



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Adriana Lima Ferreira

**Efeito do transplante de células de medula óssea no perfil
inflamatório e resistência à insulina em tecido adiposo de
camundongos hiperalimentados**

Rio de Janeiro

2020

Adriana Lima Ferreira

Efeito do transplante de células de medula óssea no perfil inflamatório e resistência à insulina em tecido adiposo de camundongos hiperalimentados

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

F383 Ferreira, Adriana Lima.

Efeito do transplante de células de medula óssea no perfil inflamatório e resistência à insulina em tecido adiposo de camundongos hiperalimentados / Adriana Lima Ferreira.- 2020.

71 f.

Orientadora. Alessandra Alves Thole

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Obesidade – Teses. 2. Células-tronco – Teses. 3. Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos. 4. Tecido adiposo – Teses. 5. Hipernutrição – Teses. 6. Lactação – Teses. 7. Inflamação – Teses. I. Thole, Alessandra Alves. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-056.52

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Adriana Lima Ferreira

Efeito do transplante de células de medula óssea no perfil inflamatório e resistência à insulina em tecido adiposo de camundongos hiperalimentados

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 23 de março de 2020.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Erika Afonso Costa Cortez Marques
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Vinícius Novaes Rocha
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pela proteção e força durante esta jornada. Em segundo, aos meus pais Antonio e Antonieta e aos meus irmãos Alessandro e Ana Beatriz.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Papai do Céu e Nossa Senhora por me guardarem todos os dias e me proporcionarem muitas conquistas.

À minha mãezinha e paizinho! Amo-os tanto! obrigada por me apoiarem e mostrarem o quão importante é o estudo desde muito novinha. Obrigada por me educarem, por serem o meu pilar, meus melhores amigos e por me guiarem na estrada que é a vida.

Aos meus irmãos, Alessandro e Ana Beatriz pelo incentivo e carinho.

Agradeço também aos meus padrinhos por me apoiarem e torcerem por mim.

À minha orientadora prof^a Dra Alessandra, assim como prof^a Dra Laís por permitirem que eu continuasse minha trajetória acadêmica através do desenvolvimento deste projeto. Obrigada por confiarem em mim!

Às professoras, Dr^a Erika Cortez, Dr^a Simone Nunes e Dr^a Ana Carolina Stumbo pelas sugestões construtivas que me permitiram enriquecer meu trabalho.

As técnicas do LPCT Karina, e em especial, Genilza pela grande ajuda na realização deste trabalho com muitas dicas, ensinamentos você é grande inspiração como profissional e pessoa! Obrigada pela sua amizade, conselhos e dicas nos experimentos.

À minha IC Tatiana sempre disposta em ajudar e aprender. Meu braço direito nos experimentos, mesmo muitas vezes saindo mais tarde do laboratório comigo ao me auxiliar nas atividades. Foi um enorme prazer ter alguém tão super alto astral como aluna!

As ICs maravilhosas que também me ajudaram nos experimentos quando eu estava super atarefada! Beatriz, Bruna, Milena, Vasti, Anna Carol foi um prazer poder compartilhar um pouco do meu dia a dia com vocês com muitas conversas divertidas entre um e outro experimento. Que tenhamos muitas parcerias no futuro!

Aos outros integrantes do LPCT que sempre foram muito prestativos em sanar dúvidas nas quantificações e estatísticas Camila Luna, Dani, Belle o meu muito obrigada!

Ao chefe do LUBT prof^o Dr Jorge José de Carvalho por me permitir a colaboração nos experimentos que também foram cruciais no meu projeto o sr^o tem

coração de ouro! Aproveito também para agradecer à equipe técnica, Ana Lúcia pelas dicas, assim como os demais membros Kíssila, Priscila, Victor e Sheila.

Ao Laboratório de Morfometria, Metabolismo Cardiovascular (LMMC), prof^o Carlos Mandarim Lacerda, prof^a Márcia e prof^a Vanessa Melo pela colaboração para que eu realizasse parte dos experimentos no laboratório. A doutoranda Priscila Carapeto da qual não poderia esquecer! Uma grande amiga e pesquisadora, te admiro muito, como profissional e pessoa, que coração enorme! Os meus agradecimentos também a pós-doc Fabi Martins e técnica Aline.

Aos demais membros do Departamento de Histologia e Embriologia, Josefa, Marcelo, Fábio pelas conversas e cordialidade.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela realização deste projeto.

A verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos mesmo
quando todos dizem que ele é impossível.

Cora Coraline

RESUMO

FERREIRA, Adriana Lima. *Efeito do transplante de células de medula óssea no perfil inflamatório e resistência à insulina em tecido adiposo de camundongos hiperalimentados*. 2020. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A obesidade é uma doença que cresce mundialmente. Por isso, vem sendo um do grande desafio conter o seu crescimento. Ela é determinada pelo aumento da adiposidade abdominal e tem como consequência diversas alterações metabólicas. As alterações envolvem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e prejuízo da sinalização de insulina nos tecidos periféricos. Para isso, a terapia celular utilizando células de medula óssea (CMO) emerge como uma das promissoras alternativas no tratamento de doenças metabólicas como resistência à insulina e diabetes do tipo 2. Na medula óssea estão contidas populações de células-tronco que secretam de maneira parácrina fatores imunorreguladores, fatores de crescimento responsáveis pelo reparo tecidual. Contudo, pouco se sabe sobre mecanismos intracelulares que regem o potencial das CMO na melhoria dos índices glicêmicos e insulinêmicos através da sinalização de insulina. Para isto, utilizamos o modelo de hiperalimentação durante a lactação no período de lactação para indução da obesidade. Avaliamos a glicemia, insulinemia, imunomarcagem de TNF- α e expressão dos componentes da via de insulina responsáveis pela ativação do Transportador de Glicose 4 (GLUT4) no tecido adiposo branco (TAB). Nossos resultados apontam que a terapia em CMO promoveram melhorias nos índices glicêmicos, hiperinsulinemia, triglicérides, marcação de TNF- α e conteúdo de GLUT4. Já os níveis de colesterol total também foram aparentemente reduzidos ainda que não fosse estatisticamente significativo. Com isso, sugerimos que a terapia com CMO promoveu maior captação de glicose melhorou a inflamação no TAB o que reforça as pesquisas em prol na terapia com CMO aos portadores de doenças metabólicas.

Palavras-chave: Terapia celular. Célula-tronco de medula óssea. Resistência à insulina. Obesidade. Inflamação. TNF- α . Tecido adiposo. Hiperlactação.

ABSTRACT

FERREIRA, Adriana Lima. *Effect of bone marrow cells transplantation on the inflammatory profile and insulin resistance in adipose tissue of overfed mice*. 2020. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Obesity is a disease that grows up in the worldwide. For that, it came up a big deal to control that disease. It can be determined through the increase of abnormal adiposity and It has in consequence several types of metabolic changes. The alterations involved the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α . that impairs the insulin pathway in peripheral tissues. For that, cell therapy using Bone Marrow Cells (BMC) emerges as one of the promising alternatives in the treatment of metabolic diseases such as insulin resistance and type 2 diabetes. The bone marrow is composed of a stem cell population that secretes through paracrine way immunoregulator factors, growth factors responsible for tissue repair. However, stills unclear about the intracellular mechanism that regulates the BMC potential in the improvement of the glycemic, insulinemic index through the insulin pathway. For that, we induced the overfed mice to obesity model. We evaluated the glycemia, insulinemia, lipidic profile, immunostaining for TNF- α and expression of proteins related to insulin pathway, responsible for the activation of Glucose Transporter 4 (GLUT4) in white adipose tissue (WAT). Our results indicate that CMO therapy promoted improvements in glycemic indexes, hyperinsulinemia, triglycerides, TNF- α immunostating and GLUT4 content. Total cholesterol levels were also apparently reduced although it did not significant statistically. Thus, we suggest that CMO therapy promoted greater glucose uptake and improved inflammation in WAT, which reinforces research in favor of CMO therapy for patients with metabolic diseases.

Keywords: Cell therapy. Bone marrow stem cells. Insulin resistance. Obesity, Inflammation, TNF- α , Adipose tissue, Hyperlactation.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Esquema representativo do TAB em condições fisiológicas normais e na obesidade..... | 20 |
| Figura 2 - | Esquema simplificado da via de sinalização da insulina..... | 22 |
| Figura 3 - | Esquema ilustrativo das ações da insulina | 23 |
| Figura 4 - | Esquema ilustrativo dos componentes do nicho na medula óssea..... | 26 |
| Figura 5 - | Esquema ilustrativo das células-tronco hematopoiéticas durante a hematopoiese..... | 27 |
| Figura 6 - | Esquema ilustrativo das principais interações entre as CTMs e o sistema imune..... | 29 |
| Figura 7 - | Desenho experimental do modelo para indução de hiperalimentação durante a lactação por redução de ninhada e terapia com células de medula óssea..... | 34 |
| Figura 8 - | Fórmula para cálculo do índice de Lee..... | 35 |
| Figura 9 - | Diluição dos anticorpos primários utilizados para Western Blotting no tecido adiposo..... | 39 |
| Figura 10 - | Diluição dos anticorpos secundários utilizados para Western Blotting no tecido adiposo..... | 39 |
| Figura 11 - | Curva de massa corporal dos animais dos grupos controle e hiperalimentado..... | 41 |

| | |
|---|----|
| Figura 12 - Gráfico representativo da massa corporal ao fim dos 100 de experimento..... | 42 |
| Figura 13 - Gráfico representativo dos par..... | 43 |
| Figura 14 - Gráficos representativos do TITG e área sob a curva em animais controle e hiperalimentados..... | 44 |
| Figura 15 - Gráficos representativos do TITG e área sob a curva após a terapia com células de medula óssea..... | 46 |
| Figura 16 - Gráfico com os valores de insulina dos animais controle, hiperalimentado e hiperalimentado submetido a terapia com CMO..... | 47 |
| Figura 17 - Gráfico representativo de HOMA IR e HOMA- β | 48 |
| Figura 18 - Gráfico representativo de colesterol total e triglicerídeos..... | 50 |
| Figura 19 - Fotomicrografias da morfologia do tecido adiposo, músculo e pâncreas por imunomarcação de TNF- α | 51 |
| Figura 20 - Fotomicrografias e quantificação de TNF- α no tecido adiposo..... | 52 |
| Figura 21 - Gráfico representativo da expressão de PI3K no tecido adiposo..... | 53 |
| Figura 22 - Gráfico representativo da expressão de AKT no tecido adiposo..... | 54 |
| Figura 23 - Gráfico representativo da expressão de pAKT no tecido adiposo..... | 55 |

| | |
|--|----|
| Figura 24 - Razão pAKT/AKT em extratos teciduais de tecido adiposo nos grupos experimentais..... | 56 |
| Figura 25 - Gráfico representativo da expressão de GLUT-4 no tecido adiposo..... | 57 |

.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

| | |
|--------------------------|--|
| ABESO | Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome |
| Adipo-Q | Adiponectina |
| CMO | Células de Medula Óssea |
| CTH | Células-Tronco Hematopoiéticas |
| CTM | Células-Tronco Mesenquimais |
| DM1 | Diabetes do Tipo 1 |
| DM2 | Diabetes do Tipo 2 |
| FADD | <i>Fas-associated death domain</i> |
| GC | Grupo Controle |
| GH | Grupo Hiperalimentado |
| GLUTs | Transportadores de glicose |
| GLUT4 | Transportador de Glicose do Tipo 4 |
| Hb1C | Hemoglobina Glicada |
| HOMA | <i>Homeostatic Model Assessment</i> |
| IKK β /NF κ | Complexo IK- β cnase/NFkappa β |
| IL-1 | Interleukin-1 |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IL-10 | Interleukin-10 |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IR | Receptor de Insulina |
| IRS1 | Receptor de Insulina-1 |
| JAK | <i>Janus Kinase 2</i> |
| JUNK | <i>C-Jun Terminal</i> |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| MCP1 | <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> |
| MO | Medula Óssea |
| NK | <i>Natural Killer Cell</i> |
| PAI-1 | <i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i> |
| PI3K | <i>Phosphatidylinositol 3-kinases</i> |

| | |
|---------------|--|
| RI/ | Resistência à Insulina |
| SOC1/SOCB | <i>Suppressor of cytokine signaling-1/Suppressor of cytokine signaling-B</i> |
| SRC | <i>Homology Collagen</i> |
| TAB | Tecido Adiposo Branco |
| TAG | Triacilglicerol |
| TNF- α | Enzima conversora de TNF- α |
| TITG | Teste Intraperitoneal de Tolerância à glucose |
| TAMO | Tecido Adiposo de Medula Óssea |
| TNF- α | Tumoral Necrose Factor - α |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------|---------------------|
| α | Alfa |
| κ | Kappa |
| KDa | Quilodalton |
| β | Beta |
| mg/kg | Miligrama por quilo |
| mL | Militro |
| RPM | Rotações por minuto |
| mL/L | Mililitro por litro |
| μ U | Microunidades |
| mmol | Milimol |
| L | Litro |
| % | Porcentagem |
| mM | Milimolar |
| μ g | Micrograma |
| nM | Nanomolar |
| h | Hora |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| | INTRODUÇÃO | 17 |
| 1 | REVISÃO DA LITERATURA | 18 |
| 1.1 | Obesidade | 18 |
| 1.2 | Obesidade e inflamação | 19 |
| 1.3 | Resistência periférica à insulina | 21 |
| 1.4 | Medula óssea | 24 |
| 1.5 | Terapia celular na normalização da glicemia | 29 |
| 2 | OBJETIVO | 32 |
| 2.1 | Objetivo geral | 32 |
| 2.2 | Objetivo específico | 32 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 3.1 | Animais | 33 |
| 3.2 | Modelo experimental de indução a obesidade | 33 |
| 3.3 | Terapia com células de medula óssea (CMO) | 34 |
| 3.4 | Análise da massa corporal | 35 |
| 3.5 | Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG) | 35 |
| 3.6 | Coleta de dados biométricos | 35 |
| 3.7 | Cálculo do HOMA-IR e HOMA-β | 36 |
| 3.8 | Colesterol Total e Triglicerídeos | 36 |
| 3.9 | Processamento histológico | 37 |
| 3.10 | Imunohistoquímica para TNF-α | 37 |
| 3.11 | Western Blotting para sinalização intracelular da insulina no tecido adiposo branco (AKT, pAKT, PI3K e GLUT4) | 38 |
| 3.12 | Análise estatística | 40 |
| 4 | RESULTADOS | 41 |
| 4.1 | Dados biométricos | 41 |
| 4.1.1 | <u>Massa corporal</u> | 41 |
| 4.1.2 | <u>Massa corporal após a terapia</u> | 42 |
| 4.1.3 | <u>Comprimento naso-anal, pesagem da gordura epididimal e índice de Lee</u> | 42 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.2 | Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG) | 44 |
| 4.3 | Insulinemia, HOMA-IR e HOMA-β | 47 |
| 4.4 | Lipidograma | 49 |
| 4.5 | Imunohistoquímica para TNF-α | 50 |
| 4.6 | Sinalização intracelular da insulina no tecido adiposo | 52 |
| 4.7 | Análise quantitativa de PI3K | 53 |
| 4.8 | Análise quantitativa de AKT | 53 |
| 4.9 | Análise quantitativa de pAKT | 54 |
| 4.10 | Análise da razão entre pAKT/AKT | 55 |
| 4.11 | Análise quantitativa de GLUT4 | 56 |
| 5 | DISCUSSÃO | 58 |
| | CONCLUSÃO | 63 |
| | REFERÊNCIAS | 64 |
| | ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética | 71 |

INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade tem aumentando subitamente no mundo. Ela vem sendo considerada um problema de saúde pública em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, sem distinções entre classes. Indivíduos obesos são suscetíveis a doenças que afetam a qualidade de vida o que pode levar ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas.

O consumo alimentar excessivo contribui para alterações que envolvem o remodelamento e expansão do tecido adiposo branco somados à resposta inflamatória crônica de baixa intensidade. Sabe-se que este quadro é um dos gatilhos responsáveis a prejuízos na sinalização de insulina nos tecidos periféricos e, conseqüentemente, ao estabelecimento do quadro de diabetes do tipo 2.

A Medula óssea (MO) compreende principalmente duas grandes populações de células-tronco multipotentes: A célula-tronco hematopoiética (CTH) e a célula-tronco mesenquimal (CTM). As CTHs originam células de linhagem sanguínea e as CTMs fazem parte do estroma da medula óssea e podem gerar células de linhagem adipogênica, condrogênica e osteogênica. Ambas as linhagens celulares da medula têm sido bastante empregadas na terapia celular e bioengenharia de tecidos.

A terapia com células-tronco de medula óssea vem demonstrando resultados positivos em modelos animais e ensaios clínicos. Isto se deve a um painel de fatores secretados que já se sabe, são responsáveis pelo seu efeito terapêutico. Estes fatores compreendem fatores de crescimento, microvesículas e citocinas anti-inflamatórias que exercem efeitos anti-apoptóticos, interagem com o sistema imune, promovendo melhoria da condição do tecido alvo.

