



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICENTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Robson Barth

O HNF4 α controla o processo de expansão de massa de células beta induzida por dexametasona.

Florianópolis
2022

Robson Barth

O HNF4 α controla o processo de expansão de massa de células beta induzida por dexametasona.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Gustavo J. Dos Santos.

Florianópolis, 2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barth, Robson

O HNF4? controla o processo de expansão de massa de células beta induzida por dexametasona. / Robson Barth ; orientador, Gustavo Jorge dos Santos, 2022.

54 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. hnf4 alfa. 3. célula beta pancreática. 4. diabetes. I. Jorge dos Santos, Gustavo . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

Robson Barth

O HNF4 α controla o processo de expansão de massa de células beta induzida por dexametasona.

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 29 de julho de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Fernanda Barbosa Lima
Instituição UFSC

Prof.(a) Dr.(a) Renata Lataro
Instituição UFSC

Prof. Dr. Flaviano Lorenzon
Instituição UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Gustavo Jorge dos Santos
Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

“ A história de todo homem acaba em morte. Mas não somos homens, e não morreremos.”

(Morgana, rainha da congregação e assoladora do novo mundo).

Agradecimentos

À Yahweh e a todas as hordas celestes e bênçãos que foram a mim agraciadas durante toda a minha vida até o presente momento;

À mais grandiosa guerreira que conheço, Angelita, por ter me dado a vida, cuidado de mim, e sido o maior pilar de conforto e segurança que tenho.

À minha incrível vovó Namir por matar minha fome por várias vezes nesse meu caminho acadêmico.

À minha tia Isolene e meu tio Paulo por todo o suporte emocional e familiar.

Às minhas primas Jennifer e Caroline por compartilharem o sentimento acadêmico, as frustrações e as vitórias comigo.

Ao homem que eu tenho orgulho de chamar de orientador, o Prof. Dr. Gustavo Jorge dos Santos, que sempre me ajudou não só como professor e orientador, mas também como um amigo. Por todos os puxões de orelhas necessários, e que me permitiram evoluir como cientista.

Ao grupo de pesquisa do Lidoc que permitiram um ambiente de aprendizado incrível. Ana Paula Taschetto, Cinthia Rejane Corrêa, Guilherme Durante Cruz, Maciel Alencar Bruxel, Priscila Laiz Zimath. Um agradecimento especial a Flávia Natividade pois sem ela não teria conhecido o LidoC e por toda a ajuda durante a graduação. A Dra. Renata Silveiro por me proporcionar a oportunidade de trabalhar com ela em um projeto, fornecendo um conhecimento gigante.

Aos meus amigos mais próximos do laboratório Francieli Caroline De Ramos, Liana Franca, José Rodrigo Nascimento e Milena dos Santos Almeida, que foram e ainda são uma das melhores partes deste laboratório se tornando um dos alicerces que mantiveram muitas das minhas crises em *check*.

Aos meus amigos que a playstation me deu, Yago Pereira Araújo e Jean Fernandes Francisco. Amigas, irmãs, pessoas que fui abençoado de conhecer. Palavras não conseguem descrever a ajuda e o suporte que eu sempre tive. São o suporte do meu *multiplayer*, o meu trio, minha maior conquista dentro de um jogo.

Ao meu amigo João Pedro, que por muito tempo me aguentou, me ajudou e ainda está presente na minha vida.

Aos Colegas do LENEC, Flaviano e Tamires, pela ajuda e amizade.

À secretaria SIP, pela cordialidade e por sempre serem solícitos com as demandas apresentadas.

Aos colaboradores do biotério setorial do departamento de Fisiologia, por lavarem todas as instalações dos animais reduzindo a carga de trabalho durante os experimentos.

À equipe de serviços gerais da UFSC, mas em especial a equipe que é responsável pelo departamento de Fisiologia.

Aos funcionários do LAMEB, que me auxiliaram e colaboraram durante a execução deste projeto.

À Universidade Federal de Santa Catarina, que me acolheu nesta etapa importante da minha vida me proporcionando muito aprendizado.

À banca avaliadora, que se dispuseram a estar presente e por todas as contribuições a este trabalho. Por fim, agradeço a agência de fomento pelo suporte financeiro UNIEDU/FUNDES.

A todos, o meu mais sincero obrigado!

RESUMO

O Diabetes Mellitus é uma patologia de etiologia múltipla caracterizada por um panorama de hiperglicemia crônica que é considerado um grande problema de saúde pública. O Diabetes do tipo 1 resulta da depleção maciça das células β , já o tipo 2 decorre da depleção parcial dessas células, podendo ou não ser associado a resistência à insulina. A resistência à insulina é responsável pelo aumento da massa funcional das células β e por desencadear também a plasticidade pancreática. Desta maneira, o efeito da resistência à insulina cria uma forma de compensação nas células β e este efeito é, portanto, considerado alvo de interesse em pesquisas com intuito terapêutico para o tratamento do DM. Sabe-se que a plasticidade pancreática também pode ser afetada pela superexpressão ou ausência de fatores de transcrição específicos como PDX1 e o HNF4 α . O fator nuclear dos hepatócitos quatro alfa, HNF4 α , é um FT fundamental para as células β pancreáticas, pois regula a expressão de proteínas que participam no metabolismo da glicose, bem como na expressão gênica e secreção da insulina, além de participar também no processo de plasticidade pancreática. O HNF4 α controla o aumento de massa de células β em resposta ao estresse (e.g. prenhez) através da ativação da via quinase dois regulada por sinal extracelular ERK-ST5. Sabe-se ainda que o HNF4 α regula a ERK e esta controla a expressão e translocação nuclear do FT NeuroD e a ativação do PDX-1, essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento das ilhotas pancreáticas. O mecanismo de plasticidade pancreática permite que células que não são da linhagem β , tornem-se células β -like a fim de suprir uma demanda maior de insulina como no quadro de resistência à insulina. O processo de plasticidade pancreática pode comumente ser assimilado com o processo de aumento de massa de células β , pois ambos aumentam o seu número. Em comparação com os WT, os animais KO apresentaram uma profunda intolerância à glicose, baixa glicemia em jejum e secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS) aumentada. A DEXA induziu a RI tanto nos animais WT quanto nos KO. Ainda, a DEXA induziu expansão de massa de células β em ambos os grupos, e também aumentou a marcação do imunomarcador Ki67 somente no grupo WT evidenciando que a proliferação da massa de células β induzida por RI é por sua vez dependente do HNF4 α . Foi visto também que o aumento da expressão gênica de PDX1, PAX4 e NGN3 que é causado pelo tratamento com DEXA é dependente de uma via dependente de HNF4 α o que aponta este FT como uma possível alvo terapêutico no tratamento do DM.

Palavras chave: HNF4 α - Diabetes mellitus - Proliferação - resistência à Insulina Dexametasona

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a pathology of multiple etiology characterized by a chronic hyperglycemia panorama and it is considered a major public health care problem. Type 1 diabetes results from the massive β cell depletion, type 2 occurs the partial depletion of these β cells being associated sometimes with insulin resistance (IR) or not. Insulin resistance is responsible for the increase of the β cell mass and for triggering the pancreatic plasticity as well. Thus, the insulin resistance effect creates a compensation form on β cells, and this effect, therefore, considered a target of studies that have therapeutic aim to treat DM. It is well known that pancreatic plasticity also can be affected by specific transcription factors such as super expression or its absence like PDX1 and HNF4 α . The HNF4 α is a transcription factor fundamental to β cell, because it regulates the protein expression that participates in glucose metabolism, as well on gene expression of insulin secretion, also participating in the pancreatic plasticity process. HNF4 α controls the β cell mass increase in response to stress (e. g. pregnancy) through the activation of the two kinase pathways regulated by extracellular signal ERK-1/2. It is well known that HNF4 α regulates ERK and this control expression and nuclear translocation of the transcription factor NeuroD and the PDX1 activation, essentials to the development and survival of the pancreatic islet. Pancreatic plasticity mechanisms allow cells that are non- β cells to turn into β -like cells to supply an insulin increase demand like in IR. The pancreatic plasticity can commonly be assimilated with the increased β cell mass because both processes increase β cell numbers. In comparison to WT, KO mice presented a great glucose intolerance, low fasting glycemia and increased glucose stimulated insulin secretion. DEXA treatment induced IR in both WT and KO mice. Additionally, DEXA induced β cell proliferation mass in both groups, and increased KI67 immunostaining in WT showing that β cell proliferation mass IR-induced is HNF4 α dependent. It was also showed that PDX1, PAX4 and NGN3 was increased by DEXA treatment only on WT mice, and this increase is dependent on a HNF4 α way, pointing this transcription factor has a possible therapeutic target for DM.

**Keywords: HNF4 α - Diabetes mellitus - Proliferation - Insulin resistance
Dexamethasone**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rt-PCR de animais CRE	24
Figura 2 : Rt-PCR de animais LOXp	24
Figura 3 : Expressão gênica de HNF4a e sensibilidade à insulina.....	29
Figura 4 : Peso corporal e tolerância à insulina.....	30
Figura 5 : Imunohistoquímica dos animais KO e WT com e sem o tratamento com dexametasona.....	32
Figura 6 : Expressão genica em animais KO tratados com dexametasona.	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Diabetes Mellitus	12
1.2 DM1.....	12
1.3 DM2.....	13
1.4 DM MODY	14
1.5 Resistência à insulina.....	15
1.6 RI e a fisiologia de célula β	15
1.7 Modelos de estudo para RI	17
1.8 Glicocorticoides e massa de células β e função.....	17
1.9 HNF4a e as células β	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.2 Objetivo Geral.....	21
2.3 Objetivos Específicos	21
3 METODOLOGIA	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Genotipagem	23
3.3 Teste de tolerância à glicose (ipGTT)	25
3.4 Teste de tolerância à insulina (ipITT)	25
3.6 Imunohistoquímica	25
3.7 Morfometria	26
3.8 Análise estatística	26
4. RESULTADOS	28
5 DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÃO	40
7 REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica que afeta cerca de 537 milhões de pessoas no mundo todo (SUN H, SAEEDI P, *et al.*,2022). Sendo uma doença com tratamento caro tanto para o afetado quanto para todo o sistema de saúde global (SEURING, *et al.*, 2015). Esta patologia é caracterizada por um estado de hiperglicemia crônica, que causa alterações tanto no metabolismo de carboidratos e lipídios, quanto no de proteínas, e que resulta da secreção reduzida ou ausente do hormônio da insulina e/ou da redução da ação do mesmo em seus tecidos alvos. Segundo estimativas da federação internacional de diabetes (IDF) o número de casos de diabetes *mellitus* em adultos nos anos 2000 era de 151 milhões de pessoas. É possível afirmar que há um aumento de casos de DM em todo o mundo. Todavia, vale salientar que o número crescente de diabéticos não vai ao encontro do crescimento populacional, mostrando que há um aumento de diabéticos no mundo (SUN H, SAEEDI P, *et al.*,2022).

O DM é classificado em Diabetes *mellitus* tipo 1-2. Etiologicamente os dois principais tipos de DM são o diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e o diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

1.2 DM1

O DM1 representa 5-10% de todos os casos de DM no mundo, e decorre de uma resposta autoimune, no qual o sistema imune ataca e destrói as células β pancreáticas. Essa patologia então pode ser diagnosticada a partir da presença de imunomarcadores incluindo anticorpos das células das ilhotas, anticorpos para ácido glutâmico descarboxilase, insulina como o antígeno anti- tirosina fosfatase A2 (ADA 2022). O desenvolvimento do DM1 inicia após a apresentação de peptídeos para a

célula β através das células apresentadoras de antígenos (APCs). Sequencialmente as células APCs contendo o antígeno migram para os linfonodos pancreáticos onde interagem com linfócitos T $CD4^+$, que mediam a ativação de células T auto reativas (HULL, *et al.*, 2017). As células T são estimuladas repetitivamente pela interação com os APCs presentes em $CD11^+$ que causa a produção de citocinas como o IFN- γ . As $CD11$ podem produzir até 20 tipos de quimiocinas que têm a capacidade de se ligarem a receptores nas células T da ilhota (SANDOR, *et al.*, 2019). O processo de destruição das células β que precede a instauração do DM1 resulta na insuficiência da secreção de insulina, o que causa o aumento da produção hepática de glicose e a diminuição da captação desse carboidrato, o que resulta na hiperglicemia. A ausência da insulina também acarreta na quebra de triglicerídeos e na oxidação de ácidos graxos resultando no aumento de corpos cetônicos e, também em uma cetoacidose diabética. A expressão de mediadores inflamatórios é a principal causa de apoptose das células produtoras de insulina no DM1, pois uma vez ligada ao seu receptor, as citocinas ativam uma via de sinalização que culmina na ativação da apoptose extrínseca (DARIA, *et al.*, 2019).

1.3 DM2

O DM2, por sua vez, representa 90-95% dos casos de DM no mundo (SUN H, SAEEDI P, *et al.*, 2022) e pode decorrer de diversos fatores como obesidade, sedentarismo associado ao mal comportamento alimentar, viés genéticos e tratamentos excessivos com glicocorticoides que levam a resistência à insulina (RI). O DM2 embora não seja um processo linear, se inicia com a predisposição genética, e a resistência a insulina em tecidos periféricos, acarretado principalmente é seguida de uma alta demanda de insulina ao longo do tempo. A ilhota pancreática a fim de suprir esta necessidade por insulina, inicia um processo de adaptação que consiste no aumento do número de células produtoras de insulina e no tamanho delas, fenômenos estes denominados hiperplasia e hipertrofia. (FISCHER, *et al.*, 2020). Quando o quadro compensatório se estende durante longos períodos as células β s sofrem até três tipos de morte, que são apoptose, senescência e necrose. A apoptose se dá de forma controlada pelo organismo. A necrose se dá pelo estresse hipoxico, e

a senescência se dá pela diminuição de fatores de transcrição responsáveis pela programação fenótipo e identidade celular da célula β (KITAMURA *et al*, 2013). Após a instauração, pacientes com DM2 apresentam uma diminuição na secreção de insulina estimulada pela glicose decorrente da RI precedente ao estado diabético (ADA 2022). Antecedendo a patologia DM2, quando há uma instauração de uma hiperglicemia em tempos prolongados a alta demanda metabólica leva a um estresse oxidativo, estresse de retículo e um estresse hipóxico. Todos estes fatores se dão a partir da alta funcionalidade da célula β , que leva a um aumento da atividade mitocondrial, aumentando então o consumo de oxigênio (CHRISTENSEN, *et al*, 2019). No caso do DM2, a hiperglicemia presente em pacientes é resultante da incapacidade do pâncreas endócrino em suprir e secretar a quantidade de insulina necessária para todos os tecidos alvos. A alta e constante demanda pela insulina acarreta na falha das células β , bem como a apoptose da mesma, e, apoptose esta que está ligada a fatores como obesidade, disfunção nas células β (KITAMURA *et al*, 2013; IHARA *et al* 2005; CNOP *et al*, 2005)

1.4 DM MODY

Além dos tipos poligênicos (DM1 e DM2), existe também um tipo de DM que é causado por uma alteração monogênica, isto é, de apenas um gene. Este tipo de DM é denominado como *Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY) e apresenta, como característica, deficiência na secreção de insulina (GUPTA *et al*, 2004;2007). Este tipo de diabetes é resultante de mutações de 12 genes diferentes, podendo manifestar hiperglicemia hiperinsulinêmica na criança recém-nascida, contudo sendo uma hiperglicemia assintomática no jovem antes do seu diagnóstico. Uma das variações deste tipo de DM é o MODY1 que se desenvolve devido a atuação do *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* (HNF4 α), um fator de transcrição que, dentre suas funções, regula a expressão gênica da subunidade Kir6.2, uma subunidade dos canais para potássio sensível ao trifosfato de adenosina (ATP), um importante promotor da despolarização da bicamada fosfolipídica (GUPTA *et al*, 2007). Para que possa ser feito o diagnóstico do MODY, é necessário que seja feito um estudo do histórico familiar de diabetes, apresentando no mínimo três ou mais gerações sem

que haja a presença de fatores de risco como a obesidade ou a autoimunidade reativa contra tipos celulares pancreáticos (FAJANS *et al*, 2011).

