
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**CARACTERIZAÇÃO DO MODELO B6D2F1 PARA OBESIDADE, DIABETES E
SÍNDROME METABÓLICA E SUA POTENCIALIDADE PARA TERAPIA
CELULAR EM LESÃO AGUDA**

ADRIANE PADUAN NOLLI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)

Março - 2013

ADRIANE PADUAN NOLLI

**CARACTERIZAÇÃO DO MODELO B6D2F1 PARA OBESIDADE, DIABETES E
SÍNDROME METABÓLICA E SUA POTENCIALIDADE PARA TERAPIA
CELULAR EM LESÃO AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho de Rio Claro para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)

Departamento: Biologia

Orientador: Dr. Flávio Henrique Caetano

Co-orientador: Marcus A. Finzi Corat

Rio Claro

2013

574.82 Nolli, Adriane Paduan
N796c Caracterização do modelo B6D2F1 para obesidade, diabetes e síndrome metabólica e sua potencialidade para terapia celular em lesão aguda / Adriane Paduan Nolli. - Rio Claro : [s.n.], 2013
55 f. : il., figs., gráfs., tabs., quadros, fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Flávio Henrique Caetano
Co-Orientador: Marcus Alexandre Finzi Corat

1. Histologia. 2. Células mononucleares de medula óssea. 3. Células tronco. 4. Diabetes melito tipo 2. 5. Lesão nervo ciático. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Caracterização do modelo B6D2F1 para obesidade, diabetes e síndrome metabólicas e sua potencialidade para terapia celular em lesão aguda

AUTORA: ADRIANE PADUAN NOLLI

ORIENTADOR: Prof. Dr. FLAVIO HENRIQUE CAETANO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCUS ALEXANDRE FINZI CORAT

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCUS ALEXANDRE FINZI CORAT
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. ROVILSON GILIOLI
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. HÉRCULES MENEZES
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro

Data da realização: 01 de março de 2013.

Agradecimentos

Ao meu orientador Marcus, por ser um grande orientador e amigo que, com sua sabedoria e ânsia por novidades, me ensinou tantas coisas novas com muita paciência

Ao Sam, que nos ajudou a iniciar a idéia deste trabalho, pela sua grande paciência e cuidado e pela sua imensa amizade

Ao Flávio, que nos ajudou a conquistar mais uma etapa de novas vidas

À minha mãe e ao meu pai, que são a minha sustentação e por me apoiarem em todas as minhas escolhas

À minha irmã Cris, que deu todo seu apoio, cuidado e grandes conselhos.

Ao Eklon, pela grande e linda companhia de tantos anos, pelas grandes ajudas nas horas difíceis me fazendo ri em muitas delas, pelos melhores conselhos, compreensão e grande paciência

Ao meu gato George, pela gostosa companhia e pelos momentos de felicidade que sempre me dá

À Hari, pelas grandes ajudas, hospedagem em sua casa e grande amizade

Ao Rovilson, por proporcionar que este trabalho fosse realizado

Às todas meninas do laboratório do CEMIB, por proporcionaram grandes momentos de risadas e divertimento, além da grande ajuda no laboratório e nos cuidados dos camundongos

À equipe do Biotério do CEMIB

Ao pessoal da farmacologia, anatomia patológica, anatomia e fisiologia, por liberar espaço para que eu pudesse realizar os experimentos, pelas dicas e grandes ajudas

Ao Vlamir, por suas dicas e por ser um grande amigo

Ao Lucas, pela imensa ajuda, dedicação, paciência e amizade

Às meninas da secretaria de pós-graduação da Unesp, pela dedicação e paciência a qualquer hora que precisei

Aos animais utilizados no experimento, pela doação da vida em prol da pesquisa

À FAPESP, pelo apoio financeiro

A todos vocês, deixo meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

NOLLI, A. P. **Caracterização do modelo B6D2F1 para obesidade, diabetes e síndrome metabólicas e sua potencialidade para terapia celular em lesão aguda.** [Characterization of B6D2F1 model for obesity, diabetes and metabolic syndrome and its potential for cell therapy in lesion]. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2013.

Para pesquisa experimental relacionada à síndrome metabólica (SM) e diabetes melito tipo 2 (DMT2), uma dieta que induz obesidade e que desenvolve alterações em modelos animais não alterados geneticamente, é essencial. Neste trabalho, mostramos que o camundongo B6D2F1, F1 híbrido do cruzamento de camundongos isogênicos C57BL/6J/Unib com DBA/2Unib, desenvolveu SM e DMT2 ao ser alimentado com dieta hipercalórica, podendo ser observado várias alterações fisiopatológicas encontradas na DMT2 humana, como a obesidade severa, resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão arterial e alterações histológicas em pâncreas, fígado e rim, sendo, assim, um modelo animal muito bom para a proposta de nosso trabalho. Neste trabalho, através do procedimento cirúrgico de esmagamento e lesão do nervo ciático de camundongos B6D2F1 diabéticos obesos e camundongos B6D2F1 não diabéticos, permitimos simular uma situação de trauma agudo em camundongos B6D2F1 obesos diabéticos induzidos por DH. Uma vez que o nervo ciático é uma estrutura isolada, pouco vascularizado e em que a nutrição ocorre de forma indireta, foi possível observar de forma precisa a potencialidade da migração de células tronco mononucleares de medula óssea (CMMO) GFP (*green fluorescent protein*) de camundongos B6D2F1 GFP obesos e diabéticos à lesão nervosa aguda quando injetadas sistemicamente. Com isso, embora a grande quantidade de sinalização existente num organismo de lesão progressiva e crônica como encontrado em diabéticos, neste trabalho foi mostrada esta potencialidade de migração celular evidenciando a resposta sinalizadora positiva das células usadas para a terapia celular originadas de organismo diabético, assim como a sinalização da lesão do nervo ciático responsável pelo direcionamento e *homing* destas células. Sendo este o primeiro passo para o possível sucesso desta terapia, com o presente trabalho abrem-se portas para futuros estudos de terapia celular regenerativa em lesão aguda em diabetes que sejam realizados e desenvolvidos visando sua efetividade e funcionalidade.

Palavras-chave: modelo animal B6D2F1, terapia celular, lesão aguda, diabetes melito tipo 2

ABSTRACT

NOLLI, A. P. **Caracterização do modelo B6D2F1 para obesidade, diabetes e síndrome metabólicas e sua potencialidade para terapia celular em lesão aguda.** [Characterization of B6D2F1 model for obesity, diabetes and metabolic syndrome and its potential for cell therapy in lesion]. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2013.

For experimental research related to metabolic syndrome (MS) and type 2 diabetes mellitus (T2DM), a diet that induces obesity that develops and changes in animal models genetically normal, is essential. In this paper, we show that the B6D2F1 mouse, F1 hybrid by crossing inbred mice with C57BL/6J/Unib DBA/2Unib developed MS and T2DM to be fed with high calorie diet, and can be seen several pathophysiological changes found in human T2DM, such as severe obesity, insulin resistance, glucose intolerance, hypertension, and histological changes in the pancreas, liver and kidney, and thus an ideal animal model for the proposal of our work. In this work, through the surgical procedure and crushing sciatic nerve injury in mice B6D2F1 obese diabetic mice and nondiabetic B6D2F1, allow simulate a situation of acute trauma in mice B6D2F1 obese diabetic-induced DH. Once the sciatic nerve is isolated structure, slightly vascularized and in the nutrition which occurs indirectly, it was possible to observe accurately the capability of the migration of mononuclear stem cells from bone marrow (BMMC) GFP (green fluorescent protein) of GFP mice B6D2F1 obese and diabetic nerve acute injury when injected systemically. Thus, despite all the existing signaling of body injury and chronic progressive as found in diabetics, this work was shown this capability of cell migration signaling highlighting the positive response of the cells used for cell therapy derived from diabetic body, as well as the signs of sciatic nerve injury responsible for targeting and homing of these cells. Since this is the first step in the possible success of this therapy, this study opens up doors for future studies of regenerative cell therapy in acute diabetes that are made and developed to its effectiveness and functionality.

Keywords: animal model B6D2F1, cell therapy, acute injury, diabetes mellitus type 2

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEMIB= Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica

CEUA= Comissão Ética no Uso de Animais

CMMO= Células mononucleares de medula óssea

CIBio= Comissão Interna de Biossegurança

CO₂= Gás carbônico

CPEs= Células progenitoras endoteliais

CXCR-4= C-X-C *chemokine receptor type 4*

DAPI= 4', 6-diamidino 2-phenylindole, dihydrochloride

DMEN= *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMT1= Diabetes Melito Tipo 1

DMT2= Diabetes Melito Tipo 2

DH= Dieta hipercalórica

GFP= *Green fluorescent protein*

MO= Medula óssea

RI= Resistência à insulina

SDF-1= *Stromal cell-derived factor-1*

SM= Síndrome metabólica

UNICAMP= Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 ANIMAIS	12
3.2 DIETAS	13
3.2.1 Composição das dietas	13
3.3 CURVAS DE TOLERÂNCIA À INSULINA E À GLICOSE	15
3.4 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	15
3.5 PERFIL DE LIPOPROTEÍNAS	16
3.6 PROCESSAMENTOS PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	16
3.6.1 Coloração pela Hematoxilina-Eosina.....	17
3.7 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA (CMMO)	18
3.8 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO- ESMAGAMENTO DO NERVO CIÁTICO.....	19
3.9 ANÁLISE DOS NERVOS LESIONADOS	21
4 RESULTADOS	22
4.1 EXPERIMENTO I.....	23
4.2 EXPERIMENTO II.....	32
5 DISCUSSÃO GERAL.....	44
6 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é um distúrbio da civilização moderna, associada à obesidade, como resultado da alimentação inadequada e do sedentarismo. Esta síndrome é um conjunto de anormalidades metabólicas e hemodinâmicas caracterizada pela presença da obesidade, dislipidemia, hipertensão, resistência à insulina (RI) e hiperglicemia (SACKS; MCDONALD, 1996; PARILLO; RICCARDI, 2004; MALECKI, 2005).

Um pouco mais de um terço dos adultos nos Estados Unidos poderiam ser caracterizados como portadores da SM, a qual aumenta com a idade e, principalmente, com o aumento do índice de massa corporal (IMC) (ERVIN, 2009). Os dados de prevalência mundial da SM têm comportamento crescente anualmente, sendo eles muito preocupantes, já que esta síndrome predispõe o surgimento da diabetes melito tipo 2 (DMT2) e das doenças cardiovasculares (SACKS; MCDONALD, 1996; PARILLO; RICCARDI, 2004; MALECKI, 2005). A DMT2 e SM são conhecidas por serem complexas e por envolverem fatores poligenéticos e ambientais (MALECKI, 2005; LOOMANS et al., 2004; LI et al., 2011, SHEETZ; KING, 2002).

A diabetes melito tipo 2 ocorre quando a secreção de insulina é inadequada para a manutenção da concentração normal de glicose no sangue e tem frequente associação com obesidade. Relaciona-se à resistência à insulina e à incapacidade das células β do pâncreas em manter uma adequada secreção de insulina. A DMT2 corresponde aproximadamente 90% das diabetes e atinge cerca de 246 milhões de pessoas em todo mundo, sendo estimado pela *American Diabetes Association* um crescimento de 6% anualmente.

Resistência à insulina e hiperglicemia estão associadas com o declínio do número e disfunção das células progenitoras endoteliais (CPEs) circulantes, as quais têm origem na medula óssea (MO) e desempenham um papel importante na homeostase vascular e angiogênese (ASAHARA; MUROHARA; SULLIVAN, 1997; SHEETZ; KING, 2002; RAFII; LYDEN, 2003; LOOMANS et al., 2004; CHEN et al., 2007; LI et al., 2011), podendo, com sua deficiência angiogênica, causar doenças cardiovasculares, com comprometimento aterosclerótico das artérias coronarianas, dos membros inferiores e das cerebrais com consequente morte do paciente, mesmo em estágios precoces da DMT2 (ASAHARA; MASUDA; TAKAHASHI, 1999; OIKAWA et al., 2010).

Células tronco adultas têm sido utilizadas em estudos em diferentes patologias, incluindo a diabetes, como potente terapia para criar tecidos vivos e funcionais e para regenerar e reparar tecidos e órgãos do corpo que estão danificados. As células tronco têm o

poder de ir a áreas danificadas através do *homing* celular, possibilitando a regeneração de novas células e tecidos através da realização de reparo e processo de renovação, restaurando a funcionalidade (ROOPA, 2009; DALEY; SCADDEN, 2008). A medula óssea é uma importante fonte de células tronco adultas pluripotentes, tais como as células tronco hematopoiéticas, CPEs e mesenquimais. Estas células progenitoras pertencem à família de células mononucleares (RATAJCZAK et al., 2004; HU et al., 2012).

Os fatores envolvidos no *homing* celular são relacionados principalmente com duas proteínas, uma sinalizadora e outra de resposta a esta sinalização, são elas a quimiocina SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*) e o receptor CXCR4, respectivamente. SDF-1 regula muitos processos biológicos essenciais, incluindo a motilidade de células tronco ao local de reparo e regeneração, através de um mecanismo dependente CXCR-4 (ROOPA, 2009; DALEY; SCADDEN, 2008). CXCR-4 é um receptor quimiocina- α específico para SDF-1, ambos são conhecidos por serem importantes na migração de células tronco ao local danificado.

Estudos de terapia celular em diabetes melito tipo 1 (:) mostraram que células mesenquimais e células de MO injetadas sistemicamente em modelos animais induzidos por estreptozotocina, substância química tóxica para as células β produtoras de insulina do pâncreas, melhoraram o controle glicêmico e a capacidade de regeneração de células β do pâncreas (MILANESI et al., 2012; HASEGAWA et al., 2006; HESS et al., 2003; URBAN et al., 2008; BANERJEE; KUMAR; BHONDE, 2005; EZQUER et al., 2008; EZQUER et al., 2011) e em pacientes com DMT1, o transplante autólogo de células hematopoiéticas juntamente com altas doses de imunossupressão resultou na independência de insulina por período prolongado em maior parte dos pacientes tratados (COURI et al., 2009; ESMATJES, 2010; MAEHR et al., 2009). Diversos estudos nos modelos animais diabéticos mostraram que terapia com células mesenquimais melhoram a microalbuminúria e preservam a histologia normal renal (EZQUER et al., 2008; LEE et al., 2006).

Nos poucos ensaios clínicos utilizando terapia celular com células de MO autólogas em pacientes com DMT2, também mostraram resultados de diminuição da glicemia de jejum, das doses de insulina diárias e da hemoglobina glicosilada A_{1c} (HbA $_{1c}$), entre outros parâmetros por até um ano (ESTRADA et al., 2008; BHANSALI et al., 2009; LI et al., 2011).

Esses estudos utilizando terapia celular em modelos animais induzidos por estreptozotocina para DMT1 e em pacientes diabéticos na regeneração de células β do pâncreas com consequente diminuição da hiperglicemia, nas complicações crônicas como a disfunção e falência renal de modelos animais e diminuição da dose de insulina diária de

pacientes com DMT2, mostram a importância dada ao estudo da terapia celular nas complicações crônicas das diabetes. Entretanto, estudos de terapia celular relacionados à reparação e à regeneração de estruturas danificadas de origem aguda, sejam em musculatura, ossos, vasos e nervos em pacientes diabéticos são muito pouco estudados, porém extremamente importantes. Visto isto, é essencial a utilização de um modelo animal apropriado que mimetize vários aspectos das características da DMT2 em humanos para este tipo de estudo utilizando terapia celular para reparação e regeneração de estruturas danificadas de origem aguda.

