



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Fábio Coelho das Neves

**Distribuição de componentes celulares, vasculares, e estromais na ilhota
pancreática humana em amostras de adultos jovens e idosos**

Rio de Janeiro

2024

Fábio Coelho das Neves

Distribuição de componentes celulares, vasculares, e estromais na ilhota pancreática humana em amostras de adultos jovens e idosos

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

Orientador Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N518 Neves, Fábio Coelho das.
Distribuição de componentes celulares, vasculares, e estromais na ilhota pancreática humana em amostras de adultos jovens e idosos / Fábio Coelho das Neves – 2024.
50f.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso

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

1. Ilhotas pancreáticas - Teses. 2. Matriz extracelular - Teses. 3. Sindecana-4. 4. Células estromais. I. Cardoso, Luiz Eduardo de Macedo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.39

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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



Assinatura

19 de maio de 2024

Data

Fábio Coelho das Neves

Distribuição de componentes celulares, vasculares, e estromais na ilhota pancreática humana em amostras de adultos jovens e idosos

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

Aprovada em 17 de abril de 2024.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Janice Mery Chicarino de Oliveira Coelho

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Luiza Bastos

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

A Deus por me dar vida e gozo de saúde para seguir em frente, a meus pais, meus filhos e minha amada esposa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus o grande criador do universo, que tornou cada dia possível com o sopro da vida.

A minha esposa Carla Leal por me apoiar e aturar por este momento tão importante na minha vida.

Aos meus pais Edvaldo Júlio Neves e Hosana Coelho das Neves, que com grande sabedoria sempre me incentivaram a estudar e romper as barreiras da vida.

Ao orientador Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso pela sua genialidade, sabedoria e paciência em todos os momentos meu reconhecimento e admiração pelo senhor.

Aos professores Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda e Prof.^a. Dr.^a. Márcia Barbosa Águila por compartilhar o conhecimento e serem os grandes incentivadores e criadores de novos pensadores para a nossa sociedade.

Ao Prof. Reginaldo Franklin, Médico Legista e Subdiretor do IML, por permitir meu acesso ao Instituto Médico-Legal Afrânio Peixoto (IMLAP-RJ), por compartilhar o seu conhecimento e colaborar diretamente com este projeto.

Aos amigos Dr.^a. Thatiany Marinho, Aline Penna e André Vianna que sempre está à disposição em ajudar e com os seus conhecimentos e domínio da área.

Aos Professores do BHEX Dr.^a. Sandra Barbosa, Dr.^a Vanessa Souza-Mello, Dr.^a Jemima Fuontes e Dr.^a Cristane Matsura, que me inspirou e agregou tantos valores na minha vida acadêmica, profissional e pessoal.

Aos amigos de turma do programa que compartilhamos tantas conquistas e nesta “maratona que é o mestrado”.

A Disciplina de Anatomia Patológica-AnatPat, em destaque a Prof. DR.^a. Janice Mery Coelho e Lilimar Rioja e Prof. Dra. Elyzabeth Avad Portari por tornar este projeto possível.

Aos amigos AnatPat e Disciplina de Histologia e Embriologia-DHE Ana Paula Pessanha e Ana Lucia, pela compreensão ajuda e companheirismo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço também a FAPERJ e ao CNPq, pelo suporte financeiro deste trabalho.

A melhor forma de revolta contra o sistema é o estudo.

Paulo Freire

RESUMO

NEVES, Fábio Coelho das. *Distribuição de componentes celulares, vasculares, e estromais na ilhota pancreática humana em amostras de adultos jovens e idosos*. 2024. 50f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

O envelhecimento da população está associado a alterações estruturais e metabólicas nas ilhotas pancreáticas, incluindo redução na massa e função das células beta, resultando em menor secreção de insulina e maior suscetibilidade à hiperglicemia. Além disso, a matriz extracelular que envolve as ilhotas pancreáticas também é afetada pelo envelhecimento, influenciando a interação celular e a integridade estrutural. O presente estudo envolve a análise histológica da ilhota pancreática utilizando vários marcadores imunológicos de células e estroma, e examinando separadamente três regiões anatômicas do pâncreas humano normal (cabeça, corpo e cauda). Como a faixa etária em que há maior prevalência do diabetes tipo 2 se situa entre 60 e 85 anos, estudamos amostras de idosos acima de 60 anos, usando como controle amostras de pâncreas de adultos jovens. Utilizamos anticorpos anti-insulina e anti-glucagon para analisar a massa de células, anticorpos anti-CD31 e anti-SMA para capilares e componentes do estroma, com os anticorpos anti-Perlecan e anti-Syndecan-4 e análise histoquímica com a coloração Picro-Sirius, para analisar fibras colágenas. O objetivo foi verificar as alterações na ilhota com o envelhecimento, e se estas poderiam ter relação com o diabetes. Nossos resultados indicam um aumento no acúmulo de colágeno ao redor das ilhotas em indivíduos idosos, possivelmente relacionado à perda de massa de células beta na região da cabeça do pâncreas. Observamos também uma redução na quantidade de Perlecan e Syndecan-4 nas ilhotas de idosos, o que pode estar ligado à manutenção das células beta. Além disso, constatamos uma diminuição na quantidade média de células beta em diferentes regiões do pâncreas em idosos, sugerindo uma possível disfunção na regulação da insulina com o avançar da idade.

Palavras-chave: ilhota pancreática; idoso; matriz extracelular; syndecan-4; perlecan; anti-CD31; anti-SMA; Picro Sirius; anti-Glucagon; anti-Insulina

ABSTRACT

NEVES, Fábio Coelho das. *Distribution of cellular, vascular and stromal components in the human pancreatic islet in samples from young and elderly adults*. 2024. 50f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Population aging is associated with alterations structural and metabolic in pancreatic islets, including a reduction in beta cell mass and function, resulting in decreased insulin secretion and increased susceptibility to hyperglycemia. Additionally, the extracellular matrix surrounding pancreatic islets is also affected by aging, influencing cellular interaction and structural integrity. The present study involves the histological analysis of the pancreatic islet using various cell and stroma immunological markers, and separately examining three anatomical regions of the normal human pancreas (head, body, and tail). As the age group with the highest prevalence of type 2 diabetes ranges from 60 to 85 years, we studied samples of elderly people over 60 years old, using pancreas samples from young adults as controls. We used anti-insulin and anti-glucagon antibodies to analyze cell mass, anti-CD31 and anti-SMA antibodies for capillaries and stromal components, with anti-Perlecan and anti-Syndecan-4 antibodies and histochemical analysis with Picro- Sirius, to analyze collagen fibers. The objective is to verify if there are changes in the islet with aging, and if these could be related to diabetes. Our findings indicate an increase in collagen accumulation around the islets in elderly individuals, possibly related to beta cell mass loss in the pancreatic head region. We also observed a reduction in the amount of Perlecan and Syndecan-4 in the islets of the elderly, which may be linked to beta cell maintenance. Furthermore, we noted a decrease in the average number of beta cells in different regions of the pancreas in the elderly, suggesting a potential dysfunction in insulin regulation with advancing age.

Keywords: pancreatic islet; elderly; extracellular matrix; syndecan-4; perlecan; anti-CD31; anti-SMA; picro Sirius; anti-Glucagon; anti-Insulin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Desenho esquemático da localização do pâncreas in situ.....	13
Figura 2 –	Desenho esquemático do pâncreas humano e a composição celular.....	14
Figura 3 –	Desenho esquemático da composição da matriz extracelular.....	15
Figura 4 –	Gráfico da evolução do Diabetes Mellitus tipo 2 em diferentes regiões do mundo.....	16
Figura 5 –	Desenho esquemático do pâncreas humano com as regiões anatômicas.	20
Figura 6 –	Foto da macroscopia de preservação do pâncreas humano	21
Figura 7 –	Fotomicrografia do padrão de preservação do pâncreas humano corado em HE.....	21
Figura 8 –	Fotomicrografia da técnica de Vermelho do Congo.....	23
Figura 9 –	Foto do pâncreas humano bem preservado usado no estudo.....	24
Figura 10-	Processador de tecidos LUPTEC PT2	25
Figura 11-	Captura das telas das três etapas da densidade de volume de células beta estimada para análise da imagem.....	29
Figura 12-	Fotomicrografia de ilhotas humanas de jovens e idosos corada por HE	32
Figura 13-	Fotomicrografia de ilhotas humanas coradas por Picro Sirius.....	34
Figura 14-	Fotomicrografia de ilhotas humanas de jovens e idosos marcadas por anticorpo anti-perlecan.....	35
Figura 15	Fotomicrografia de ilhotas humanas de jovens e idosos marcadas por anticorpo anti-syndecan-4.....	36
Figura 16-	Fotomicrografia do anticorpo anti-SMA das ilhotas de humanos jovens e idosos.....	37
Figura 17-	Fotomicrografia da ilhota pancreática marcada pelo anticorpo anti-CD31 de jovens e idosos.....	38
Figura 18-	Fotomicrografia de ilhotas pancreática humanas de jovens e idosos marcadas pelo anticorpo anti-insulina.....	38
Figura 19-	Fotomicrografia de ilhotas humanas de jovens e idosos marcadas pelo anticorpo anti-glucagon	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Amostras de pâncreas humano coletadas.....	30
Tabela 2 –	Lista dos anticorpos utilizados no estudo.....	30
Tabela 3 –	Diluições dos anticorpos realizadas em cada marcador imunológicos	30
Tabela 4 –	Quantidade relativa de componentes da ilhota pancreática nas duas faixas etárias.....	31
Tabela 5 –	Comparação da quantidade relativa de componentes da ilhota pancreática entre as diferentes regiões anatômicas do pâncreas.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HE	Hematoxilina e Eosina
PS	Picro Sirius
VC	Vermelho Congo
DAB	Diaminobenzidina
RGB	Red, Green and Blue
BW	Black and White
IML	Instituto Médico Legal
TBS	Solução Salina Tamponada com Tris
SMA	Alfactina de Músculo Liso
NDB	Não Diabético
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
BCM	Massa de Células Beta
CV	Coefficiente de Variação
IAPP	Islet Amyloid Polypeptide, ou amylin
MEC	Matriz Extracelular
IMC	Índice de Massa Corporal

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
α	Alfa
μm	Micrômetro
mg/dl	miligramas por decilitro
δ	Delta