O combate às doenças geradas em decorrência da obesidade, em especial a resistência à insulina no quadro do diabetes tem chamado a atenção dos cientistas. Com intuito de minimizar os efeitos gerados pela doença, a terapia com a utilização das células-tronco vem motivando a comunidade científica devido a resultados positivos. Todavia, os mecanismos celulares que regem o potencial das células-tronco ainda não estão bem compreendidos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Obesidade

A obesidade é um problema de saúde enfrentado pela comunidade global. Em virtude de seus elevados índices também é responsável pelo estabelecimento de diversas doenças como, câncer, doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2, além da redução da expectativa de vida (ENGIN, A., 2017; FRUCTUOSO *et al.*, 2018; FRUH, 2017). De maneira sucinta, ela pode ser definida pelo acúmulo de peso corporal devido à ingestão calórica excessiva associada ao estilo de vida sedentário resultando no acúmulo de gordura corporal. Sua incidência acomete indivíduos sem distinção de classe social e idade pelo mundo (ENGIN, A., 2017; FRUH, 2017; GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017).

Um dos parâmetros mais utilizados para diagnóstico da obesidade é o Índice de Massa Corporal (IMC). Estimativas divulgadas pela Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO) apontam que até 2025, 2,5 bilhões de adultos apresentarão sobrepeso, sendo que destes, 700 milhões serão de indivíduos obesos. Outro estudo referente ao ano de 2016, conduzido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), apontou que cerca de 39% das mulheres e homens acima dos 18 anos apresentavam sobrepeso sendo que destes, 11% dos homens e 15% das mulheres encontravam-se obesos, com IMC acima de 30.

Tendo em vista que mudanças no estilo de vida na população estão ligadas ao estabelecimento de desordens metabólicas associadas ao quadro de obesidade, sugerem-se terapias alternativas que busquem atenuar os efeitos sistêmicos por ela gerados.

1.2 Obesidade e Inflamação

O tecido adiposo é um tecido que apresenta inúmeras participações fisiológicas. Nele, compreendem tipos celulares como adipócitos, células endoteliais, macrófagos, células mesenquimais e pericitos compondo a fração vascular estromal (FVE) (RAMAKRISHNAN; BOYD, 2018; SIPPEL *et al.*, 2015). O tecido adiposo pode ser subdividido em tecido adiposo branco (TAB) (o maior órgão endócrino que atua na sensibilidade à insulina, inflamação e papel imune), o tecido adiposo marrom (de ação termogênica devido a grande presença de mitocôndrias), e tecido adiposo bege (alterna entre as características do TAB e tecido adiposo marrom por meio do processo denominado *browning*) (BONFANTE *et al.*, 2015).

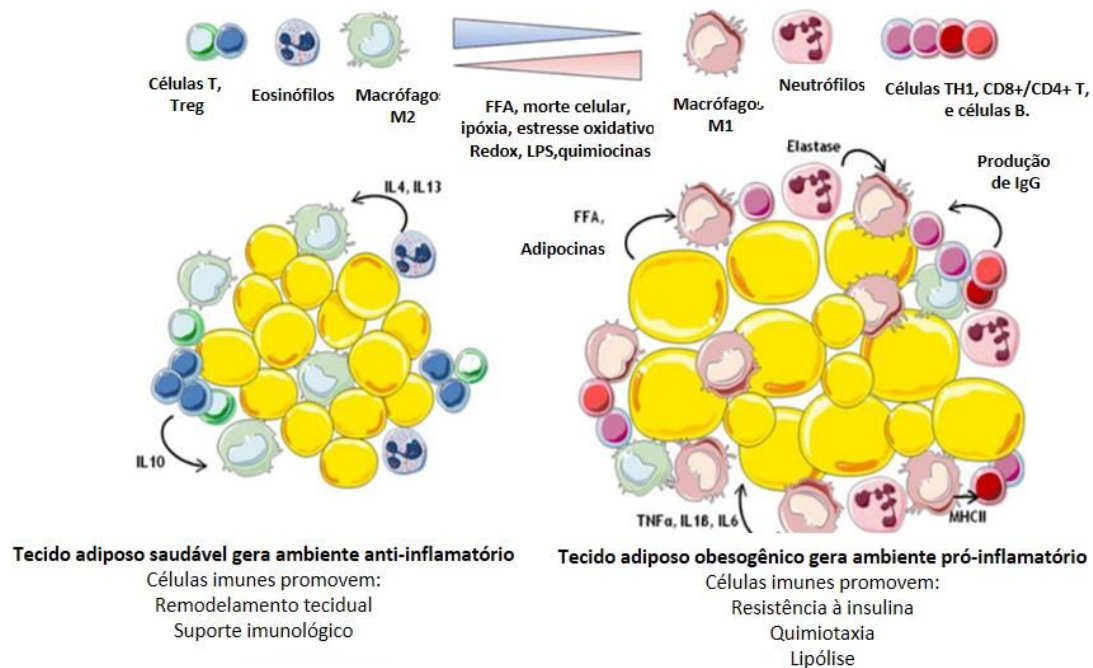
O tecido adiposo branco foi considerado por muito tempo como tecido com função única de armazenamento energético, entretanto. Contudo, foi descoberta participação endócrina e de interação com o sistema imune. Nos anos 90, um estudo pioneiro demonstrou a relação entre o tecido adiposo e inflamação por meio da elevada expressão da citocina fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) em TAB de ratos submetidos a uma dieta hipercalórica (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; SIPPEL *et al.*, 2015). A partir daí, diversos trabalhos tem reforçado a relação entre obesidade e inflamação em virtude das condições patológicas encontradas na obesidade (FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015).

Ele também é uma fonte de adipocinas, que são moléculas bioativas que participam em processos metabólicos do organismo por sinalização parácrina e endócrina. Dentre as principais adipocinas secretadas pelo TAB temos Interleucina-10 (IL-10), adiponectina (AdipoQ), TNF- α , Interleucina-6 (IL-6) e resistina. Em condições de homeostase, há o equilíbrio entre a produção de adipocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias. Porém na obesidade, é desencadeado o remodelamento tecidual do TAB somado a produção de adipocinas envolvidas em respostas pró-inflamatórias locais de maneira sistêmica (GOOSSENS, 2017; GUIDO *et al.*, 2020; KAMMOUN; KRAAKMAN; FEBBRAIO, 2014; SOUSA LACERDA *et al.*, 2016).

Nesta inflamação considerada de baixa intensidade, ocorrem alterações dos status de sinais imunomoduladores das células residentes gerando o recrutamento de

células do sistema imune. Simultaneamente, ocorre hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos formando regiões de hipóxia e que ao final, ativam vias de sinalização para NF- κ B que envolvem a transcrição de genes pró-inflamatórios, assim como recrutamento de macrófagos (FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015; HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993) (Figura 1).

Figura 1 - Esquema representativo do TAB em condições fisiológicas normais e na obesidade



Fonte: Adaptado de KAMMOUN; KRAAKMAN; FEBBRAIO, 2014.

Uma importante citocina atuante na inflamação do TAB é o TNF- α . Este mediador pró-inflamatório é sintetizado como uma proteína transmembrana e para que alcance sua forma ativa, passa por clivagens pela enzima conversora de TNF- α (TACE) até que seja liberada na circulação como uma molécula de 17kDa. Ela é expressa majoritariamente pelos macrófagos e está envolvida nas respostas de citotoxicidade, crescimento celular e diferenciação celular (FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003).

Paralelamente a ação do TNF- α , outros exemplos de adipocinas pró-inflamatórias importantes são a resistina e o IL-6. A ação da resistina é mediada por TNF e IL-6 o que implica em complicações na ação da insulina no organismo. Já a IL-6 tem sido relacionada principalmente com o estímulo da síntese de triglicerídeos no

fígado o que leva ao ganho de gordura visceral (SOUSA LACERDA *et al.*, 2016). Portanto, as ações das adipocinas desempenham importante papel durante a progressão da inflamação presente nas complicações em função da obesidade.

No que tange ao desenvolvimento da resistência à insulina (RI) nos tecidos, particularmente o TNF- α vem sendo reportado como um dos mediadores entre a obesidade e o estabelecimento da RI (DO PRADO *et al.*, 2009). Um dos estudos demonstrou que esta citocina se encontra elevada no soro de ratos obesos tratados com dieta hiperlipídica. Os autores sugeriram que o aumento da presença deste marcador inflamatório associado aos marcadores proteína quimioatraente de macrófagos 1 (MCP-1) e leptina estaria associada ao aumento do índice de HOMA (Homeostasis Model Assessment) o que permite caracterizar o estabelecimento da resistência à insulina (LIONETTI *et al.*, 2014).

1.3 Resistência periférica à insulina

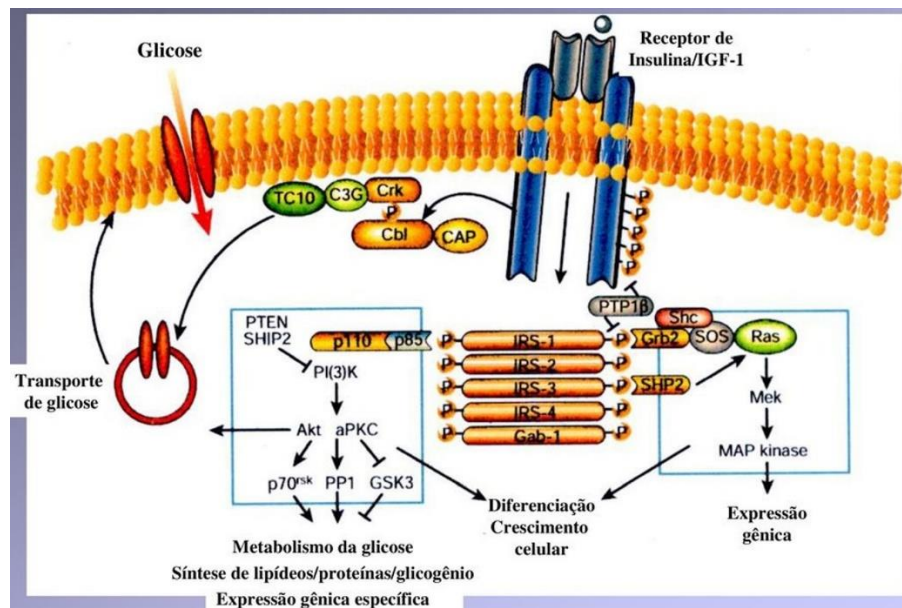
A insulina tem importante papel na regulação de processos anabólicos nos tecidos. Este hormônio é produzido pelo pâncreas, especificamente nas células- β das ilhotas pancreáticas em resposta a elevação da glicemia (SHANG *et al.*, 2008). Ela está relacionada à sobrevivência e crescimento celular assim como na captação de glicose nos tecidos periféricos, no metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos (GUO, S., 2014).

Em condições fisiológicas normais, a ligação da insulina ocorre no receptor de insulina (IR). O IR é um receptor transmembrana de atividade tirosina quinase. É composto por duas subunidades α (porção extracelular) e duas subunidades β (porção intracelular). As subunidades α e β unem-se por pontes de dissulfeto em que a subunidade α possui atividade alostérica capaz de inibir a ação tirosina quinase da subunidade β (MARTINS, 2016).

Com a ligação da insulina ao IR ocorre ativação e dimerização resultando em uma série de reações de fosforilações nos resíduos de tirosina localizados na porção citoplasmática deste receptor (LIZCANO; ALESSI, 2002). Isto inclui o recrutamento de proteínas adaptadoras, incluindo os substratos do receptor de insulina 1 (IRS1 a IRS4), Homology Collagen (Src) e Janus Kinase 2 (JAK2). A partir daí, 3 principais

vias de sinalização podem ser ativadas: A via de proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), relacionado a crescimento celular, via de mTOR que atua no crescimento celular e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). A PI3K é essencial para ativação da proteína quinase B (PKB) ou AKT relacionada a exocitose dos transportadores de glicose (GLUTs) para membrana celular permitindo a captação de glicose pelas células (FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015) (Figura 2).

Figura 2 - Esquema simplificado da via de sinalização da insulina.



Fonte: ROPELLE, E. R., PAULI, J. R., & CARVALHEIRA, 2007.

Os efeitos da insulina no organismo culminam em diferentes rotas metabólicas no tecido alvo. É um hormônio que favorece processos anabólicos e tem ação hipoglicemiante. Após ser secretado pelas células β e ativar vias de transdução de sinal, age promovendo a utilização da glicose como fonte de energia nos tecidos principalmente os tecidos periféricos como no caso do músculo, fígado e tecido adiposo (MARZZOCO; BAPTISTA TORRES, 2015).

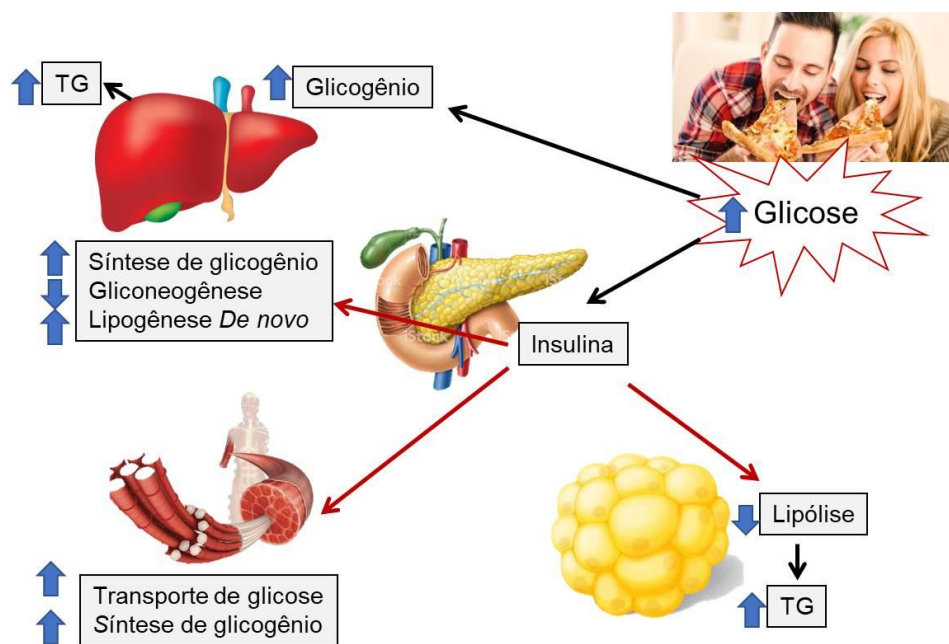
No músculo esquelético a insulina estimula a captação de glicose e síntese de glicogênio. A glicose obtida é exclusivamente para a produção de energia para o próprio tecido (MARZZOCO; BAPTISTA TORRES, 2015).

Particularmente no fígado, a insulina exerce efeito inibitório da gliconeogênese haja vista que a ativação de PKB (enzima presente nesta via) inibe enzimas

reguladoras responsáveis pela degradação do glicogênio. Os efeitos fisiológicos da via de insulina diferem em certo momento para o músculo e fígado. No fígado o quadro hipoglicemiante estimula a liberação de glucagon, estimulando a glicogenólise para corrigir os níveis glicêmicos entre as refeições (MARZZOCO; BAPTISTA TORRES, 2015).

No tecido adiposo, o aumento da glicemia, liberada em virtude da abundância de nutrientes, promove inibição da via metabólica relacionada com a liberação de ácidos graxos no plasma (lipólise). Em contrapartida, a insulina estimula a síntese de lipídeos a partir da entrada de glicose nas células pelo processo denominado de lipogênese (SAMUEL; SHULMAN, 2012a) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema ilustrativo das ações da insulina



Fonte: Adaptado de SAMUEL; SHULMAN, 2012.

Infelizmente, é comum no quadro de obesidade a presença de disfunções metabólicas. Uma delas é a resistência à insulina (RI) dada pela deficiência na resposta ao hormônio e que geralmente é uma condição que antecede o quadro de diabetes tipo 2. Isto leva a menor captação de glicose pelos órgãos periféricos, o que culmina na elevação dos níveis glicêmicos no sangue. Em resposta, o pâncreas passa

a produzir maior quantidade de insulina levando ao quadro de hiperinsulinemia (BAI *et al.*, 2018).

A resistência à insulina também é um dos gatilhos que contribuem para o quadro de inflamação (ZHAO *et al.*, 2018). A inflamação, neste caso, é diferente da resposta de inflamação clássica caracterizada pelos sinais de vermelhidão, inchaço, calor e dor. É denominada como inflamação crônica de baixa intensidade ou metainflamação por se tratar de um fenômeno que envolve a contínua produção de adipocinas pró-inflamatórias, contrapondo ação das adipocinas benéficas produzidas pelo tecido adiposo (FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015).