Estudos têm mostrado a influência do consumo de gorduras, sejam elas saturadas ou insaturadas, no ganho de peso de humanos, uma vez que os alimentos ricos em lipídeos são geralmente altamente energéticos, relatando que a obesidade causada pelo consumo de uma dieta rica em calorias é a principal causa de SM e DMT2 (CATENACCI; HILL; WYATT, 2009; PARILLO; RICCARDI, 2004).

Existem alguns estudos com modelos experimentais para obesidade e DMT2, tais como camundongos isogênicos C57BL/6 e DBA/2. O modelo DBA/2 tem predisposição a ser diabético devido a sua grande suscetibilidade de apresentar disfunção nas células β do pâncreas, porém são animais que têm muita resistência à obesidade induzida por dieta hiperlipídica, enquanto o modelo C57BL/6 tem a predisposição de se tornar diabético obeso através da ingestão de dieta hiperlipídica, porém os sintomas desse modelo são modestos e os defeitos da secreção de insulina são limitados (SURWIT et al., 1988; LEITER; COLEMAN; HUMMEL, 1981).

Através dos estudos com camundongos C57BL/6J e DBA/2, Karawasa et al., 2009 estabeleceu um novo modelo híbrido F1 do cruzamento dessas duas linhagens de camundongos nomeado de B6D2F1 que, através da ingestão de dieta hiperlipídica composta pela adição de banha de porco ao farelo de ração, apresentou obesidade, resistência à insulina e defeitos distintos na secreção de insulina.

Nestes contextos, caracterizamos o modelo animal B6D2F1 para a SM e DMT2 através da ingestão de uma dieta hipercalórica (DH) com ingredientes utilizados na alimentação humana, para que assim fosse analisada a potencialidade de migração de células tronco mononucleares de medula óssea (CMMO) à lesão aguda em nervo ciático e a capacidade de sinalização dessa lesão aguda em recrutar essas células.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fisiologicamente o modelo animal B6D2F1 para a SM e DMT2 através da ingestão de uma dieta hipercalórica (DH), para que assim fosse analisada a potencialidade de migração de células tronco mononucleares de medula óssea (CMMO) à lesão aguda em nervo ciático e a capacidade de sinalização dessa lesão aguda em recrutar essas células.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisiopatologicamente o modelo animal B6D2F1 para SM e DMT2 através da ingestão de DH e das análises de pesagem corporal, das curvas de tolerância à glicose e insulina, da medição da pressão arterial sistólica e da histologia de pâncreas, fígado e rim.
- Avaliar a potencialidade de migração de CMMO à lesão aguda em nervo ciático e a capacidade de sinalização dessa lesão aguda em recrutar essas células, através do procedimento cirúrgico de esmagamento e lesão em nervo ciático de camundongos B6D2F1 tratados com DH e utilização de CMMO GFP (*green fluorescence protein*) de camundongos B6D2F1 GFP tratados com DH.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os animais utilizados neste trabalho foram provenientes do CEMIB/Unicamp. Camundongos isogênicos fêmeas C57BL/6J/Unib e machos DBA/2Unib foram adquiridos às 6-8 semanas de idade e submetidos ao cruzamento para gerar o modelo híbrido B6D2F1 (F₁ do cruzamento). Fêmeas transgênicas C57BL/6J/Unib GFP (*green fluorescent protein* expressa coloração fluorescente verde nas células, permitindo rastrear e visualizar estas, quando injetadas em animais não transgênicos, em microscopia de fluorescência) foram adquiridas às 6 semanas de idade e foram submetidas ao cruzamento com machos DBA/2N para que o modelo transgênico B6D2F1 GFP fosse gerado.

Os animais B6D2F1 GFP foram produzidos para que suas CMMO fossem injetadas sistemicamente em camundongos comuns B6D2F1 diabéticos e não diabéticos, para permitir o rastreamento e visualização em microscopia de fluorescência da possível migração das CMMO no tecido de animais tratados. Após o cruzamento e o desmame, os camundongos C57BL/6J/Unib, C57Bl/6J/Unib GFP e DBA/2Unib foram sacrificados por asfixia com CO₂ em câmara com fluxo lento de gás 5L/min.

A partir dos indivíduos da geração F1 dos dois cruzamentos realizados, foram selecionados camundongos machos B6D2F1 e B6D2F1 GFP às 6 semanas de idade e estes foram mantidos em ambiente com temperatura controlada, em caixas isoladas (3-5 camundongos por caixa). Foram oferecidos água e alimento *ad libitum* ao longo de todo o período experimental. Os experimentos com os animais foram realizados de acordo com diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp (Campinas, Brasil) e CIBio (CEMIB/Unicamp, Campinas, Brasil).

3.2 DIETAS

Para a realização dos experimentos, duas dietas foram utilizadas, sendo a dieta convencional dada aos animais B6D2F1 e B6D2F1 GFP para que a DMT2 não fosse desenvolvida, e dieta hipercalórica dada a outros animais B6D2F1 e B6D2F1 GFP para que desenvolvessem a diabetes. Os grupos experimentais foram gerados a partir da dieta dada a eles. O grupo experimental de camundongos que receberam a dieta convencional (DC) foi chamado de Grupo Controle (GC), enquanto que o grupo de animais que recebeu a dieta hipercalórica (DH) foi chamado de Grupo Tratado (GT).

As dietas foram oferecidas aos animais de ambos os grupos (GC e GT) por 24-26 semanas, período o qual os animais do GT desenvolveram DMT2. Após este período, os animais foram utilizados para diversos estudos, sendo eles divididos em duas etapas:

- Caracterização fisiopatológica do camundongo B6D2F1 para síndrome metabólica e diabetes melito tipo 2;
- Análise do potencial migratório de células mononucleares de medula óssea (CMMO) geradas ou não em organismo do GT para lesão aguda em nervo ciático em organismo do GC e GT.

3.2.1 Composição das dietas

3.2.1.1 Dieta Convencional

A dieta convencional, a qual foi dada aos camundongos do GC, consiste em ração para animais de laboratório Nuvilab CR-1[®] (Nuvital, Brasil). Composição básica: milho integral moído, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos. Proporção proteína-gordura-carboidrato de 32,5:5,8:61,7 com energia metabolizável de 3,3kcal/g.

3.2.1.2 Dieta Hipercalórica

Alimento	%
Sardinha em lata	6,31
Farinha de Soja	2,87
Fubá	1,15
Farinha de Trigo Integral	2,87
Germen de Trigo	5,74
Amido de Milho	4,59
Farinha de Aveia Integral	5,74
Leite Ninho [®]	11,48
Sustagem [®]	4,59
Farinha Lactea [®]	3,73
Leite de Soja	2,87
Sal	0,29
Açúcar Mascavo	0,29
Trigo para Kibe	1,15
Farelo de Ração	1,15
Levedo de Levedura	0,57
Banha de porco	26,22
Óleo de Soja	0,92
Ovos	3,66
Azeite Extra Virgem	1,22
Leite Integral	12,20
TOTAL	100%

Quadro 1- Ingredientes utilizados na DH

A dieta hipercalórica, composta por ingredientes utilizados na alimentação humana, foi oferecida aos animais B6D2F1, B6D2F1 GFP do GT a partir da data do desmame dos mesmos (6 semanas de idade) até completar 24-26 semanas da administração desta dieta. Proporção de proteína-gordura-carboidrato de 13,4:48,1:38,5 com energia metabolizável de 4,4 kcal/g

ETAPA I

3.3 CURVAS DE TOLERÂNCIA À INSULINA E À GLICOSE

As curvas de tolerância à insulina e à glicose foram realizadas para verificar se os camundongos B6D2F1 do GT desenvolveram resistência à insulina e intolerância à glicose.

Para a curva de tolerância à insulina, a glicemia dos animais foi medida em tempos determinados através de uma gota de sangue retirada da veia caudal colocada em fitas reagentes OneTouch Ultra Johnson®. A primeira medida (0 min) foi obtida com o animal em jejum alimentar de 8 horas e então foi administrado solução de insulina a 1% em solução fisiológica + albumina por via intraperitoneal e a glicemia foi medida aos 5, 15, 20 e 35 minutos.

Para a curva de tolerância à glicose, a glicemia dos animais foi medida em tempos determinados através de uma gota de sangue retirada da veia caudal colocada em fitas reagentes OneTouch Ultra Johnson®. A primeira medida (0 min) foi obtida com o animal em jejum alimentar de 8 horas e então foi administrado glicose a 20% por via intraperitoneal e a glicemia foi medida aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

3.4 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Para obtenção dos valores da pressão arterial sistólica, os animais foram colocados em gaiolas aquecidas à 37°C por 20 min, para provocar dilatação dos vasos caudais. Após este período, os animais foram colocados em contensor, modelo MLA5030 (AD Instruments, Austrália). Na cauda do animal adaptou-se um manguito acoplado a transdutor de pulso (sensor) para medir a pressão arterial. O manguito foi inflado até 200 mmHg de modo a não se visualizarem as pulsações. Logo após, o manguito foi desinsuflado até reiniciarem as pulsações, e os valores de pressão arterial foram registrados em sistema PowerLab™ de aquisição de dados (Software versão 7.0, AD Instruments, Austrália).

3.5 PERFIL DE LIPOPROTEÍNAS

O fracionamento das lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL) foi determinado a partir do plasma dos camundongos, os quais foram submetidos à cromatografia líquida de alta resolução (FPLC) utilizando-se uma coluna de Superose 6 (Amersham Pharmacia HR 10/30) (JIAO et al., 1990). Nas 40 frações eluídas da coluna foram determinadas as concentrações de colesterol total utilizando kit enzimático da Roche-Hitachi (Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante.

3.6 PROCESSAMENTOS PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Os animais B6D2F1 do GC e GT foram sacrificados por deslocamento cervical para serem coletados os órgãos para análise histológica. Fragmentos de aproximadamente de 6 mm de diâmetro dos órgãos pâncreas, fígado e rim foram fixados em solução de paraformaldeído 4% + sacarose 3% (Synth) por 24 horas (JUNQUEIRA, 2004 adaptado). Após fixação, as peças foram processadas histologicamente para desidratação, diafanização e posteriormente inclusão em blocos de Paraplast Plus (Sigma, USA). Os melhores resultados foram obtidos nos tempos listados no quadro 2.

Reagente	Tempo
Etanol 70%	2 horas
Etanol 90%	2 horas
Etanol 95%	1 hora
Etanol Absoluto I	1 hora
Etanol Absoluto II	12 horas
Etanol/Xilol (1:1)	2 horas
Xilol I	2 horas
Xilol II	2 horas
Parafina Histológica I	2 horas
Paraplast PLUS	4 horas

Quadro 2- Tempos utilizados no processamento histológico

Foram feitos blocos de parafina para cada órgão. Os blocos de parafina foram cortados de maneira seriada com 5µm de espessura. Os cortes histológicos foram analisados em microscopia óptica após coloração Hematoxilina-Eosina (H.E.) para visualização da morfologia e normalidade dos tecidos.

3.6.1 Coloração pela Hematoxilina-Eosina

A hematoxilina se comporta como um corante básico, ligando-se com estruturas basófilas dos tecidos, como por exemplo os ácidos nucleicos, glicosaminoglicanas e glicoproteínas ácidas. Em contrapartida a eosina é um corante ácido, portanto, possui afinidade por moléculas acidófilas, como por exemplo as mitocôndrias, grânulos de secreção, proteínas citoplasmáticas e colágeno (JUNQUEIRA, 2004).

Esta é a combinação de corantes mais utilizada, resultando na coloração azul ou violeta das estruturas ácidas como os núcleos, matriz de cartilagem hialina, porções do citoplasma ricas em RNA e outras estruturas ácidas; e coloração cor-de-rosa no citoplasma e colágeno.

O protocolo de coloração da técnica de hematoxilina-eosina (HE) está descrito em detalhes no quadro 3.

Reagente	Tempo
Xilol I	10 min
Xilol II	10 min
Etanol Absoluto	3 min
Etanol 90%	3 min
Etanol 70%	3 min
H2O Corrente	3 min
Hematoxilina	3 min
Etanol HCl	Retirar o excesso
H2O Corrente	10 minutos
Eosina	1 minuto
Etanol 70 %	2 trocas rápidas
Etanol Absoluto I	2 minutos
Etanol Absoluto II	2 minutos
Etanol/Xilol (1:1)	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol II	2 minutos

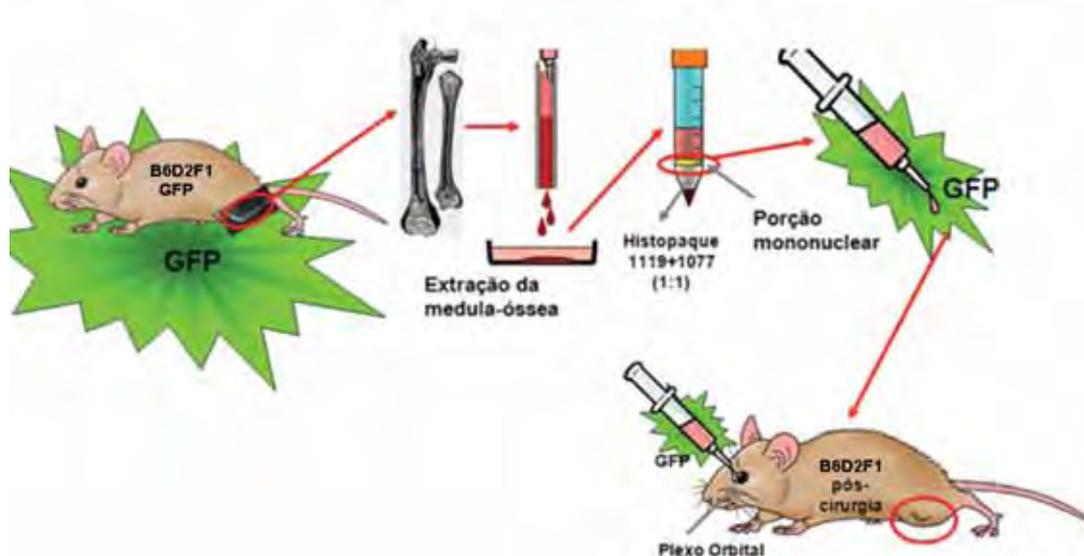
Quadro 3- Protocolo para coloração H.E.

ETAPA II

3.7 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA (CMMO)

Células da medula óssea foram extraídas do fêmur e da tíbia de camundongos transgênicos B6D2F1 GFP (com expressão oblíqua da proteína *green fluorescent protein*) do GC e CT. Essa proteína GFP expressa coloração fluorescente verde nas células, permitindo rastrear e visualizar estas, quando injetadas em animais não transgênicos B6D2F1, em microscopia de fluorescência.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a coleta e limpeza dos ossos fêmur e tíbia. As epífises dos ossos foram cortadas e a medula óssea foi lavada por uma agulha e meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contendo antibiótico penicilina/streptomicina, para certificar-se de não-contaminação. As células foram diluídas em 10 mL do meio DMEM e centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos a 25°C para lavagem. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio DMEM-penicilina/streptomicina e cuidadosamente sobrepostas numa solução de histopaque contida em tubo cônico tipo Falcon de 15 mL e centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos a 25°C. O anel correspondente a porção das células mononucleares, foi coletado e lavado uma vez em meio DMEM por centrifugação a 1.500 rpm por 10 minutos. As células sedimentadas foram ressuspensas em 1 mL, contadas e checado a viabilidade celular com solução de corante vital azul de Tripán a 0,1% (p/v) (protocolo segundo indicação do fabricante). Essas CMMO GFP, extraídas e purificadas de camundongos transgênicos B6D2F1 GFP do GC e GT, foram injetadas sistemicamente em camundongos B6D2F1 do GC e GT após o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo ciático descrito no item 3.7. O esquema de extração e purificação podem ser melhores visualizados no esquema 1.