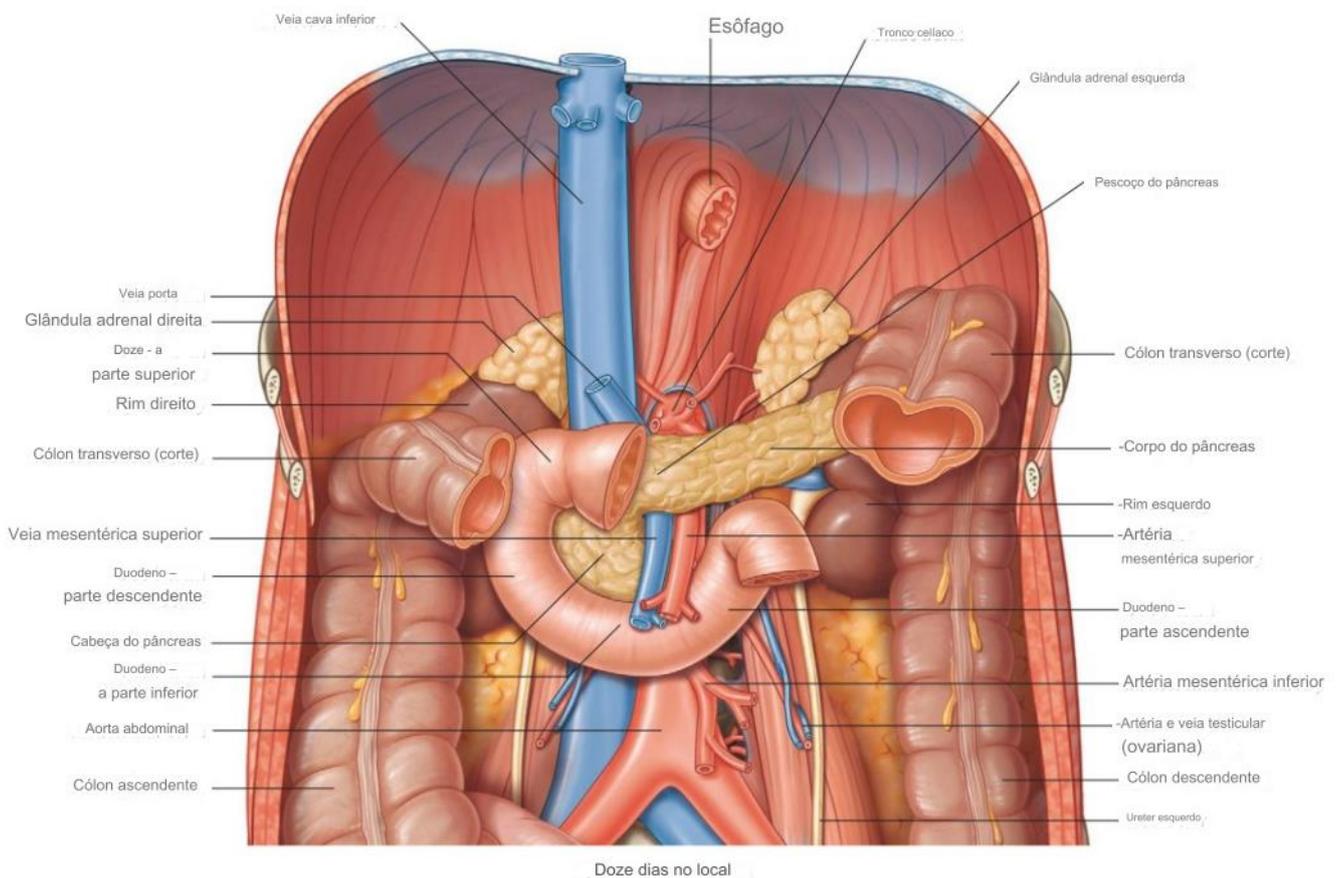
SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	18
1.1	Geral	18
1.2	Específicos	18
2	MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1	Obtenção das amostras de pâncreas humano	19
2.2	Critério de exclusão e coleta	21
2.2.1	<u>Critério de exclusão 1</u>	22
2.2.2	<u>Critério de exclusão 2</u>	22
2.3	Coleta das amostras	23
2.4	Processamento histológico	24
2.5	Método de coloração Hematoxilina-Eosina (HE)	25
2.6	Coloração de Picro-Sirius ou Sirius-Red. (PS)	25
2.7	Coloração de Vermelho do Congo	26
2.8	Imunohistoquímica	27
2.9	Morfometria	27
2.10	Análises estatísticas	29
3	TABELAS	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Preservação e reatividade do material	33
4.2	Componente da matriz extracelular, fibrose da ilhota pancreática	33
4.2.1	<u>Proteoglicanos da matriz extracelular</u>	34
4.3	Fatores da microvascularização da ilhota	36
4.4	Densidade de células alfa e beta na ilhota	38
5	DISCUSSÃO	40
	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45
	ANEXO A - Termo de anuência	49
	ANEXO B – Comitê de ética humano CEP	50

INTRODUÇÃO

O pâncreas humano é uma glândula mista com funções exócrinas e endócrinas essenciais para a homeostase metabólica do organismo. Anatomicamente situado na cavidade abdominal superior e anterior, entre o duodeno, baço, veia cava inferior e aorta abdominal (Drake, 2023), o pâncreas consiste em células ductais que formam os ductos pancreáticos e células acinares que compõem a maioria da glândula exócrina (Efrat & Russ, 2012).

Figura 1 - Desenho esquemático da localização do pâncreas humano in situ



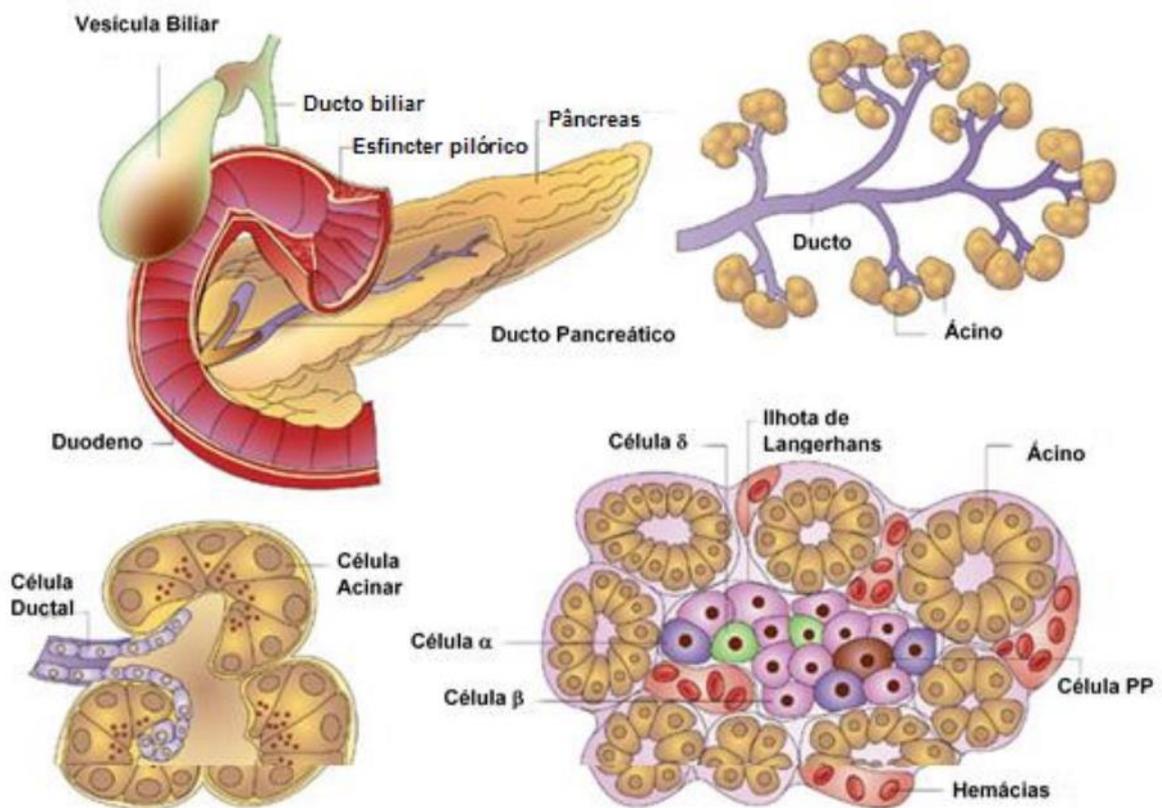
Legendas: Esquema anatômico do corpo humano que demonstra que o pâncreas se localiza no abdômen, atrás do estômago e entre o duodeno e o baço.

Fonte: Adaptado de (Drake, 2023).

A função endócrina do pâncreas é realizada pelas ilhotas pancreáticas, também conhecidas como ilhotas de Langerhans, que abrigam uma variedade de células, incluindo células β (Beta) secretoras de insulina, células α (Alfa) secretoras de glucagon, células PP secretoras de (Polipeptídeo Pancreático) e células δ (Delta) secretoras de somatostatina (figura

2) (Efrat & Russ, 2012). A função dessas células é crucial para a regulação da glicemia, mantendo-a dentro de limites fisiológicos adequados.

Figura 2 - Desenho esquemático demonstrando o pâncreas humano e a composição celular



Legendas: Desenho esquemático do pâncreas humano, mostrado as ligações com outros órgãos e a composição histológica do tecido pancreático.

Fonte: Adaptado de Efrat e Russ, 2012

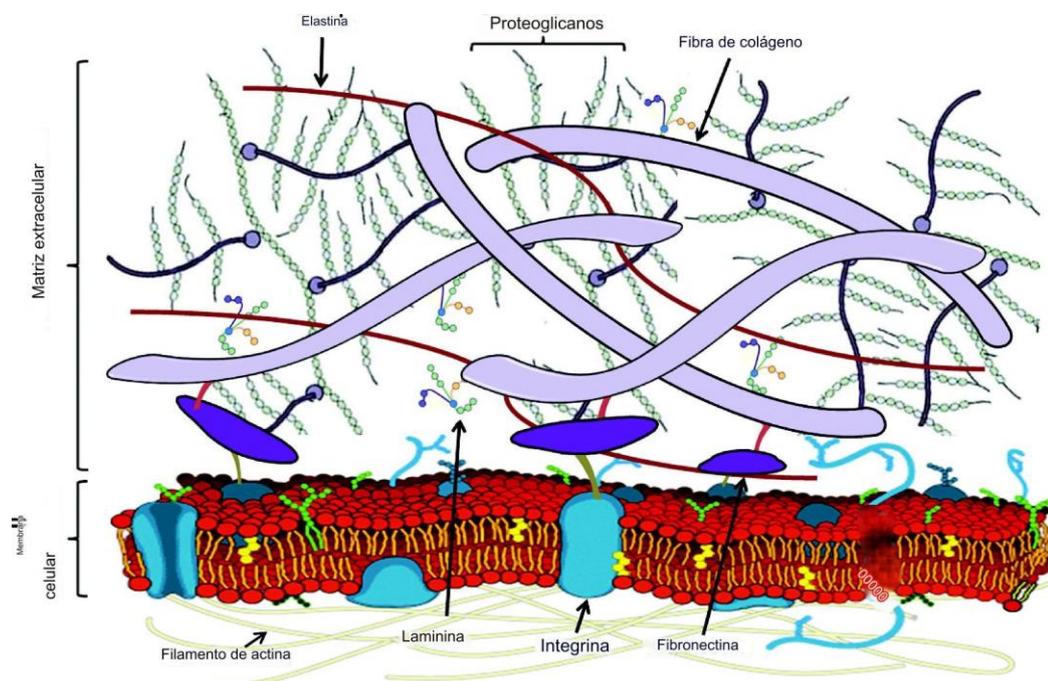
A homeostase glicêmica é mantida através da interação dinâmica entre os hormônios insulina e glucagon. A insulina facilita a entrada de glicose nas células, promovendo sua captação e armazenamento como glicogênio hepático, enquanto o glucagon estimula a liberação de glicose armazenada no fígado para elevar os níveis de glicose sanguínea em resposta à hipoglicemia (Thorens, 2022; Suh, Paik, & Jacobs, 2007).