Uma das citocinas principais atuantes na RI é o TNF- α . Ela parece prejudicar a ativação do IR, fosforilação de IRS-1 e conseqüentemente a externalização de GLUT4 o que acarretaria em prejuízos na captação de glicose pelas células (SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008). Já Yaribeygi, Farrokhi & Butler (2018), apresentam alguns dos mecanismos moleculares associados as ações do TNF- α relacionada à resistência da ação da insulina. A elevada expressão de TNF- α , com participação de outros mediadores inflamatórios, como (Interleucina 1) IL-1 e MCP-1 prejudicam a via devido a fosforilações de quinases do Complexo IK-B cinase/NF-kappaB (IKK β /NF- κ B) e C-jun N-terminal (JNK) que são complexos relacionados aumento da RI. O TNF, também é responsável pela elevada expressão de proteínas supressoras de sinalização 1 e 3 (SOCS1/SOCS3) que induzem degradação dos receptores de insulina (RI), além de estresse oxidativo.

Embora o quadro de RI quando diagnosticado na prática clínica seja passível de tratamento por meio de alimentação saudável, prática regular de atividade física e medicamentos sabemos que muito há para aprimorar acerca de estratégias que possam ser futuramente aliadas no tratamento desta condição. Para isto, novas ferramentas são exploradas trazendo esperanças para o tratamento de doenças metabólicas decorrentes da obesidade.

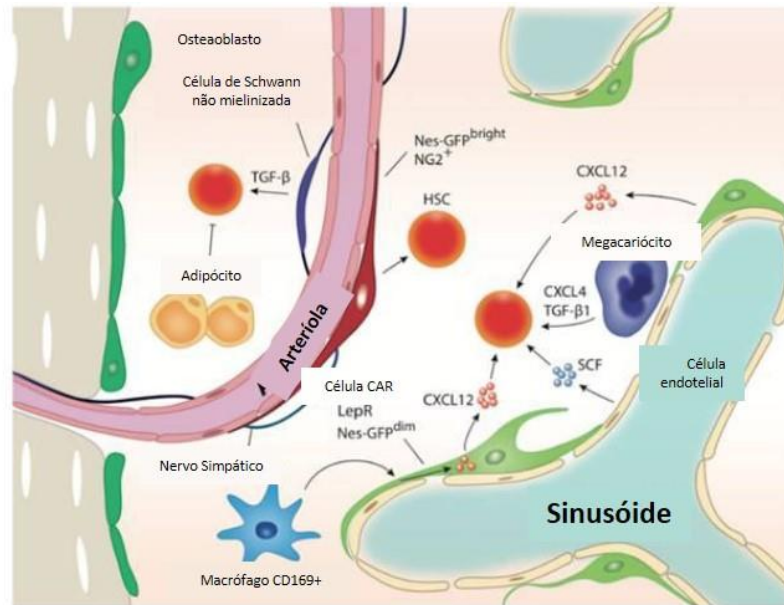
1.4 Medula óssea

A medula óssea (MO) encontra-se localizada no interior dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos. Durante muitos anos foi considerado local inerte

com função apenas de abrigar células da linhagem sanguínea. Todavia, com a contribuição de diversos pesquisadores, descobriu-se que se tratava de um tecido dinâmico e complexo (LAZZARI; BUTLER, 2018). Nela encontramos uma população heterogênea, incluindo: osteoblastos, osteoclastos, macrófagos, eritrócitos além de tecido adiposo de medula óssea (TAMO) e fibras de Schawn não mielinizadas. É neste local onde ocorre, primariamente, a geração de células sanguíneas de acordo com a demanda. Na medula óssea também encontramos dois importantes tipos celulares de precursores multipotentes: As Células-Tronco Hematopoiéticas (CTH) e Células-Tronco Mesenquimais (CTM) (CALVI; LINK, 2015; MORTADA; MORTADA, 2018; WANG; LENG; GONG, 2018).

A MO distingue-se em medula vermelha e medula amarela, sendo a medula vermelha onde se estabelecem os nichos das células-tronco, e a segunda formada por adipócitos que virão a substituir a medula vermelha no decorrer da idade (LUONG; HUANG; LEE, 2019). Os vasos sanguíneos fornecem nutrientes, oxigenação e produzem fatores importantes para manutenção da quiescência das CTHs no nicho da medula, juntamente com os osteoblastos (ASADA; TAKEISHI; FRENETTE, 2017; SMITH; CALVI, 2013). As células-tronco podem estar localizadas em diferentes nichos. Na MO é possível encontrá-las no nicho endosteal, mais próximo a região perivascular e reticular. O nicho perivascular é responsável pela manutenção e migração de células-tronco hematopoiéticas até o sangue periférico. Já o nicho endosteal, atua na retenção e manutenção do pool das CTHs neste nicho (GHOBRIAL *et al.*, 2018; NIU; CANCELAS, 2018) (Figura 4).

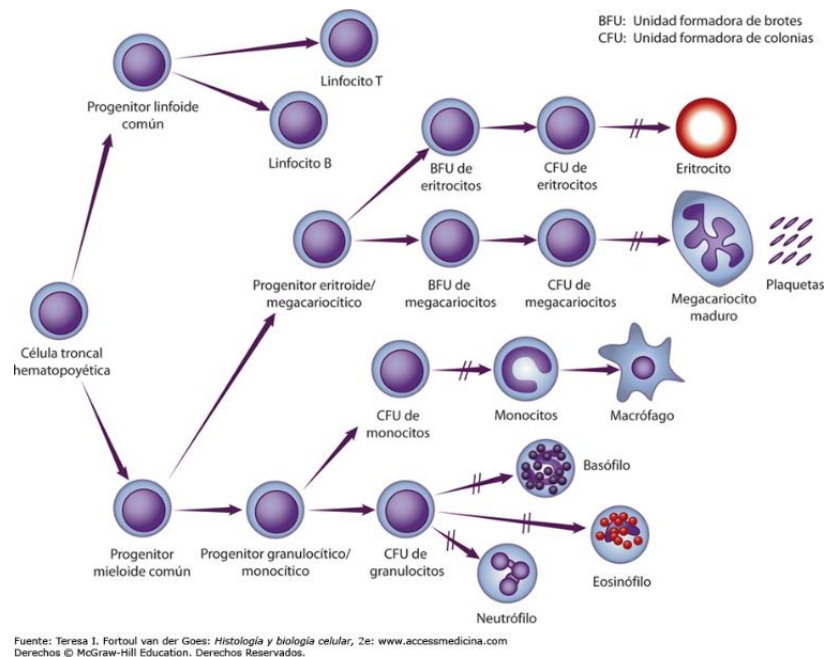
Figura 4 - Esquema ilustrativo dos componentes do nicho medula óssea



Fonte: Adaptado de ASADA; TAKEISHI; FRENETTE, 2017.

A hematopoese é um processo orquestrado pelas CTHs que estão presentes em maioria na composição celular da MO (SZADE *et al.*, 2018). Já é bem estabelecido que estas células estejam no topo da hierarquia como células que irão gerar progenitores hematopoiéticos, permitindo a formação de células de linhagem sanguínea ao final da diferenciação que irão exercer funções de acordo com o tipo celular (ANTONIANI; ROMANO; MICCIO, 2017). As CTHs são mantidas por meio de proteínas de adesão como N-caderinas e fatores secretados pelas CTMs. À medida em que se diferenciam, migram da região endosteal em direção à região central da MO (SMITH; CALVI, 2013) (Figura 5).

Figura 5 - Esquema das células-tronco hematopoiéticas durante a hematopoeise



Fonte: Retirada do site Access Medicina.

Já as CTMs auxiliam na manutenção do microambiente da MO. Elas estão imersas no estroma e compoendo os nichos na MO. Sabe-se que secretam de forma parácrina fatores que irão estimular a proliferação, diferenciação ou o estado quiescente para outros tipos celulares. Um exemplo disto é a quimiocina CXCL12 que atua como ligante para CXCR4 nas CTH contribuindo para a migração ou manutenção quiescência das CTH na medula. O Fator de Célula-Tronco 1 (SCF-1) ligante para KITL também promove o estado quiescente das CTH (THORÉN *et al.*, 2008; TZENG *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2018).¹

Para utilização das CTMs no desenvolvimento de novas terapias, a Sociedade Internacional de Terapia Celular implementou critérios para caracterizá-la por meio da presença de um painel de marcadores de superfície positivos para: CD105, CD90, CD73 e HLA-DR. Que não apresentem MHCII, sendo o MHCI expresso em níveis menores. Serem negativas para marcadores de progenitores hematopoiéticos: CD45,

¹ Disponível em:

<<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1502§ionid=94735038/>> Acessado em 20/7/19 às 10:00.

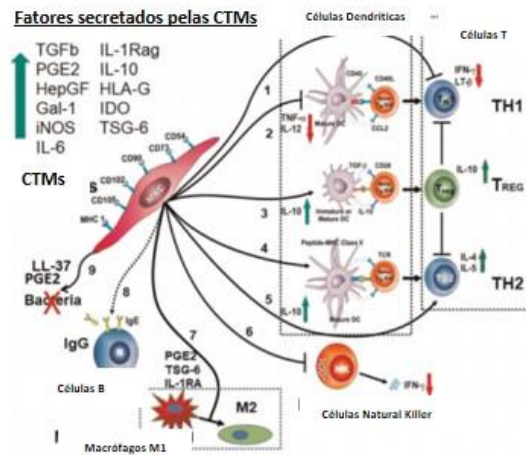
CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19. E, apresentem a capacidade de se diferenciar em osteoblasto, adipócito e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006; JIANG; XU, 2020).

As CTMs vem sendo bastante exploradas pela habilidade de migrarem para tecidos lesionados e secretarem moléculas como fatores de crescimento, citocinas e microRNAs que estimulam o reparo tecidual, além de modular respostas imunes e inflamatórias (JIANG; XU, 2020; PITTENGER *et al.*, 2019a). Há em torno de 700 estudos sendo conduzidos, sendo 224 até o momento (final de 2019), segundo dados do site *Clinical Trials* (<https://clinicaltrials.gov>).

Recentemente, um trabalho de revisão sugere que as células mesenquimais além de secretarem fatores de crescimento, vesículas extracelulares, também seriam participariam do recrutamento de células imunes para o local lesionado, o que sugere que a comunicação celular ocorra por fatores parácrinos e por meio de interações célula-célula (CECCARIGLIA *et al.*, 2019).

Nas revisões recentes que abordando perspectivas futuras do uso das CTMs, os autores expuseram alguns mecanismos de interação com sistema imune. Há cerca de 11 fatores conhecidos secretados dentre eles, destacam-se o Fator de Crescimento Transformante β (TGF- β) e Interleucina-10 (IL-10). Os autores, também sugerem que as células mesenquimais seriam capazes de estimular a proliferação e diferenciação de células T Regulatórias (T_{Reg}) e linfócitos T Helper 2 (T_{H2}), conhecidos por terem fenótipo anti-inflamatório. Além de atenuarem a ação de células Natural Killer (NK), macrófagos pró-inflamatórios ou M1 estimulando macrófagos do tipo M2 (DE CASTRO *et al.*, 2019; JIANG; XU, 2020; PITTENGER *et al.*, 2019) (Figura 6).

Figura 6 - Esquema ilustrativo das principais interações entre as CTMs e o sistema imune



Fonte: Adaptado de PITTENGER *et al.*, 2019.

1.5 Terapia Celular na normalização da glicemia

Nas últimas décadas, a busca pelo tratamento e a possível cura para diversas doenças fez com que muitos grupos de pesquisas focassem no estudo e desenvolvimento de novas estratégias almejando a melhoria da condição dos pacientes. Com este propósito, a terapia celular vem sendo considerada uma das grandes promessas na era da medicina regenerativa.

A terapia celular divide-se em terapia celular propriamente dita (uso de células-tronco ou células diferenciadas), terapia tecidual (utiliza tecidos para transplante), terapia genética (transferência de genes ou bloqueio de genes alvo), além de drogas que mimetizam biomoléculas secretadas pelo tecido alvo (fatores de crescimento ou interleucinas) que podem ser isoladas e produzidas em laboratório por bactérias ou células (ARRIGHI, 2018).

Inicialmente, a descoberta de diferentes fontes de células-tronco humanas ganhou atenção no meio científico devido a sua capacidade de diferenciação. Elas podem ser classificadas em: embrionárias ou pluripotentes, pluripotentes-induzidas e adultas e as mesenquimais. As células-tronco embrionárias diferenciam-se indefinidamente em condições propícias, uma vez que retêm a capacidade gerar todos tipos celulares pertencentes aos três folhetos germinativos no estágio de blastocisto, exceto os anexos embrionários. Já as pluripotentes induzidas empregam-se fatores de transcrição para induzir células já diferenciadas à pluripotência. No caso das

células-tronco adultas ou multipotentes, trata-se de células em estado indiferenciado e que quando estimuladas, geram tipos celulares de acordo com tecido alvo, ainda que possuam capacidade de diferenciação mais limitada (BEREBICHEZ-FRIDMAN; MONTERO-OLVERA, 2018).

Hoje, as células-tronco adultas ou mesenquimais têm sido uma das fontes mais utilizadas devido à ausência de questões éticas e por serem relativamente de fácil obtenção e expansão. No período embrionário originam-se a partir do mesoderma e ao longo podem encontradas no estroma de tecidos como: tecido adiposo, cordão umbilical, polpa dentária, líquido amniótico e medula óssea. Trabalhos recentes têm explorado extensivamente o papel destas células em doenças degenerativas, e, em especial no tratamento do diabetes do tipo 1 (DM1) e 2 (DM2) (ESTRELA *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2019; LIRA *et al.*, 2017; MERINO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016; OLIVEIRA, M. *et al.*, 2019; TRUBIANI *et al.*, 2019).

No contexto da hiperglicemia comum no DM, um estudo publicado em 2016 utilizando terapia com células totais de medula em humanos portadores de DM2, demonstrou que após tratamento, cinco dos seis pacientes submetidos a terapia apresentaram melhoria dos níveis de Hemoglobina glicada (Hb1AC). Concomitantemente, os pacientes obtiveram redução da administração de insulina, redução dos índices de Hb1AC, além de efeitos colaterais mínimos (WEHBE *et al.*, 2016). Outro mini report em 2019, também demonstrou resultados semelhantes de melhoria da glicemia de jejum, glicemia pós-refeição e redução níveis de Hb1AC durante os meses de acompanhamento (LE *et al.*, 2019).

Outro grupo utilizando camundongos em modelo de DM1 observou que após a terapia com células mesenquimais houve melhoria na glicemia, função das células β e perfil inflamatório do órgão (YAOCHITE *et al.*, 2016), corroborando com resultados encontrados em outro estudo utilizando ratos, porém, em modelo de DM2 (HAO *et al.*, 2013).

O potencial regenerativo e reparador advindo da terapia com células de medula, particularmente no quadro de hiperglicemia tem se mostrado promissor. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos parácrinos de interação das células-tronco com os tecidos-alvo da captação de glicose, especialmente, o tecido adiposo. Até o momento, estudos em relação o uso da terapia de células-tronco advindas da medula óssea têm sido bastante empregadas para investigar a formação de novas células- β , reparação endógena de ilhotas em modelos animais assim como melhoria

da glicemia (HbA1c) em humanos tem sido bastante explorados (BRBORIC *et al.*, 2019; ESTRADA *et al.*, 2019; GUO, X. J. *et al.*, 2019; MOHAMED *et al.*, 2019; OH *et al.*, 2019).

Diante da participação do tecido adiposo processos dos processos que levam ao comprometimento metabólico na obesidade, neste trabalho investigamos o envolvimento deste tecido em relação à homeostasia da glicemia de camundongos hiperalimentados durante a lactação após a terapia com células da medula óssea.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Investigar o comportamento do tecido adiposo de camundongos hiperalimentados durante a lactação em relação ao marcador inflamatório TNF- α e na captação de glicose após terapia com células de medula óssea (CMO).

2.2 Objetivos específicos

- A) Avaliar os parâmetros biométricos (massa corporal, comprimento naso-anal, peso da gordura epididimal), dos camundongos *Swiss* controle e hiperalimentados durante a lactação que receberam ou não a terapia com células de medula óssea.
- B) Analisar a glicemia dos camundongos *Swiss* controle e hiperalimentados durante a lactação após a terapia com CMO.
- C) Analisar os níveis plasmáticos de insulina de camundongos *Swiss* controle e hiperalimentados durante a lactação após a terapia com CMO.
- D) Avaliar a expressão do marcador pro-inflamatório TNF- α no tecido adiposo após a terapia com CMO.
- E) Analisar o conteúdo das proteínas da cascata de sinalização para GLUT4 no tecido adiposo, Akt, pAkt de modo a avaliar resistência à insulina periférica antes e terapia com CMO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Células-Tronco do Departamento de Histologia de Embriologia (DHE) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* provenientes do biotério do Departamento. Todos os experimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na experimentação animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética para no cuidado e Uso de Animais Experimentais (protocolo CEUA/026/2018).

