, assim o complexo 80S de iniciação de translação proteica não poderá ser iniciado (19; 26).

Entretanto, a fosforilação do eIF2 α facilita a tradução de fatores como ATF4 (*activating transcription fator 4*) e ATF5 (*activating transcription fator 5*) (15). O ATF4 induz a expressão de CHOP (*C/EBP homologous protein*), também chamada de GADD153 (17; 27). A expressão de CHOP inicia o programa de transcrição que promove a indução da apoptose(6; 28). Esta, inclui a expressão da proteína pró-apoptótica BIM e a repressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (B-cell lymphoma2) (6).

A CHOP foi identificada como um fator de transcrição do estresse do RE sendo altamente induzido no estresse prolongado via ativação dos fatores ATF4, ATF6 e Xbp-1. Entretanto, desses três, a via PERK-eIF2 α -ATF4 é essencial (6; 19). Assim sendo, a apoptose induzida pela PERK no

estresse de RE tem como principal mediador de apoptose a transcrição do fator pró-apoptótico CHOP (15).

ATF6

ATF6 é uma proteína transmembrana da família bZIP que, ao se dissociar da BiP, é translocada para o Complexo de Golgi, onde é clivada em S1P (lado 1 da protease) e S2P (lado 2 da protease). Com isso, o domínio N-terminal é liberado e se dirige ao núcleo promovendo o aumento da transcrição de genes alvos como Xbp-1 (15).

UPR no remodelamento pancreático

Conforme já descrito, a UPR possui um papel fundamental na apoptose em decorrência do estresse do RE. Nesse contexto, Bromatiet al (11) demonstraram que o aumento da apoptose em ilhotas no início da lactação em ratas Wistar ocorre pela redução da fosforilação de AKT (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*) estimulado pela expressão de TRB3 (*Tribble 3*).

Para esse experimento, Bromatiet al (11) utilizaram ratas Wistar para a análise e quantificação das proteínas da UPR envolvidas no remodelamento fisiológico pancreático durante o período de lactação. Além disso, foi efetuado um tratamento com PBA (ácido 4-fenilbutírico), que é um ácido graxo de cadeia curta e funciona como uma chaperona química capaz de estabilizar a conformação da proteína. Desses experimentos, concluiu-se que o aumento de ATF4 e fragmentação de DNA estão correlacionados com aumento da expressão de CHOP e diminuição da fosforilação da AKT (pAKT) durante o terceiro dia de lactação (L3), sendo que a formação do dímero ATF4-CHOP induz à expressão de TRB3 que é uma pseudo-quinase inibidora da AKT. AAKT é uma proteína quinase que governa a síntese geral de proteínas e a sobrevivência da célula por inibição da apoptose(29). Com a

utilização de PBA, verificou-se o aumento da pAKT, assim como a diminuição da apoptose provocada pela UPR, além disso, há normalização da fragmentação de DNA L3, em valores observados em animais controle. CHOP, TRB3 e caspase-3 (marcador de apoptose) também estão diminuídos durante esse tratamento, sugerindo que a apoptose em ilhotas pancreáticas seja dependente do estresse do RE.

Desse exposto, pode-se concluir que, durante o terceiro dia de lactação (L3), ocorre ativação fisiológica da UPR, com elevação dos níveis proteicos de ATF4, CHOP e TRB3, e redução dos níveis de pAKT.

Uso de glicocorticoides durante a gravidez

Anualmente, mais de 15 milhões de crianças nascem prematuras, sendo a maior causa de morte em recém-nascidos (com até 28 dias) e a segunda causa em crianças de até 5 anos. Os efeitos nocivos desses nascimentos podem ser diminuídos com o uso correto de glicocorticoides, que são utilizados para a maturação pulmonar (30).

Vogel et al (30), a partir de um levantamento mundial, concluíram que a utilização de corticosteróides pré-natal foi associada com uma redução de 31% no total de mortes neonatais, e reduções significativas nos riscos de síndrome do desconforto respiratório (34%), hemorragia cerebroyentricular (46%), enterocolitene necrosante (54%), necessidade de suporte respiratório ou admissão de cuidados intensivos (20%) e infecções sistêmicas nas primeiras 48 horas de vida (44%). O uso de corticosteróides pré-natais foram eficazes quando administrados entre a 26^a e 34^a semana de gestação, sem aumentar risco de morte materna, corioamnionite ou sepsis puerperal.. Porém, corticoides são efetivos quando administrados entre a 24^a e a 34^a semana de gestação (30; 31), sendo que a posologia sugerida é dose única administrada de 24 horas ou até no máximo 7 dias antes do parto (31).

Na gravidez, dois mecanismos são necessários para garantir a troca gasosa pulmonar do neonato: eliminação do excesso de fluido alveolar

e o aumento da perfusão sanguínea pulmonar. A ausência de um ou ambos desses mecanismos podem causar complicações respiratórias neonatais (32; 33). Na revisão feita por Paganelli et al (32) é verificado que, na tentativa de melhorar a troca gasosa do pulmão do recém-nascido, é necessária a ativação de canais de sódio na superfície epitelial das células pulmonares permitindo a passagem do fluido do epitélio para o espaço intersticial.

Os corticoides têm um papel importante no final da maturação dos pulmões por aumentar o número dos canais de sódio e aumentar a produção de surfactante (33; 34). A expressão alveolar de canais de sódio é regulada por vários fatores como catecolaminas endógenas, oxigênio, hormônios da tireoide e glicocorticoides, porém, os mais importantes são as catecolaminas e glicocorticoides. Um aumento na produção endógena de catecolamina, durante o trabalho de parto, é crucial para promover a eliminação do fluido alveolar. Essas catecolaminas agem diretamente em receptores β , promovendo a ativação de canais de sódio, enquanto que os glicocorticoides podem aumentar o número de canais de sódio; entretanto é necessária exposição por 4 a 24 horas(32).

Excesso de glicocorticoides no final da gestação

Recentemente foi demonstrado, em modelo animal, que o excesso de glicocorticoides no final da gestação leva a um prejuízo da secreção de insulina materno e estabelecimento de intolerância à glicose tardio(35), e também causar diabetes induzida por esteroides (36).

Além disso, em ratos, esse excesso *in útero* inibe o crescimento fetal (37; 38), sendo que filhotes de ratas tratadas com dexametasona, durante a prenhez, têm redução de 10% do peso dos filhos quando comparadas a controles (39). E a exposição pré-natal à dexametasona resulta em hiperativação permanente do eixo HPA (Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal) (40). Essa alteração no eixo HPA durante a vida fetal pode afetar o desenvolvimento e a saúde do indivíduo no futuro (41). Esse retardo no

crescimento fetal demonstra um papel importante na programação fetal tanto de humanos como em roedores (42).

Além de promover menor crescimento fetal, sendo usada como um modelo de restrição de crescimento *in útero*, a dexametasona também é usada como modelo de estresse materno. Ratas tratadas com dexametasona apresentam redução do ganho de peso quando comparadas a ratas controle, sem alterar a ingestão de alimentos (35; 43).

Em humanos, ficou convencionado pelo Instituto Nacional da Saúde Infantil e Desenvolvimento Humano (NICHD), nos EUA, o uso de corticosteroides pré-natal, especialmente com tratamento de, no mínimo, 24 horas antes do parto, porém com no máximo 7 dias entre a administração de corticosteroides e o parto. Nesse intervalo de tempo, muitos médicos adotaram a prática estratégica de múltiplas ou no mínimo uma dose semanal de corticosteroides, para garantir que o tratamento seja aplicado dentro da janela de 24^a-36^a semanas de gestação. Entretanto, essa prática resultou em baixo peso ao nascer (44). Com isso, em 2000, uma nova conferência do NICHD recomendou o fim dessa prática, pois estudos subsequentes demonstraram o benefício de aplicação em dose única.

Ensaio *in vitro* da ação de dexametasona

Em ensaios *in vitro* utilizando células β pancreáticas, Ranta et al (45) demonstraram que um tratamento de 4 dias com 0,1 $\mu\text{mol/L}$ de dexametasona foi capaz de aumentar a indução da apoptose em células secretoras de insulina, seguido de *down-regulation* de Bcl-2, ativação de calcineurina com subsequente desfosforilação da BAD e despolarização mitocondrial.

Weinhaus et al (7) também realizou estudos *in vitro* que evidenciaram que o tratamento de ilhotas pancreáticas em cultura celular com 100 nM de dexametasona apresentou efeitos inibitórios após um dia de tratamento, continuando por 6 dias consecutivos, mostrando um efeito

inibitório na secreção de insulina dose-dependente, levando a um aumento da apoptose.

Ensaio, *in vitro*, da ação de 17 β -estradiol (E2)

Os estrógenos pertencem à classe dos hormônios esteróides. São moléculas lipofílicas, derivadas do colesterol e sintetizadas no córtex da adrenal, testículos, ovários e placenta. Em humanos, o estrógeno natural mais potente é o 17 β -estradiol (E₂), seguido pela estrona e pelo estriol.

Os múltiplos efeitos dos estrógenos em diferentes tipos celulares se manifestam através da modulação de distintas vias metabólicas e de sinalização celular. Estes efeitos podem iniciar/ocorrer tanto no núcleo como no citoplasma das células. Os efeitos nucleares estão associados aos receptores de estrógenos alfa (ER α) e beta (ER β), que atuam como fatores de transcrição, unindo-se ao elemento de resposta aos estrógenos (ERE) (46-48).

Dentro do contexto, é importante salientar que a apoptose de células β pancreáticas leva a uma deficiência de insulina, e que os estrógenos são capazes de proteger as células β contra esse dano. O estradiol manifesta ação anti-apoptótica em humanos e roedores, mediados pelo ER α (49-52). Essa proteção, *in vivo*, ocorre também em situações de estresse oxidativo (53), porém o estradiol não está associado com o aumento da proliferação ou hipertrofia de célula β (54).

Le May et al (54) demonstraram, *in vitro*, que em ilhotas pancreáticas de ratos e em células β expostas ao estresse oxidativo, o estradiol previne a apoptose e previne danos no mecanismo de secreção de insulina; este efeito protetor foi perdido em células tratadas com tamoxifeno, um antagonista de ER α (52).

Ademais, já foi demonstrado que o E2 protege células β em modelos de ratos com diabetes do tipo 2 (55), bem como agonistas de ER α ,

ER β e do receptor de estrógeno acoplado à proteína G (GPER) (54; 56); em cultura com células β de roedores e de humanas, foi observada uma redução na síntese de ácidos graxos, e queda na lipogênese, assim como diminuição no acúmulo de triglicerídeos (55).

Receptores de Glicocorticoides (GR) e de Estrógeno (ER)

Glicocorticoides medeiam suas ações por ligação aos receptores de glicocorticoides (GR), membros da superfamília de ácidos proteicos esteroides/tireoide/retinoide, que funcionam como um fator de transcrição dependente de ligante (47). Vários estudos mostraram que o tratamento com glicocorticoides diminuem o nível de mRNA de GR entre 50-80% em vários tecidos (57; 58).

A redução da expressão dos GR dependente de ligante é complexa. A presença prolongada do ligante desestabiliza o GR provocando queda na expressão do GR. O tratamento de longo período com glicocorticoides leva a uma *down-regulation* de GR, provocando uma ausência de resposta a tratamento hormonal (59).

Existem dois receptores principais de estrógenos: ER α e ER β . Ambos possuem isoformas apresentando diferentes padrões de expressão e funções tecido-específicas(60). Os ER estão relacionados com a função reprodutiva bem como participam no controle do metabolismo energético, modulando diretamente a expressão de gênica (52).

Assim como os GR, os receptores de estrógeno participam de importantes processos como metabolismo, imunidade, crescimento celular, proliferação, reprodução e desenvolvimento (49; 50; 61). Ambos pertencem à família de receptores de hormônios esteroides de receptor nuclear, sendo suas ações através da ligação ligante-receptor (48).

Kinyamu e Archer (62) analisaram a ligação cruzada entre GR e ER utilizando a linhagem de célula de câncer de mama MCF-7 que expressa

ER α endógeno. Estes autores demonstraram que agonistas de estrógeno promovem a degradação dos GR. Outro fato observado é que, possivelmente, mais GR se mantém no citosol em células tratadas com dexametasona na presença de E2 (17 β -estradiol). Entretanto, agonistas de estrógeno não afetam especificamente o mRNA de GR, sugerindo que a queda na densidade de GR ocorre, talvez, na etapa de tradução ou pós-tradução. Também, Karmakar, Jin e Nagaich(63) demonstraram que os GR interagem diretamente com ER α através do domínio de ligação de DNA (DBD).

Vias de apoptose em células β

Sabe-se que a sobrevivência das células é fortemente regulada pela via de sinalização, para a qual convergem proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2. Membros anti-apoptóticos e incluem Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1, enquanto que os indutores da apoptose são Bax, Bad, Bid e Bim (64).

A perda da função química ou genética dos anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-xL aumentam significativamente metabólitos dependentes de glicose, assim como a sinalização de cálcio em células β pancreáticas (65).

Bad possui um papel fisiológico nas células β que vai além do papel na apoptose. Especificamente, na sua forma fosforilada na serina 155, promove a secreção de insulina estimulada pela glicose via interação com a glicocinase (66). Assim, as proteínas Bcl-2 podem ser importantes na função normal das células β (65).

A expressão de Bim é regulada positivamente pela CHOP e requerida no estresse de RE na indução de apoptose (67). A deficiência de Bid é capaz de prevenir a indução de apoptose de células β contra o estímulo de apoptose (68).

Relação entre uso de Glicocorticoides e CD40L e TNF α

Já é conhecido que o sucesso terapêutico de glicocorticoides é amplamente atribuído a sua habilidade de reduzir a expressão de genes pró-inflamatórios via ativação de GR e concomitantemente a inibição de atividade pró-inflamatória de fatores de transcrição, incluindo NF- κ B e AP-1 (*Activator Protein-1*) (69). NF- κ B possui um papel importante de mediador na fisiopatologia anti-inflamatória e em doenças sépticas pelo elevado nível de citocinas e ROS (70)

Cechin e Buchwald(69) realizaram vários experimentos que demonstraram a ativação de NF- κ B induzida pelo TNF α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) e pelo ligante de CD40 (CD40L). Por outro lado, todos os glicocorticoides testados (incluindo dexametasona) inibiram parcialmente a indução do NF- κ B pelo TNF α e CD40L.

O CD40L também é conhecido como CD154, molécula ativadora T-B (TBAM), fator de necrose tumoral relacionada com a ativação de proteína (TRAP) e gp39 (71). É uma proteína transmembrana do tipo 1, estando presente na superfície de células T CD4+, células B, plaquetas sanguíneas, monócitos, células NK (*Natural Killer*) e também em células cancerígenas. A via CD40/CD40L possui forte papel na indução da imunidade sanguínea e, através da ativação do NF- κ B, tem a habilidade de potencializar a apoptose em células tumorais (72; 73).

Com base nessas informações, observa-se que o remodelamento fisiológico pancreático no pós-parto, mediado pela UPR, já é um fenômeno conhecido. Falta compreender, entretanto, o remodelamento frente ao excesso de glicocorticoides no terceiro período gestacional, uma vez que são medicações de primeira escolha em caso de partos prematuros.

OBJETIVOS

1 – Investigar o perfil de remodelamento pós-parto mediado pela UPR frente ao excesso de glicocorticoides no terceiro período gestacional de ratas Wistar.

2 – Analisar os efeitos, in vivo, do bloqueio das ações de E2 (17 β -Estradiol) na apoptose de células β pancreáticas materna de ratas associada ao tratamento com dexametasona.

3 – Avaliar o perfil da expressão de genes de apoptose na célula β no final da gestação e no pós-parto de ratas Wistar submetidas ao excesso pré-natal de glicocorticoides.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas ratas Wistar virgens, prenhez e lactantes, separadas para cruzamento a partir da décima terceira semana de vida, fornecidas pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – Unicamp (CEMIB), alimentadas com ração padronizada Nuvilab (Nuvital Nutrientes, S.A.), e água *ad libitum* e mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura ambiente de 24°C. A partir da décima segunda semana de vida, as ratas foram mantidas duas por caixa para aclimação. Na décima terceira semana, elas foram mantidas na proporção de duas fêmeas por macho durante três dias, sendo considerado o segundo dia de contato com o macho como primeiro dia de prenhez (G1). Assim sendo, no segundo dia de prenhez (G2), o macho era retirado e as fêmeas eram então pesadas e numeradas.