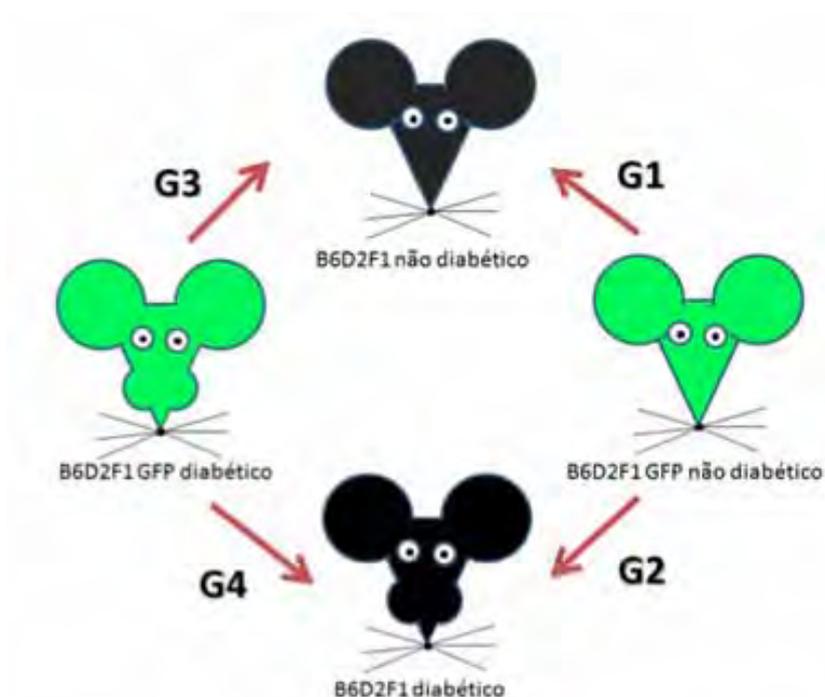
Esquema 1- Extração da medula óssea de camundongos transgênicos B6D2F1 GFP; purificação das CMMO; e injeção sistêmica de CMMO GFP em camundongos B6D2F1 do GC e CT.

3.8 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO- ESMAGAMENTO DO NERVO CIÁTICO

Camundongos B6D2F1 do GC e GT foram anestesiados via intraperitoneal pelo anestésico Avertin (0,0015-0,0017 mL solução a 2,5% de Avertin por grama de peso do animal). Após os animais serem anestesiados, foi realizada a tricotomia dos pelos da coxa esquerda dos animais e foi realizada a incisão cirúrgica paralelamente ao fêmur do animal. Os planos de fáscia e muscular foram rebatidos para exposição do nervo ciático. Primeiramente, o esmagamento do nervo foi realizado por 10 segundos ao nível do músculo piriforme, utilizando uma pinça n4 de forma padronizada para todos os animais. Sequencialmente, para ampliar a área de lesão nervosa, foi utilizada uma pinça hemostática no mesmo local por mais 10 segundos de compressão. Os planos musculares e subcutâneos foram retornados aos seus locais e a pele foi adequadamente suturada (THAMS, OLIVEIRA, CULLHEIM, 2008).

No mesmo dia em que foi realizado o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo ciático, os animais B6D2F1 do GC e GT que tiveram seus nervos lesionados, receberam CMMO GFP dos camundongos transgênicos B6D2F1 GFP do GC e GT via sistêmica pelo plexo retrorbital. Para que fosse verificado a potencialidade de migração de CMMO GFP de animais transgênicos B6D2F1 GFP do GC e GT com consequente análise da potencialidade de sinalização da lesão para o recrutamento dessas células, foram criados 4 grupos (Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3 e Grupo 4). Os grupos são melhores visualizados no esquema 2.

- G1: CMMO de animais transgênicos B6D2F1 GFP do GC (não diabéticos) injetadas em animais GC (não diabéticos) lesionados;
- G2: CMMO de animais transgênicos B6D2F1 GFP do GC (não diabéticos) injetadas em animais GT (diabéticos) lesionados;
- G3: CMMO de animais transgênicos B6D2F1 GFP do GT (diabéticos) injetadas em animais GC (não diabéticos) lesionados;
- G4: CMMO de animais transgênicos B6D2F1 GFP do GT (diabéticos) injetadas em animais GT (diabéticos) lesionados;



Esquema 2- Ilustração exemplificando os 4 grupos testados, sendo mostrado os animais doadores de CMMO GFP aos animais receptores dessas células.

Nos animais, as lesões foram analisadas após 4 dias do início do tratamento sob microscópio de fluorescência em cortes de tecido congelado com uso de criostato. Isto possibilitará a análise do comportamento das CMMO (migração) geradas em diferentes ambientes fisiológicos (diabético e não diabético) em diferentes ambientes da lesão (diabético e não diabético), afim de gerar informações intrínsecas às células progenitoras, assim como seu comportamento em resposta à lesão fora e dentro de um organismo diabético.

3.9 ANÁLISE DOS NERVOS LESIONADOS

Após 4 dias da cirurgia e injeção sistêmica de CMMO GFP dos camundongos transgênicos B6D2F1 GFP do GC e GT, os animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 foram sacrificados por asfixia com CO₂ em câmara com fluxo lento de gás 5L/min para a coleta dos nervos ciáticos lesionados, pâncreas e rim. Logo após a coleta, os nervos, pâncreas e rim foram fixados em paraformaldeído 4% + sacarose 3%. O processo de desidratação e diafanização são os mesmos descritos no item 3.5, porém os materiais não foram embloacos em parafina, mas sim, congelados em Tissue Tek ® à temperatura de -80°C para posterior cortes em criostato.

Foram analisados em microscopia óptica de fluorescência em cortes de tecido congelado com uso de criostato, possibilitando analisar a capacidade migratória das CMMO em diferentes ambientes fisiológicos (diabético e não diabético) à lesão aguda e analisar a capacidade de sinalização que estes organismos têm ao receber terapia celular. Núcleos de células do nervo, pâncreas e rim foram marcadas por DAPI (marcação azulada quando visto em microscopia óptica de fluorescência).

4 RESULTADOS

Os resultados serão expostos em formato de dois artigos, sendo o primeiro a caracterização fisiopatológica do camundongo B6D2F1 para síndrome metabólica e diabetes melito tipo 2, e o segundo sobre análise do potencial migratório de células mononucleares de medula óssea (CMMO) geradas ou não em organismo do GT para lesão aguda em nervo ciático em organismo do GC e GT.

4.1 EXPERIMENTO I

Título: Caracterização do modelo animal B6D2F1 induzido por dieta hipercalórica para obesidade, síndrome metabólica e diabetes melito tipo 2

RESUMO

Para pesquisa experimental relacionada à síndrome metabólica (SM) e diabetes melito tipo 2 (DMT2), uma dieta que induz obesidade e que desenvolve alterações em modelos animais geneticamente normais, é essencial. No entanto, as tentativas de fornecer uma dieta hipercalórica (DH) para as principais linhagens puras de camundongos não resultou na criação de um modelo ideal. Neste trabalho, mostramos que o camundongo B6D2F1, F1 híbrido do cruzamento de camundongos isogênicos C57BL/6J/Unib com DBA/2Unib, desenvolveu SM e DMT2 ao ser alimentado com dieta hipercalórica. Foi observado que este modelo animal alimentado com dieta hipercalórica apresentou obesidade e desenvolveu a SM e a DMT2 com resistência à insulina, hiperglicemia, intolerância à glicose, hipertensão e alterações no metabolismo de lipídeos em 24-26 semanas. Foi mostrado nas análises histológicas em fígado esteatose hepática com deposição macrogoticular em parênquima hepático nas zonas 2 e 3, e deposição microgoticular na zona 1; em pâncreas hiperplasia das ilhotas pancreáticas, aumentando a função endócrina; e em rim nefrose discreta na região cortical do órgão. Camundongos B6D2F1 alimentados com DH tornaram-se um modelo animal apropriado para estudos da SM e DMT2. Este modelo pode ser útil para explorar mecanismos de desenvolvimento da SM e DMT2; utilização de drogas anti-diabéticas ou anti-obesidade; avaliação dos efeitos nutricionais de alimentos considerados saudáveis associados ao alto teor de gordura saturada; e terapia celular.

1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é um conjunto de anormalidades metabólicas e hemodinâmicas caracterizada pela presença da obesidade, dislipidemia, hipertensão, resistência insulínica e hiperglicemia, as quais predisõem à diabetes melito tipo 2 (DMT2) e a doenças cardiovasculares (ALBERTI et al., 2009; GUPTA; GUPTA, 2010; KAHAN et al., 2005). A DMT2 e SM são conhecidas por serem complexas e envolvem fatores poligenéticos e ambientais (GUPTA; GUPTA, 2010; SACKS; MCDONALD, 1996; MALECKI, 2005;

JEE; JO, 2012).

Estudos têm mostrado a influência do consumo de gorduras, sejam elas saturadas ou insaturadas, no ganho de peso de humanos, uma vez que os alimentos ricos em lipídeos são geralmente altamente energéticos, relatando que a obesidade causada pelo consumo de uma dieta rica em calorias é a principal causa de SM e DMT2 (CATENACCI; HILL; WYATT, 2009; PARILLO; RICCARDI, 2004). Deste modo, para o estudo de alterações fisiopatológicas descritas em humanos provocadas pela SM e DMT2, é interessante estabelecer um modelo animal que possa ser induzido à obesidade através da ingestão de dieta hipercalórica.

Atualmente, os camundongos db/db e ratos ZDF e Zucker são usados como modelos animais para diversos estudos da SM e DMT2 (DINEL et al., 2011; YILMAZ et al., 2010; FUJIWARA et al., 1991; CHILLARON et al., 2002). Estes modelos são caracterizados por serem animais monogênicos, havendo, portanto, limitações na fisiopatologia da SM e DMT2. As caracterizações da SM e DMT2 nestes modelos não são baseadas em fatores ambientais, os quais são de grande importância para o surgimento dessas síndromes em humanos (CHUA et al., 1996; CHEN et al., 1996; LEE et al., 1996).

Existem alguns estudos com modelos experimentais para obesidade e DMT2, tais como camundongos isogênicos C57BL/6 e DBA/2. O modelo DBA/2 tem predisposição a ser diabético devido a sua grande suscetibilidade de apresentar disfunção nas células β do pâncreas, porém são animais que têm muita resistência à obesidade induzida por dieta hiperlipídica, enquanto o modelo C57BL/6 tem a predisposição de se tornar diabético obeso através da ingestão de dieta hiperlipídica, porém os sintomas desse modelo são modestos e os defeitos da secreção de insulina são limitados (SURWIT et al., 1988; LEITER; COLEMAN; HUMMEL, 1981).

Através dos estudos com camundongos C57BL/6J e DBA/2, Karawasa et al, 2009 estabeleceu um novo modelo híbrido F1 do cruzamento dessas duas linhagens de camundongos nomeado de B6D2F1 que, através da ingestão de dieta hiperlipídica composta pela adição de banha de porco ao farelo de ração, apresentou obesidade, resistência à insulina e defeitos distintos na secreção de insulina.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi induzir o modelo animal B6D2F1, à ingestão de uma dieta hipercalórica (DH) com ingredientes utilizados na alimentação humana, para que assim fosse analisado a ocorrência de síndrome metabólica e diabetes melito tipo 2, apresentando obesidade, resistência à insulina e distintas alterações metabólicas de lipídios.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Camundongos isogênicos fêmeas C57BL/6Unib e machos DBA/2Unib foram adquiridos às 6-8 semanas de idade (CEMIB/Unicamp, Campinas, Brasil) e submetidos ao cruzamento para gerar o modelo híbrido B6D2F1 (F₁ do cruzamento). Dos indivíduos da geração F1, foram selecionados camundongos machos B6D2F1 às 6 semanas de idade e estes foram mantidos em ambiente com temperatura controlada, em caixas isoladas (3-5 camundongos por caixa). Foram oferecidos água e alimento *ad libitum* ao longo de todo o período experimental. Os experimentos com os animais foram realizados de acordo com diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/Unicamp (Campinas, Brasil).

2.2 Dieta

A alimentação dos camundongos B6D2F1 se iniciou às 6 semanas de idade. Os camundongos foram divididos em grupo controle (GC), o qual recebeu a dieta convencional, e grupo tratado com dieta hipercalórica (GT).

A dieta convencional foi composta pela ração Nuvilab CR-1[®] (Nuvital, Brasil), numa proporção proteína-gordura-carboidrato de 32,5:5,8:61,7 com energia metabolizável de 3,3kcal/g. A dieta hipercalórica (DH) foi feita através de mistura de ingredientes utilizados na alimentação humana, tendo em sua composição sardinha, farelos integrais, ingredientes à base de soja, leite integral, ovos, azeite e banha de porco numa proporção de proteína-gordura-carboidrato de 13,4:48,1:38,5 com energia metabolizável de 4,4 kcal/g.

2.3 Peso corporal e Curvas de tolerância à glicose e insulina

A cada 2 semanas o peso corporal foi obtido de cada animal de ambos os grupos.

Para a curva de tolerância à glicose, a glicemia dos animais foi medida em tempos determinados através de uma gota de sangue retirada da veia caudal colocada em fitas reagentes OneTouch Ultra Johnson[®]. A primeira medida (0 min) foi obtida com o animal em jejum alimentar de 8 horas e então foi administrado glicose a 20% por via intraperitoneal e a glicemia foi medida aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Para a curva de tolerância à insulina, a glicemia dos animais foi medida em tempos determinados através de uma gota de sangue retirada da veia caudal colocada em fitas reagentes OneTouch Ultra Johnson[®]. A primeira medida (0 min) foi obtida com o animal em

jejum alimentar de 8 horas e então foi administrado solução de insulina a 1% em solução fisiológica + albumina por via intraperitoneal e a glicemia foi medida aos 5, 15, 20 e 35 minutos.

2.4 Pressão arterial sistólica

Para obtenção dos valores da pressão arterial sistólica, os animais foram colocados em gaiolas aquecidas à 37°C por 20 min, para provocar dilatação dos vasos caudais. Após este período, os animais foram colocados em contensor, modelo MLA5030 (AD Instruments, Austrália). Na cauda do animal adaptou-se um manguito acoplado a transdutor de pulso (sensor) para medir a pressão arterial. O manguito foi inflado até 200 mmHg de modo a não se visualizarem as pulsações. Logo após, o manguito foi desinsuflado até reiniciarem as pulsações, e os valores de pressão arterial foram registrados em sistema PowerLab™ de aquisição de dados (Software versão 7.0, AD Instruments, Austrália).

3.5 Perfil de lipoproteínas

O fracionamento das lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL) foi determinado a partir do plasma dos camundongos, os quais foram submetidos à cromatografia líquida de alta resolução (FPLC) utilizando-se uma coluna de Superose 6 (Amersham Pharmacia HR 10/30) (JIAO et al., 1990). Nas 40 frações eluídas da coluna foram determinadas as concentrações de colesterol total utilizando kit enzimático da Roche-Hitachi (Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante.

2.5 Análises histológicas

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical de modo que o pâncreas, fígado e rim fossem coletados para análise histológica. O pâncreas, fígado e rim foram fixados em solução de paraformaldeído 4% + sacarose 3% (Synth) por 24 horas. Os órgãos foram desidratados em soluções de álcoois e embebedados em parafina por 4h. Os materiais foram emblocados, cortados, corados pela coloração hematoxilina-eosina (H.E.) e observados em microscopia óptica.

2.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas no programa *GraphPad Prism* v.3 através do test t.

3 RESULTADOS

3.1 DH induziu obesidade em camundongos B6D2F1

No início do experimento não havia diferença significativa no peso corporal entre GC e GTR. Camundongos alimentados com DH tornaram-se severamente obesos após a 12^a semana comparados com o GC (Fig. 1). A diferença no peso corporal entre os dois grupos foi de 9,9 g às 8 semanas de alimentação sendo ainda aumentado após esse período.

