Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

CARINA PEREIRA DIAS

Investigação sobre a ocorrência de reprogramação fetal no desenvolvimento do pâncreas endócrino em modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2019

CARINA PEREIRA DIAS

Investigação sobre a ocorrência de reprogramação fetal no desenvolvimento do pâncreas endócrino em modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia de Sistemas

Orientador: Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn

Versão corrigida

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Dias Pereira , Carina
Investigação sobre a ocorrência de reprogramação fetal no desenvolvimento do pâncreas endócrino em modelo animal de diabetes mellitus tipo 1 / Carina Dias Pereira ; orientadora Telma Maria Tenório Zorn. -- São Paulo, 2019.
73 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Diabetes Mellitus tipo 1. 2. Matriz Extracelular. 3. Reprogramação Fetal. 4. Biologia do Desenvolvimento.. 5. Histologia. I. Tenório Zorn, Telma Maria , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carina Pereira Dias

Titulo da Dissertação/Tese: Investigação sobre a ocorrência de reprogramação fetal no desenvolvimento do pâncreas endócrino em modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 1

Orientador: Telma Maria Tenório Zorn

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Investigação da ocorrência de reprogramação fetal no desenvolvimento do pâncreas endócrino provocada pelo Diabetes Mellitus tipo 1 materno em um modelo de camundongo***", registrado sob o protocolo nº ***111/2016***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***26/09/2016*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Telma Maria Tenório Zorn***
- Departamento: *Biologia Celular e do Desenvolvimento*
- Membros da Equipe: *Mychel Raony Teixeira Paiva de Morais (Pós-graduando), Carina Pereira Dias (Pós-graduando), Rodolfo Favaro Ribeiro (Pós-doutorando), Fernanda Ângela Correia Barrence (Técnico de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico *www.icb.usp.br/ceua*. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Investigation of the fetal programming process during endocrine pancreas development promoted by maternal type-1 diabetes mellitus in a mice model***", protocol nº ***111/2016***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***9/26/2016*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Telma Maria Tenório Zorn***
- Team members: *Mychel Raony Teixeira Paiva de Morais (Graduate Student), Carina Pereira Dias (Graduate Student), Rodolfo Favaro Ribeiro (Postdoctoral Researcher)), Fernanda Ângela Correia Barrence (Laboratory Technician).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*Swiss*	*Fêmea/female*	*2 meses/months*	*100*

São Paulo, 04 de outubro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

“Dedico esse trabalho a Deus que me guia com sua poderosa mão me dando forças, sabedoria e paciência. Dedico a Ele por sempre direcionar minha vida e fazer maravilhas por mim. Serei eternamente grata por Tê-lo em meu coração e por me proporcionar as maiores alegrias da vida, sendo uma delas a conclusão deste trabalho. Sem Ele, nada sou!”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me fazer lembrar quão bela a vida é, e os difíceis, para proporcionar um crescimento pessoal singular. Transformar sentimentos em palavras não é uma tarefa fácil, escrevê-los, tão pouco, mas tentarei expressar meus sinceros agradecimentos uma vez que cada um foi essencial para a realização e conclusão desse trabalho.

Primeiramente agradeço a **Deus** por me auxiliar em todos os momentos, por não me deixar desanimar, por estar ao meu lado nessa trajetória e ser sempre o meu refúgio.

Aos meus pais **Naide e Celio**, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Por buscarem compreender a necessidade da minha dedicação para a realização desse trabalho. Por todas as orações realizadas a Deus por mim, para que eu prosseguisse o caminho escolhido, tenho certeza de que foram muitas. Ao Meu irmão **Eduardo** que sempre esteve presente, acreditando em mim.

Aminha estimada orientadora Profa. Dra. **Telma Maria Tenório Zorn** pela oportunidade de fazer parte do LBR&MEC e por partilhar sua experiência comigo. Por apostar no meu potencial, me incentivar, me orientar e acreditar no meu trabalho.

Ao colega **Mychel Raony Teixeira Paiva de Morais** que me ensinou, me auxiliou, participou de todo o desenvolvimento desse trabalho, contribuindo com seu conhecimento. Muito obrigada!

A **Fernanda Ângela Correia Barrence** por todos os ensinamentos técnicos, pelas dicas, pelas broncas quando necessárias e por estar sempre presente. De coração, obrigada!

A minha querida IC **Camila Balbino da Silva**. Obrigada por sempre me ajudar e por me deixar aprender com você.

Aos colegas e amigos que conquistei durante esse período, por dividirem suas histórias, por tornarem os meus dias mais divertidos. Por se preocuparem comigo, por confiarem em mim e por compartilharem seus anseios. Foi muito bom ter vocês por perto, em

especial **Ana Carolina Lima Ralph, Lucas Barbosa Rossetti, Janaina Alessandra da Silva, Laís Mendes**, **Rafaela Mendonça** e **Elói Matias.**

Aos alunos do laboratório da Matriz Extracelular que sempre quando necessário sanaram minhas dúvidas, além das boas risadas nos momentos de descontração.

A todos os alunos, funcionários e professores do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, especialmente ao professor **Paulo Abrahamsohn** que esteve próximo me permitindo absorver um pouco do seu vasto conhecimento em histologia e escrita cientifica.

A professora **Fernanda Ortis** por aceitar participar da Banca do meu Exame de Qualificação, por me disponibilizar sua experiência e conhecimento científicos e por participar da conclusão desse trabalho. Aos seus alunos **Caroline, Carolina, Catharina e Angelo** que compartilharam comigo suas descobertas e sempre foram muito gentis.

As minhas amigas, **Diana** e **Camila** que não deixaram o tempo esfriar nossa amizade e sempre se importaram comigo. A minha amigona **Renatinha**, que sempre me levantou e disse que eu era capaz quando nem mesmo eu acreditava. A **Vanilza** pelos conselhos, as minhas primas **Dayane** e **May** que sempre me incentivaram e mesmo por vezes eu estando longe devido aos obstáculos do dia a dia, não desistiram de mim.

A todos os meus amigos, os de mais perto, os de mais longe, que direta ou indiretamente me ajudaram e apostaram em mim e que com palavras mostraram carinho e incentivo. Como são muitos amigos (oh! como sou abençoada!), não escreverei todos os nomes para não correr o risco de esquecer alguém.

E como agradecer a minha amiga Andromeda? A amiga que ganhei na graduação e que levarei para toda a vida. Muito obrigada por participar dessa trajetória comigo do início ao fim. Sempre contei com seu apoio, incentivo e amizade. Mesmo com a rotina pesada, você sempre apareceu nas horas em que mais precisei, nem que fosse apenas para um café. Animou-me e escutou-me nos momentos em que ninguém mais poderia. De coração, muito obrigada por ser essa amiga!

A Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento e ao LBR&MEC por me proporcionar um aprimoramento gratuito e excelente.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

Agradeço ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo 3/0667/2017 -8 nº12/2017 pelo auxílio financeiro que proporcionou ao LBR&MEC a infraestrutura adequada, insumos necessários e equipamentos modernos para a realização desse trabalho.

"E o futuro é uma astronave que tentamos pilotar, não tem tempo nem piedade, nem tem hora de chegar. Sem pedir licença muda a nossa vida, depois convida a rir ou chorar. Nessa estrada não nos cabe conhecer ou ver o que virá. O fim dela ninguém sabe bem ao certo onde vai dar. Vamos todos numa linda passarela de uma aquarela que um dia, enfim, descolorirá".

Vinícius de Moraes, Toquinho (1983) (1)

RESUMO

DIAS, C. Investigação sobre a ocorrência de reprogramação fetal no desenvolvimento do pâncreas endócrino em modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 1 [dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas; Universidade de São Paulo, São Paulo; 2019.

Várias evidências, incluindo as originadas de estudos anteriores do LBR&MEC, sugerem que condições adversas durante o desenvolvimento intrauterino promovam alterações moleculares e estruturais em órgãos e sistemas vitais podendo comprometer o seu funcionamento no indivíduo adulto. A hiperglicemia é um fator que influencia negativamente o desenvolvimento fetal, modificando processos biológicos importantes, como o padrão de síntese e deposição dos componentes da matriz extracelular (MEC). A MEC participa diretamente do processo de ramificação e morfogênse do pâncreas, e pouco é conhecido a respeito dos efeitos da hiperglicemia materna sobre a MEC desse órgão durante seu desenvolvimento. Investigamos por meio de imuno-histoquímica como a hiperglicemia materna severa modifica a distribuição de panlaminina, das cadeias α1 eγ1 das lamininas e da integrina α3, moléculas da MEC que desempenham um papel chave na diferenciação do pâncreas endócrino. Avaliamos o perfil proliferativo das células presentes nas ilhotase ainda, a distribuição das células α e β por meio da marcação de glucagon e insulina no pâncreas de fetos de 19 dias. Analisamos por RT-qPCRa expressão dos fatores de transcrição *Pdx1* e *Pax4* que controlam o desenvolvimento e diferenciação das células β pancreáticas. O modelo utilizado foi o de gestação complicada por diabetes *mellitus*do tipo 1 (DM1), desenvolvido por nosso grupo, quimicamente induzido por aloxana sem tratamento de reposição insulínica, em camundongos. Observamos que a marcação de panlaminina e das cadeias α1 e γ1 das lamininas é mais fraca no pâncreas endócrino dos fetos de mães hiperglicêmicas, quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, vimos um aumento na deposição da integrina α3 na membrana basal das ilhotas pancreáticas dos fetos gerados sob condições de hiperglicemia materna. O índice proliferativo das células endócrinas, observado por imuno-histoquímica para PCNA, também é menor nesse grupo. Observamos um aumento da área de ilhotas fetais imunomarcadas para a insulina, indicando aumento na massa de células β nessas ilhotas, enquanto que a área imunomarcada para glucagon estava com marcação menos intensa no grupo experimental comparado ao controle. Identificamos que aexpressão relativa de *Pdx1* é menor no pâncreas do grupo experimental comparado a expressão nos animais do grupo controle, enquanto a expressão de *Pax*4 está aumentada. Concluímos por meio de nossas abordagens histoquímicas que a hiperglicemia materna altera a morfogênese do pâncreas endócrino fetal modificando o

padrão de deposição de moléculas da membrana basal peri-ilhotas, promovendo uma diminuição da atividade proliferativa das células endócrinas, associada a alterações na expressão de fatores de crescimento importantes para o estado diferenciado e proliferativo das células β. Essas células apresentam aumento da massa funcional identificada pelo aumento da deposição de insulina no tecido pancreático.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes *Mellitus* tipo 1. Matriz Extracelular**.** Reprogramação Fetal. Histologia. Biologia do Desenvolvimento.

ABSTRACT

DIAS, C. Research about occurrence of fetal reprogramming in the development of endocrine pancreas in animal model of type 1 diabetes *mellitus* [dissertation (Master´s degree in System Biology)], Institute of Biomedical Sciences; University of São Paulo, São Paulo; 2019.

Previous studies from our lab and others have shown that adverse conditions during intrauterine development promotes molecular and structural changes in vital organs and systems which may alter on their function in the adult individuals. Hyperglycemia impacts on fetal development by modifying important biological processes, such as the pattern of synthesis and deposition of extracellular matrix (ECM) components. ECM cooperates in pancreatic branching and morphogenesis and little is known about the effect of maternal hyperglycemia on the pancreas' ECM during development. We investigate through immunohistochemistry, how severe maternal hyperglycemia modifies the distribution of panlaminin, lamininsα1 and γ1 chains and integrin α3, ECM molecules that play a key role in the differentiation of the endocrine pancreas. We evaluate the proliferative index of islet cells and, α and β cells distribution, by glucagon and insulin fetal (E19.0) pancreas staining. We analyzed by RT-qPCR the expression of the *Pdx1* and *Pax4* transcription factors that control the development and differentiation of pancreatic β cells. The model used was created by our group, a pregnancy model complicated by type 1diabetes *mellitus* (T1D) chemically induced by alloxan without treatment of insulin replacement, in mice. We observed that the labeling of panlaminin and laminins α1 and γ1 chains is weaker in the endocrine pancreas of the fetuses from hyperglycemic mothers. On the other hand, integrin α3 deposition increased in the basement membrane of the pancreatic islets of the fetuses generated under maternal hyperglycemia. Immunohistochemistry for PCNA showed lower proliferative index of endocrine cells. There was an increase in the area of immunolabeled fetal islets indicating an increase in β-cell mass in these islets; whereas the glucagon-immunolabeled area was smaller in the experimental group compared to the control group. The relative expression of *Pdx1* was lower in the pancreas from the experimental group, and the *Pax4* expression was increased. We conclude from our histochemical approaches that maternal hyperglycemia alters fetal endocrine pancreas morphogenesis by modifying the pattern of peri-islet basement membrane molecules, promoting a decrease in endocrine cell proliferative activity associated with changes in the expression of important growth factors for the differentiated and proliferative state of the β-cells. These cells have increased functional mass identified by increased insulin deposition in pancreatic tissue.

KEY WORDS: Type 1 Diabetes *Mellitus.* Extracellular Matrix. Fetal Reprogramming. Histology. Development Biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das principais características da Hipótese do "fenótipo poupador". 28
Figura 2 - Representação esquemática da ilhota pancreática e da Matriz extracelular peri-ilhota 30
Figura 3 -Representação esquemática simplificada da participação da MEC no desenvolvimento do pâncreas endócrino..... 33
Figura 4 - Representação esquemática das lamininas 35
Figura 5 - Representação esquemática das integrinas..... 35
Figura 6 - Caracterização do grupo experimental: indução de diabetes e acasalamento 41
Figura 7 - Análise da viabilidade fetal e parâmetros do desenvolvimento 46
Figura 8 - Características morfológicas do pâncreas fetal (19º dias) 48
Figura 9 - Pâncreas fetal corado pelo ácido periódico de Schiff (PAS)..... 49
Figura 10 - Imunolocalização de lamininas e da integrina α3 no pancreas de fetos de 19 dias.....50
Figura 11-Avaliação da proliferação de células das ilhotas pancreáticas fetais por imunolocalização de PCNA.....51
Figura 12 - Análise da massa de células α e β pancreáticas fetais por imunomarcação de glucagon einsulina 53
Figura 13 - Análise da expressão relativa de *Pdx1* e *Pax4* em pâncreas fetal de 19 dias 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Resumo dos anticorpos utilizados nas imunohistoquímicas com suas diluições, recuperação antigênicas e anticorpo secundário com o fator de diluição 44

Tabela 2 -Sequência dos primers utilizados no estudo.....45

Tabela 3 -Média ± erro padrão da média das dimensões corpóreas, glicemia, quantidade de fetos efetos viáveis 47

Tabela 4 -.Média ± erro padrão da médiada porcentagem de área marcada referente às proteinas damembrana basal peri-ilhotas analisadas no pâncreas fetal de 19 dias..... 55

LISTA DE ABREVIATURAS

DM- Diabetes *mellitus*

DM1- Diabetes *mellius* tipo 1

DM2- Diabetes *mellitus* tipo 2

DMG- Diabetes *mellitus* Gestacional

LBR&MEC- Laboratório da Biologia da Reprodução e Matriz Extracelular

MEC- Matriz Extracelular

MB- Membrana Basal

PP-Polipeptídeo Pancreático

LISTA DE SIGLAS

HE - Hematoxilina e Eosina

Cx36 - Gap junction protein

GLUT - Transportador de glicose

HRP - Horsearadishperoxidase

IDF- International Diabetes Federation

IgG - Imunoglobulina G

MafA -Fator de transcrição MAFA

Neurod -Neuronal Differentiation 1

Ngn3 - Neurogenin 3

Nkx2.2 - Nk2 homeobox 2

Nkx6 - Nk6 homeobox 1

PAS - Periodic acid-Schiff

Pax4 - Paired box gene 4

PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen

Pdx1 -Pancreatic and duodenal homeobox 1

Rpl7 –RibosomalProtein L7

RT Qpcr - Quantitative reverse transcriptionPCR

TGF β - Fator de transformação do crescimento beta

LISTA DE SÍMBOLOS

α -Alfa

β -Beta

γ - Gama

δ -Delta

ε - Épsilon

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
2 REVISÃO DE LITERATURA 24
2.1. Diabetes mellitus 24
2.1.1 Diabetes *mellitus* do tipo 1 24
2.1.1.1 Diabetes *mellitus* do tipo 2 25
2.1.1.1.1 Diabetes gestacional 25
2.2 Diabetes e o desenvolvimento 26
2.2.1 Teoria da reprogramação fetal 27
2.2.2 Pâncreas 28
2.2.2.2 Ilhotas de Langerhans 29
2.2.2.2.2 Células β 30
2.3. Desenvolvimento Pancreático 31
2.4 Matriz extracelular 33
2.4.1 Matriz extracelular e o desenvolvimento pancreático 36
2.4.1.1 Laminina 111 36
2.4.1.1.1 Integrina α3 36
2.5 Justificativa para o desenvolvimento deste trabalho 37
3 OBJETIVOS 39
3.1 Objetivos específicos 39
4 MATERIAIS E MÉTODOS 40
4.1 Animais 40
4.1.1 Indução do diabetes 40
4.1.1.1 Acasalamento 40
4.1.1.1.1 Análise das dimensões corpóreas e glicemia fetal 41
4.2 Coleta do tecido para análises histológicas 41
4.3 Quantificação e avaliação das dimensões das ilhotas fetais 42
4.4 Imunolocalização de glicoproteínas de membrana basal 42
4.5 Imunodetecção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) 43
4.6 Imunoavaliação dos hormônios glucagon e insulina em pâncreas fetal 43
4.7 Avaliação da expressão de *Pdx1* e *Pax4* por RT- qPCR 44

5 RESULTADOS **46**

5.1 A hiperglicemia materna induz hiperglicemia fetal, modifica a simetria do crescimento intra-uterino e diminui a quantidade de fetos viáveis **46**

***5.2* A hiperglicemia materna promove modificação no tamanho e morfologia das ilhotas pancreáticas fetais** **47**

5.3 A hiperglicemia materna modifica o padrão de deposição de polissacarídeos no pâncreas fetal. **48**

5.4 A hiperglicemia materna diminui a deposição de panlaminina, das cadeias α1 e γ1 da laminina e aumenta a deposição de integrina a3 no pâncreas de fetos pré-termo **49**

5.5 A hiperglicemia materna afeta a proliferação das células endócrinas do pâncreas fetal **51**

5.6 A hiperglicemia materna promove modificações na massa funcional das células β pancreáticas fetais **52**

5.7 A expressão relativa dos genes *Pdx1* e *Pax4* fetais não sofrem alterações significativas pela hiperglicemia materna **54**

6 DISCUSSÃO **55**

7 CONCLUSÃO **60**

REFERÊNCIAS **61**

ANEXO(S) **72**

1 INTRODUÇÃO

O pâncreas é uma glândula mista essencial para o metabolismo de nutrientes. Possui uma porção exócrina, composta por acinos que secretam enzimas digestivas e por uma porção endócrina, formada pelas ilhotas pancreáticas que abrigam as células α, β, γ, ε e PP responsáveis pela homeostase da glicose (2). Em camundongos, o desenvolvimento pancreático torna-se morfologicamente evidente em torno do 9º dia embrionário, quando a superfície epitelial começa a se formar, alongando-se em ramos. A Matriz extracelular (MEC) participa diretamente do processo de morfogênese do pâncreas promovendo adesão das células precursoras pancreáticas, e pela interação de seus componentes com vias de sinalização importantes para a diferenciação e proliferação celular (2).