A matriz extracelular (MEC) da ilhota pancreática humana desempenha um papel crucial na manutenção da estrutura e função das ilhotas, que são aglomerados de células endócrinas responsáveis pela regulação da glicose no sangue. A MEC é uma rede tridimensional de proteínas e glicosaminoglicanos que circunda as células das ilhotas e fornece suporte físico,

regula a adesão celular, transmite sinais bioquímicos e influencia a diferenciação celular (Hull et al., 2015).

A composição da MEC varia entre diferentes regiões das ilhotas e é composta principalmente por proteínas como colágeno, laminina, fibronectina e proteoglicanos. Essas moléculas interagem entre si e com receptores celulares para modular processos biológicos essenciais, como adesão, migração e a diferenciação celular (figura 3) (Berger et al., 2020).

Figura 3 - Desenho esquemático demonstrando a composição da matriz extracelular



Legenda: A matriz extracelular demonstrando elementos fluidos e fibrosos. Os fluidos são as glicosaminoglicanas e proteoglicanas. Os fibrosos são proteínas estruturais (colágeno, fibras elásticas ou fibras colágenas) e proteínas adesivas (fibronectina, laminina e integrina).

Fonte: Adaptado de (Abalymov et al., 2023)

Estudos têm demonstrado que a MEC desempenha um papel fundamental na regulação da sobrevivência e função das células beta pancreáticas, que são responsáveis pela produção e secreção de insulina. A integridade da MEC é crucial para a manutenção da homeostase da glicose e a prevenção da progressão do diabetes mellitus (Bosco et al., 2000).

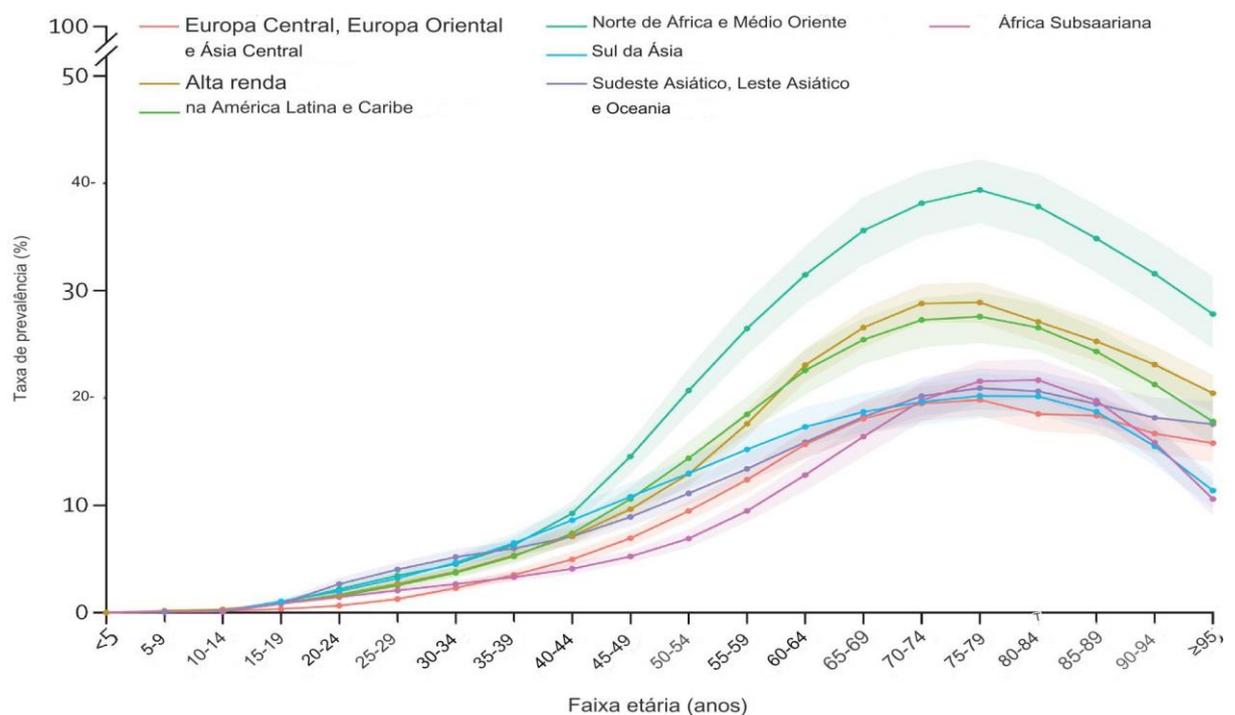
Além disso, a dinâmica da MEC é afetada em condições patológicas, como diabetes tipo 1 e tipo 2, o que pode levar à disfunção das ilhotas e à progressão da doença. Alterações na composição e organização da MEC podem influenciar a resposta das células beta a sinais metabólicos e inflamatórios, contribuindo para a patogênese do diabetes (Bornstein & Sage, 2002).

Estudos demonstraram que o envelhecimento do corpo humano está associado a alterações estruturais e funcionais nas ilhotas pancreáticas, contribuindo para a disfunção metabólica observada em pessoas idosas (Sui et al., 2019). Foi demonstrado uma diminuição da massa de células beta, levando a uma redução na secreção de insulina e maior suscetibilidade à hiperglicemia (Bornstein & Sage, 2002).

Além do envelhecimento da ilhota pancreática, o diabetes é uma doença metabólica crônica com alta prevalência em países ocidentais e está associado a diversas complicações importantes, como retinopatia, amputações de membros e insuficiência renal (Vijan, 2019). A maioria dessas complicações decorre de disfunção de microvasculatura (Fadini et al., 2019). A incidência do diabetes mellitus tipo2 (DM2) tem aumentado nas últimas décadas, não apenas devido à maior longevidade de população, mas também por sua estreita associação com a obesidade (Malone; Hansen, 2019).

Um estudo recente realizado na Coreia, utilizando uma amostra populacional grande e com idade igual ou superior a 65 anos, indicou que o pré-diabetes, diabetes, e a duração da condição diabética estão associados com risco aumentado para todos os tipos de câncer (figura 4) (Kim et al., 2023).

Figura 4 - Gráfico que demonstra a evolução do DM2 em diferentes regiões do mundo



Legendas: Prevalência de diabetes por faixa etária e regiões. As áreas sombreadas representam intervalos de incerteza de 95%. Estudo da Carga Global de Doenças, Lesões e Fatores de Risco.

Fonte: Adaptado de (GBD, 2021)

Este estudo visa investigar as alterações histológicas da ilhota pancreática relacionadas ao envelhecimento, com foco na análise da expressão de marcadores celulares e estromais em diferentes regiões anatômicas do pâncreas humano. Utilizando amostras de pâncreas de indivíduos idosos e de adultos jovens como controle, examinamos a correlação entre o envelhecimento e as características morfológicas e estromais da ilhota pancreática. Especificamente, investigamos a expressão de marcadores imunohistoquímicos com os anticorpos anti-insulina e anti-glucagon para analisar a massa de células, anticorpos anti-CD31 e anti-SMA para capilares e componentes do estroma, com os anticorpos anti-Perlecan e anti-Syndecan-4 e análise histoquímica com as colorações Hematoxilina e Eosina (HE) e Picro-Sirius, para analisar fibras colágenas, em relação ao envelhecimento da ilhota pancreática humana.

Nosso objetivo é contribuir para o entendimento dos mecanismos subjacentes ao envelhecimento da ilhota pancreática e à disfunção metabólica associada, fornecendo insights importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas destinadas a preservar a função endócrina e prevenir distúrbios metabólicos relacionados à idade avançada.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Realizar estudo estrutural e imuno-histoquímico em amostras teciduais de pâncreas humano obtidos à partir de autópsias na faixas etárias de 17-30 anos e 60-85 anos, respeitando os critérios de inclusão estabelecidos.

1.2 Objetivos específicos

- a. Analisar a citoarquitetura, vascularização, e composição do estroma das ilhotas pancreáticas em diferentes regiões anatômicas da glândula humana de adultos jovens e idosos;
- b. Estabelecer equivalências e diferenças em relação às ilhotas pancreáticas de jovens e idosos;
- c. Realizar estudo imuno-histoquímico com os anticorpos anti-CD31, anti-SMA, anti-perlecan, anti-syndecan-4, anti-insulina e anti-glucagon.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

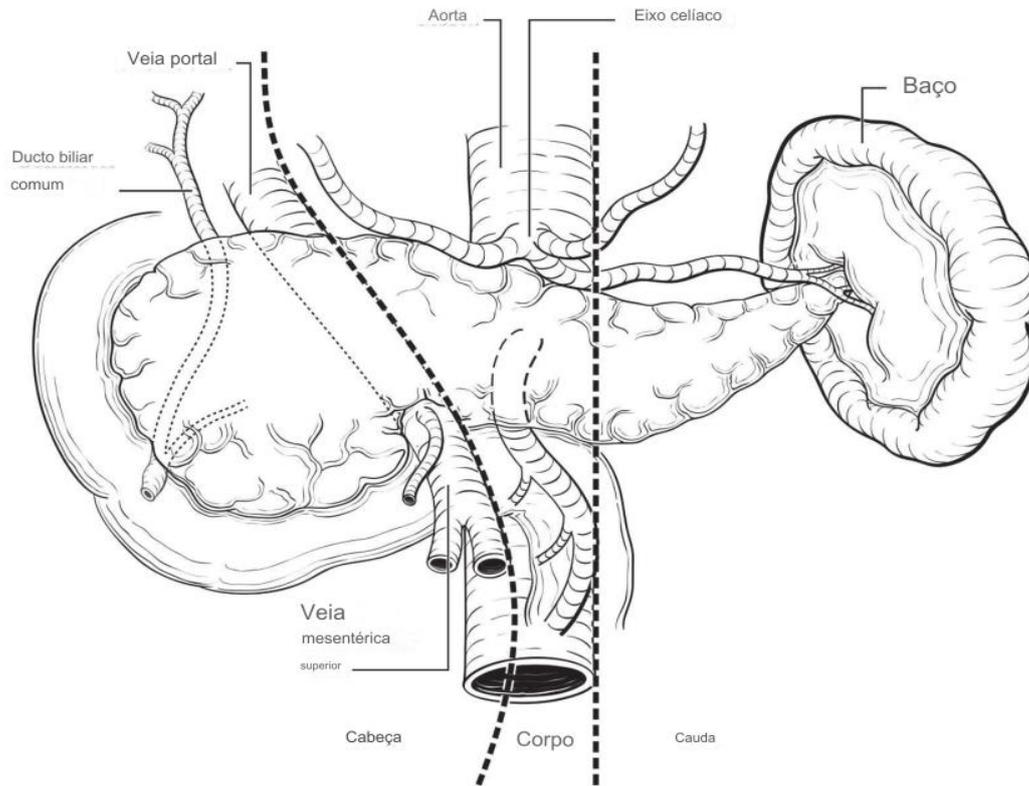
2.1 Obtenção das amostras de pâncreas humano

As amostras de pâncreas humanos foram obtidas à partir de necrópsia de indivíduos com tempo post-mortem estimado de até 9 horas, com morte por trauma, e cujos corpos não foram reclamados junto às autoridades públicas. Autorização oficial do Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto, Rio de Janeiro, a obtenção das amostras de pâncreas, foi realizada durante as disseções e tivemos a colaboração ativa de médico-legista dessa instituição. Existe legislação federal específica (Lei N° 8.501, de 30 de novembro de 1992, publicada no Diário Oficial da União, Seção 1, 1/12/1992, página 16519).