3.2 Modelo experimental de indução a obesidade

Para obtenção dos grupos, utilizamos o modelo experimental de redução de ninhada durante lactação (PLAGEMANN *et al.*, 1992). Inicialmente foram utilizados camundongos fêmeas grávidas condicionadas de forma individual em gaiolas. No terceiro dia após o nascimento a ninhada foi ajustada para formar os grupos controle (GC) e hiperalimentado (GH). No GC permaneceram 9 filhotes durante o período de lactação, enquanto no GH permaneceram apenas 3 filhotes machos. Aos 21 dias pós-natais, com o término da lactação, os animais foram separados em gaiolas contendo 3 machos cada. Todos os animais utilizados no experimento foram mantidos em condições padrão de ciclo claro/escuro de 12 horas na temperatura de 23°C, com água e ração comercial *ad libitum*. Os experimentos foram realizados preferencialmente no horário da manhã entre 8:00 e 12:00 horas. O tempo total de experimento foi de 100 dias.

3.3 Terapia com Células de Medula Óssea (CMO)

Os fêmures e tíbias de camundongos Swiss machos controle de 3 meses de idade foram dissecados e as epífises cortadas para coleta das células da medula óssea por centrifugação a 1500 RPM durante 5 minutos. Para obtenção das células totais de medula óssea, foi adicionado tampão de lise de hemácias. Posteriormente, essas células foram lavadas com PBS estéril, contadas e ajustadas para uma quantidade de 1×10^6 diluídos em PBS. Para administração das células na veia caudal, os animais hiperalimentados foram anestesiados com Xilazina (Anasedan – 5 mg/kg) e Cetamina (Virbac – 100 mg/kg). Aos 90 dias formamos os seguintes grupos experimentais:

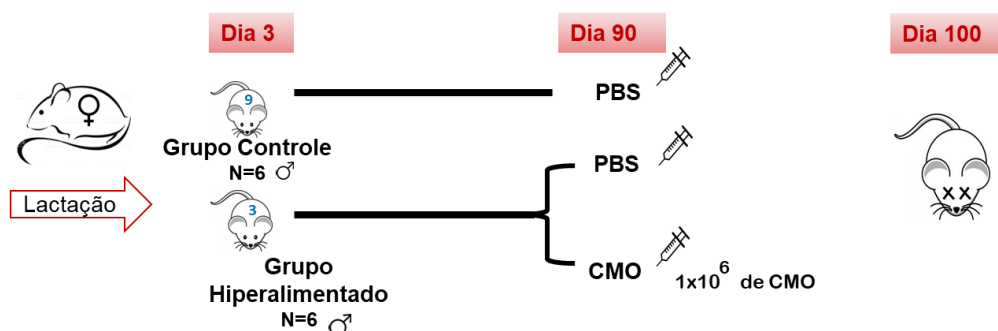
Grupo Controle (GC): formado pelas ninhadas que permaneceram com os 9 filhotes durante o período de lactação e aos 90 dias receberam 0,1 mL de PBS na veia caudal.

Grupo Hiperalimentado (GH): formado pelas ninhadas que permaneceram com 3 filhotes durante o período de lactação e que receberam 0,1 mL de PBS aos 90 dias.

Grupo Hiperalimentado + Células de Medula Óssea (GH+CMO): formado pelas ninhadas que permaneceram com 3 filhotes durante o período de lactação. Aos 90 dias receberam o transplante de 1×10^6 de CMO na veia caudal, obtidas de animais controle.

Cada grupo foi composto por 6 animais ($n=6$) e 10 dias após o transplante todos os grupos foram eutanasiados (dia 100) para as análises (Figura 7).

Figura 7- Desenho experimental do modelo para indução de hiperalimentação durante a lactação por redução de ninhada e terapia com células de medula óssea



Fonte: A autora, 2020.

3.4 Análise da massa corporal

Com intuito de investigar os impactos da hiperalimentação durante a lactação durante a lactação, os animais foram pesados a cada 10 dias contados a partir do dia de nascimento até completarem 100 dias com auxílio de balança analítica de precisão.

3.5 Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose (TITG)

Sete dias antecedentes ao transplante e 2 dias anteriores a eutanásia dos animais realizamos o teste intraperitoneal para avaliar a tolerância a glicose. Os animais foram submetidos a 6 horas de jejum para realização do teste. Foi injetada a concentração de 1g de Glicose/Kg e posteriormente a glicemia foi mensurada nos tempos: 0 (jejum), 30, 60, 90 e 120 minutos após administração de glicose. Os níveis de glicose foram medidos utilizando tira reagentes do aparelho Accu-Chek Active (Roche Diagnostics, Alemanha).

3.6 Coleta de Dados Biométricos

Aos 100 dias, a eutanásia foi realizada nos animais utilizando Cetamina e Xilazina. Foram coletados os dados dos animais referente a peso da gordura retroperitoneal e epididimal. Já o comprimento naso-anal foi feito com auxílio de paquímetro para mensurar. A partir dos dados de peso da massa corporal e comprimento naso-anal, mensuramos o índice de Lee que permite calcular o índice de massa corporal em roedores (Figura 8).

Figura 8 - Fórmula para cálculo do índice de Lee

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{Massa Corporal (g)}}}{\text{Comprimento Naso - Anal (cm)}}$$

No dia da eutanásia foi coletado o sangue periférico com seringa contendo heparina, alocado em eppendorf e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos para separação do plasma. Logo após, o plasma foi aliquotado, acondicionado e mantido a -80°C para posterior quantificação da insulina no plasma por ELISA (Elisa Kit- Rat Mouse Insulin, EMD Milipore, EZRMI-13K) orientada pelas instruções na bula do fabricante.

3.7 Cálculo do HOMA-IR e HOMA- β (MATTHEWS *et al.*, 1985)

O objetivo do índice Homa-IR é determinar a resistência a insulina, é calculado com os valores da glicemia e insulinemia de jejum através da seguinte equação:

Homa-IR = Glicemia (mMol/L) x Insulina (μ U/mL) / 22,5. Valores acima de 2,7 caracteriza a resistência à insulina.

Já o HOMA- β utilizado para determinar avaliar a eficiência das células β a partir da concentração de insulina de jejum através da seguinte equação:

HOMA- β = Insulina (μ U/mL) x 20 / Glicemia (mMol/L) – 3,5.

Os valores obtidos permitem caracterizar hiposecreção ou hipersecreção de insulina.

3.8 Colesterol Total e Triglicerídeos

Para mensurar os valores de triglicerídeos dos animais, amostras de plasma foram coletadas em jejum analisadas pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o kit Bioclin para dosagem de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos.

3.9 Processamento histológico

Durante a dissecação do animal, amostras de tecido muscular, de gordura epididimária e fígado de todos os grupos experimentais foram retirados, identificados e acondicionados em potes individuais contendo paraformaldeído 4% por 48 horas. Após esse período, foram transferidos para cassetes para processamento e registrados. Os tecidos então passaram por banhos em concentrações crescentes de álcool, para desidratação, e em seguida em banhos de xilol para clarificação. Por fim, foram inclusos em parafina líquida no aparelho HistoCore Arcadia H e resfriados para formação dos blocos no aparelho HistoCore Arcadia C para serem cortados micrótomo com espessura de 5µm.

3.10 Imunohistoquímica para TNF- α

Com intuito de analisar a presença do processo inflamatório no tecido adiposo, realizamos imunomarcações nos cortes histológicos. Os cortes ficaram na estufa por 40 minutos e em seguida foram imersos em banhos Xilol e de diferentes concentrações álcool por 2 minutos. Depois foram incubados com peróxido de hidrogênio a fim de inativar a atividade de peroxidase endógena, minimizando as chances de marcações inespecíficas. Após essa etapa, os cortes foram imersos em tampão citrato pH 6,0 a 60°C por 30 minutos e lavados em PBS e bloqueados com BSA 3% por 20 minutos. Aplicamos anticorpo primário goat-policlonal anti-TNF- α (Santa Cruz Biotechnology na diluição de 1:200) por *overnight*. No dia seguinte, após lavagens em PBS, utilizamos anticorpo secundário biotilado (VectaStain Kit Universal Quick HRP Kit, Vector Laboratories) juntamente com a streptavidina por 30 minutos. Em seguida, revelamos os cortes com DAB (ImpacPACT® DAB Substrate Kit, Peroxidase Vector Laboratories). Por último, os cortes foram lavados em água destilada e corados com hematoxilina. As lâminas foram montadas em Entellan para visualização ao microscópio de luz. A aquisição das imagens foi no microscópio Olympus DP72 em formato TIFF.

Escolhemos o tecido adiposo para quantificação da imunomarcação de TNF- α . Foram adquiridas imagens de 5 lâminas por grupo na objetiva de 100x (7 campos

aleatórios de cada lâmina) em que a quantificação das imagens foi realizada no software ImageProplus 7.0. Por meio da ferramenta histograma em que as áreas coradas em castanho foram selecionadas com resultados sendo expressos em porcentagem de área marcada. A quantificação foi realizada pelo software Image-Pro Plus 7.0 e as análise estatística pelo programa Graph Pad Prisma 8.

3.11 Western Blotting para sinalização intracelular da insulina no tecido adiposo branco (AKT, pAKT, PI3K e GLUT4)

Fragmentos de, tecido adiposo (100 mg) dos grupos experimentais foram lisados em tampão de Lise contendo 1% de triton x-100, Tris 50mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio, cloreto de sódio 150mM, 0,1% SDS, fluoreto de sódio 50 mM, ortovanadato de sódio 1mM e 1µg/mL de coquetel inibidor de protease (Roche). Os fragmentos foram homogeneizados em macerador manualmente e, após centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, a 4°C, os sobrenadantes foram coletados. As concentrações protéicas das amostras foram quantificadas através de kit específico (BCA Protein Assay Reagent, Thermo Scientific) com auxílio de leitor de Elisa e comprimento de onda 540nm (TU-1800 UV-VIS). Em seguida, as amostras foram aliqüotadas e o tampão de amostra (Tris-HCl 50mM, pH 6,8. SDS 1%, 2-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,0001%) adicionado para desnaturar as proteínas a uma temperatura de 100 °C por 5 minutos. As amostras então foram mantidas -20°C até o ensaio de Western Blotting.

As proteínas totais, foram submetidas para as análises em ensaio de Western Blotting para PI3K, Akt, pAkt e GLUT4. Foram separadas em gel de 12% de poliacrilamida por 1h a 150V. O padrão de peso molecular correu em paralelo a separação das proteínas por eletroforese para estimar o peso molecular da amostra (GE Healthcare).

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Bio-Rad) por 1h a 15V, utilizando o sistema semidry (Bio-Rad). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 1h com leite Molico a 5% em Tween-TBS (Tris-HCl 20mM, pH 7,5, NaCl 0,5mM, Tween-20 0,05%). A seguir, as membranas foram

incubadas overnight em anticorpo primário com diferentes diluições para os respectivos marcadores (Figura 9):

Figura 9 - Diluição dos anticorpos primários utilizados no ensaio de Western Blotting no tecido adiposo

| Tecido: Adiposo Branco | | |
|----------------------------------|---------------------|------------------------------|
| | Obtido em | Diluição do anticorpo |
| Marcador | | primário |
| PI3K | rabbit (Santa-Cruz) | 1:500. |
| AKT | rabbit (Santa-Cruz) | 1:1000. |
| pAKT | rabbit (Santa-Cruz) | 1:500. |
| Glut-4 | mouse (Santa-Cruz) | 1:500. |
| β-actina | rabbit (Santa-Cruz) | 1:1000. |

Fonte: A autora, 2020.

Após isto, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado correspondente em diferentes diluições de acordo com o tecido por 1h em agitação no shaker (Tabela 2). Posterior as 3 lavagens de 5 minutos em T-TBS, as membranas foram incubadas em estreptavidina-peroxidase (Invitrogen) diluído em T-TBS com 1% de leite Molico por 1h com diluições correspondentes as diluições dos anticorpos secundários (Figura 10).

Figura 10 - Diluição dos anticorpos secundários utilizados no ensaio de Western Blotting no tecido adiposo

| Tecido: Adiposo Branco | Diluição do anticorpo |
|-------------------------------|------------------------------|
| Marcador | secundário |
| anti-rabbit | 1:1000. |
| anti-mouse | 1:1000. |

Fonte: A autora, 2020.

Para detecção das bandas, foi utilizado kit de quimioluminescência (ECL, GE Healthcare Amersham). As membranas foram incubadas por 5 minutos em ECL ao abrigo de luz. As imagens das bandas foram capturadas pelo ChemiDoc*MP (Bio-Rad) seguida por análises de densitometria no software Adobe Photoshop 6.

3.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (EPM) de 6 animais por grupo. Foi feito o One-Way ou Two-Way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey com análises realizadas pelo Graph Pad Prism 8 em que $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

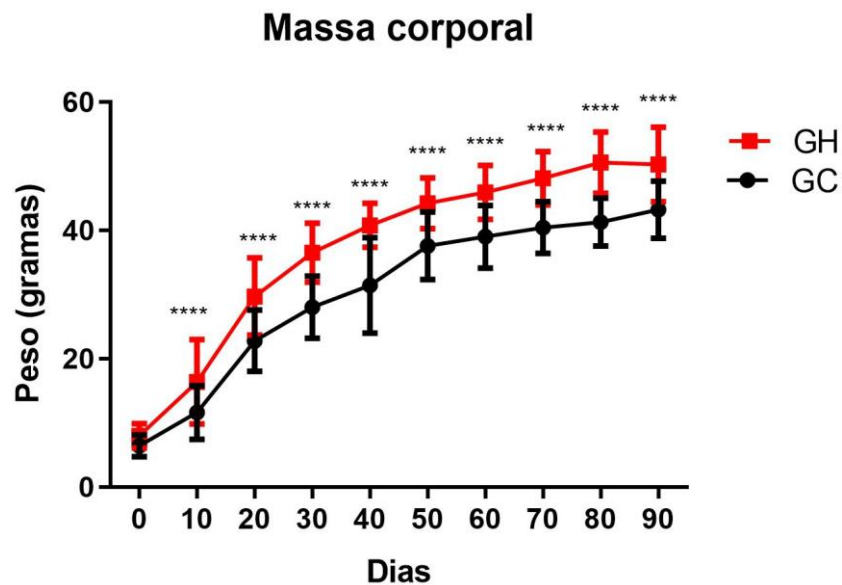
4 RESULTADOS

4.1 Dados biométricos

4.1.1 Massa corporal

Os resultados demonstraram que os animais hiperalimentados durante a lactação apresentaram aumento de massa significativo de 22,7% quando comparados aos animais do grupo controle a partir do 10º dia de vida. Observamos também que a diferença entre a média de peso dos animais hiperalimentados perdurou ao longo dos 90 dias anteriores ao transplante de células de medula (Figura 11).

Figura 11 - Curva de massa corporal dos animais dos grupos controle e hiperalimentado



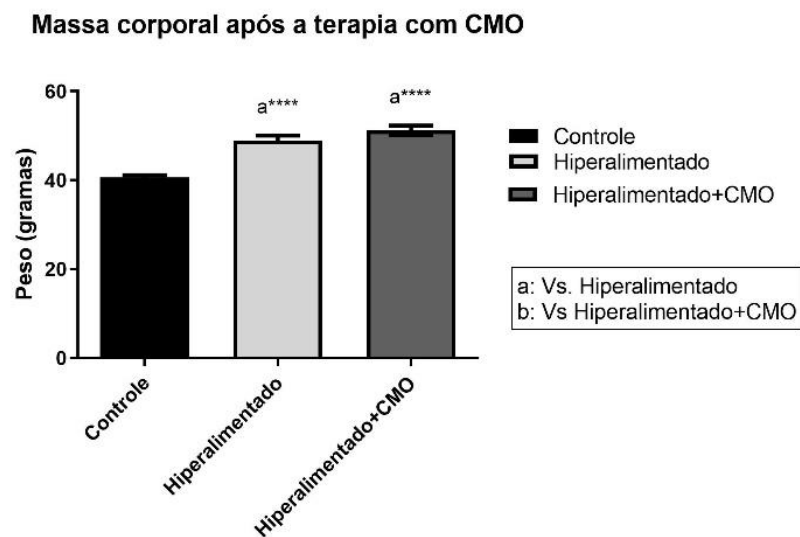
Nota: Os resultados representam média \pm EPM de cada grupo ****P <0,00005. Analisado pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020.

4.1.2 Massa corporal após a terapia

Com relação a massa corporal após ao tratamento, observamos que perduraram diferenças significativas de 20,3% do grupo GH e 26% do grupo GH+CMO comparados aos animais controle ao fim dos 100 dias (GG: $40,64 \pm 0,49$; GH: $48,93 \pm 1,07$; GH+CMO: $51,24 \pm 1,03$) (Figura 12).