O Retardo de crescimento intrauterino é uma alteração frequente em modelos murinos de gestação complicada por diabetes. De modo geral, os fetos apresentam baixo peso corpóreo e menor volume pancreático, embora a porcentagem de tecido endócrino esteja aumentada, o que pode ser considerado um quadro de insuficiência pancreática (3).

Esses fenômenos adaptativos são considerados mecanismos de reprogramação fetal (4). A teoria da reprogramação do desenvolvimento embrionário e fetal foi postulada por David J. Baker no início dos anos 90 (4). Por meio de um estudo *coorte*, Baker mostrou que filhos de mães malnutridas no período perinatal, têm maior predisposição a desenvolver doenças cardiovasculares e metabólicas ao longo da vida adulta, devido a mecanismos adaptativos adotados durante a vida intrauterina para garantir sua sobrevivência (4). Barker também correlacionou o surgimento de hiperinsulinemia e resistência à insulina em indivíduos adultos ao diabetes materno, indicando que essa doença pode estimular a reprogramação nos fetos (4).

O Diabetes *mellitus* (DM) é caracterizado pela hiperglicemia ocasionada por defeitos na secreção e/ou ação da insulina nas células alvo (3). São classificados três tipos principais, sendo eles: Tipo 1 (DM1), Tipo 2 (DM2) e Diabetes Gestacional (DMG) (5)(6)(7).O desenvolvimento e a progressão dos três tipos de diabetes apresentam componentes genéticos, porém, fatores ambientais também estão intimamente relacionados à disfunção e/ou morte das células β pancreáticas produtoras de insulina (7). O DM1 tem baixa prevalência, mas aproximadamente 86.000 individuos desenvolvem essa doença a cada ano mundialmente (7). Em decorrência da hiperglicemia crônica podem ocorrer sérias complicações, dentre elas desordens reprodutivas e comprometimento da organogênese em fetos gerados por mães hiperglicêmicas (7)(8). A MEC participa diretamente da morfogênese, ramificação e do comportamento celular do pâncreas em desenvolvimento (9).As lamininas111, 211, 221, 411

e 421 presentes na MEC pancreática de roedores são essenciais para a adesão e proliferação, como também para a secreção de insulina pelas células β (10). Já a integrina α3 atua como receptor para lamininas e desempenha um papel essencial no desenvolvimento das células β regulando sua sobrevivência e função (11).

Dada a importância da MEC para o desenvolvimento e função adequados do pâncreas (12) e sabendo que o DM1 é uma condição que pode influenciar o desenvolvimento fetal alterando os componentes de MEC (12)(13)(14), hipotetizamos que a hiperglicemia materna poderia modificar a deposição das cadeias α1 e γ1 das principais lamininas presentes no pâncreas fetal, assim como da integrina α3 no pâncreas endócrino dos fetos, e ter impacto na expressão de fatores de transcrição importantes para a diferenciação e proliferação de células β pancreáticas fetais, como *Pdx1* e *Pax4*.

Nossa hipótese foi investigada em pâncreas de fetos de camundongos de 19 dias provindos de um modelo de gestação complicada por hiperglicemia, tipo DM1 de curto prazo (30-50 dias) quimicamente induzido sem reposição insulínica (13)(15)(16).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.Diabetes mellitus

A glicose é a principal fonte de energia e é essencial para o funcionamento dos sistemas orgânicos (17). Em indivíduos saudáveis em jejum, os níveis de glicose sanguínea variam entre 70 a 99 mg/dL. Essa regulação, é mantida principalmente por hormônios produzidos pelo pâncreas, com destaque para a insulina, peptídio secretado pelas células β pancreáticas presentes nas ilhotas de Langerhans, que atua como facilitador na captação de glicose pelos tecidos responsivos, regulador do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas e fator de crescimento por seus efeitos mitogênicos (18).

O Diabetes *mellitus* (DM) é caracterizado pelos altos níveis de glicose sanguínea, causada por defeitos na secreção e/ou ação da insulina nas células alvo (18). Esse distúrbio insulínico provoca alterações metabólicas caracterizadas principalmente pela hiperglicemia crônica, levando ao comprometimento de órgãos e sistemas, conforme o tempo e progressão da doença (19)(20)(21).

O DM é uma das doenças que apresentam maior crescimento em número de casos nos últimos anos em vários países, principalmente nos países em desenvolvimento (22). A ausência de hábitos alimentares saudáveis, aumento do sedentarismo, obesidade, adoção de novos estilos de vida, crescimento e envelhecimento da população entre outros fatores, têm contribuído para o aparecimento e prevalência da doença (23). No ano de 2000, o número de adultos jovens com idade entre 20 e 30 anos com DM era de aproximadamente 171 milhões (22). Estudos demonstraram que a estimativa para o ano de 2025 é de 334 milhões de pessoas com diabetes em todo o mundo (22). Enquanto isso, no Brasil no ano de 2017, o número de indivíduos com diabetes dentre as idades de 20 a 79 anos foi avaliado em 12,5 milhões, com previsão de chegar a 20,3 milhões em 2045 (24).

Existem diferentes tipos de DM, que podem ser classificados de acordo com sua etiologia, as principais formas de DM são:DM do tipo 1 (DM1),DM do tipo 2 (DM2) e o DM gestacional (DMG) (17).

2.1.1 Diabetes *mellitus* do tipo 1

O quadro de hiperglicemia visto nesse tipo de DM é devido a baixa ou escassa produção de insulina após a morte das células beta pancreáticas (17). Essa deficiência insulínica ocorre depois da destruição das células β pelo sistema imunológico. O indivíduo

pode desenvolver DM1 em qualquer fase da vida, mas a prevalência para o aparecimento da doença é na infância e adolescência (21).

O número de casos de DM1 é menor comparado ao DM2, porém, segundo a Federação Internacional de Diabetes, em 2014 havia 387 milhões de indivíduos com diabetes em todo o mundo, dos quais aproximadamente 10% desses foram diagnosticados com DM1, sendo que 480.000 eram crianças (5)(25)(26)(27).

Ainda não se conhece exatamente todos os mecanismos que levam a destruição das células β e consequente instalação do DM1, mas, alguns fatores como a predisposição genética, hereditariedade, infecções virais, exposição a toxinas, dieta, vacinas e fatores ambientais parecem estar envolvidos com o desenvolvimento do ataque autoimune contra as células β pancreáticas (28)(29)(30). A destruição autoimune dessas células é marcada pela presença de auto anticorpos para células das ilhotas, para a insulina, ácido glutâmico descarboxilase, proteína 2 associada ao insulinoma e transportador 8 de zinco, e acontecem em 2 fases (31). No primeiro momento de destruição, de forma simplificada, evidencia-se a presença de infiltrado linfocitário composto por células TCD4 e TCD8, linfócitos B e macrófagos na região das ilhotas, caracterizando um quadro de insulite (32). Na segunda fase, a destruição celular é mais significativa, pois, além da liberação de substâncias que estimulam a apoptose das células β, ocorre o recrutamento de novos grupos celulares do tipo T com fenótipos agressivos, que se direcionam ao loco inflamatório inicial e promovem a destruição das células restantes (32)(28).

2.1.1.1 Diabetes *mellitus* do tipo 2

DM2 corresponde a aproximadamente 90% dos casos de DM no mundo, com maior incidência em adultos (33).

A hiperglicemia do DM2 decorre de um quadro de resistência à insulina promovida por alterações na via de sinalização desse hormônio (34)(35). Essa resistência diminui o transporte de glicose para as células alvo, como as células hepáticas, musculares e adiposas, elevando os níveis de glicose circulantes. Para manter os níveis glicêmicos normais, as células β são estimuladas a produzir maior quantidade de insulina (hiperinsulinemia compensatória), porém, a alta demanda na produção de insulina pode levar essas células a disfunção e ou morte, inviabilizando a produção de quantidades suficientes do hormônio para a manutenção dos níveis glicêmicos normais (36).

2.1.1.1.1 Diabetes gestacional

A etiologia do DMG é semelhante ao DM2, ocorrendo devido a diminuição da sensibilidade a insulina observada durante o período gestacional, podendo ou não continuar após o parto (37). A resistência a insulina observada em gestantes ocorre em consequência da produção aumentada de alguns hormônios importantes para a gravidez, mas que atuam também como contra reguladores insulínicos como: lactogênico placentário, cortisol, estrógeno, progesterona e prolactina. Dessa forma o organismo materno mantém os níveis de glicose suficientes para atender as necessidades do embrião/feto em desenvolvimento. Como no DM2, caso essa resistência não seja compensada pelo aumento da secreção de insulina pelas células β, haverá a hiperglicemia materna (37)(38)(39).

2.2 Diabetes e o desenvolvimento

Gestações hiperglicêmicas estão associadas a um alto índice de perdas embrionárias, malformações, partos prematuros, pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intrauterino, macrossomia e comprometimento do desenvolvimento embrionário (40)(41). Por exemplo, gestações humanas com DM1 severo com presença de vasculopatia, apresentam placentas e fetos pequenos e mais leves comparados a gestações de mulheres normoglicêmicas, enquanto que na ausência de vasculopatia, os fetos são maiores quando comparados com os controles, semelhante ao apresentado em gestações de mulheres com DM2 ou DMG (41). Já em modelos de DMG em ratos, o quadro apresenta-se inverso, visto que o retardo de crescimento intrauterino é uma alteração frequente nesse modelo de diabetes (3).

Essas informações sugerem que embora o crescimento fetal seja estimulado por vários mecanismos, incluindo o aumento da concentração de insulina em resposta a glicose materna (macrossomia), as complicações associadas ao DM variam conforme o tipo, progressão da doença e controle glicêmico, e podem modificar o padrão de desenvolvimento dos fetos, como é o caso da presença de vasculopatia, que está relacionada a restrição do crescimento fetal, por dificultar o transporte de oxigênio e nutrientes pela placenta, embora haja abundante oferta de glicose (42).

Além dessas alterações, o diabetes materno promove modificações no desenvolvimento embrionário/fetal, que podem levar a complicações na vida adulta (41)(43). Órgãos importantes como rins e coração são afetados pela hiperglicemia materna, nos quais modificações estruturais são observadas, como por exemplo,o espessamento da túnica íntima da aorta, o aumento da massa ventricular, espessamento das membranas basais glomerulares, além de perturbações neuroendócrinas (44)(45)(46). Esse conjunto de alterações adaptativas promovidas pela hiperglicemia materna é indicativo de reprogramação fetal (43)(47)(48).

2.2.1 Teoria da reprogramação fetal

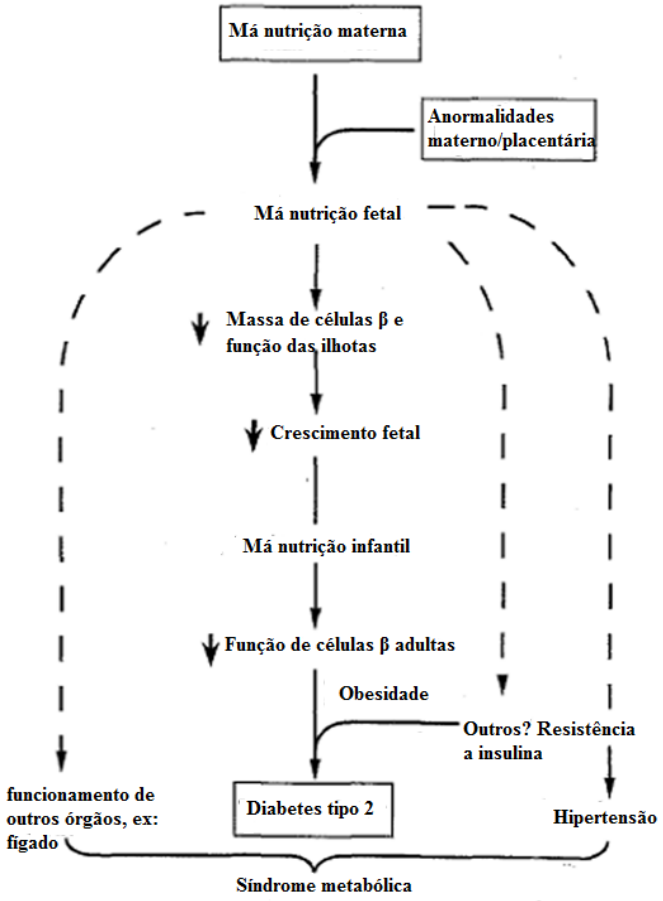
A teoria da reprogramação fetal, assim intitulada em 1996, tem como base estudos epidemiológicos de coorte retrospectivos realizado pelo pesquisador David Barker utilizando dados de indivíduos que morreram por doenças coronarianas entre os anos 1968 a 1978 em países Europeus (4)(49). Essa teoria propõe que o ambiente intrauterino adverso pode estimular mudanças epigenéticas no desenvolvimento do feto, que o auxiliam na adaptação ao ambiente em que está exposto, como forma de reprogramação. Essas modificações benéficas durante o desenvolvimento intrauterino, após o nascimento podem o predispor a complicações no decorrer do desenvolvimento pós-natal e na vida adulta, dependentes do ambiente (4)(49)(50)(51)(52).

Em suas pesquisas, Barker correlacionou mortes por doenças coronarianas de indivíduos que haviam sido expostos a desnutrição materna no período embrionário (4). Barker e seus colaboradores também associaram o desenvolvimento de doenças metabólicas em indivíduos adultos que apresentaram baixo peso ao nascer devido as condições físicas/nutricionais das mães no momento da gestação (4). A partir desses estudos, originou-se a hipótese do “Fenótipo Poupador”(Figura 1), a qual propõe que o feto é capaz de se adaptar a um ambiente intrauterino com poucos suprimentos energéticos. Esse processo adaptativo, entretanto, pode levar ao favorecimento metabólico de órgãos nobres em detrimento de outros, promovendo alterações pertinentes no crescimento e função dos tecidos, as quais irão implicar no aparecimento de doenças no indivíduo (4).

Atualmente esses conceitos estão bem consolidados na literatura tanto por meio de evidências epidemiológicas quanto experimentais utilizando modelos animais, que mostraram que sistemas metabólicos, endócrinos, imunes, e órgãos importantes podem ter seu desenvolvimento afetado por condições externas relacionadas a mãe durante o período gestacional (53)(54)(55)(56).

O pâncreas é um órgão que pode sofrer modificações por meio de adversidades durante o desenvolvimento, como por exemplo, pela exposição a hiperglicemia do DM (3). Proles geradas por mães diabéticas apresentam alterações pancreáticas fenotípicas como diminuição do peso pancreático com aumento da porcentagem de tecido endócrino, além de hiperplasia e hipertrofia das células endócrinas, principalmente de células β (3).

Figura 1. Representação esquemática das principais características da Hipótese do "fenótipo poupador".



Referência à etiologia do DM 2 e descrição sugestiva de que a síndrome metabólica pode ter origens relacionadas às falhas no crescimento e desenvolvimento embrionário/fetal. Fonte: Adaptado de Hales CN, Barker DJ, et al (1992).

2.2.2 Pâncreas

O pâncreas é um órgão fusiforme localizado retroperitonealmente no quadrante superior esquerdo do abdômen, atrás do estômago, sendo divido em cabeça, corpo, colo e calda (57)(58)(59).

É um órgão com dupla funcionalidade possuindo em seus lobos porções de secreção exócrina e endócrina, do qual a primeira corresponde de 96 a 99 % do volume total do órgão (57). A porção exócrina tem função digestória e é composta por células piramidais, que formam clusters (acinos), envolvidos na síntese e secreção de várias enzimas (59). A porção pancreática endócrina tem como função a produção de hormônios atuantes na homeostase

glicêmica, representa de 1 a 4 % do volume pancreático e é formada pelas ilhotas de Langerhans (60).

2.2.2.2 Ilhotas de Langerhans

A ilhota de Langerhans é uma estrutura com morfologia oval ou arredondada com distribuição por todo o pâncreas em meio aos acinos e em maior quantidade na porção caudal (59). É constituída de 5 tipos celulares, sendo: células α produtoras de glucagon, β produtoras de insulina, γ que sintetizam somatostatina, ε grelina e por células PP que sintetizam o polipeptídeo pancreático (2)(12).

A organização histológica e a disposição das células nas ilhotas sofrem modificações conforme o desenvolvimento e a maturação do pâncreas endócrino (61), enquanto que em animais com diabetes, alterações na morfologia e na citoarquitetura das ilhotas também são observadas (62)(63).

Ilhotas de murinos possuem morfologia e distribuição celular diferente das humanas (64). Na maioria das ilhotas humanas, há contato íntimo entre células α e β que estão espalhadas dentro da ilhota, enquanto que em roedores, essas células têm menor contato, pois, as células β estão localizadas centralmente enquanto as α, na periferia das ilhotas (64)(65).