O projeto foi assim submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, via Plataforma Brasil, tendo sido aprovado com o número de parecer de 6.840.818 (anexo B).

Para cada órgão pancreático disponibilizado para coleta, seccionamos uma amostra das regiões da cabeça, corpo e cauda. A localização e limites dessas regiões seguem critérios anatômicos estabelecidos previamente (Kakar et al., 2018). Assim, a cabeça do pâncreas é definida como a região à direita da confluência das veias mesentérica superior e porta-hepática. O corpo está situado entre a margem esquerda da veia mesentérica superior e a margem esquerda da aorta. Por fim, a cauda se localiza entre a margem esquerda da aorta e o hilo do baço com visto na figura 5.

Figura 5 - Desenho esquemático da posição anatomia do pâncreas humano



Legendas: A cabeça do pâncreas se localiza a direita da confluência da veia mesentérica-porta superior. O corpo do pâncreas fica entre a borda esquerda da veia mesentérica superior e borda esquerda da aorta. A cauda do pâncreas entre a borda esquerda da aorta e o hilo do baço

Fonte: Adaptado de (Amin; American Joint Committee On Cancer; American Cancer Society, 2017).

As amostras de pâncreas somente foram incorporadas ao projeto quando apresentavam preservação macroscópica como coloração e densidade, e sua citoarquitetura preservada, o que correspondia ao grau de classificação de "+++", assim como reatividade normal a anticorpos (Figura 6). Esse sistema de classificação do estado de preservação de tecidos foi baseado em critérios já publicados (Ravi et al., 2022), e se encontra ilustrado na figura 7. Dados experimentais mostram que em amostras post-mortem com citoarquitetura do tecido mantida, as marcações de imunohistoquímica ocorreram normalmente (Lesnikova et al., 2018; Ravi et al., 2022). Além disso, de acordo com achados usando artérias humanas, a ultraestrutura de proteoglicanos está bem preservada em um período post-mortem de até três dias (Volker et al., 1989), enquanto que a imunoreatividade a esses glicoconjugados e a outras proteínas estava praticamente inalterada em até 24 horas após a morte (Talusán et al., 2005).

Figura 6 - Foto da macroscopia de preservação do pâncreas humano

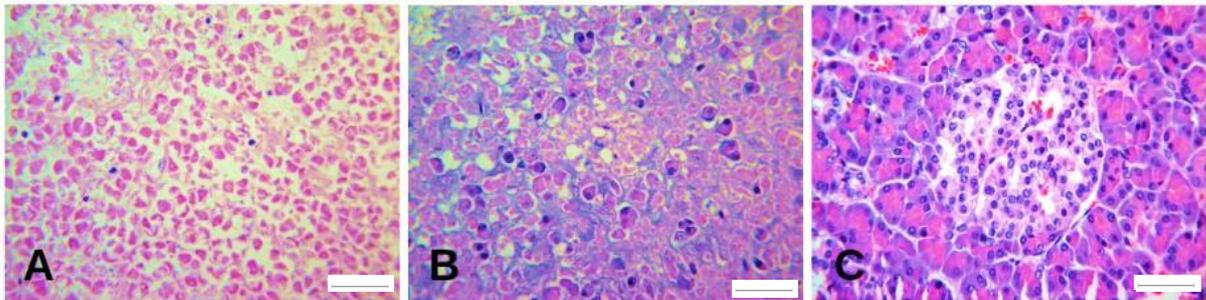


Legendas: Imagens Macroscópica dos pâncreas onde o tecido está bem preservado (A= +++), tecido com autólise inicial em (B=++) e tecido totalmente com autólise (C=+).

Abreviações: + (material com muita autólise), ++ (material pouca autólise) e +++ (material preservado).

Fonte: O autor, 2024

Figura 7 - Fotomicrografia do padrão de preservação do pâncreas humano corado em HE



Legendas: Corte histológico de pâncreas humano com análise da citoarquitetura, onde (A= +), (B=++) e (C=+++). Barra de escala de 50 μ , aumento de 400x.

Abreviações: + (material com muita autólise), ++ (material pouca autólise) e +++ (material preservado).

Fonte: O autor, 2024

2.2 Critérios de exclusões

Grupos de estudo e fatores de exclusões. Sinais macroscópicos de doenças pancreáticas como: Áreas esbranquiçada, áreas friáveis, áreas sobrelevadas, sinais de hemorragia ou de gordura aderida ao tecido pancreático, ou de outras doenças correlatas. Sinais histológicos de neoplasias e de infiltrados histológicos, Índice de Massa Corporal (IMC) normal de até 18,50 – 24,99, que morreram de causas acidentais, e com tempo post-mortem estimado superior a 9 horas. Já foi mostrado em estudos anteriores que durante este tempo as amostras estão preservadas para imuno marcação (Lesnikova et al., 2018).

2.2.1 Crêterios de exclusões 1

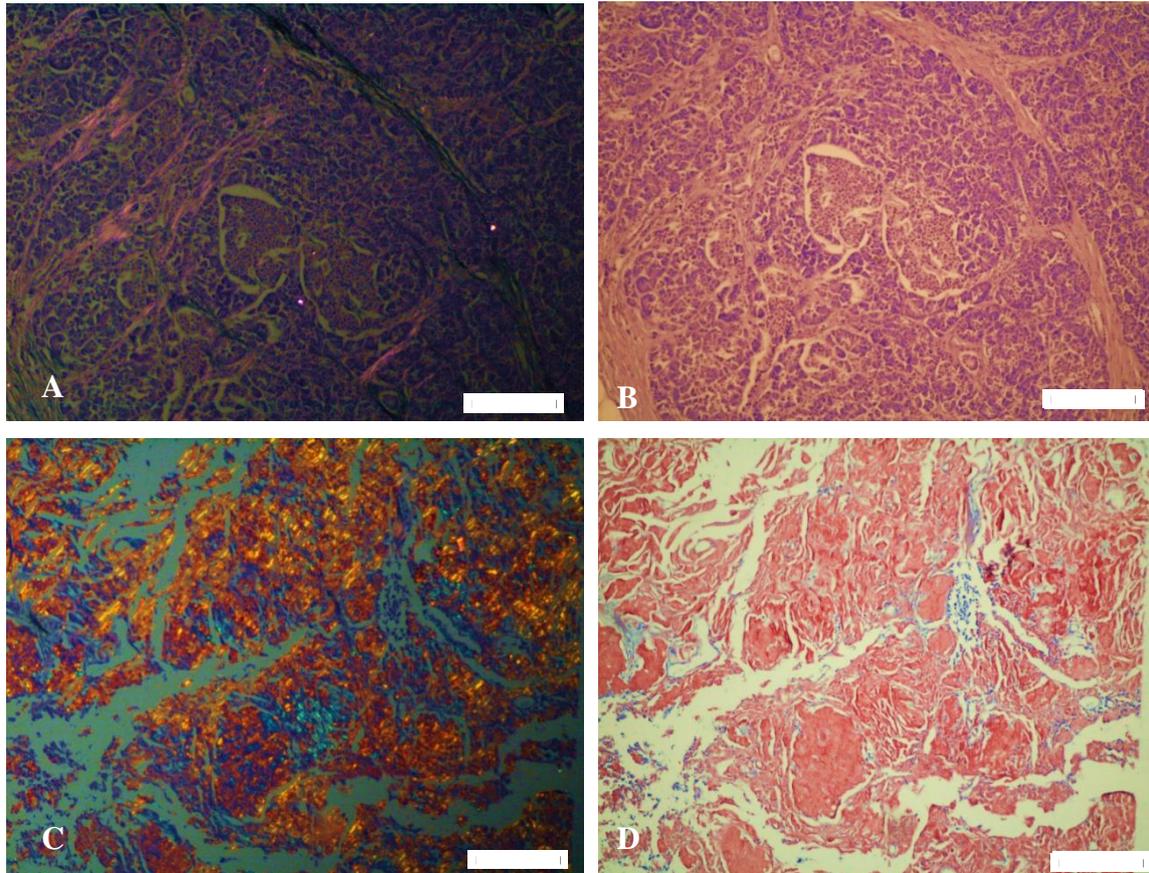
Análise de microscópica das lâminas coradas em HE para determinar a integridade histológica utilizamos um escopo de, (+) para amostras com auto lisadototal, (++) para amostras com autólise moderada e (+++) para amostras com a ilhota pancreática bem preservada.

O sistema adotado para classificar o estado de preserva o histológica das amostras de pâncreas humanos obtidas durante necrópsia. Amostras da cabeça do pâncreas. Classifica es: A, +; B, ++; e C, +++. Os cortes foram corados pelo HE e as imagens foram capturadas com aumento final de 400x. Em "A" há total perda da arquitetura celular e tecidual, que é parcialmente preservada em "B". Já em "C" há adequada preserva o da arquitetura tecidual e celular, tanto na ilhota quanto na parte exócrina do pâncreas (Figura 6). Nesta última, nota-se inclusive a característica eosinofilia no polo basal das células. No presente estudo, somente amostras "+++" foram utilizadas, as amostras "+" e "++" foram excluídas (Lesnikova et al., 2018).

2.2.2 Crêterios de exclusões 2

Em todas as amostras de jovens e idosos usadas no estudo foram coradas pelo método histoquímico de colora o Vermelho Congo para afastar possíveis casos de diabetes tipo 2, visto que mais de 90% dos pacientes com essa doença apresentam depósitos amiloides nas ilhotas (Mukherjee et al., 2015) e (Oskarsson et al., 2015). A presença de depósitos amiloide nas ilhotas foi investigada corando-se cortes do pâncreas com Vermelho Congo (Merck, código do produto no. 1.01340, Burlington, MA, USA) seguindo protocolo previamente publicado (Westermarck et al., 1999). Os cortes foram então observados em campo claro e luz polarizada. A positividade da rea o para amiloide foi verificada por meio de controles positivos polarizados, que produziram colora o vermelha bem evidente em campo claro, e característica birrefringência verde-claro sob luz polarizada como demonstrado na figura 8 as amostras com depósito de amiloide ou vermelho congo positivo foram excluídas.