As ratas foram mantidas duas por caixa até o décimo quinto dia de prenhez (G15), momento em que foi efetuada nova pesagem, isolamento e divisão dos grupos de tratamento. Todas que apresentavam ganho de peso superior ou igual a 35g foram consideradas prenhes, sendo acondicionada uma por caixa até o final dos experimentos.

Entre o período de G15-G19 foi administrado o tratamento com dexametasona (Decadron[®] Elixir 0,5mg/5mL, Aché) (Figura 3), ou dexametasona associada ao tamoxifeno (Tamoxifen Citrate Salt T5648-1G, Sigma-Aldrich) (Figura 4).

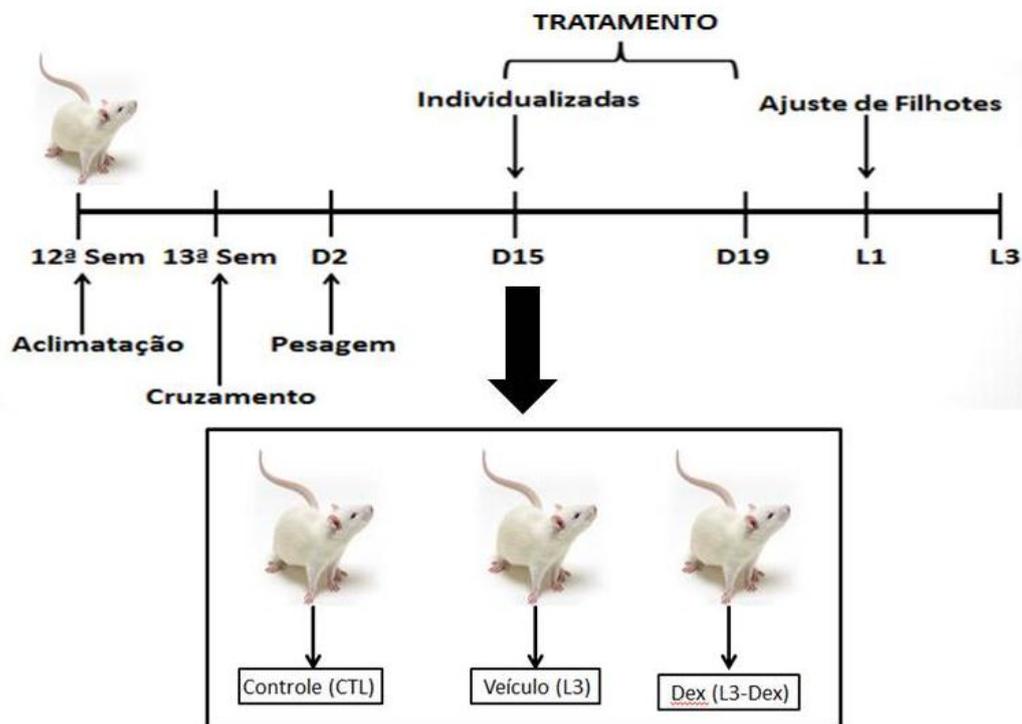


Figura 3. Desenho experimental de tratamento com dexametasona

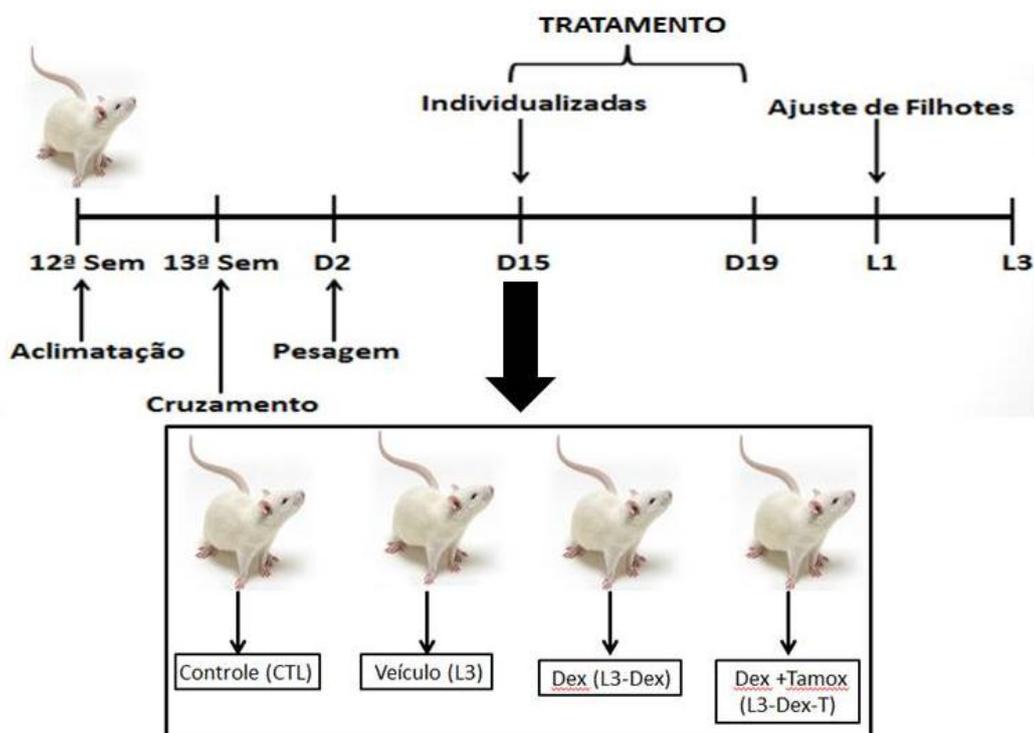


Figura 4. Desenho experimental de tratamento com dexametasona e associado ao tamoxifeno

Após o parto, no primeiro dia de lactação (L1), os neonatos foram ajustados para seis por mãe. Sendo os excedentes utilizados para ajuste de outras mães, quando necessário, respeitando o ajuste dentro do mesmo grupo. Caso não fosse necessário o ajuste esses neonatos excedentes eram eutanasiados por decapitação.

As ratas foram utilizadas para os experimentos no vigésimo dia de gravidez (G20) (Figura 5), e terceiro dia de lactação (L3).

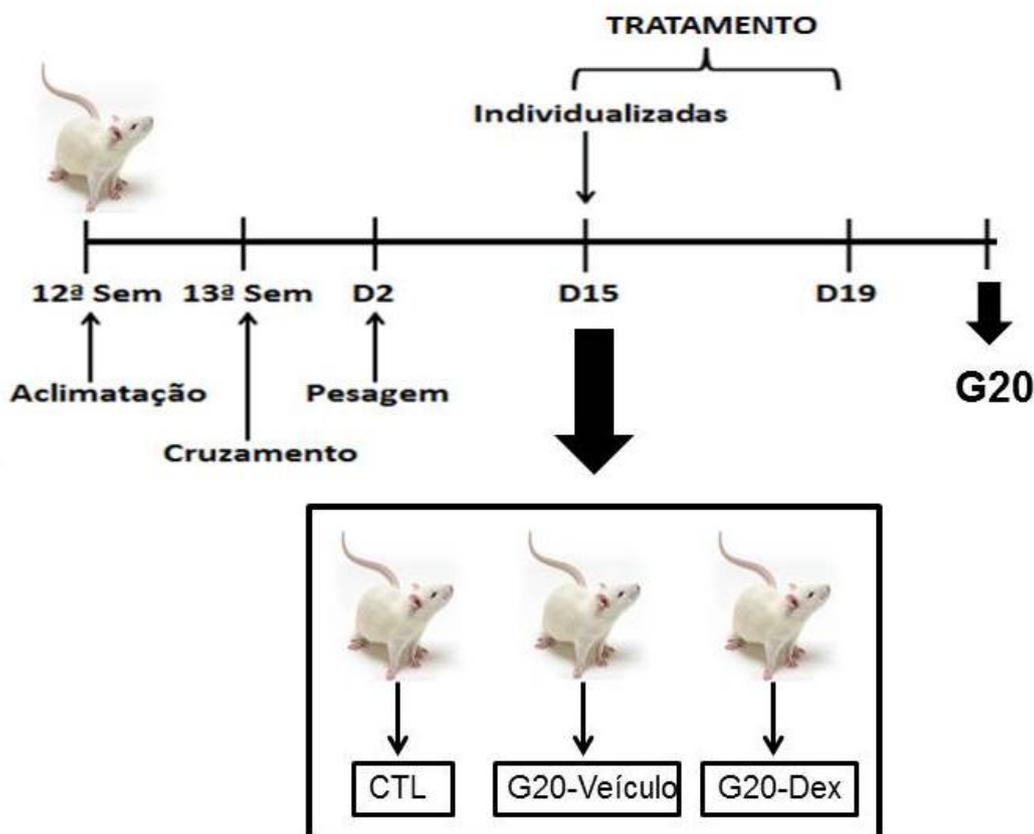


Figura 5. Desenho experimental para protocolo em vigésimo dia gestacional (G20)

Foram observados os princípios éticos na experimentação com animais adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP) – protocolo n° 3505-1.

Tratamento com dexametasona

Após a confirmação da prenhez as ratas foram separadas randomicamente em três grupos: grupo CTL (não prenhe), Veículo e Dex (dexametasona).

A partir do G15, ratas grávidas e metade do grupo CTL recebeu dexametasona *ad libitum* na água de beber até o G19. O restante continuou recebendo apenas água (veículo).

Foi administrada 0,1mg/kg/dia de dexametasona à água de beber. A dose foi ajustada diariamente baseada no peso e na ingestão hídrica. Todas as ratas, em tratamento ou não, foram pesadas (Figura 3).

Tratamento com dexametasona associado ao tamoxifeno

Após a confirmação da prenhez, as ratas foram separadas randomicamente em quatro grupos: grupo CTL, Veículo, Dex e Dex-T (dexametasona associada ao tamoxifeno).

A partir do G15, um terço das ratas prenhes recebeu dexametasona *ad libitum* na água de beber, um terço recebeu aplicação subcutânea tamoxifeno em associação à dexametasona *ad libitum* na água de beber até o G19; o restante recebeu apenas água.

Foi mantida a dose de dexametasona (0,1mg/kg/dia), com ajuste diário de dose baseado no peso e na ingestão hídrica. Todas as ratas, em tratamento ou não, foram pesadas.

Dez mg de tamoxifeno foram diluídos, em frasco de 50 mL, em 1 mL de DMSO (Dimetilsufóxido, Sigma-Aldrich) e adicionados em 50 mL óleo de amendoim. Cada aplicação subcutânea de 100 µL continha 20 µg de tamoxifeno. Para garantir que todas as ratas passassem pelo mesmo procedimento, foi preparado um novo tubo de 50 mL com apenas 1 mL de DMSO e 50 mL de óleo, sendo aplicado 100 µL subcutânea em todas as ratas restantes (prenhez e não prenhez) (Figura 4).

Dosagens bioquímicas

Após a coleta do sangue por decapitação, cada amostra foi submetida à centrifugação por 15 minutos a 3500 RPM a 4°C, sendo então coletado o soro e transferido para um microtubo.

Para as quantificações bioquímicas foram utilizados kits de triglicérides (Triglicérides GOD-PAP LiquidStable, LABORLAB ref 1770290, SP, Brasil), colesterol (Colesterol GOD-PAP LiquidStable, LABORLAB ref 1770080, SP, Brasil), insulina (EZRMI-13K *Rat/Mouse Insulin Elisa*, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), glicose (Glicose GOD-PAP *LiquidStable*, LABORLAB ref 1770130). Os procedimentos seguiram as especificações do fabricante. Para verificação da glicemia randômica foi utilizado glicosímetro *Accu-Chek Active*[®].

Dosagens Hormonais

Após a coleta do sangue por decapitação, cada amostra foi submetida à centrifugação por 15 minutos a 3500 RPM a 4°C, sendo então coletado o soro e transferido para um microtubo.

Para as quantificações hormonais de estrógeno foi utilizado kit de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) da IBL *International GMBH* (Hamburgo, Alemanha) para 17beta-Estradiol (Ref 52041).

Isolamento de ilhotas

O isolamento de ilhotas foi realizado pelo método da digestão com colagenase (74) modificado de Lacy & Kostianovsky(75). Os animais G20, CTL, L3, L3 Dex e L3 Dex-T foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia com Tiopental (Tiopentax, Cristália) 80mg/kg, em seguida foi realizada a decapitação para coleta de sangue e posterior separação e coleta de soro.

Foi efetuada uma incisão abdominal externa. A extremidade duodenal do ducto biliar comum foi ocluída, antes da incisão de um cateter através de uma pequena incisão na parte proximal do ducto. Com uma seringa conectada a um cateter foi injetada 10 mL de tampão de Hanks (137 mM de NaCl; 5,36 mM de KCl; 0,8 mM de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,3 mM de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; 0,44 mM de KH_2PO_4 ; 1,2 mM de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 4,167 mM de $NaHCO_3$; 5,6 mM de Glicose; 1 mg/ml de Albumina; pH 7,2), contendo colagenase (0,8 mg/mL) para a expansão completa do tecido. Este foi transferido para uma placa de petri para a retirada de gordura, tecido vascular e gânglios linfáticos. A seguir o pâncreas foi cortado e transferido para um tubo de 50 mL, adicionado mais 10 mL da solução tampão de Hanks contendo colagenase, e levado para banho-maria a 37°C por 24 minutos. A digestão completa do tecido foi obtida com agitação vigorosa do tubo até a obtenção de uma solução viscosa homogênea. O conteúdo foi transferido para um béquer e adicionado tampão de Hanks gelado para parar a digestão do pâncreas pela colagenase. As ilhotas foram lavadas três vezes com solução de Hanks, para a remoção da colagenase e para separação por sedimentação. O sobrenadante era retirado com o auxílio de uma seringa de vidro. As ilhotas foram coletadas individualmente sob um estereomicroscópio binocular e com auxílio de uma pipeta de vidro estirada.

As ilhotas após coleta foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, para posteriores análises.

Fragmentação do DNA

Foram utilizadas 100 ilhotas frescas de cada amostra, que após a coleta foram submetidas a um rápido *spin* no microtubo para que as ilhotas pudessem se depositar no fundo. O sobrenadante (solução de Hanks) foi retirado com o auxílio de uma pipeta. Na sequência, as ilhotas foram dissociadas com tampão de dispersão livre de cálcio (138mM de NaCl; 5,6mM de KCl; 1,2 mM de $MgCl_2$; 5mM de HEPES; 3mM de Glicose; 1,2mM de EGTA; 0,1mg/mL de Albumina; pH 7,4), em banho-maria a 37°C por 11

minutos. Em seguida, as ilhotas foram agitadas com o auxílio de uma pipeta de 1000 μL (aproximadamente dez vezes), sempre observando a dispersão das ilhotas. O microtubo foi centrifugado por oito minutos a 1000 x *g*. O sobrenadante foi retirado e adicionado 200 μL de tampão de fragmentação (1% v/v de Triton X-10%; 1mg/mL de Citrato de Sódio; 8 μg /mL de Iodeto de propídeo; PBS q.s.p.). Este, foi mantido em incubação por duas horas no escuro e, na sequência, efetuada leitura em Citometria de Fluxo (BD FACSCalibur) canal FL2-H com comprimento de onda 535-617nm.

Quantificação da produção das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Foi preparada, inicialmente, solução estoque de 5 mM de DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, Sigma-Aldrich), utilizada como sonda fluorescente.

Foram utilizadas 60 ilhotas frescas de cada amostra que, após a coleta, foi efetuado um rápido *spin* no microtubo para que as ilhotas pudessem se depositar no fundo. O sobrenadante (solução de Hanks) foi retirado com o auxílio de uma pipeta. Na sequência, as ilhotas foram dissociadas com tampão de dispersão livre de cálcio (138mM de NaCl; 5,6mM de KCl; 1,2 mM de MgCl₂; 5mM de HEPES; 3mM de Glicose; 1,2mM de EGTA; 0,1mg/mL de Albumina; pH 7,4), em banho-maria a 37°C por 11 minutos. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta de 1000 μL , feita a agitação (aproximadamente dez vezes), sempre observando a dispersão das ilhotas. O microtubo foi centrifugado por oito minutos a 1000 x *g*. O sobrenadante foi retirado e efetuado a ressuspensão em 300 μL da sonda, previamente diluída (1:1) em solução de Hanks. Em seguida, as amostras foram incubadas por 15 minutos no escuro e, na sequência, realizada a leitura em Citometria de Fluxo (BD FACSCalibur), canal FL1-H com comprimento de onda de 488-630nm.