Estudos mostram que as células α podem estimular a função das células β (66). Diante desse aspecto correlacionado a morfologia dessas ilhotas, acredita-se que esse seja um dos motivos pelos quais ilhotas humanas são mais sensíveis à glicose em comparação as ilhotas dos murinos (66). Além disso, em roedores, há ilhotas compostas somente por células β e outras por células não beta, diferente do que ocorre com as ilhotas humanas, que tem uma distribuição das células endócrinas nas ilhotas de forma mais homogênea (66).

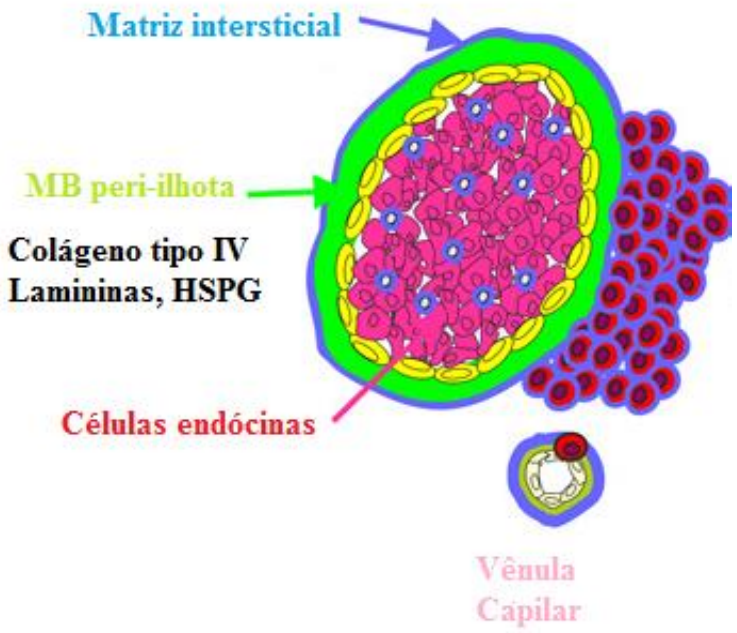
As ilhotas são muito vascularizadas e recebem mais sangue que a porção exócrina do pâncreas (67). Dependendo do tamanho da ilhota, 1 a 5 arteríolas participam da irrigação e se dividem em capilares fenestrados formando uma rede capilar (68)(67). Acredita-se que em camundongos, a irrigação dessas ilhotas seja realizada da periferia para o centro, do centro para a periferia ou de um polo para o outro da ilhota (69)(70)(71).

As ilhotas são ricamente inervadas pelos sistemas parassimpáticos, simpáticos e sensitivos (72)(73)(74). Embora esses nervos não façam sinapses com células alvo nas ilhotas, seus neurotransmissores regulam a secreção de insulina, assim como dos demais hormônios, permitindo que elas funcionem como uma unidade (72)(73)(74).

Além da rica vascularização e da inervação dessas ilhotas, a matriz extracelular também desempenha papel importante na manutenção da estrutura, sobrevivência e

proliferação das ilhotas (75). A MEC separa as ilhotas do tecido exócrino por uma cápsula (MB peri-ilhota), composta por duas camadas de membrana basal no qual ao meio delas encontram-se fibroblastos e fibras de colágeno (76). Além disso, permite a comunicação das células das ilhotas com o tecido adjacente por meio da interação de seus componentes (75)(77).

Figura 2. Representação esquemática da ilhota pancreática e da membrana basal peri-ilhota



A MB é predominante no pâncreas circundando os ácinos, os vasos sanguíneos e as ilhotas, enquanto a matriz intersticial é limitada nesse órgão. Fonte: Adaptado de Bogdani M, et al (2014) (78).

2.2.2.2.2 Células β

A célula β é a mais numerosa das células dentro das ilhotas, correspondendo a 50-70% das células endócrinas no pâncreas humano e 60-80% em camundongos, já as células α, correspondem 20-40% nas ilhotas humanas e 10 a 20% em camundongos (79). As demais células estão em menor número, representando menos de 5% das células endócrinas dos roedores (79)(80)(81). No período embrionário/fetal essas células sofrem diferenciação, porém, somente após o período pós-natal passam por processos de maturação e são capazes de respostas eficazes às alterações de glicose (82)(83)(84). Alguns fatores de transcrição como *MafA, Pdx-1, Neurod1* regulam o processo de maturação e diferenciação dessas células (85).

Após maturação, elas passam a se proliferar dentro das ilhotas promovendo aumento de sua massa (86). Dados mais recentes baseados em rastreamento genético mostraram que as células β pré-existentes são a principal fonte de novas células (82)(87), enquanto que outros estudos afirmam que a neogênese também é um evento importante para a expansão da massa de células β (86). Já no caso de danos, algumas teorias baseadas em estudos histológicos defendem o processo proliferativo das células β por meio da diferenciação de células tronco residentes nos ductos pancreáticos, dentro das ilhotas e medula óssea por transdiferenciação de células acinares em células endócrinas (88)(89).

Além dos estudos sobre a maturação e proliferação das células β, esforços para elucidar os mecanismos de diferenciação dessas células tem sido aplicados diante da crescente oportunidade de terapia celular para tratamento do diabetes, por meio de transplantes de ilhotas (90). Os mecanismos de diferenciação dessas células é altamente complexo e exige a participação de diversos genes como *Ngn3, Nkx2.2* e *Nkx61*, proteínas transportadoras de glicose 2 (GLUT2), *MafA,Cx36 e Pax4*, sendo esse último expresso principalmente por células com comprometimento endócrino e que se diferenciarão em células β ou δ (91)(92)(93)(94).

2.3. Desenvolvimento Pancreático

O Pâncreas forma-se a partir de duas evaginações do revestimento duodenal (12)(95). Em camundongos, a expressão de *Pdx1*, por volta do 8° e 9° dia embrionário sinaliza as células do endoderma a se diferenciarem nos primeiros brotos pancreáticos (96)(97).

O primeiro sinal de ramificação do pâncreas se torna aparente no embrião em desenvolvimento quando a superfície epitelial começa a se formar, alongando-se em ramos (12). Em roedores essas ramificações são vistas por volta do 11º dia de gestação, e no 15º dia o pâncreas endócrino desses animais já apresenta secreção de insulina pelas células β (98).

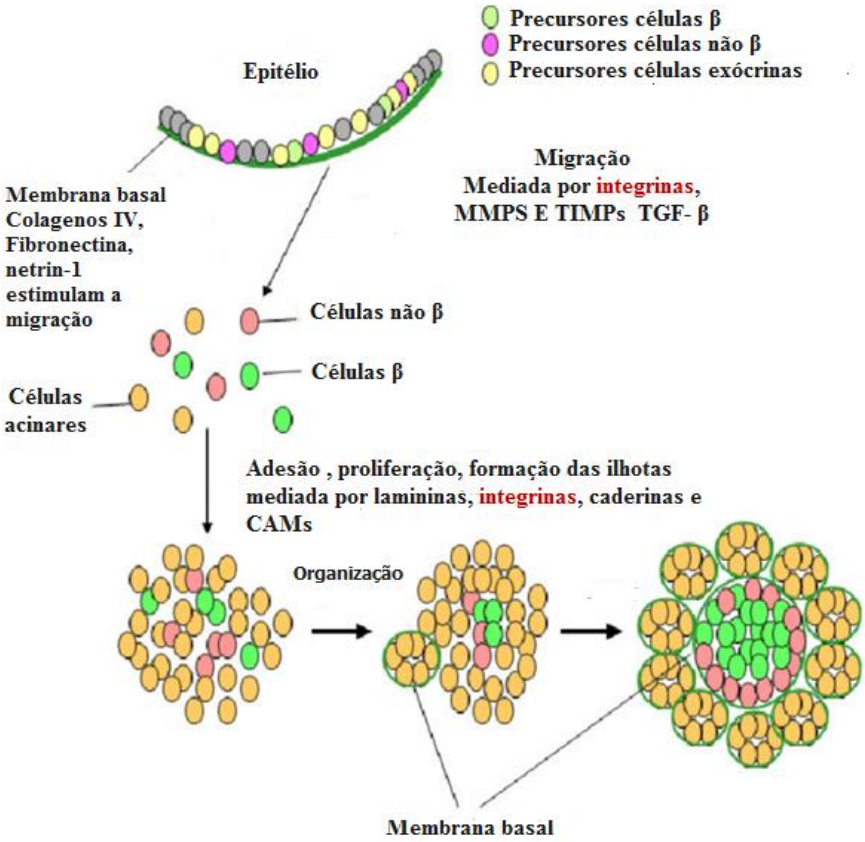
As porções dorsais e ventrais do pâncreas derivam do mesoderma do futuro aparelho gastrointestinal superior do embrião. A porção dorsal recebe sinais mesodérmicos, sinais derivados da notocorda, da aorta dorsal e posteriormente do seu próprio mesênquima (99). A porção ventral tem seu início no 10° dia gestacional e recebe sinais moleculares provindos do mesoderma lateral, mesoderma cardíaco e do septo transverso (99).

No 12.5º dia, em roedores ocorre a fusão da porção ventral e dorsal após a rotação do futuro trato gastrointestinal, enquanto que em humanos esse evento ocorre por volta da 37° dia de gestação (100). Concomitante a esse processo, as células continuam a se proliferar, aumentando o tamanho dos brotos formados, que passam a ter uma morfologia tubular

ramificada (100). Essas alterações morfológicas são seguidas da proliferação e diferenciação de células endócrinas primordiais, que em primeiro momento estão inseridas entre as células acinares e ductais e mantém contato com o lúmen (100). Essas células passam a se diferenciar em percursores endócrinos após expressão do fator de transcrição pro-endócrino *Ngn3*, seguido da perda das junções de adesão tipicamente vistas no epitélio (100). Em seguida, se juntam em forma de cordões lineares próximos de vasos e ductos, configurando as futuras ilhotas de Langerhans (91)(100).

Mediando as interações com o tecido mesenquimal adjacente e a expressão de fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento do pâncreas, está a matriz extracelular, especialmente a membrana basal cujo seus componentes, principalmente as lamininas e integrinas desempenham um papel crucial na proliferação, diferenciação e função das célulasβ (101). Além disso, a MEC auxilia a morfogênese pancreática, a migração e agregação dos precursores endócrinos e exócrinos,e a organização estrutural das ilhotas (102). Esses processos ocorrem principalmente por meio da interação de seus componentes; pela participação de metaloproteinases como MMP2 e MMP9 e suas proteínas inibidoras (TIMPs) e pela expressão de fatores de crescimento importantes como TGF β (102) (Figura 3).

· **Figura 3. Representação esquemática simplificada da participação da MEC no desenvolvimento do pâncreas endócrino**



Os precursores pancreáticos migram através da membrana basal, se diferenciam em células endócrinas ou exócrinas. As interações especializadas da MEC e integrina permitem a adesão e migração de células endócrinas para formar as ilhotas de Langerhans. Fonte: Adaptado de Krishnamurthy M, et al (2009)

2.4 Matriz extracelular

A Matriz extracelular (MEC) é um arcabouço macromolecular presente em todos os órgãos e tecidos (103). Cada um deles possui uma MEC com composição distinta que é formada ainda nos estágios iniciais da embriogênese, sendo essencial para o seu desenvolvimento e sobrevivência (103). Além disso, desempenha papeis importantes nos processos de diferenciação, proliferação, adesão, migração e sobrevivência celular (104)(105). É classificada em matriz intersticial e membrana basal (MB) (103). A Matriz intersticial compreende todo o espaço intercelular existente, o qual os preenche conferindo sustentação para as células (103).

Dentre seus constituintes estão os proteoglicanos (PGs), colágenos, tenascina C, elastina, fibronectina e os glicosaminoglicanos e mediando as interações célula-matriz estão

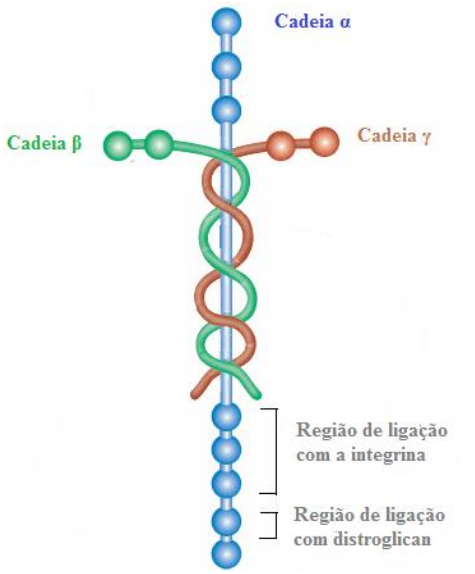
as integrinas. Juntos esses componentes não só auxiliam na formação de estruturas tridimensionais como também fornecem suporte biomecânico para manter a integridade e organização do tecido, e manutenção da homeostase (106)(107).

A membrana basal (MB) é uma estrutura delgada representada pela MEC especializada em forma de lâmina presente na interface entre os tecidos epitelial e conjuntivo (108). Exerce funções importantes no comportamento celular como aderência das células epiteliais; comunicação dessas células com o tecido conjuntivo adjacente; influência na polaridade celular; seleção de moléculas e interação com fatores de transcrição participando assim do metabolismo (108). É composta por colageno tipo IV, proteoglicanos de heparam sulfato (HSPGs) nidogenio, entactinas e lamininas (109).

A laminina compreende uma familia de glicoproteínas heterotriméricas compostas pelas cadeias α (400 kD), β (210 kDa e γ (200 kDa) (110)(111) (Figura 4). Suas cadeias podem se combinar em 15 lamininas diferentes, que são em parte, expressas de forma específica em cada célula e tecido. É um dos compontes principais das MBs e de fundamental importância no desenvolvimento embrionário, além de ter um papel importante em processos de diferenciação, migração e adesão celular (112)(113). Destaca-se aqui a relevância das lamininas 111 (formada pelas cadeias α1, β1 e γ1) devido a sua participação na morfogênese pancreática de camundongos e, em particular, na diferenciação e sobrevivência das células β (10).

Integrinas são proteínas transmembranares atuantes como receptores de superfície celular pertencentes ao grupo de moléculas de adesão celular (CAMs) (114). São heterodiméricas, compostas por uma cadeia α e uma cadeia β, as quais estão ligadas entre si (114). Cada subunidade consiste de um domínio extracelular, uma região transmembranar e uma pequena região citoplasmática, que permite a interação das células com o meio extracelular e vice-versa (114). Os domínios N-terminais da cadeia α e da cadeia β unem-se formando uma estrutura globular, que é responsável pela ligação ao ligante extracelular que podem ser fibronectinas, colágenos e lamininas (115). As integrinas são mediadoras das interações entre as células e a MEC, participando diretamente da migração, adesão, proliferação, sinalização e morfogênese celular e desempenhando um importante papel em processos como cicatrização, inflamação, câncer e embriogênese (115) (Figura 5).

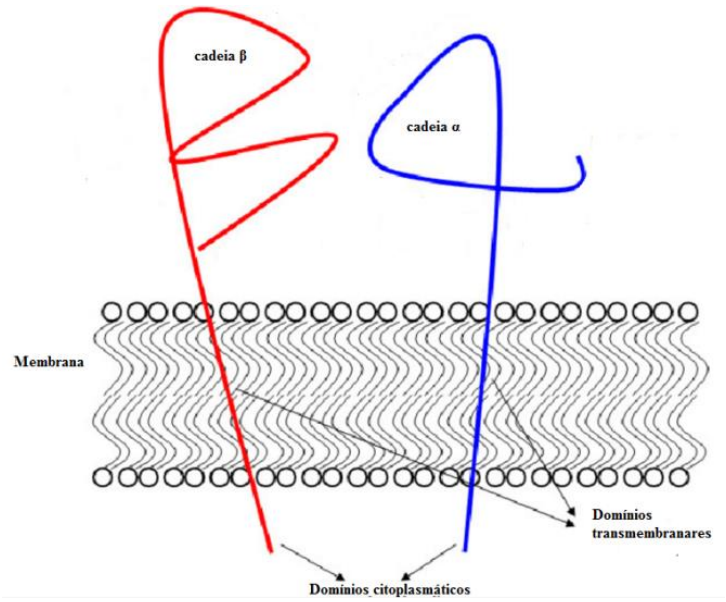
Figura 4. Representação esquemática simplificada das lamininas



.

Cada laminina é formada por 3 cadeias α, β e γ e se liga a componentes da matriz extracelular. Fonte: Adaptado de Bio Files (2008) (116).

Figura 5. Representação esquemática das integrinas



As integrinas possuem 2 cadeias, sendo uma α e uma β. A porção extracelular se liga a MEC enquanto que a porção citoplasmática interage com moléculas sinalizadoras como FAK, src, Pax. Fonte: Adaptado de Krishnamurthy M, et al (2009).

2.4.1 Matriz extracelular e o desenvolvimento pancreático

A MEC participa diretamente do processo de ramificação, morfogênese e comportamento celular pancreático (98). A matriz extracelular intersticial é limitada no pâncreas e ocorre como uma fina camada subjacente e externa à MB peri-ilhotas (98). O oposto acontece com as membranas basais, que são predominantes e estão presentes em torno das células acinares, ao redor dos vasos sanguíneos e ductos, e ao redor das ilhotas pancreáticas (78).

A MB é essencial para o desenvolvimento e sobrevivência das células das ilhotas (117). Estudos com ilhotas isoladas mantidas em meio condicionado com componentes da membrana basal, mostram que essas ilhotas produzem maior número de células funcionais, passam a expressar menos caspase 3, e apresentam maior atividade de AKT, regulação positiva de integrina α3 e preservação da expressão de *Pdx1* quando comparadas as ilhotas em suspensão (117). Dentre os componentes da membrana basal, salientamos nesse trabalho a importância da laminina 111 para o desenvolvimento pancreático da integrina α3 como seu ligante (118).

2.4.1.1Laminina 111

A laminina 111, conhecida antigamente por Laminina 1, tem sido descrita como componente importante em diversos processos embriogênicos, incluindo a diferenciação e ramificação pancreática (119). O uso de anticorpos para o bloqueio funcional da laminina 111 mostrou uma redução na expressão de marcadores acinares iniciais retardando a ramificação pancreática (119)(120).