1.5 Resistência à insulina

A RI é um estado fisiológico alterado no qual a insulina não consegue desenvolver sua função de forma efetiva no tecido alvo e está presente em várias desordens metabólicas como o DM2 (SAMUEL, *et al*, 2016). A RI está relacionada principalmente com a sensibilidade dos tecidos-alvo ao hormônio da insulina. Essa sensibilidade reduzida diminui a capacidade desses tecidos em utilizar glicose para funções específicas de forma mais efetiva (PERRY, *et al.*, 2014). Os mecanismos envolvidos na instauração da RI são inúmeros, podendo ser a ativação de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (DANDONA *et al.*, 2004; FEINSTAIN *et al.*, 1993) e de adiponectinas produzidas pelo tecido adiposo (SCHERER *et al.*, 1995). Mediadores inflamatórios como TNF- α , MCP- 1 e interleucinas são superregulados no quadro de RI. O TNF- α por si só afeta a sinalização da insulina pela fosforilação da serina do receptor IRS-1 reduzindo a expressão do transportador GLUT 4, o que diminui a entrada de glicose na célula. (PERALDI; SPIEGELMAN, 1998).

1.6 RI e a fisiologia de célula β

A célula β pancreática está localizada na porção endócrina do pâncreas, especificamente em um micro-órgão denominado ilhota pancreática. A ilhota pancreática consiste em um aglomerado celular que controla, entre outros processos, a homeostasia glicêmica. Na ilhota encontramos células β produtoras de insulina, que são o tipo celular mais abundantes na ilhota, as células α produtoras de glucagon, as células delta produtoras de somatostatina, as células epsilon produtoras de grelina e, as células pp produtoras de polipeptídios pancreáticos (J.M *et al*, 2008; COLLOMBAT *et al* 2003). A célula β pancreática tem como função produzir, armazenar e secretar a

insulina frente a um estímulo de glicose, sendo esta ação denominada GSIS (*glucose stimulated insulin secretion*), ou secreção de insulina estimulada pela glicose. Assim que a glicose é transportada para o interior da célula pelos transportadores GLUT (2 em roedores e 1 e 3 em humanos), ela é fosforilada pela glicoquinase (GCK) e então, entra no ciclo do ácido cítrico na mitocôndria a fim de produzir adenosina trifosfato (ATP). As moléculas de ATP liberadas no citoplasma alteram a razão entre o ATP e a adenosina difosfato (ADP), esse aumento da razão ATP/ADP promove o fechamento dos canais de K⁺ sensíveis a ATP (κ ATP) o que leva a uma perturbação no potencial de membrana da célula, causando uma despolarização. Essa despolarização ativa, ou seja, abre os canais de Ca²⁺ voltagem dependentes que culmina na entrada de Ca²⁺ na célula. Por sua vez, o Ca²⁺ ativa uma via de sinalização intracelular que envolve Calmodulina, CaMKII e proteínas SNARs que promove a exocitose dos grânulos de insulina (GAISANO, *et al.*, 2017). O quadro de RI, na célula β , causa alterações no funcionamento a fim de gerar uma resposta compensatória, aumentando a síntese de insulina e a sua secreção, bem como o aumento da massa de células secretora de insulina (AHREN, BO, *et al.*, 2002). A persistência do quadro de RI leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e estresse de retículo, pela atividade da mitocôndria, a perda de massa de células β sendo por degranulação e principalmente por apoptose. As vias de apoptose em células β de um organismo afetado pelo quadro de RI estão mais ativas por vias explicadas anteriormente, seja pela via extrínseca ou intrínseca de apoptose (BUTLER, Alexandra E. *et al.*, 2003).

Como foi dito acima, o DM é uma doença multifatorial caracterizada pela hiperglicemia crônica que, no DM2 é, geralmente, associada à RI nos tecidos periféricos (*e.g.* músculo, adiposo e fígado) (STEIL GM, 2001). Esse estado de RI desencadeia nas ilhotas pancreáticas uma hipersecreção compensatória de insulina na tentativa de restabelecer os níveis homeostáticos da glicose. As alterações iniciais nas ilhotas pancreáticas frente à RI vão desde uma alteração funcional em que observa aumento da produção de insulina e a sua secreção até a alterações estruturais como hipertrofia e/ou hiperplasia da célula β e plasticidade pancreática (KAHN SE, 2003; PAULSEN SJ, 2010; CIGLIOGA *et al* 2016).

1.7 Modelos de estudo para RI

Para avaliar os mecanismos que levam as células β pancreáticas a compensarem os efeitos hiperglicêmicos em um indivíduo insulinoresistente, utilizam-se diversos modelos animais. A título de exemplo: (a) animais alimentados com dieta hiperlipídica; (b) animais geneticamente obesos; e (c) animais expostos a altas doses de glicocorticoides. Os modelos utilizados a fim de verificar os mecanismos compensatórios das células β pancreáticas frente aos efeitos hipoglicêmicos podem ser diversos como:

Animais geneticamente obesos, que são animais que não produzem o hormônio da leptina (Ob/Ob) ou que tem o gene para os receptores de leptina reprimido (Db/Db), desenvolvem a RI devido a inflamação do tecido adiposo, que gera citocinas inflamatórias que afetam a captação de insulina (FISCHER, *et al*, 2020). A mesma situação ocorre com animais tratados com dietas com altas taxas lipídicas. Estes animais denominados animais *high-fat Diet* desenvolvem obesidade, aumento de gordura visceral e inflamação (HATORI, *et al*, 2012). Já os animais tratados com altas doses de glicocorticoides, desenvolvem a RI por mecanismos diferentes.

1.8 Glicocorticoides e massa de células β e função

Os glicocorticoides são hormônios esteróides sintetizados de forma endógena conhecido como um dos principais hormônios liberados em resposta ao estresse. Sua síntese ocorre no córtex adrenal, sob modulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Os glicocorticoides possuem efeitos no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, além de participar da modulação da homeostase glicêmica (ANDREWS *et al.*, 1999; RHEN *et al.*, 2005). A dexametasona (DEXA) é um glicocorticoide sintético, comumente utilizado em tratamentos clínicos devido à sua ação antialérgica, imunossupressora e anti-inflamatória (RAFACHO, *et al*, 2004). Porém a utilização crônica, ou em elevadas doses, deste fármaco pode acarretar efeitos adversos ao paciente, os quais podem ser reproduzidos em animais

(RAFACHO *et al.* 2017). Alguns exemplos destes quadros danosos são a resistência periférica à ação da insulina, desencadeamento do DM2 e intolerância à glicose (RAFACHO, *et al.*, 2004). Os glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) exercem função em eventos estressores como as inflamações, e apresenta como resposta a proliferação celular, por exemplo. Todavia, sua ação não restringe a situações de estresse, esses hormônios exercem também funções sobre a regulação nos níveis homeostáticos de macro nutrientes em vários tecidos, regulando, por exemplo, o metabolismo de proteínas e carboidratos, além de apresentarem funções cardiovasculares e ações imunossupressoras (RAFACHO, *et al.*, 2004).

Os glicocorticoides também participam da resposta ao jejum, auxiliando na disponibilização de substratos energéticos, assim podendo participar no processo de normoglicemia. Essa ajuda decorre dos processos bioquímicos que aumentam a glicose endógena como a gliconeogênese hepática, na diminuição da captação de glicose no músculo, e da lipólise e proteólise (PATEL *et al.*, 2014). Como mencionado, a DEXA é um glicocorticoide sintético, que assim como os outros glicocorticoides têm efeitos antagônicos aos efeitos da insulina nos tecidos periféricos, caracterizando-o como anti-insulínico (LIU *et al.*, 2013). Estes efeitos antagônicos induzem o organismo a um quadro chamado de resistência à insulina, ou seja, um indivíduo insulino-resistente, acarretando assim um aumento da liberação da glicose endógena, por meio do estímulo para a gliconeogênese hepática, captação menor de glicose muscular e lipólise (PATEL *et al.*, 2014), e com isso uma maior liberação de insulina para a compensação, aumentando a massa funcional de células β (RAFACHO *et al.* 2017; RAFACHO, *et al.*, 2004).

1.9 HNF4a e as células β

Na busca pelo entendimento dos processos que controlam o aumento da massa secretora de insulina muitas vias de sinalização são estudadas. Uma dessas vias é a via do fator de transcrição HNF4 α , a qual já foi relacionada com aumento de célula β em condições de prenhez.

O HNF4 α é um fator de transcrição, que faz parte do grupo dos receptores

hormonais intracelulares (NR2A1), expresso em vários tecidos, como fígado, rim, intestino e pâncreas (IHARA *et al.*, 2005). Em cada tecido ele apresenta especificidades, como no rim, onde sua expressão está ligada diretamente a maturação e proliferação de células do túbulo proximal afetando diretamente os processos de absorção (MARABLE, *et al.*, 2020). No fígado o HNF4 α participa principalmente na diferenciação e proliferação de hepatócitos, além de auxiliar na mediação e regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios (PARVIZ, *et al.*, 2003). Já no intestino ele está ligado a diferenciação epitelial (BABEU, *et al.*, 2008). O HNF4 α possui uma estrutura composta por diferentes domínios, entre eles um domínio de transativação N-terminal, um domínio de ligação ao DNA e uma região C-terminal que forma a interface de dimerização (IHARA, *et al.*, 2005; GONZÁLEZ, 2008). Existem 9 isoformas (HNF4 α 1 – HNF4 α 9) que são geradas por *splicing* alternativo ou por diferentes tipos de promotor. Devido a presença do promotor P2, as isoformas expressas em células β pancreáticas são HNF4 α -7, α 8 e α 9 (HANSEN, *et al.*, 2002; HUANG, *et al.*, 2008).

Nas células β , o HNF4 α controla genes relacionados com o metabolismo da glicose e genes que coordenam a expressão e secreção de insulina (WANG, *et al.*, 2000). Animais *Knockout* (KO) para o HNF4 α em células β (HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre) são intolerantes à glicose e apresentam hiperinsulinemia no jejum e no estado alimentado (Velasco *et al.*, 2016; Lu e Li, 2018). Além disso, ilhotas isoladas desses animais apresentam deficiência na secreção de insulina estimulada por glicose, devido à redução na expressão de diversas proteínas envolvidas no processo secretório, entre eles L-piruvato quinase e Kir6.2 (GUPTA, *et al.*, 2005). O HNF4 α regula também diretamente o aumento fisiológico da massa de célula β em resposta a eventos estressores (*e.g.* prenhez). A literatura mostra que fêmeas prenhez KO para o fator de transcrição HNF4 α não apresentam aumento na proliferação de células β , uma resposta que se é esperada devido a prenhez (GUPTA, *et al.*, 2007), e são intolerantes à glicose. Além disso, é possível afirmar que esses efeitos são devido a redução na via *Ras/ERK*, que por sua vez regulam o fluxo de sinais para eventos celulares cruciais, como diferenciação, proliferação e proteção contra morte celular (SANTOS DE DIOS, *et al.*, 2018). Mesmo sabendo muito sobre as funções do HNF4 α na fisiologia da célula β , principalmente no metabolismo da glicose, ainda não há muito conhecimento sobre o envolvimento deste fator de transcrição no processo de apoptose de células β . Na literatura, foi relatado que o HNF4 α controla

alguns genes relacionados com apoptose (GUPTA, *et al*, 2005; ODOM, *et al*, 2004), estando também envolvido na proteção da morte celular, induzida por estresse de retículo, através da ativação da via HNF4 α -GRP78-Anks4b (SATO, *et al*, 2012).

Independente da classificação etiológica (DM1, DM2 ou MODY) a fisiopatologia do DM reside na redução do número de células β funcionais, portanto, compreender o funcionamento dos mecanismos de expansão e proliferação, sejam eles por neogênese ou transdiferenciação de células β , é crucial para poder apontar novos alvos terapêuticos que possam ser utilizados no tratamento, impedimento e/ou remissão desta patologia. No presente trabalho, sendo utilizados o modelo KO para o HNF4 α , investigamos o papel desse fator de transcrição nos processos moleculares que regem a proliferação de células β . Hipotetizamos que o HNF4 α , além de ter um papel crucial no processo de aumento proliferação de células β , pode estar ligado ao processo de transdiferenciação de células não β em células do tipo β funcionais induzido pela DEXA.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

Avaliar o papel do HNF4 α na plasticidade das células β em modelo de animais com RI induzida por exposição ao glicocorticoide DEXA.

2.3 Objetivos Específicos

- a. Avaliar o metabolismo glicêmico dos animais HNF4 $\alpha^{loxP/loxP};Ins.Cre^+$;
- b. Avaliar a instauração da RI induzida pela DEXA;
- c. Avaliar o aumento de massa de células β induzido pela DEXA;
- d. Avaliar se em animais HNF4 $\alpha^{loxP/loxP};Ins.Cre^+$ a DEXA é capaz de promover aumento da massa secretora de insulina;
- e. Avaliar a importância do HNF4 α na maturação e identidade de células β ;

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) com o protocolo 4359060516 (Anexo 01). Para realizar esta pesquisa, utilizamos animais KO para o HNF4 α em tecido específico (HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre⁺). Foram utilizados camundongos C56BL/6 adultos (24 dias) machos. Os animais foram gerados pelo cruzamento entre duas linhagens, uma que possuía a enzima CRE recombinase acoplada ao promotor de insulina INS2, que é um promotor específico em células β pancreáticas (Ins.Cre⁺), e a linhagem que possuía o gene do fator de transcrição HNF4 α flanqueado por duas sequências loxP (HNF4 α ^{loxP/loxP}). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial no Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS/UFSC) em iluminação padrão (ciclo claro e escuro de 12/12 horas) e a temperatura de 22 \pm 2 °C. Durante todo o experimento, os animais tiveram acesso a água e ração padrão *ad libitum*, salvo os momentos de jejum necessários para procedimentos específicos. Para o desenvolvimento do estudo, os animais foram separados em 3 grupos:

Controle Salina (WT): após a genotipagem, os animais que não expressavam o gene para a enzima CRE e eram homocigotos para a sequência Lox (animais (HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre⁻) foram incluídos nesse grupo. Dez dias após a última injeção de Tamoxifeno (dia 17) os animais desse grupo receberam 10 injeções de salina em 5 dias consecutivos (1 injeção pela manhã e 1 injeção durante a tarde). Para simular o volume aplicado nos grupos DEXA, essas injeções de salina foram de volume igual ao peso do animal multiplicado por 12,5.

Controle Dexa (WT-DEX): Após a genotipagem, os animais que não expressavam o gene para a enzima CRE e eram homocigotos para a sequência Lox (animais HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre⁻) foram incluídos nesse grupo. Dez dias após a última injeção de tamoxifeno os animais desse grupo receberam 10 injeções de Dexametasona, durante 5 dias consecutivos (1 injeção pela manhã e 1 injeção durante a tarde). A

dose diária de DEXA foi de 100 mg/Kg, dividida em 50 mg/kg pela manhã e 50 mg/kg no período da tarde.