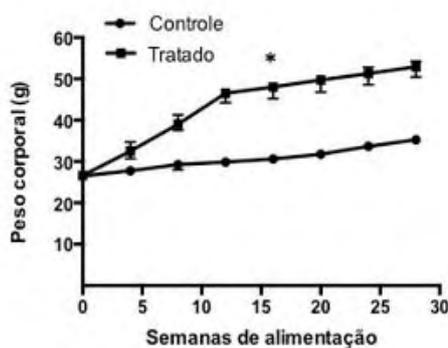


Figura 1: Peso corporal (g) dos camundongos controles e tratados com DH. Os dados são a média \pm SEM de 10 animais. *P < 0.01

3.2 DH induziu a Síndrome Metabólica e DMT2 em camundongos B6D2F1

Além da obesidade, os camundongos apresentaram hiperglicemia de jejum acima de 200 mg/dL, resistência à insulina e intolerância à glicose e (Fig. 2 A e B). A pressão arterial sistólica dos animais do GTR foi de 121 mmHg, sendo a do grupo controle 88 mmHg (Fig. 3). Os camundongos tratados com a DH também apresentaram hiperlipidemia com aumento do colesterol total e suas frações (Fig.4).

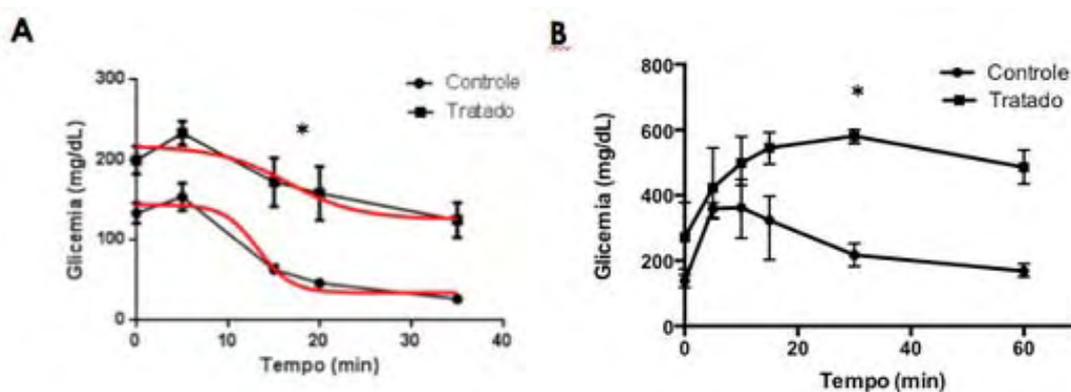


Figura 2: A: Após ser injetado insulina 1% intraperitoneal, é possível observar resistência à insulina do grupo tratado, enquanto no grupo controle há queda normal da glicemia (controle, n=4 e tratado, n=5). B: Curva glicêmica demonstrando intolerância à glicose do grupo tratado (controle, n=4 e tratado, n=5). Os dados são a média \pm SEM de 9 animais, *P < 0.02.

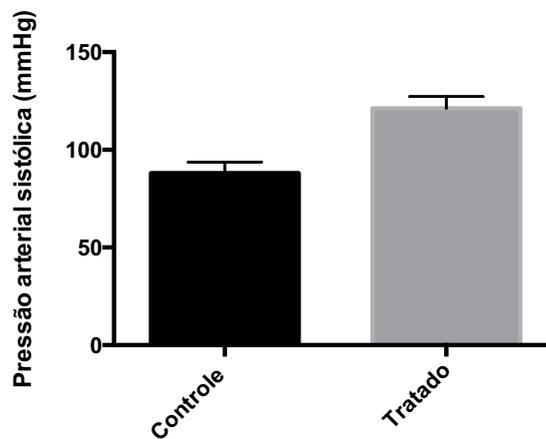


Figura 3: Pressão arterial sistólica de animais B6D2F1 do grupo controle e tratado (n= 5; n= 6, respectivamente). Os dados são a média \pm SEM de 11 animais, *P < 0.0001

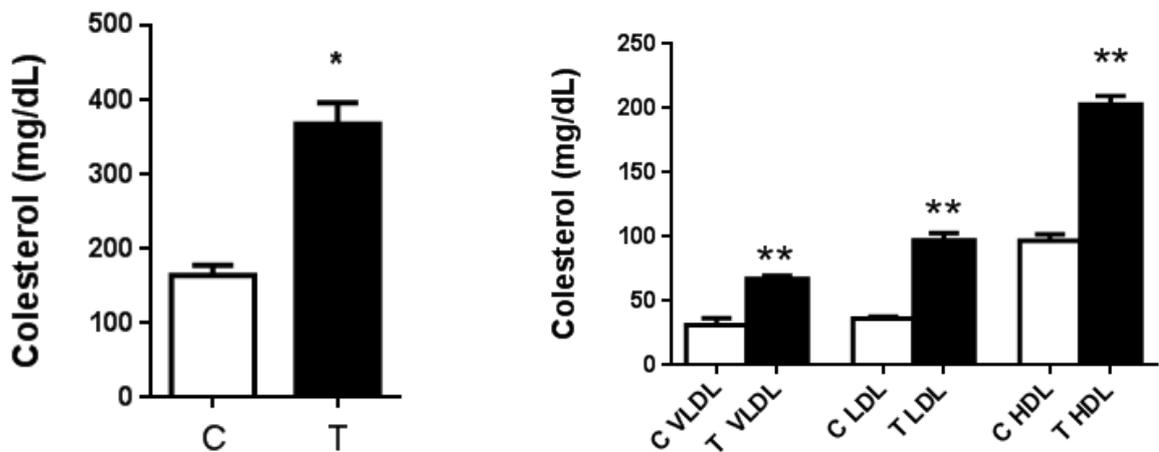


Figura 4: Colesterol total e frações de colesterol. C= Controle, T=Tratado. * P<0.001 e **P<0.0001

3.3 Análise histológica

Para investigar a patogênese da SM e DMT2 em camundongos B6D2F1 tratados com DH, foram examinados o fígado (Fig. 5 A, B), as ilhotas de Langerhans do pâncreas (Fig. 6 A, B) e rim (Fig. 7 A, B).

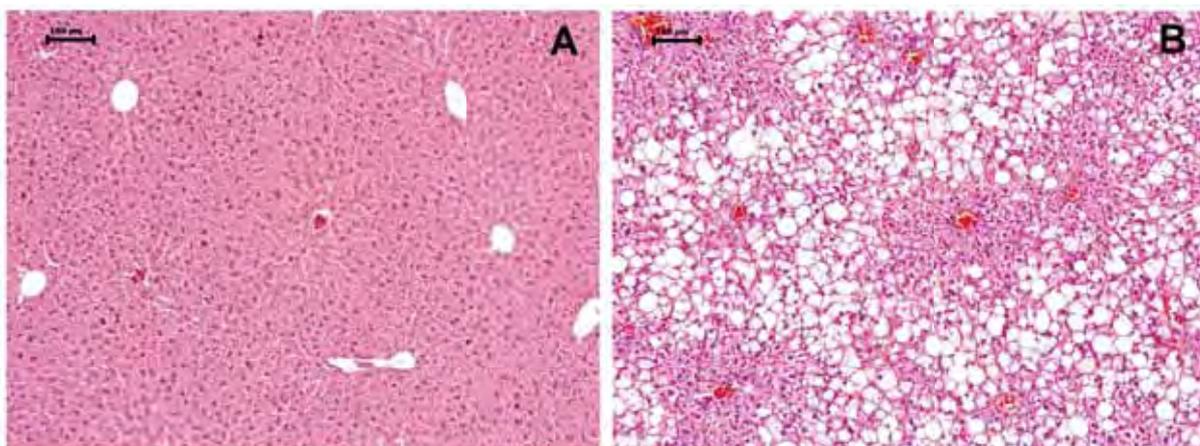


Figura 5: A e B: fígado corado por H.E. Em A, animal controle. Em B, esteatose hepática com deposição macrogoticular em parênquima hepática nas zonas 2 e 3, e deposição microgoticular na zona 1 em camundongo diabético. Barra representa 100 μm .

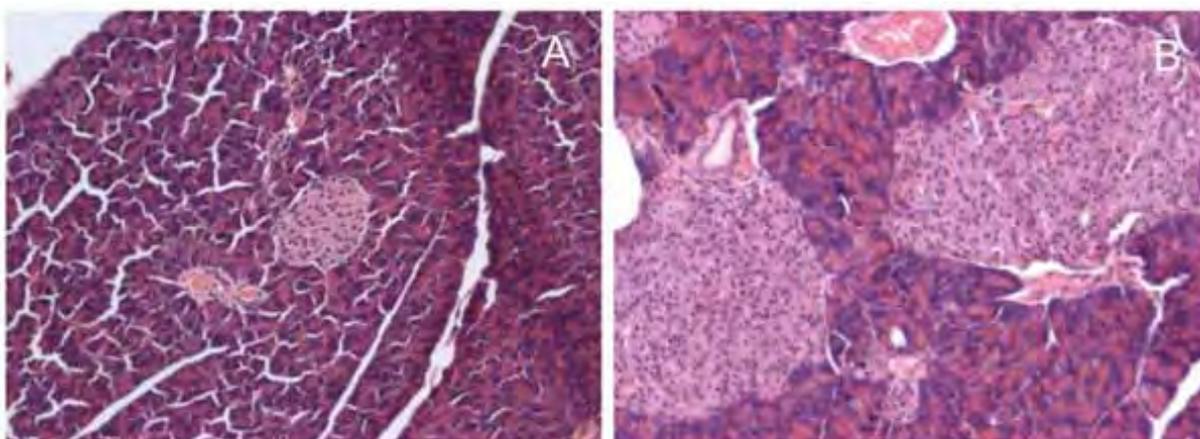


Figura 6: A e B: pâncreas corado por H.E. objetiva 10x. Em A, camundongo controle. Em B, hiperplasia das ilhotas pancreáticas, aumentando a função endócrina de camundongos diabéticos.

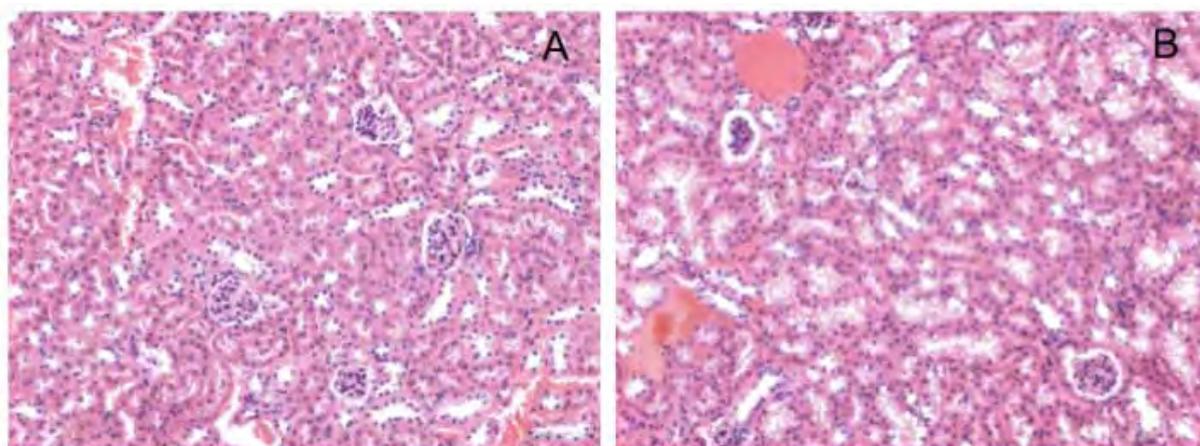


Figura 7: A e B: rim corado por H.E. objetiva 10x. Em A, camundongo controle. Em B, glomérulos com morfologia preservada e nefrose discreta na região cortical do órgão em camundongo diabético.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi possível verificar que, com uma dieta hipercalórica composta por ingredientes utilizados na alimentação humana, os camundongos B6D2F1 tornaram-se modelo-induzido de SM e DMT2. Nossos resultados mostraram que esses indivíduos híbridos F1 a partir do cruzamento entre C57BL/6J/Unib (linhagem obesa) e DBA/2Unib (linhagem diabética), alimentados com dieta hipercalórica, apresentaram obesidade, resistência à insulina (RI), hiperglicemia, hipertensão, alterações no metabolismo de lipídeos e DMT2.

As características observadas neste modelo-induzido B6D2F1 para SM e DMT2 são semelhantes às encontradas em humanos em diversos pontos. Este modelo animal desenvolveu estas síndromes como resultado da obesidade induzida por dieta hipercalórica com ingredientes utilizados na alimentação humana, sendo esta obesidade caracterizada inicialmente como simples (sem manifestações de alterações de SM e DMT2) porém, após 24-26 semanas, houve o desenvolvimento desses distúrbios fisiológicos. Esta transição de obesidade simples para SM e DMT2 é considerado o passo fundamental no desenvolvimento de SM e DMT2 em humanos (FRANCONI et al., 2008).

A resistência à insulina (RI) é geralmente definida como a redução da sensibilidade e/ou da capacidade de resposta às ações metabólicas da insulina que promovem a eliminação da glicose (KIM et al., 2006). A RI e hiperglicemia são importantes características encontradas na diabetes e SM em humanos, pois estão associadas a doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, doença arterial coronária e aterosclerose, estas causadas pela disfunção endotelial devido à diminuição e disfunção, provocadas pela RI e hiperglicemia, de células progenitoras endoteliais, as quais têm origem na medula óssea e desempenham um papel importante na homeostase vascular e angiogênese (WEYER et al., 1999; KIM et al., 2006).

A SM e o DMT2 neste modelo são baseadas na redução da secreção de insulina do pâncreas e resistência à insulina, sendo considerado que a disfunção das células β do pâncreas desempenha um papel fundamental na patogênese da DMT2 em humanos (FERRANNINI et al., 2003). A pressão arterial sistólica aumentada nos camundongos tratados com DH é decorrente devido às doenças cardiovasculares que a RI e hiperglicemia podem causar em pacientes com SM e DMT2, mostrando mais uma vez que este modelo animal pode mimetizar características dessas síndromes em humanos (WEYER et al., 1999; KIM et al., 2006; AYALA et al., 2012). As alterações microscópicas encontradas em fígado mostram a alteração de metabolismo de lipídeos que também pode ser encontrada em pacientes humanos diabéticos do tipo 2 (PAGADALA; MCCULLOUGH, 2012).

O estudo de Karasawa et al., 2009 demonstrou, pela primeira vez, que camundongos B6D2F1, através da ingestão de dieta hiperlipídica à base de farelo de ração convencional e banha de porco numa proporção proteína-gordura-carboidrato de 12.6:52.1:35.3 com energia metabolizável de 4,9 kcal/g por 16 semanas, apresentaram obesidade, resistência à insulina, hiperglicemia e aumento de células glucagon-positivas de ilhotas pancreáticas, características encontradas na DMT2. Em nosso estudo, foi possível verificar que uma dieta hipercalórica na proporção de proteína-gordura-carboidrato de 13,4:48,1:38,5 com energia metabolizável de 4,4 kcal/g contendo ingredientes considerados saudáveis associados à adição de 26,2% de banha de porco, pode desenvolver SM e DMT2 em camundongos B6D2F1 em 24-26 semanas da alimentação. Estes resultados comparados com o trabalho de Karasawa et al., 2009 mostram que o período de tempo necessário que os animais ficassem doentes foi maior. Isso é devido, provavelmente, à composição de ingredientes saudáveis na dieta dos animais alimentados com a DH, que possuiu como principal objetivo aproximar-se ao da dieta humana.