Laminina 111, presente na MB pancreática das ilhotas de roedores é essencial para a adesão, proliferação e também para a secreção de insulina pelas células β (10). Estudos *in vitro* utilizando células de fetos de camundongo de 13.5º dia embrionário, mostraram que após 4 dias na presença de colágenos e fibronectina as ilhotas sofreram diminuição no número total de células, enquanto que em meio contendo laminina 111, o número de células mostrou-se aumentado, em decorrênciada proliferação das células β (10)(121). Outros estudos *in vitro* com linhagens celulares humanas também mostraram que essas células foram capazes de se diferenciar em células endócrinas a partir de células ductais em meio contendo laminina 111 de camundongo (122).

2.4.1.1.1Integrina α3

A integrina α3β1 representa em média 50% das integrinas β expressas no pâncreas endócrino em desenvolvimento (123). Atua como receptor para lamininas e desempenha um papel essencial para o desenvolvimento das células β pancreáticas regulando sua sobrevivência e função (124). O bloqueio da integrina α3 por anticorpos ou o seu silenciamento por RNA de interferência em ilhotas humanas isoladas, adultas e fetais, e em células INS-1 provocam a diminuição da adesão e proliferação celular (11)(125). Além disso, promove a redução da expressão do fator de transcrição *PDX1* pelas células pancreáticas e diminuição da secreção de insulina por parte das células β (11). Em ilhotas fetais humanas, a subunidade α3 da integrina regula a expressão de *PDX1* de células progenitoras epiteliais pancreátias (125), além de ter maior expressão em ilhotas em estágios avançados de maturação, o que indica que sua participação é importante para a formação de massa funcional dessas ilhotas (118).

Em camundongos a integrina α3 é responsável por mediar a adesão e migração de células endócrinas primárias, sendo expressa em todos os tipos celulares presentes em ilhotas, tanto em desenvolvimento como também maduras (11)(123).

Existem muitos estudos sobre a importância das lamininas e integrinas no processo de desenvolvimento pancreático, porém, pouco se sabe a respeito do impacto da hiperglicemia materna sobre a interações da laminina 111 mediadas pela integrina α3 na formação e função das ilhotas fetais de camundongo. Assim o presente estudo buscou investigar os efeitos da hiperglicemia materna sobre a deposição dessas moléculas e o impacto sobre a morfogênese do pâncreas endócrino de camundongo.

2.5 Justificativa para o desenvolvimento deste trabalho

O laboratório de Biologia da Reprodução e Matriz Extracelular (LBR &MEC) tem se dedicado nos últimos anos a elucidar os eventos que ocorrem no processo de remodelação tecidual, as alterações sofridas pela MEC uterina e seus componentes durante o ciclo estral e decidualização (126)(127)(128)(129)(130). Dentre as várias modificações identificadas na Matriz Extracelular uterina, nosso grupo descreveu o espessamento de fibrilas colágenas assim como alterações na expressão e distribuição de colágenos e proteoglicanos (127).

Diante da importância da remodelação tecidual uterina que ocorre no processo reprodutivo em camundongos, do qual a matriz extracelular participa ativamente, e sabendo que a MEC pode ser afetada pela hiperglicemia materna, o Laboratório de Reprodução e Matriz Extracelular desenvolveu um modelo de gestação complicada pela hiperglicemia do DM tipo 1 quimicamente induzido em camundongos com o objetivo de avaliar o impacto

dessa doença sobre o ambiente uterino desses animais (131). Utilizando esse modelo, observou-se que a atividade proliferativa e a composição da MEC dos tecidos uterinos são afetadas pelo diabetes durante o início do período gestacional, com o potencial de comprometer o estabelecimento da gestação, o desenvolvimento embrionário e o trabalho de parto (131). Além disso, o número de sítios de implantação é reduzido, as dimensões deciduais são menores, a deposição de colágenos I e IV aumentada e deposição de colágeno III diminuída, nessa mesma região (131).Também foram observadas alterações estruturais no miométrio, que apresenta aumento na deposição de colágenos associado a uma diminuição do padrão proliferativo das células musculares lisas (132).

Resultados mais recentes do nosso grupo utilizando nosso modelo de gestação complicada por DM1 mostram que essa doença afeta de modo marcante a estrutura placentária, levando a alterações no padrão de síntese e deposição dos colágenos tipo I, III e V na região do Labirinto, modificações na atividade das metaloproteinases MMP2 e MMP9, diminuição do peso e tamanho das placentas e dos fetos, assim como maior número de perdas embrionárias e malformações (14).

Nesse contexto, a proposta desse estudo foi ampliar os conhecimentos referentes a essa linha de pesquisa,dos estudos sobre o impacto da hiperglicemia materna sobre o desenvolvimento embrionário, analisando as alterações morfológicas do pâncreas fetal, com foco na matriz extracelular desse órgão, especificamente na membrana basal do pâncreas endócrino.

3 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi avaliar o impacto da hiperglicemia materna sobre as interações célula-matriz do pâncreas fetal em desenvolvimento, com enfoque na composição das membranas basais e genes envolvidos no desenvolvimento das ilhotas pancreáticas.

3.1 Objetivos específicos

(a) Analisar a morfologia do pâncreas fetal com foco na sua porção endócrina;

(b) Avaliar o padrão de deposição de moléculas das membranas basais como panlaminina, as cadeias α1 e γ1 das lamininas e integrina α3;

(c) Analisar o perfil proliferativo das células das ilhotas e identificar o padrão de distribuição das células α e β por meio da avaliação da marcação para insulina, glucagon e PCNA em pâncreas fetal;

(d) Verificar o impacto da hiperglicemia materna sobre a expressão dos genes *Pdx1 e Pax4;*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Ciências Biomédicas (Número de Autorização: **Protocolo 111/2016**).

Foram utilizadas fêmeas de camundongos *Swiss* de dois meses de idade com cerca de 30 g de peso corporal. Os camundongos foram mantidos no Bioterio de Experimentação Animal do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, em temperatura ambiente constante (21 ± 1 º C) e 12 horas de ciclo claro/escuro com água e ração *ad libitum.*

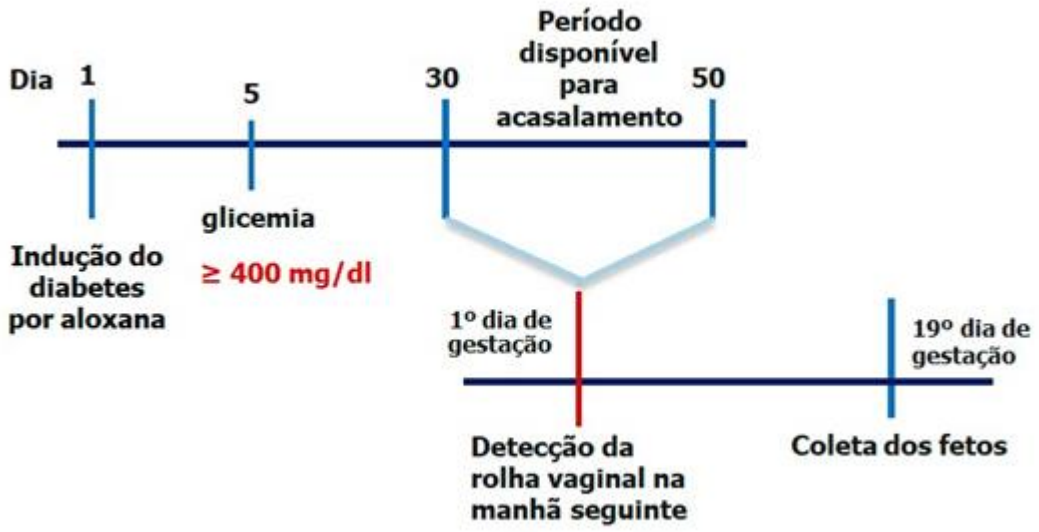
4.1.1 Indução do diabetes

As fêmeas foram submetidas ao protocolo de indução de DM1 preconizado por Favaro et al, (131). Foi administrada uma única dose de aloxana (40 $mg.kg^{-1}$, Sigma St. Louis, MO, USA) intravenosa, após 16 horas de jejum alimentar. Fêmeas do grupo controle (n=12) receberam uma injeção de solução salina 0,9%. Cinco dias após a indução a glicemia foi verificada em amostra de sangue coletado de veia da cauda usando um glicosímetro (Accu-Check - Roche Basel, Swtizerland). Somente fêmeas que apresentaram glicemia ≥ 400 mg/dl (n=15) foram selecionadas para o grupo experimental. Os animais não receberam insulina ao longo do estudo.

4.1.1.1 Acasalamento

Os animais foram submetidos ao esquema de acasalamento descrito por Favaro et al (131) (Figura 6). Após 30 dias de indução, fêmeas de ambos os grupos foram acasaladas com machos normoglicêmicos pelo período de 30-50 dias pós-indução. A gestação foi diagnosticada ao visualizar-se a rolha vaginal na manhã seguinte ao acasalamento, sendo este considerado o primeiro dia gestacional ou de desenvolvimento embrionário. No 19º dia de gestação, as fêmeas prenhas foram anestesiadas com Avertin® (25 $ml.kg^{-1}$, Sigma, USA) e os fetos foram coletados. Foram feitas medições das dimensões corpóreas do comprimento cabeça-cauda, circunferência abdominal e circunferência da cabeça dos fetos de ambos os grupos. (Número de fetos avaliados no grupo controle n:= 93), (Número de fetos avaliados no grupo experimental n = 58) (Tabela 3). Foi realizada a determinação do peso corporal e dosagem da glicemia nos fetos (Número de fetos avaliados no grupo controle n =139) (Número de fetos avaliados no grupo experimental n =112) (tabela 3) Número total de fetos utilizados no estudo n = 251. Após a decapitação, o pâncreas fetal foi dissecado e coletado.

Figura 6. Formação do grupo experimental: indução ao diabetes e acasalamento



As fêmeas de camundongos recebem uma dose única de aloxana (40,0 mg.kg-1) no primeiro dia, enquanto o grupo controle recebe 0,9% de solução salina. A glicemia é medida após 5 dias em ambos os grupos. Femeas induzidas por aloxana que apresentam glicemia < ou = a 400 mg dL são separadas para o estudo. Do dia 30 até ao dia 50 pós indução (período para acasalamento), fêmeas diabéticas e normoglicêmicas são acasaladas com machos normoglicêmicos durante a noite, sendo removidas da caixa do macho na manhã seguinte. A detecção de um tampão vaginal é considerada o primeiro dia de prenhez e as fêmeas são mantidas em gaoilas separadas. No 19º dia, a gestação é interrompida e os fetos são coletados para retirada do pâncreas, que é dissecado armazenado para análises futuras.
Fonte: Favaro R, et al (2010).

4.1.1.1.1 Análise das dimensões corpóreas e glicemia fetal

Após a coleta dos fetos, foi mensurada a glicemia, o peso corporal fetal, a circunferência da cabeça e do abdômem e ocomprimento cabeça-cauda (Dados tabela 3). Essas análises foram realizadas com auxílio de um paquímetro e balança analítica. A glicemia fetal foi mensurada utilizando um glicosímetro (Accu-Check - Roche Basel, Swtizerland) a partir de sangue proveniente da decaptação dos fetos.

4.2 Coleta do tecido para análises histológicas

Após a coleta, o pâncreas fetal foi imediatamente fixado em Methacarn (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético glacial) por 3 horas à temperatura ambiente, em paraformaldeído (4% ph 7,2 *overnight)* a 4°C e em bowin por 8 horas a 4°C. Foram desidratados, seguido de diafanização em xilol e inclusão em parafina. Amostras de 5.0 µm de espessura foram obtidas por meio de micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina

(protocolo anexo A), para análises morfológicas e pelo ácido periódico de Schiff (PAS) (protocolo anexo B), para observação de mucopolissacarídeos.

4.3 Quantificação e avaliação das dimensões das ilhotas fetais

A quantidade e o tamanho médio das ilhotas dentro do tecido pancreático total foram analisadas por abordagem histológica. Cortes de pâncreas de fetos de 19 dias de desenvolvimento corados por Hematoxilina e Eosina foram fotografados em aumento de 200x, em microscópio óptico (Nikon's Eclipse E600) equipado com câmera digital CCD Nikon DP72 com auxilío do software de processamento de imagens Image Pro (Image-Pro Media Cybernetics). A quantidade, o diâmetro e a porcentagem de área cada ilhota dentro do tecido total foram avaliadas pelo software Axion Vision s40 4.8 2.0 (Axion Vs40 4.8 2.0 Carl Zeiss MicroImaging Gmbh) e analisadas estatisticamente.

4.4 Imunolocalização de glicoproteínas de membrana basal

Panlaminina, lamininaγ1, laminina α1 e integrina α3 foram avaliadas quanto à sua distribuição no pâncreas fetal, pela técnica de imunohistoquímica. Cortes de pâncreas de fetos de 19 dias de desenvolvimento foram desparafinizados, lavados com solução salina de tampão fosfato 0,1M pH 7,2 contendo Tween 20 0,03% (v/v) (PBS-T). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% por 30 min à temperatura ambiente.A recuperação antigênica foi realizada por aquecimento em tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 durante 40 minutos à 96ºC, seguida da reação de bloqueio de sítios antigênicos inespecíficos com soro de cabra diluido em BSA 10% por 90 min à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários específicos (panlaminina Abcam ab 1575 1:500; laminina γ1 Santa Cruz sc5584 1:50; laminina α1 Santa Cruz H-300: SC-5582, 1:50; integrina α3 Rockland 600-401 R13 1:200) diluídos em PBS Tween 20 0,3% *overnight* a 4°C em câmara úmida (Dados dos anticorpos tabela 1). Após essa etapa, os cortes foram incubados por 2 horas com anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado com HRP (1:200, KPL 5220-0283). A reação foi revelada com 3,3-diaminobenzidine (DAB) 0,03% em PBS contendo peróxido de hidrogênio 0.03%, e contracorados rapidamente com hematoxilina de Harris. Os cortes foram fotografados em aumento de 400x, em microscópio óptico (Nikon's Eclipse E600) equipado com câmera digital CCD Nikon DP72 com auxilío do software de processamento de imagens Image Pro (Image-Pro Media Cybernetics). Foram escolhidas imagens aleatórias das ilhotas

pancreáticas, e a porcentagem das áreas marcadas foram analisadas utilizando o software Imagej (software v. 1.49 http://rsbweb.nih.gov/ij/) (Dados tabela 4).

4.5 Imunodetecção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

Para avaliar a atividade proliferativa do pâncreas endócrino, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi detectado imuno-histoquimicamente. Os cortes foram desparafinados e tratados para recuperação de antígeno e bloqueio da peroxidase endógena conforme descrito anteriormente. Os cortes foram incubados com anticorpo anti-PCNA (ab2426 Abcam 1:200) *overnight* a 4 °C em câmara úmida (Dados dos anticorpos tabela 1). No dia seguinte, foram incubados por duas horas com anticorpo secundario anti-coelho IgG conjugado com HRP (1:200, KPL 5220-0283). A reação foi revelada com 3,3-diaminobenzidine (DAB) 0,03% em PBS contendo peróxido de hidrogênio 0.03%, e contracorados rapidamente com hematoxilina de Harris. As imagens foram capturadas em aumento de 600x, em microscópio óptico (Nikon's Eclipse E600) equipado com câmera digital CCD Nikon DP72 com auxílio do software de processamento de imagens Image Pro (Image-Pro Media Cybernetics). As células endócrinas foram contadas. O índice mitótico foi estimado pela porcentagem de células PCNA positivas contadas em dez campos aleatórios. Cerca de 400 células endócrinas foram contadas por animal, com índice positivo (PI) = n de células positivas x100 divididas pelo número de células contadas aleatoriamente.

4.6 Imunoavaliação dos hormônios glucagon e insulina em pâncreas fetal

Para avaliar a massa funcional de células α e β, os hormônios glucagon e insulina foram detectado imuno-histoquimicamente. O pâncreas fetal foi imediatamente fixado após a coleta em paraformaldeído 4% e processados conforme protocolo anterior. Os cortes foram incubados com anticorpo anti-glucagon (#A0565 1:350) anti-insulina (#A0564 1:250) *overnight* a 4 °C em câmara úmida (Dados dos anticorpos tabela 1). Os cortes foram fotografados em aumento de 400x, em microscópio óptico (Nikon's Eclipse E600) equipado com câmera digital CCD Nikon DP72 com auxílio do softwarede processamento de imagens Image Pro (Image-Pro Media Cybernetics). Foram escolhidas imagens aleatórias das ilhotas pancreáticas e foram avaliados a porcentagem das áreas marcadas e a intensidade de marcação utilizando o software Imagej (software v. 1.49 http://rsbweb.nih.gov/ij/.(Dados tabela 1)

Tabela 1. Resumo dos anticorpos utilizados nas imuno-histoquímicas com suas diluições, recuperação antigênica e anticorpo secundário.