Knockout DEXA (KO-DEX): Após a genotipagem, os animais que expressavam o gene para a enzima CRE e eram homozigotos para a sequência Lox (animais HNF4 α loxP/loxP;Ins.Cre+) foram incluídos neste grupo. Dez dias após a última injeção de Tamoxifeno (dia 17) os animais desse grupo receberam 10 injeções de Dexametasona, em 5 dias consecutivos (1 injeção pela manhã e 1 injeção durante a tarde). A dose diária de DEXA foi de 100 mg/Kg, dividida em 50 mg/kg pela manhã e 50 mg/kg no período da tarde.

3.2 Genotipagem

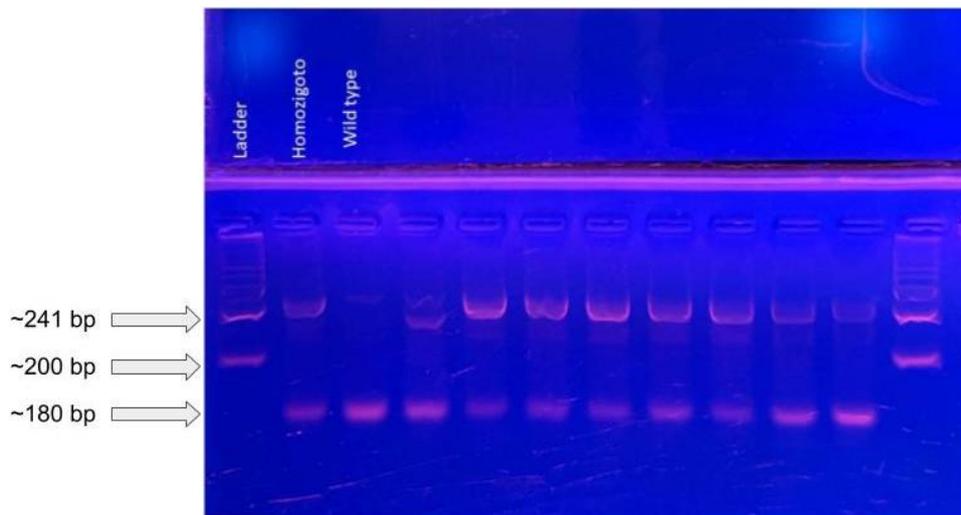
A genotipagem foi feita através da extração do DNA por meio da ponta da cauda do animal. O fragmento caudal foi incubado a 55 °C *overnight* em uma solução de proteinase K (Roche, USA). Para aferir a presença da enzima CRE recombinase, foi amplificado o gene CRE através do RT-PCR, seguindo instruções do laboratório fornecedor do animal B6.129X1(FVB)-Hnf4 α tm1.1Gonz/J (*Jackson Laboratory, USA*) e sendo considerado positivo quando a banda estivesse presente. Após verificar a presença da enzima CRE recombinase, foi verificado a presença das sequencias LOXp flanqueando o gene do Hnf4 α em ambas as fitas de DNA caracterizando o animal como homozigoto para as sequências LOXp. Este dado também foi aferido via RT-PCR seguindo os protocolos do mesmo laboratório de origem dos animais (*Jackson Laboratory, USA*). Os animais só foram considerados experimentais quando havia a presença da enzima CRE juntamente com as sequências LOXp homozigóticas.

Figura 1: Rt-PCR de animais CRE



Gel de agarose 1,5% após corrida de RT-PCR. As bandas coradas com o GelRed que é um marcador de ácidos nucleicos que juntamente com a frequência da luz UV permite a visualização dos ácidos nucleicos do DNA. A presença de bandas na posição equivalente a 410 bp neste gel confirma a presença da enzima CRE no animal que a banda representa.

Figura 2 : Rt-PCR de animais LOXp



Gel de agarose 1,5% após corrida de RT-PCR. As bandas coradas com o GelRed, um marcador de ácidos nucleicos que juntamente com a frequência da luz UV permite a visualização dos ácidos nucleicos do DNA. A presença de bandas na posição equivalente a 241 e 180 bp neste gel confirma a presença das sequências LOXp em ambas as fitas de DNA no animal que a banda representa.

3.3 Teste de tolerância à glicose (ipGTT)

Os animais foram mantidos em um jejum de 10-12 horas. Após este período foi aferido a glicemia de jejum por via de sangue coletado da ponta da cauda do animal com o aparelho *Accu-Check Advantage II*, e então administrado uma solução de glicose 50% (1 g/Kg de massa corporal) por via intraperitoneal. A glicemia foi verificada nos tempos 0, 15, 30, 60, 45, 60 e 120 depois da administração da solução de glicose.

3.4 Teste de tolerância à insulina (ipITT)

Depois da verificação basal da glicemia por via da coleta de sangue da ponta da cauda do animal (1 hora e meia de jejum), foi injetado insulina de forma intraperitoneal (1 U/kg de massa corporal) diluída em salina (0,9% de NaCl). A glicemia foi verificada nos tempos 0, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 min. A taxa de decaimento constante de glicose foi calculada das concentrações plasmáticas de glicose durante a fase de decaimento linear, utilizando a fórmula $0.693/t_{1/2}$.

3.5 Imunohistoquímica

Seguindo a eutanásia feita por isoflórano seguido de decaptação, foi feita a incisão abdominal no animal decapitado a fim de retirar o pâncreas. Após a retirada do pâncreas, o órgão foi fixado em uma solução de paraformaldeído 4% durante 24 horas. Seguindo o processo, o pâncreas foi embebido em parafina para realizar cortes histológicos de forma seriada. Após os cortes dos pâncreas no micrótomo, os cortes foram fixados em lâminas histológicas silânizadas para melhor fixação. Os cortes passaram pelo processo de desparafinização e então foram bloqueados com uma solução de PBS (*phosphate buffered saline* 0,05% *Tween* 20; 5% leite em pó desnatado) e incubados com o anticorpo primário para as proteínas alvo (*insulin*, *glucagon*, ki67) por duas horas em temperatura ambiente ou *overnight* em

temperatura de 4° C. Após fazer a lavagem com a solução PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário e então reveladas com DAB (diaminobenzidina). Os cortes então foram marcados com hematoxilina e selados com uma lamínula e foram analisados via *Axio Scan* com a ajuda do software *Zen blue edition*.

3.6 Morfometria

Os cortes histológicos foram escaneados pelo Axio Scan slide scanner (Zeiss, Germany) e o software *Zen blue edition* foi utilizado para análise quantitativa. Os dados da massa das ilhotas, célula β e célula α foram calculados utilizando uma fórmula onde a área total em μm^2 é dividida pela área total do pâncreas da lâmina μm^2 e multiplicada pela massa do pâncreas do animal em mg. A proporção de células β e células α foi calculada dividindo a área total de cada tipo celular pela área total da ilhota e expressa em porcentagem. A densidade da ilhota foi calculada dividindo o número de ilhotas pelo total da área do pâncreas em cm^2 . As ilhotas então foram divididas em grupos de acordo com o tamanho delas expresso em porcentagem do tamanho das ilhotas (0-5, 5-10, 10-20, e $> 20 \mu\text{m}^2$) em relação ao número total de ilhotas.

3.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc., USA). Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão da média (SEM). Foi considerado estatisticamente diferente quando $p < 0.05$. Foi verificado a presença de outliers utilizando o teste de Grubb's e a distribuição normal foi aferida pelos testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk ou D'Agostino. Os dados aprovados por ao menos um dos três testes foram

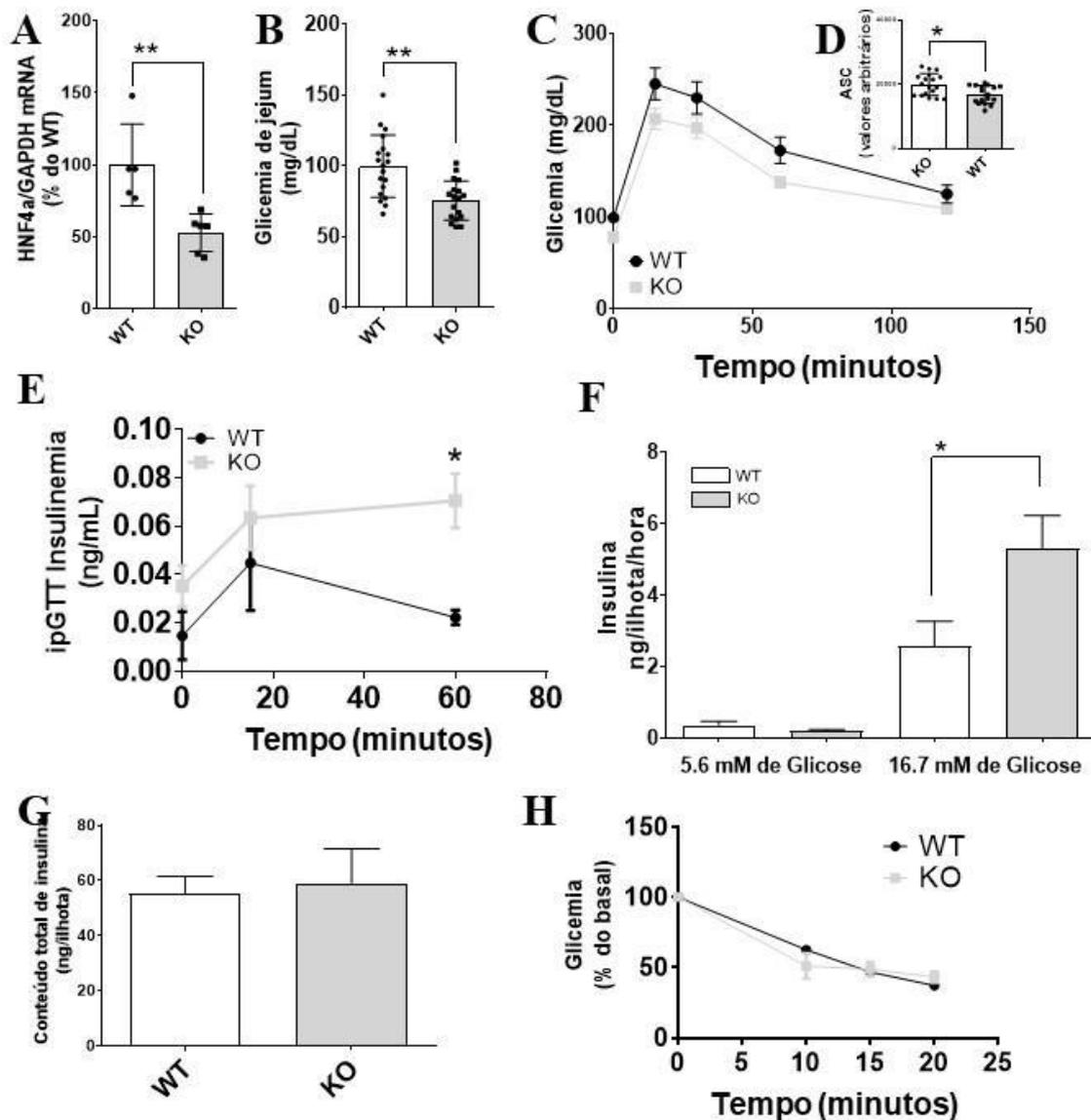
considerados de distribuição normal. Caso algum dado não seja considerado normal, então foi usado Kruskal-Wallis. As comparações entre os animais WT e KO foram feitas através do Teste T de *Student's*. As comparações entre os grupos WT, WT-DEX e KO-DEX foram feitas utilizando o teste de ANOVA de duas vias (fatores genotípicos e o tratamento com dexametasona) seguindo pelo teste de Tukey.

4. RESULTADOS

Destacamos que os resultados encontrados durante o desenvolvimento do mestrado em avaliação foram, juntamente com os dados obtidos na dissertação de uma Mestre do nosso grupo (Carolina Ruoso) publicados no periódico internacional Life Science (RUOSO, 2019). Assim, os dados mostrados na seção 4 – Resultados são aqueles publicados no paper “Hepatocyte Nuclear Factor 4- α (HNF4 α) controls the insulin resistance-induced pancreatic β -cell mass expansion (DOI - <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120213> - Anexo 02)”. Tendo em vista que para o completo entendimento da discussão, trazemos os dados das figuras 5 e 6 do artigo mencionado acima.

Antes de iniciar o tratamento com a DEXA, validamos o modelo de animal KO para o fator de transcrição (FT) HNF4 α analisando a expressão de mRNA do HNF4 α em ilhotas pancreáticas em animais KO e WT. Esta análise fora feita em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (Ruosso, *et al* 2019), e foi visto uma redução de 58% menos expressão de HNF4 α nos animais KO quando comparados com os animais WT (Fig. 1) validando assim o modelo de KO para o HNF4 α . Feito a validação genética, analisamos o perfil metabólico dos animais KO para o HNF4 α específico em células β pancreáticas, incluindo glicemia de jejum e a resposta destes animais frente a um estímulo de glicose durante o ipGTT. Em comparação com os animais WT, os animais KO mostraram uma menor glicemia de jejum (Fig. 1B) e maior eficiência em lidar com sobrecarga de glicose (Fig. 1C-D).

Figura 3 : Expressão gênica de HNF4a e sensibilidade à insulina.



(A) Expressão de mRNA de HNF4a/GAPDH entre os animais WT e KO, expressos como % do WT. (B) Nível glicêmico após 10 horas de jejum. (C) Níveis glicêmicos antes (0 min) e 15, 30, 60 e 120 minutos depois da administração de 1 g/kg de glicose (ipGTT) (D) área abaixo da curva do IpGTT. (E) Insulinemia durante o IpGTT. (F) Secreção de insulina estimulada por glicose a nível basal (5,6mM) e em solução de glicose concentrada (16.7mM). (G) Conteúdo de insulina total da ilhota. (H) níveis glicêmicos antes (0 min), 10, 15, e 20 minutos depois da administração intraperitoneal de 1 U/kg de insulina (ipITT) Dados apresentados com média ± SEM, *P<0,05, **P<0,01 vs WT. Os resultados estão apresentados da mesma forma que se encontram publicados (<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120213>).