Foi coletado um pool das amostras em um novo microtubo, totalizando 60 ilhotas. Estas passaram pelo mesmo procedimento de

centrifugação, retirada do sobrenadante, adição do tampão de dispersão de ilhotas e posterior centrifugação. Entretanto, após a retirada do sobrenadante, foram adicionados 300 μ L de solução de Hanks. Este foi o microtubo de células não marcadas utilizadas para aquisição dos parâmetros a serem analisados na Citometria de Fluxo. A leitura foi realizada em canal FL1-H com comprimento de onda de 488-630nm.

Western Blot

As ilhotas frescas (maior quantidade possível coletada por rata), de ratas CTL, L3, L3 Dex, L3 Dex-T, foram transferidas para microtubo e rapidamente centrifugadas para que as ilhotas pudessem se depositar no fundo do tubo. O sobrenadante (solução tampão de Hanks) foi retirado e adicionado Tampão de SDS (1% de SDS, 100 mM de Tris [pH 7,5]; 10 mM de EDTA; 100 mM de Fluoreto de Sódio; 10 mM de Pirofosfato de Sódio; 10 mM de Ortovanadato de Sódio). Na sequência, as amostras foram sonicadas (potência 25%) em 3 pulsos de 10 segundos cada e incubadas a 96°C em banho-maria por 10 minutos e centrifugadas (3000 x *g* por 10 minutos a 4°C). Parte do sobrenadante (diluído na razão 1:10) de cada amostra foi utilizada para a quantificação do conteúdo proteico por espectrofotometria com reagente de Bradford (Bio-Rad, CA, USA), este diluído na proporção 1:4 de água.

O restante das amostras foi diluído em solução tampão de Laemmli (25% de betamercaptoetanol; 0,1% de Azul de Bromofenol; 1M de Fosfato de Sódio [pH 7,0]; 50% de Glicerol; 10% [p/v] de SDS) e incubado por 10 minutos a 96°C. As amostras foram então congeladas a -80°C permanecendo nessa condição até o dia da aplicação no gel de poliacrilamida, com exceção das amostras de análise da fosforilação de AKT. Neste caso, a aplicação no gel ocorreu logo após a incubação com solução tampão de Laemmli a 96°C por 10 minutos. Todas as amostras foram adicionadas em gel de poliacrilamida 10 a 15% em aparelho para mini gel (Bio-Rad, CA, USA).

As proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, CA, USA), em aparelho de transferência elétrica semi-seca (Bio-Rad Trans-Blot[®] SD Semi-DryTransfer Cell, CA, USA). Posteriormente as membranas foram bloqueadas com 5% de leite sem gordura e solução basal (10mM Tris [pH 7,5]; 150mM NaCl e 0,02% Tween 20), *overnight*, em temperatura de geladeira (2-8°C). Em seguida foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada, com solução basal, e na sequência, a incubação das membranas com anticorpos contra CHOP/GADD153, ATF4/Creb2, AKT, pAKT 1/2/3 Ser 473, eIF2 α (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), β -Actin (Sigma-Aldrich), *overnight*, em temperatura de 2-8°C. Para a utilização do anticorpo contra TRB3 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), o bloqueio inicial foi efetuado com 1,5% de gelatina. A seguir as membranas foram lavadas (três lavagens de 10 minutos com solução basal) e incubadas por 1h30 com anticorpos secundários conjugados com peroxidase, com exceção da membrana incubada com anticorpo contra β -Actin, pois esse já era conjugado com peroxidase, eliminando assim a etapa de incubação com anticorpo secundário. A seguir, foram adicionadas as soluções de revelação: solução 1 – 1 M de Tris (pH 8,5), 250 mM de Luminol, 90 mM de Ácido p-cumárico; solução 2 – 1 M de Tris (pH 8,5), 25 mM de peróxido de hidrogênio P.A.

As membranas foram expostas por tempos variados a filmes de Raio-X. Após a revelação, as proteínas foram quantificadas por densitometria óptica utilizando o software ImageJ.

Extração de RNA

Para a extração de RNAs totais das ilhotas frescas foi utilizado RNeasy Mini Kit (74104) da Qiagen. Todo procedimento foi realizado conforme especificações do fabricante, sendo utilizadas de 400 a 500 ilhotas por amostra.

Uma alíquota de cada amostra obtida foi utilizada para espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 e 280nm a fim de verificar a pureza de cada amostra.

Análise da Expressão Gênica em Larga Escala

Após, foi efetuada a quantificação de RNA por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 e 280nm. Foi feito um pool das amostras de cada grupo com alíquotas de 2 µg, com volume ajustado para 10 µL com água livre de nucleases. A transcrição reversa foi realizada com *primers* randômicos. Para isso foram adicionados tampão RT, 100 mM de dNTP, *primers* randômicos, enzima transcriptase reversa MultiScribe™, e água livre de nucleases para completar o volume para 10 µL. O volume final de reação foi 20 µL. As reações foram incubadas por 10 minutos a 25°C, seguido de 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C e finalmente mantido a 4°C.

Após a obtenção final de 100ng/mL de cDNA foi realizada a reação de amplificação com o kit RT²Profilter™ PCR Array RatApoptosis (PARN-012Z). Para utilização das placas do *Array* de Apoptose foi preparado, para cada amostra, o mastermix (5 µL de KAPA SYBR® FAST qPCR; 5 µL de RoxLow; 10 ng de cDNA; H₂O q.s.p. para 10 µL) suficiente para a aplicação em 96 poços, sendo então aplicado 10 µL em cada poço da placa de *array*(10 ng de cDNA por poço). A placa contém 84 genes alvo e 12 genes endógenos (controle).

A amplificação foi realizada em termociclador da Applied Biosystems® modelo 7500 *fast*. Este foi inicialmente mantido por 3 minutos a 95°C para a ativação enzimática, seguido por 3 segundos a 95°C e após 33 segundos a 60°C para anelamento, extensão e aquisição de valores.

A expressão dos RNAs dos genes envolvidos na apoptose foram analisados utilizando aplicativo fornecido no site da Qiagen (*GeneGlobe – Data Analysis Center*).

Dois genes alterados no array foram confirmados em amostras individuais utilizando os cDNAs previamente transcritos, em reação padrão de

qPCR com Sybr Green (KAPA SYBR® FAST). As sequências dos primers utilizados estão listadas a seguir.

- 1) CD40lg sense: CAACGTCCATTCATCGTCAGCC
antisense: TTGGAGGAACTGTGGGTATTTCGC
- 2) Cidea sense: GCT GTC TCA ATG TCA AAG CCA C
antisense TCTGTGTCACCCAGTGCTCG;
- 3) RPL37a sense: CAAGAAGGTCGGGATCGTCCG
antisense: ACCAGGCAAGTCTCAGGAGGTG.

O gene RPL37a foi utilizado como constitutivo para normalização dos resultados, calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey ou teste de *Student* quando apropriado. Para todos os resultados foram adotados limite de significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Evolução do peso gestacional

A partir do 15º dia foram realizadas pesagens diárias para ajustar a dose da dexametasona (0,1mg/kg/dia) e também para avaliar o efeito do tratamento sobre o peso corporal da rata. Na figura 6 podemos observar a diminuição em relação à rata não tratada. O uso do glicocorticoide fez com a rata parasse de ganhar peso em comparação com a rata não tratada. Esse parâmetro foi utilizado para verificar se o tratamento estava ocorrendo conforme informações da literatura(35; 37-39).

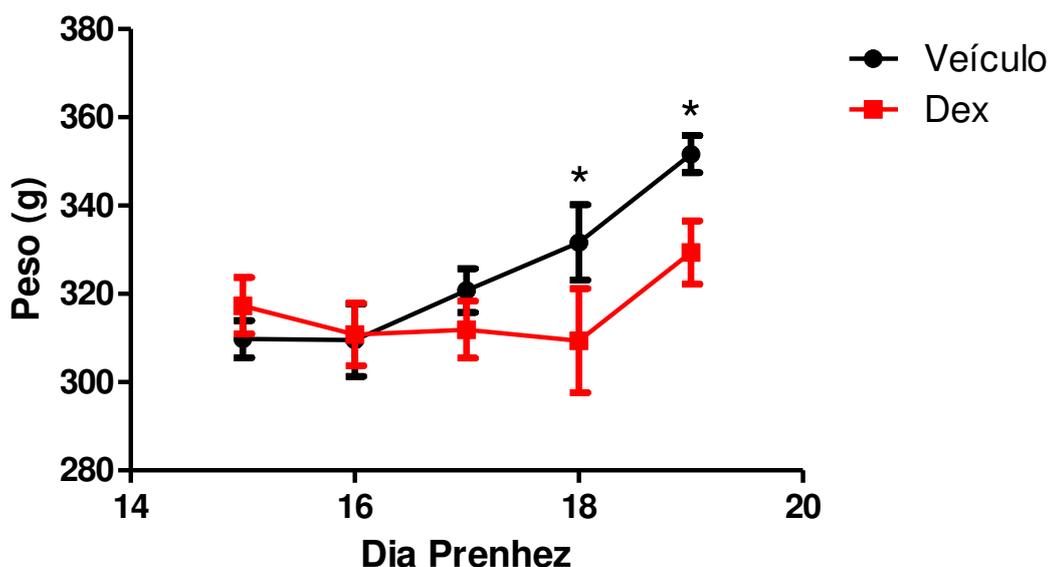


Figura 6. Evolução do peso gestacional durante tratamento(15º-19º dia de prenhez). Tratamento com dex (0,1mg/kg/dia,); Médias \pm EPM referem-se a 2 experimentos independentes * $p < 0,05$ vs Dex (n=6)

O mesmo procedimento de pesagem se repetiu no tratamento com tamoxifeno (figura 7). A mesma variação de peso foi observada, porém o tratamento de dexametasona (0,1mg/kg/dia) associada ao tamoxifeno (20 μ g

subcutânea por dia) provocou uma redução no peso em relação ao grupo não tratado, mas sem significância estatística, sendo observados valores significativos entre o grupo tratado apenas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) e o grupo não tratado.

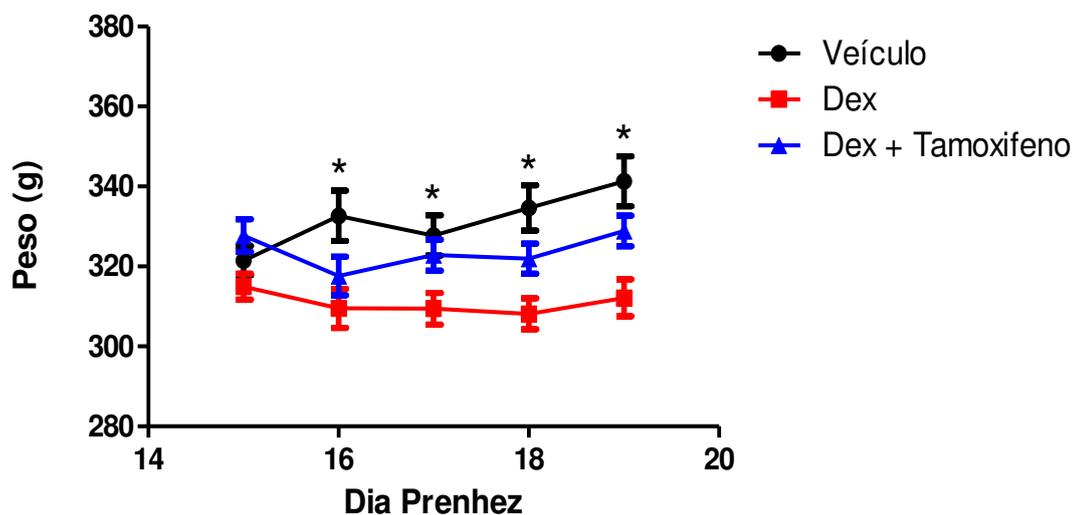


Figura 7. Evolução do peso gestacional durante tratamento (15^o-19^o dia de prenhez). Tratamento com dex associado com tamoxifeno (20µg/dia). Médias ± EPM referem-se a 3 experimentos independentes *p<0,05 vs Dex (n=6)

Evolução do peso médio de neonatos

Nas figuras 8 e 9, verificamos o peso dos neonatos em diferentes dias de lactação. Como esperado, houve diferença de peso ao nascer, que se mantém até o terceiro dia de lactação, sendo este mais um indicativo que o tratamento com a dexametasona estava de acordo com a literatura (35; 37-39). O tratamento com tamoxifeno promoveu um aumento transitório de ganho de peso em L1 (figura 9C), que retornou a valores similares ao grupo Dex em L3 (figura 9D).

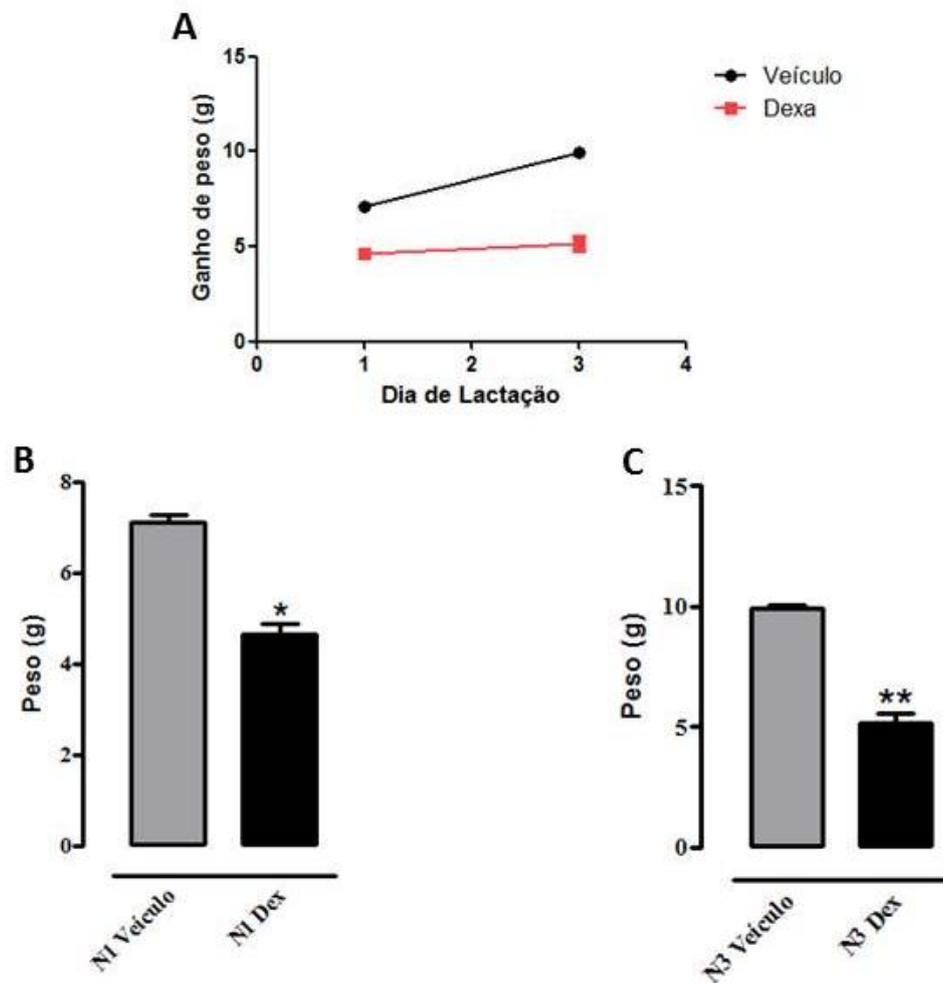


Figura 8. Ganho de peso de neonatos de mães tratadas ou não com Dex (0,1mg/kg/dia, 15^o ao 19^o dia de prenhez). (A) Ganho de peso médio entre o 1^o e 3^o dia de lactação, (B) Peso de neonatos no 1^o dia de lactação – N1 (n=7), (C) Peso de neonatos no 3^o dia de lactação – N3 (n=8). Médias \pm EPM referem-se a 2 experimentos independentes *P<0,002 vs Veículo; **P<0,02 vs Veículo.