Anticorpo primário	Diluição em PBS/T20 0,03%	Recuperação antigênica	Anticorpo secundário	Diluição anticorpo secundário
Anti- panlaminina Abcam ab1575	1:500	Tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 40 minutos à 96ºC,	Anti-coelho IgG HRP conjugado KPL 5220-0283	1:200
Anti-laminina γ1 Santa Cruz sc5584	1:50	Tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 40 minutos à 96ºC,	Anti-coelho IgG HRP conjugado KPL 5220-0283	1:200
Anti- laminina α1 H-300: SC-5582 Santa Cruz 1 50	1:50	Tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 40 minutos à 96ºC,	Anti-coelho IgG HRP conjugado KPL 5220-0283	1:200
Anti- integrina α3 Rockland 600-401 R13	1:200	Tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 40 minutos à 96ºC,	Anti-coelho IgG HRP conjugado KPL 5220-0283	1:200
Anti-PCNA (Abcam ab2426)	1:200	Tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 40 minutos à 96ºC,	Anti-coelho IgG HRP conjugado KPL 5220-0283	1:200
Anti-glucagon (#A0565)	1:350	Tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 40 minutos à 96ºC,	Anti-coelho IgG HRP conjugado KPL 5220-0283	1:200
Anti-insulina (#A0564	1:250	Tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 40 minutos à 96ºC,	Anti-coelho IgG HPR conjugado KPL 5220-0283	1:200

4.7 Avaliação da expressão de *Pdx1* e *Pax4* por RT- qPCR

Com intuito de analisar a expressão dos genes *Pdx1* e *Pax4* o pâncreas fetal coletado foi dissecado e armazenado a -30°C em solução estabilizadora RNAlater (Sigma-Aldrich, USA). A extração de RNA total do pâncreas foi realizada pelo método de purificacão de ácido nucleico baseado em coluna de spin utilizando o ilustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare,Sweden). O mRNA total foi quantificado por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro EpochMicroplate e Placa de Multivolume Take3 (BioTek, EUA). A síntese de cDNA foi realizada usado o kit High-CapacitycDNA Reverse Transcription (ThermoFisherScientific) conforme instruções do fabricante, e a transcrição reversa foi realizada por meio do termociclador StepOne Plus (AppliedBiosystems), seguindo o

programa de ciclos térmicos sugerido pelo fabricante: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. Foram utilizados *primers* aleatórios usando 1,0 µg de RNAm total. O cDNA foi dividido em alíquotas e armazenado a -20 ° C. A PCR quantitativa em tempo real foi realizada utilizando 200 µg de cDNA pancreático com a mistura principal de PCR Power SYBR® Green (Applied Biosystems ™, EUA), misturada com *primers* específicos para hibridizar com os seguintes genes *Pdx1 e Pax4* (Tabela 4). Os ensaios foram amplificados em triplicata usando o sistema StepOnePlus (Life Technologies, EUA). Os genes *Ppia* e *Rpl7* foram testados e o *Rpl7* foi selecionado como gene de referência para normalização de dados com base em sua estabilidade de expressão e a expressão relativa de mRNA foi calculada usando o método 2-ΔΔCt (133).

Tabela 2. Sequência dos primers de camundongos utilizados no estudo

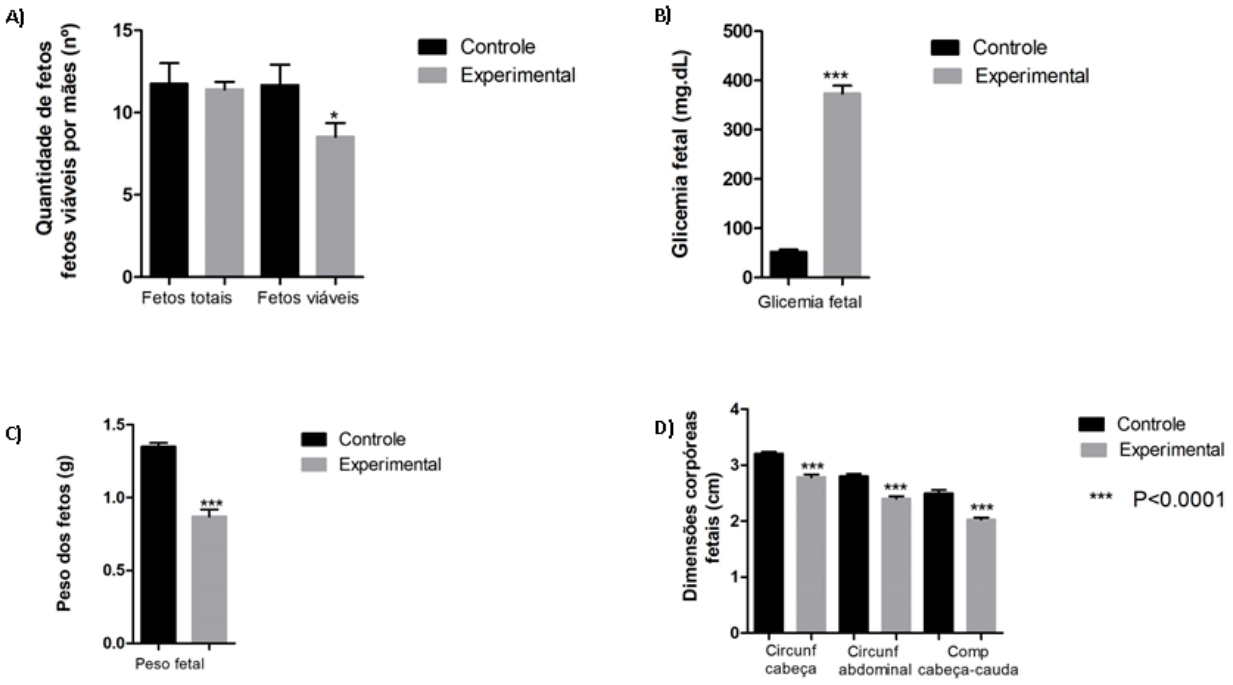
Símbolo	Número de acesso	Sequência do primer
Pdx1	NM_008814.3	FOR *5'-CCAAAACCGTCGCATGAAGTG-3'*
		REV 3'-TCTGGGTCCCAGACCCG5 -'
Pax4	NM_001159926.1	FOR 5'-ACCTCATCCCAGGCCTATCT-3'
		REV 3'-AGGCCTCTTATGGCCAGTTT-5´
Rpl7	NM_011291.5	FOR 5'GCAGATGTACCGCACTGAGATTC 3'
		REV 3'ACCTTTGGGCTTACTCCATTGATA 5'
Ppia	NM_008907	FOR: 5'-CAGACGCCACTGTCGCTTT-3'
		REV: 5'-TGTCTTTGGAACTTTGTCTGCAA-3'

5RESULTADOS

5.1 A hiperglicemia materna induz hiperglicemia fetal, modifica a simetria do crescimento intra-uterino e diminui a quantidade de fetos viáveis

O número de fetos e de fetos viáveis foi analisado e comparado entre os grupos. As fêmeas hiperglicêmicas (n=15) tiveram número menor de fetos viáveis comparadas as fêmeas do grupo controle (n=12) (Figura 7A). Malformações fetais foram observadas somente no grupo experimental. A glicemia dos fetos do grupo experimental (mães hiperglicêmicas) estava significativamente alta quando comparada a dos fetos do grupo controle (Figura 7B). Com relação ao peso fetal e as dimensões corporais, observamos que os fetos do grupo experimental eram significativamente mais leves (Figura 7C) e menores (Figura 7D) que os fetos do grupo controle. Além disso, foi verificado um padrão de assimetria corporal em comparação aos fetos do grupo controle. A circunferência da cabeça era menor que a observada nos fetos do grupo controle. Ademais, a circunferência abdominal e o comprimento cabeça-cauda estava reduzido comparado ao controle (Figura 7E).

Figura 7. Análise da viabilidade fetal e parâmetros do desenvolvimento



Comparação entre a quantidade de fetos gestados e viáveis em ambos os grupos (Figura A). Glicemia e peso dos fetos dos grupos controle e experimental (Figura B-C). Medida das dimensões corpóreas dos fetos e comparação entre os grupos: Circunferência da cabeça, Circunferência abdominal, Comprimento cabeça-cauda (Figura D).

Tabela 3 Média ± erro padrão da média das dimensões corpóreas, glicemia, quantidade de fetos e fetos viáveis.

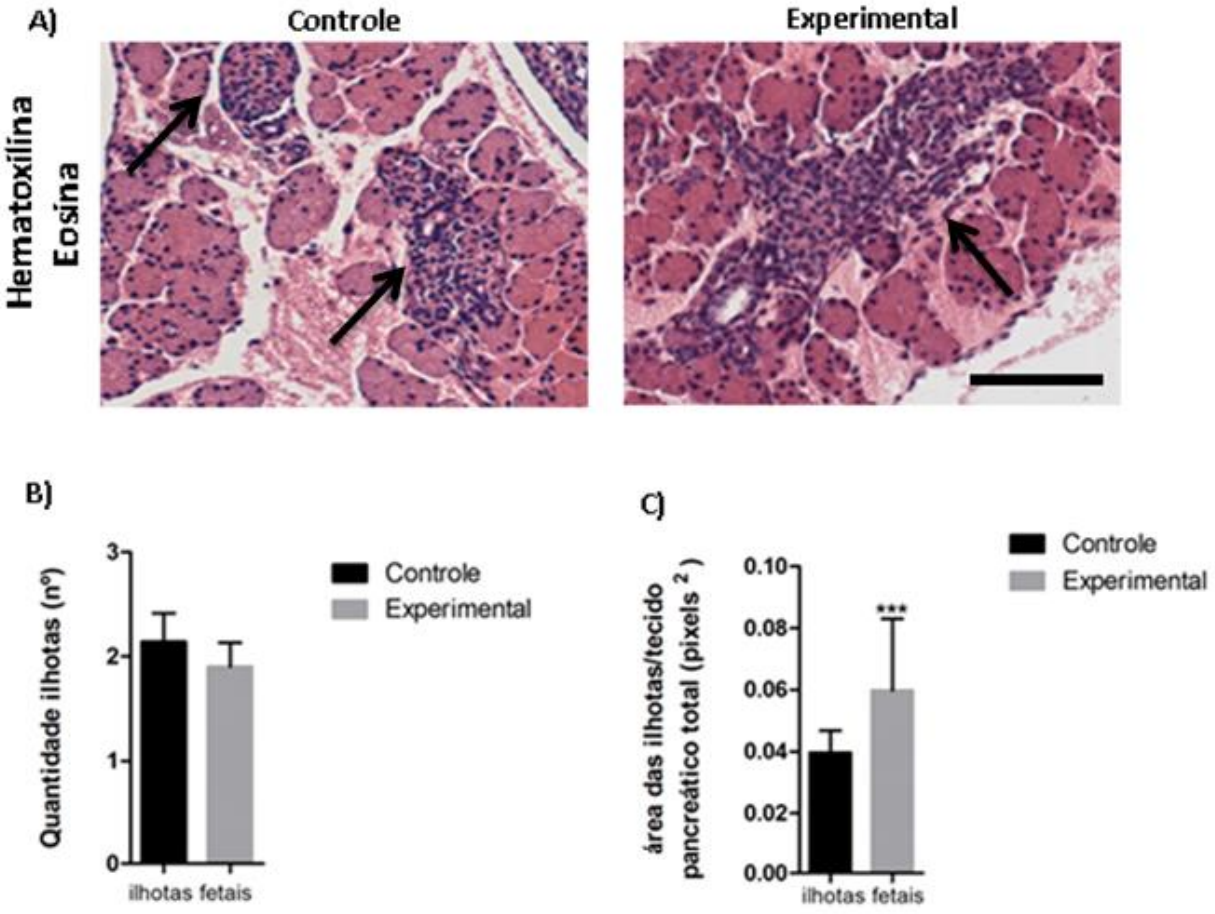
Dados avaliados	Controle	Experimental	Valor de - ρ
Glicemia	52,29 ± 3,9 mg/dL	392,2 ± 11,2mg/dL	ρ< 0,0001
Peso fetal	1,4 ± 0,04 kg	0,9 ± 0,02 kg	ρ< 0,0001
Total de fetos	15,00 ± 0,6	7,74 ±1,3	ρ<0,02
Fetos viáveis	14,30 ± 0,7	8,455 ± 0,981	ρ< 0,0001
Fetos mal formados	0±0	1,25 ± 0,62	ρ< 0,0001
Circunferência da cabeça	3,2 ±0,2 cm	2,7 ±0,3 cm	ρ< 0,0001
Circunferência abdominal	2,8 ± 0,3 cm	2,3 ±0,3 cm	ρ< 0,0001
Comprimento cabeça-cauda	2,6 ± 0,5 cm	2,0 ± 0,3 cm	ρ< 0,0001

Dados apresentados como média ± erro padrão da média, teste t de Student $\rho<0.01$

5.2 A hiperglicemia materna promove modificação no tamanho e na morfologia das ilhotas pancreáticas fetais

A morfologia e quantidade das ilhotas pâncreáticas fetais foi comparada entre os grupos. Maior parte das ilhotas do grupo experimental apresenta-se próximas aos ductos de origem, além de estarem dispostas cordonalmente, aspectos observados no início do processo de desenvolvimento (100). Já as ilhotas do grupo controle estão dispostas em ilhas, morfologia encontrada em pâncreas já desenvolvidos, e que deveria ser esperada nessa idade (100) (Figura 8A). Além disso, o grupo experimental apresenta uma tendência a um menor número de ilhotas (Figura 8B) e ilhotas maiores (Figura 8C) comparadas ao grupo controle.

Figura 8. Características morfológicas do pâncreas fetal (19º dias).

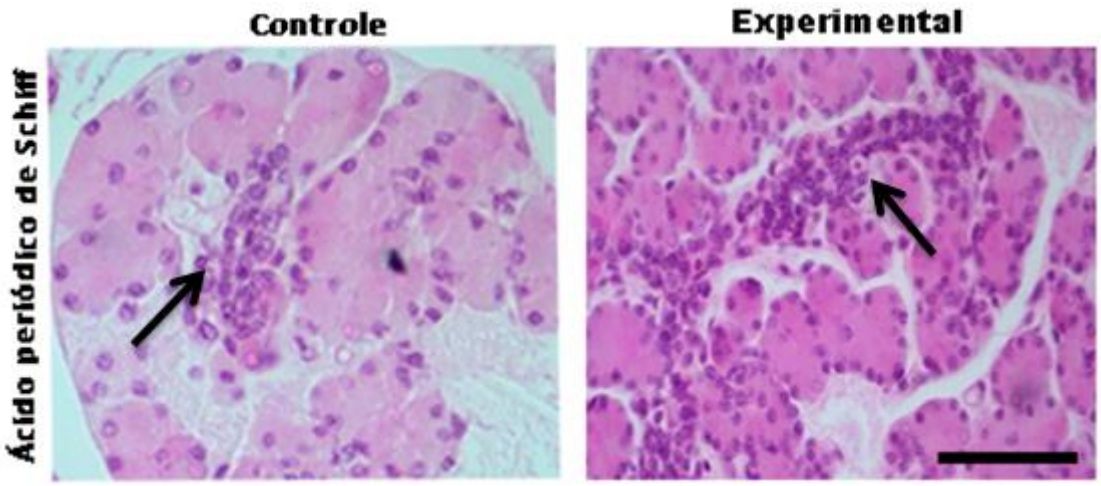


Pâncreas de animal controle e experimental corado com hematoxilina e eosina. Observe a diferença no tamanho das ilhotas pancreáticas (setas) sua expansão e aspecto imaturo no grupo experimental (Figura A). Quantificação das ilhotas e análise estatística da área das ilhotas. (Figura B-C). Barra de escala: 20.0 µm.

5.3 A hiperglicemia materna modifica o padrão de deposição de polissacarídeos no pâncreas fetal.

A coloração pelo Ácido periodico de Schiff demonstrou acúmulo de polissacarídeos no citoplasma das células do pâncreas dos fetos de 19 dias, tanto nas ilhotas de langerhans quanto nos ácinos pancreáticos (Figura 9).

Figura 9. Pâncreas fetal corado pelo ácido periódico de Schiff (PAS).

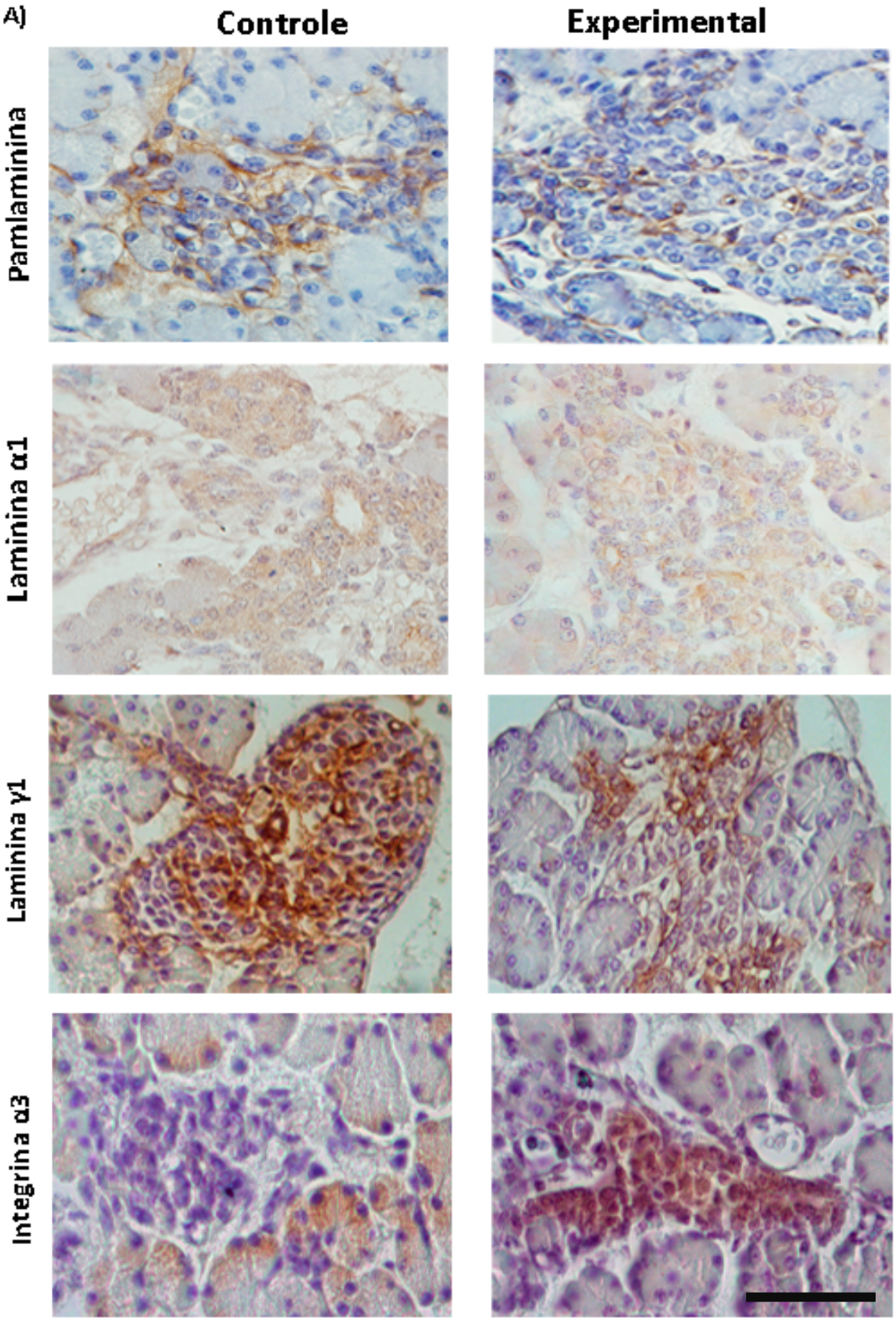


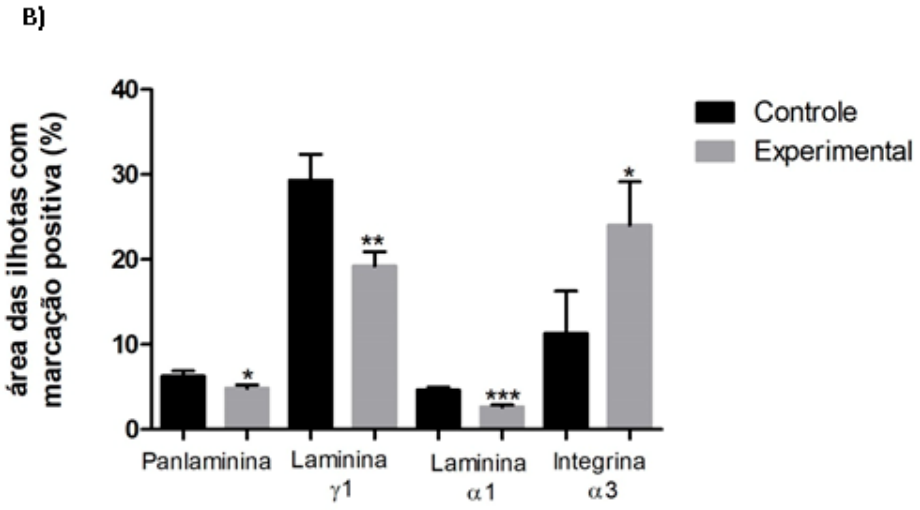
Pâncreas fetal de 19 dias corado com ácido periódico de Schiff. Coloração mostra maior intensidade no pâncreas de fetos de mães hiperglicêmicas (grupo experimental) comparado com o grupo controle. Ihotas pancreáticas (setas) Barra de escala: 20.0 µm.