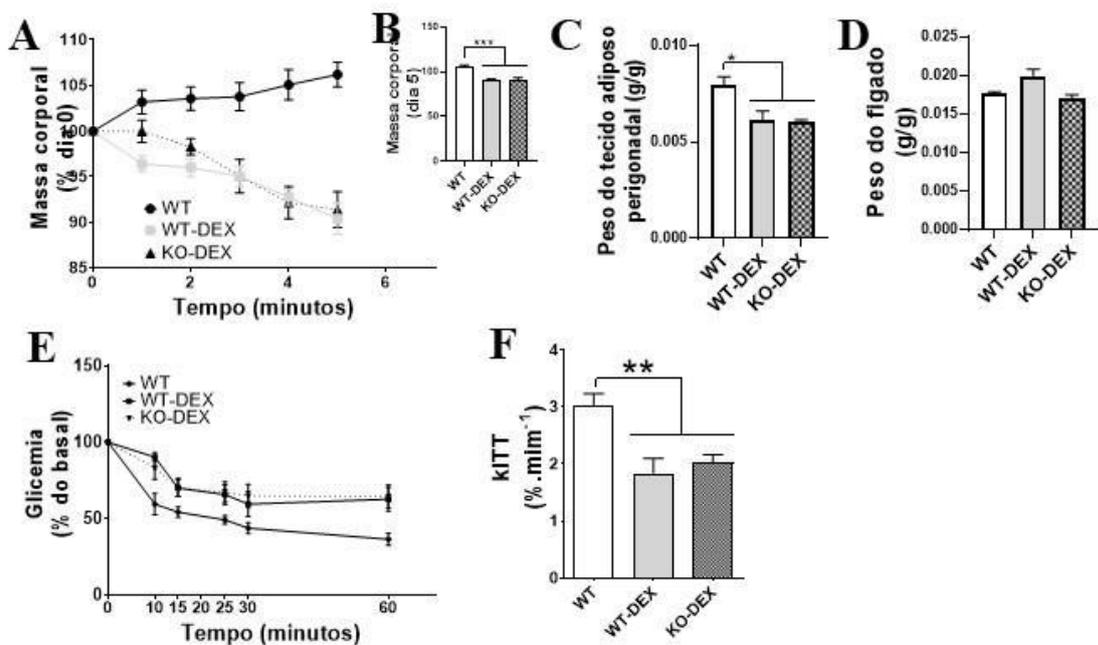
Baseado na tolerância à glicose aumentada e na glicemia de jejum reduzida observada nos animais KO, é que os animais KO poderiam estar hiperglicêmicos e que suas células β poderiam estar liberando uma maior quantidade de insulina quando estimuladas pela glicose. Avaliamos então a secreção de insulina

estimulada por glicose (GSIS) e a sensibilidade periférica à insulina dos animais WT e KO, e vimos que os animais apresentaram hiperinsulinemia durante o ipGTT (Fig. 1E).

Em relação a GSIS, observamos que as ilhotas dos animais KO secretavam mais insulina frente ao estímulo da glicose (Fig. 1F), sem alterações no conteúdo total de insulina (Fig. 1G), sugerindo que o aumento da GSIS pode decorrer de alterações na maquinaria secretória e não no conteúdo de insulina, nem mesmo no número de células β . Em comparação com os animais WT, não foi observada nenhuma alteração na sensibilidade à insulina (Fig. 1H) sugerindo então que a deleção do HNF4 α específico na célula β pancreática não promove nenhuma modificação na sinalização de insulina nos tecidos periféricos.

Após validarmos o modelo de KO para HNF4 α e caracterizá-lo metabolicamente, induzimos a RI administrando o glicocorticoide DEXA. Como esperado, o tratamento com DEXA induziu a RI em ambos os animais WT e KO (Fig. 2A-F).

Figura 4 : Peso corporal e tolerância à insulina



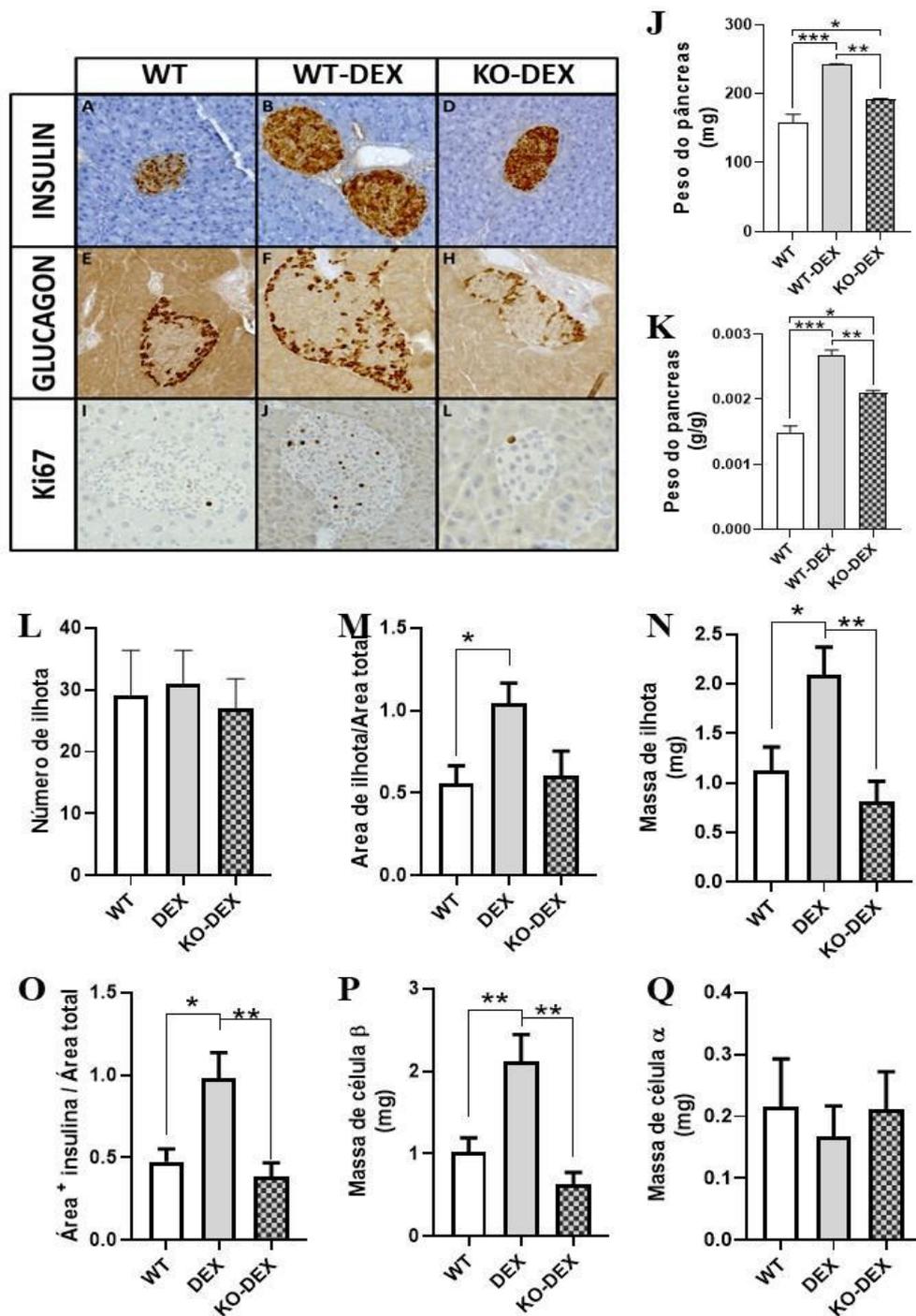
Efeitos do tratamento com DEXA no ganho de massa corporal e sensibilidade a insulina em animais WT e KO. (A) O ganho de massa corporal foi avaliado após (dia 0) e durante (dia 1- 5) o tratamento com DEXA. (A) Massa corporal total, % do dia 2 e (B) massa corporal do dia 5. (C) Peso do tecido adiposo perigonadal em g/g. (D) Peso total do fígado. (E) teste de tolerância a insulina e (F) KITT.

Dados apresentados com média \pm SEM, *P<0,05, **P<0,01. Os resultados estão apresentados da mesma forma que se encontram publicados (<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120213>).

Instaurada a RI nos grupos DEX, comparamos a morfologia do pâncreas entre WT, WT-DEX e KO-DEX. Além disso, analisamos a imunomarcação para Ki67, um marcador de proteína nuclear que indica proliferação celular.

O tratamento com DEXA aumentou o peso do pâncreas, todavia o aumento do peso foi atenuado no grupo KO-DEX quando comparado com o WT-DEX (Fig. 3J-K). Ainda, o tratamento com DEXA aumentou a imunoreatividade para insulina (Fig. 3A-C) e promoveu a hipertrofia de ilhotas marcadas (Fig. 3M-N), mas somente nos animais WT-DEX.

Figura 5 : Imunohistoquímica dos animais KO e WT com e sem o tratamento com dexametasona.



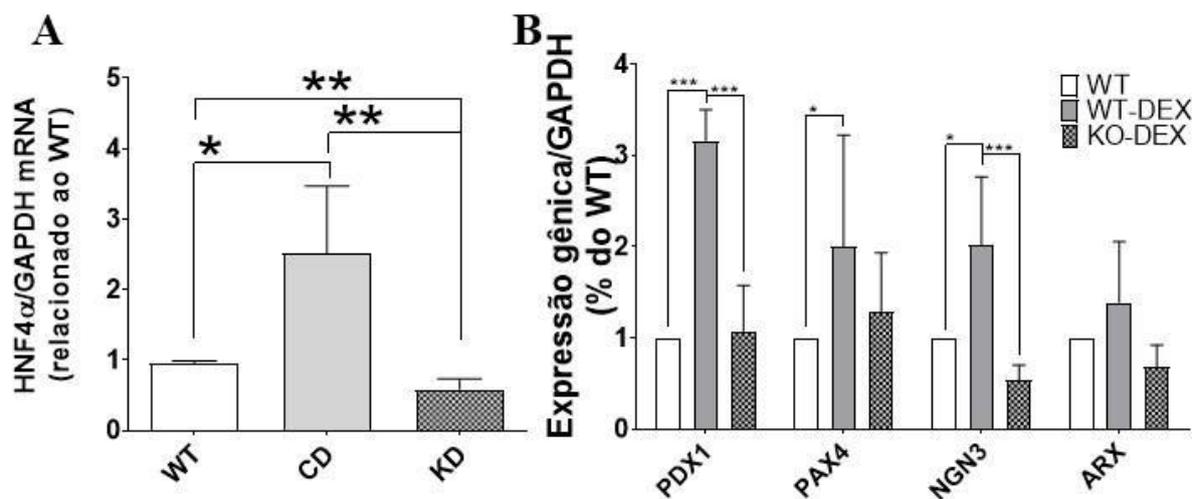
Análise da imunomarcagem para insulina, glucagon e Ki67 de animais WT e KO após a última injeção (salina para os WT e dexametasona para WT-DEX e KO). Imagens com um aumento de 20X. (J) Peso do pâncreas em mg. (K) Peso do pâncreas em g/g. (L) Número total de ilhotas, (M) área total de ilhota dentro do pâncreas, e (N) área da massa de ilhota em mg. (O) Área positiva para insulina no pâncreas. (P) Massa de células β e (Q) células α no pâncreas. Dados apresentados com média ± SEM, *P<0,05, **P<0,01. Os resultados estão apresentados da mesma forma que se encontram publicados (<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120213>), e na dissertação com o título “O papel do HNF4-alfa na expansão da massa de célula beta induzida por dexametasona” coautora do artigo em questão.

O tratamento com DEXA aumentou a área positiva para insulina (Fig. 3O) e a massa de células β (fig. 3P) somente no grupo WT-DEX, sem alterações na massa de células α (Fig. 3Q). Estes resultados mostram que mesmo que o tratamento com DEXA tenha instaurado a RI em animais KO (Fig. 2E-F), o tratamento não foi capaz de promover a expansão da massa de células β quando o HNF4 α está ausente. Estes resultados confirmam que o HNF4 α é essencial para a expansão de massa de células β induzida por RI.

Estes dados indicam que a expansão da massa de células provavelmente ocorreu devido ao aumento das células β preexistentes. A imunomarcagem para Ki67 foi significativamente maior no grupo WT-DEX (Fig. G-I). Devido a problemas técnicos, não conseguimos assegurar qual célula da ilhota estaria proliferando em resposta a DEXA. Contudo, baseado na localização da marcação para Ki67, podemos sugerir que a proliferação está acontecendo em células β . Ainda assim, independentemente do tipo celular em proliferação, nossos dados indicam que há uma dependência de HNF4 α nesse processo proliferativo

Após essas observações, nós viramos nossa atenção para a expressão de genes relacionados com a plasticidade pancreática. Primeiramente, vimos um aumento na expressão gênica do HNF4 α no grupo WT-DEX (Fig. 4A), sugerindo que o tratamento com DEXA estimula vias de sinalização que culminam no aumento da expressão gênica de HNF4 α . Estes fatos corroboram nossa hipótese que o HNF4 α é necessário para os efeitos da DEXA no modelo animal deste trabalho.

Figura 6 : Expressão genica em animais KO tratados com dexametasona.



(A) Expressão de mRNA de HNF4 α /GAPDH entre WT e WT-DEX e KO-DEX. (B) Expressão gênica de PDX1, PAX4, NGN3 e ARX em ilhotas dos animais WT, WT-DEX e KO-DEX. A análise da expressão gênica foi possível através do RT-PCR real time e o HNF4 α foi normalizado pela expressão de GAPDH. Data apresentada com média \pm SEM, *P<0,05, **P<0,01. Os resultados estão apresentados da mesma forma que se encontram publicados (<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120213>), e na dissertação com o título “O papel do HNF4-alfa na expansão da massa de célula beta induzida por dexametasona” coautora do artigo em questão.

Investigamos também a expressão gênica de fatores de transcrição indispensáveis para a plasticidade pancreática, tais como PDX1, PAX4, ARX e NGN3. O tratamento com DEXA aumentou a expressão de mRNA dos FT PDX1, PAX4 e NGN3 somente no grupo WT-DEX, indicando a participação do HNF4 α neste processo (Fig. 4B).

Com estes achados, nossos resultados sugerem incisivamente que a expansão da massa de células β induzida por RI requer um processo de proliferação e neogênese de células β , que por sua vez depende da atividade do HNF4 α .

5 DISCUSSÃO

O DM é uma disfunção metabólica caracterizada pela perda da função e ou massa de células β pancreáticas. O início do DM ocorre quando a produção de insulina não é capaz de suprir a necessidade fisiológica dos tecidos periféricos (OLIVER-KRASINSKI, *et al*, 2008.). Então, independente da sua etiologia (DM1, DM2 ou MODY), a fisiopatologia do DM reside na redução do número ou na deficiência funcional de células β . Portanto, qualquer tipo de DM será beneficiado por um tratamento que promova a regeneração de células β . Isto justifica o esforço intenso da comunidade científica para o desenvolvimento de uma nova fonte de células produtoras de insulina, para que haja uma reposição e ou regeneração terapêutica (AFELIK *et al*, 2017).

O pâncreas pode se adaptar a situações danosas, como por exemplo a gravidez e a obesidade, sendo essa adaptação o aumento de massa de células β , seja por replicação, hipertrofia e/ou neogênese (AL-KANDARI, *et al*, 2021). Apesar de haver muito progresso no tratamento do DM através dos anos, como terapia imunossupressora e transplante de ilhotas pancreáticas, muitas das vias de sinalização intracelular que controlam a expansão de massa de células secretoras de insulina não são conhecidas. Tendo isso em mente, nosso foco foi investigar o papel do HNF4 α na expansão da massa de células β em condições de RI.

A importância do HNF4 α para a ilhota pancreática é salientada pelo fato de que polimorfismos no gene que produz esse FT levam a um caso específico de DM conhecido como MODY1. Além disso, ratas com deficiência de HNF4 α em células β não apresentam expansão da massa de células β , esperadas na prenhez, apontando que a expansão da massa de células β é dependente em algum ponto da atividade do HNF4 α (EIZIRIK *et al*, 2009). O HNF4 α também participa do processo de plasticidade pancreática, e sabe-se que a superexpressão artificial deste FT é capaz de transformar células α em células do tipo β (SANGAN, *Et al.*, 2015).