O presente estudo demonstrou que camundongos B6D2F1 alimentados com DH composta por ingredientes utilizados na alimentação humana, desenvolveram obesidade, SM e DMT2, assim como apresentaram resistência à insulina, hiperglicemia, hipertensão e alterações do metabolismo de lipídeos. Com isso, podemos concluir que este modelo animal pode ser utilizado para diversos estudos, como investigar mecanismos de desenvolvimento da SM e DMT2; utilização de drogas anti-diabéticas ou anti-obesidade; avaliação dos efeitos nutricionais de alimentos considerados saudáveis associados ao alto teor de gordura; e terapia celular.

4.2 EXPERIMENTO II

Título: Potencialidade da terapia celular utilizando células mononucleares de medula óssea em modelo animal B6D2F1 para DMT2 com lesão aguda em nervo ciático

RESUMO

Existem muitos estudos utilizando terapia celular nas complicações crônicas da diabetes melito tipo 1 (DMT1) e da diabetes melito tipo 2 (DMT2) em modelos animais e em pacientes diabéticos, de maneira geral voltados para diminuição da hiperglicemia acometida a estes indivíduos. Entretanto estudos de terapia celular relacionados à reparação e à regeneração de estruturas danificadas de origem aguda em pacientes ou modelos animais diabéticos são muito pouco estudados, porém extremamente importantes. Neste trabalho, através do procedimento cirúrgico de esmagamento e lesão do nervo ciático de camundongos B6D2F1 diabéticos obesos e camundongos B6D2F1 não diabéticos, permitimos simular uma situação de trauma agudo em camundongos B6D2F1 obesos diabéticos induzidos por dieta hipercalórica (DH). Uma vez que o nervo ciático é uma estrutura isolada, pouco vascularizado e em que a nutrição ocorre de forma indireta, foi possível observar de forma precisa a potencialidade da migração de células tronco mononucleares de medula óssea (CMMO) GFP (*green fluorescent protein*) de camundongos B6D2F1 GFP obesos e diabéticos à lesão nervosa aguda quando injetadas sistemicamente. Com isso, embora a grande quantidade de sinalização existente num organismo de lesão progressiva e crônica como encontrado em diabéticos, neste trabalho foi mostrada esta potencialidade de migração celular evidenciando a resposta sinalizadora positiva das células usadas para a terapia celular originadas de organismo diabético, assim como a sinalização da lesão do nervo ciático responsável pelo direcionamento e *homing* destas células. Sendo este o primeiro passo para o possível sucesso desta terapia, o presente trabalho abrem-se portas para futuros estudos de terapia celular regenerativa em lesão aguda em diabetes que sejam realizados e desenvolvidos visando sua efetividade e funcionalidade.

1 INTRODUÇÃO

A patogênese da diabetes melito tipo 2 (DMT2) é complexa e envolve fatores poligênicos e ambientais (SACKS; MCDONALD, 1996; PARILLO; RICCARDI, 2004;

MALECKI, 2005). A resistência à insulina e hiperglicemia, presentes na DMT2, estão associadas com o declínio do número e disfunção de células progenitoras endoteliais (CPEs) circulantes, as quais têm origem na medula óssea (MO) e desempenham um papel importante na homeostase vascular e angiogênese (ASAHARA; MUROHARA; SULLIVAN, 1997; SHEETZ; KING, 2002; RAFII; LYDEN, 2003; LOOMANS et al., 2004; CHEN et al., 2007; LI et al., 2011), podendo, com sua deficiência angiogênica, causar doenças cardiovasculares, com comprometimento aterosclerótico das artérias coronarianas, dos membros inferiores e das cerebrais com consequente morte do paciente, mesmo em estágios precoces da DMT2 (ASAHARA; MASUDA; TAKAHASHI, 1999; OIKAWA et al., 2010).

Células tronco adultas têm sido utilizadas em estudos em diferentes patologias, incluindo a diabetes, como potente terapia para criar tecidos vivos e funcionais e para regenerar e reparar tecidos e órgãos do corpo que estão danificados. As células tronco têm o poder de ir a áreas danificadas através do *homing* celular, possibilitando a regeneração de novas células e tecidos através da realização de reparo e processo de renovação, restaurando a funcionalidade (ROOPA, 2009; DALEY; SCADDEN, 2008). A medula óssea é uma importante fonte de células tronco adultas pluripotentes, tais como as células tronco hematopoiéticas, CPEs e mesenquimais. Estas células progenitoras pertencem à família de células mononucleares (RATAJCZAK et al., 2004; HU et al., 2012).

Estudos de terapia celular em diabetes melito tipo 1 (DMT1) mostraram que células mesenquimais e células de MO injetadas sistemicamente em modelos animais diabéticos, melhoraram o controle glicêmico e a capacidade de regeneração de células β do pâncreas (MILANESI et al., 2012; HASEGAWA et al., 2006; HESS et al., 2003; URBAN et al., 2008; BANERJEE; KUMAR; BHONDE, 2005; EZQUER et al., 2008; EZQUER et al., 2011) e em pacientes com DMT1, o transplante autólogo de células hematopoiéticas juntamente com altas doses de imunossupressão resultou na independência de insulina por período prolongado em maior parte dos pacientes tratados (COURI et al., 2009; ESMATJES, 2010; MAEHR et al., 2009). Diversos estudos nos modelos animais diabéticos mostraram que terapia com células mesenquimais melhoram a microalbuminúria e preservam a histologia normal renal (EZQUER et al., 2008; LEE et al., 2006).

Nos poucos ensaios clínicos utilizando terapia celular com células de MO autólogas em pacientes com DMT2, também mostraram resultados de diminuição da glicemia de jejum, das doses de insulina diárias e da hemoglobina glicosilada A_{1c} (HbA_{1c}), entre outros parâmetros por até um período limitado (ESTRADA et al., 2008; BHANSALI et al., 2009; LI et al., 2011).

Esses estudos utilizando terapia celular em modelos animais e em pacientes com DMT1 e DMT2 na regeneração de células β do pâncreas com consequente diminuição da hiperglicemia, nas complicações crônicas como a disfunção e falência renal de modelos animais e diminuição da dose de insulina diária de pacientes com DMT2, mostram a importância dada ao estudo da terapia celular nas complicações crônicas da diabetes. Entretanto estudos de terapia celular relacionados à reparação e à regeneração de estruturas danificadas de origem aguda, sejam em musculatura, ossos, vasos e nervos em pacientes diabéticos são muito pouco estudados, porém extremamente importantes.

Não existe ainda clareza se a terapia celular em lesão aguda em organismo diabético responde de forma adequada, uma vez que, o organismo diabético apresenta grandes quantidades de sinalizadores orgânicos provocados pela sua deficiência sistêmica crônica, assim como pela lesão progressiva de órgãos vitais, causada principalmente pela hiperglicemia.

Visto a gama de estudos utilizando terapia celular nas complicações crônicas das diabetes, no presente trabalho foi utilizado o modelo animal B6D2F1 obeso diabético induzido por dieta hipercalórica (DH) que mimetiza vários aspectos da DMT2 em humanos, para o estudo da potencialidade de migração de células tronco mononucleares de medula óssea (CMMO) à lesão aguda em nervo ciático e a capacidade de sinalização dessa lesão aguda em recrutar essas células, visando este como sendo o primeiro passo para o possível sucesso desta terapia, permitindo que futuros estudos de terapia celular regenerativa em lesão aguda em diabetes sejam realizados e desenvolvidos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Camundongos isogênicos fêmeas C57BL/6J/Unib e machos DBA/2Unib foram adquiridos com 6-8 semanas de idade e submetidos ao cruzamento para gerar o modelo híbrido B6D2F1 (F₁ do cruzamento). Fêmeas transgênicas C57BL/6J/Unib GFP (*green fluorescent protein* expressa coloração fluorescente verde nas células, permitindo rastrear e visualizar estas, quando injetadas em animais não transgênicos, em microscopia de fluorescência) foram adquiridas com 6 semanas de idade e foram submetidas ao cruzamento com machos DBA/2Unib para que o modelo transgênico B6D2F1 GFP fosse gerado.

Os animais B6D2F1 GFP foram produzidos para que suas CMMO fossem injetadas sistemicamente em camundongos comuns B6D2F1 diabéticos e não diabéticos, para permitir o rastreamento e visualização em microscopia de fluorescência da possível migração das CMMO no tecido de animais tratados. Após o cruzamento e o desmame, os camundongos C57BL/6J/Unib, C57Bl/6J/Unib GFP e DBA/2Unib foram sacrificados por asfixia com CO₂ em câmara com fluxo lento de gás 5L/min.

A partir dos indivíduos da geração F1 dos dois cruzamentos realizados, foram selecionados camundongos machos B6D2F1 e B6D2F1 GFP às 6 semanas de idade e estes foram mantidos em ambiente com temperatura controlada, em caixas isoladas (3-5 camundongos por caixa). Foram oferecidos água e alimento *ad libitum* ao longo de todo o período experimental. Os experimentos com os animais foram realizados de acordo com diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA da Unicamp (Campinas, Brasil) e CIBio (CEMIB/Unicamp, Campinas, Brasil).

2.2 Dietas

Para a realização dos experimentos, duas dietas foram utilizadas, sendo a dieta convencional dada aos animais B6D2F1 e B6D2F1 GFP para que a DMT2 não fosse desenvolvida, e dieta hipercalórica dada a outros animais B6D2F1 e B6D2F1 GFP para que desenvolvessem a diabetes. Os grupos experimentais foram gerados a partir da dieta dada a eles. O grupo experimental de camundongos que receberam a dieta convencional (DC) foi chamado de Grupo Controle (GC), enquanto que o grupo de animais que recebeu a dieta hipercalórica (DH) foi chamado de Grupo Tratado (GT).

A dieta convencional, a qual foi dada aos camundongos do GC, consiste em ração para animais de laboratório Nuvilab CR-1[®] (Nuvital, Brasil). Proporção proteína-gordura-carboidrato de 32,5:5,8:61,7 com energia metabolizável de 3,3kcal/g.

A dieta hipercalórica, composta por ingredientes utilizados na alimentação humana, foi oferecida aos animais B6D2F1, B6D2F1 GFP do GT. Proporção de proteína-gordura-carboidrato de 13,4:48,1:38,5 com energia metabolizável de 4,4 kcal/g.

As dietas foram oferecidas aos animais de ambos os grupos (GC e GT) por 24-26 semanas, período o qual os animais do GT desenvolveram DMT2. Após este período, os animais foram utilizados para diversos estudos.

2.3 Alimentação e monitoramento dos camundongos

Camundongos foram divididos em grupo controle (GC), grupo controle GFP (GC-GFP), grupo tratado com dieta hipercalórica (GT) e grupo tratado GFP com dieta hipercalórica (GT-GFP). A cada 15 dias o peso dos animais foi medido e após 24-26 semanas de alimentação, os animais do GT e GT-GFP tornaram-se diabéticos e então foram realizados experimentos com os animais.

2.4 Extração e purificação de células mononucleares de medula óssea (CMMO)

Células da medula óssea foram extraídas do fêmur e da tíbia de camundongos transgênicos B6D2F1 GFP (com expressão oblíqua da proteína *green fluorescent protein*) do GC e CT. Essa proteína GFP expressa coloração fluorescente verde nas células, permitindo rastrear e visualizar estas, quando injetadas em animais não transgênicos B6D2F1, em microscopia de fluorescência.

Camundongos dos grupos GC-GFP e GTR-GFP foram sacrificados por asfixia com CO₂ em câmara com fluxo lento de gás 5L/min. A medula óssea foi retirada do fêmur e tíbia dos animais B6D2F1 GFP diabéticos e não diabéticos. As CMMO lavadas e purificadas através de centrifugação por 15 minutos a 15000 rpm em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Após esta purificação, foi feita a contagem de 10 µl de células em câmara de Neubauer para estimar quantificação total da amostra.

2.5 Lesão do nervo ciático e injeção de CMMO via sistêmica

Camundongos B6D2F1 do GC e do GT foram anestesiados via intraperitoneal pelo anestésico Avertin (0,0015-0,0017 mL solução a 2,5% de Avertin por grama de peso do animal). Após a tricotomia, incisão da pele paralela ao fêmur e divulsão da musculatura, o nervo ciático foi lesionado através de três esmagamentos por pinça.

No mesmo dia em que foi realizado o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo ciático, os animais B6D2F1 do GC e GT que tiveram seus nervos lesionados, receberam CMMO GFP dos camundongos transgênicos B6D2F1 GFP do GC e GT via sistêmica pelo plexo retrorbital. Para que fosse verificado a potencialidade de migração de CMMO GFP de animais transgênicos B6D2F1 GFP do GC e GT com consequente análise da potencialidade

de sinalização da lesão para o recrutamento dessas células, foram criados 4 grupos (Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3 e Grupo 4).

- G1: CMMO de animais transgênicos B6D2F1 GFP do GC (não diabéticos) injetadas em animais GC (não diabéticos) lesionados;
- G2: CMMO de animais transgênicos B6D2F1 GFP do GC (não diabéticos) injetadas em animais GT (diabéticos) lesionados;
- G3: CMMO de animais transgênicos B6D2F1 GFP do GT (diabéticos) injetadas em animais GC (não diabéticos) lesionados;
- G4: CMMO de animais transgênicos B6D2F1 GFP do GT (diabéticos) injetadas em animais GT (diabéticos) lesionados;

2.6 Análise dos nervos lesionados, pâncreas e rim

Após 4 dias da cirurgia e injeção sistêmica de CMMO GFP dos camundongos transgênicos B6D2F1 GFP do GC e GT, os animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 foram sacrificados por asfixia com CO₂ em câmara com fluxo lento de gás 5L/min para a coleta dos nervos ciáticos lesionados, pâncreas e rim. Os nervos, pâncreas e rim foram analisados em microscopia óptica de fluorescência em cortes de tecido congelado com uso de criostato, possibilitando analisar a capacidade migratória das CMMO em diferentes ambientes fisiológicos (diabético e não diabético) à lesão aguda e analisar a capacidade de sinalização que o organismo diabético e não diabético tem ao receber terapia celular. Núcleos de células do nervo, pâncreas e rim foram marcadas por DAPI (marcação azulada quando visto em microscopia óptica de fluorescência).

3 RESULTADOS

3.1 DH induziu obesidade e DMT2 em camundongos B6D2F1 e B6D2F1 GFP

Os camundongos do GT tornaram-se severamente obesos comparado com camundongos controles e apresentaram resistência à insulina e hiperglicemia (dados não demonstrados).

Camundongos tratados com DH apresentaram alterações histológicas em pâncreas e rim (Fig. 1 e Fig. 2, respectivamente) após 24-26 semanas do início da administração da DH.