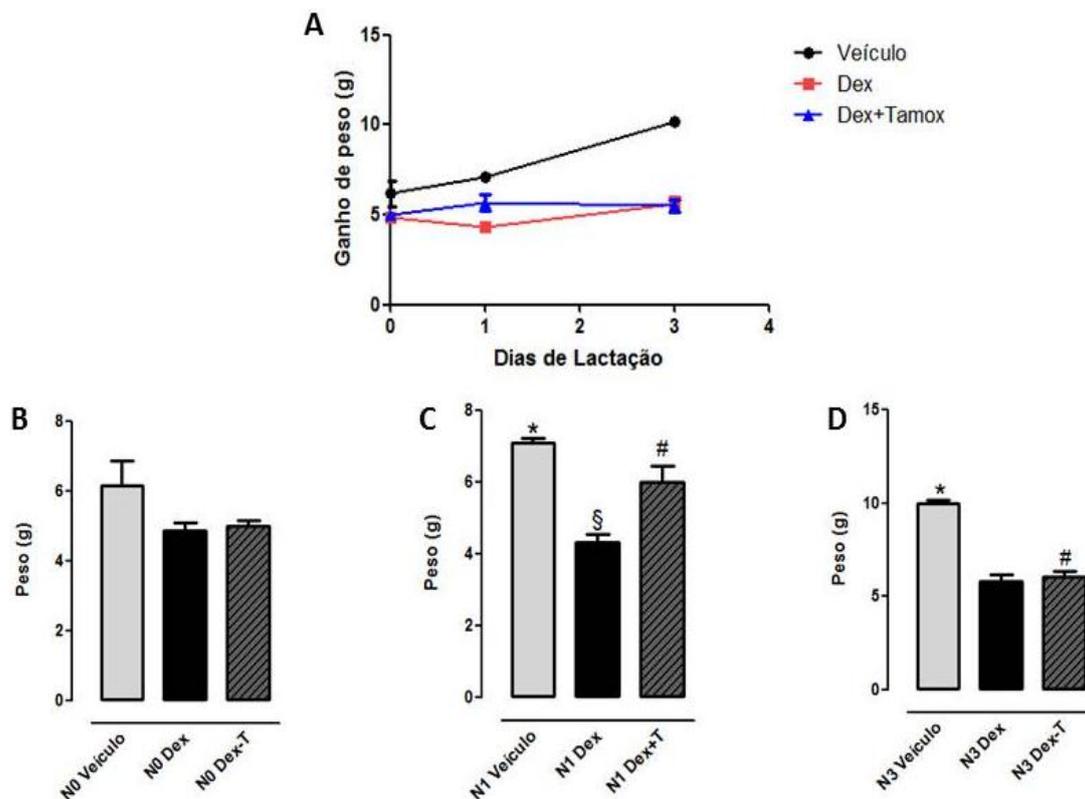


Figura 9. Ganho de peso de neonatos de mães tratadas ou não com Dex (0,1mg/kg/dia, 15^o ao 19^o dia de prenhez) ou Tamox (20µm/dia, 15^o ao 19^o dia de prenhez). (A) Ganho de peso médio entre o dia zero e o 3^o de lactação, (B) Peso de neonatos no dia zero de lactação – N0 (n= 3 a 5), (C) Peso de neonatos no 1^o dia de lactação – N1 (n= 4 a 6), (D) Peso de neonatos no 3^o dia de lactação – N3 (n=8). Médias ± EPM referem-se a 3 experimentos independentes *P<0,05 vs Dex; § P<0,05 vs Dex+Tamox; #P<0,05 vs Veículo.

Média de nascimentos por grupo

A tabela 1 mostra o número médio de neonatos de mães tratadas ou não com Dex (0,1mg/kg/dia, 15^o ao 19^o dia de prenhez) ou Dex associada com Tamoxifeno (20µm/dia, 15^o ao 19^o dia de prenhez). Não houve diferença entre os grupos.

Tabela 1– Quantidade de neonatos por grupo

	Número de nascimentos*
L3 Veículo (n=30)	9,92
L3 Dex (n=30)	9,77
L3 Dex-T (n=18)	8,22

* Valor médio da quantidade de nascimentos por mãe

Na tabela 2 podemos observar o número médio de fetos de mães tratadas ou não com Dex (0,1mg/kg/dia, 15^o ao 19^o dia de prenhez). Esse experimento foi realizado no vigésimo dia de gravidez (G20), ou seja, um dia após o término do tratamento com dexametasona. Também não foi observada diferença no número de fetos.

Tabela 2 – Quantidade de fetos por grupo

	Quantidade de fetos*
G20 Veículo (n=6)	12,16
G20 Dex (n=6)	11,40

* Valor médio da quantidade de fetos por mãe

Dosagens bioquímicas

As dosagens bioquímicas da figura 10 foram realizadas após jejum de 8 horas, para que pudéssemos verificar a glicemia (figura 7A) e a insulinemia (figura 7B). O soro foi também utilizado para a quantificação de triglicerídeos (figura 7C) e colesterol (figura 7D).

A dexametasona durante a gravidez não alterou os valores observados em L3. A insulinemia apresentou uma tendência de aumento em ratas L3, sem diferença significativa.

Semelhante à glicose, os níveis de triglicerídeos (TG) se mantiveram semelhantes aos de L3. O colesterol não apresentou variação em nenhum dos grupos testados.

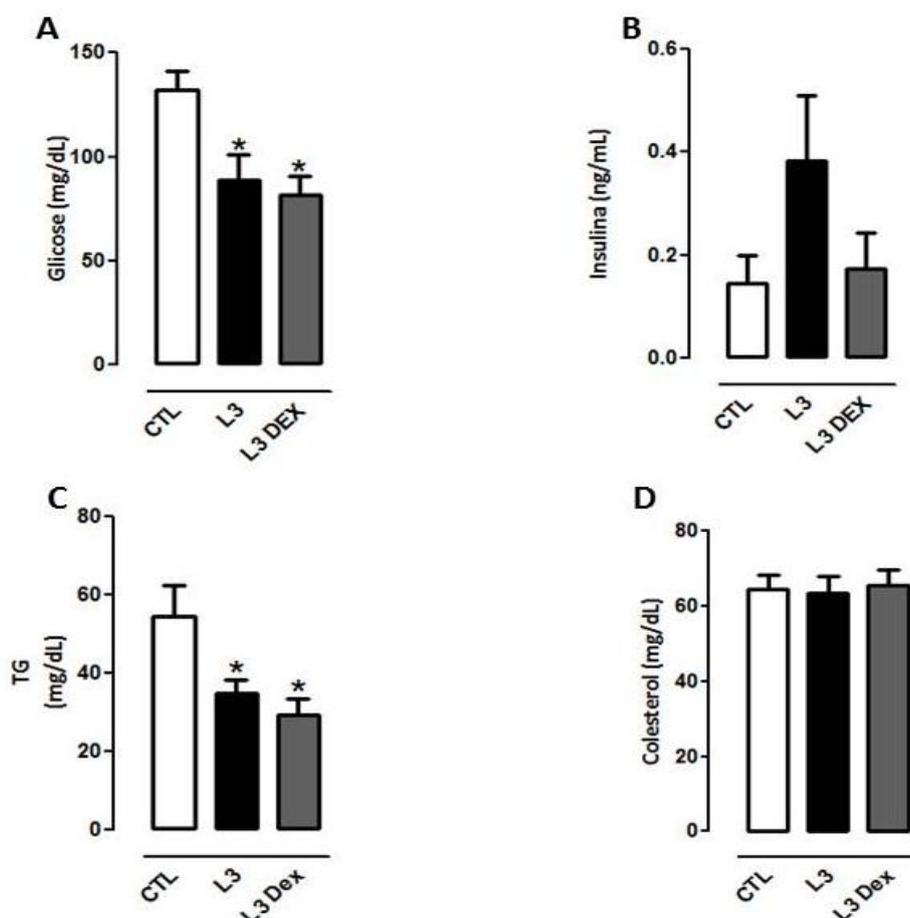


Figura 10. Dosagens bioquímicas após 8 horas de jejum (A) Glicemia, (B) Insulinemia, (C) Trigliceridemia e (D) Colesterolemia de ratas virgens (CTL), lactantes (L3) e lactantes tratadas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) entre o 15^o e 19^o dias de prenhez (L3-Dex). Médias \pm EPM referem-se a 2 experimentos * $p < 0,05$ vs. CTL. (n=6 a 8)

A dosagem randômica de glicose sanguínea, triglicerídeos e colesterol está representada na figura 11. Dex não foi capaz de alterar os níveis de glicose em L3. Porém, o tratamento com tamoxifeno induziu diminuição na glicemia em comparação com o grupo não prenhe (figura 11A).

Por outro lado, o TG (figura 11B) dos dois grupos tratados com Dex apresentaram elevação significativa nos níveis séricos de TG em relação ao L3.

O colesterol (figura 11) se mantém sem alteração significativa em todos os grupos.

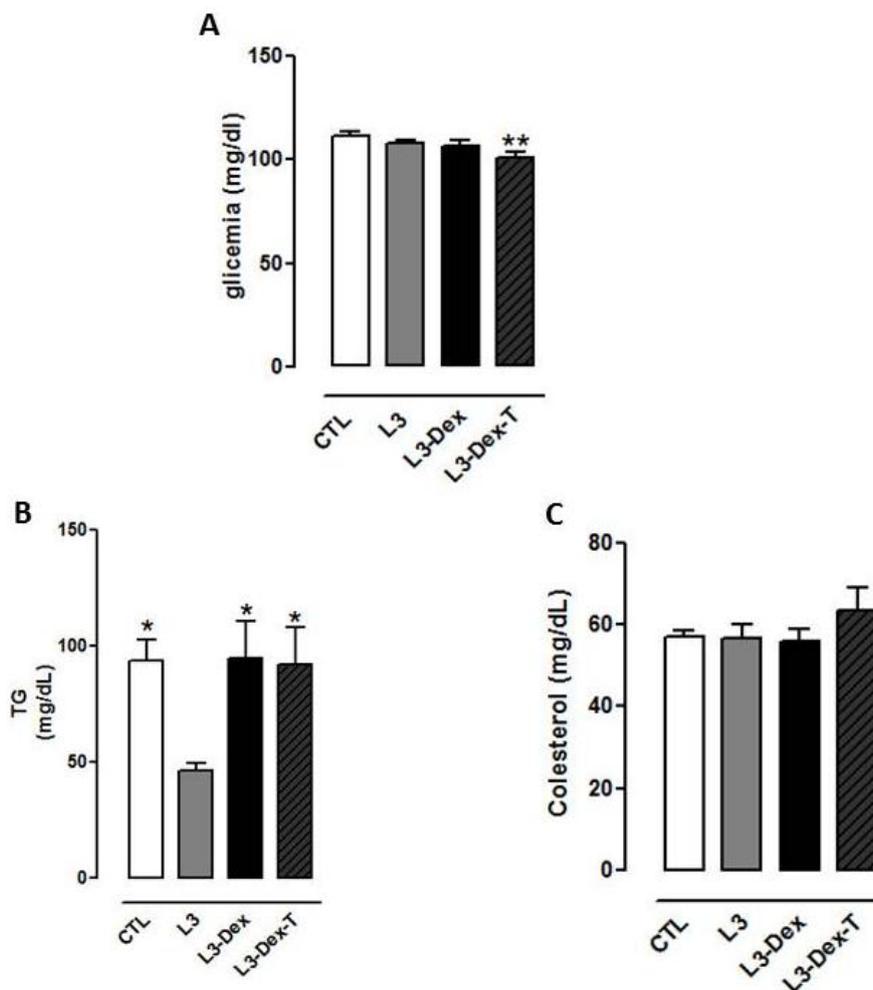


Figura 11. Dosagens bioquímicas realizadas randomicamente (A) Glicemia, (B) trigliceridemia e (C) Colesterolemia de ratas virgens (CTL), lactantes (L3) e lactantes tratadas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) entre o 15° e 19° dias de prenhez (L3-Dex), e tratadas com dex associada ao tamoxifeno (20µg/dia, 15° e 19° dias de prenhez) (L3-Dex-T). Médias ± EPM referem-se a 3 experimentos**p<0,05 vs CTL; * p<0,05 vs. L3 (n= 6 a 8)

Dosagem hormonal

Aventamos também a possibilidade de fatores hormonais estarem contribuindo para as modificações observadas. Para isso, foi realizado um protocolo de coleta de soro no vigésimo dia de gravidez (G20) para a

quantificação hormonal de E2 (17β -estradiol). A figura 12 mostra que o tratamento com Dex foi capaz de elevar os níveis séricos de estradiol.

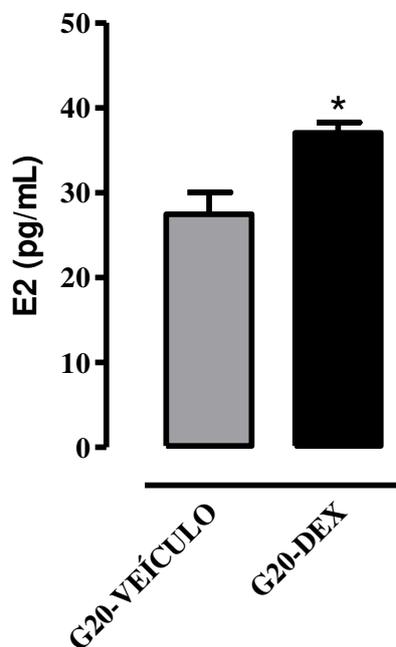


Figura 12. Concentrações de 17β -estradiol (E2) de ratas prenhes (G20 Veículo) e prenhes tratadas com dexametasona (0,1mg/kg/dia) entre o 15^o e 19^o dias de prenhez (G20 Dex). As barras representam as médias \pm EPM * $p < 0,05$ vs. G20 Veículo. (n=6).

Fragmentação de DNA

Com base nas informações bioquímicas e hormonais passamos a verificar a fragmentação de DNA de ilhotas isoladas. Estudos prévios do nosso grupo mostraram que ocorre um *burst* de apoptose em ilhotas pancreáticas no terceiro dia de lactação de ratas(11).

No primeiro momento, fizemos uma análise apenas com o tratamento de Dex entre o 15^o e o 19^o dia de gravidez (figura 13). Esse tratamento foi capaz de reduzir a fragmentação de DNA em relação a uma lactante não tratada. Com essa informação e associado com a dosagem hormonal de estradiol (sabidamente anti-apoptótico)(54), aventamos que o aumento de estradiol poderia ser responsável pela redução da apoptose.

Para tanto, realizamos uma nova série de experimentos, desta vez com o tratamento com Dex associado ao tamoxifeno. Observamos que o tamoxifeno foi capaz de reverter o efeito da dexametasona na fragmentação de DNA (figura 14).

Na sequência, verificamos como se comportaria o remodelamento pancreático logo após o término de tratamento com dexametasona (um dia após – G20). Observamos que a fragmentação de DNA é menor no grupo G20-DEX em relação ao grupo controle (figura 15).

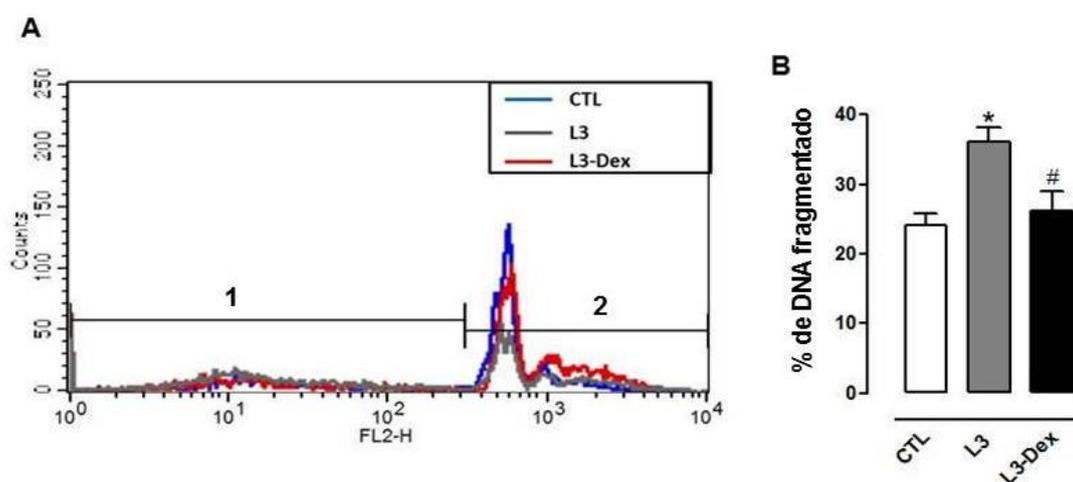


Figura 13. Fragmentação de DNA de ilhotas de ratas não prenhes (CTL), lactantes (L3), lactantes tratadas com dexametasona (0,1mg/kg/dia) entre o 15º e o 19º de gestação (L3-Dex). (A) histograma: região 1 – DNA fragmentado, região 2 – DNA íntegro; (B) porcentagem de células com DNA fragmentado. As barras representam \pm EPM * $p < 0,05$ vs CTL; # $p < 0,05$ vs L3.