Figura 8 - Fotomicrografias da técnica de Vermelho do Congo



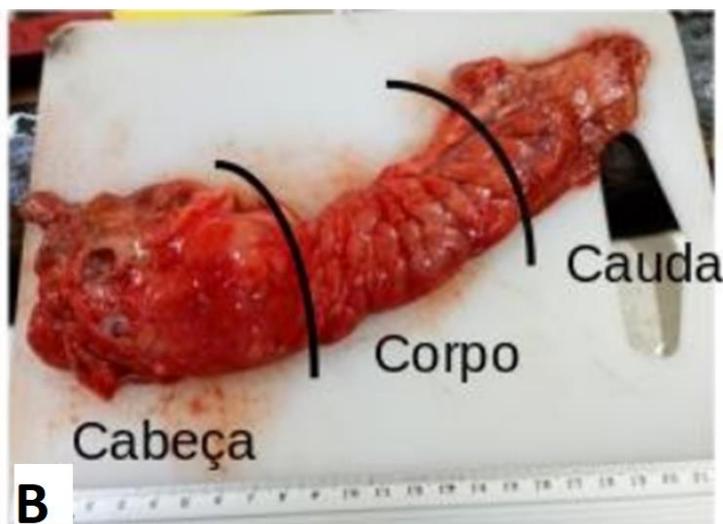
Legendas: Fotomicrografias da coloração de Vermelho Congo, fotomicrografia (a) ilhota pancreática humana negativo para vermelho congo com polarização, fotomicrografia (b) ilhota pancreática humana negativo para vermelho congo sem polarização, fotomicrografia (c) Tireoide humana controle positivo para vermelho congo com polarização e fotomicrografia (d) Musculo esquelético humana controle positivo para vermelho congo sem polarização. Barra de escala em 100 μ aumento de 200x.

Fonte: O autor, 2024

2.3 Coleta das amostras

O pâncreas foi isolado para iniciar o posicionamento anatômico e fotografados por inteiro (com escala em centímetros) logo após a coleta (figura 9). Realizado a clivagem de uma amostra de aproximadamente 2cm² de cada região anatômica, cabeça, corpo e cauda seguindo os critérios de identificação vistos da figura 9.

Figura 9 -Foto do pâncreas humano colhido no IML demonstrando boa preservação



Legendas: Foto macroscópica de um pâncreas com critério (+++) de jovem e com a separação das áreas onde foram retiradas as amostras para o processamento.

Fonte: O autor, 2024.

A fixação do material imediatamente após a clivagem, utilizando frascos de boca larga com tampa de volume 50ml com formol 10% neutro-tamponado e fechado hermeticamente. Para cada indivíduo, foram usados três frascos, os quais previamente etiquetados e contendo as seguintes informações: (a) código do corpo (C1, C2, C3, etc.), (b) região do pâncreas (cabeça “A”, corpo “B”, ou cauda “C”) e (c) data da coleta (necrópsia). As amostras foram separadas em cassetes plásticos um de cada área, identificadas como C1 1,2,3., C2 1,2,3..., assim por diante, assim totalizando 78 amostras de pâncreas.

2.4 Processamento histológico humano

As amostras foram desidratadas usando uma série crescente de 5 etanol na concentração de (70, 80, 96, 99,6 e 99,6%), em seguida o material foi embebido em 3 (três) banhos de Xilol (Xilênio) e em seguida o material passou por 2 (dois) banhos de parafinas em uma temperatura de 65C° de (60 minutos) em um processamento automatizado PT2 (LUPTEC 2015, BRASIL) (figura 10). Foi feita a inclusão em parafina onde foi confeccionado os blocos de parafina em unidade de inclusão LEICA 2009. Os cortes foram feitos em micrótomo RM (LUPETEC 2015, BRASIL) na espessura 5 µm.

Figura 10 - Processador automático de tecidos LUPTEC PT2



Fonte: Lupetec - Tecnologia Aplicada, BRASIL.

2.5 Método de coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

Os cortes histológicos obtidos em lâminas de vidro foram corados pelo método de coloração HE. As lâminas foram colocadas na estufa para aderência do material ao vidro e desparafinização a uma temperatura de 65°C durante 60 minutos, em seguida retiramos da estufa e iniciamos a desparafinização com imersão das lâminas em 4 banhos de xilênio, com 2 minutos em cada um. Logo depois iniciamos a hidratação em uma série de concentrações decrescentes de etanol aquoso (99,6, 96, 80 e 70%). Em seguida, para a água corrente e lavada em água destilada, após hidratação iniciamos a coloração dos núcleos em hematoxilina Harris durante 1 minuto, e em seguida foi realizada a diferenciação em água corrente durante 5 minutos. A coloração em eosina se deu durante 1 minuto e diferenciada em 3 (três) etanol a 99,6% e clarificação em 4 (quatro) xilênio. E a selagem com Etellan com lamínula 24x50 para finalização. A análise foi realizada em um microscópio óptico (Olympus, BX51, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus, DP71, Tokyo, Japan) (Marinho et al., 2020). Esta coloração foi realizada com o objetivo de analisar a citoarquitetura e a preservação histológica das amostras.

2.6 Coloração de Picro-Sirius ou Sirius-Red

A coloração de Picro-Sirius foi realizada para evidenciar a distribuição de colágeno nas ilhotas pancreáticas. Os cortes foram desparafinizados e hidratados em água corrente e, em

seguida, em água destilada seguindo a base do protocolo de HE por 4 minutos. Para coloração dos núcleos utilizamos hematoxilina Weigerts (Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Alemanha) por 8 minutos. Prontamente, os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e em água destilada por 1 minuto, e fixados duas vezes em ácido acético 30% (Carl Roth GmbH e Ko.KG) durante 1 minuto, e a seguir, duas vezes em etanol 96% por 4 min. Após esta etapa incubamos em ácido fosfomolibdico a 0,02 Normal durante 1 minuto. Os cortes foram corados com Picro-Sirius a 0,1% (Morphisto GmbH) por 60 minutos, lavados e diferenciados em HCL 0,01 Normal por 2 minutos, seguido de um banho em água destilada por 2 minutos, e logo depois desidratada em 3 Etanol e para clarificar foram utilizados 4 banhos em Xilênio. Concluindo em selagem utilizando etellan (Merck KGaA) e lamínulas 24x50, e na análise microscopia usamos o equipamento (Olympus, BX51, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus, DP71, Tokyo, Japan) (Marinho et al., 2020).

2.7 Coloração de Vermelho do Congo

A presença de depósitos amiloide nas ilhotas foi investigada corando-se cortes do pâncreas com Vermelho Congo (Merck, código do produto no. 1.01340, Burlington, MA, USA) seguindo protocolo previamente publicado (Westermarck et al., 1999). Foi realizada a desparafinização e hidratação segundo o protocolo de HE até a água destilada, imergido as lâminas na solução de vermelho congo a 5% durante 60 minutos, em seguida, lavado em água destilada, e diferenciado em solução alcoólica alcalina de hidróxido de sódio a 1%, seguido de lavagem em água corrente por 1 minuto, os cortes foram contracorados em Hematoxilina de Harris por 1 minuto, diferenciado em água corrente por 5 minutos, desidratados e clarificados segundo o protocolo de HE e montagem usando etellan e lamínula 24x50. Na análise de microscopia, usamos o equipamento (Olympus, BX51, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus, DP71, Tokyo, Japan). Os cortes foram então observados em campo claro e luz polarizada. A positividade da reação para amiloide foi verificada por meio de controles positivos apropriados, que produziram coloração vermelha bem evidente em campo claro, e característica birrefringência verde-claro sob luz polarizada.

2.8 Imunohistoquímica

Lâminas com carga positiva da (Apex Adhesive Slide, Leica Microsystems GmbH) seguido as orientações rigorosas do fabricante do kit para a revelação, kit Leica Novolink Max Polymer Detection System (código RE7280-K), Leica Microsystems GmbH. 1. Cortes foi feito em lâminas revestidas de um tecido adesivo apropriado. 2. Desparafinado as secções em xileno ou substitutos de xileno. 3. Reidratar através de álcoois graduados. 4. Lavado as lâminas em água corrente de torneira lavado em água destilada em 3 banhos. 5. Efetuar a recuperação do antígeno conforme necessário (A recuperação antigênica está sendo realizada por incubação das lâminas em câmara úmida à 95°C em tampão citrato pH 6.0 durante 20 minutos) 6. Lavado as lâminas em água deionizada. 7. Neutralizar a peroxidase endógena, empregando para tal Peroxidase “Block” durante 5 minutos. 8. Lavado em TBS durante 2 x 5 minutos. 9. Incubar as secções com “Protein Block” durante 5 minutos. 10. Lavado em TBS durante 2 x 5 minutos. 11. Incubar com anticorpo primário a uma diluição padronizada (Ver tabela 2 e 3). 12. Lavada em TBS durante 2 x 5 minutos. 13. Incubar com Post Primary durante 30 minutos. 14. Lavada em TBS durante 2 x 5 minutos. 15. Incubar com Novolink Polymer durante 30 minutos. 16. Lavada em tampão TBS durante 2 x 5 minutos, agitando levemente. 17. Desenvolver a atividade da peroxidase com a solução de trabalho diaminobenzidina (DAB) (Solução de trabalho DAB Adicionar 50 µl de Novolink DAB Chromogen a 1ml de DAB Substrato “Buffer” (Polymer). Utilizar dentro de seis horas após a preparação) durante 5 minutos. 18. Enxaguado as lâminas em água. 19. Contrastar com Hematoxilina de Harris durante 5 minutos. 20. Enxaguado as lâminas em água durante 5 minutos. 21. Desidratar e montar as lâminas. (“eIFU - Leica Biosystems”, [s.d.]

2.9 Morfometria

Todas as imagens usadas para a morfometria das estruturas da ilhota pancreática foram capturadas com aumento final de 400X em microscópio ótico (Olympus, BX51, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus, DP71, Tokyo, Japan).