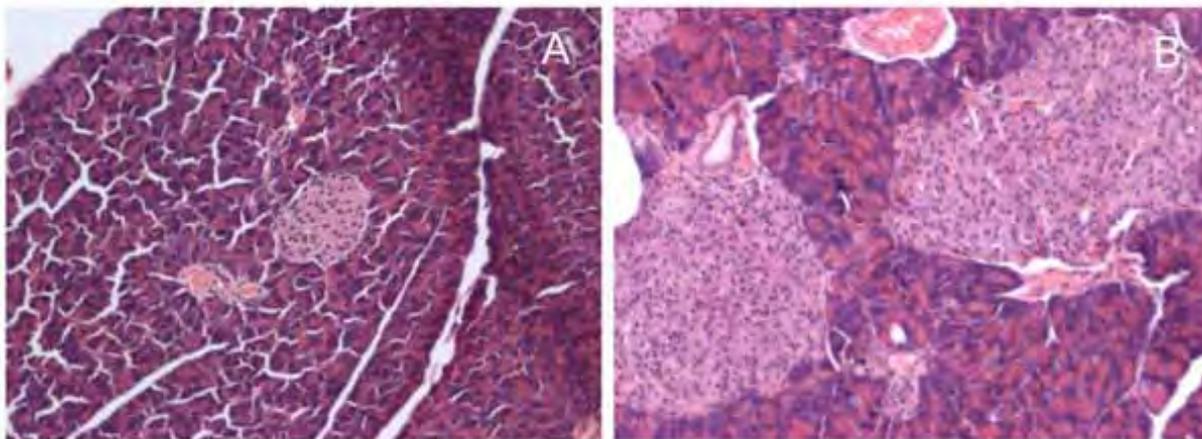


Figura 1: Pâncreas corado por H.E. objetiva 10x. A: Camundongo B6D2F1 tratado com dieta convencional. B: Hiperplasia e aumento no número das ilhotas pancreáticas, assim como ausência de infiltrados inflamatórios em animal diabético

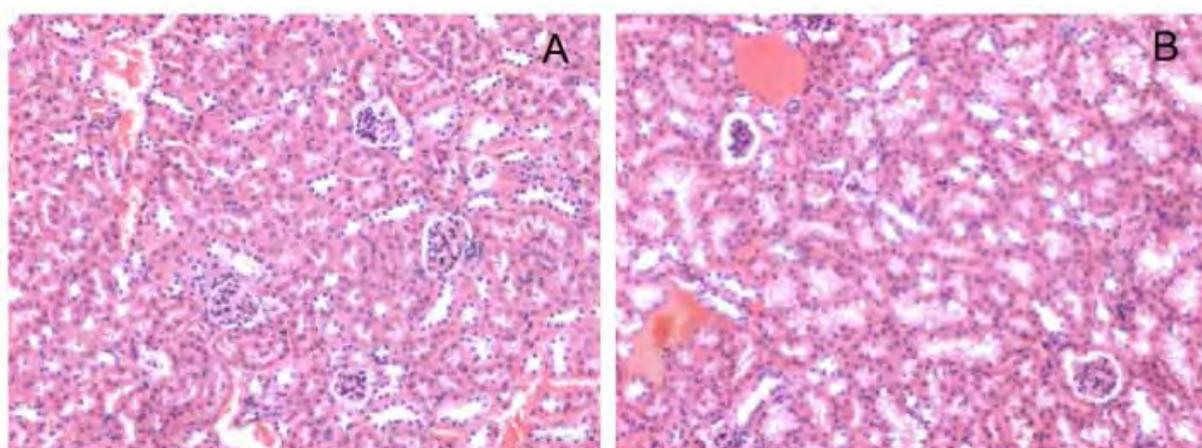


Figura 2: Rim corado por H.E. objetiva 10x. A: Animal controle. B: nefrose discreta na região cortical do órgão e ausência de infiltrados inflamatórios em animal diabético

3.2 Migração de CMMO GFP à lesão de nervo ciático

Para investigar a potencialidade de migração de CMMO de animais diabéticos à lesão de um organismo diabético e não diabético, 3×10^6 de CMMO GFP foram injetadas sistemicamente logo após o procedimento cirúrgico de esmagamento e lesão do nervo ciático de camundongos B6D2F1 diabéticos e não diabéticos. Com este procedimento foi possível observar a capacidade de sinalização da lesão em recrutar estas células injetadas ao local e a capacidade de resposta das células injetadas a esta sinalização. A resposta migratória foi positiva para os grupos G1, G2, G3 e G4, podendo ser visualizado em microscopia óptica de fluorescência células GFP no local da lesão no nervo ciático (Fig. 3). Na Fig. 4 observamos uma região do nervo ciático não lesionado e a ausência de células GFP. Em pâncreas e fígado, há ausência de CMMO GFP (Fig. 5, Fig. 6, respectivamente).

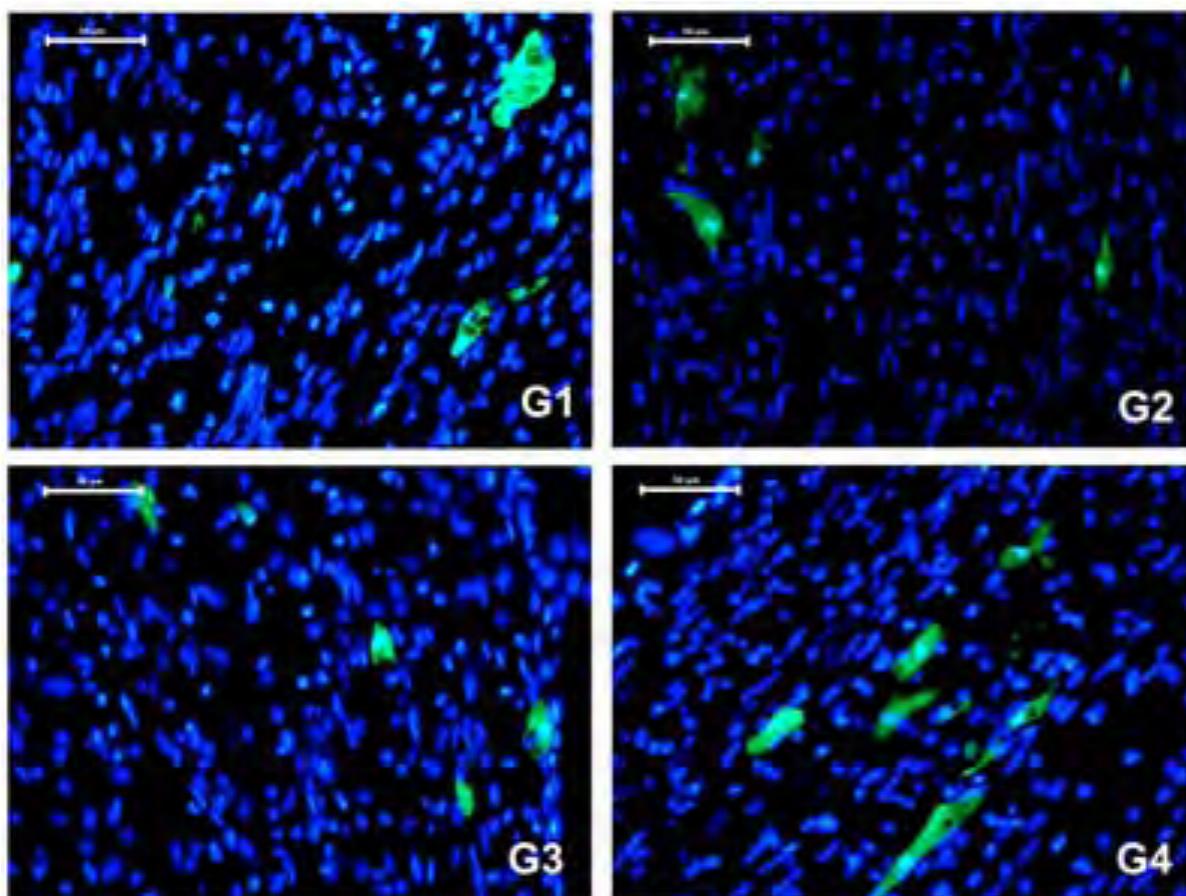


Figura 3: A, B, C e D: nervo ciático lesionado em microscopia de fluorescência (núcleos das células marcadas por DAPI) dos grupos experimentais G1, G2, G3 e G4, respectivamente. É possível observar a migração de células GFP nos locais lesionados de todos os grupos. Barra representa 50 μm .

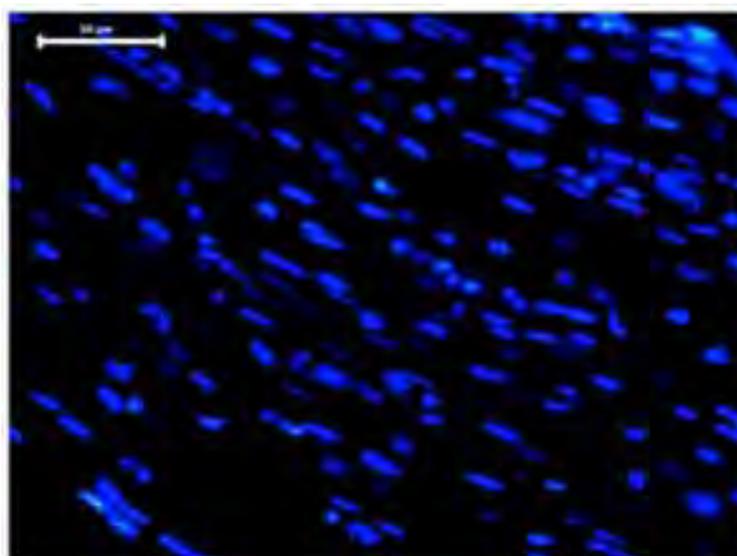


Figura 4: Ausência de células GFP em nervo ciático não lesionado
Barra representa 50 μm

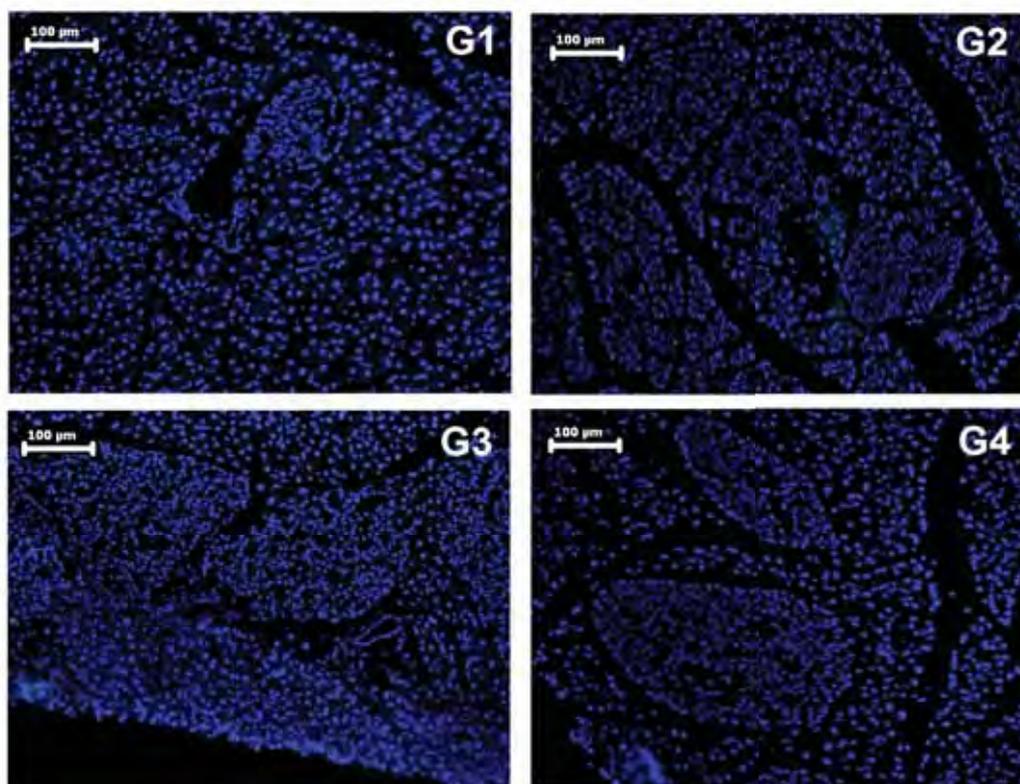


Figura 5: G1, G2, G3 e G4: pâncreas em microscopia de fluorescência com os núcleos das células marcadas por DAPI dos grupos 4 grupos experimentais. Não há presença de células GFP. Barra representa 100 µm.

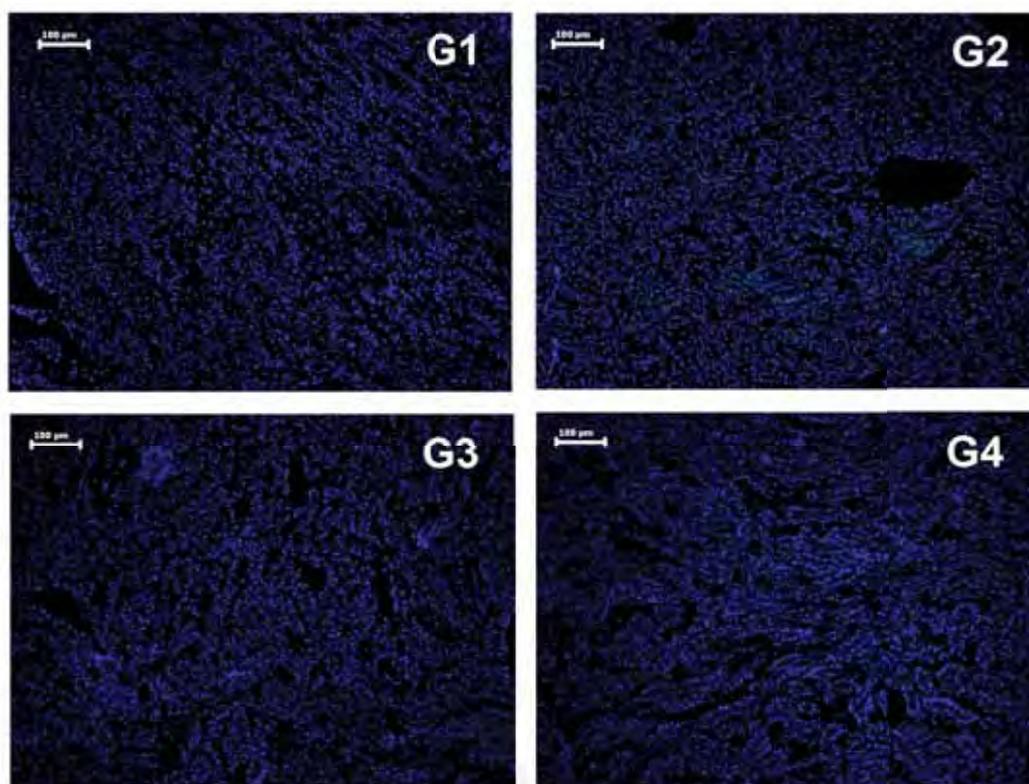


Figura 6: G1, G2, G3 e G4: rim em microscopia de fluorescência com os núcleos das células marcadas por DAPI dos 4 grupos experimentais. Não há presença de células GFP. Barra representa 100 µm.

4 DISCUSSÃO

A DMT2 corresponde aproximadamente 90% das diabetes e atinge cerca de 246 milhões de pessoas em todo mundo, sendo estimado pela *American Diabetes Association* um crescimento de 6% anualmente. A DMT2 é caracterizada por resistência à insulina e hiperglicemia, as quais, juntamente com a obesidade, provocam alterações importantes que influenciam no número e disfunção das CPEs circulantes resultando em distúrbios vasculares graves (LOOMANS et al., 2004; SHEETZ; KING, 2002; LI et al., 2011; CHEN et al., 2007; ASAHARA, MUROHARA; SULLIVAN, 1997; RAFII; LYDEN, 2003).

Estudos recentes vêm utilizando terapia celular com células tronco para tratar pacientes diabéticos. De forma geral, células tronco adultas, que podem ser derivadas da MO, de sangue periférico, de sangue do cordão umbilical ou de qualquer tecido adulto, têm sido utilizadas em estudos como potente terapia para criar tecidos vivos e funcionais para regenerar e reparar tecidos e órgãos do corpo que estão danificados (DALEY; SCADDEN, 2008).