Figura 12 - Gráfico representativo da massa corporal ao fim dos 100 dias de experimento



Nota: Valores apresentados como média \pm EPM ****P <0,00005. Analisado pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020.

4.1.3 Comprimento naso-anal, Pesagem da Gordura Epididimal e Índice de Lee

Para avaliar se o ganho de peso e massa estaria associado ao tamanho do animal, mensuramos o comprimento naso-anal. Não encontramos diferenças significativas entre os grupos, o que comprova o ganho de massa (GC: $10,38 \pm 0,08$; GH: $10,29 \pm 0,07$; GH+CMO: $10,55 \pm 0,10$; GH+CMO HA: $10,77 \pm 0,10$) (Figura 13A). Com relação ao peso da gordura epididimal, confirmamos o ganho considerável de tecido adiposo dos animais GH (GH: $1,434 \pm 0,1045$) e GH+CMO (GH+CMO: $0,09262$) comparados aos animais GC (GC: $0,5531 \pm 0,04460$) (Figura 13b). Isto sugere que o transplante de células de medula óssea (CMO) oriundas de animais saudáveis não foi capaz de promover a redução massa corporal dos animais hiperalimentados. Ao

analisarmos o índice de Lee constatamos que os animais GH e GH+CMO apresentaram diferenças significativas em relação ao GC o que reforça o quadro obesogênico estabelecido nos animais (GC: $330,2 \pm 2,021$; GH: $365,1 \pm 3,381$; GH+CMO: $353,4 \pm 6,343$) (Figura 13c).

Figura 13 - Gráfico representativo dos parâmetros biométricos (continua)

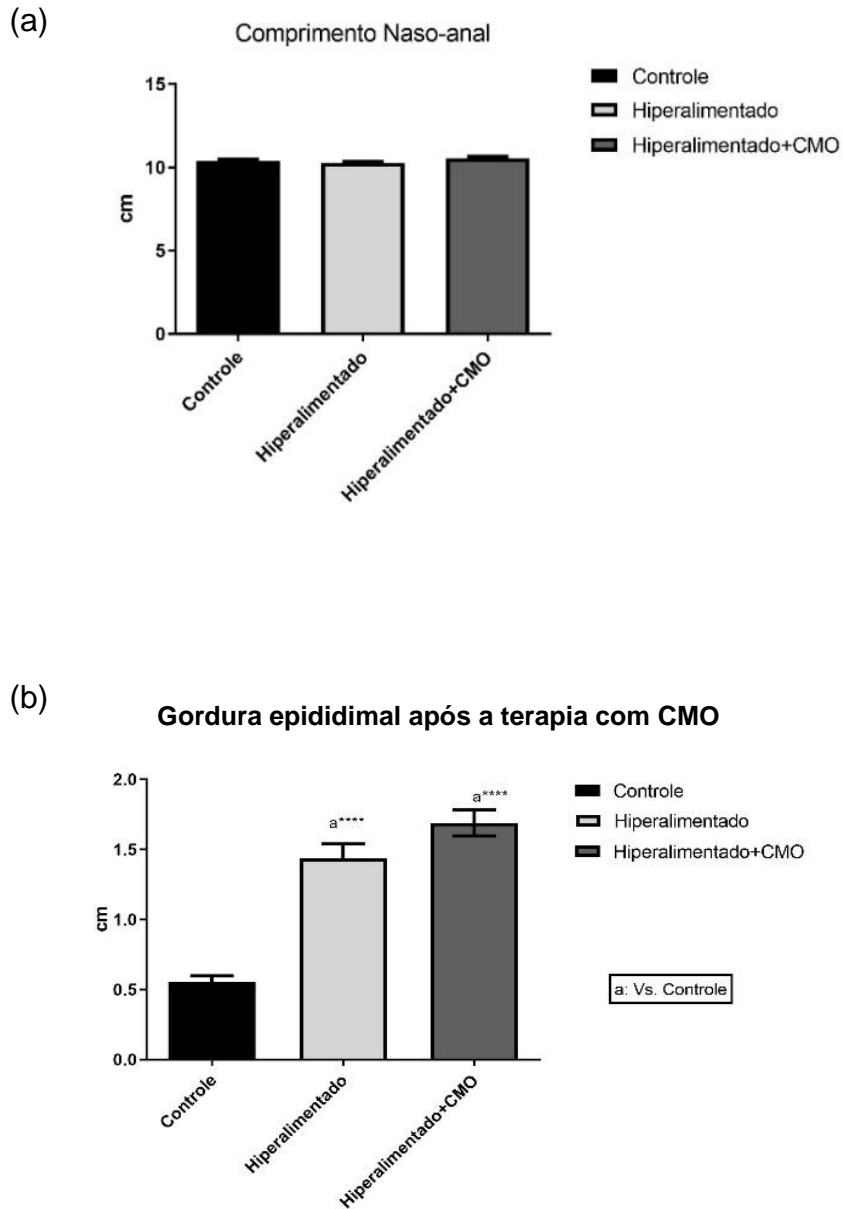
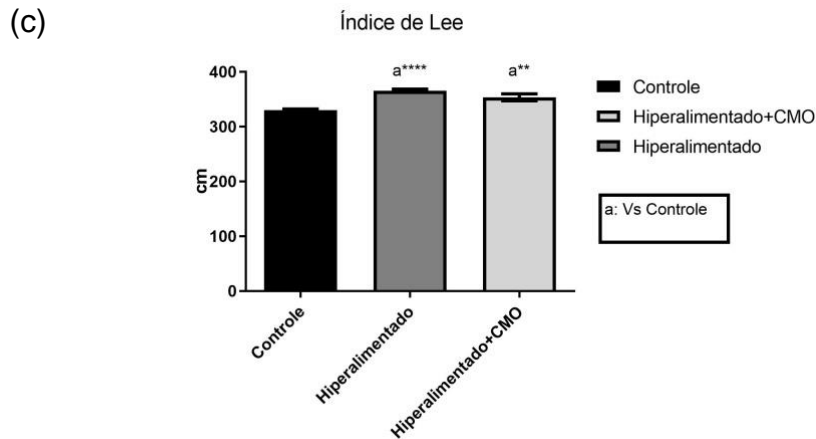


Figura 13 - Gráfico representativo dos parâmetros biométricos (conclusão)



Legenda: (a) Gráficos representativos do comprimento naso-anal, peso da gordura epididimal (b) dos camundongos controle, hiperalimentado e hiperalimentado com terapia de CMO. (c) Gráfico do Índice de Lee que estima a obesidade em roedores.

Nota: Valores apresentados como média + EPM **P <0,005, ****P <0,00005. Analisado pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020.

4.2 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

A glicemia dos animais hiperalimentados (GH) apresentou valores superiores a partir dos 30 minutos. Esta diferença substancial dos animais hiperalimentados (GH) perdurou até o fim do teste. Os resultados foram comprovados por meio do cálculo da área sob a curva. (Figura 14).

Figura 14 - Gráficos representativos do TITG e área sob a curva em animais controle e hiperalimentados (continua)

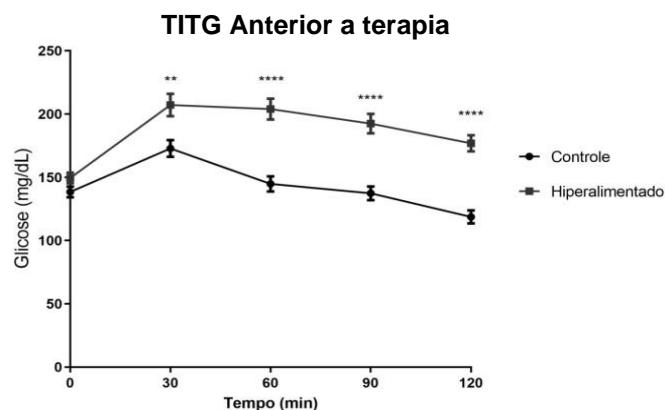
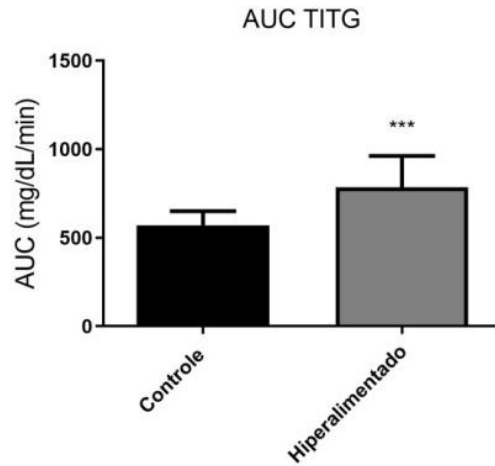


Figura 14 - Gráficos representativos do TITG e área sob a curva em animais controle e hiperalimentados (conclusão)

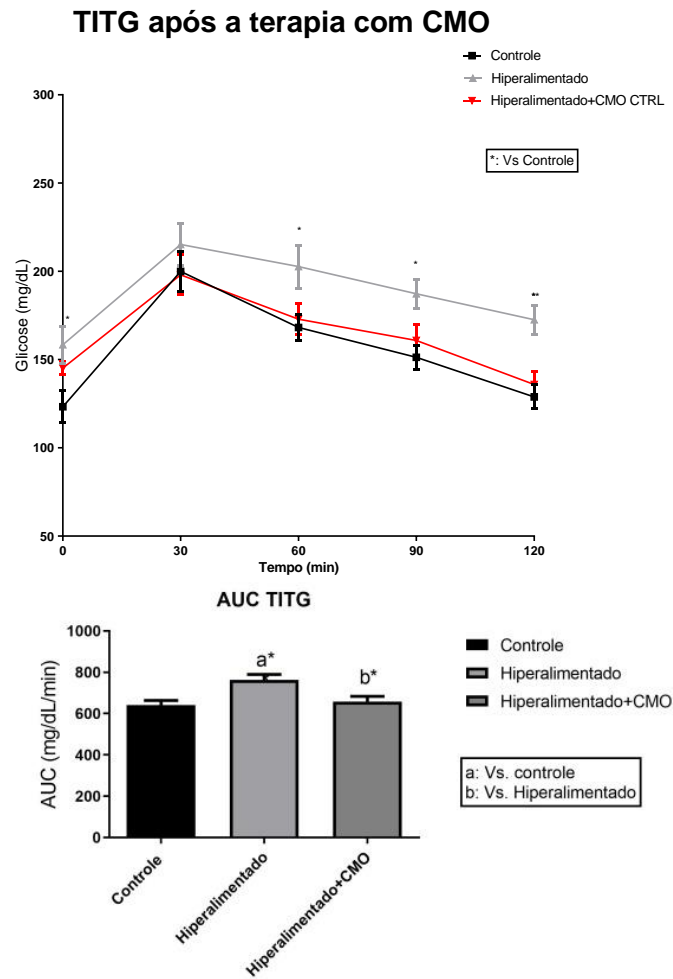


Nota: Valores apresentados como média \pm EPM **P <0,005, ***P <0,0005, ****P <0,00005. Analisado pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey no TITG e teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey em AUC.

Fonte: A autora, 2020.

Todavia, os animais hiperalimentados que receberam a terapia (GH+CMO) apresentaram melhoria dos índices glicêmicos em que a curva glicêmica apresentou valores muito similares aos animais controle (GC) com diferença significativa em relação aos animais que não receberam a terapia (GH), sugerindo melhoria destes parâmetros. Em contrapartida, os animais hiperalimentados (GH) apresentaram prevalência de elevados índices glicêmicos em todos os tempos após administração da solução de glicose. No gráfico da área sob a curva, corroboramos os resultados observados dos animais submetidos à terapia que apresentaram melhoria da sensibilidade à glicose indo na contramão dos animais GH, com prevalência da resistência à ação da insulina (Figura 15).

Figura 15 - Gráficos representativos do TITG e área sob a curva após a terapia com células de medula óssea



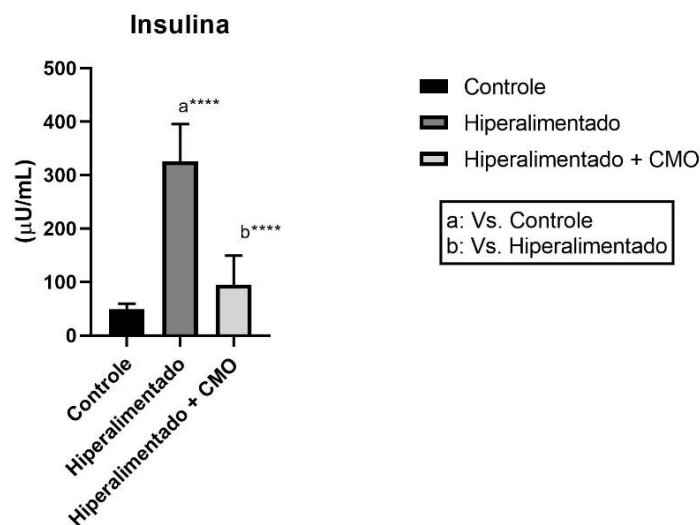
Nota: Valores apresentados como média \pm EPM * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$. Analisado pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey em TITG e teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey em AUC.

Fonte: A autora, 2020.

4.3 Insulinemia, HOMA IR e HOMA- β

As concentrações de insulina foram analisadas por meio da dosagem plasmática de insulina. Observamos hiperinsulinemia nos animais hiperalimentados com considerável diferença em relação ao grupo GC, o que é um forte indicativo de resistência à ação da insulina nos tecidos destes animais. O mesmo já não observamos nos animais submetidos à terapia. Os animais GH+CMO apresentaram redução significativa da ação da insulina comparado ao GH. Isto sugere que a terapia parece ter agido de forma a permitir a melhor sensibilidade da ação da insulina o que refletiria também na redução dos índices glicêmicos, similares nos animais GC (GC: $49,28 \pm 4,193$, GH: $326,1 \pm 31,17$ e GH+CMO: $94,86 \pm 24,31$) (Figura 16).

Figura 16 - Gráfico com os valores de insulina dos animais controle, hiperalimentado e hiperalimentado submetido a terapia com CMO.



Nota: Valores apresentados como média \pm EPM ****P <0,00005. Analisado pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020.

Na intenção de analisar o grau de resistência à insulina nos animais como também avaliar a função das células β , foram calculados os valores para HOMA IR e HOMA- β . O HOMA IR dos animais GH apresentou valores significativamente superior aos animais GC, o que confirma os resultados já observados para tendência de resistência a ação da insulina destes animais. Quando submetidos à terapia, os

animais hiperalimentados apresentaram valores próximos aos animais controle (GC: $14,95 \pm 1,631$, GH: $82,02 \pm 16,29$ e GH+CMO: $20,87 \pm 3,436$) (Figura 17a).

Em relação ao HOMA- β , os animais GH apresentam claro comprometimento da função das células β pancreáticas, um indicativo do estabelecimento do quadro de pré-diabetes. Quando submetidos a terapia, os animais GH+CMO apresentaram melhoria desses parâmetros com valores semelhantes aos animais controle (Figura 17b).