Para compensar a variação considerável que existe no tamanho das ilhotas em cada pâncreas humano (Dybala & Hara, 2019), expressamos a quantidade dos marcadores como um

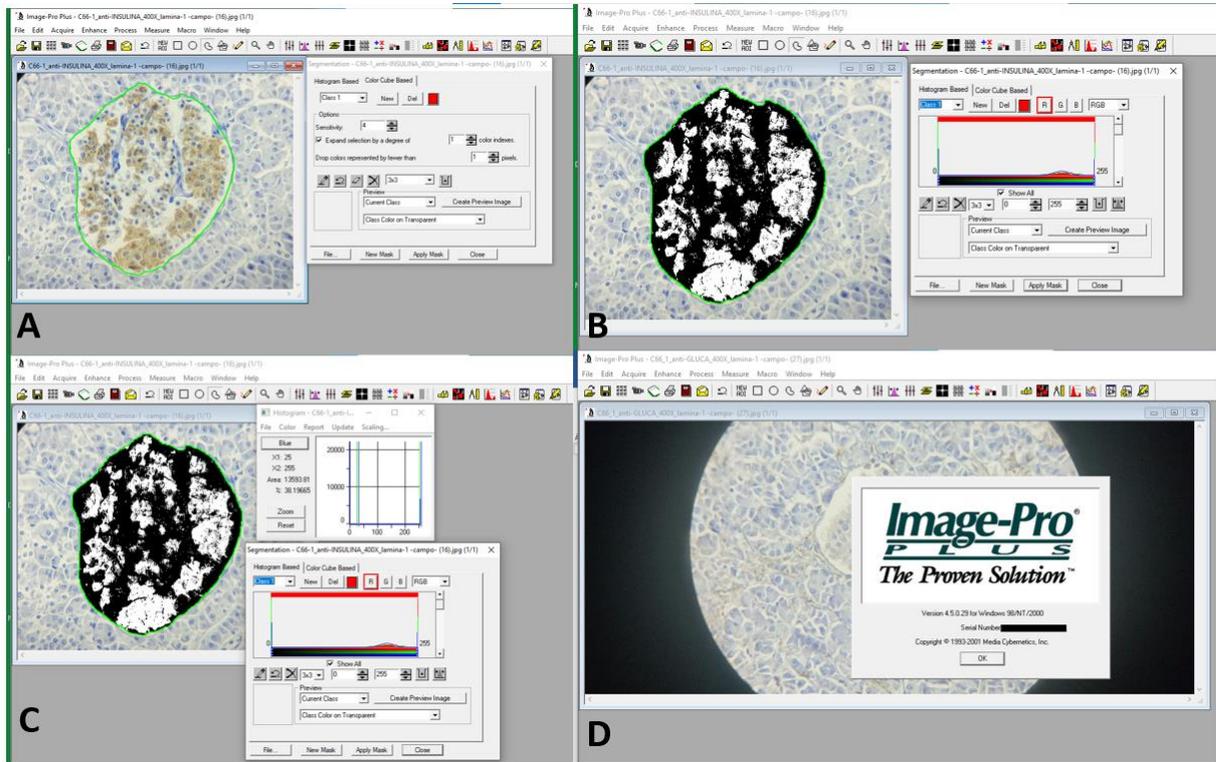
valor relativo, e analisamos um número maior de ilhotas por região anatômica do pâncreas. A análise morfométrica das ilhotas foi feita como descrita previamente (Marinho et al. 2020), utilizando a técnica de "color segmentation" através do programa Image-Pro v.5.0. Esse método é amplamente utilizado para a quantificação de estruturas celulares e estromais em cortes histológicos, como por exemplo, em ilhotas pancreáticas de humanos (Wang et al., 2013; Yang et al., 2016) e de animais de experimentação (Marinho et al. 2020).

As imunomarcações, (figura 11 A) foi destacada com a opção, "irregular AOI", para determinar a área de interesse com marcação com DAB (área positiva insulina no exemplo). Com a opção "perform segmentation" transformamos a marcação de RGB (Red, Green e Blue) para BW (Black and White) (Figura 11 B). Obtemos as medidas em unidades de intensidade, para densidade óptica em % opção "image histogram" (Figura 11 C). O programa utilizado foi o (Image-Pro Plus) (Figura 11 D) (Marinho et al., 2022).

Foi assim determinada a área da marcação imunohistoquímica, que foi expressa como um percentual em relação à área da ilhota. Para cada marcação, foram avaliados em torno de 4 cortes, com espaçamento de 200 μm entre eles, de modo que um total de 30 ilhotas, aproximadamente, foi analisada em cada uma das três regiões anatômicas de cada indivíduo. A partir desses valores do total de ilhotas, foi calculada uma média de região para cada indivíduo.

Todas as quantificações morfométricas foram realizadas por um observador, e para se verificar a reprodutibilidade intra-observador do método, utilizou-se o procedimento do coeficiente de variação (Li et al., 2009). Assim, foram realizadas medidas repetidas de ilhotas de diferentes tamanhos, e para cada um foi calculado o coeficiente de variação ($CV = (SD/média) \times 100$) dos valores obtidos. Os CVs foram sempre $<5\%$, o que é considerado como reprodutibilidade aceitável (Li et al., 2009) (Mandarim et al., 2003) e (Mandarim et al., 2010).

Figura 11 - Captura das telas das três etapas da densidade de volume de células beta estimada para análise da imagem



Legenda: A-delimitação da ilhota, B- delimitação da marcação do DAB, C - estimativa da densidade em (%) e D- Versão do programa utilizado.

Fonte: O autor, 2024

2.10 Análises estatísticas

Os resultados para as variáveis numéricas estão apresentados como média \pm desvio padrão. A comparação entre os valores obtidos para as duas faixas etárias foi feita pelo teste t com correção de Welch. Já a comparação entre as três regiões anatómicas do pâncreas foi realizada por meio de one-way ANOVA para medidas repetida. Todas as análises estatísticas foram feitas com o software R v.4.3.2 (R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2023), e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3 TABELAS

Tabela 1 - Amostras de pâncreas humanos, que apresentam preservação adequada do tecido (+++). Para cada pâncreas, foi colhida uma amostra da cabeça, corpo e cauda.

Faixa etária	Número de amostras
Adultos jovens 17-30 anos	11
Idosos de 60-85 anos	5

Legenda: Amostra de pâncreas humanos de cada faixa etária.

Fonte: O autor, 2024.

Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados

Antígeno	Fabricante	Código do produto
Syndecan-4	CUSABIO	CSB-PA278485
Perlecan (HSPG2)	CUSABIO	CSB-PA967416
Insulina	SANTA-CRUZ	SC-9168
Glucagon	CELL MARQUE	CSB-PA002654
Alfa-actina de músculo liso-SMA	CELL MARQUE	202M-96
CD31	CEL MARQUE	131M-96

Legenda: Anticorpos primários com nome e código do fabricante.

Fonte: O Autor, 2024.

Tabela 3 - Diluição e pH da recuperação

Antígeno	Diluição	Recuperação antigênica
Syndecan-4	1:200	Citrato pH 6.0
Perlecan (HSPG2)	1:200	Citrato pH 6.0
Insulina	1:400	Citrato pH 6.0
Glucagon	1:400	Tris-EDTA pH 9.0
Alfa-actina de músculo liso	1:100	Citrato pH 6.0
CD31	1:100	Citrato pH 6.0

Legenda: Anticorpos primários com nome diluição e pH de recuperação antigênica.

Fonte: O autor, 2024.

Tabela 4 - Quantidade relativa de componentes da ilhota pancreática nas duas faixas etárias e nas diferentes regiões anatômicas do pâncreas, marcados por meio de imunohistoquímica

Componente da ilhota	Cabeça			Corpo			Cauda		
	Adultos	Idosos	P	Adultos	Idosos	p	Adultos	Idosos	p
CD31	1,6±1,3	0,8±0,6	0,26	1,9±1,1	0,8±0,6	0,08	1,5±1,3	0,4±0,3	0,10
SMA	2,3±1,4	1,7±1,4	0,48	2,9±1,9	1,3±0,5	0,09	2,3±1,7	1,3±0,7	0,24
Syndecan-4	2,1±0,9	0,8±0,5	0,02	1,6±0,8	1,0±0,8	0,25	1,6±0,6	0,8±0,5	0,04
Perlecan	15,0±7,8	30,1±9,4	0,04	22,6±8,7	26,3±13,3	0,61	22,5±8,6	32,5±8,3	0,11
Insulina	56,4±4,7	45,2±7,8	0,03	53,5±5,4	41,3±4,8	0,005	53,8±10,1	41,1±8,5	0,06
Glucagon	15,1±7,1	12,5±7,6	0,61	13,4±7,7	10,4±5,1	0,50	11,6±6,1	6,2±3,4	0,12

Legenda: Os valores numéricos são dados como média ± desvio padrão e representam a quantidade da marcação expressa como porcentagem da área da ilhota pancreática. As médias foram comparadas por teste t com a correção de Welch, e os resultados são mostrados como valores de p. SMA, alfa-actina de músculo liso.

Fonte: O autor, 2024.

Tabela 5 - Comparação da quantidade relativa de componentes da ilhota pancreática entre as diferentes regiões anatômicas do pâncreas, para cada uma das faixas etárias. Os componentes foram marcados por meio de imunohistoquímica

Faixa etária	CD31			
	Cabeça	Corpo	Cauda	p
Adultos	1,6±1,3	1,9±1,1	1,5±1,3	0,35
Idosos	0,8±0,6	0,8±0,6	0,4±0,3	0,13
SMA				
Adultos	2,3±1,4	2,9±1,9	2,3±1,7	0,64
Idosos	1,7±1,4	1,3±0,5	1,3±0,7	0,57
Syndecan-4				
Adultos	2,1±0,9	1,6±0,8	1,6±0,6	0,43
Idosos	0,8±0,5	1,0±0,8	0,8±0,5	0,58
Perlecan				
Adultos	15,0±7,8	22,6±8,7	22,5±8,6	0,68
Idosos	30,1±9,4	26,3±13,3	32,5±8,3	0,86
Insulina				
Adultos	56,4±4,7	53,5±5,4	53,8±10,1	0,51
Idosos	45,2±7,8	41,3±4,8	41,1±8,5	0,78
Glucagon				
Adultos	15,1±7,1	13,4±7,7	11,6±6,1	0,35
Idosos	12,5±7,6	10,4±5,1	6,2±3,4	0,12

Legenda: Os valores numéricos representam a quantidade da marcação expressa como porcentagem da área da ilhota pancreática, e são dados como média ± desvio padrão. As médias foram comparadas por one-way ANOVA para medidas repetidas, e os resultados são mostrados como valores de p. Abreviação: SMA, alfa-actina de músculo liso.