5.4 A hiperglicemia materna diminui a deposição de panlaminina, das cadeias α1 e γ1 da Laminina e aumenta a deposição de integrina a3 no pâncreas de fetos pré-termo

A imunomarcação para panlaminina e para as cadeias α1 e γ1 da laminina, mostrou diminuição na deposição dessas moléculas na membrana basal das ilhotas do grupo experimental comparado ao grupo controle (Figura 10A). A quantificação da área marcada para essas proteinas apresentou reduçãona intensidade da marcação no pâncreas de fetos de mães hiperglicêmicas, comparado com o grupo controle (Figura 10B). A marcação para a integrina α3estava aumentada nos fetos do grupo experimental (Figura 10A). A quantificação da imunomarcação para integrina α3 mostrou aumento no grupo experimental comparada com o grupo controle (Figura 10B).

Figura 10. Imunolocalização de lamininas e da integrina α3 do pâncreas de fetos de 19 dias



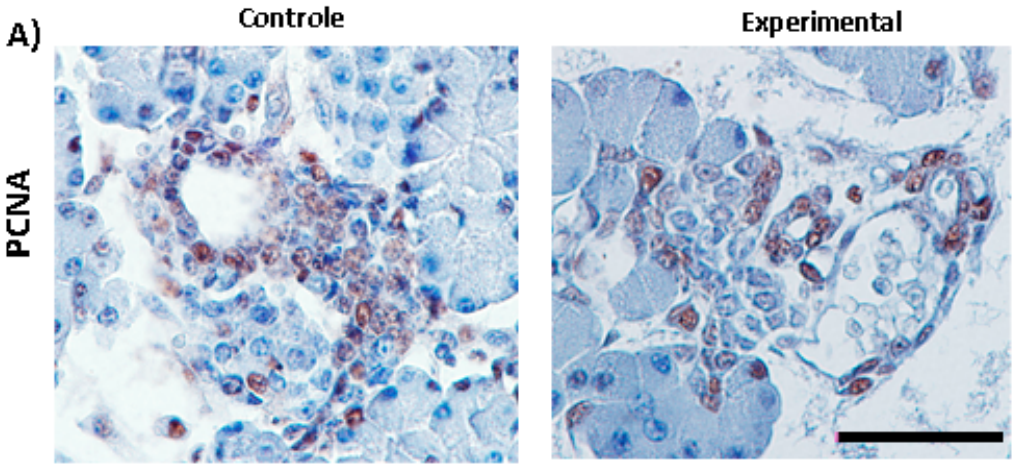


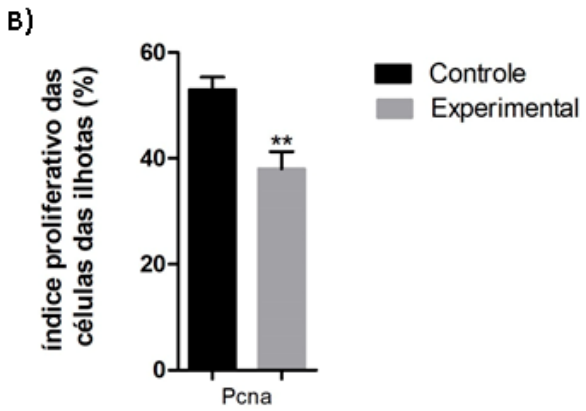
Imunohistoquímica para panlaminina, cadeias α1 e γ1 da laminina e integrin α3 (Figura 10A). Análises estatísticas da porcentagem de área marcada para cada molécula analisada comparada entre os grupos controle e experimental (Figura 10B). Barra de escala: 20.0 µm.

5.5 A hiperglicemia materna afeta a proliferação das células endócrinas do pâncreas fetal

Foi observado uma marcação para PCNA menor em células de ilhotas dos animais do grupo experimental, comparado ao grupo controle (Figura 11 A-B). A quantificação dessa marcação indica que houve diminuição na proliferação de células das ilhotas pancreáticas dos fetos de mães diabéticas comparado ao observado nos fetos do grupo controle.

Figura 11. Avaliação da proliferação de células das ilhotas pancreáticas fetais por imunolocalização de PCNA



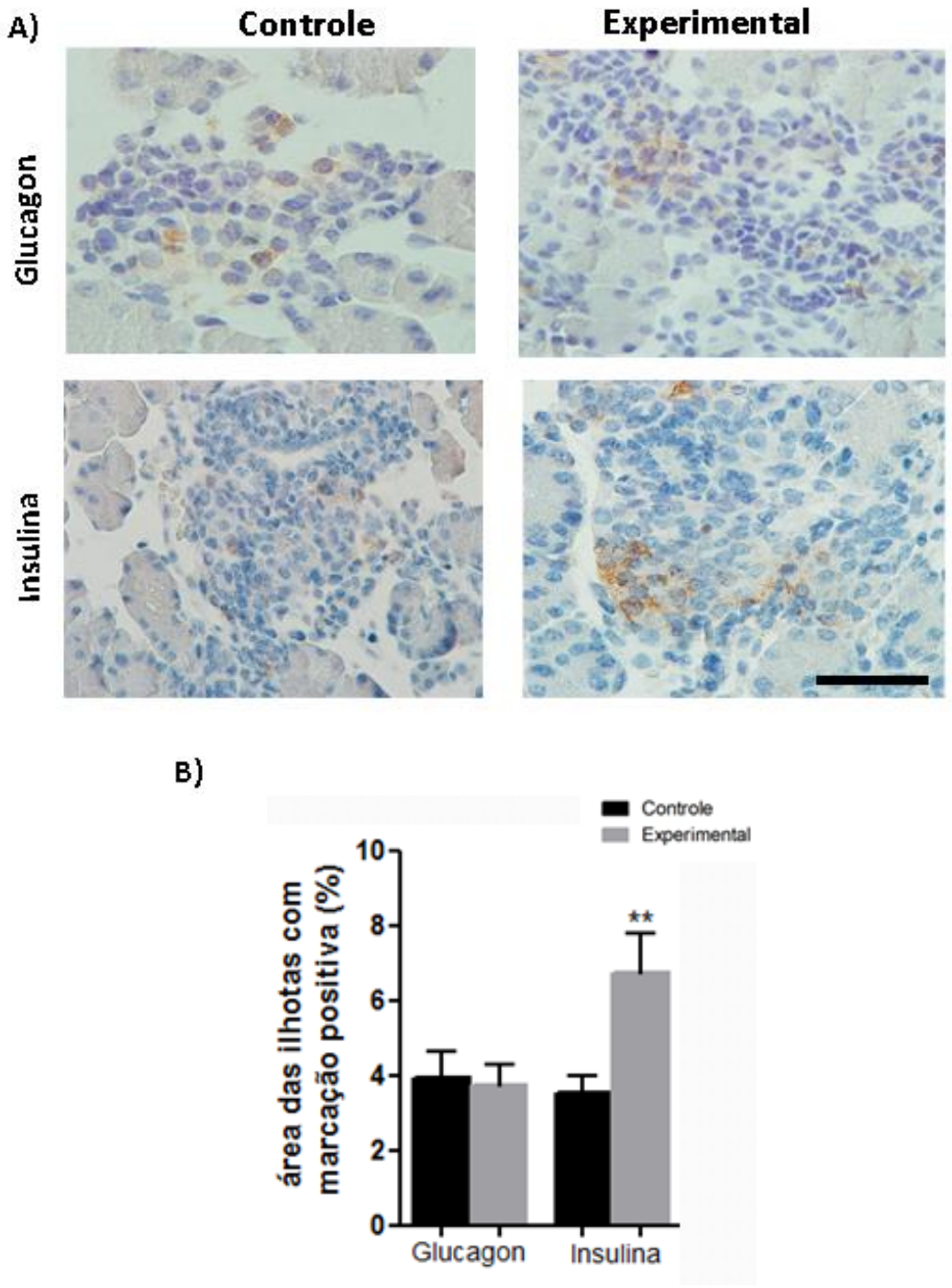


Imunohistoquímica para PCNA (Figura A). A imunomarcação para PCNA nas ilhotas pancreáticas fetais mostrou quantidade reduzida de células endócrinas marcadas. Análise estatística do índice proliferativo das células endócrinas comparado entre os grupos controle e experimental (Figura B). Barra de escala 30.0 μm

5.6 A hiperglicemia materna promove modificações na massa funcional das células β pancreáticas fetais

A hiperglicemia materna leva a um aumento da área de ilhotas fetais imunomarcadas para insulina, que indicaum aumento na massa funcional de células β nessas ilhotas (Figura 12A). Além disso, houve um aumento na intensidade dessa marcação nesse grupo experimental quando comparado ao grupo controle (Figura 12B). A hiperglicemia materna, porém, não gerou alteração da marcação da área de ilhotas para glucagon (Figura 12A) o que indica que não houve mudança na massa funcional de células α nessas ilhotas. Para a marcação de glucagon, porém, apesar de não haver mudança na área marcada observa-se uma diminuição na intensidade da marcação (Figura 12B).

Figura 12. Análise da massa de células α e β pancreáticas fetais por imunomarcação de glucagon e insulina



Imunohistoquímica para glucagon e insulina (Figura 12A**).** Análises estatísticas da porcentagem de área marcada comparada entre os grupos nas reações para glucagon e insulina (Figura 12B). Barra de escala: 20.0 µm.

Tabela 4. Média ± erro padrão da média da porcentagem de área marcada referente às proteínas da membrana basal peri-ilhotas analisadas no pâncreas fetal de 19 dias.

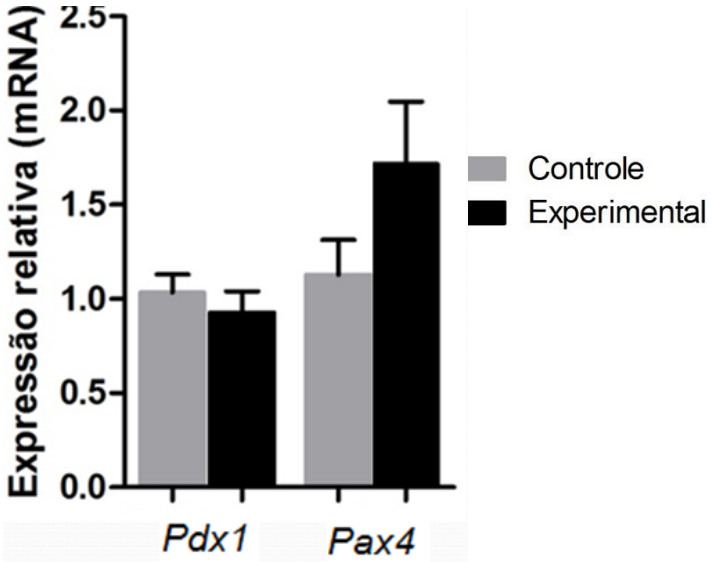
Proteina marcada	Controle	Experimental	Valor de - ρ
Panlaminina	6,3 ± 2,7%	4,8 ± 2,1%	ρ<0,01
Laminina α1	4,6 ± 3,2%	2,7 ± 1,5%	ρ<0,0007
Lamininaγ1	29,3 ± 9,2 %	19,3 ± 4,4%	ρ<0,001
Integrinaα3	11,3 ± 14,0%	24 ± 13,5%	ρ<0,02
Glucagon	3.9 ± 3,2%	3,7 ± 3,5%	ρ<0,4
Insulina	3,5 ± 2,5%	6,7 ± 6.5%	ρ<0,06

Dados apresentados como média ± erro padrão da média, teste t de Student ρ< 0.01.

5.7 A expressão relativa dos genes *Pdx1* e *Pax4* fetais não sofrem alterações significativas pela hiperglicemia materna

A expressão do gene *Pdx1* foi avaliada e não apresentou alterações significativas entre os grupos. Já a expressão de *Pax4* mostrou-se maior no grupo experimental comparado ao grupo controle, apesar dessa diferença não ser estatisticamente significante.

Figura 13. Análise da expressão relativa de Pdx1 e Pax4 em pâncreas fetal



Análise estatística da expressão relativa dos fatores de transcrição *Pdx1* e *Pax4* por RT-qPCR. A expressão de *Pdx1* mostrou-se discretamente diminuída no grupo experimental comparado ao grupo controle, não sendo estatisticamente significativo. Já a expressão de *Pax4* apresenta-se aumentada no grupo experimental.

6 DISCUSSÃO

A hiperglicemia materna é um dos fatores que podem comprometer o desenvolvimento embrionário/fetal predispondo o feto a complicações ao longo do desenvolvimento e vida adulta**.** Demonstramos por meio do nosso modelo de gestação complicada por hiperglicemia severa de curto prazo, 30-50 dias sem reposição insulínica, que a microssomia, assimetria corporal, hiperglicemia e baixo peso foram frequentes nos fetos, assim como já descrito em modelos de diabetes severo em murinos (134). Nossos fetos apresentaram alterações na morfologia do pâncreas endócrino associadas ao aumento de insulina, sinais que são evidenciados em modelos de diabetes materno leve e em indivíduos adultos com diabetes do tipo 2 (135)(136).

As ilhotas fetais do grupo experimental apresentaram hipertrofia, o que poderia estar relacionado a um aumento das células β. Embora a dosagem sérica dos hormônios insulina e glucagon não tenham sido realizadas, devido a limitações experimentais, nossos dados sugerem que há um aumento da massa funcional das células β visto que há um aumento namarcação para insulina no tecido pancreático do grupo experimental, semelhante as alterações vistas em ilhotas de roedores em modelo DM2 (62)(63). O inverso foi observado com relação ao glucagon, que apesar de a àrea de marcação para esse hormônio não ter sido alterada, apresentou menor intensidade de marcação, possivelmente por não haver aumento funcional por parte das células α ou talvez pela regulação negativa por parte da insulina, que conforme nossos achados, encontra-se com maior deposição no tecido pancreático. Glucagon é um hormônio importante para a manutenção da homeostase da glicose por regular a produção hepática dessa molécula e por promover aumento dos níveis glicêmicos em situações de hipoglicemia (137). Sua secreção é controlada por uma variedade de fatores nutricionais, neurais e hormonais e também por parte da insulina (137). Nos casos de diabetes mellitus, a hiperglicemia pode ser também promovida/mantida pelo aumento dos níveis de glucagon (hiperglucagonemia) (138).

Apesar de nosso modelo não ser um modelo típico de gestação diabética, e sim de gestação complicada por hiperglicemia de curto prazo induzida quimicamente, utilizando fetos pré-termo, demonstramos que o tempo de exposição dos fetos à hiperglicemia materna (19 dias) e os efeitos da hiperglicemia de 30-50 dias sobre a gestação foram importantes para promover alterações significantes no crescimento da prole, como já descrito por nosso grupo anteriormente (14), porém, com base nas nossas abordagens, não foi possível concluir se essas condições foram ou não suficientes para comprometer totalmente a funcionalidade das células β e instalação de um quadro hipoinsulinêmico, como visto por Kevin et al (1980) (139). Seria

interessante analisar esses fetos após o nascimento para verificar se a hiperglicemia persistirá e para avaliar o padrão de funcionalidade das células β, visto que os fetos estariam expostos à hiperglicemia materna por mais tempo por completarem o tempo de gestação, assim como também estudar esses fetos utilizando o nosso modelo de DM1 de longo prazo 90-110 dias, pois, quanto maior o tempo e progressão da doença, mais complexos são os impactos da hiperglicemia sobre a gestação e o desenvolvimento (132). Ao comparamos as ilhotas dos animais controle com as dos animais experimentais, identificamos no segundo grupo, ilhotas com perfil mais imaturo para a idade gestacional. Embora as ilhotas completem sua maturação após o nascimento, maior parte das ilhotas dos animais experimentais apresentaram células dispostas em forma de cordões, estrutura desorganizada e a maioria delas próximas aos ductos de origem, sendo esses sinais típicos de ilhotas em estágios iniciais de maturação (91)(100). Essa morfologia sugere haver um retardo na maturação do tecido endócrino, que poderia ser avaliado melhor após o nascimento, quando o completo desenvolvimento fosse possível. As ilhotas são originadas a partir de precursores celulares provindos dos ductos pancreáticos, dos quais tem sua diferenciação e morfogênese mediada pela membrana basal adjacente (140). Essas células migram dos ductos e formam clusters celulares que após a diferenciação e maturação, formam as ilhotas pancreáticas, que se distribuem no tecido exócrino (140). A participação da Matriz extracelular nesses processos é importante por meio da interação de seus componentes. As lamininas e as integrinas, por exemplo, participam diretamente da citodiferenciação ductal, migração dos percursores endócrinos e morfogênese das ilhotas (141).