Figura 17 – Gráficos representativos de HOMA-IR e HOMA- β (Continua)

(a)

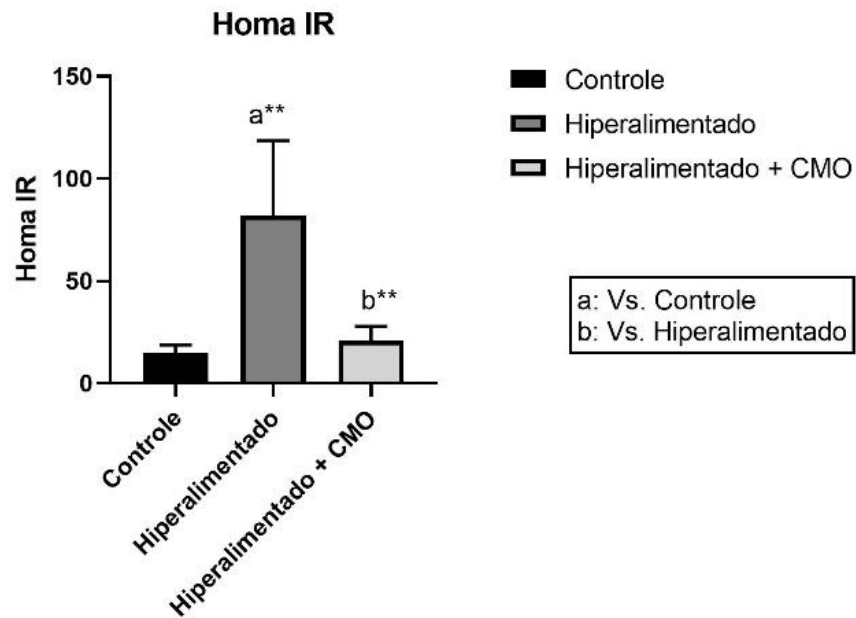
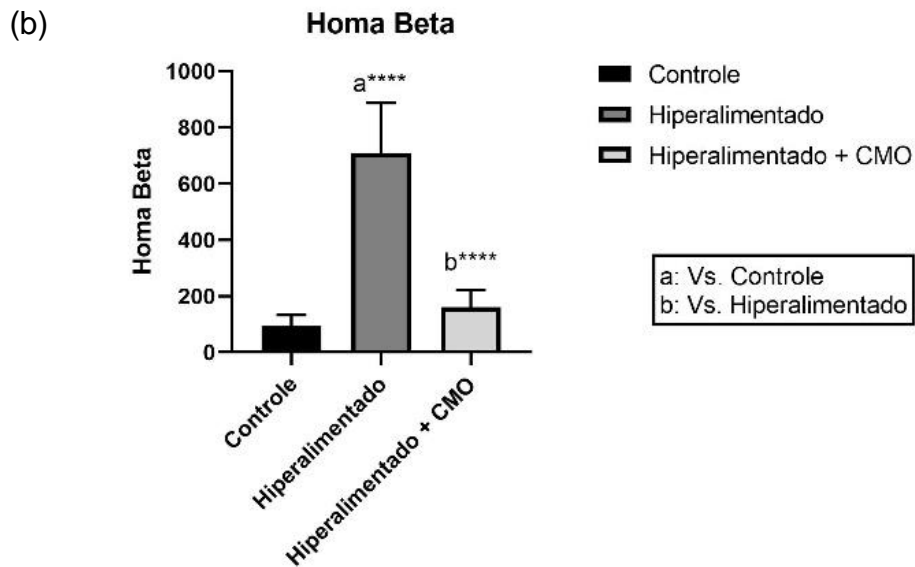


Figura 17 – Gráficos representativos de HOMA-IR e HOMA-β (Conclusão)



Legenda: (a) Gráfico representativo de HOMA IR. (b) Gráfico representativo de HOMA-β.

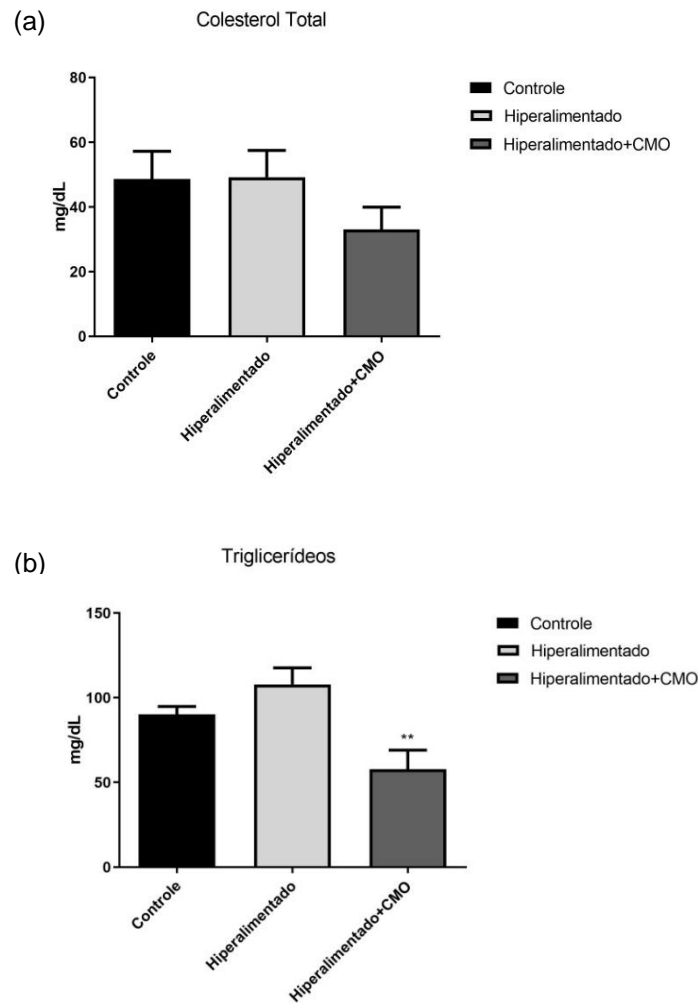
Nota: Valores apresentados como média ± EPM ****P <0,00005. Analisado por teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020.

4.4 Lipidograma

De modo a investigar se a terapia com CMO exerceria mudanças no perfil lipídico dos animais, submetemos o plasma sanguíneo para análises de colesterol. Observamos que os animais hiperalimentados apresentaram níveis consideráveis de triglicerídeos, e elevados níveis de colesterol total, embora não estatisticamente significativos. Os animais que receberam a terapia apresentaram aparente redução dos níveis de colesterol total embora não possua diferença estatística. Porém, os valores de triglicerídeos desses animais apresentaram considerável redução comparada aos animais hiperalimentados (Figura 18a e 18b).

Figura 18 – Gráficos representativos do colesterol total e triglicerídeos



Legenda: (a) Gráfico representativo de colesterol total após a terapia com CMO. (b) Gráfico representativo dos valores de triglicerídeos após a terapia com CMO.

Nota: Valores apresentados como média \pm EPM **P <0,005. Analisado pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

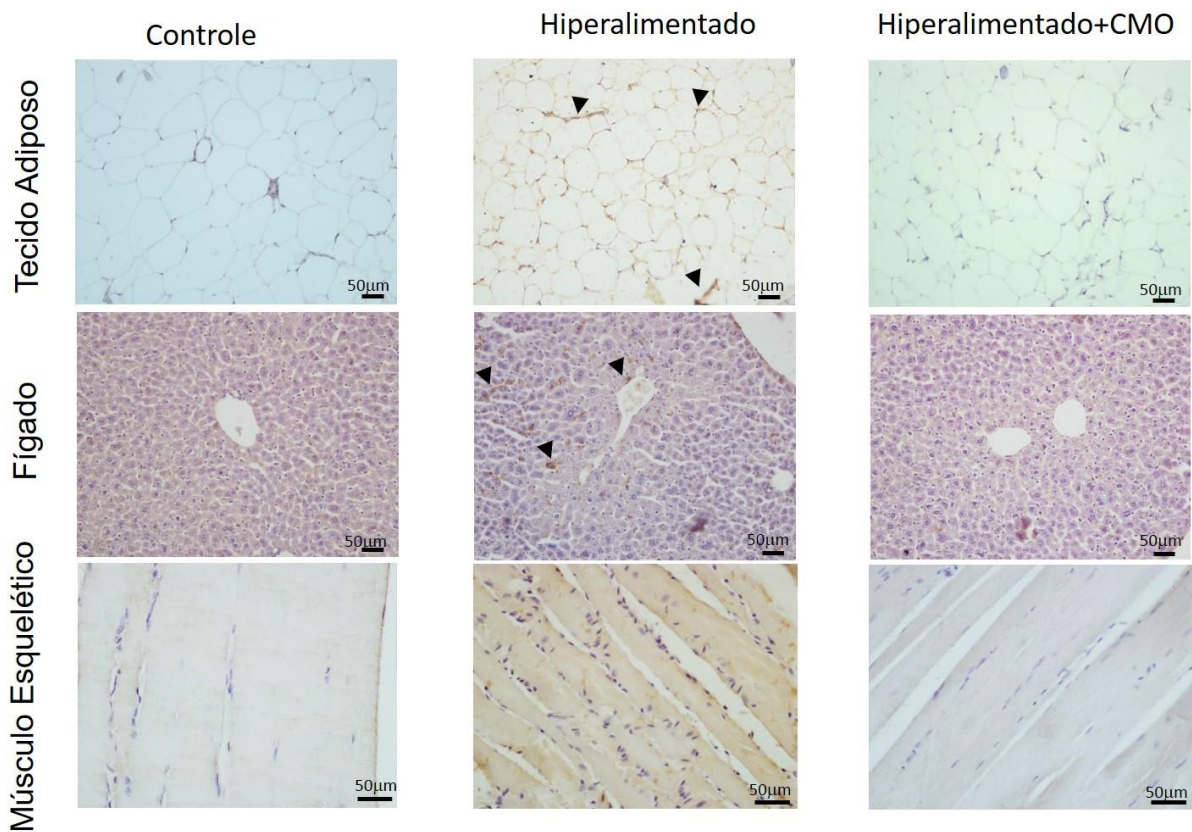
Fonte: A autora, 2020.

4.5 Imunohistoquímica para TNF- α

Para avaliarmos os efeitos decorrentes da obesidade e posterior à terapia, analisamos qualitativamente os órgãos periféricos como tecido adiposo, fígado e músculo. Observamos que os animais do grupo hiperalimentado apresentaram áreas demarcadas para citocina TNF- α no músculo, fígado e tecido adiposo (ponta de seta).

Por outro lado, os animais hiperalimentados ao receberem a terapia com CMO apresentaram aparente redução da marcação para a citocina pró-inflamatória TNF- α (Figura 19).

Figura 19 - Fotomicrografias de morfologia do tecido adiposo, músculo e pâncreas por imunomarcação de TNF- α .

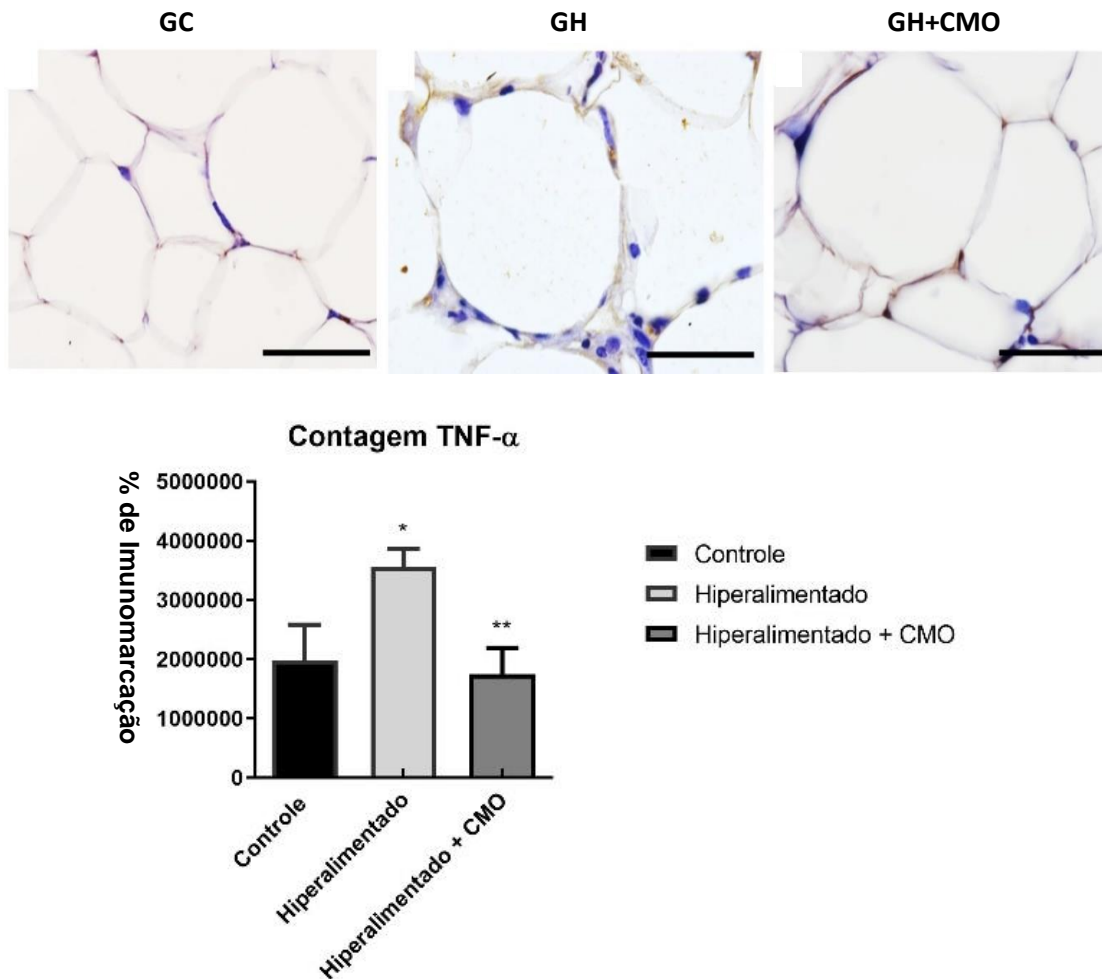


Legenda: Os animais do grupo hiperalimentado apresentam aparente marcação acastanhada para a citocina TNF- α (ponta de seta). Ao receberem a terapia com CMO, observamos redução da marcação. Objetiva de 40x.

Fonte: A autora, 2020.

Uma vez que o tecido adiposo é um dos órgãos chave na inflamação e desenvolvimento de resistência à insulina na obesidade, escolhemos o tecido adiposo para quantificar a porcentagem de área marcada para TNF- α . Por meio da quantificação, observamos maior porcentagem significativa de área marcada para a citocina nos animais hiperalimentados. Já os animais tratados apresentaram marcação semelhante aos animais do grupo controle (GC: $19,69 \pm 2,74$; GH: $35,49 \pm 3,15$; GH+CMO: $17,43 \pm 4,49$) (Figura 20).

Figura 20 – Fotomicrografias e quantificação de TNF- α no tecido adiposo



Legenda: Fotomicrografias do Grupo controle (GC) com tênue marcação, Grupo Hiperalimentado (GH) com marcação acastanhada e Grupo Hiperalimentado + CMO (GH+CMO), com marcações saúves similares ao controle para a citocina. Gráfico representativo da porcentagem de área marcada para molécula TNF- α nos três grupos. Objetiva de 100x.

Nota: Dados apresentados em média \pm EPM *P <0,05; **P <0,005. Analisado pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020.

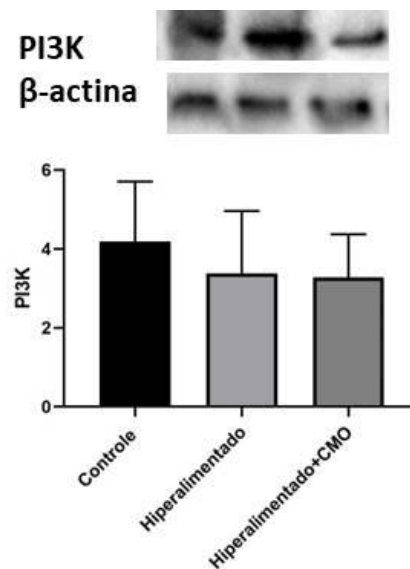
4.6 Sinalização intracelular da insulina no tecido adiposo

Da mesma maneira que notamos melhoria do quadro inflamatório no TAB, propusemos investigar se o mesmo se aplicaria para a sinalização de insulina. Para isso, realizamos análises de alguns marcadores envolvidos na via de sinalização de insulina no TAB.

4.7 Análise quantitativa de PI3K

Na quantificação por western blotting de PI3K no TAB observamos ausência de diferenças significativas na expressão de PI3K nos animais GH e GH+CMO em relação ao GC, ainda que o GH e GH+CMO apresentassem discreta diminuição da expressão da proteína (GC:4,189±0,6794; GH:3,383±0,7903; GH+CMO: 3,275±0,4909) (Figura 21).

Figura 21 – Gráfico representativo da expressão de PI3K no tecido adiposo



Legenda: Expressão de PI3K em extratos teciduais de tecido adiposo nos grupos experimentais, sem diferenças significativas aparentes entre os grupos.

Nota: Dados apresentados em média ± EPM. β-actina utilizada como controle interno. Analisado pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

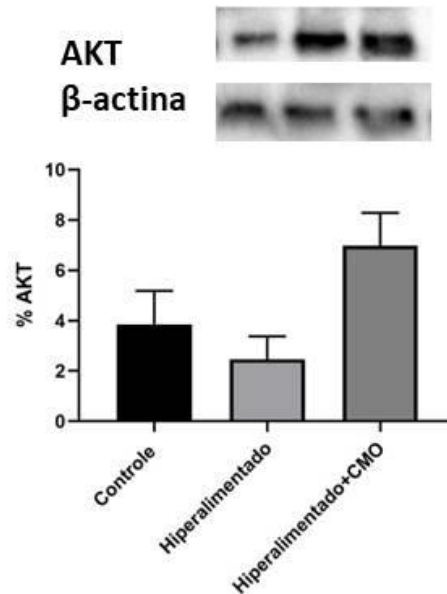
Fonte: A autora, 2020.

4.8 Análise quantitativa de AKT

Ao analisarmos a expressão de AKT notamos maior expressão da proteína no grupo GH+CMO relação ao grupo GH, ainda que não seja significativa. Além disso, o GH apresentou aparente redução da expressão de AKT em relação ao controle

embora não tenha sido estatisticamente significativa. (GC: $27,06 \pm 6,437$; GH: $11,07 \pm 2,168$; GH+CMO: $22,33 \pm 3,359$) (Figura 22).