A resistência à insulina na ilhota pancreática, serve como um gatilho para o início de alterações tanto na função (KAHN SE, 2003), quanto na estrutura (PAULSEN SJ, 2010) de células β pancreáticas. Então, a fim de esclarecer o papel do HNF4 α na expansão da massa de células β em um modelo animal de RI, nós utilizamos um

animal KO para HNF4 α específico para célula β , e expusemos o animal ao tratamento com DEXA.

Quando se fala em KO, espera-se que haja a deleção total do gene específico. Vimos que na análise feita no estudo anterior do nosso grupo (RUOSO, *et al* 2019) revelou uma deleção de cerca de 58% do HNF4 α . Porém nosso modelo KO é um modelo específico para célula β conhecido como INS2 e a análise efetuada foi em toda a ilhota. Com isso, outras células da ilhota pancreática, podem ainda expressar o gene do HNF4 α (MIURA, *et al*, 2006).

Além disso, observamos que os animais KO tinham deleção maior que 50% do gene do HNF4 α , validando o modelo de KO. Em seguida, avaliamos o perfil metabólico dos animais. Foi visto que os animais KO tinham uma glicemia de jejum menor e uma maior eficiência em lidar com cargas altas de glicose. Este achado vai em oposição a estudos já efetuados (GUPTA, *et al*, 2007,2005), que mostram que animais KO para o HNF4 α específico em células β são intolerantes à glicose. Entretanto, é necessário salientar que há uma diferença metodológica entre nossos estudos. Diferente dos estudos mencionados, nós avaliamos a tolerância à glicose 10 dias após a última dose de tamoxifeno, um período em que a deleção do HNF4 α e a disfunção da célula β ainda é precoce (GUPTA, *et al*, 2007.).

Como visto nos resultados, os animais KO apresentaram alta tolerância à glicose e uma glicemia de jejum reduzida, além de apresentarem hiperinsulinemia durante o ipGTT. Esta hiperinsulinemia pode ser explicada pela ausência do gene do HNF4 α em células β pancreáticas, podendo alterar a expressão de genes que controlam o processo secretório de insulina, visto que o HNF4 α é o principal regulador da expressão gênica da subunidade Kir 6.2 dos canais para K⁺ dependentes de ATP (K_{ATP}). A deleção gênica do HNF4 α em células β faz com que os canais K_{ATP} sejam inativados com mais facilidade, levando a uma liberação não controlada de insulina após o estímulo da glicose (GUPTA, *et al*, 2005). Além disso, é visto que mutações no gene do HNF4 α aumentam os níveis de mRNA de genes relacionados com o metabolismo da glicose e a GSIS, tais como o GLUT2, aldolase, canais K_{ATP} e a L-piruvato quinase (WANG *et al*, 2009).

Mesmo utilizando animais KO para o HNF4 α , nosso modelo não se caracteriza como um modelo DM MODY1. Para testar nossa hipótese sem nenhum viés, propusemos um modelo onde o início para o tratamento com DEXA foi quando o animal era knockout para HNF4 α , apresentando quaisquer das características do

MODY1. Quando o modelo KO foi validado, foi iniciada a indução da RI com glicocorticóides, uma vez que é sabido que glicocorticóides em excesso induzem alterações na sinalização da insulina em tecidos periféricos. Dessa forma, optamos por utilizar a DEXA como modelo de indução a RI por ser bastante utilizada e bem descrita na literatura (RUZZIN *et al*, 2005; BURÉN *et al*, 2002). Foi visto então de acordo com a literatura (PROTZEK *et al*, 2014) que o tratamento com DEXA pode instaurar a RI. Sabe-se que a RI é um grande indutor da expansão de células β (PAULSEN SJ, 2010) e, por este motivo, conseguimos avaliar e comparar a morfologia do pâncreas dos grupos de animais e aferir que houve proliferação celular no grupo WT-DEX por meio do marcador Ki67 (JURIKOVA *et al*, 2016).

Nossos resultados mostraram que há um aumento na expansão da massa de células β de animais WT-DEXA, e que animais KO para HNF4 α não possuem esta proliferação, indicando que o HNF4 α é essencial para expansão da massa de células β pancreáticas induzido pela RI. Não houve resultados que mostrassem um aumento da neogênese de células β , por isso, é indicado que o aumento da massa de células β seja proveniente de células β preexistentes. As marcações do Ki67, um marcador de proliferação celular, estão localizadas dentro da ilhota e longe da periferia, o que sugere que a marcação se apresenta em células β . Não obstante, independentemente do tipo celular, a proliferação celular em decorrência do tratamento com a DEXA ocorreu somente no grupo WT-DEX, revelando uma dependência do HNF4 α para que este processo ocorra. Quando avaliamos a expressão gênica de FT de genes relacionados com a plasticidade pancreática, vimos um aumento de HNF4 α nos animais WT-DEX, o que vai de acordo com a literatura, que mostra que o gene do HNF4 α pode ser ativado por glicocorticóides no fígado (BAILLY, *et al*, 2009) e também na linhagem celular de hepatócitos (OYADOMARI *et al*, 2000). Com isso podemos afirmar que o HNF4 α é necessário para que haja a proliferação desencadeada pela DEXA em nosso modelo.

A expressão de fatores de transcrição responsáveis pela plasticidade pancreática sendo eles o PDX1 (insulin promoter factor-1), PAX4 (Paired Box 4) e NGN3 (Neurogenina 3), também se mostrou aumentada somente nos animais WT-DEX. O PDX1, também conhecido como *insulin promoter factor-1*, tem um papel primordial no desenvolvimento do pâncreas, tanto endócrino, quanto exócrino (ZHU *et al*, 2017). Nas células β , o PDX1 é fundamental para a expressão do gene da secreção de insulina. Em camundongos adultos, a deleção ou diminuição do PDX1

em células β induz a intolerância à glicose, o que confirma o seu papel na homeostase glicêmica (ZHU *et al*, 2017). Na plasticidade pancreática, sabe-se que quando há a deleção do PDX1 em células β , ocorre uma diminuição da massa deste tipo celular, e nas células α , a sua deficiência faz com que haja um aumento da expansão da massa de células β (BRAMSWIG *et al*, 2011). Este fato mostra uma correlação positiva entre a expansão da massa de células β e o FT PDX1. Portanto, comparando estes dados com nossos achados, podemos sugerir que a expansão da massa de células β induzida pelo tratamento com DEXA depende da expressão de PDX1, sendo este dependente do HNF4 α .

A NGN3 é essencial para o desenvolvimento da linhagem de células do pâncreas endócrino, e sua expressão em níveis altos só é esperada em estágios embrionários. A NGN3 não é expressa em células β diferenciadas. Sua expressão em camundongos adultos está estritamente relacionada com o processo regenerativo, principalmente na reprogramação de células não β em células β . O aumento na expressão gênica de NGN3, induzido pela DEXA, indica que este glicocorticoide talvez tenha induzido o aparecimento de células pré-existentes dentro da ilhota, que por sua vez diferenciam-se em células secretoras de insulina. A expressão forçada de NGN3 em embriões de camundongos promove a diferenciação de células endócrinas do pâncreas e diminui o conteúdo de células exócrinas (ZHU *et al*, 2017).

Ainda, vimos que houve um aumento de PAX4 somente nos animais WT-DEX, mas não houve diferença na expressão gênica de ARX. Pax4 está presente em células β maturadas, e é crucial para que a célula mantenha o seu fenótipo (COLLOMBAT *et al*, 2009), enquanto ARX está presente em células α e é crucial para a manutenção do seu fenótipo (SPIJKER *et al.*, 2013). Além disso, a modulação artificial destes FTs promove a conversão entre tipos celulares. A título de exemplo, a superexpressão de ARX em células β converte essas células em células α , e a superexpressão de PAX4 em células α converte as mesmas em células β (BRAMSWIG *et al*, 2011). Assimilamos também o fato de o ARX não estar aumentado com os dados de massa de células α , mostrando que se não há aumento de massa de células α também não há o aumento da expressão de ARX.

Estas alterações encontradas em nosso estudo na expressão de FT cruciais para a plasticidade pancreática mostram, ao menos em parte, o mecanismo subjacente da expansão da massa de células β induzida por DEXA. O tratamento com DEXA induziu a resistência à insulina, o que promove o aumento da demanda de

insulina. Em uma forma dependente de HNF4 α , essa demanda metabólica aumentada gerou um aumento da expansão da massa de célula β devido a uma proliferação de células β preexistentes evidenciadas pelo aumento da imunomarcação de Ki67, e células β recém-formadas, que é evidenciada pelo aumento da expressão gênica de NGN3 e PAX4.

Com isso, nossos resultados sugerem incisivamente que a expansão da massa de células β induzida por RI requer um processo de proliferação e neogênese de células β , que por sua vez depende da atividade do HNF4 α . Em conclusão, estes dados apontam o HNF4 α como um alvo terapêutico promissor no tratamento de DM.

6 CONCLUSÃO

Com isso, nossos resultados sugerem incisivamente que a expansão da massa de células β induzida por RI requer um processo de proliferação e neogênese de células β , que, por sua vez, depende da atividade do HNF4 α . Assim, nossos dados apontam o HNF4 α como um alvo terapêutico promissor no tratamento de DM, uma vez que sua manipulação poderia promover o aumento, ou até mesmo a regeneração, de células secretoras de insulina em pacientes diabéticos.

7 REFERÊNCIAS

AL-KANDARI, Hessa et al. Identification of Maturity-Onset-Diabetes of the Young (MODY) mutations in a country where diabetes is endemic. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2021.

AFELIK, S.; ROVIRA, M. Pancreatic β -cell regeneration: Facultative or dedicated progenitors? **Mol Cell Endocrinol**, v. 445, p. 85-94, 04 2017.

AHREN, Bo; PACINI, Giovanni. Insufficient islet compensation to insulin resistance vs. reduced glucose effectiveness in glucose-intolerant mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 283, n. 4, p. E738-E744, 2002.

ANDREWS, ROBERT C.; WALKER, Brian R.. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clinical Science**, v. 96, n. 5, p. 513-523, 16 abr. 1999.

BABEU, Jean-Philippe et al. Hepatocyte nuclear factor 4 α contributes to an intestinal epithelial phenotype in vitro and plays a partial role in mouse intestinal epithelium differentiation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 297, n. 1, p. G124-G134, 2009.

BAILLY, Alain; BRIANÇON, Nadège; WEISS, Mary C. Characterization of glucocorticoid receptor and hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) binding to the hnf4 α gene in the liver. **Biochimie**, v. 91, n. 9, p. 1095-1103, 2009.

BONNER-WEIR, S. Islet growth and development in the adult. **J Mol Endocrinol**, v. 24, n. 3, p. 297-302, Jun 2000.

BORT, Roque et al. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. **Developmental biology**, v. 290, n. 1, p. 44-56, 2006.

BRAMSWIG, N. C.; KAESTNER, K. H. Transcriptional regulation of α -cell differentiation. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 13, p. 13-20, 2011.

BURÉN, Jonas et al. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. **European journal of endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 419-429, 2002.

BUTLER, Alexandra E. et al. β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 102-110, 2003.

BUTLER, P. C. Meier JJ, Butler AE, Bhushan A. **The replication of beta cells in normal physiology, in disease and for therapy.** *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, v. 3, p. 758-768, 2007.

CHRISTENSEN, Ashley A.; GANNON, Maureen. The beta cell in type 2 diabetes. **Current diabetes reports**, v. 19, n. 9, p. 1-8, 2019.

CIGLIOLA, Valentina et al. Stress-induced adaptive islet cell identity changes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 18, p. 87-96, 2016.

CNOP, Miriam et al. Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54, n. suppl 2, p. S97-S107, 2005.

COLLOMBAT, Patrick et al. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. **Genes & development**, v. 17, n. 20, p. 2591-2603, 2003.

COLLOMBAT, Patrick et al. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into α and subsequently β cells. **Cell**, v. 138, n. 3, p. 449-462, 2009.

DANDONA, Paresh; ALJADA, Ahmad; BANDYOPADHYAY, Arindam. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in immunology**, v. 25, n. 1, p. 4-7, 2004.

DARIYA, Begum et al. Pathophysiology, Etiology, Epidemiology of Type 1 Diabetes and Computational Approaches for Immune Targets and Therapy. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 39, n. 4, 2019.

EIZIRIK, Décio L.; COLLI, Maikel L.; ORTIS, Fernanda. The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 4, p. 219-226, 2009.

FAJANS, S. S.; BELL, G. I. MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. **Diabetes Care**, v. 34, n. 8, p. 1878-84, Aug 2011.

GONZALEZ, F. J. Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 48 23, n. 1, p. 2-7, 2008.

FEINSTEIN, Revital et al. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 35, p. 26055-26058, 1993.

GAN, Wan J. et al. Cell polarity defines three distinct domains in pancreatic β -cells. **Journal of cell science**, v. 130, n. 1, p. 143-151, 2017.

GUPTA, R. K. et al. Expansion of adult beta-cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4alpha. **Genes Dev**, v. 21, n. 7, p. 756-69, Apr 2007. ISSN 0890-9369.

GUPTA, R. K.; KAESTNER, K. H. HNF-4alpha: from MODY to late-onset type 2 diabetes. **Trends Mol Med**, v. 10, n. 11, p. 521-4, Nov 2004. ISSN 1471-4914.

GUPTA, R. K. et al. The MODY1 gene HNF-4alpha regulates selected genes involved in insulin secretion. **J Clin Invest**, v. 115, n. 4, p. 1006-15, Apr 2005. ISSN 0021-9738.

HANSEN, S. K. et al. Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function. **J Clin Invest**, v. 110, n. 6, p. 827-33, Sep 2002.

HUANG, J. et al. Expression of HNF4alpha variants in pancreatic islets and Ins-1 beta cells. **Diabetes Metab Res Rev**, 49 v. 24, n. 7, p. 533-43, Oct 2008.

HULL, Caroline M.; PEAKMAN, Mark; TREE, Timothy IM. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it?. **Diabetologia**, v. 60, n. 10, p. 1839-1850, 2017.

IHARA, Arisa et al. Functional characterization of the HNF4 α isoform (HNF4 α 8) expressed in pancreatic β -cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 329, n. 3, p. 984-990, 2005.

JURIKOVA, Miroslava et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. **Acta histochemica**, v. 118, n. 5, p. 544-552, 2016.

KITAMURA, T. The role of FOXO1 in beta-cell failure and type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, v. 9, n. 10, p. 615-23, Oct 2013. ISSN 1759-5037

KAHN, S. E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 46, n. 1, p. 3-19, Jan 2003.

LIU, D. et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. **Allergy Asthma Clin Immunol**, v. 9, n. 1, p. 30, Aug 2013.

MARABLE, Sierra S.; CHUNG, Eunah; PARK, Joo-Seop. Hnf4a is required for the development of Cdh6-expressing progenitors into proximal tubules in the mouse kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 31, n. 11, p. 2543-2558, 2020.