No presente estudo utilizamos a MO como fonte de células mononucleares para terapia celular aqui proposta injetadas sistemicamente nos modelos animais B6D2F1 para ser verificado a capacidade de migração à lesão em nervo ciático. A MO é uma inestimável fonte de células tronco adultas pluripotentes como as células tronco hematopoiéticas, as CPEs e as mesenquimais (HU et al., 2012; RATAJCZAK et al., 2004). Células mononucleares, células mesenquimais isoladas e CPEs são uma opção de tratamento inovador para complicações diabéticas que requerem revascularização terapêutica e reparação vascular, embora a função e número de CPEs serem comprovadamente prejudicadas e diminuídas em pacientes diabéticos (HESS et al.; 2003; ZORINA et al., 2003; OH et al., 2004; TANG et al., 2004; LI et al., 2007). No entanto, as células mononucleares utilizadas neste estudo são as células de mais fácil extração e utilização.

As células tronco têm o poder de ir a áreas danificadas através do *homing* celular, possibilitando a regeneração de novas células e tecidos através da realização de reparo e processo de renovação, restaurando a funcionalidade do tecido (DALEY; SCADDEN, 2008). Os fatores envolvidos no *homing* celular são relacionados principalmente com duas proteínas, uma sinalizadora e outra de resposta a esta sinalização, são elas a quimiocina SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*) e o receptor CXCR4 respectivamente. SDF-1 regula muitos processos biológicos essenciais, incluindo a motilidade de células tronco ao local de reparo e regeneração, através de um mecanismo dependente CXCR-4. CXCR-4 é um receptor

quimiocina- α específico para SDF-1, ambos são conhecidos por serem importantes na migração de células tronco ao local danificado (LIU et al., 2011; KUCIA et al., 2005).

Embora neste trabalho não tenha sido analisado a liberação de SDF-1 do tecido lesionado, teve-se o cuidado de se escolher uma região do organismo que pudesse evitar dúvidas. Para verificar a potencialidade de migração de células injetadas foi utilizado o nervo ciático, uma estrutura isolada, pouco vascularizado e em que a nutrição ocorre de forma indireta, desta forma impediria a migração das células injetadas de forma aleatória prevenindo falso positivo e tornando a observação mais precisa como pode ser comprovado na figura do nervo sem lesão onde nenhuma célula GFP pode ser observada (Figura 4). Além disso, a escolha da via de inoculação sistêmica, ao invés da injeção local muito utilizada na maioria dos estudos de recuperação de células β do pâncreas (PHADNIS et al., 2011; PHUC et al., 2011; CARLOTTI et al., 2010), reforçaram a necessidade de migração celular até a lesão fortalecendo os resultados. Os resultados mostraram a presença de CMMO GFP, em animais diabéticos e não diabéticos, em lesão de nervo ciático de camundongos B6D2F1, diabéticos ou não, mostrando que existiu o processo de migração celular nos diferentes grupos testados, indicando que o processo de comunicação entre tecido lesionado e células injetadas funcionou bem em todas as possíveis combinações considerando os grupos testados (Figura 3).

No entanto, de forma oposta, não foram observadas células GFP nos tecidos do pâncreas e do rim onde haviam lesões crônicas (Figura 1 e 2). Na histologia do pâncreas dos animais B6D2F1 obesos diabéticos, foi observado hiperplasia, maior número e desorganização das ilhotas pancreáticas. No rim foi observado nefrose discreta na região cortical do órgão, ambos com ausência de infiltrados inflamatórios. Portanto pode ser observado nos resultados apresentados a presença de CMMO GFP em lesão nervosa aguda no nervo ciático e a ausência dessas células em lesão crônica no pâncreas e no rim. Uma vez que não foi possível observar infiltrados inflamatórios nestes órgão adicionando que o processo inflamatório é essencial para o deflagrar do processo de *homing* celular (LIU et al., 2011; KUCIA et al., 2005), acreditamos que a falta de inflamação aguda no rim e no pâncreas evitou a migração das células injetadas. Estes resultados corroboram com a afirmação da potencialidade e eficácia da terapia celular em lesão recente, sem interferência das degenerações crônicas ocorridas normalmente em organismo diabético.

Existem vários estudos de terapia celular em modelos animais e em pacientes com DMT1. Alguns estudos demonstraram a redução da glicemia sanguínea (FLAQUER et al., 2009; WEIR et al., 2008; OKUNO et al., 2007), regeneração de células β do pâncreas

(PHADNIS et al., 2011; PHUC et al., 2011; CARLOTTI et al., 2010) e melhora da microalbuminúria e preservação da histologia normal renal (EZQUER et al., 2008; LEE et al., 2006).

Em termos de DMT2, há poucos ensaios clínicos em pacientes diabéticos. Os estudos clínicos utilizando terapia celular em DMT2, mostraram que, células tronco de MO autólogas de pacientes dependentes de insulina diária injetadas nas artérias gastroduodenal, reduziram a dose de insulina continuamente ou transitoriamente (BHANSALI et al., 2009; LI et al., 2011); e que a associação de infusão de células tronco autólogas intrapancreático e oxigênio hiperbárico em pacientes diabéticos, diminuiu a glicemia de jejum e também as doses diárias de insulina por período limitado (ESTRADA et al., 2008; JARAJAPU; GRANT, 2010).

Esses estudos utilizando terapia celular em modelos animais e em pacientes com DMT1 e DMT2 na regeneração de células β do pâncreas com consequente diminuição da hiperglicemia, nas complicações crônicas como a disfunção e falência renal de modelos animais e diminuição da dose de insulina diária de pacientes com DMT2, mostram a importância dada ao estudo da terapia celular nas complicações crônicas da diabetes. Entretanto estudos de terapia celular relacionados à reparação e à regeneração de estruturas danificadas de origem aguda, sejam em musculatura, ossos, vasos e nervos em pacientes diabéticos em lesões acidentais ou mesmo em lesões programadas ou cirúrgicas, são muito pouco estudados.

Sabemos que pacientes diabéticos têm deficiência de reparo vascular devido à disfunção e ao declínio do número de CPEs circulantes decorrentes da hiperglicemia. Esta deficiência leva pacientes diabéticos, na rotina clínica, a terem grandes sangramentos em procedimentos cirúrgicos ou em traumas agudos em que há ruptura de estruturas, tornando o período de recuperação pós-cirúrgico mais lento e sujeito a complicações. Visto isso, nosso trabalho utilizou um modelo animal B6D2F1 obeso diabético, que mimetiza vários aspectos da DMT2 em humanos, demonstrando a potencialidade de migração de CMMO à lesão aguda em nervo ciático sem interferência das lesões crônicas pré-existentes decorrentes da patologia. Demonstrando assim, a capacidade de sinalização da lesão para o recrutamento dessas células e sua resposta a esta sinalização.

Este estudo permitiu abrir uma porção de perguntas ainda não respondidas e muitas vezes não pensadas, que possam trazer facilidades à rotina dos médicos clínicos ou cirúrgicos através de opções de terapia pós-traumática ou pré-traumática de forma preventiva aplicadas em pacientes diabéticos.

5 DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo, foi possível verificar que, com uma dieta hipercalórica composta por ingredientes utilizados na alimentação humana, os camundongos B6D2F1 tornaram-se modelo-induzido de SM e DMT2. Nossos resultados mostraram que esses indivíduos híbridos F1 a partir do cruzamento entre C57BL/6J/Unib (linhagem obesa) e DBA/2Unib (linhagem diabética), alimentados com dieta hipercalórica, apresentaram obesidade, resistência à insulina (RI), hiperglicemia, hipertensão, alterações no metabolismo de lipídeos e DMT2.

As características observadas neste modelo-induzido B6D2F1 para SM e DMT2 são semelhantes às encontradas em humanos em diversos pontos. Este modelo animal desenvolveu estas síndromes como resultado da obesidade induzida por dieta hipercalórica com ingredientes utilizados na alimentação humana, sendo esta obesidade caracterizada inicialmente como simples (sem manifestações de alterações de SM e DMT2) porém, após certo período, houve o desenvolvimento desses distúrbios fisiológicos. Esta transição de obesidade simples para SM e DMT2 é considerado o passo fundamental no desenvolvimento de SM e DMT2 em humanos (FRANCONI et al., 2008).

A resistência à insulina (RI) é geralmente definida como a redução da sensibilidade e/ou da capacidade de resposta às ações metabólicas da insulina que promovem a eliminação da glicose (KIM et al., 2006). A RI e hiperglicemia são importantes características encontradas na diabetes e SM em humanos, pois estão associadas a doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, doença arterial coronária e aterosclerose, estas causadas pela disfunção endotelial devido à diminuição e disfunção, provocadas pela RI e hiperglicemia, de células progenitoras endoteliais, as quais têm origem na medula óssea e desempenham um papel importante na homeostase vascular e angiogênese (WEYER et al., 1999; KIM et al., 2006).

A SM e o DMT2 neste modelo são baseadas na redução da secreção de insulina do pâncreas e RI, sendo considerado que a disfunção das células β do pâncreas desempenha um papel fundamental na patogênese da DMT2 em humanos (FERRANNINI et al., 2003). A pressão arterial sistólica aumentada nos camundongos tratados com DH é decorrente devido às doenças cardiovasculares que a RI e hiperglicemia podem causar em pacientes com SM e DMT2, mostrando mais uma vez que este modelo animal pode mimetizar características dessas síndromes em humanos (WEYER et al., 1999; KIM et al., 2006; AYALA et al., 2012). As alterações microscópicas encontradas em fígado mostram a alteração de metabolismo de lipídeos que também pode ser encontrada em pacientes humanos diabéticos do tipo 2 (PAGADALA; MCCULLOUGH, 2012).

O estudo de Karasawa et al., 2009 demonstrou, pela primeira vez, que camundongos B6D2F1, através da ingestão de dieta hiperlipídica à base de farelo de ração convencional e banha de porco numa proporção proteína-gordura-carboidrato de 12.6:52.1:35.3 com energia metabolizável de 4,9 kcal/g por 16 semanas, apresentaram obesidade, resistência à insulina, hiperglicemia e aumento de células glucagon-positivas de ilhotas pancreáticas, características encontradas na DMT2. Em nosso estudo, foi possível verificar que uma dieta hipercalórica na proporção de proteína-gordura-carboidrato de 13,4:48,1:38,5 com energia metabolizável de 4,4 kcal/g contendo ingredientes considerados saudáveis associados à adição de 26,2% de banha de porco, pode desenvolver SM e DMT2 em camundongos B6D2F1 em 24-26 semanas da alimentação. Estes resultados comparados com o trabalho de Karasawa et al., mostram que o período de tempo necessário que os animais ficassem doentes foi maior. Isso é devido, provavelmente, à composição de ingredientes saudáveis na dieta dos animais alimentados com a DH, que possuiu como principal objetivo aproximar-se ao da dieta humana.

Vimos que existem muitos estudos utilizando terapia celular em modelos animais induzidos por estreptozotocina para DMT1 e em pacientes diabéticos na regeneração das complicações crônicas das diabetes, mas, entretanto, estudos de terapia celular relacionados à reparação e à regeneração de estruturas danificadas de origem aguda, sejam em musculatura, ossos, vasos e nervos em pacientes diabéticos, são muito pouco estudados. Portanto, após a caracterização do modelo animal B6D2F1 para SM para posterior DMT2, foi possível observar que este modelo é ideal para vários estudos, inclusive para o estudo de terapia celular em lesão aguda.

Células tronco adultas têm sido utilizadas em estudos em diferentes patologias, incluindo a diabetes, como potente terapia para criar tecidos vivos e funcionais e para regenerar e reparar tecidos e órgãos do corpo que estão danificados. As células tronco têm o poder de ir a áreas danificadas através do *homing* celular, possibilitando a regeneração de novas células e tecidos através da realização de reparo e processo de renovação, restaurando a funcionalidade (DALEY; SCADDEN, 2008).

Em nosso estudo utilizamos a MO como fonte de células mononucleares, para terapia celular aqui proposta, injetadas sistemicamente nos modelos animais B6D2F1 para ser verificado a capacidade de migração à lesão em nervo ciático. A MO é uma importante fonte de células tronco adultas pluripotentes, tais como as células tronco hematopoiéticas, CPEs e mesenquimais. Estas células progenitoras pertencem à família de células mononucleares (RATAJCZAK et al., 2004; HU et al., 2012). Células mononucleares, células mesenquimais isoladas e CPEs são uma opção de tratamento inovador para complicações diabéticas que

requerem revascularização terapêutica e reparação vascular, embora a função e número de CPEs serem comprovadamente prejudicadas e diminuídas em pacientes diabéticos (HESS et al.; 2003; ZORINA et al., 2003; OH et al., 2004; TANG et al., 2004; LI et al., 2007). No entanto, as células mononucleares utilizadas neste estudo são as células de mais fácil extração e utilização.

As células tronco têm o poder de ir a áreas danificadas através do *homing* celular, possibilitando a regeneração de novas células e tecidos através da realização de reparo e processo de renovação, restaurando a funcionalidade do tecido. Os fatores envolvidos no *homing* celular são relacionados principalmente com duas proteínas, uma sinalizadora e outra de resposta a esta sinalização, são elas a quimiocina SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*) e o receptor CXCR4 respectivamente (DALEY; SCADDEN, 2008). SDF-1 regula muitos processos biológicos essenciais, incluindo a motilidade de células tronco ao local de reparo e regeneração, através de um mecanismo dependente CXCR-4. CXCR-4 é um receptor quimiocina- α específico para SDF-1, ambos são conhecidos por serem importantes na migração de células tronco ao local danificado.

Embora neste trabalho não tenha sido analisado a liberação de SDF-1 do tecido lesionado, teve-se o cuidado de se escolher uma região do organismo que pudesse evitar dúvidas. Para verificar a potencialidade de migração de células injetadas foi utilizado o nervo ciático, uma estrutura isolada, pouco vascularizado e em que a nutrição ocorre de forma indireta, desta forma impediria a migração das células injetadas de forma aleatória prevenindo falso positivo e tornando a observação mais precisa. Além disso, a escolha da via de inoculação sistêmica, ao invés da injeção local muito utilizada na maioria dos estudos de recuperação de células β do pâncreas (PHADNIS et al., 2011; PHUC et al., 2011; CARLOTTI et al., 2010), reforçaram a necessidade de migração celular até a lesão fortalecendo os resultados. Os resultados mostraram a presença de CMMO GFP, em animais diabéticos e não diabéticos, em lesão de nervo ciático de camundongos B6D2F1, diabéticos ou não, mostrando que existiu o processo de migração celular nos diferentes grupos testados, indicando que o processo de comunicação entre tecido lesionado e células injetadas funcionou bem em todas as possíveis combinações considerando os grupos testados.

Sabemos que pacientes diabéticos têm deficiência de reparo vascular devido à disfunção e ao declínio do número de CPEs circulantes decorrentes da hiperglicemia. Esta deficiência leva pacientes diabéticos, na rotina clínica, a terem grandes sangramentos em procedimentos cirúrgicos ou em traumas agudos em que há ruptura de estruturas, tornando o período de recuperação pós-cirúrgico mais lento e sujeito a complicações. Visto isso, nosso

trabalho utilizou o modelo animal B6D2F1 obeso diabético, que mimetiza vários aspectos da DMT2 em humanos, demonstrando a potencialidade de migração de CMMO à lesão aguda em nervo ciático sem interferência das lesões crônicas pré-existentes decorrentes da patologia. Demonstrando assim, a capacidade de sinalização da lesão para o recrutamento dessas células e sua resposta a esta sinalização.