Figura 22 - Gráfico representativo da expressão de AKT no tecido adiposo



Legenda: Expressão de AKT em extratos teciduais de tecido adiposo nos grupos experimentais. Na quantificação temos aparente expressão de AKT no grupo GH+CMO e redução de expressão no grupo GH, porém sem diferenças significativa.

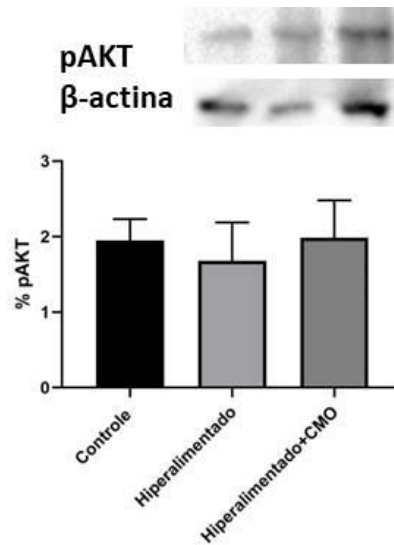
Nota: Dados apresentados em média \pm EPM. β -actina utilizada como controle interno. Analisado pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020

4.9 Análise quantitativa de pAKT

Em relação ao conteúdo de pAKT não notamos diferenças significativas na entre os grupos. (GC: $1,948 \pm 0,1641$; GH: $1,678 \pm 0,2952$; GH+CMO: $1,987 \pm 0,2862$) (Figura 23).

Figura 23 - Gráfico representativo da expressão de pAKT no tecido adiposo



Legenda: Expressão de pAKT em extratos teciduais de tecido adiposo nos grupos experimentais. Na quantificação não foram encontradas diferenças significativas.

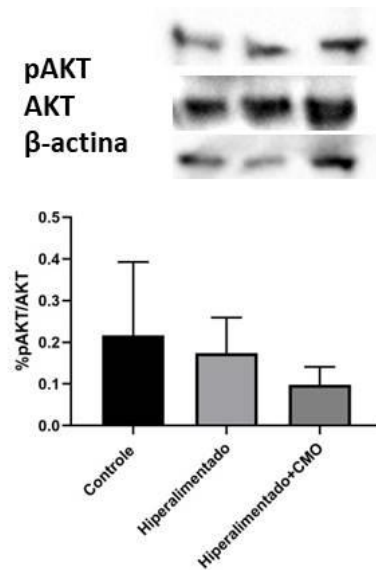
Nota: Dados apresentados em média \pm EPM. β -actina utilizada como controle interno. Analisado pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020.

4.10 Análise da razão entre pAKT/AKT

Ao realizarmos quantificação da razão entre pAKT/AKT não encontramos diferenças significativas entre os grupos analisados. Isto sugere que a terapia com CMO possivelmente não foi capaz de promover a melhoria da glicemia através da via PI3K/AKT de sinalização insulina (GC: $0,2163 \pm 0,1019$; GH: $0,1740 \pm 0,4259$; GH+CMO: $0,09750 \pm 0,2184$) (Figura 24).

Figura 24 - Razão pAKT/AKT em extratos teciduais de tecido adiposo



Legenda: Razão pAKT/AKT em extratos teciduais de tecido adiposo nos grupos experimentais. Na quantificação não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

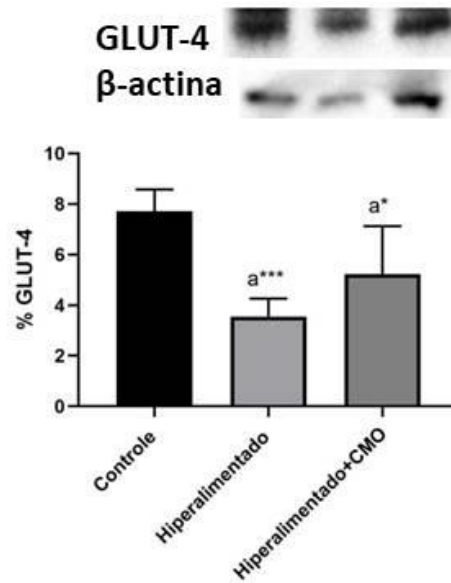
Nota: Dados apresentados em média ± EPM. β-actina utilizada como controle interno. Analisado pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020.

4.11 Análise quantitativa de GLUT4

Surpreendentemente, ao quantificarmos o transportador GLUT4, encontramos diferenças significativas. O grupo GH apresentou redução proeminente do transportador em relação ao controle (GC). Diferentemente, o grupo que recebeu a terapia (GH+CMO) apresentou melhoria significativa da expressão do transportador de glicose no TAB (GC: $7,724 \pm 0,3839$; GH: $3,553 \pm 0,3182$; GH+CMO: $5,233 \pm 0,8477$) (Figura 25).

Figura 25 - Gráfico representativo da expressão de GLUT-4 no tecido adiposo



Legenda: Expressão de GLUT4 em extratos teciduais de tecido adiposo nos grupos experimentais. Na quantificação foram encontradas diferenças significativas. O grupo GH apresentou redução proeminente do transportador GLUT em relação ao controle (GC) Em contrapartida, os animais que receberam a terapia obtiveram melhora na expressão do transportador.

Nota: Dados apresentados em média \pm EPM *P <0,05; ***P <0,0005. β -actina utilizada como controle interno. Analisado pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020.

5 DISCUSSÃO

A obesidade é uma das principais preocupações na saúde pública. Nesse contexto, com intuito de melhor compreender os fenômenos que envolvem a evolução dessa doença modelos de estudo em animais são empregados. O modelo de hiperalimentação durante a lactação com redução de ninhada é considerado de fácil aquisição e com custo mínimo. O ajuste da ninhada realizado no terceiro dia pós-natal foi capaz de ocasionar modificações metabólicas em camundongos adultos formando um grupo de animais com massa corporal superior em relação ao grupo controle. No estudo realizado anteriormente por Cunha A. C e colaboradores mostrou que a redução de ninhada nos primeiros dias pós-natais foi capaz de induzir maior ingestão alimentar dos ratos Wistar do grupo hiperalimentado em comparação aos animais do grupo controle. A redução de ninhada ocasiona modificações na composição do leite da nutriz promovendo maior produção de triglicerídeos e decréscimo na produção de proteínas (DE SOUZA RODRIGUES CUNHA *et al.*, 2009; PLAGEMANN *et al.*, 1992). Estudos epidemiológicos também já demonstraram que alterações nutricionais e hormonais nos períodos críticos do desenvolvimento podem levar ao desenvolvimento ao quadro de obesidade na vida adulta. Mudanças no microambiente durante os primeiros dias pós-natais também levar a complicações. Ninhadas de camundongos contendo menos filhotes tornam-se hiperfágicos e por esta razão apresentam maior ganho peso, hiperinsulinemia e hiperglicemia na fase adulta (DE SOUZA RODRIGUES CUNHA *et al.*, 2009; HARDER *et al.*, 1999). A adoção do estilo de vida ocidental, provida do consumo excessivo de uma dieta altamente calórica e pobre em nutrientes contribuem para aumento em níveis alarmantes das taxas de sobrepeso, dado que essas mudanças afetam o desenvolvimento, resultando na susceptibilidade ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos (KAYSER *et al.*, 2015).

A massa corporal ao final do tratamento apresentou relação significativamente maior nos animais GH e GH+CMO em relação ao grupo controle (GC). Isto sugere que a terapia com CMO não foi capaz de promover redução na massa corporal. Além disso, não encontramos diferenças substanciais no comprimento naso-anal em nenhum dos grupos analisados (Figura 10A). Isto demonstra que não há relação entre o ganho de massa corporal dos animais e seu comprimento. Contudo, os resultados de gordura epididimal reforçam o acúmulo de tecido adiposo, sugerindo o quadro de obesidade nos animais do grupo hiperalimentado (GH). Nos animais que receberam

a terapia (GH+CMO) ainda encontramos elevados valores significativos, o que mostra que mesmo após a infusão das CMO não houve diminuição da adiposidade epididimária nos animais. O cálculo do índice de Lee confirmou que não houve diferença entre os grupos hiperalimentados que receberam ou não a terapia com CMO. Portanto, a terapia não foi capaz de reduzir a massa corporal, o que já era esperado. De maneira semelhante ao utilizado em humanos com IMC, o índice de Lee é um parâmetro que permite diagnosticar o estabelecimento do quadro obesogênico em roedores (DE OLIVEIRA, G. P. *et al.*, 2014; ROGERS; WEBB, 1980; THOLE *et al.*, 2012)

Em relação a glicemia dosada anteriormente a terapia, o grupo hiperalimentado (GH) exibiu curva acentuada no TITG 30 minutos após administração da glicose, como demonstrado no gráfico da curva glicêmica correspondendo ao que já é visto na literatura (THOLE *et al.*, 2012). Porém ao serem submetidos a terapia com CMO, os animais hiperalimentados apresentaram melhoria substancial da glicemia em 10 dias, como observado no gráfico da área sob a curva, com valores similares aos animais GC. Estes resultados são semelhantes aos da literatura, como Hao e colaboradores (2013) utilizando a terapia com células mesenquimais provenientes da medula óssea, demonstraram a redução da glicemia e hiperinsulinemia em ratos diabéticos, assim como restabelecimento da normoglicemia após múltiplas infusões destas células. Outro estudo recente também demonstrou resultados similares de normoglicemia e perfil imunomodulador em camundongos submetidos ao modelo de diabetes tipo 1 (YAOCHITE *et al.*, 2016). Embora não esteja completamente elucidado se os índices glicêmicos permaneceriam próximos a normalidade após os 10 dias da terapia. Nosso estudo foi o primeiro utilizando a terapia com CMO em animais submetidos ao modelo de hiperalimentação durante a lactação na lactação. Este modelo seria outra abordagem interessante no contexto da Terapia Celular, uma vez que temos resultados publicados explorando o potencial de outras fontes de células mesenquimais, como as provenientes do tecido adiposo e também da medula em outros modelos de doenças (DE ANDRADE *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2018; LIRA *et al.*, 2017).

De forma contrária, os animais GH permaneceram com hiperglicemia quando comparados ao grupo controle. Estes achados sugerem um quadro inicial de desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2. De maneira similar, o aumento da insulina no grupo hiperalimentado poderia ser em virtude da produção e secreção de

insulina pelas células β -pancreáticas de maneira compensatória em resposta aos elevados níveis glicêmicos. A insulina é um importante mediador nos processos metabólicos e na obesidade, a desregulação nos seus receptores está relacionada a resistência à insulina o que leva a prejuízos à captação da glicose nos tecidos periféricos e de produção de energia (DE SOUZA RODRIGUES CUNHA *et al.*, 2009; FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015; KANTER; HSU; BORNFELDT, 2020).

O índice de HOMA é um teste matemático que permite mensurar o grau de resistência à insulina e eficácia da produção deste hormônio. No resultado de HOMA-IR, os animais GH apresentaram significativo grau de resistência em comparação aos animais GC. Em contrapartida, os animais GH+CMO apresentaram redução significativa em relação grupo GH. Evidências experimentais relacionam a RI ao estabelecimento do quadro de diabetes do tipo 2 e a inflamação crônica de baixa intensidade tem sido apontada como um dos fatores atuantes na patologia do diabetes. A participação de adipocinas pró-inflamatórias secretadas pelo TAB como IL-6 e TNF- α parecem interferir na sensibilidade à insulina (HAO *et al.*, 2013). É sabido que as células-tronco, em especial as células-tronco adultas que povoam a medula óssea são capazes que secretar um painel de fatores imunomoduladores que atenuariam a inflamação, assim, estimulando o reparo tecidual (DE CASTRO *et al.*, 2019; SIPPEL *et al.*, 2015). De forma similar, os resultados do índice de HOMA- β , corroboram com os achados de HOMA-IR, os animais GH+CMO apresentaram significativa eficiência nas células- β ao passo que os o grupo GH permaneceram com eficiência prejudicada.

No colesterol total não encontramos diferenças significativas entre os grupos, ainda que no colesterol total do GH+CMO tenha apresentado discreta redução desse níveis pós-terapia em relação aos animais GH. Já os triglicerídeos dos animais que receberam a terapia (GH+CMO) apresentaram significativa melhoria destes parâmetros. A dislipidemia é um dos fatores de risco para desenvolvimento de aterosclerose, fenômeno comum em indivíduos portadores da obesidade e/ou diabetes em que há elevação dos níveis de colesterol LDL e triglicerídeos (DA CUNHA DE SÁ *et al.*, 2020).

Quanto aos resultados de quantificação para marcação da citocina TNF- α nos tecidos periféricos, embora não tenha sido quantificado, as avaliações qualitativas das lâminas histológicas o grupo GH apresentou aparente marcações nos cordões de

hepatócitos no fígado, músculo e tecido adiposo comparado ao GC. Uma vez os animais submetidos a terapia com CMO vemos padrão de marcação de GH+CMO aparentemente tênue, similar aos animais GC. Por isso, sugerimos futuras análises para confirmar os resultados observados no músculo e fígado.

Devido as participações do TAB na inflamação e progressão da RI, realizamos a quantificação para citocina TNF- α , e nossos resultados demonstraram que os animais GH apresentaram acentuada marcação para a citocina. Isto reitera a presença do perfil inflamatório de baixa intensidade, muito comum na obesidade. Os animais submetidos à terapia apresentaram significativa redução da marcação da citocina. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória de baixo peso molecular. Na literatura, o aumento desta citocina está relacionado à redução da produção de adiponectina pelos adipócitos. A adiponectina é conhecida por exercer efeitos anti-inflamatórios sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , INF- γ , IL-10, além do recrutamento de macrófagos, perpetuando a inflamação (SIPPEL *et al.*, 2015). Uma possível explicação para os resultados encontrados, seria o próprio mecanismo imunomodulador presente na células-tronco adultas, seja por interações célula-célula ou por mecanismos parácrinos. Evidências científicas também apontam que uma das participações mediadas pelas células mesenquimais presentes no pool de células da medula, seria interação com linfócitos-T reguladores e mudanças do fenótipo M1(pró-inflamatório) para M2 (anti-inflamatório) em macrófagos (DE CASTRO *et al.*, 2019; EL HUSSENY *et al.*, 2017).

Nas análises quantitativas da via de sinalização de insulina no tecido adiposo não encontramos diferenças significativas no conteúdo de PI3K, AKT, pAKT e razão pAKT/AKT nos animais GH+CMO e GH em relação ao grupo controle. Interessantemente, nossos resultados quantitativos de GLUT4 mostraram melhoria substancial no conteúdo do transportador dos animais que receberam a terapia (GH+CMO) comparados aos animais GH, que permaneceram com expressão reduzida do transportador. Diante destes achados, sugerimos que a terapia também poderia exercer efeitos benéficos de restauração normoglicêmica através de outra via que não a PKB/AKT. Na literatura, trabalhos relacionam a melhoria da glicemia em virtude da via AKT, já que a inflamação gerada por TNF- α parece interferir na fosforilação via insulina (BASUKALA *et al.*, 2018; SIPPEL *et al.*, 2015). Contudo, sabemos que os mecanismos que regem a externalização dos GLUTs ainda não estão completamente elucidados, uma vez que envolvem outras vias paralelas divergentes

a AKT. Por exemplo, a CAP/Cbl/TC-10 que após diversas fosforilações e recrutamento de proteínas adaptadoras, ativa TC-10 ativando-a e permitindo a translocação de GLUT4 de forma complementar à via de PI3K/AKT (CHIANG *et al.*, 2001; FERRANNINI; DEFRONZO, 2015).

Outros autores também mostram que o estresse oxidativo parece prejudicar a formação dos transportadores de glicose na RI. Por exemplo, um estudo que mostrou que homens submetidos à dieta hipercalórica apresentaram elevado estresse oxidativo (marcação para 8-iso-PGF2a), no tecido adiposo em biópsias coletadas de urina. Os autores deste trabalho sugerem que na RI o GLUT4 passaria por modificações pós-translacionais, denominadas de carbonilação que levariam a alterações conformacionais gerando perda de função do transportador (BODEN *et al.*, 2015). Com isto, nosso trabalho foi o primeiro analisando a via de sinalização de insulina por meio do modelo de hiperalimentação na lactação, o que contribui consideravelmente para os estudos envolvendo terapia utilizando células de medula óssea em modelos animais submetidos a obesidade. Não menos importante, sugerimos futuras investigações que busquem aprofundar o conhecimento em torno da terapia com CMO na normalização da glicemia no modelo de hiperalimentação durante a lactação.

CONCLUSÃO

Portanto, podemos concluir que a terapia com células de medula óssea em camundongos *Swiss* machos obteve êxito na melhoria da insulinemia, glicemia, perfil inflamatório, assim como na expressão do transportador de glicose em uma única dose.