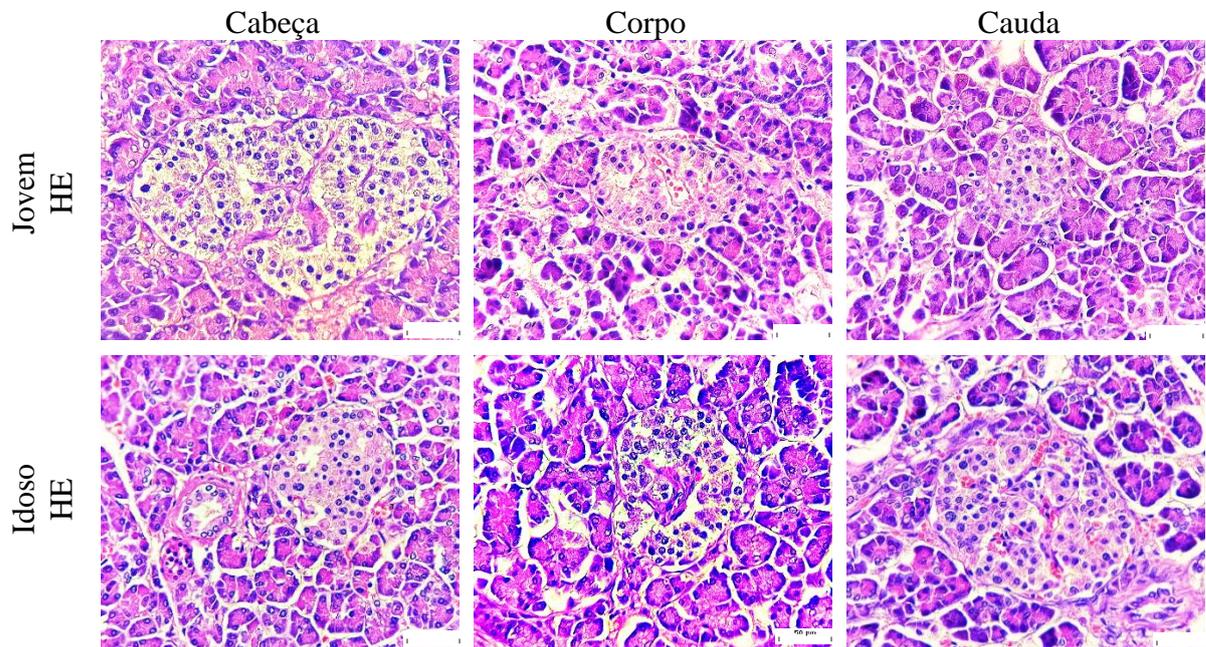
Fonte: O autor, 2024.

4 RESULTADOS

Para obtenção das amostras de pâncreas humano foi contactado o Instituto Médico Legal do Rio de Janeiro, onde conseguimos autorização do Diretor e Instituto Dr Diego Rissi Carvalho, e dado início a jornada de coleta, com obtenção do termo de anuência (ANEXO A).

A maior parte das amostras teve que ser descartada em função da degradação post-mortem do tecido. Portanto, após a identificação, aplicação dos termos de exclusão do projeto, análise macroscópica, posicionamento anatômico, retirada das amostras do pâncreas e catalogação dos doadores e registrados conseguimos obter um número de amostras necessário para realização da pesquisa 5 idosos e 11 jovens (tabela 1). A maioria dos pâncreas estavam autolisados, com o escopo de (+) uma cruz e por critérios de exclusão foram descartados, visto na figura 7. Apenas uma em cada 9 amostras apresentavam preservação adequada do tecido, tanto do ponto de vista de citoarquitetura, quanto de reatividade das imunomarcações.

Figura 12 - Fotomicrografia de ilhotas humanas de jovens e idosos corada por HE



Legendas: Ilhotas humanas de jovens e idosos corada por HE, demonstrando a preservação histológica. Barra de escala em 50 μ , aumento de 400x. Abreviações: HE-Hematoxilina e Eosina.

Fonte: O autor, 2024.

4.1 Preservação e reatividade do material

As amostras de pâncreas selecionadas para o presente estudo, depois de aplicados os critérios de exclusões, apresentavam citoarquitetura e reatividade a anticorpos praticamente inalteradas, como pode ser visto nas fotomicrografias 11, 12 e 13. A preservação das nossas amostras também pôde ser verificada ao compará-las com amostras de mesmo tecido obtidas e fixadas durante cirurgia (dados não mostrados).

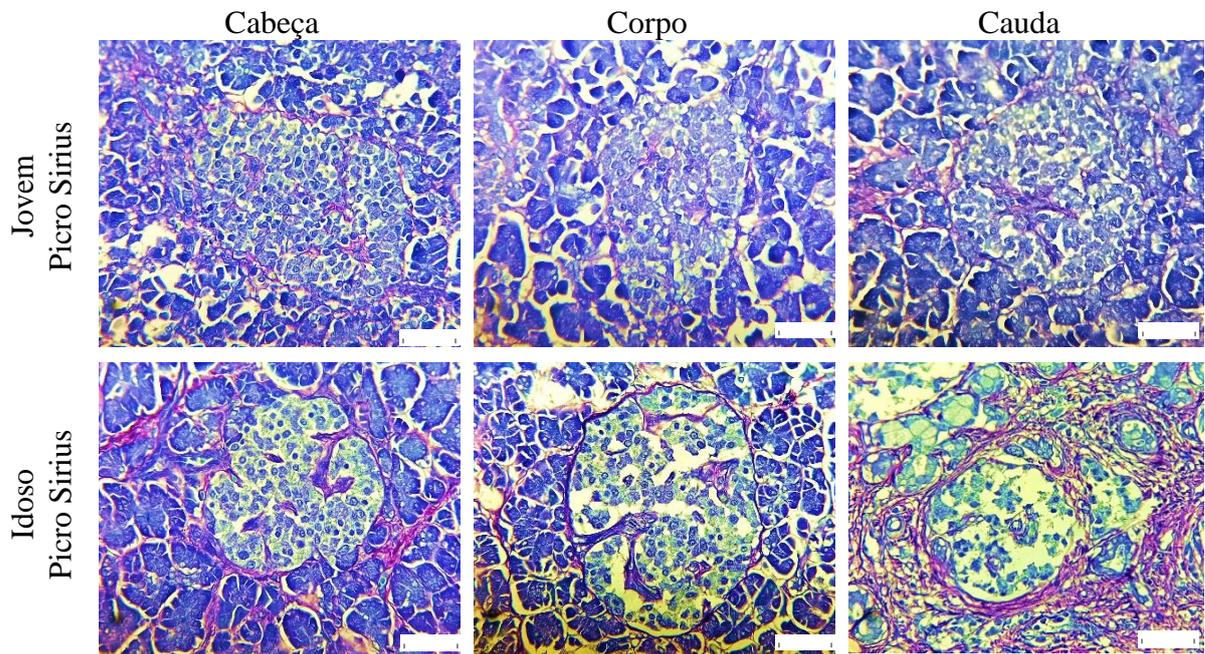
A coloração pelo Vermelho Congo foi negativa em todos os pâncreas do estudo, e em especial nas amostras de pâncreas de idosos, já demonstrado na figura 10.

4.2 Componente da matriz extracelular, fibrose da ilhota pancreática

A distribuição do colágeno no interior e periferia das ilhotas foi evidenciada corando-se os cortes por meio da técnica histoquímica do Picro-Sirius.

Sabemos que, a ocorrência de fibrose no pâncreas do idoso não diabético, principalmente na zona peri-ilhota e perivascular, foi inferida indiretamente através da expressão elevada de metaloproteinases, e tal evento poderia ser mais importante para fisiopatologia do diabetes tipo 2 do que perdas funcionais da célula beta. Portanto, não apenas há poucas evidências para essa resposta fibrótica, mas também não se sabe se ela ocorre de maneira diferente nas diversas regiões anatômicas do pâncreas. Por isso, nós realizamos a coloração de Picro-Sirius que evidencia colágeno, afim de investigar sobre esta resposta fibrótica em idosos. Nossos resultados sugerem que há uma perceptível área fibrótica nas amostras de pâncreas de idosos marcada em vermelho, principalmente em torno das ilhotas, também observamos que tem pouca variação quando comparada entre as regiões, mas que o corpo tem menos marcação quando comparado com a cabeça e a cauda (Figura 13). Nos adultos jovens, a área de colágeno peri-ilhota aparenta ser menor.

Figura 13 - Fotomicrografia de ilhotas humanas coradas por Picro-Sirius



Legendas: Ilhotas humanas coradas por Picro-Sirius sugerem que há uma perceptível área fibrótica nas amostras de pâncreas de idosos, principalmente em torno da ilhota, em comparação com jovens. Barra de escala em 50 μ , aumento de 400x.

Fonte: O autor, 2024

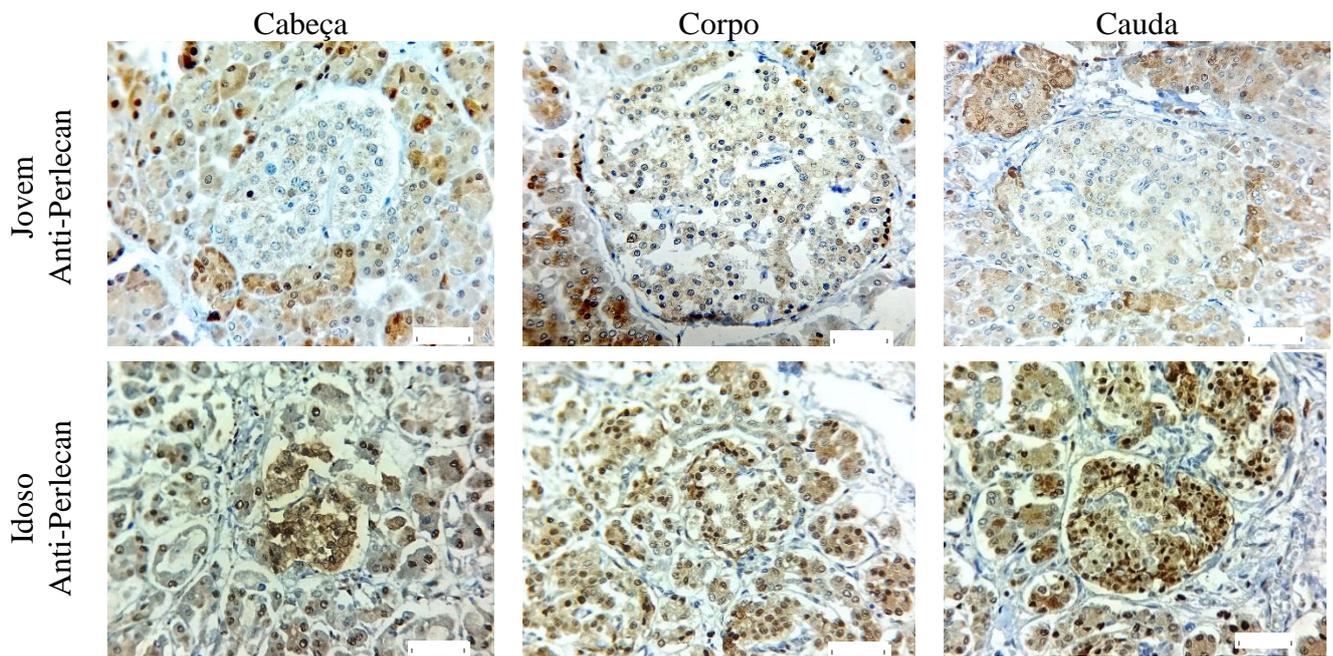
4.2.1 Proteoglicanos da matriz extracelular

Outros dois componentes macromoleculares da matriz extracelular, os proteoglicanos perlecan e syndecan-4, foram marcados por meio da técnica de imunohistoquímica (Figuras 14 e 15). A extensão da marcação foi quantificada por método de análise de imagem (color segmentation), e expressa como percentual da área da ilhota. Conforme mostrado na Tabela 4, o syndecan-4 está presente em quantidades relativamente pequenas em adultos jovens, e em idosos há uma redução significativa de 62% nessa quantidade na região da cabeça do pâncreas, e de 50% na cauda. No corpo, a diferença entre as duas faixas etárias não é significativa. Por outro lado, quando as regiões anatômicas são comparadas entre si, para cada uma das faixas etárias separadamente, não há diferenças significativas na quantidade desse proteoglicano (Tabela 5).