- MIURA, Atsuko et al. Hepatocyte nuclear factor-4 α is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic β -cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p. 5246-5257, 2006.
- NISHIO, Junko et al. Islet recovery and reversal of murine type 1 diabetes in the absence of any infused spleen cell contribution. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1775-1778, 2006.
- OYADOMARI, Seiichi et al. The gene for hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α is activated by glucocorticoids and glucagon, and repressed by insulin in rat liver. **FEBS letters**, v. 478, n. 1-2, p. 141-146, 2000.
- OLIVER-KRASINSKI, J. M.; STOFFERS, D. A. On the origin of the beta cell. **Genes Dev**, v. 22, n. 15, p. 1998-2021, Aug 2008.
- PARVIZ, Fereshteh et al. Hepatocyte nuclear factor 4 α controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. **Nature genetics**, v. 34, n. 3, p. 292-296, 2003.
- PAULSEN, S. J. et al. Characterization of beta-cell mass and insulin resistance in diet-induced obese and diet-resistant rats. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 2, p. 266-73, Feb 2010.
- PATEL, R.; WILLIAMS-DAUTOVICH, J.; CUMMINS, C. L. Minireview: new molecular mediators of glucocorticoid receptor activity in metabolic tissues. **Mol Endocrinol**, v. 28, n. 7, p. 999-1011, Jul 2014.
- PERALDI, Pascal; SPIEGELMAN, Bruce. TNF- α and insulin resistance: summary and future prospects. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 182, n. 1, p. 169-175, 1998.
- PERRY, Rachel J. et al. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 84-91, 2014.
- POITOUT, V. et al. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 3, p. 289-98, Mar 2010.
- PROTZEK, André OP et al. Augmented β -cell function and mass in glucocorticoid-treated rodents are associated with increased islet Ir- β /AKT/mTOR and decreased AMPK/ACC and AS160 signaling. **International journal of endocrinology**, v. 2014, 2014.
- RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v. 36, n. 3, p. 284-93, Apr 2008. ISSN 1536-4828.
- RAFACHO, Alex et al. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. 2017.

- RHEN, T, CIDLOWSKI, JA. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. **N Engl J Med**, v.353, p.1711-1723, 2005.
- RUOSO, Carolina et al. O papel do HNF4a na expansão da massa de célula β induzida por dexametasona. 2019.
- RUZZIN, J.; WAGMAN, A. S.; JENSEN, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. **Diabetologia**, v. 48, n. 10, p. 2119-2130, 2005.
- SAMUEL, Varman T. et al. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 1, p. 12-22, 2016.
- SANGAN, Caroline B. et al. In vitro reprogramming of pancreatic alpha cells towards a beta cell phenotype following ectopic HNF4 α expression. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 399, p. 50-59, 2015.
- SANDOR, Adam M. et al. CD11c+ cells are gatekeepers for lymphocyte trafficking to infiltrated islets during type 1 diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 99, 2019.
- SANTOS DE DIOS, Eugenio; CRESPO, Piero. The RAS-ERK pathway: A route for couples. **American Association for the Advancement of Science**, 2018
- SATO, Yoshifumi et al. Anks4b, a novel target of HNF4 α protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 27, p. 23236-23245, 2012.
- SCHERER, Philipp E. et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **Journal of Biological chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26746-26749, 1995.
- SEURING, Till; ARCHANGELIDI, Olga; SUHRCKE, Marc. The economic costs of type 2 diabetes: a global systematic review. **Pharmacoeconomics**, v. 33, n. 8, p. 811-831, 2015.
- SHIH DQ, Screenan S, Munoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, Polonsky KS, Stoffel M: Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. **Diabetes** 2001;50:2472-2480.
- SPIJKER, H. Siebe et al. Conversion of mature human β -cells into glucagon-producing α -cells. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2471-2480, 2013.
- STEIL, G. M. et al. Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 5, p. E788-96, May 2001.

SUN, Hong et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes research and clinical practice**, v. 183, p. 109119, 2022.

THOREL, F. et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. **Nature**, v. 464, n. 7292, p. 1149-54, Apr 2010.

WANG, Sui et al. Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 24, p. 9715-9720, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a **WHO/IDF consultation**. 2006.

ZARET, Kenneth S.; GROMPE, Markus. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. **Science**, v. 322, n. 5907, p. 1490-1494, 2008.

ZHU, Yaxi et al. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. **Stem cell research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2017.

ANEXO 01 – Certificado CEUA

ANEXO 2 - Artigo publicado.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O Papel do HNF4alfa na plasticidade de ilhotas pancreáticas", protocolada sob o CEUA nº 4359060516 (ID 000171), sob a responsabilidade de **Gustavo Jorge dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 03/06/2016.

We certify that the proposal "The HNF4alfa role in pancreatic islet plasticity", utilizing 8 Heterogenics mice (males and females), 8 Knockout mice (males and females), protocol number CEUA 4359060516 (ID 000171), under the responsibility of **Gustavo Jorge dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 06/03/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2016** a **04/2019**

Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **Biotério Externo**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **45 a 60 dias**

N: **8**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **18 a 35 kg**

Origem: **Biotério Externo**

Espécie: **Camundongos Knockout**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **45 a 60 dias**

N: **8**

Linhagem: **HNF4alfaLoxP/loxP;Ins.Cre**

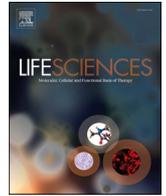
Peso: **18 a 35 kg**

Local do experimento: Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB/UFSC Departamento de Biologia Estrutural e Funcional/IB/Unicamp

Florianópolis, 05 de julho de 2022

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina



Hepatocyte Nuclear Factor 4- α (HNF4 α) controls the insulin resistance-induced pancreatic β -cell mass expansion

Robson Barth^{a,c,1}, Carolina Ruoso^{a,c,1}, Sandra Mara Ferreira^b, Francieli Caroline de Ramos^{a,c},
Fernanda Barbosa Lima^{a,c}, Antônio Carlos Boschero^b, Gustavo Jorge dos Santos^{a,c,*}

^a *Istet Biology and Metabolism Lab – I.B.M. Lab, Department of Physiological Sciences, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina - UFSC, Florianópolis 88040-900, Santa Catarina, Brazil*

^b *Laboratory of endocrine pancreas and metabolism - LAPEM, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas - UNICAMP, 13083-862 Campinas, Brazil*

^c *Multicenter Graduate Program in Physiological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil*

ARTICLE INFO

Keywords:

HNF4 α
Diabetes mellitus
Proliferation
Insulin resistance
Dexamethasone

ABSTRACT

Background: Regardless of the etiology, any type of DM presents a reduction of insulin-secreting cell mass, so it is important to investigate pathways that induce the increase of this cell mass.

Aim: Based on the fact that (1) HNF4 α is crucial for β -cell proliferation, (2) DEX-induced IR promotes β -cell mass expansion, and (3) the stimulation of β -cell mass expansion may be an important target for DM therapies, we aimed to investigate whether DEX-induced proliferation of β pancreatic cells is dependent on HNF4 α .

Methods: We used WildType (WT) and Knockout (KO) mice for HNF4- α , treated or not with 100 mg/Kg/day of DEX, for 5 consecutive days. One day after the last injection of DEX the IR was confirmed by ipITT and the mice were euthanized for pancreas removal.

Results: In comparison to WT, KO mice presented increased glucose tolerance, lower fasting glucose and increased glucose-stimulates insulin secretion (GSIS). DEX induced IR in both KO and WT mice. In addition, DEX-induced β -cell mass expansion and an increase in the Ki67 immunostaining were observed only in WT mice, evidencing that IR-induced β -cell mass expansion is dependent on HNF4 α . Also, we observed that DEX-treatment, in an HNF4 α -dependent way, promoted an increase in PDX1, PAX4 and NGN3 gene expression.

Conclusions: Our results strongly suggest that DEX-induced IR promotes β -cell mass expansion through processes of proliferation and neogenesis that depend on the HNF4 α activity, pointing to HNF4 α as a possible therapeutic target in DM treatment.

1. Introduction

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic syndrome characterized by chronic hyperglycemia and presents multiple etiologies. This pathology affects more than 422 million people in the world and, projections indicate that the diabetic population and the spending with this disease will double in the next 25 years [1,2]. This disease may be characterized by absolute insulin deficiency (Type 1 Diabetes – DM1) due to a combination of a genetic predisposition associated with environmental factors promoting specific autoimmune destruction of pancreatic β -cells [3]. It can also be related to insulin deficiency (Type 2 Diabetes – DM2), generally associated with obesity, peripheral insulin resistance (IR),

pancreatic β -cells dysfunction, and alteration in insulin clearance [4,5].

The pancreatic islets, a micro-organ dispersed in the exocrine pancreas, are responsible for insulin production and secretion. This micro-organ is composed of several endocrine cell types, such as glucagon-producing α -cells, insulin-producing β -cells, and somatostatin-producing δ -cells. The differentiation of these cell types is controlled by various transcription factors (TF), such as ARX and PAX4, which determine the initial destination of α and β -cells, respectively [6].

Besides the differentiation process, the control of gene transcription is essential to the phenotype and function maintenance in adult cells [7]. In pancreatic β -cells, the development of Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY), a DM2 monogenic form, highlights the TF importance

* Corresponding author at: Iste Biology and Metabolism Lab./CCB, UFSC, 88040-900, Brazil - <https://ibm.ufsc.br/>.

E-mail address: gustavo.js@ufsc.br (G.J. Santos).

¹ Barth, R and Ruoso, C contributed equally for this manuscript.

[8]. This disease is characterized by a deficiency in the glucose-induced insulin secretion process (GSIS) due to a mutation of at least sixteen genes (MODY 1 to 14) [9], such as the Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (HNF4 α), responsible for the MODY1 [10].

The HNF4 α is a TF orphan member of the nuclear receptor superfamily, expressed in the liver, kidney, intestine, and pancreas [11]. Twelve HNF4 α isoforms were described and their distribution depends on the activated promoter in different tissues: activation of the proximal P1 promoter results in the expression of HNF4 α 1–6 predominantly in the adult liver [12]. Whereas activation of the P2 promoter region results in the expression of HNF4 α 7–12 that prevails in the fetal liver, pancreas, liver, and colon cancers [11–14]. The isoforms expressed in pancreatic β -cells are HNF4 α -7, α 8, and α 9, due to the presence of the P2 promoter [15,16].

In pancreatic β -cells, HNF4 α regulates the expression of several genes, including those related to glucose metabolism, such as Aldolase B, GLUT2, and Glycokinase [17,18], and those related to insulin secretion, such as L-pyruvate kinase, ATP-sensitive potassium channel subunit Kir6.2 and Glut-2 [19]. Knockout mice for HNF4 α specifically in pancreatic β -cells (HNF4 α loxP/loxP;Ins.Cre) present hyperinsulinemia in the fasting and fed state [18].

HNF4 α regulates the β -cells proliferation process and mass expansion, mainly during the pancreatic development, pregnancy [20], and in the neonatal period [8]. It has been shown that pregnant HNF4 α loxP/loxP;Ins.Cre females do not show pregnancy-induced β -cell proliferation and, consequently, they are glucose intolerant. These effects seem to be due to a reduction in the Ras/ERK pathway [8]. It is also known that HNF4 α controls some genes related to apoptosis and is also involved in protecting β -cells against death, induced by reticulum stress, through activation of the HNF4 α -GRP78-Anks4b pathway [21].

It has been reported that β -cells can adapt themselves, expanding their functional mass, to respond to different physiological scenarios, such as obesity, IR and, pregnancy. Insulin resistance triggers a structural and functional compensation within the pancreatic islet to counteract the insulin demand that includes proliferation, differentiation, and/or transdifferentiation mechanisms [22–24]. In both DM1 (after an autoimmune attack) and DM2 (after a compensatory increase), a reduction in the β -cell mass occurs within the islet, during the progression of the disease. Thus, studying the mechanisms that are involved with β -cell mass modulation or adaptation may reveal a molecular target to treat DM.

HNF4 α seems to control the β -cell mass increase, induced by the metabolic demand. Beyond its effect on β -cell expansion during pregnancy, it was shown that ectopic overexpression of HNF4 α in an α -cell lineage promotes the transdifferentiation of these cells into β -cells like [25]. These transdifferentiated β -cells express important genes for the β -cell phenotype, such as Glucokinase (GCK), Insulin, and Glut2, and can produce and process insulin, presenting C-peptide inside.

Dexamethasone is a glucocorticoid widely used in clinical practice to treat inflammation and allergies. Despite its importance to the clinical, supraphysiological doses of dexamethasone could induce side effects related to glucose metabolism and insulin signaling [26,27]. Since dexamethasone may induce insulin resistance, this glucocorticoid induces a compensatory increase in the β -cell mass, being a well disseminate model to study both insulin signaling impairment and the process behind β -cell mass expansion [27–29]. This study aims to investigate whether the dexamethasone-induced β -cell mass expansion is dependent on HNF4 α .

Here, using a dexamethasone-induced IR model [28], we have shown that HNF4 α is crucial to β -cell mass expansion in an insulin-resistant scenario.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

All experiments involving animal manipulation were done following the CONCEA (Brazilian National Council for Animal Experimentation Protocol) and the procedures involving mice were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Santa Catarina (protocol n° 4359060516).

2.2. Animals

All mice were maintained in appropriate cages at the physiological sciences department in standardized illumination (12 h light/dark cycle) and controlled temperature (23 ± 2 °C) and humidity with access to food (Nuvilab CR1, Brazil) and water (filtered tap) *ad libitum*. To investigate the HNF4 α role in the β -cell expansion process, we utilized an HNF4 α β -cell-specific knockout (KO) mice (HNF4 α ^{loxP/loxP};Ins.Cre⁺), generated by the matting of the HNF4 α ^{loxP/loxP} (#004665, Jackson Laboratory, USA) and Ins2.Cre⁺ mice (#008122, Jackson Laboratory, USA). The KO mice were homozygous for the loxP-flanked allele plus heterozygous for the RIP-Cre^{ER} and as a control (WT mice) we used the homozygous for the loxP-flanked allele plus non-caring for the RIP-Cre^{ER}. To determine the mice genotype, an RT-PCR was performed following the Jackson Laboratory instructions. To activate the CRE-recombinase enzyme, animals at 35–40-days-old received intraperitoneally daily injections of 100 μ l of tamoxifen (#T5648, Sigma-Aldrich, USA) solution (20 mg/mL in sesame oil) (#3547-250, Sigma-Aldrich) for five consecutive days.

2.3. Experimental design

10-days after the last tamoxifen injection, the CRE-recombinase activation was confirmed by the fasting glycemia and ipGTT analysis. Afterward, mice were divided into three groups: WildType saline (WT), WildType dexamethasone (WT-DEX) and Knockout Dexamethasone (KO-DEX). The dexamethasone daily dose was 100 mg/kg applied intraperitoneally, divided as 50 mg/kg in the morning and 50 mg/kg in the afternoon. WT mice received the correspondent volume of saline. For a schematic representation see Supplementary Fig. 1.

2.4. Glucose tolerance test (ipGTT) and plasma insulin levels

As described before [30], 10-h fasted-mice received intraperitoneally an injection of a glucose bolus (1 g/kg in 0.9% w/v of NaCl solution). The glycemia was measured at baseline (fasted glycemia) and after 15, 30, 60, 45, 60 and 120 min of the injection. Glucose was evaluated with glucose strips on an Accu-Check Advantage II instrument (Roche, Germany). Blood samples (100 μ l) were collected immediately before the injection (0 min) and at 15 and 60 min after the glucose bolus injection to determine the concentrations of insulin, which were measured by RIA.

2.5. Insulin tolerance test (ipITT)

A 1.5-h fasted-mice received intraperitoneally an injection of insulin (1 U/kg in 0.9% w/v of NaCl solution). The glycemia was measured at baseline (time 0 min) and after 10, 15, 20, 25, 30 and 60 min. The rate of glucose decay constant (kITT) was calculated from the blood glucose concentrations during the linear decay phase, using the formula $0.693/t_{1/2}$.

2.6. Immunohistochemistry and islet morphology

For immunohistochemistry, at least five wholes were excised, cleaned from the fat pad, weighed and fixed in paraformaldehyde 4% w/v for 24 h. Then, the pancreas was dehydrated and embedded in paraffin.