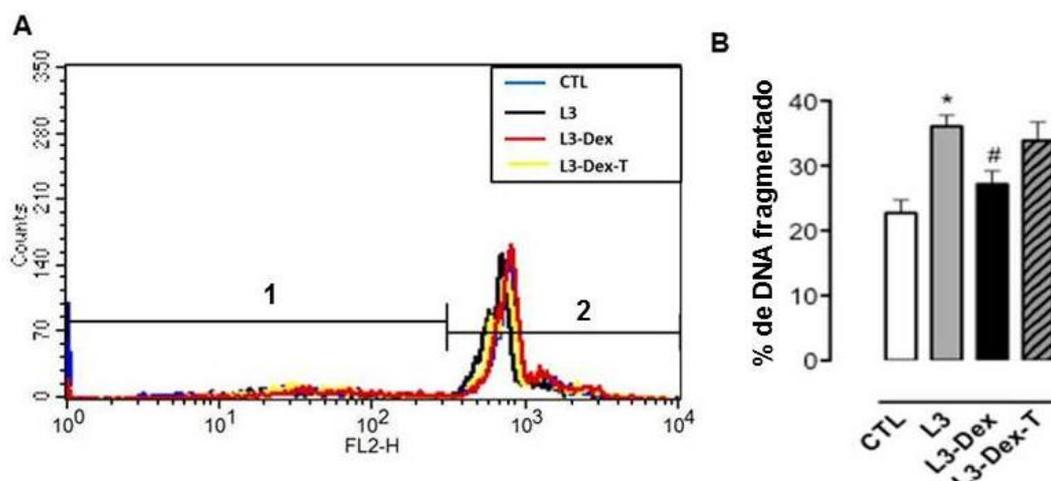


Figura 14. Fragmentação de DNA de ilhotas de ratas não prenhes (CTL), lactantes (L3), lactantes tratadas com dexametasona (0,1mg/kg/dia) entre o 15^o e o 19^o de gestação (L3-Dex), lactantes tratadas com dexametasona (0,1mg/kg/dia) associada com tamoxifeno(20µg/dia, 15^o e 19^o dias de prenhez) (L3-Dex-T). (A) histograma: região 1 – DNA fragmentado, região 2 – DNA íntegro; (B) porcentagem de células com DNA fragmentado. As barras representam \pm EPM * $p < 0,05$ vs CTL; # $p < 0,05$ vs L3.

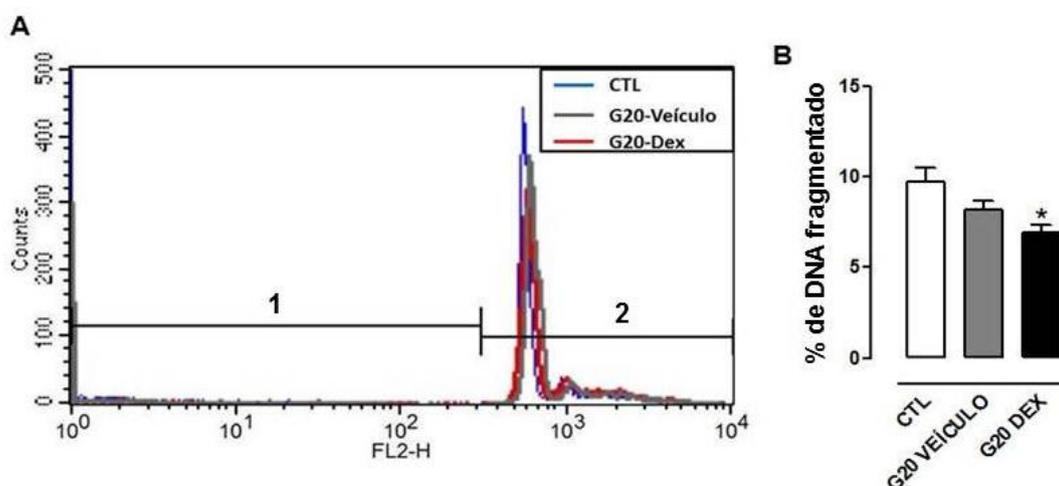


Figura 15. Fragmentação de DNA de ilhotas de ratas não prenhes (CTL), vigésimo dia gestacional (G20 Veículo), vigésimo dia gestacional após tratamento com dexametasona (0,1mg/kg/dia) entre o 15^o e o 19^o dia de gestação (G20 Dex).(A) histograma: região 1 – DNA fragmentado, região 2 – DNA íntegro; (B) porcentagem de células com DNA fragmentado. As barras representam \pm EPM * $p < 0,05$ vs G20 Veículo.

Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Fizemos uma verificação na porcentagem de eventos (marcados com DCFH-DA) para analisar a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes nas ilhotas no final da gestação. A figura 16 mostra que a porcentagem de eventos está aumentada em G20; o tratamento com Dex reverteu este fenômeno.

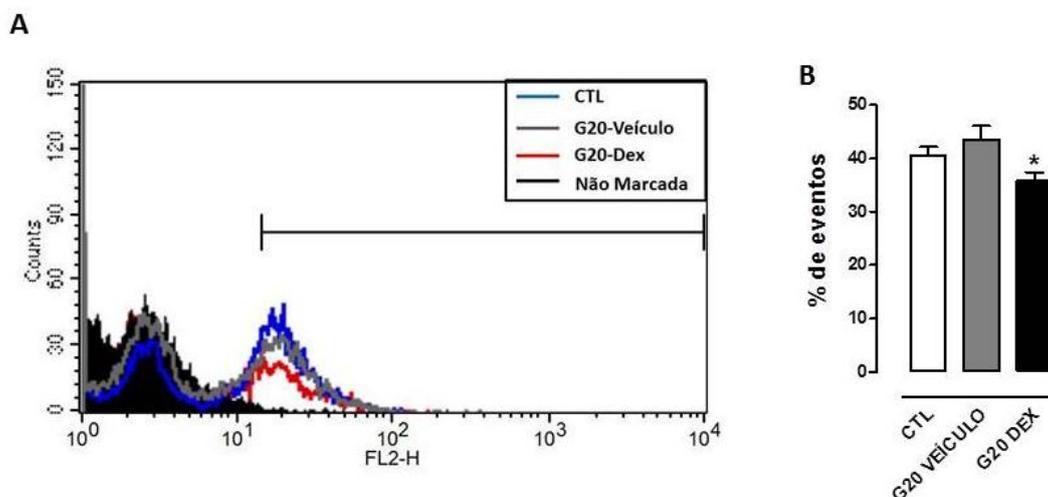


Figura 16. Porcentagem de eventos de espécies reativas de oxigênio (ROS) de ratas virgens (CTL), vigésimo dia de prenhez (G20 Veículo), vigésimo dia de prenhez de rata tratadas com dexamentasona (0,1 mg/kg/dia). As barras representam \pm EPM de um experimento * $p < 0,05$ vs. G20 Dex (n=6).

Western Blot

A seguir, analisamos as possíveis alterações na ativação da UPR induzida pela Dex em ilhotas de ratas L3.

Verificada uma diminuição da expressão de GADD153 (figura 17A), ATF4 (figura 17B) e TRB3 (figura 17C), associada a uma diminuição na fosforilação de AKT (figura 17D) no grupo L3+Dex.

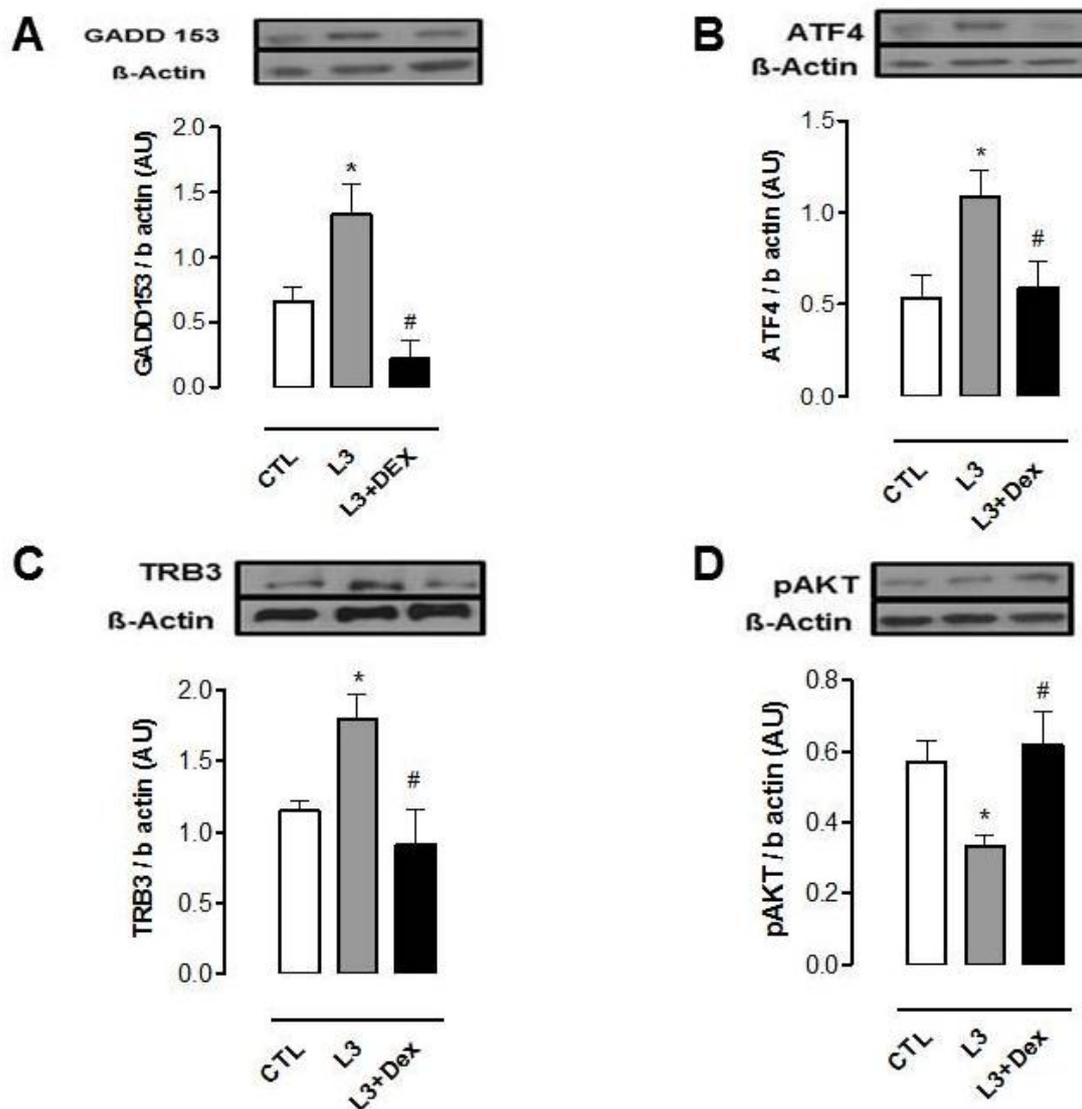


Figura 17. (A) expressão de GADD153 (30 kDa); (B) ATF4 (40/50 kDa); (C) TRB3 (45 kDa); (D) pAKT(55-65 kDa) de ilhotas isoladas de ratas virgens (CTL), lactantes (L3) e lactantes tratadas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) entre o 15^o e 19^o dias de prenhez (L3-Dex). As barras representam \pm EPM de 2 experimento. * $p < 0,05$ vs. CTL; # $p < 0,05$ vs. L3 (n=6).

A fosforilação de AKT reduziu em L3 e retornou aos valores controle em L3-Dex (figura 18A). O tratamento com tamoxifeno não reverteu o efeito da Dex sobre a fosforilação da AKT.

As figuras 18B e 18C mostram que, respectivamente, GADD153 e ATF4 apresentaram padrão de expressão correlacionada com a fosforilação

de AKT. Ambas as proteínas tiveram expressão aumentada em L3 e reversão deste efeito em L3-Dex e L3-Dex-T.

Por sua vez, TRB3 apresentou reversão parcial dos efeitos da Dex pelo tratamento com tamoxifeno (figura 18D), e portanto padrão similar à fragmentação do DNA (figura 14).

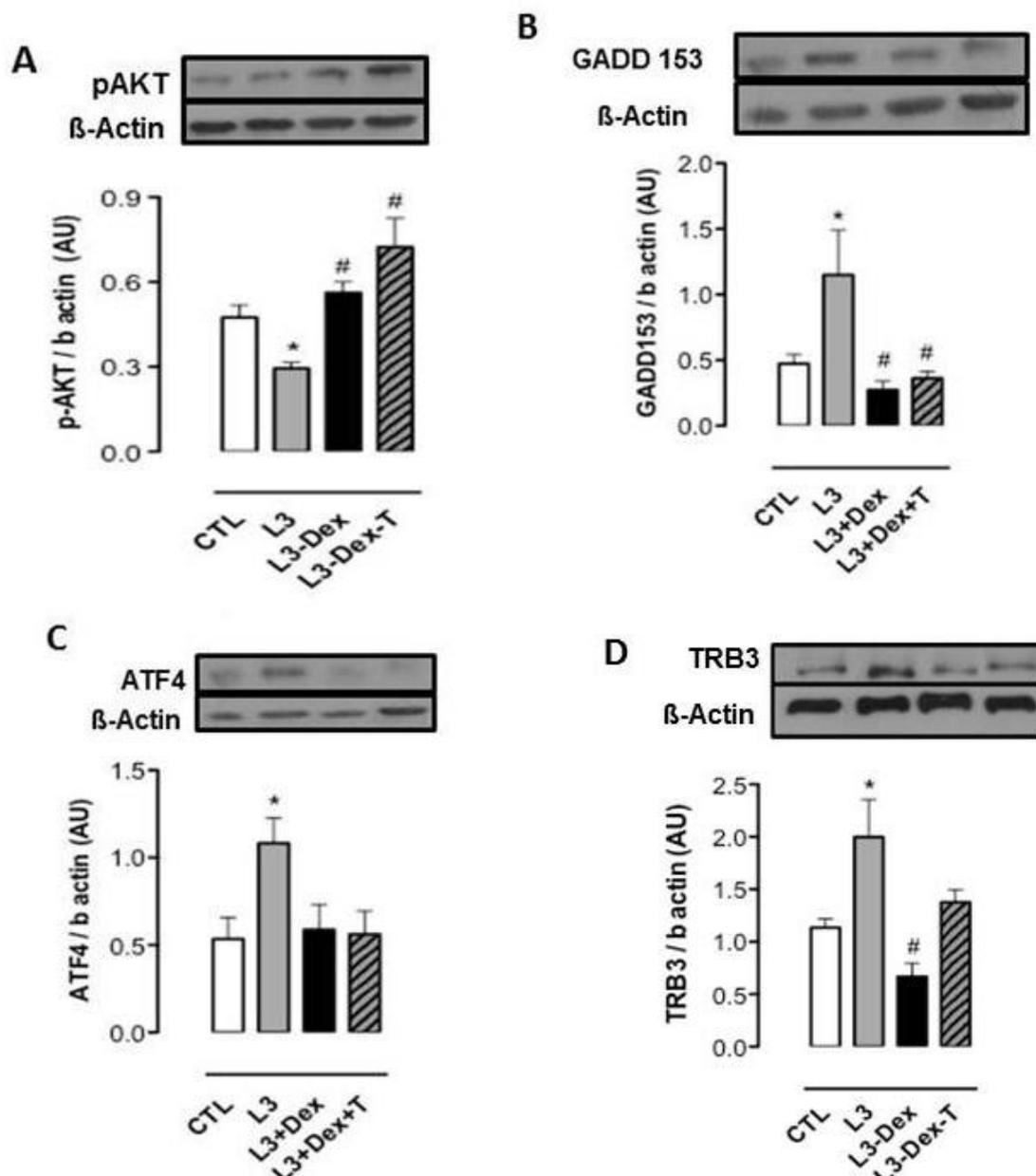


Figura 18. (A) fosforilação da AKT (55-65 kDa), (B) expressão de GADD153 (30 kDa), (C) ATF4 (40/50 kDa) e (D) TRB3 (45 kDa) de ilhotas isoladas de ratas virgens (CTL), lactantes (L3), lactantes tratadas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) entre o 15^o e 19^o dias de prenhez (L3-Dex) e

tratadas com dex associada ao tamoxifeno (20µg/dia, 15^o e 19^o dias de prenhez) (L3-Dex-T). As barras representam \pm EPM de 3 experimentos. * p<0,05 vs. CTL; # p<0,05 vs. L3 (n=6).