Isto demonstra que as CMO apresentam possível potencial terapêutico frente a doenças metabólicas como à resistência à insulina auxiliando na elaboração de futuras abordagens terapêuticas na medicina regenerativa.

REFERÊNCIAS

- ANTONIANI, C.; ROMANO, O.; MICCIO, A. Concise Review: Epigenetic Regulation of Hematopoiesis: Biological Insights and Therapeutic Applications. *Stem Cells Transl Med*, v. 6, n. 12, p. 2106–2114, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29080249>>.
- ARRIGHI, N. *Stem Cells - ISTE*. 1st. ed. [S.l.]: Elsevier, 2018. Disponível em: <<http://www.iste.co.uk/book.php?id=1307>>.
- ASADA, N.; TAKEISHI, S.; FRENETTE, P. S. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Int J Hematol*, v. 106, n. 1, p. 45–54, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28534115>>.
- BAI, L. *et al.* Therapeutic Potential of Ginsenosides as an Adjuvant Treatment for Diabetes. *Front Pharmacol*, v. 9, p. 423, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29765322>>.
- BASUKALA, P. *et al.* Determination of Insulin Resistance and Beta-Cell Function Using Homeostatic Model Assessment in Type 2 Diabetic Patients at Diagnosis. *J Diabetes Metab*, v. 9, p. 790, 2018. Disponível em: <<http://www.dtu.ox.ac.uk/>>.
- BEREBICHEZ-FRIDMAN, R.; MONTERO-OLVERA, P. R. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells State-of-the-art review. v. 18, n. 3, p. 264–277, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6307657/pdf/squmj1808-e264-277.pdf/>>.
- BODEN, G. *et al.* Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, GLUT4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men. *Sci Transl Med.*, v. 7, n. 304, p. 304re7, 2015. Disponível em: <www.ScienceTranslationalMedicine.org>.
- BONFANTE, I. L. P. *et al.* Novos achados relacionados ao tecido adiposo: Uma revisão de browning e irisina. *Revista Arquivos de Ciências da Saúde*, v. 22, n. 2, p. 9, 13 jul. 2015. Disponível em: <<https://www.cienciasdaude.famerp.br/index.php/racs/article/view/135>>.
- BRBORIC, A. *et al.* Characterization of neural crest-derived stem cells isolated from human bone marrow for improvement of transplanted islet function. *Upsala Journal of Medical Sciences*, v. 124, n. 4, p. 228–237, 2 out. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31623497/>>.
- CALVI, L. M.; LINK, D. C. *The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease*. *Blood*. 26 nov. 2015 American Society of Hematology. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4661168/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4661168/?report=abstract)>.
- CECCARIGLIA, S. *et al.* Autophagy: a potential key contributor to the therapeutic action of mesenchymal stem cells. *Autophagy*, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31185790>>.
- CHIANG, S. H. *et al.* Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*, v. 410, n. 6831, p. 944–948, 19 abr. 2001.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11309621/>>.

DA CUNHA DE SÁ, R. D. C. *et al.* Fish oil reverses metabolic syndrome, adipocyte dysfunction, and altered adipokines secretion triggered by high-fat diet-induced obesity. *Physiological Reports*, v. 8, n. 4, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32109344/>>.

DE ANDRADE, D. C. *et al.* Bone marrow mononuclear cell transplantation improves mitochondrial bioenergetics in the liver of cholestatic rats. *Experimental Cell Research*, v. 336, n. 1, p. 15–22, 12 ago. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482715001718/>>.

DE CASTRO, L. L. *et al.* Current understanding of the immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells. *Journal of Molecular Medicine*, v. 97, n. 5, p. 605–618, 22 maio 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00109-019-01776-y/>>.

DE OLIVEIRA, G. P. *et al.* Impaired mitochondrial function and reduced viability in bone marrow cells of obese mice. *Cell and Tissue Research*, v. 357, n. 1, p. 185–194, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24744266/>>.

DE SOUZA RODRIGUES CUNHA, A. C. *et al.* Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion - the role of GLUT-2. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 20, n. 6, p. 435–442, 1 jun. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955286308001101?via%3Dihub/>>.

DIAS, I. *et al.* Neonatal overfeeding impairs differentiation potential of mice subcutaneous adipose mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 14, n. 4, p. 535–545, 17 ago. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12015-018-9812-2>>.

DO PRADO, W. L. *et al.* Obesity and inflammatory adipokines: Practical implications for exercise prescription. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 15, n. 5, p. 378–383, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922009000600012&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606/>>.

EL HUSSENY, M. W. A. *et al.* Adipokines: Potential Therapeutic Targets for Vascular Dysfunction in Type II Diabetes Mellitus and Obesity. *Journal of Diabetes Research*. 2017. Hindawi Limited. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2017/1234567>>.

ENGIN, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. In: ENGIN, A. B.; ENGIN, A. (Org.). *Obesity and Lipotoxicity*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 1–17. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_1>.

ESTRADA, E. J. *et al.* Combination treatment of autologous bone marrow stem cell transplantation and hyperbaric oxygen therapy for type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled trial. *Cell Transplantation*, v. 28, n. 12, p. 1632–1640, 1 dez.

2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31665912/>>.

ESTRELA, C. *et al.* Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*, v. 22, n. 2, p. 91–98, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537580>>.

FERRANNINI, E.; DEFRONZO, R. A. Insulin actions *in vivo*: glucose metabolism. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 211-233. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9781118387658.ch14/>>.

FRANCISQUETI, F. V. [UNESP]; NASCIMENTO, A. F. DO; CORRÊA, C. R. [UNESP]. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. *Currículo Lattes*, p. 81–89, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/141079>>.

FRUCTUOSO, M. *et al.* Increased levels of inflammatory plasma markers and obesity risk in a mouse model of Down syndrome. *Free Radic Biol Med*, v. 114, p. 122–130, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28958596>>.

FRUH, S. M. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, v. 29, n. S1, p. S3–S14, 1 out. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29024553/>>.

GHOBRIAL, I. M. *et al.* The bone-marrow niche in MDS and MGUS: implications for AML and MM. *Nat Rev Clin Oncol*, v. 15, n. 4, p. 219–233, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29311715>>.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P. *et al.* Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, n. 1, p. 17034, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>>.

GOOSSENS, G. H. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obesity Facts*, v. 10, n. 3, p. 207–215, 1 jul. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28564650/>>.

GUIDO, I. *et al.* Age and Multimorbidity Predict Death Among COVID-19 Patients. *Hypertension*, v. 76, n. 2, p. 366–372, 1 ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15324>>.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*, v. 220, n. 2, p. T1–T23, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24281010>>.

GUO, X. J. *et al.* Efficacy of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus: An Updated Meta-Analysis. *Diabetes Therapy*, v. 10, n. 2, p. 535–547, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30725399/>>.

HAO, H. *et al.* Multiple intravenous infusions of bone marrow mesenchymal stem cells reverse hyperglycemia in experimental type 2 diabetes rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 436, n. 3, p. 418–423, 5 jul. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X13009352/>>.

HARDER, T. *et al.* Overweight and increased diabetes susceptibility in neonatally insulin-treated adult rats. *Endocr Regul.*, v. 33, n. 1, p. 25–31, 1999. Disponível em:

<<https://www.sav.sk/journals/endo/full/er0199d.pdf/>>

Hematopoyesis Histología y biología celular. Disponível em:

<<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1502§ionid=94735038>>.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7678183/>>.

JIANG, W.; XU, J. *Immune modulation by mesenchymal stem cells*. *Cell Proliferation*. 1 Jan 2020. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cpr.12712>>.

KAMMOUN, H. L.; KRAAKMAN, M. J.; FEBBRAIO, M. A. Adipose tissue inflammation in glucose metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 15, n. 1 LB-Kammoun2014, p. 31–44, 2014. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1007/s11154-013-9274-4>>.

KANG, S. H. *et al.* Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Liver Disease: Present and Perspectives. *Gut Liver*, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31581387>>.

KANTER, J. E.; HSU, C.-C.; BORNFELDT, K. E. Monocytes and Macrophages as Protagonists in Vascular Complications of Diabetes. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 7, 14 fev. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32118048/>>.

KAYSER, B. D. *et al.* Temporal relationships between adipocytokines and diabetes risk in Hispanic adolescents with obesity. *Obesity*, v. 23, n. 7, p. 1479–1485, 1 jul. 2015. Disponível em: <http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms>.

LAZZARI, E.; BUTLER, J. M. The Instructive Role of the Bone Marrow Niche in Aging and Leukemia. *Current Stem Cell Reports*, v. 4, n. 4 LB-Lazzari2018, p. 291–298, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40778-018-0143-7>>.

LE, P. T.-B. *et al.* A type 2 diabetes mellitus patient was successfully treated by autologous bone marrow-derived stem cell transplantation: A case report. *Biomedical Research and Therapy*, v. 6, n. 1, p. 2966–2969, 27 jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.15419/bmrat.v6i1.516>>. Acesso em: 1 fev. 2021.

LIONETTI, L. *et al.* Differential effects of high-fish oil and high-lard diets on cells and cytokines involved in the inflammatory process in rat insulin-sensitive tissues. *Int J Mol Sci*, v. 15, n. 2, p. 3040–3063, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24562331>>.

LIRA, R. *et al.* Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves renal function and Na. *Cell Tissue Res*, v. 369, n. 2, p. 287–301, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28374150>>.

LIZCANO, J. M.; ALESSI, D. R. *The insulin signalling pathway*. *Current Biology*. 2 abr. 2002. Cell Press. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11937037/>>.

LUONG, Q.; HUANG, J.; LEE, K. Y. Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. *Biology (Basel)*, v. 8, n. 2, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30978929>>.

MARTINS, F. S. M. Mecanismos de ação da insulina. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016. 13 p. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wp-content/uploads/2016/07/mecanismo_a%C3%A7ao_insulinaSavio.pdf/>.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016. 13 p. MARZZOCO, A.; BAPTISTA TORRES, B. *Bioquímica Básica*. 2015. Disponível em: <https://www.grupogen.com.br/bioquimica-basica?gclid=Cj0KCQiA6t6ABhDMARIsAONIYywuLadzlpYTdo98Mv5eVulF3_t5yCVRNPneWXTKQ9JTPFSUD_OstR8aAkJUEALw_wcB>.

MATTHEWS, D. R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, v. 28, n. 7, p. 412–419, jul. 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3899825/>>.

MERINO-GONZÁLEZ, C. *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Angiogenesis: Potencial Clinical Application. *Front Physiol*, v. 7, p. 24, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26903875>>.

MOHAMED, M. T. *et al.* Effects of exercise in combination with autologous bone marrow stem cell transplantation for patients with type 1 diabetes. *Physiotherapy Theory and Practice*, v. 35, n. 12, p. 1233–1242, 2 dez. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29775119/>>. Acesso em: 2 fev. 2021.

MORTADA, I.; MORTADA, R. Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation. *Eur J Med Genet.*, v. 61, n. 2, p. 114–118, 2018.

NIU, H.; CANCELAS, J. A. Twisting the bone marrow stem cell niche. *Haematologica*, v. 103, n. 12, p. 1937–1939, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31013470>>.

OH, J. E. *et al.* Direct differentiation of bone marrow mononucleated cells into insulin producing cells using pancreatic β -cell-derived components. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30926860/>>.

OLIVEIRA, M. *et al.* Bone marrow mononuclear cell transplantation rescues the glomerular filtration barrier and epithelial cellular junctions in a renovascular hypertension model. *Experimental Physiology*, v. 104, n. 5, p. 740–754, 12 maio 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/EP087330>>.

PITTENGER, M. F. *et al.* Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regenerative Medicine*, v. 4, n. 1, p. 22, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>>.

PITTENGER, M. F. *et al.* Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regenerative Medicine*, v. 4, p. 22, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>>.

- PLAGEMANN, A. *et al.* Obesity and Enhanced Diabetes and Cardiovascular Risk in Adult Rats due to Early Postnatal Overfeeding. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, v. 99, n. 3, p. 154–158, 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1526266/>>. Acesso em: 1 fev. 2021.
- RAMAKRISHNAN, V. M.; BOYD, N. L. *The Adipose Stromal Vascular Fraction as a Complex Cellular Source for Tissue Engineering Applications. Tissue Engineering - Part B: Reviews*. 1 ago. 2018. Mary Ann Liebert Inc. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/>>.
- ROGERS, P.; WEBB, G. P. Estimation of body fat in normal and obese mice. *British Journal of Nutrition*, v. 43, n. 1, p. 83–86, jan. 1980. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7370219/>>.
- ROPELLE, E. R., PAULI, J. R., & CARVALHEIRA, J. B. C. Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica. *Revista de Educação Física. UNESP*, v. 11, n. (1), p. 49–55, 2007.
- SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. *Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. Cell*. [S.l.]: Cell. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22385956/>>. Acesso em: 1 fev. 2021a. , 2 mar. 2012
- SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. *Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. Cell*. 2 mar. 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22385956/>>.
- SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. *Insulin sensitivity: Modulation by nutrients and inflammation. Journal of Clinical Investigation*. 2 set. 2008. J Clin Invest. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18769626/>>.
- SHANG, W. *et al.* Ginsenoside Rb1 stimulates glucose uptake through insulin-like signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol*, v. 198, n. 3, p. 561–569, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550785>>.
- SIPPEL, C. A. *et al.* PROCESSOS INFLAMATÓRIOS DA OBESIDADE. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde - USCS*, v. 12, n. 42, p. 48–56, 26 jan. 2015. Disponível em: <https://seer.uscs.edu.br/index.php/revista_ciencias_saude/article/view/2310>.
- SMITH, J. N. P.; CALVI, L. M. *Concise review: Current concepts in bone marrow microenvironmental regulation of hematopoietic stem and progenitor cells. Stem Cells*. jun. 2013. Stem Cells. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23509002/>>.
- SOUSA LACERDA, M. *et al.* Tecido adiposo, uma nova visão: as adipocinas e seu papel endócrino. *Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos*. 16 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.fmc.br/ojs/index.php/RCFMC/article/view/6>>
- SZADE, K. *et al.* Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxid Redox Signal*, v. 29, n. 2, p. 191–204, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29113449>>.
- THOLE, A. A. *et al.* Progenitor cells and TNF-alpha involvement during morphological changes in pancreatic islets of obese mice. *Tissue and Cell*, v. 44, n. 4, p. 238–248,

2012. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22537687/>>.

THORÉN, L. A. *et al.* Kit Regulates Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells. *The Journal of Immunology*, v. 180, n. 4, p. 2045–2053, 15 fev. 2008.

Disponible em:

<<http://www.jimmunol.org/content/180/4/2045><http://www.jimmunol.org/content/180/4/2045.full#ref-list-1>>.

TRUBIANI, O. *et al.* Periodontal Ligament Stem Cells: Current Knowledge and Future Perspectives. *Stem Cells Dev*, v. 28, n. 15, p. 995–1003, 2019. Disponible em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31017047>>.

TZENG, Y. S. *et al.* Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood*, v. 117, n. 2, p. 429–439, 13 jan. 2011.

Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20833981/>>.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. *Tumor necrosis factor signaling.*

Cell Death and Differentiation. 1 jan 2003: Nature Publishing Group. Disponible em:

<www.nature.com/cdd>.

WANG, .; LENG, Y.; GONG, Y. Bone Marrow Fat and Hematopoiesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 9, p. 694, 2018. Disponible em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30546345/>>.

WEHBE, T. *et al.* Mesenchymal stem cell therapy for refractory scleroderma: A report of 2 cases. *Stem Cell Investigation*, v. 2016, n. SEP, 1 set. 2016. Disponible em:

<[/pmc/articles/PMC5067369/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31017047)>.

WU, J. *et al.* The Differentiation Balance of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Is Crucial to Hematopoiesis. *Stem Cells International*, v. 2018, p. 13, 2018. Disponible em: <<https://doi.org/10.1155/2018/1540148>>.

YAOCHITE, J. N. U. *et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells from patients with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus exhibit preserved in vitro and in vivo immunomodulatory properties. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 7, n. 1, 18 jan. 2016. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26781648/>>.

ZHAO, H. *et al.* Exosomes From Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose Inflammation and Obesity Through Polarizing M2 Macrophages and Beiging in White Adipose Tissue. *Diabetes*, v. 67, n. 2, p. 235–247. Disponible em:

<<https://diabetes.diabetesjournals.org/content/67/2/235/>>.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

ibrag Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação morfofuncional das células-tronco de medula óssea em modelo de obesidade e diabetes mellitus tipo 2", registrada com o nº 026/2018, sob a responsabilidade de Alessandra Alves Thole - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 24/05/2018.

| | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 24/05/2022 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo Suíço |
| Nº de animais | 56 |
| Peso/idade | 40-70 g / 0 – 90 dias |
| Sexo | Macho |
| Origem | Biotério setorial |

Rio de Janeiro, 24 de Maio de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