6 CONCLUSÕES

- Camundongos B6D2F1 alimentados com DH composta por ingredientes utilizados na alimentação humana, desenvolveram obesidade, SM e DMT2, assim como apresentaram resistência à insulina, hiperglicemia, hipertensão e alterações do metabolismo de lipídeos.
- Modelo animal B6D2F1 mostrou-se útil para diversos estudos, como investigar mecanismos de desenvolvimento da SM e DMT2; utilização de drogas anti-diabéticas ou anti-obesidade; avaliação dos efeitos nutricionais de alimentos considerados saudáveis associados ao alto teor de gordura; e terapia celular.
- CMMO GFP de camundongos B6D2F1 GFP de animais diabéticos e não diabéticos, migraram em lesão de nervo ciático de camundongos B6D2F1, diabéticos ou não, mostrando que existiu o processo de migração celular nos diferentes grupos testados, indicando que o processo de comunicação entre tecido lesionado e células injetadas funcionou bem em todas as possíveis combinações considerando os grupos testados.
- Visto a potencialidade de migração celular evidenciando a resposta sinalizadora positiva das células usadas para a terapia celular originadas de organismo diabético, este trabalho é o primeiro passo para o possível sucesso desta terapia, podendo gerar futuros estudos de terapia celular regenerativa em lesão aguda em diabetes que sejam realizados e desenvolvidos visando sua efetividade e funcionalidade.

REFERÊNCIAS

ALBERTI, K.G.; ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z.; CLEEMAN, J.I.; DONATO, K.A.; FRUCHART, C.; JAMES, W.P.T.; LORIA, C.M.; SMITH, S.C. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, p. 1640-1645, 2009.

ASAHARA, T, MASUDA, H, TAKAHASHI, T. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. **Circ. Res.**, v. 85, p. 221-228, 1999.

ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v.275, p.964-967, 1997.

AYALA, D.; MOYÁ, A.; CRESPO, J.; CASTINEIRA, C.; DOMÍNGUEZ-SARDIÑA, M.; GOMARA, S.; SINEIRO, E.; MOJÓN, A.; FONTAO, M.; HERMIDA, R. Circadian Pattern of Ambulatory Blood Pressure in Hypertensive Patients With and Without Type 2 Diabetes. **Healthcare USA**, 2012.

BANERJEE, M.; KUMAR, A.; R. BHONDE, R. Reversal of experimental diabetes by multiple bone marrow transplantation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, p. 318-325, 2005.

BHANSALI, A.; UPRETI, V.; KHANDELWAL, N.; MARWAHA, N.; GUPTA, V.; SACHDEVA, N. Efficacy of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus. **Stem Cells Dev.**, v. 18, p. 1407-1416, 2009.

CARLOTTI, F.; ZALDUMBIDE, A.; LOOMANS, C.J.; ROSSENBERG, E.V.; ENGELSE, M. Isolated human islets contain a distinct population of mesenchymal stem cells. **Islets**, v. 2, p. 164-173, 2010

CATENACCI, V.A.; HILL, J.O.; WYATT, H.R. The obesity epidemic. **Clinics in chest medicine**, v. 30, p.415-444, 2009

CHEN, H.; CHARLAT, O.; TARTAGLIA, L. A.; WOOLF, E.A.; WENG, X.; ELLIS, S.J.; LAKEY, N.D.; CULPEPPER, J.; MORE, K.J.; BREITBART, E.; DUYK, G.M.; TEPPER, R.I.; MORGENSTERN, J.P.. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. **Cell**, v. 84, p. 491-495, 1996.

CHEN, Y.; LIN, S.; LIN, F.; WU, T.; TSAO, C.; HUANG, P.; LIU, P.; CHEN, Y.; CHEN, J. High Glucose Impairs Early and Late Endothelial Progenitor Cells by Modifying Nitric Oxide–Related but Not Oxidative Stress–Mediated Mechanisms. **Diabetes**, v.56, p.1559-1568, 2007.

CHILLARON, J.C.; POTTS, S.; VALADES, A.G.; NEWGARD, C.B.; FOIX, A.M. Glucokinase gene transfer to skeletal muscle of diabetic Zucker fatty rats improves insulin-sensitive glucose uptake. **Metabolism**, v. 51, p. 121-126, 2002

CHUA, SC J.R.; CHUNG, W.K.; WU-PENG, X.S.; ZHANG, Y.; LIU, S.M.; TARTAGLIA, L.; LEIBEL, R.L. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. **Science**, v. 271, p. 994-996, 1996.

COURI, C.E.B; OLIVEIRA, M.C.B; STRACIERI, A.B.P.L; MORAES, D.A.; PIERONI, F. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 301, p. 1573-1579, 2009.

DALEY, G.O.; SCADDEN, D.T. Prospects for Stem Cell-Based Therapy. **Cell**, v. 132, p. 544-548, 2008.

DINEL, A.L.; ANDRE, C.; AUBERT, A.; FERREIRA, G.; LAYE, S.; CASTANON, N. Cognitive and Emotional Alterations Are Related to Hippocampal Inflammation in a Mouse Model of Metabolic Syndrome. **PlosOne**, v.6, e24325, 2011.

ESMATJES, E.; MONTANA, X.; REAL, M.I.; BLANCO, J.; CONGET, I. Regeneration of insulin production by autologous bone marrow blood autotransplantation in patients with type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 53, p. 786-789, 2010.

ESTRADA, E.J; VALACCHI, F.; NICORA, E.; BRIEVA, S.; ESTEVE, C.; ECHEVARRIA, L. Combined treatment of intrapancreatic autologous bone marrow stem cells and hyperbaric oxygen in type 2 diabetes mellitus. **Cell Transplant**, v. 17, p. 1295-1304, 2008.

EZQUER, F.; EZQUER, M.; PARRAU, D.; CARPIO, D.; YAN, E.Z; CONGET, P. Systemic Administration of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Reverts Hyperglycemia and Prevents Nephropathy in Type 1 Diabetic Mice. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.14, p.631-640, 2008

EZQUER, F.; EZQUER, M.; SIMON, V.; CONGET, P. The Antidiabetic Effect of MSCs Is Not Impaired by Insulin Prophylaxis and Is Not Improved by a Second Dose of Cells. **PlosOne**, v. 6 (1), e16566, 2011.

FERRANNINI, E.; GASTALDELLI, A.; MIYAZAKI, Y.; MATSUDA, M.; PETTITI, M.; NATALI, A. ;MARI, A.; DeFRONZO, R.A. Predominant role of reduced beta-cell sensitivity to glucose over insulin resistance in impaired glucose tolerance. **Diabetologia**, v. 46, p. 1211-1219, 2003.

FLAQUER, M.; FRANQUESA, M.; BARQUINERO, J.; LLOBERAS, N.; GUTIERREZ, C. Bone marrow transplantation induces normoglycemia in a type 2 diabetes mellitus murine model. **Transplantation proceedings**, v. 41, p. 2282-2285, 2009.

FRANCONI F, SEGHIERI G, CANU S, STRAFACE E, CAMPESI I, MALORNI W. Are the available experimental models of type 2 diabetes appropriate for a gender perspective? **Pharmacological research**, v. 57, p. 16-18, 2008.

FUJIWARA, T.; WADA, M.; FUKUDA, K.; FUKAMI, M.; YOSHIOKA, S.; YOSHIOKA, T. Characterization of CS-045, a new oral antidiabetic agent, II. Effects on glycemic control and pancreatic islet structure at a late stage of the diabetic syndrome in C57BL/KsJ-db/db mice. **Metabolism**, v. 40, p. 1213-1218, 1991.

GUPTA, A.; GUPTA, V. Metabolic syndrome: what are the risks for humans? **Bioscience trends**, v. 4, p. 204-212, 2010.

HASEGAWA, Y., OGIHARA, T., YAMADA, T., ISHIGAKI, Y.; IMAI, J.; UNO, K., GAO, J.; KANEKO, K.; ISHIHARA, H.; SASANO, H.; et al. Bone Marrow (BM) Transplantation Promotes b-Cell Regeneration after Acute Injury through BM Cell Mobilization. **Endocrinology**, v. 148, p.2006- 2015, 2006.

HESS, D.; LI, L.; MARTIN, M.; SAKANO, S.; HILL, D.; STRUTT, B.; THYSSEN, S.A.; GRAY, D.; BHATIA, M. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. **Nature Biotechnology**, v. 21, p.763-770, 2003.

HU, J.; LI, C.; WANG, L.; ZHANG, X; ZHANG, M.; GAO H.; YU, X; WANG, F; ZHAO, W.; YAN, S.; WANG, Y. Long term effects of the implantation of autologous bone marrow mononuclear cells for type 2 diabetes mellitus. **Endocrine Journal**, v.59, p.1031-1039, 2012.

JARAJAPU, Y.P; GRANT, M.B. The promise of cell-based therapies for diabetic complications: challenges and solutions. **Circulation research**, v. 106, p. 854-869, 2010.

JEE, S.H.; JO, J. Linkage of Epidemiologic Evidence With the Clinical Aspects of Metabolic Syndrome. **Korean circulation journal**, v. 42, p.371-378, 2012.

LEE, G.H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J.M.; CARROLL, K.M.; DARVISHZADEH, J.G.; LEE, J.L, FRIEDMAN, J.M. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, v. 379, p. 632-635, 1996.

JIAO, S., COLE, T.G., KITCHENS, R.T., PFLEGER, B. E SCHONFELD, G. Genetic heterogeneity of lipoproteins in inbred strains of mice: analysis by gel-permeation chromatography. **Metabolism**, v. 39, p. 155-160, 1990.

KAHN, R.; BUSE, J.; FERRANNINI, E.; STERN, M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, p. 2289-2304, 2005.

KARASAWA, H.; NAGATA-GOTO, S.; TAKAISHI, K.; KUMAGAE, Y. A novel model of type 2 diabetes mellitus based on obesity induced by high-fat diet in BDF1 mice. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 58, p. 296-303, 2009.

KIM, J.; PHD; MONTAGNANI, M.; KOH, K.; MD; QUON, M. Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction Molecular and Pathophysiological Mechanisms. **Circulation**, v. 113, p. 1888-1906, 2006.

KUCIA, M.; RECA, R.; JALA, V.R.; DAWN, B.; RATAJCZAK, J.; RATAJCZAK, M.Z. Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells. **Leukemia**, v.19, p. 1118-1127, 2005.

LEE, R.; SEO, M.; REGER, R.; SPEES, L.; PULIN, A. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 17438–17443, 2006.

LEITER, E.H.; COLEMAN, D.L.; HUMMEL, K.P. The influence of genetic background on the expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. III. Effect of H-2 haplotype and sex. **Diabetes**, v. 30, p. 1029-1034, 1981.

LI, W.; SHI, Z.; HONG, M.; LING, Z.; ZHONG-JING, W.; HONG-XIANG, W. Autologous bone marrow stem cell transplantation for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Chinese medical journal**, v. 124, p. 3622-3628, 2011.

LI, M.; HO, J.; LAI, K.; AU, K.; XU, A.; CHEUNG, B.; LAM, K; TSE, H. The decrement in circulating endothelial progenitor cells (EPCs) in type 2 diabetes is independent of the severity of the hypoadiponectemia. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v.27, p. 185-194, 2011.

LI, Y.; ZHANG, R.; QIAO, H.; ZHANG, H.; WANG, Y.; YUAN, H. Generation of insulin producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells. **Journal of cellular physiology**, v. 211, p. 36-44, 2007.

LOOMANS, C., DE KONING, E., STAAL, F., ROOKMAAKER, M., VERSEYDEN, C., DE BOER, H., VERHAAR, M., BRAAM, B, RABELINK, T., VAN ZONNEVELD, A. Endothelial Progenitor Cell Dysfunction: A Novel Concept in the Pathogenesis of Vascular Complications of Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v.53, p. 195-199, 2004.

MAEHR, R.; CHEN, S.; SNITOW, M.; LUDWIG, T.; YAGASAKI, L. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, p. 15768-15773, 2009.

MALECKI, M.T. Genetics of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes research and clinical practice**, v.68, p.10-21, 2005.

MILANESI, A.; LEE, J.; LI, Z.; DA SACCO, S.; VILLANI, V.; CERVANTES, V; PERIN, L; YU, J. b-Cell Regeneration Mediated by Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **PlosOne**, v.7, e42177, 2012.

OIKAWA, A., SIRAGUSA, M.; QUAINI, F.; MANGIALARDI, G.; RAJESH G., KATARE, R; CAPORALI, A; ALPHEN, P.J; SPINETTI, G.; KRAENKEL, N.; PREZIOSO, L.; EMANUELI, C.; MADEDDU, P. Diabetes Mellitus Induces Bone Marrow Microangiopathy. **Journal of American Heart Association**, v.30, p.498-508, 2010.

OH, S.H; MUZZONIGRO, T.M; BAE, S.H.; LAPLANTE, J.M.; HATCH, H.M.; PETERSEN, B.E. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 84, p. 607-617, 2004.

OKUNO, M.; MINAMI, K.; OKUMACHI, A.; MIYAWAKI, K.; YOKOI, N. Generation of insulin secreting cells from pancreatic acinar cells of animal models of type 1 diabetes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.292, p. 158-165,

2007.

PAGADALA, M.; MCCULLOUGH, A. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity: Not All About Body Mass Index. **The American journal of gastroenterology**, v.107, p.1859-1861, 2012.

PARILLO, M, RICCARDI, G. Diet composition and the risk of type 2 diabetes: epidemiological and clinical evidence. **The British journal of nutrition**, v.92, p.7-19, 2004.
PHADNIS, S.M.; JOGLEKAR, M.V.; DALVI, M.P.; MUTHYALA, S.; NAIR, P.D. Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo. **Cytotherapy**, v. 13, p. 279-293, 2011.

PHUC, P.V.; NHUNG, T.H.; LOAN, D.T.; CHUNG, D.C.; NGOC, P.K. Differentiating of banked human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells. **In vitro cellular & developmental biology. Animal**, v. 47, p. 54-63, 2011.

RAFII, S.; LYDEN, D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. **Nature medicine**, v.9, p.964-967, 2003.

RATAJCZAK, M.; KUCIA, M.; MAJKA, M.; RECA, R.; RATAJCZAK, J. Heterogeneous populations of bone marrow stem cells - are we spotting on the same cells from the different angles? **Folia Histochemica Cytobiologica**, v.42, p.139-146, 2004.

ROOPA, R.N. Stem cell therapy- Hype or hope? A review. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 12, p. 131-138, 2009

SACKS, D.B.; MCDONALD, J.M. The pathogenesis of type II diabetes mellitus. A polygenic disease. **American journal of clinical pathology**, v. 105, p. 149-156, 1996.

SHEETZ M.J; KING G.L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v.288, p. 2579-2588, 2002.

SURWIT, R.S.; KUHN, C.M.; COCHRANE, C.; MCCUBBIN, J.A.; FEINGLOS, M.N. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. **Diabetes**, v.37, p. 1163-1167, 1988.

TANG, D.Q.; CAO, L.Z.; BURKHARDT, B.R.; XIA, C.Q.; LITHERLAND, S.A.; ATKINSON, M.A. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. **Diabetes**, v.53, p. 1721-1732, 2004.

THAMS S, OLIVEIRA A, CULLHEIM S. MHC class I expression and synaptic plasticity after nerve lesion. **Brain research reviews**, v. 57, p. 265-269, 2008.

URBÁN, V.S; KISS, J.; KOVÁCS, J.; GÓCZA, E.; VAS, V.; MONOSTORI, E.; UHER, F. Mesenchymal Stem Cells Cooperate with Bone Marrow Cells in Therapy of Diabetes. **StemCell**, v. 26, p. 244-253, 2008.

ZORINA, T.D.; SUBBOTIN, V.M.; BERTERA, S.; ALEXANDER, A.M.; HALUSZCZAK, C.; GAMBRELL, B. Recovery of the endogenous beta cell function in the NOD model of autoimmune diabetes. **Stem Cells**, v. 21, p. 377-388, 2003.

YILMAZ, C.; RAVIKUMAR, P.; BELLOTTO, D.; UNGER, R.; HSIA, C. Fatty diabetic lung: functional impairment in a model of metabolic syndrome. **Journal of applied physiology**, v. 109, p. 1913-1919, 2010

WEYER, C.; BOGARDUS, C.; MOTT, D.M.; PRATLEY, R.E. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, p. 787- 794, 1999.