Five μm -thickness serial sections were mounted in a silanized slide and after the paraffin removal, sections were rehydrated, incubated with citrate buffer for 1 h at 95 °C and blocked in a PBS solution (0.05% Tween 20; 5% bovine serum albumin) for 1 h at room temperature. After this period, the sections were incubated with the primary antibody against Insulin (#A0564, Dako, Carpinteria, CA, USA), Glucagon (#A0565, Dako, Carpinteria, CA, USA) or Ki67 (#M3060, Spring Bioscience, USA) overnight at 4 °C with subsequent endogenous peroxidase activity blockage. Then, after washing with PBS solution, sections were incubated with the HRP-conjugated secondary antibody for 2 h and revealed with DAB (diaminobenzidine). The slides were counterstained with hematoxylin and then mounted with Entellan (Merk). Sections were scanned in the Axio Scan slide scanner (Zeiss, Germany), and the ZenLite software Blue edition (Zeiss, Germany) was used for image analysis. We analyzed two sections of each pancreas. The islet morphology analysis was done as described before [31].

2.7. Pancreatic islet isolation and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS)

After euthanasia, the pancreas was inflated with a Hanks buffer (137 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 4.5 mM NaHCO₃, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.4 mM Na₂HPO₄, 0.8 mM MgSO₄, 1.5 mM CaCl₂, pH 7.4) containing 1.7 mg/ml of type V collagenase and, after its removal, the inflated pancreas was incubated for 17 min at 37 °C. After the digestion, the solution was shaken gently to complete the islet dissociation and washed with cold Hanks buffer to stop the enzyme activity. The islets were collected one by one for GSIS assessment or gene expression analysis. The GSIS was performed as described before [30].

2.8. Real-time RT-PCR

To analyze the HNF4 α , PDX1, PAX4, ARX, and NGN3 gene expression 120 isolated islets were homogenized in 1 mL of TRIzol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) for 1 min and the mRNA was extracted following the manufacturer's guide. The mRNA extracted was quantified through spectrophotometry (GeneQuant, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK). The cDNA was done using one μg of total RNA, with the High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) gene was used as an endogenous control. The thermocycling conditions applied were of 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s, and 60 °C for 30 s. The amplification curves were analyzed employing the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems). The primers used are listed in Supplementary Table 1.

2.9. Statistical analysis

All statistical analyses were done using the GraphPad Prism 8 software (GraphPad Inc., USA). The results are expressed as mean \pm SEM. Statistical difference was defined as $p < 0.05$. Significant outliers were detected by Grubb's test and the normal distribution was accessed by Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, or D'Agostino normality tests. Data approved by at least one of the three tests were considered normally distributed. Comparisons between WT and KO animals were performed via the Student's *t*-test. Comparisons among WT, WT-DEX and KO-DEX groups were done using the two-way ANOVA (factors: genotype and DEX treatment), followed by Tukey's *posthoc* test.

3. Results and discussion

DM is a metabolic dysfunction characterized by the loss of function and/or mass of pancreatic β -cells. The onset of DM occurs when insulin production is not capable to supply the physiological needs from peripheral tissues [32]. So, regardless of the etiological classification (DM1, DM2, or MODY), the DM physiopathology resides on number

reduction and/or functional deficiency of β -cells. Thus, any type of DM will be benefited from a treatment that promotes β -cells regeneration. This justifies the intense effort of the scientific community on developing new sources of insulin-producing cells for cell reposition/regeneration therapies [33].

The pancreas can adapt to metabolic challenges, for example, in pregnancy and obesity, when an increase in the β -cell mass by replication, hypertrophy, and/or neogenesis can be observed [9]. Although the great progress observed throughout the last years, many intracellular pathways controlling the insulin-secreting cell mass expansion remain unknown. In this scenario, we aimed to investigate the role of HNF4 α on the β -cells mass expansion in a condition of IR.

The importance of HNF4 α to the pancreatic β -cell is highlighted by the fact that mutations in the gene which produces this TF lead to an especial case of diabetes called MODY1. In addition, female mice lacking HNF4 α in β -cells do not display pregnancy-induced β -cell mass expansion, pointing out that β -cell mass expansion is dependent on the HNF4 α activity [3]. The HNF4 α also participates in the process of pancreatic plasticity. It is known that artificial overexpression of this TF in α -cells transforms them into β -cells-like [25].

The IR triggers in the pancreatic islet, especially on β -cell, alterations on both cell function [22] and structure [23], so, aiming to clarify the role of HNF4 α on β -cell expansion in an IR mice model, we used β -cell-specific HNF4 α KO mice exposed to the glucocorticoid DEX.

Before starting DEX treatment, we validated the β -cell-specific HNF4 α KO mice model by analyzing the mRNA expression of HNF4 α in KO and WT mice islets. As expected, KO mice islets showed a 58% reduction in the HNF4 α gene expression when compared to WT mice (Fig. 1A). It is noteworthy that the expression analysis was done in whole islets presenting other cell types that also express HNF4 α -gene

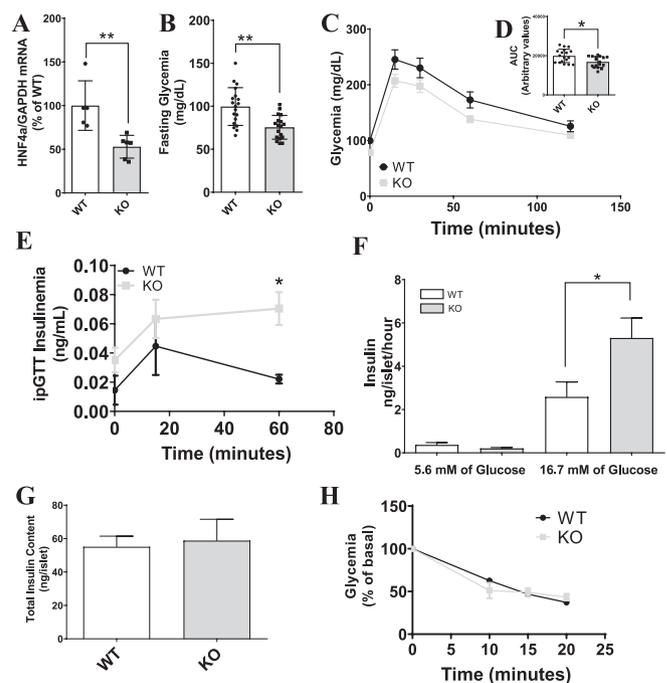


Fig. 1. β -cell-specific HNF4 α knockout effects in glucose tolerance, insulin sensibility and insulin secretion. 10-days after the last tamoxifen injection we analyzed the (A) mRNA expression of HNF4 α /GAPDH, expressed as % of WT. (B) 10-h fasted glycemia. (C) Blood glucose before (0 min), 15, 30, 60 and 120 min after an intraperitoneal administration of 1 g/kg of glucose (ipGTT) (D) ipGTT area under the curve. (E) Insulinemia during IpGTT. (F) Insulin secreted after 1 h of incubation with 5.6 and 16.7 mM of glucose. (G) Total insulin content of pancreatic islet. (H) Blood glucose before (0 min), 10, 15, and 20 min after an intraperitoneal administration of 1 U/kg of insulin (ipITT). Data are presented as mean \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT.

[19].

After the genetic validation, we analyzed the metabolic characteristics of the β -cell-specific HNF4 α KO mice model, including fasting glycemia and their response to a glucose challenge during the ipGTT. In comparison to the WT mice, KO mice displayed lower fasting glycemia (Fig. 1B) and higher efficiency to deal with a glucose overload (Fig. 1C/D). On the contrary, some studies [8,18] showed that β -cell-specific HNF4 α KO mice are glucose intolerant, however, it is necessary to highlight that there is a methodological difference in our study. Unlike the mentioned studies, we evaluated the glucose tolerance ten days after the last dose of tamoxifen, a period when the HNF4 α deletion and the β -cells dysfunction is precocious.

Based on the higher glucose tolerance and reduced fasting glycemia, observed in KO mice, we supposed that KO mice could be hyperinsulinemic and that their β -cells could release a greater amount of insulin when stimulated by glucose. Thus, we evaluated the β -cell function by investigating the insulinemia during the ipGTT and the GSIS in isolated islets, as well as the peripheral insulin sensitivity from WT and KO mice. Under data from the literature [8] and in comparison to WT mice, KO mice presented hyperinsulinemia during ipGTT (Fig. 1E).

This hyperinsulinemia may have occurred given that the absence of the HNF4 α gene in the pancreatic β -cell alters the expression of genes that control the insulin-secreting process. Since HNF4 α is the main regulator of the Kir 6.2 gene expression, a K^+_{ATP} channel subunit, the HNF4 α gene deletion in β -cells turn the K^+_{ATP} channels more easily inactivated, leading to a non-controlled hormone release after glucose stimulation [18]. Besides, it was shown that HNF4 α gene mutation increases mRNA levels of genes related to glucose metabolism and GSIS, such as GLUT2, aldolase, K^+_{ATP} channel, and L-pyruvate kinase [34].

Regarding the GSIS, we observed that islets from KO mice secret more insulin in face of a glucose stimulus (Fig. 1F) with no alteration in the total insulin content (Fig. 1G), suggesting that the increased GSIS is due to changes in the secretory machinery and not in the insulin content nor β -cell numbers. In comparison to WT mice, no alteration in the insulin sensitivity was observed (Fig. 1H), suggesting that HNF4 α gene deletion is pancreatic β -cell-specific and does not promote any modification in the insulin signaling in peripheral tissues.

It is important to highlight that as much as our model does not

express HNF4 α on β -cells, like MODY1, our experimental model does not configure a MODY1 disease model. To test our hypothesis with no bias, we proposed a model where the onset for DEX treatment was at the moment that the mice were knockout for HNF4 α presenting any MODY1 characteristics.

After the HNF4 α KO model be validated and metabolically characterized, we induced IR by administering the glucocorticoid dexamethasone. Glucocorticoids in excess is known to induces alteration in insulin Signaling. The dexamethasone as a model to study Insulin Resistance is very used and well described in the literature [27–29]. As expected [28], DEX treatment induced IR in both WT and KO mice (Fig. 2A-F).

Considering that IR is a potent inducer of β -cell expansion [23] and, after confirming that the DEX treatment had promoted IR, we compared the pancreas morphology between WT, WT-DEX and KO-DEX mice. Also, we analyzed the Ki67 immunostaining, a nuclear protein that indicates cellular proliferation [35].

DEX treatment increased the pancreas weight, but this increase was attenuated in the KO-DEX compared to the WT-DEX (Fig. 3J/K). Also, DEX increased the immunoreactivity to insulin, (Fig. 3A-C) and promoted marked islet hypertrophy (Fig. 3M/N), but only in WT-DEX mice. Similarly, DEX treatment increased the insulin⁺ area (Fig. 3O) and β -cell mass (Fig. 3P) only in the WT-DEX group, without alteration in α -cell mass (Fig. 3Q). These results show that, even though DEX treatment provoked IR in KO-DEX mice (Fig. 2E/F), it was unable to promote β -cell mass expansion in the absence of HNF4 α . This result strongly confirms that HNF4 α is essential for β -cell mass expansion induced by IR.

These findings indicate the β -cell mass expansion probably occurs due to an increase in pre-existing β -cells. The Ki67 immunostaining was significantly higher in WT-DEX mice (Fig. G-I). Due to the technic used, we cannot ensure which islet cell is proliferating in response to DEX treatment, but based on the Ki67 localization, we can suggest that the proliferation is occurring in the β -cells. Moreover, independently of the islet-cell type proliferating, our data indicate an HNF4 α dependency in this proliferation process.

After these observations, we turn our attention to the expression of genes related to pancreatic plasticity. First, we observed an increase in HNF4 α -gene expression in the WT-DEX mice (Fig. 4A), suggesting that DEX-treatment stimulates pathways that culminate in the increase of the

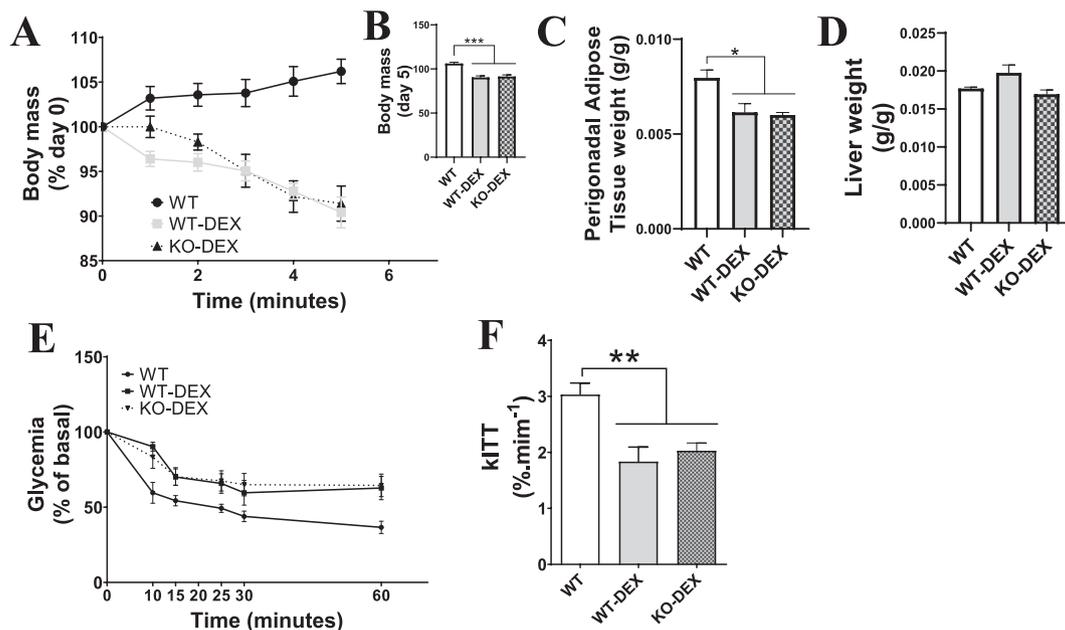


Fig. 2. DEX-treatment effects on body mass gain and insulin sensitivity in WT and KO mice. (A) Body mass gain was evaluated after (Day 0) and during (Days 1–5) the dexamethasone treatment. Data are presented as % of day 0. (B) Body mass in day 5. (C) Perigonadal adipose tissue and (D) liver weight related to the body mass (g/g). (E) Blood glucose before (0 min), 10, 15, 25, 30 and 60 min after an intraperitoneal administration of 1 U/kg of insulin (ipITT). (F) Glucose constant decay during ipITT. Data presented with mean \pm SEM, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs WT.