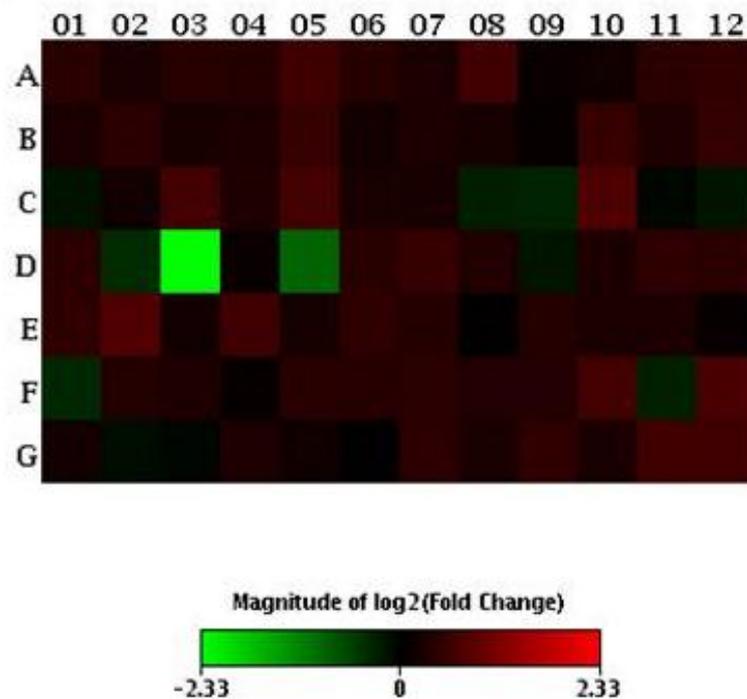
Array de apoptose

Como as alterações observadas na via da PERK não explicou a reversão da apoptose observada no grupo L3-Dex-T, decidimos analisar a expressão gênica em larga escala utilizando um array de PCR específico para genes de apoptose. Dos vários genes analisados no array, apenas o gene CD40L se mostrou alterado quando comparados os grupos L3 e L3-Dex (Tabela 3).

Tabela 3– Expressão gênica L3-Dex vs L3

L3-Dex vs L3		
Posição	Símbolo	Foldregulation
D03	CD40L	-5,05

A figuras 19 ilustra o HeatMap, com uma forma representativa do observado no Array (L3-Dex vs L3).



LAYOUT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Abl1	Aifm1	Akt1	Anxa5	Apaf1	Api5	Aven	Bad	Bdag1	Bak1	Bax	Bcl10
B	Bcl2	Bcl2a1	Bcl2l1	Bcl2l11	Bcl2l2	Bid	Bik	Birc2	Birc3	Birc5	Bnip	Bnip3
C	Bok	Card10	Casp1	Casp12	Casp14	Casp2	Casp3	Casp4	Casp6	Casp7	Casp8	Casp8ap2
D	Casp9	Cd40	Cd40L	Cflar	Cidea	Cideb	Cycs	Dad1	Dapk1	Dffa	Dffb	Diablo
E	Fadd	Faim	Faz	Faslg	Gadd45a	Hrk	Il10	Lta	Ltbr	Mapk1	Mapk8ip1	Mcl1
F	Naip6	Nfkb1	Nol3	Polb	Prdx2	Prlr	Pycard	Ripk2	Sphk2	Tnf	Tnfrsf10b	Tnfrsf11b
G	Tnfrsf1a	Tnfrsf1b	Tnfsf10	Tnfsf12	Tp53	Tp53bp2	Tp63	Tp73	Tradd	Traf2	Traf3	Xiap

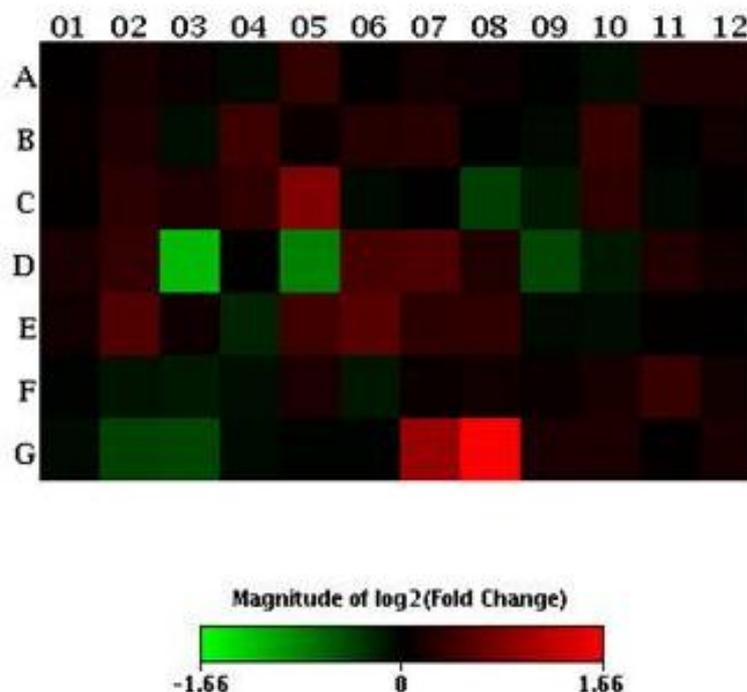
Figura 19. Array de apoptose. *HeatMap* de ratas no terceiro dia de lactação tratadas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) entre o 15^o e 19^o dias de prenhez (L3-Dex); e ratas prenhez controle (L3). Pool de 6 amostras por grupo.

A comparação entre os grupos L3-Dex-T e L3 mostrou redução de CD40L e aumento da expressão do gene tp73 (Tabela 4)

Tabela 4 – Expressão gênica L3-Dex-T vs L3

L3-Dex-T vs L3		
Posição	Símbolo	Foldregulation
G08	tp73	3,16
D03	CD40L	-2,31

A figura 20 ilustra o HeatMap com uma forma representativa do observado no Array (L3-Dex-T vs L3).



LAYOUT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Abl1	Aifm1	Akt1	Anxa5	Apaf1	Api5	Aven	Bad	Bdag1	Bak1	Bax	Bcl10
B	Bcl2	Bcl2a1	Bcl2l1	Bcl2l11	Bcl2l2	Bid	Bik	Birc2	Birc3	Birc5	Bnip	Bnip3
C	Bok	Card10	Casp1	Casp12	Casp14	Casp2	Casp3	Casp4	Casp6	Casp7	Casp8	Casp8ap2
D	Casp9	Cd40	Cd40L	Cflar	Cidea	Cideb	Cycs	Dad1	Dapk1	Dffa	Dffb	Diablo
E	Fadd	Faim	Faz	Faslg	Gadd45a	Hrk	Il10	Lta	Ltbr	Mapk1	Mapk8ip1	Mcl1
F	Naip6	Nfkb1	Nol3	Polb	Prdx2	Prlr	Pycard	Ripk2	Sphk2	Tnf	Tnfrsf10b	Tnfrsf11b
G	Tnfrsf1a	Tnfrsf1b	Tnfsf10	Tnfsf12	Tp53	Tp53bp2	Tp63	Tp73	Tradd	Traf2	Traf3	Xiap

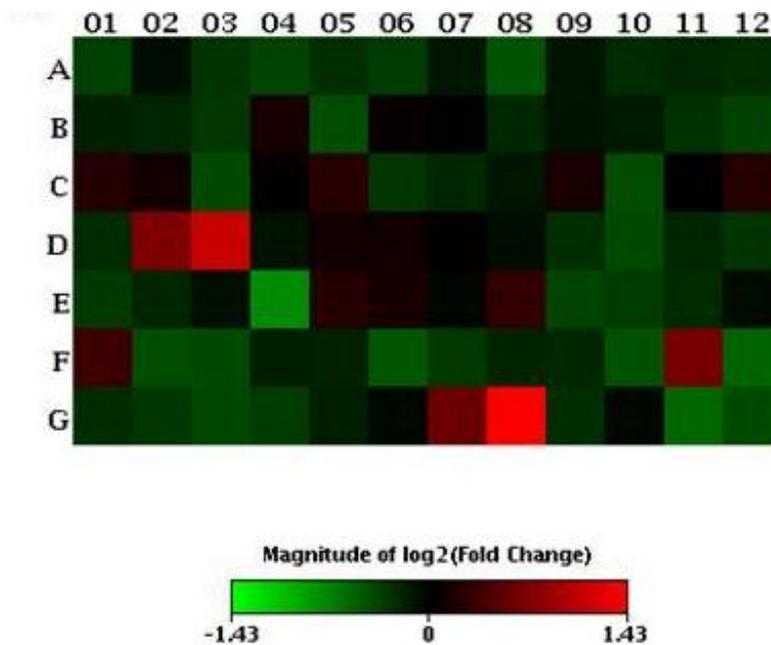
Figura 20. Array de apoptose. *HeatMap* de ratas no terceiro dia de lactação tratadas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) associada ao tamoxifeno (20µg/dia, 15^o e 19^o dias de prenhez) (L3-Dex-T); e ratas no terceiro dia de lactação (L3). Pool de 6 amostras por grupo.

A comparação entre os grupos L3-Dex-T e L3-Dex mostra que ambos os genes tp73 e CD40L foram regulados positivamente.

Tabela 5 – Expressão gênica L3-Dex-T vs L3-Dex

L3-Dex-T vs L3-Dex		
Posição	Símbolo	Foldregulation
G08	tp73	2,69
D03	CD40L	2,17

A figura 21 ilustra o HeatMap como uma forma representativa do observado no Array (L3 Dex-T vs L3-Dex).



LAYOUT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Abl1	Aifm1	Akt1	Anxa5	Apaf1	Api5	Aven	Bad	Bdag1	Bak1	Bax	Bcl10
B	Bcl2	Bcl2a1	Bcl2l1	Bcl2l11	Bcl2l2	Bid	Bik	Birc2	Birc3	Birc5	Bnip	Bnip3
C	Bok	Card10	Casp1	Casp12	Casp14	Casp2	Casp3	Casp4	Casp6	Casp7	Casp8	Casp8ap2
D	Casp9	Cd40	Cd40L	Cflar	Cidea	Cideb	Cycs	Dad1	Dapk1	Dffa	Dffb	Diablo
E	Fadd	Faim	Faz	Faslg	Gadd45a	Hrk	Il10	Lta	Ltbr	Mapk1	Mapk8ip1	Mcl1
F	Naip6	Nfkb1	Nol3	Polb	Prdx2	Prlr	Pycard	Ripk2	Sphk2	Tnf	Tnfrsf10b	Tnfrsf11b
G	Tnfrsf1a	Tnfrsf1b	Tnfrsf10	Tnfrsf12	Tp53	Tp53bp2	Tp63	Tp73	Tradd	Traf2	Traf3	Xiap

Figura 21. Array de apoptose. *HeatMap* de ratas no terceiro dia de lactação tratadas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) associada ao tamoxifeno (20µg/dia, 15^o e 19^o dias de prenhez) (L3-Dex-T); e ratas no terceiro dia de lactação tratadas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) entre o 15^o e 19^o dias de prenhez (L3-Dex). Pool de 6 amostras por grupo.

A figura 22 mostra um comparativo dos genes CD40L e tp73 entre todos os grupos, representando o *foldchange* em relação ao grupo controle (rata não prenhe).

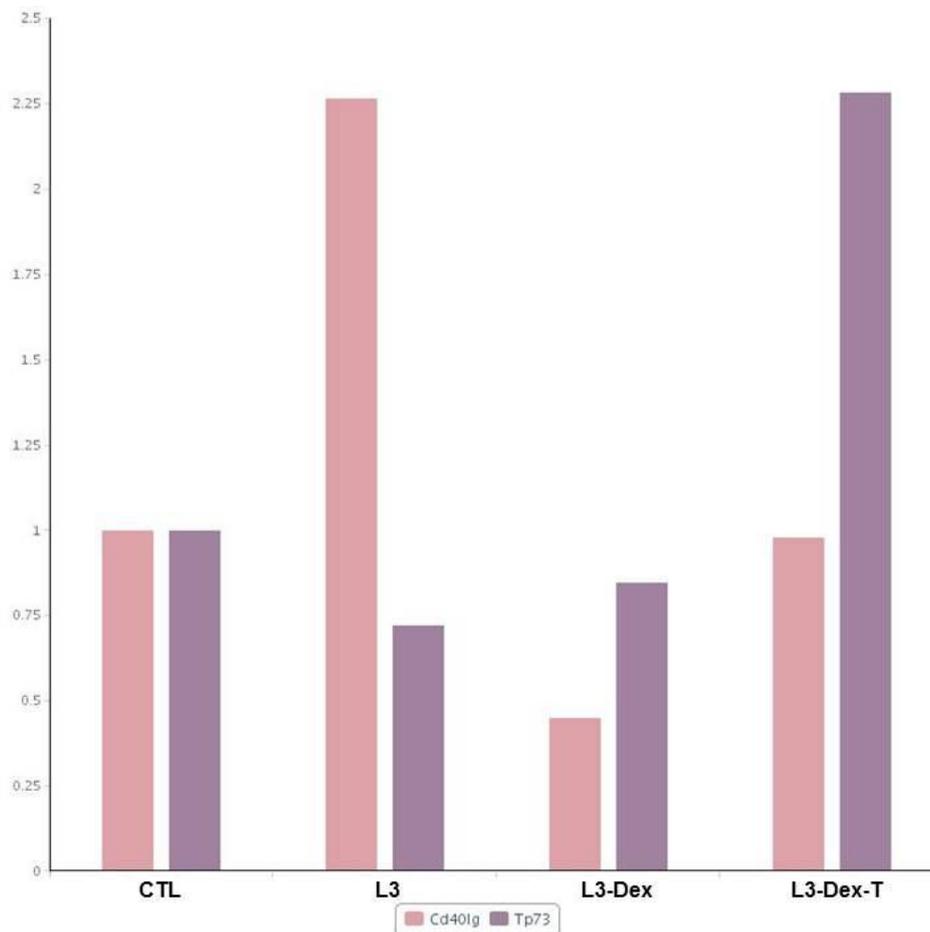


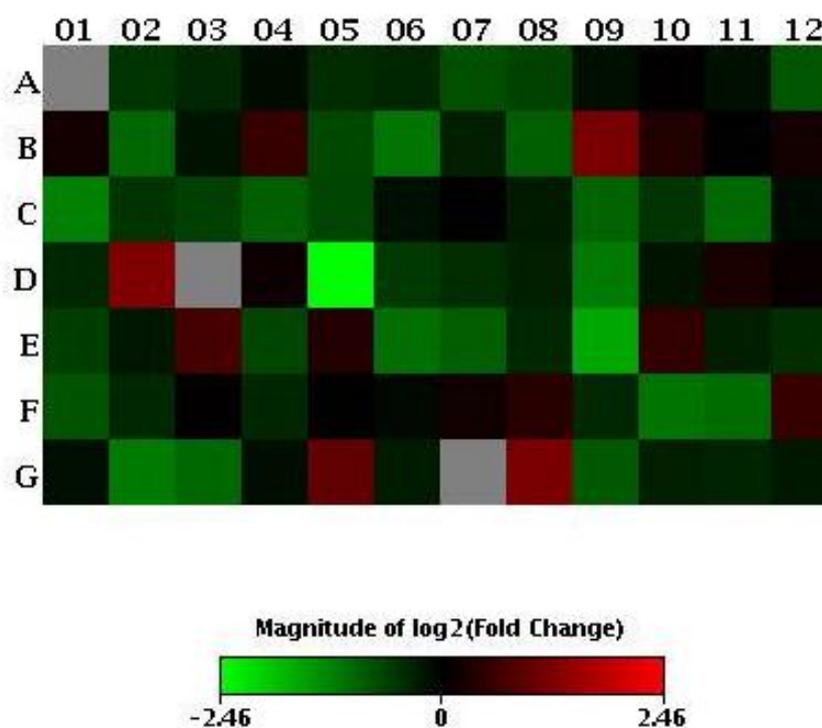
Figura 22. Array de apoptose. Comparativo multi-grupos dos genes CD40L e Tp73 entre ratas não prenhes (CTL); no terceiro dia de lactação(L3); no terceiro dia de lactação tratadas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) entre o 15^o e 19^o dias de prenhez (L3-Dex); e tratadas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) associada ao tamoxifeno (20µg/dia, 15^o e 19^o dias de prenhez) (L3-Dex-T).