Para avaliar o impacto da hiperglicemia sobre a membrana basal das ilhotas, imuno-histoquímicamente, analisamos o padrão de deposição das principais lamininas e integrinas do pâncreas fetal de camundongo. Identificamos que a deposição da panlaminina, das cadeias α1 e γ1 das lamininas e da integrina α3 nos ductos e ilhotas pancreáticas fetais tem seu padrão modificado quando o feto se desenvolve em um ambiente condicionado pela hiperglicemia materna. A laminina é uma glicoproteína trimérica formada por três cadeias: α, β e γ, podendo formar 16 isoformas diferentes de laminina (142). A cadeia γ1 da laminina está presente nas principais isoformas das lamininas (111, 211, 221, 411 e 421) localizadas na membrana basal das ilhotas de roedores e importantes para a sobrevivência e manutenção das células β (10)(142)(143). Entre as lamininas citadas, a 111, composta pelas cadeias α1, β1 e γ1 é descrita como a principal laminina expressa durante o desenvolvimento e de suma importância para a montagem das membranas basais e para correta organogênese (144)(145).

Perturbações no padrão de montagem ou destruição dessas proteínas aumentam a necrose celular, inibem a diferenciação e levam a apoptose (145).

O presente estudo mostrou que a hiperglicemia materna modificou o padrão de distribuição e a intensidade de marcação para integrina α3. As ilhotas fetais apresentaram uma marcação mais intensa para esse receptor, o que sugere ser por um desequilíbrio na sua produção por parte das células, devido uma maior expressão ou por uma menor taxa de degradação dessa proteína. Alterações relacionadas à integrina α3 podem ter efeitos negativos sobre a diferenciação do pâncreas endócrino, por causar perturbações nos padrões de sobrevivência, diferenciação e proliferação das células das ilhotas, principalmente das células β, podendo afetar a ativação de vias de sinalização como FAK/MAPK/ERK, Akt/GSK3,Akt/XIAP/ e caspase3 (11)(77)(146). Diversos estudos mostram que a hiperglicemia pode promover o espessamento das membranas basais por aumentar a secreção e deposição de glicoproteínas como colágeno IV, fibronectina e lamininas (147). Realizamos a coloração pelo Ácido Período de Schiff (PAS) para evidenciar as membranas basais das ilhotas e verificar se havia alterações em sua estrutura. Por meio dessa técnica não identificamos espessamento, mas verificamos uma marcação intensa em ambas as porções endócrina e exócrina do pâncreas fetal do grupo experimental. Essa intensa marcação sugere aumento da síntese e deposição de polissacarídeos e glicoproteínas em todo o órgão, não limitando-se apenas às membranas basais, que mostrou ter deposição diminuída de laminina conforme discutido acima. Em um trabalho paralelo realizado por nosso grupo, utilizando o nosso modelo de gestação complicada por DM1, analisamos o colágeno IV nas membranas basais do pâncreas fetal de 19 dias e verificamos que diferente das lamininas, essa glicoproteína não sofreu alterações tanto na expressão quanto no padrão de deposição comparado com os animais controle[1.]

A hiperglicemia promove alterações pós-transducionais em diversas proteínas inclusive nas constituintes da MEC. Essas alterações incluem a formação excessiva de produtos finais de glicação avançada não enzimática (AGEs) (148)(149). Essas proteínas hiperglicadas formam ligações cruzadas intra e intermoleculares, tornando-se mais rígidas e resistentes às ações das metaloproteinases, comprometendo sua conformação, de forma irreversível, o que conduz a alterações no seu padrão de deposição no meio extracelular prejudicando o turnover da MEC (149). A hiperglicemia também diminui a expressão de

[1] Balbino CS. Estudo da expressão e distribuição do colágeno tipo IV no pâncreas fetal em um modelo de diabetes materno tipo 1 em camundongo. Iniciação científica. Laboratório da Biologia da reprodução e Matriz extracelular. Universidade de São Paulo. Julho 2018.

metaloproteinases como por exemplo, as MMP2 e MMP9, que no pâncreas participam diretamente do processo de migração dos precursores celulares endócrinos através dadegradação da MEC, tendo sua atividade regulada por TGF β (141)(150). Alterações na degradação da matriz e na sua remodelação levam a diminuição da ramificação pancreática, além de alterações morfológicas das ilhotas (139).

Semelhante ao relatado por Aerts L, et.al (1997) (3), nossa abordagem imuno-histoquímica para PCNA nas ilhotas pancreáticas mostrou redução no número de células em proliferação. A atividade proliferativa das células endócrinas no grupo experimental foi menor que a observada no grupo controle. Seria importante avaliar as células separadamente para identificar se há diminuição proliferativa de todos os tipos celulares ou se há redução por um tipo ou somente por parte das células β, que no último caso confirma a hiperplasia dessas células.

Não identificamos diferenças estatísticas significativas na expressão relativa de *Pdx1*, que foi analisada com base no pâncreas total não restringindo-se apenas as ilhotas. Seria interessante analisar a expressão de *Pdx1* nas ilhotas isoladamente, para verificar possíveis modificações na expressão desse fator por parte das células endócrinas, visto que são diretamente afetadas pela hiperglicemia. Por outro lado, nossos dados sugerem que além da diminuição da proliferação das células endócrinas, as células acinares também podem ter o seu padrão proliferativo afetado prejudicando o desenvolvimento pancreático como um todo, visto que os órgãos do grupo experimental apresentavam-se visualmente menores que os do grupo controle. A expressão de *Pdx1* diminuída pode levar a diminuição da proliferação das células β e demais células pancreáticas, promover aumento no número de células α, diminuir a síntese da insulina no pâncreas adulto e em casos mais extremos em que há depleção total de *pdx1,* a agnesia pancreática (151)(152)(153).

Além da importante participação no desenvolvimento pancreático, *Pdx1* juntamente com outros fatores de transcrição, regula a síntese de insulina por meio da ativação de seus precursores. (154)(155). A hiperglicemia altera a expressão de diversos genes importantes para o desenvolvimento, como por exemplo, Foxo1, fator de transcrição inibitório da expressão de *Pdx1* que tem sua expressão aumentada no DM2 (154)(155). É possível que haja uma relação entre a diminuição da expressão de *Pdx1* nos animais expostos a hiperglicemia materna e aumento da expressão de Foxo1, o que poderá ser investigado em estudos futuros.

Pax4 é também um dos principais fatores de transcrição envolvidos na morfogênese das células β e atua como repressor da expressão de genes importantes para a diferenciação das células α (156). Mostramos que a expressão relativa desse fator está aumentada no

pâncreas quando desenvolvido sob condições de hiperglicemia materna, assim como visto em ilhotas diabéticas, que apresentaram o perfil proliferativo das células β aumentado (157). Embora em no nosso modelo, tenhamos avaliado o perfil proliferativo das células das ilhotas e não das células β separadamente, acreditamos que o aumento de P*ax4* seja o responsável pelo aumento da marcação para insulina, observado aqui, o que estaria relacionado ao aumento de células β nessas ilhotas. Além disso, foi previamente demonstrado que esse fator de transcrição é capaz de suprimir a proliferação das α (151), que poderia explicar a diminuição da marcação para glucagon nas ilhotas dos animais expostos a hiperglicemia materna.

7 CONCLUSÃO

Concluímos que a hiperglicemia materna 30-50 dias promove alterações no desenvolvimento do pâncreas endócrino fetal de camundongos, modificando diferencialmente o padrão de deposição de moléculas da membrana basal das ilhotas, associado a diminuição da atividade proliferativa das células endócrinas com aumento da massa funcional de células β. Acreditamos que o conjunto dessas alterações seja um indício de reprogramação das células do pâncreas endócrino, que levam a modificações na morfologia do órgão e de seu funcionamento. O estudo aprofundado desses achados iniciais são necessários para comprovar a reprogramação por parte dessas células e os efeitos a longo prazo.

REFERÊNCIAS*

1. Moraes V de, Toquinho. Aquarela. 1983.

2. Shih HP, Wang A, Sander M. Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2013;29(1):81–105.

3. Aerts L, Vercruysse L, Van Assche FA. The endocrine pancreas in virgin and pregnant offspring of diabetic pregnant rats. Diabetes Res Clin Pract. 1997;38(1):9–19.

4. Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Int J Epidemiol. 2013;42(5):1215–22.

5. Federation ID. IDF Atlas. 2015. 144 p

6. Steck AK, Rewers MJ. Genetics of type 1 diabetes. Clin Chem. 2011;57(2):176–85.

7. Gallen I. Type 1 Diabetes: Clinical Management of the Athlete. Clin Chem. 2012;367(9911):194.

8. Stirban A, Peter R, Tschoepe D. Complications of Type 1 Diabetes : New Molecular Findings. 2008;328–51.

9. Beattle GM, Rubins JS, Mally MI, Otonkoski T, Hayek A. Regulation of proliferation and differentiation of human fetal pancreatic islet cells by extracellular matrix, hepatocyte growth factor, and cell-cell contact. Diabetes. 1996;45:1223–8.

10. Jiang FX, Cram DS, DeAizpurua HJ, Harrison LC. Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic beta-cells. Diabetes. 1999;48(4):722–30.

11. Krishnamurthy M, Li J, Fellows GF, Rosenberg L, Goodyer CG, Wang R. Integrin α3, but not β1, regulates islet cell survival and function via PI3K/Akt signaling pathways. Endocrinology. 2011;152(2):424–35.

12. Jennings RE, Berry AA, Strutt JP, Gerrard DT, Hanley NA. Human pancreas development. Development. 2015;

13. Favaro RR, Salgado RM, Covarrubias AC, Bruni F, Lima C, Fortes ZB, et al. Long-term type 1 diabetes impairs decidualization and extracellular matrix remodeling during early embryonic development in mice. Placenta. 2013;34(12):1128–35.

14. Sanches JC, Favaro RR, Barrence FC, Bevilacqua E, Fortes ZB, Zorn TMT. Distinct effects of short- and long-term type 1 diabetes to the placental extracellular matrix and fetal development in mice. Placenta. 2017;53:1–7.

15. Sanches JC, Favaro RR, Barrence FC, Bevilacqua E, Fortes ZB, Zorn TMT. Distinct effects of short- and long-term type 1 diabetes to the placental extracellular matrix and fetal development in mice. Placenta. 2017;53:1–7.

16. Favaro RR, Salgado RM, Raspantini PR, Fortes ZB, Zorn TMT. Effects of long-term diabetes on the structure and cell proliferation of the myometrium in the early

pregnancy of mice. Int J Exp Pathol. 2010;91(5):426–35.

17. Dean L, McEntyre J. The Genetic Landscape of Diabetes. Genet Landsc Diabetes. 2004;(Md):1–20.

18. Wilcox G. Insulin and Insulin. 2005;26(May):19–39.

19. Brownlee M. Biochemicstry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001;414(December):813–20.

20. Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. Annu Rev Biochem. 1981;50(1):385–432.

21. Lomas J, Anderson GM, Dominick-Pierre Ka, Vayda E, Enkin MW, Hannah WJ. Type Idiabetes mellitus. A chronic autoimmune. N Engl J Med. 1989;321(19):1306–11.

22. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 2004;27(5):1047–53.

23. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica Diabetes Mellitus. 2006.

24. Federation ID. IDF Atlas. 2017. 144 p.

25. You WP, Henneberg M. Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: The role of natural selection and life expectancy at birth. BMJ Open Diabetes Res Care. 2016;4(1):1–7.

26. Hrabovsky M. The Epidemiology of Type 1 Diabetes Mellitus. Intech open. 2018;2:64.

27. Shulman RM, Daneman D. Type 1 diabetes mellitus in childhood. Medicine (Baltimore). 2010;38(12):679–85.

28. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Clinical review Type 1 diabetes: recent developments. Br Med J. 2004;328(1):750–4.

29. Jun HS, Yoon JW. The role of viruses in Type I diabetes: Two distinct cellular and molecular pathogenic mechanisms of virus-induced diabetes in animals. Diabetologia. 2001;44(3):271–85.

30. Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. Childhood Vaccination and Type 1 Diabetes. N Engl J Med. 2004;350(14):1398–404.

31. Islam ST, Srinivasan S, Craig ME. Environmental determinants of type 1 diabetes: A role for overweight and insulin resistance. J Paediatr Child Health. 2014;50(11):874–9.

32. Acharjee S, Ghosh B, Al-Dhubiab BE, Nair AB. Understanding type 1 diabetes: Etiology and models. Can J Diabetes. 2013;37(4):269–76.

33. Bruno G, Runzo C, Cavallo-Perin P, Merletti F, Rivetti M, Pinach S, et al. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30-49 years: The population-based registry in

the province of Turin, Italy. Diabetes Care. 2005;28(11):2613–9.

34. Lecture KCB. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. Diabetes. Diabetes. 1994;43:1066–85.

35. RP1. R. Antagonist: diabetes and insulin resistance–philosophy, science, and the multiplier hypothesis. J Lab Clin Med. 1995;125(5):560–4.

36. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. Front Med China. 2013;7(1):14–24.

37. Spaight C, Gross J, Horsch A, Puder JJ. Gestational diabetes mellitus. Endocr Dev. 2016;31:163–78.

38. Benhalima K, Devlieger R, Van Assché A. Screening and management of gestational diabetes. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2015;29(3):339–49.

39. Wei YM, Yang HX. Diagnosis and management of gestational diabetes mellitus in China. Chin Med J (Engl). 2012;125(7):1206–8.

40. Casson I, Clarke C, Howard C, McKendrick O, Pennycook S, Pharoah P, et al. Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. Bmj. 1997;315(7103):275–8.

41. M Makhseed, V. M. Musini, M. A. Ahmed J A-H. Placental pathology in relation to the White's classification of diabetes mellitus. Archives of Gynecology and Obstetrics. 2002;136–40.

42. Oh W, Gelardi NL, Cha CJ. Maternal hyperglycemia in pregnant rats: Its effect on growth and carbohydrate metabolism in the offspring. Metabolism. 1988;37(12):1146–51.

43. Marco LJ, Mccloskey K, Vuillermin PJ, Burgner D, Said J, Ponsonby A. Cardiovascular Disease Risk in the Offspring of Diabetic Women : The Impact of the Intrauterine Environment. Exp Diabetes Res. 2012;2012.

44. Akcakus M, Koklu E, Baykan A, Yikilmaz A, Coskun A, Gunes T, et al. Macrosomic newborns of diabetic mothers are associated with increased aortic intima-media thickness and lipid concentrations. Horm Res. 2007;67(6):277–83.

45. Mason RM. Extracellular Matrix Metabolism in Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2004;14(5):1358–73.

46. Bruning JC, Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science (80-). 2000;289(5487):2122–5.

47. Correia-Santos AM, Vicente GC, Suzuki A, Pereira AD, dos Anjos JS, Lenzi-Almeida KC, et al. Maternal use of flaxseed oil during pregnancy and lactation prevents morphological alterations in pancreas of female offspring from rat dams with experimental diabetes. Int J Exp Pathol. 2015;96(2):94–102.

48. Mayer C, Joseph KS. Fetal growth: A review of terms, concepts and issues relevant to obstetrics. Ultrasound Obstet Gynecol. 2013;41(2):136–45.

49. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K CP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. Diabetologia. 1993;36:5.

50. Tuovinen S, Aalto-Viljakainen T, Eriksson JG, Kajantie E, Lahti J, Pesonen AK, et al. Maternal hypertensive disorders during pregnancy: Adaptive functioning and psychiatric and psychological problems of the older offspring. BJOG An Int J Obstet Gynaecol. 2014;121(12):1482–91.

51. Himmelmann K, Himmelmann A, Niklasson A SA. Hypertension in pregnancy and size at birth. Blood Press. 1996;5:6.

52. Gray PH, O'Callaghan MJ, Harvey JM, Burke CJ PD. Placental pathology and neurodevelopment of the infant with intrauterine growth restriction. Dev Med Child Neurol. 1999;41:16–20.

53. Barker DJP. Mothers, Babies and Health in Later Life. Churchill Livingst. 1998;2.

54. Moritz KM, Evans RG, Hoppe CC, Cullen-McEwen LA, Bertram JF, Dowling J, et al. Combined prenatal and postnatal protein restriction influences adult kidney structure, function, and arterial pressure. Am J Physiol Integr Comp Physiol. 2006;292(1):R462–9.

55. Stuart RO, Bush KT, Nigam SK. Changes in global gene expression patterns during development and maturation of the rat kidney. Proc Natl Acad Sci. 2002;98(10):5649–54.

56. Woodall SM, Johnston BM, Breier BH GP. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. Pediatr Res. 1996;40:438–43.

57. Longnecker D. Anatomy and Histology of the Pancreas. Am Pancreat Assoc. 2017;1–26.

58. Dale BE. Anatomy of the pancreas.pdf. The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease. 1993. p. 1–8.

59. Abraham L. Kierszenbaum, M.D. PD. Histologia e Biologia Celular Uma Introdução à Patologia. 2nd ed. Ltda EE, editor. Rio de Janeiro - RJ - Brasil; 2008. 495-498 p.

60. In't Veld, P., & Smeets S. Microscopic Anatomy of the Human Islet of Langerhans. Islets of Langerhans. 2014;2:1–18.

61. Carvalho CPF, Barbosa HCL, Britan A, Santos-Silva JCR, Boschero AC, Meda P, et al. Beta cell coupling and connexin expression change during the functional maturation of rat pancreatic islets. Diabetologia. 2010;53(7):1428–37.

62. Wong HY, Ahrén B, Lips CJM, Höppener JWM, Sundler F. Postnatally disturbed pancreatic islet cell distribution in human islet amyloid polypeptide transgenic mice. Regul Pept. 2003;113(1–3):89–94.