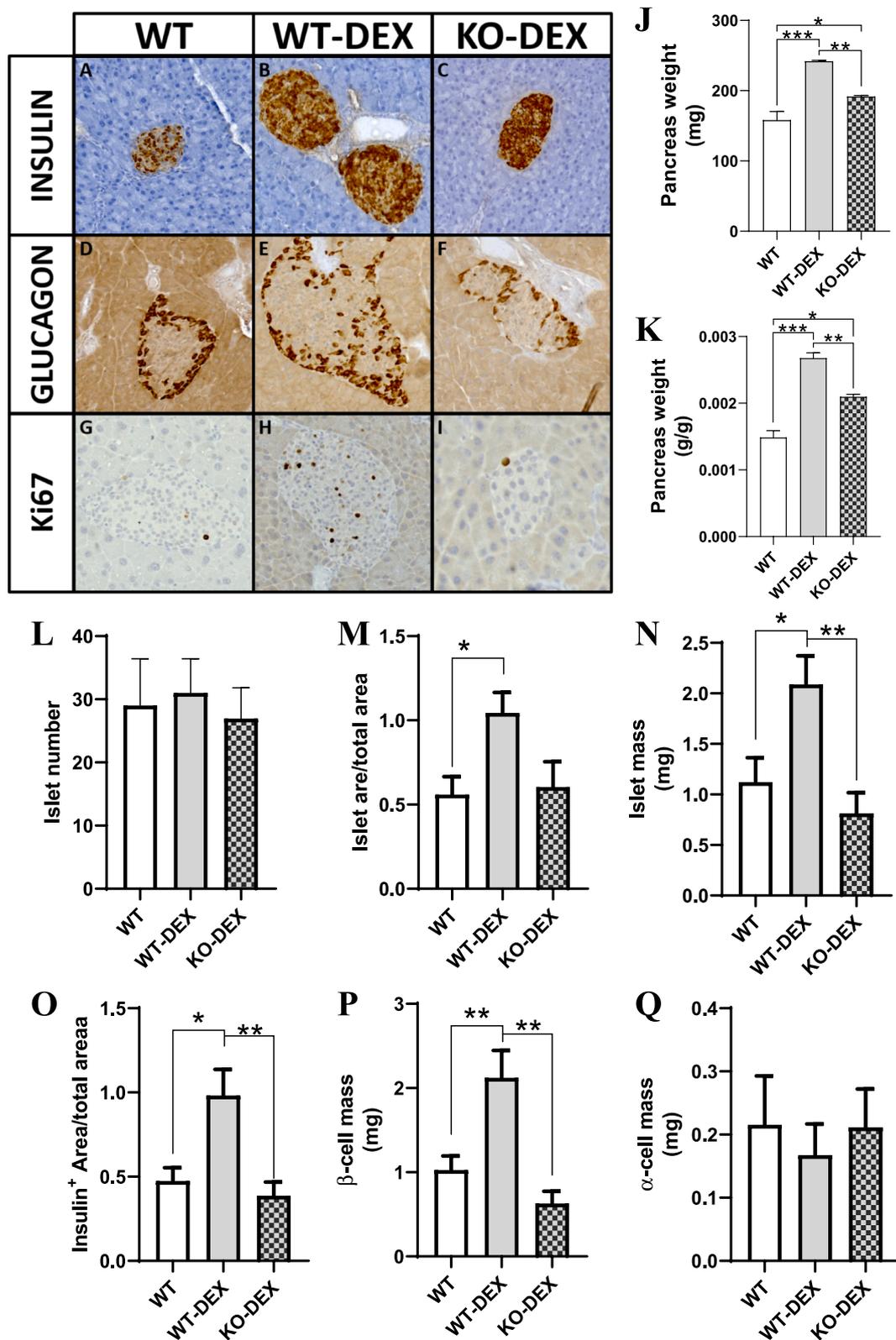


Fig. 3. DEX-treatment effects on pancreatic structure in WT and KO mice. Representative images of (A-C) Insulin (D-F) Glucagon and (G-I) Ki67 immunostaining in a final magnification of 20 \times . (J) Absolute pancreas weight. (K) Relative pancreas weight in g/g of body mass. (L) Total number of islets. (M) Total islet related to total section (N) Absolute Islet mass. (O) Insulin positive area related to total section area. (P) β -cell and (Q) α -cell absolute. Data are presented as mean \pm SEM, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P0.001.

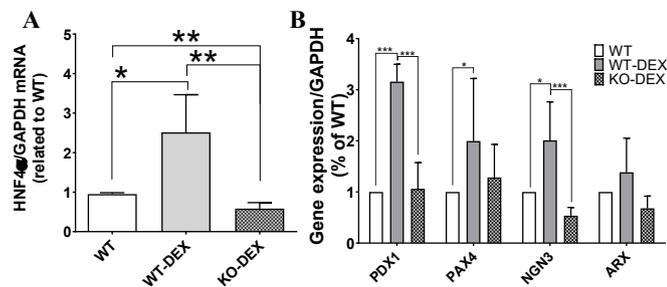


Fig. 4. DEX-treatment effects on HNF4 α , PDX1, PAX4, NGN3 and ARX gene expression in islet from WT and KO mice. (A) mRNA expression of HNF4 α . (B) Pancreatic islet mRNA expression of PDX1, PAX4, NGN3 and ARX. GAPDH was used as housekeeping gene. Data are related to the WT group and are presented as mean \pm SEM, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

HNF4 α gene expression. In accordance, it was reported that the HNF4 α gene can be activated by glucocorticoids in the liver [13] and a hepatocyte cellular lineage [36]. Together, these facts corroborate our hypothesis that HNF4 α is necessary for the DEX effects in the present model.

We also investigated the gene expression of key TFs for pancreatic plasticity, such as PDX1, PAX4, ARX and NGN3. DEX-treatment increased PDX1, PAX4, and NGN3 mRNA expression only in WT-DEX mice, suggesting that the HNF4 α participates in this process (Fig. 4B).

PDX, also known as Insulin Promoter Factor-1, has a pivotal role in the development of the exocrine and endocrine pancreas [37]. On β -cells, the PDX1 is fundamental to insulin-gene expression. In adult mice, depletion or reduction of PDX1 in β -cells induces glucose intolerance, confirming its role in glucose homeostasis [37]. In the pancreatic plasticity scenario, it is known that the PDX1 deletion in β -cells decreases β -cell mass while its deficiency in α -cells leads to β -cell mass expansion [38]. This fact shows a positive correlation between PDX1 expression and β -cell mass. Thus, confronting these data with our findings, we suggest that DEX-induced β -cell mass expansion depends on the PDX1 expression in an HNF4 α -dependent fashion.

Since NGN3 is essential for the development of pancreatic endocrine cells lineage, its expression at high levels is just expected to be seen in embryonic stages. This TF is not expressed in differentiated α - and β -cells. The NGN3 expression in adult mice is tightly related to the β -cell regeneration process, mainly reprogramming non- β -cells to β -cells. The fact that DEX-treatment promoted an increase in NGN3 gene expression indicates that this glucocorticoid may induce the appearance of pre-endocrine cells within the islet, which in turn could differentiate themselves into insulin-secreting cells. NGN3 forced expression in mice embryos promotes pancreatic endocrine cell differentiation and decreases exocrine cells content [37].

In addition, we observed an increase in PAX4 only in WT-DEX mice, but no difference in ARX gene expression. PAX4 is present in mature β -cells and it is crucial for this cellular phenotype [39], while ARX is present in α -cells and is crucial for α -cells to maintain their phenotype [40]. Moreover, the artificial modulation of these TFs promotes a conversion between islet cellular types (*i.e.*, the ARX super expression in β -cell converts these cells into α -cell and, PAX4 super expression in α -cell increases the β -cell number) [38].

The alterations found here in the expression of key TFs for pancreatic plasticity show, at least in part, the mechanism underlying the DEX-induced β -cell mass expansion. Dexamethasone-treatment induced insulin resistance, which promoted an increase in the demand for insulin. In an HNF4 α -dependent way, this augmented metabolic demand provoked a β -cell mass expansion due to the proliferation of pre-existing β -cell (evidenced by increase Ki67 immunostaining) and newly formed β -cells (evidenced by the increase in NGN3 and PAX4 gene expression).

Taken together, our results strongly suggest that the β -cell mass expansion induced by IR requires a process of proliferation and

neogenesis of β -cells, which in turn depends on HNF4 α activity. In conclusion, these data point to HNF4 α as a promising therapeutic target in DM treatment.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120213>.

CRediT authorship contribution statement

R.B.: data curation, formal analysis, investigation, methodology and writing original draft. C.R.: data curation, formal analysis, investigation, methodology and writing original draft. S.M.F.: data curation, formal analysis, methodology and writing - review & editing. F.C.R.: data curation and formal analysis. F.B.L.: Writing - review & editing. A.C.B.: funding acquisition, investigation and writing - review & editing. G.J.S.: data curation, formal analysis, investigation, methodology, funding acquisition, project administration, supervision, and writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors have stated explicitly that there are no conflicts of related to this article.

Acknowledgements

The authors are grateful to the LIDoC members and for the technical assistance of the Multiuser Laboratory of Studies in Biology – LAMEB's staff. Moreover, we thank to Prof. Alex Rafacho for technical assistance and José Rodrigo N. Martins for helping in the graphical abstract design.

Financial support

This work was supported by grants from Santa Catarina State Research and Innovation Support Foundation – FAPESC (2017TR1760), São Paulo Research Foundation – FAPESP (2015/12611-0), National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (420602/2018-6) and University fellowship program of Santa Catarina (Protocol #16751).

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- [1] E.S. Huang, et al., Projecting the future diabetes population size and related costs for the U.S., *Diabetes Care* 32 (12) (2009) 2225–2229.
- [2] N.R.F.C. <collab>(NCD-RisC), Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants, *Lancet* 387 (10027) (2016) 1513–1530.
- [3] D.L. Eizirik, M.L. Colli, F. Ortis, The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes, *Nat. Rev. Endocrinol.* 5 (4) (2009) 219–226.
- [4] M. Cnop, et al., Mechanisms of pancreatic b-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities, *Diabetes* 54 (Suppl 2) (2005) S97–S107.
- [5] L.F. Rezende, et al., Ciliary neurotrophic factor (CNTF) protects non-obese Swiss mice against type 2 diabetes by increasing beta cell mass and reducing insulin clearance, *Diabetologia* 55 (5) (2012) 1495–1504.
- [6] P. Collombat, et al., Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development, *Genes Dev.* 17 (20) (2003) 2591–2603.
- [7] D.Q. Shih, et al., Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism, *Diabetes* 50 (11) (2001) 2472–2480.
- [8] R.K. Gupta, et al., Expansion of adult beta-cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4alpha, *Genes Dev.* 21 (7) (2007) 756–769.
- [9] H. Al-Kandari, et al., Identification of maturity-onset-diabetes of the young (MODY) mutations in a country where diabetes is endemic, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021) 16060.
- [10] R.K. Gupta, K.H. Kaestner, HNF-4alpha: from MODY to late-onset type 2 diabetes, *Trends Mol. Med.* 10 (11) (2004) 521–524.

- [11] A. Ihara, et al., Functional characterization of the HNF4alpha isoform (HNF4alpha8) expressed in pancreatic beta-cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329 (3) (2005) 984–990.
- [12] H.L. Ko, Z. Zhuo, E.C. Ren, HNF4 α combinatorial isoform heterodimers activate distinct gene targets that differ from their corresponding homodimers, *Cell Rep.* 26 (10) (2019) 2549–2557.e3.
- [13] A. Bailly, N. Briangon, M.C. Weiss, Characterization of glucocorticoid receptor and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) binding to the hnf4alpha gene in the liver, *Biochimie* 91 (9) (2009) 1095–1103.
- [14] S. Guo, H. Lu, Novel mechanisms of regulation of the expression and transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 α , *J. Cell. Biochem.* 120 (1) (2019) 519–532.
- [15] S.K. Hansen, et al., Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function, *J. Clin. Invest.* 110 (6) (2002) 827–833.
- [16] J. Huang, et al., Expression of HNF4alpha variants in pancreatic islets and Ins-1 beta cells, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24 (7) (2008) 533–543.
- [17] J.D. Johnson, Pancreatic beta-cell apoptosis in maturity onset diabetes of the young, *Journal of Diabetes* (2007) 67–74.
- [18] R.K. Gupta, et al., The MODY1 gene HNF-4alpha regulates selected genes involved in insulin secretion, *J. Clin. Invest.* 115 (4) (2005) 1006–1015.
- [19] A. Miura, et al., Hepatocyte nuclear factor-4alpha is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells, *J. Biol. Chem.* 281 (8) (2006) 5246–5257.
- [20] I. Sandovici, et al., Developmental and environmental epigenetic programming of the endocrine pancreas: consequences for type 2 diabetes, *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (9) (2013) 1575–1595.
- [21] Y. Sato, et al., Anks4b, a novel target of HNF4 α protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells, *J. Biol. Chem.* 287 (27) (2012) 23236–23245.
- [22] S.E. Kahn, The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes, *Diabetologia* 46 (1) (2003) 3–19.
- [23] S.J. Paulsen, et al., Characterization of beta-cell mass and insulin resistance in diet-induced obese and diet-resistant rats, *Obesity (Silver Spring)* 18 (2) (2010) 266–273.
- [24] V. Cigliola, et al., Stress-induced adaptive islet cell identity changes, *Diabetes Obes. Metab.* 18 (Suppl 1) (2016) 87–96.
- [25] C.B. Sangan, et al., In vitro reprogramming of pancreatic alpha cells towards a beta cell phenotype following ectopic HNF4 α expression, *Mol. Cell. Endocrinol.* 399 (2015) 50–59.
- [26] N. Bodor, P. Buchwald, Corticosteroid design for the treatment of asthma: structural insights and the therapeutic potential of soft corticosteroids, *Curr. Pharm. Des.* 12 (25) (2006) 3241–3260.
- [27] J. Burén, et al., Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes, *Eur. J. Endocrinol.* 146 (3) (2002) 419–429.
- [28] A.O. Protzek, et al., Augmented β -cell function and mass in glucocorticoid-treated rodents are associated with increased islet Ir- β /AKT/mTOR and decreased AMPK/ACC and AS160 signaling, *Int. J. Endocrinol.* 2014 (2014), 983453.
- [29] J. Ruzzin, A.S. Wagman, J. Jensen, Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor, *Diabetologia* 48 (10) (2005) 2119–2130.
- [30] S.M. Ferreira, et al., ARHGAP21 acts as an inhibitor of the glucose-stimulated insulin secretion process, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 11 (2020), 599165.
- [31] C. Dos Santos, et al., Excess of glucocorticoids during late gestation impairs the recovery of offspring's β -cell function after a postnatal injury, *FASEB J.* 35 (8) (2021), e21828.
- [32] J.M. Oliver-Krasinski, D.A. Stoffers, On the origin of the beta cell, *Genes Dev.* 22 (15) (2008) 1998–2021.
- [33] S. Afelik, M. Rovira, Pancreatic β -cell regeneration: advances in understanding the genes and signaling pathways involved, *Genome Med.* 9 (1) (2017) 42.
- [34] H. Wang, et al., Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion, *J. Biol. Chem.* 275 (46) (2000) 35953–35959.
- [35] M. Juríková, et al., Ki67, PCNA, and MCM proteins: markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer, *Acta Histochem.* 118 (5) (2016) 544–552.
- [36] S. Oyadomari, et al., The gene for hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha is activated by glucocorticoids and glucagon, and repressed by insulin in rat liver, *FEBS Lett.* 478 (1–2) (2000) 141–146.
- [37] Y. Zhu, et al., PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration, *Stem Cell Res. Ther.* 8 (1) (2017) 240.
- [38] N.C. Bramswig, K.H. Kaestner, Transcriptional regulation of α -cell differentiation, *Diabetes Obes. Metab.* 13 (Suppl 1) (2011) 13–20.
- [39] P. Collombat, et al., The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells, *Cell* 138 (3) (2009) 449–462.
- [40] H.S. Spijker, et al., Conversion of mature human β -cells into glucagon-producing α -cells, *Diabetes* 62 (7) (2013) 2471–2480.