A mesma análise foi realizada com ilhotas obtidas nos grupos G20 (vigésimo dia de gravidez). Os genes Bid, Cidea e TNF (genes pró-apoptóticos) apresentaram expressão reduzida no grupo G20-Dex, comparado ao grupo G20 (Tabela 6).

Tabela 6- Expressão gênica G20-Dex vs G20-Veículo

G20-Dex vs G20-Veículo		
Posição	Símbolo	FoldRegulation
B06	Bid	-2,20
D05	Cidea	-5,50
F10	Tnf	-2,17

A figura 20 ilustra o HeatMap como uma forma representativa do observado no Array (G20-Dex vs G20-Veículo).



LAYOUT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Abi1	Aifm1	Akt1	Anxa5	Apaf1	Api5	Aven	Bad	Bdag1	Bak1	Bax	Bcl10
B	Bcl2	Bcl2a1	Bcl2l1	Bcl2l11	Bcl2l2	Bid	Bik	Birc2	Birc3	Birc5	Bnip	Bnip3
C	Bok	Card10	Casp1	Casp12	Casp14	Casp2	Casp3	Casp4	Casp6	Casp7	Casp8	Casp8ap2
D	Casp9	Cd40	Cd40L	Cflar	Cidea	Cideb	Cyts	Dad1	Dapk1	Dffa	Dffb	Diablo
E	Fadd	Faim	Faz	Faslg	Gadd45a	Hrk	Il10	Lta	Ltbr	Mapk1	Mapk8ip1	Mcl1
F	Naip6	Nfkb1	Nol3	Polb	Prdx2	Prlr	Pycard	Ripk2	Sphk2	Tnf	Tnfrsf10b	Tnfrsf11b
G	Tnfrsf1a	Tnfrsf1b	Tnfrsf10	Tnfrsf12	Tp53	Tp53bp2	Tp63	Tp73	Tradd	Traf2	Traf3	Xiap

Figura 23. Array de apoptose. *HeatMap* de ratas no vigésimo dia de gravidez tratadas com dexametasona (0,1 mg/kg/dia) entre o 15^o e 19^o dias de prenhez (G20-Dex); e ratas prenhez controle (G20-veículo). Pool de 6 amostras por grupo.

A figura 21 mostra um comparativo dos genes Bid, Cidea, Tnf, representando o *foldchange* em comparação com o grupo controle (rata não prenhe).

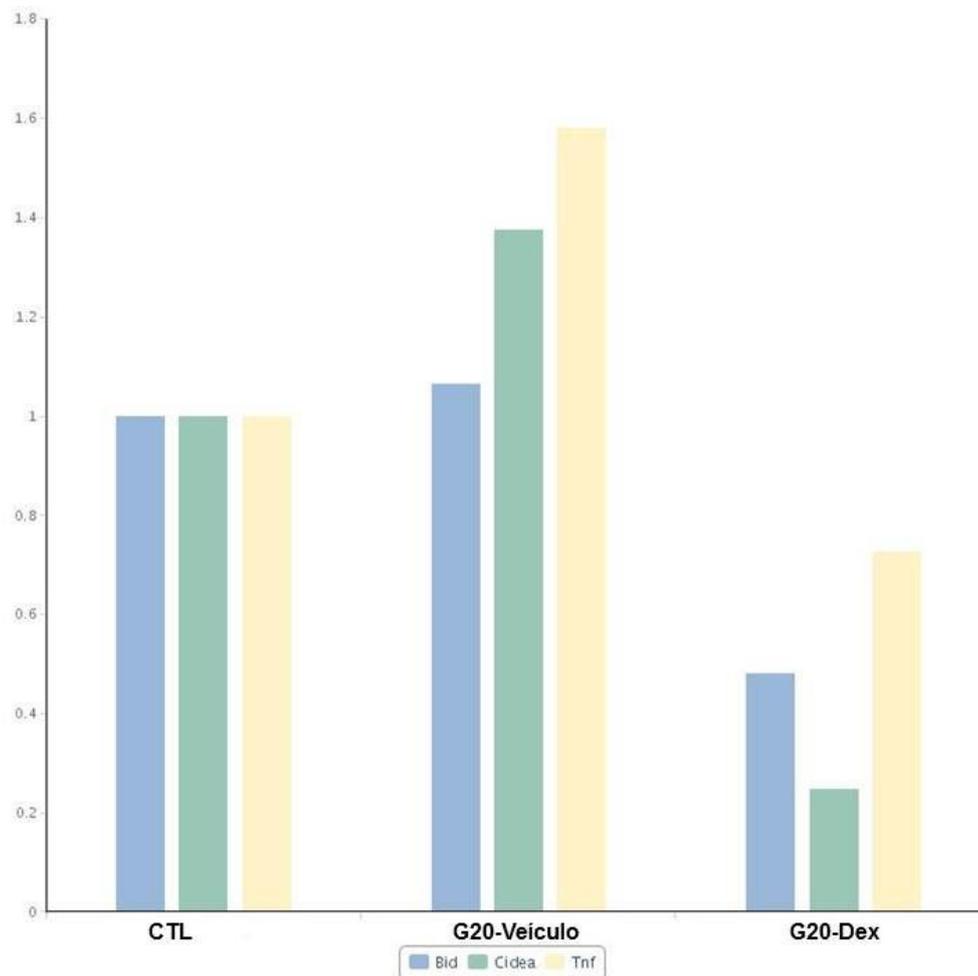


Figura 24. Array de apoptose. Comparativo multigrupos dos genes Bid, Cidea, Tnf entre ratas não prenhes (CTL); ratas no vigésimo dia de gravidez (G20-veículo); ratas tratadas com dexametasona (0,1mg/kg/dia) entre o 15º e 19º dia de prenhez (G20-Dex). Pool de 6 amostras por grupo.

Até o momento, 2 genes foram confirmados pela análise da expressão em amostras individuais. A figura 22 mostra que a expressão de CD40L apresentou tendência ao aumento em L3, porém não significativo (figura 22A). A expressão de Cidea não variou entre os grupos CTL e G20, mas apresentou redução significativa no grupo G20-Dex quando comparado ao grupo G20 (figura 22B).

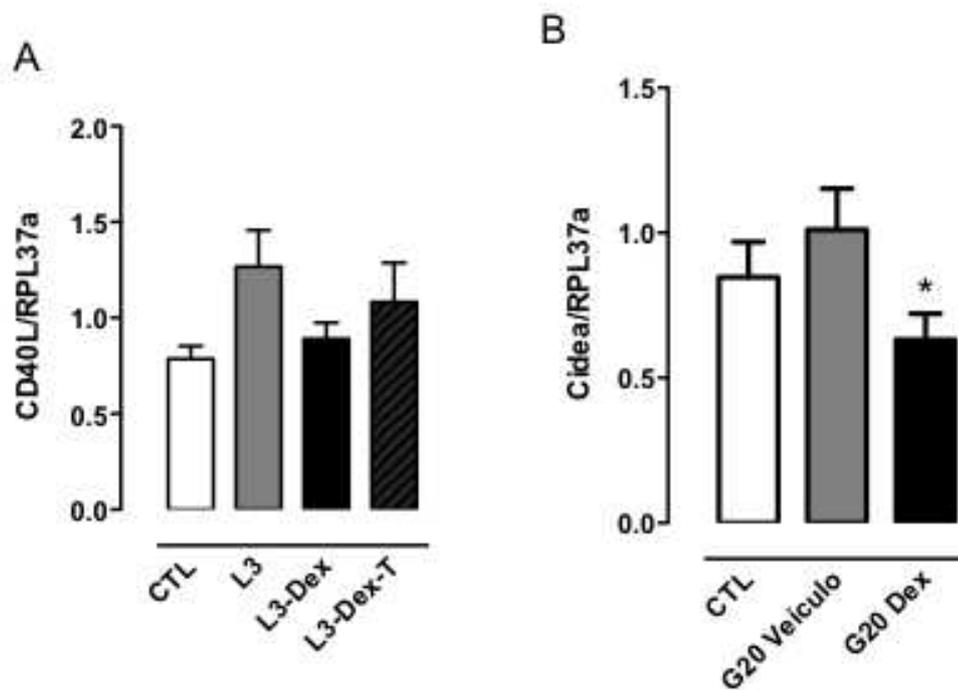


Figura 25. Análise da expressão gênica de CD40L em L3 (A) e Cidea em G20 (B). As ratas foram tratadas com dexametasona entre o 15^o e 19^o dias de prenhez, associada ou não ao tamoxifeno. * $P < 0,05$ vs G20. N = 5 a 7.

DISCUSSÃO

Resultados prévios de nosso grupo demonstraram que o remodelamento funcional da ilhota pancreática materna, que ocorre nos primeiros dias do pós-parto é decorrente de um *burst* de apoptose dependente da ativação da UPR, em especial pela via da PERK (11). Mais recentemente, observamos que ratas submetidas ao excesso de glicocorticoides pré-natal por administração de dexametasona, durante 3^o período gestacional, apresentam perda tardia e progressiva da função pancreática (35). Assim, aventamos que os efeitos tardios do excesso de glicocorticoides poderiam se iniciar no período de remodelamento pós-parto, prejudicando a renovação celular e retorno adequado da função pancreática ao estado não gravídico.

A exposição pré-natal à dexametasona é um modelo amplamente utilizado no estudo das alterações funcionais da prole ao longo da vida (38; 39; 40; 41; 42). Como poucos estudos avaliam a fisiologia materna, ampliamos a caracterização prévia do modelo (35) analisando alguns parâmetros bioquímicos e morfométricos não investigados previamente. Primeiro, o tratamento reduziu o peso materno e fetal, mas não o número de fetos ou filhotes vivos. Os níveis de glicose e triglicerídeos no jejum são menores em ratas lactantes, e não foram alterados pelo tratamento com dexametasona. Entretanto, quando submetidas ao jejum de 8 horas, os níveis de triglicerídeos são maiores nas ratas lactantes tratadas com dexametasona. Este efeito está sendo melhor investigado no laboratório, mas pode-se especular alguns mecanismos para explicá-lo. Primeiro, a dexametasona poderia aumentar a produção hepática de VLDL (76). Segundo, o excesso de glicocorticoides poderia reduzir a captação de triglicerídeos pela glândula mamária(77). Por fim, efeitos combinados da dexametasona no fígado, tecido adiposo e glândula mamária poderiam alterar os níveis de triglicerídeos da lactante (78).

Sob o ponto de vista da função endócrina pancreática, o resultado mais relevante e que motivou o planejamento dos experimentos subsequentes foi a redução da fragmentação do DNA de ilhotas em L3 após tratamento pré-natal com dexametasona. O aumento da taxa de apoptose, seguido do aumento da taxa de proliferação da célula beta é o mecanismo mais aceito para explicar o remodelamento morfo-funcional no pós-parto(79). Estes dois fenômenos biológicos, quando ativados de forma coordenada e temporalmente definida, promovem a renovação celular e retorno rápido à fisiologia do estado não gravídico.

Nossos resultados mostram que a via da UPR, ativada no início da lactação (via da PERK), foi inibida pela pré-exposição à dexametasona. Ademais, a redução da fosforilação da AKT e o aumento de TRB3 em L3 foi também revertido pela dexametasona. Em conjunto, estes resultados confirmam a importância da ativação da UPR no remodelamento da ilhota no pós-parto (11), e indicam que o prejuízo deste pode alterar permanentemente a função do pâncreas endócrino (35).

Com o intuito de identificar os fatores responsáveis pela redução da ativação da UPR e apoptose induzida pela dexametasona, avaliamos os níveis séricos de estradiol, um conhecido indutor da sobrevivência e ganho de função da célula beta pancreática (54; 80; 81). Descartamos a hipótese de uma ação direta da dexametasona porque, tanto em experimentos realizados em nosso laboratório quanto em resultados publicados por outros grupos (7; 45), é claro o efeito pró-apoptótico deste hormônio na célula beta pancreática.

Os níveis significativamente maiores de estradiol tem correlação direta com a inibição da apoptose, confirmada pelo tratamento com tamoxifeno (54), um antagonista dos ER. Entretanto, apenas a expressão de TRB3 foi revertida pelo tamoxifeno, e a de ATF4, CHOP e fosforilação da AKT não foram alteradas.

TRB3 é uma pseudo-quinase que funciona como modulador negativo da ativação da AKT(82) e que tem função central na ativação do braço da PERK da UPR(83). Entretanto, já foram relatados padrões mais

abrangentes de interações da TRB3, e diversos mecanismos de regulação de sua expressão, dependentes ou independentes da ativação da *UPR*. Na linhagem de adipócitos 3T3-L1, tanto a deprivação de glicose quanto o tratamento com dexametasona induzem a expressão de TRB3(84). TRB3 induz a ativação do NF- κ B nas células beta pancreáticas(85), e se associa diretamente com ATF4, formando um complexo que complete com o fator de transcrição CREB (86). Assim, é possível que o aumento da expressão de TRB3 induzido pelo tamoxifeno em ilhotas de ratas L3-Dex participe do aumento da taxa de apoptose, de forma independente da fosforilação da AKT e da expressão de CHOP e ATF4. A ação direta da dexametasona ou a resposta à hipoglicemia observada no grupo L3-Dex-T são potenciais mediadores do aumento de TRB3 neste grupo experimental.

Cabe aqui relatar que a progesterona tem efeito pró-apoptótica na célula β (87), dependente do estresse de retículo endoplasmático(88). Resultados não publicados de nosso laboratório mostraram que os níveis séricos de P4 diminuem no final da gestação (G20) e, portanto, este hormônio poderia participar da redução da apoptose observada em L3. Entretanto, algumas limitações experimentais impediram a exploração deste mecanismo, como a ausência de agonistas seletivos e sua ação na duração da gestação, uma vez que é utilizada na prevenção de parto pré-maturo (89).

Com o intuito de verificar o padrão de expressão de genes envolvidos na apoptose, utilizamos a metodologia de expressão gênica em larga escala por array de PCR. No momento de aumento da taxa de apoptose (L3), a expressão do gene CD40L se mostrou reduzida em ilhotas de ratas tratadas com dexametasona.

CD40L é uma proteína pró-inflamatória capaz de ativar NF- κ B na célula beta pancreática(90). Embora ainda preliminares, os resultados de expressão de CD40L apresentam padrão similar à fragmentação do DNA observada nas ilhotas em L3. Experimentos adicionais são necessários para confirmar a participação de CD40L na modulação da apoptose da célula beta em L3, dentre estes a quantificação dos níveis protéicos de CD40L e CD40.

Por fim, a expressão de Cidea (*Cell death-inducing DNA fragmentation factor, α subunit-like effector A*) apresentou redução significativa logo após o tratamento com dexametasona (G20). Cidea é um coativador transcricional envolvido na regulação do metabolismo lipídico hepático e regulado pelo estresse oxidativo(91). Corroborando a redução da expressão de Cidea, observamos redução de ROS em G20. Por fim, a supressão da expressão de Cidea protege a célula beta da apoptose induzida por palmitato(92).

Em conjunto, nossos resultados mostram que o tratamento pré-natal com dexametasona inibe o *burst* de apoptose fisiológico da ilhota pancreática materna característica do início da lactação. Nossos resultados também indicam que esta resposta pode ser dependente das ações anti-inflamatórias da dexametasona, mediadas pela modulação da expressão coordenada de genes pró- e anti-inflamatórios.

CONCLUSÕES

1. A exposição pré-natal ao excesso de glicocorticoides reduziu a ativação da UPR e a apoptose das ilhotas maternas de ratas em L3.

2. O bloqueio dos receptores de E2 em L3-Dex resultou na recuperação da taxa de apoptose L3. Entretanto, a ativação da UPR não foi completamente revertida.