63. Hong EG, Noh HL, Lee SK, Chung YS, Lee KW, Kim HM. Insulin and glucagon secretions, and morphological change of pancreatic islets in OLETF rats, a model of type 2 diabetes mellitus. J Korean Med Sci. 2002;17(1):34–40.

64. Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, Sgroi A, Muller YD, et al. Unique arrangement of α- and β-cells in human islets of Langerhans. Diabetes. 2010;59(5):1202–10.

65. Martin F, Soria B. Glucose-induced in single human. Imaging. 1996;20:409–14.

66. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. J Histochem Cytochem. 2005;53(9):1087–97.

67. Fowler JL, Lee SSY, Wesner ZC, Olehnik SK, Kron SJ, Hara M. Three-Dimensional Analysis of the Human Pancreas. Endocrinology. 2018;159(3):1393–400.

68. El-Gohary Y, Sims-Lucas S, Lath N, Tulachan S, Guo P, Xiao X, et al. Three-Dimensional Analysis of the Islet Vasculature. Anat Rec. 2012;295(9):1473–81.

69. Konstantinova I, Lammert E. Microvascular development: Learning from pancreatic islets. BioEssays. 2004;26(10):1069–75.

70. Lara R. Nyman, 1 K. Sam Wells, 2 W. Steve Head, 2 Michael McCaughey 2, Eric Ford, 1 Marcela Brissova, 1 David W. Piston 2 and Alvin C. Powers1. Real time, multidimensional in vivo imaging used to investigate blood flow in mouse pancreatic islets. J Clin Invest. 2008;118(11):3790–7.

71. Nyman LR, Ford E, Powers AC, Piston DW. Glucose-dependent blood flow dynamics in murine pancreatic islets in vivo. Am J Physiol Metab. 2010;298(4):E807–14.

72. Ahrén B. Autonomic regulation of islet hormone secretion - Implications for health and disease. Diabetologia. 2000;43(4):393–410.

73. Havel, P. J., & Ahren B. Activation of Autonomic Nerves and the Adrenal Medulla Contributes to Increased Glucagon Secretion During Moderate Insulin-Induced Hypoglycemia in Women. Diabetes. 1997;5:801–7.

74. Gilliam LK, Palmer JP, Jr GJT. Tyraminemediated activation of sympathetic nerves inhibits insulin secretion in humans. 2014;92(10):4035–8.

75. van Deijnen JHM, Hulstaert CE, Wolters GHJ, van Schilfgaarde R. Significance of the peri-insular extracellular matrix for islet isolation from the pancreas of rat, dog, pig, and man. Cell Tissue Res. 1992;267(1):139–46.

76. Ziolkowski AF, Parish CR, Sado Y, Ninomiya Y, Simeonovic CJ, Rodgers RJ. Molecular composition of the peri-islet basement membrane in NOD mice : a barrier against destructive insulitis. 2008;1680–8.

77. Arous C, Wehrle-Haller B. Role and impact of the extracellular matrix on integrin-mediated pancreatic β-cell functions. Biol Cell. 2017;109(6):223–37.

78. Korpos E, Simeonovic CJ, Wight TN, Bogdani M, Sorokin L, Parish CR. Extracellular Matrix Components in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. Curr Diab Rep. 2014;14(12).

79. Rahier J, Wallon J, Henquin JC. Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. Diabetologia. 1981;20(5):540–6.

80. Hara M, Miller K, Wojcik P, Kim A, Jo J, Kilimnik G. Islet architecture: A comparative study. Islets. 2010;1(2):129–36.

81. Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M. Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. Islets. 2010;2(3):135–45.

82. Li W-C, Ouziel-Yahalom L, Sharma A, Weir GC, Bonner-Weir S, Guo L. -Cell Growth and Regeneration: Replication Is Only Part of the Story. Diabetes. 2010;59(10):2340–8.

83. Jung H. On the origin of the Glagolitic alphabet. Proc Scr. 2012;10(8–10):89–120.

84. Häring H-U, Aichler M, Irmler M, Wang-Sattler R, Leitzinger C, Gerdes J, et al. Identification of proliferative and mature β-cells in the islets of Langerhans. Nature. 2016;535(7612):430–4.

85. H E. Developmental biology of the pancreas. Diabetes 50. Suppl 1. 2001;1580:S5–S9.

86. Georgia S, Bhushan A. B Cell Replication Is the Primary Mechanism for Maintaining Postnatal B Cell Mass. J Clin Invest. 2004;114(7):963–8.

87. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic. Nature. 2004;(model 3):41–6.

88. Zajicek G , Arber N , Schwartz-Arad D AI. Streaming pancreas: islet cell kinetics. Diabetes Res. 1990;13:121–5.

89. Kodama S, Kühtreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL. Islet Regeneration during the Reversal of Autoimmune Diabetes in NOD Mice. Science (80-). 2003;302(5648):1223–7.

90. Liew CG, Andrews PW. Stem cell therapy to treat diabetes mellitus. Rev Diabet Stud. 2008;5(4):203–19.

91. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. Neurogenin3 Is Required for the Development of the Four Endocrine Cell Lineages of the Pancreas. Proc Natl Acad Sci

U S A. 2000;97(4):1607–11.

92. Tsai M-J, Huang H-P, Naya FJ, Leiter AB, Qiu Y, DeMayo FJ, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. Genes Dev. 2008;11(18):2323–34.

93. Thorens B, Guillam MT, Beermann F, Burcelin R, Jaquet M. Transgenic reexpression of GLUT1 or GLUT2 in pancreatic β cells rescues GLUT2-null mice from early death and restores normal glucose-stimulated insulin secretion. J Biol Chem. 2000;275(31):23751–8.

94. Mansouri A, St-Onge L, Gruss P. Role of Pax genes in endoderm-derived organs. Trends Endocrinol Metab. 1999;10(4):164–7.

95. Kallman F, Sciences B. Structure Pancreatic of Differentiating Culture Mouse in Transfilter. J Cell Biol. 1960;

96. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. 1996;995:983–95.

97. Fujitani Y. Transcriptional regulation of pancreas development and β-cell function. Endocr J. 2017;64(5):477–86.

98. Gelaye B, Rondon M, Araya PR, A PM. ECM signaling regulates collective cellular dynamics to control pancreas branching morphogenesis. 2016;3(10):973–82.

99. Pan FC, Wright C. Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland. Dev Dyn. 2011;240(3):530–65.

100. Pictet RL, Clark WR, Williams RH, Rutter WJ. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. Dev Biol. 1972;29(4):436–67.

101. Jiang FX, Georges-Labouesse E, Harrison LC. Regulation of laminin 1-induced pancreatic beta-cell differentiation by alpha6 integrin and alpha-dystroglycan. Mol Med. 2001;7(2):107–14.

102. Krishnamurthy M, Wang R. Integrins and extracellular matrices in pancreatic tissue engineering. Front Biosci Sch Ed. 2009;1(February 2009):477–91.

103. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. 2013;326(5957):1216–9.

104. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. J Cell Sci. 2010;123(24):4195–200.

105. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. J Cell Biol. 2012;196(4):395–406.

106. Yue B. Biology of the Extracellular Matrix: An Overview. J Glaucoma. 2014;1–8.

107. Hynes RO YK. Extracellular Matrix Biology. Cold Spring Harb Lab Press. 2011;

108. Star VL, Kleinman HK, Cannon FB, Hassell JR, Laurie GW, Martin GR, et al. Basement membrane complexes with biological activity. Biochemistry. 2005;25(2):312–8.

109. Carter W, Edgar D, Hohenester E, E E, Jones J, Aumailley M, et al. A simplified laminin nomenclature. Matrix Biol. 2005;24(5):326–32.

110. Yurchenco, Holly Colognato PD. Form and Function: The Laminin Family of Heterotrimers. Dev Dyn. 2000;213–34.

111. Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. Matrix Biol. 2004;22(7):521–38.

112. Miner JH, Yurchenco PD. Laminin Functions in Tissue Morphogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20(1):255–84.

113. Timpl R, Brown JC. Supramolecular assembly of basement membranes. BioEssays. 1996;18(2):123–32.

114. Humphries JD. Integrin ligands at a glance. J Cell Sci. 2006;119(19):3901–3.

115. Horwitz AR, Huttenlocher A. Integrins in Cell Migration. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;1–17.

116. Sitterley G. Laminin. BioFiles. 2008;3(8):11.

117. Miao G, Zhao Y, Li Y, Xu J, Gong H, Qi R, et al. Basement membrane extract preserves islet viability and activity in vitro by up-regulating α3 integrin and its signal. Pancreas. 2013;42(6):971–6.

118. Bouvard D, Bengtsson T, Gustafsson E, Fässler R, Berna A, Aszódi A, et al. Functional Consequences of Integrin Gene Mutations in Mice. Circ Res. 2007;89(3):211–23.

119. Kesavan G, Sand FW, Greiner TU, Johansson JK, Kobberup S, Wu X, et al. Cdc42-Mediated Tubulogenesis Controls Cell Specification. Cell. 2009;139(4):791–801.

120. Li Z, Manna P, Kobayashi H, Spilde T, Bhatia A, Preuett B, et al. Multifaceted pancreatic mesenchymal control of epithelial lineage selection. Dev Biol. 2004;269(1):252–63.

121. O'Neil JJ, Weir GC, Taneja M, Bonner-Weir S, Sharma A, Tatarkiewicz K, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. Proc Natl Acad Sci. 2002;97(14):7999–8004.

122. Lundin K, Ustinov J, Otonkoski T, Korsgren O, Pulkkinen M-A, Gao R. Characterization of Endocrine Progenitor Cells and Critical Factors for Their Differentiation in Human Adult Pancreatic Cell Culture. Diabetes. 2007;52(8):2007–15.

123. Kantengwa S, Baetens D, Sadoul K, Buck CA, Halban PA, Rouiller DG. Identification and characterization of α3β1 integrin on primary and transformed rat islet cells. Exp Cell Res. 1997;237(2):394–402.

124. Jiang F-X, Harrison LC. Extracellular Signals and Pancreatic β-cell Development: A Brief Review. Mol Med. 2018;8(12):763–70.

125. Yebra M, Montgomery AMP, Diaferia GR, Kaido T, Silletti S, Perez B, et al. Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins α6β4 and α3β1 regulates epithelial cell adhesion and migration. 2003;5:695–707.

126. Zorn TMT, Bevilacqua E, Abrahamsohn P. Collagen remodeling during decidualization in the mouse. Cell Tissue Res. 1986;244(2):443–8.

127. San Martin S, Soto-Suazo M, Ferreira de Oliveira S, Aplin JD, Abrahamsohn P, Zorn TMT. Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. Reproduction. 2003;125(4):585–95.

128. Salgado RM, Favaro RR, San Martin S, Zorn TMT. The estrous cycle modulates small leucine-rich proteoglycans expression in mouse uterine tissues. Anat Rec. 2009;292(1):138–53.

129. Favaro RR, Aplin JD, Zorn TM, Capelo LP, Salgado RM, Glazier JD. Hormone-regulated expression and distribution of versican in mouse uterine tissues. Reprod Biol Endocrinol. 2009;7(1):60.

130. Salgado RM, Favaro RR, Zorn TMT. Modulation of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) expression in the mouse uterus by estradiol and progesterone. Reprod Biol Endocrinol. 2011;9(1):22.

131. Favaro RR, Salgado RM, Raspantini PR, Fortes ZB, Zorn TMT. Effects of long-term diabetes on the structure and cell proliferation of the myometrium in the early pregnancy of mice. Int J Exp Pathol. 2010;91(5):426–35.

132. Favaro RR, Salgado RM, Covarrubias AC, Bruni F, Lima C, Fortes ZB, et al. Long-term type 1 diabetes impairs decidualization and extracellular matrix remodeling during early embryonic development in mice. Placenta. 2013;34(12):1128–35.

133. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods. 2001;25(4):402–8.

134. Chen YW, Chenier I, Tran S, Scotcher M, Chang SY, Zhang SL. Maternal diabetes programs hypertension and kidney injury in offspring. Pediatr Nephrol. 2010;25(7):1319–29.

135. Holemans K, Aerts L, Van Assche F a. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. J Physiol. 2003;547(Pt 1):11–20.

136. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities.

Diabetes. 2005;54 Suppl 2(6):S97-107.

137. Wewer Albrechtsen NJ, Kuhre RE, Pedersen J, Knop FK, Holst JJ. The biology of glucagon and the consequences of hyperglucagonemia. Biomark Med. 2016;10(11):1141–51.

138. Campbell JE, Drucker DJ. Islet α cells and glucagon-critical regulators of energy homeostasis. Nat Rev Endocrinol. 2015;11(6):329–38.

139. Kervran A, Randon J. Development of insulin release by fetal rat pancreas in vitro. Effects of glucose, amino acids, and theophylline. Diabetes. 1980;29(9):673–8.

140. Gittes GK, Galante P, Hanahan D, Rutter WJ, Debase HT. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. Development. 1996;122(2):439–47.

141. Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. Genes Dev. 2001;15(2):111–27.

142. Guldager Kring Rasmussen D, Karsdal MA. Laminins. Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure, Function and Biomarkers. 2016. 163-196 p.

143. Daoud J, Petropavlovskaia M, Rosenberg L, Tabrizian M. The effect of extracellular matrix components on the preservation of human islet function in vitro. Biomaterials. 2010;31(7):1676–82.

144. Selg M, Horn N, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. Expression and Function of Laminins in the Embryonic and Mature Vasculature. Physiol Rev. 2005;85(3):979–1000.

145. Rodgers KD, Barritt L, Miner JH, Cosgrove D. The laminins in the murine inner ear: Developmental transitions and expression in cochlear basement membranes. Hear Res. 2001;158(1–2):39–50.

146. Llacua A, De Haan BJ, Smink SA, De Vos P. Extracellular matrix components supporting human islet function in alginate-based immunoprotective microcapsules for treatment of diabetes. J Biomed Mater Res - Part A. 2016;104(7):1788–96.

147. Wahab NA, Schaefer L, Weston BS, Yiannikouris O, Wright A, Babelova A, et al. Glomerular expression of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor at different stages of diabetic nephropathy and their interdependent roles in mesangial response to diabetic stimuli. Diabetologia. 2005;48(12):2650–60.

148. Tarsio JF, Reger LA, Furcht LT. Molecular mechanisms in basement membrane complications of diabetes. Alterations in heparin, laminin, and type IV collagen association. Diabetes. 1988;37(5):532–9.

[2]149. Reger LA, Tsilibary EC, Furcht LT, Wohlhueter RM, Charonis AS, Kouzi-Koliakos K, et al. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. Diabetes. 2007;39(7):807–14.

150. Santos SAA Dos, Porto Amorim EM, Ribeiro LM, Rinaldi JC, Delella FK, Justulin LA, et al. Hyperglycemic condition during puberty increases collagen fibers deposition in the prostatic stroma and reduces MMP-2 activity. Biochem Biophys Res Commun. 2017;493(4):1581–6.

151. Gao T, McKenna B, Li C, Reichert M, Nguyen J, Singh T, et al. Pdx1 maintains β cell identity and function by repressing an α cell program. Cell Metab. 2014;19(2):259–71.

152. Schisler JC, Becker TC, Mirmira RG, Nesher R, Iype T, Griffen SC, et al. Mechanism of insulin Gene Regulation by the Pancreatic Transcription Factor Pdx-1 . J Biol Chem. 2005;280(17):16798–807.

153. Robertson RP, Oseid EA, Tanaka Y, Hunter-Berger KK, Harmon JS, Gleason CE. In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression. Diabetes. 2007;48(10):1995–2000.

154. Montminy M, Johnson T, Ferreri K, Leonard J, Sharma S, Jhala US. Hormonal regulation of an islet-specific enhancer in the pancreatic homeobox gene STF-1. Mol Cell Biol. 2015;17(5):2598–604.

155. Guerra S Del, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetesin Human Type 2 Diabetes. 2014;54(March 2005):727–35.

156. Smith SB, Ee HC, Conners JR, German MS. Paired-Homeodomain Transcription Factor PAX4 Acts as a Transcriptional Repressor in Early Pancreatic Development. Mol Cell Biol. 2015;19(12):8272–80.

157. Brun T, He KHH, Lupi R, Boehm B, Wojtusciszyn A, Sauter N, et al. The diabetes-linked transcription factor Pax4 is expressed in human pancreatic islets and is activated by mitogens and GLP-1. Hum Mol Genet. 2008;17(4):478–89.

[*]De acordo com International Comitee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts submited to Biomedical Journal: sample references. 2003 cited 2016 May 30. Available from:https://www.nlm.nih.gov/bsv/uniform requeriments.html

ANEXO(S)

ANEXO A- Protocolo para coloração por Hematoxilina e Eosina para pâncreas fetal

- Desparafinização

Estufa 60° C por 1 hora

Xilol I 40 minutos

Xilol II 40 minutos

- Hidratação

Álcool 100% I 20 minutos

Álcool 100% II 20 minutos

Álcool 95% 10 minutos

Álcool 70% 10 minutos

H2O destilada 10 minutos

- Coloração

Hematoxilina de Harris 6 minutos

Água corrente 5 minutos

Álcool 95% 30 segundos

- Desidratação

Álcool 100% I 5 minutos

Álcool 100% II 5 minutos

Álcool xilol 15 minutos

Xilol I 15 minutos

Xilol II 15 minutos

Montar com goma de damar e lamínula

ANEXO B-Protocolo para coloração pelo Ácido periódico de Schiff

- Desparafinização

Estufa 60° C por 1 hora

Xilol I 40 minutos

Xilol II 40 minutos

- Hidratação

Álcool 100% I 20 minutos

Álcool 100% II 20 minutos

Álcool 95% 10 minutos

Álcool 70% 10 minutos

H2O destilada 10 minutos

Ácido periódico 1% por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação

H2O destilada 30 segundos

Reativo de schiff por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação

Água sulfurosa 3 minutos

Água corrente por 60 minutos

Hematoxilina de Meyer 60 segundos

Água corrente 60 minutos

Desidratação

Álcool 100% I 5 minutos

Álcool 100% II 5 minutos

Álcool xilol 15 minutos

Xilol I 15 minutos

Xilol II 15 minutos

Montar com goma de damar e lamínula