3. A análise em larga escala da expressão gênica indica que a inibição da apoptose resultante do tratamento com dexametasona envolve a expressão de genes não classicamente relacionados à apoptose induzida pela UPR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marynissen G, Aerts L, Van Assche FA: The endocrine pancreas during pregnancy and lactation in the rat. *J Dev Physiol* 1983;5:373-381
2. Kawai M, Kishi K: Adaptation of pancreatic islet B-cells during the last third of pregnancy: regulation of B-cell function and proliferation by lactogenic hormones in rats. *Eur J Endocrinol* 1999;141:419-425
3. Toselli C, Hyslop CM, Hughes M, Natale DR, Santamaria P, Huang CT: Contribution of a non- β -cell source to β -cell mass during pregnancy. *PLoS One* 2014;9:e100398
4. Rieck S, Kaestner KH: Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:151-158
5. Green IC, Taylor KW: Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of Langerhans. *J Endocrinol* 1972;54:317-325
6. Mihailidou C, Papavassiliou AG, Kiaris H: A crosstalk between p21 and UPR-induced transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP) linked to type 2 diabetes. *Biochimie* 2014;99:19-27
7. Weinhaus AJ, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL: Dexamethasone counteracts the effect of prolactin on islet function: implications for islet regulation in late pregnancy. *Endocrinology* 2000;141:1384-1393
8. Anhô GF, Nogueira TC, Nicoletti-Carvalho JE, Lellis-Santos C, Barbosa HC, Cipolla-Neto J, Bosqueiro JR, Boschero AC, Bordin S: Signal transducer and activator of transcription 3-regulated sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 expression by prolactin and glucocorticoids is involved in the adaptation of insulin secretory response during the peripartum period. *J Endocrinol* 2007;195:17-27

9. Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S: Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* 1995;136:5461-5468
10. Nicoletti-Carvalho JE, Nogueira TC, Gorjão R, Bromati CR, Yamanaka TS, Boschero AC, Velloso LA, Curi R, Anê GF, Bordin S: UPR-mediated TRIB3 expression correlates with reduced AKT phosphorylation and inability of interleukin 6 to overcome palmitate-induced apoptosis in RINm5F cells. *J Endocrinol* 2010;206:183-193
11. Bromati CR, Lellis-Santos C, Yamanaka TS, Nogueira TC, Leonelli M, Caperuto LC, Gorjão R, Leite AR, Anê GF, Bordin S: UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300:R92-100
12. Carrara M, Prischi F, Nowak PR, Ali MM: Crystal structures reveal transient PERK luminal domain tetramerization in endoplasmic reticulum stress signaling. *EMBO J* 2015;34:1589-1600
13. Diehl JA, Fuchs SY, Koumenis C: The cell biology of the unfolded protein response. *Gastroenterology* 2011;141:38-41, 41.e31-32
14. Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR: Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:2409-2427
15. Lee J, Ozcan U: Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J Biol Chem* 2014;289:1203-1211
16. Sano R, Reed JC: ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:3460-3470

17. Ozcan L, Tabas I: Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med* 2012;63:317-328
18. Kaufman RJ, Back SH, Song B, Han J, Hassler J: The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in β -cells. *Diabetes Obes Metab* 2010;12 Suppl 2:99-107
19. Xia P, Qi Y: Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 and survival of beta cells undergoing endoplasmic reticulum stress. *Vitam Horm* 2014;95:269-298
20. Wu J, Kaufman RJ: From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* 2006;13:374-384
21. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS: Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306:457-461
22. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ: Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest* 2008;118:3378-3389
23. Pirot P, Naamane N, Libert F, Magnusson NE, Ørntoft TF, Cardozo AK, Eizirik DL: Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs. *Diabetologia* 2007;50:1006-1014
24. Chen Y, Brandizzi F: IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol* 2013;23:547-555
25. Ardestani A, Maedler K: MST1: a promising therapeutic target to restore functional beta cell mass in diabetes. *Diabetologia* 2016;
26. Schröder M, Kaufman RJ: Divergent roles of IRE1 α and PERK in the unfolded protein response. *Curr Mol Med* 2006;6:5-36

27. Averous J, Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Thiel G, Fafournoux P: Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279:5288-5297
28. Boyce M, Yuan J: Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 2006;13:363-373
29. Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, Lee JP, Koeberlein B, Furth EE, Polonsky KS, Naji A, Birnbaum MJ: Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat Med* 2001;7:1133-1137
30. Vogel JP, Souza JP, Gülmezoglu AM, Mori R, Lumbiganon P, Qureshi Z, Carroli G, Laopaiboon M, Fawole B, Ganchimeg T, Zhang J, Torloni MR, Bohren M, Temmerman M, Network WM-CSoMaNHR: Use of antenatal corticosteroids and tocolytic drugs in preterm births in 29 countries: an analysis of the WHO Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health. *Lancet* 2014;384:1869-1877
31. Razaz N, Skoll A, Fahey J, Allen VM, Joseph KS: Trends in optimal, suboptimal, and questionably appropriate receipt of antenatal corticosteroid prophylaxis. *Obstet Gynecol* 2015;125:288-296
32. Paganelli S, Soncini E, Gargano G, Capodanno F, Vezzani C, La Sala GB: Retrospective analysis on the efficacy of corticosteroid prophylaxis prior to elective caesarean section to reduce neonatal respiratory complications at term of pregnancy: review of literature. *Arch Gynecol Obstet* 2013;288:1223-1229
33. Jain L: Alveolar fluid clearance in developing lungs and its role in neonatal transition. *Clin Perinatol* 1999;26:585-599
34. Dileep A, Khan NB, Sheikh SS: Comparing neonatal respiratory morbidity in neonates delivered at term by elective Caesarean section with and without dexamethasone: retrospective cohort study. *J Pak Med Assoc* 2015;65:607-611

35. Gomes PR, Graciano MF, Pantaleão LC, Rennó AL, Rodrigues SC, Velloso LA, Latorraca MQ, Carpinelli AR, Anhô GF, Bordin S: Long-term disruption of maternal glucose homeostasis induced by prenatal glucocorticoid treatment correlates with miR-29 upregulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;306:E109-120
36. Colvin ES, Ma HY, Chen YC, Hernandez AM, Fueger PT: Glucocorticoid-induced suppression of β -cell proliferation is mediated by Mig6. *Endocrinology* 2013;154:1039-1046
37. Mark PJ, Augustus S, Lewis JL, Hewitt DP, Waddell BJ: Changes in the placental glucocorticoid barrier during rat pregnancy: impact on placental corticosterone levels and regulation by progesterone. *Biol Reprod* 2009;80:1209-1215
38. O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC: Environmental disturbance confounds prenatal glucocorticoid programming experiments in Wistar rats. *Lab Anim* 2010;44:199-205
39. Norris AW, Wang C, Yao J, Walsh SA, Sawatzke AB, Hu S, Sunderland JJ, Segar JL, Ponto LL: Effect of insulin and dexamethasone on fetal assimilation of maternal glucose. *Endocrinology* 2011;152:255-262
40. Shoener JA, Baig R, Page KC: Prenatal exposure to dexamethasone alters hippocampal drive on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adult male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R1366-1373
41. Li S, Sloboda DM, Moss TJ, Nitsos I, Polglase GR, Doherty DA, Newnham JP, Challis JR, Braun T: Effects of glucocorticoid treatment given in early or late gestation on growth and development in sheep. *J Dev Orig Health Dis* 2013;4:146-156
42. Gesina E, Tronche F, Herrera P, Duchene B, Tales W, Czernichow P, Breant B: Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development. *Diabetes* 2004;53:2322-2329

43. Somm E, Vauthay DM, Guérardel A, Toulotte A, Cettour-Rose P, Klee P, Meda P, Aubert ML, Hüppi PS, Schwitzgebel VM: Early metabolic defects in dexamethasone-exposed and undernourished intrauterine growth restricted rats. *PLoS One* 2012;7:e50131
44. Goldenberg RL, McClure EM: Appropriate use of antenatal corticosteroid prophylaxis. *Obstet Gynecol* 2015;125:285-287
45. Ranta F, Avram D, Berchtold S, Düfer M, Drews G, Lang F, Ullrich S: Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4. *Diabetes* 2006;55:1380-1390
46. Beato M, Klug J: Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 2000;6:225-236
47. Kumar R, Thompson EB: The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 1999;64:310-319
48. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83:835-839
49. Clegg DJ: Minireview: the year in review of estrogen regulation of metabolism. *Mol Endocrinol* 2012;26:1957-1960
50. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL: The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev* 2013;34:309-338
51. Tiano JP, Mauvais-Jarvis F: Importance of oestrogen receptors to preserve functional β -cell mass in diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:342-351
52. Liu S, Mauvais-Jarvis F: Minireview: Estrogenic protection of beta-cell failure in metabolic diseases. *Endocrinology* 2010;151:859-864
53. Kilic G, Alvarez-Mercado AI, Zarrouki B, Opland D, Liew CW, Alonso LC, Myers MG, Jonas JC, Poitout V, Kulkarni RN, Mauvais-Jarvis F: The islet

estrogen receptor- α is induced by hyperglycemia and protects against oxidative stress-induced insulin-deficient diabetes. *PLoS One* 2014;9:e87941

54. Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, Tsai MJ, Mauvais-Jarvis F: Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9232-9237

55. Tiano J, Mauvais-Jarvis F: Selective estrogen receptor modulation in pancreatic β -cells and the prevention of type 2 diabetes. *Islets* 2012;4:173-176

56. Liu S, Le May C, Wong WP, Ward RD, Clegg DJ, Marcelli M, Korach KS, Mauvais-Jarvis F: Importance of extranuclear estrogen receptor-alpha and membrane G protein-coupled estrogen receptor in pancreatic islet survival. *Diabetes* 2009;58:2292-2302

57. Okret S, Poellinger L, Dong Y, Gustafsson JA: Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:5899-5903

58. Dong Y, Poellinger L, Gustafsson JA, Okret S: Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Mol Endocrinol* 1988;2:1256-1264

59. Wallace AD, Cidlowski JA: Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 2001;276:42714-42721

60. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA: Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81:1535-1565

61. Couse JF, Korach KS: Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 1999;20:358-417

62. Kinyamu HK, Archer TK: Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Mol Cell Biol* 2003;23:5867-5881
63. Karmakar S, Jin Y, Nagaich AK: Interaction of glucocorticoid receptor (GR) with estrogen receptor (ER) α and activator protein 1 (AP1) in dexamethasone-mediated interference of ER α activity. *J Biol Chem* 2013;288:24020-24034
64. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW: Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:83-94
65. Luciani DS, White SA, Widenmaier SB, Saran VV, Taghizadeh F, Hu X, Allard MF, Johnson JD: Bcl-2 and Bcl-xL suppress glucose signaling in pancreatic β -cells. *Diabetes* 2013;62:170-182
66. Danial NN, Walensky LD, Zhang CY, Choi CS, Fisher JK, Molina AJ, Datta SR, Pitter KL, Bird GH, Wikstrom JD, Deeney JT, Robertson K, Morash J, Kulkarni A, Neschen S, Kim S, Greenberg ME, Corkey BE, Shirihai OS, Shulman GI, Lowell BB, Korsmeyer SJ: Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med* 2008;14:144-153
67. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A: ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 2007;129:1337-1349
68. McKenzie MD, Jamieson E, Jansen ES, Scott CL, Huang DC, Bouillet P, Allison J, Kay TW, Strasser A, Thomas HE: Glucose induces pancreatic islet cell apoptosis that requires the BH3-only proteins Bim and Puma and multi-BH domain protein Bax. *Diabetes* 2010;59:644-652
69. Cechin SR, Buchwald P: Effects of representative glucocorticoids on TNF α - and CD40L-induced NF- κ B activation in sensor cells. *Steroids* 2014;85:36-43

70. Liu SF, Malik AB: NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L622-L645
71. Karpusas M, Hsu YM, Wang JH, Thompson J, Lederman S, Chess L, Thomas D: 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 1995;3:1031-1039
72. Korniluk A, Kemono H, Dymicka-Piekarska V: Multifunctional CD40L: pro- and anti-neoplastic activity. *Tumour Biol* 2014;35:9447-9457
73. Wang XH, Ding XM, Li Y, Liu HB, Xue WJ, Tian XH, Feng XS, Jiao FM, Zheng J: Simultaneous blockade of the CD40/CD40L and NF-kB pathways prolonged islet allograft survival. *Transpl Int* 2012;25:118-126
74. Bordin S, Boschero AC, Carneiro EM, Atwater I: Ionic mechanisms involved in the regulation of insulin secretion by muscarinic agonists. *J Membr Biol* 1995;148:177-184
75. Lacy PE, Kostianovsky M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967;16:35-39
76. Fu J, Ma S, Li X, An S, Li T, Guo K, Lin M, Qu W, Wang S, Dong X, Han X, Fu T, Huang X, Wang T, He S: Long-term Stress with Hyperglucocorticoidemia-induced Hepatic Steatosis with VLDL Overproduction Is Dependent on both 5-HT₂ Receptor and 5-HT Synthesis in Liver. *Int J Biol Sci* 2016;12:219-234
77. Herrera E, Gómez-Coronado D, Lasunción MA: Lipid metabolism in pregnancy. *Biol Neonate* 1987;51:70-77
78. Herrera E, Lasunción MA, Palacín M, Zorzano A, Bonet B: Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes* 1991;40 Suppl 2:83-88
79. Lee YC, Nielsen JH: Regulation of beta cell replication. *Mol Cell Endocrinol* 2009;297:18-27

80. Wong WP, Tiano JP, Liu S, Hewitt SC, Le May C, Dalle S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Korach KS, Mauvais-Jarvis F: Extranuclear estrogen receptor- α stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:13057-13062
81. Tiano JP, Delghingaro-Augusto V, Le May C, Liu S, Kaw MK, Khuder SS, Latour MG, Bhatt SA, Korach KS, Najjar SM, Prentki M, Mauvais-Jarvis F: Estrogen receptor activation reduces lipid synthesis in pancreatic islets and prevents β cell failure in rodent models of type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2011;121:3331-3342
82. Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M: TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 2003;300:1574-1577
83. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H: TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* 2005;24:1243-1255
84. Yacoub Wasef SZ, Robinson KA, Berkaw MN, Buse MG: Glucose, dexamethasone, and the unfolded protein response regulate TRB3 mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E1274-1280
85. Fang N, Zhang W, Xu S, Lin H, Wang Z, Liu H, Fang Q, Li C, Peng L, Lou J: TRIB3 alters endoplasmic reticulum stress-induced β -cell apoptosis via the NF- κ B pathway. *Metabolism* 2014;63:822-830
86. Liew CW, Bochenski J, Kawamori D, Hu J, Leech CA, Wanic K, Malecki M, Warram JH, Qi L, Krolewski AS, Kulkarni RN: The pseudokinase tribbles homolog 3 interacts with ATF4 to negatively regulate insulin exocytosis in human and mouse beta cells. *J Clin Invest* 2010;120:2876-2888
87. Zhou R, Yao X, Xu X, Wang G, Zhu Z, Chen J, Chen L, Shen X: Blockage of progesterone receptor effectively protects pancreatic islet beta cell viability. *Steroids* 2013;78:987-995

88. Nunes VA, Portioli-Sanches EP, Rosim MP, Araujo MS, Praxedes-Garcia P, Valle MM, Roma LP, Hahn C, Gurgul-Convey E, Lenzen S, Azevedo-Martins AK: Progesterone induces apoptosis of insulin-secreting cells: insights into the molecular mechanism. *J Endocrinol* 2014;221:273-284
89. Norwitz ER, Caughey AB: Progesterone supplementation and the prevention of preterm birth. *Rev Obstet Gynecol* 2011;4:60-72
90. Barbé-Tuana FM, Klein D, Ichii H, Berman DM, Coffey L, Kenyon NS, Ricordi C, Pastori RL: CD40-CD40 ligand interaction activates proinflammatory pathways in pancreatic islets. *Diabetes* 2006;55:2437-2445
91. Carr SK, Chen JH, Cooper WN, Constância M, Yeo GS, Ozanne SE: Maternal diet amplifies the hepatic aging trajectory of Cidea in male mice and leads to the development of fatty liver. *FASEB J* 2014;28:2191-2201
92. Omae N, Ito M, Hase S, Nagasawa M, Ishiyama J, Ide T, Murakami K: Suppression of FoxO1/cell death-inducing DNA fragmentation factor α -like effector A (Cidea) axis protects mouse β -cells against palmitic acid-induced apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 2012;348:297-304

ANEXOS



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Participação dos glicocorticóides no remodelamento do pâncreas endócrino no período perinatal" (protocolo nº 3505-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gabriel Forato Anhô / Dailson Nogueira de Souza, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 22 de agosto de 2014.

Campinas, 22 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
PresidenteFátima Alonso
Secretária Executiva