O perlecan, entretanto, está presente em quantidades bem maiores em adultos jovens, compreendendo de 15 a 22% da ilhota em termos de área de marcação. Quando comparado a

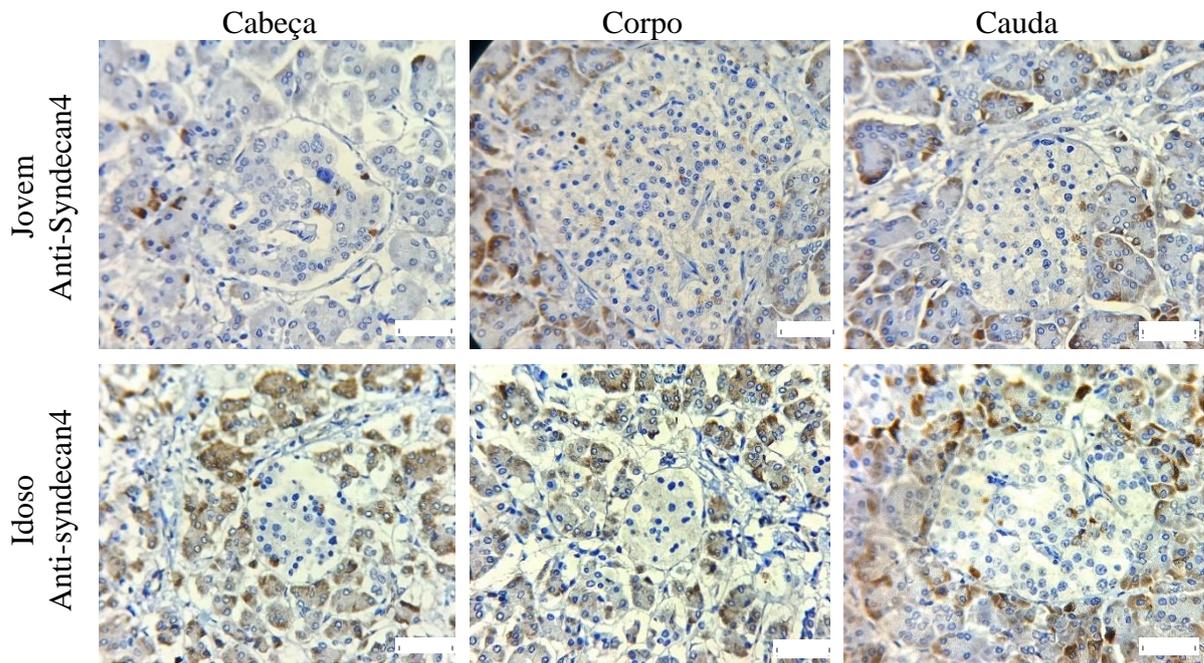
idosos, o proteoglicano apresenta um aumento de 100% na cabeça do pâncreas, enquanto que nas demais regiões as diferenças não são significativas (Tabela 4). Também não há diferenças significativas na quantidade desse proteoglicanos quando as regiões anatômicas são comparadas entre si, para cada uma das faixas etárias (Tabela 5).

Figura 14 - Fotomicrografia de ilhotas humanas de jovens e idosos marcadas por anti-perlecan



Legenda: Ilhotas pancreáticas humanas imuno marcadas por anti-perlecan de jovens e idosos, onde podemos evidenciar uma baixa diferença entre as duas faixas etárias. Barra de escala em 50 μ , aumento de 400x.
Autor: O autor, 2024.

Figura 15 - Fotomicrografia de ilhotas humanas de jovens e idosos marcadas por anti-syndecan-4



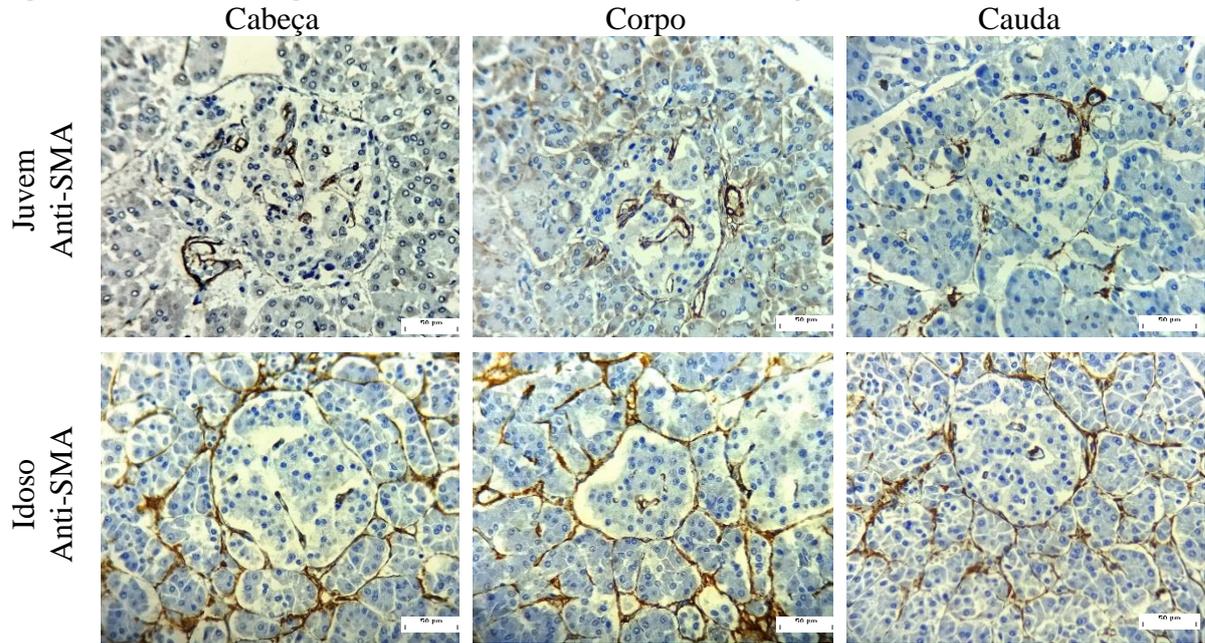
Legendas: Ilhotas pancreáticas humanas imuno marcadas por anti-syndecan-4 de jovens e idosos, onde podemos evidenciar uma baixa diferença entre as duas faixas etárias. Aumento de 400x.

Fonte: O autor, 2024.

4.3 Fatores da microvascularização da ilhota

Um fator importante na fisiologia normal de ilhota é a sua microvasculatura. Esse fator foi assim analisado por meio da marcação de células endoteliais, com anticorpos anti-CD31, e de células de músculo liso, com anticorpos anti-SMA (figura 15 e 16). Nenhum desses marcadores apresentou diferença significativa nas comparações entre adultos jovens e idosos (Tabela 4). Nota-se, no entanto, uma tendência para diminuição de células endoteliais e de músculo liso nos idosos, nas três regiões anatômicas do pâncreas, especialmente no corpo. Como já observado em relação aos proteoglicanos, a concentração na ilhota de CD31 e SMA não apresenta diferenças significativas entre as regiões anatômicas do pâncreas, independente de faixa etária (Tabela 5).

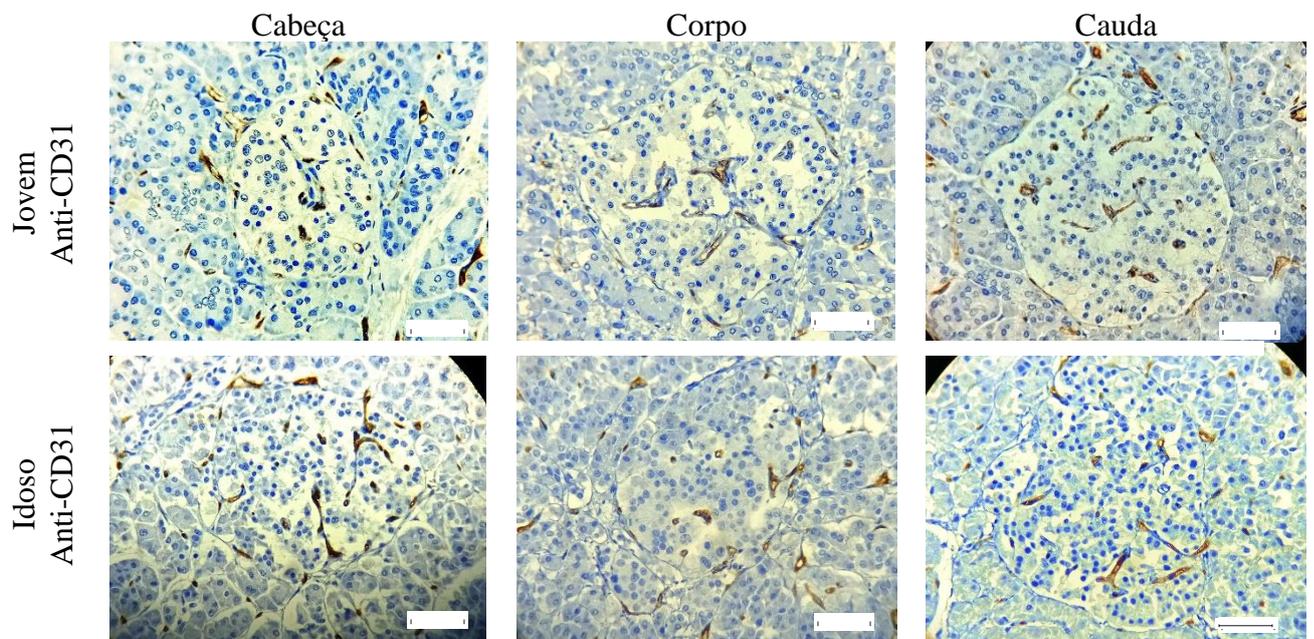
Figura 16 - Fotomicrografia de SMA das ilhotas de humanos jovens e idosos



Legendas: Fotomicrografia de ilhotas de humanos jovens e idosos, imuno marcadas por Anti-SMA. Barra de escala em 50µ, aumento de 400x. Abreviações: SMA Alfa-quitina de músculo liso

Fonte: O autor, 2024

Figura 17 - Fotomicrografia da ilhota pancreática marcada por anti-CD31 nos grupos jovens e idosos aumento de 400x.



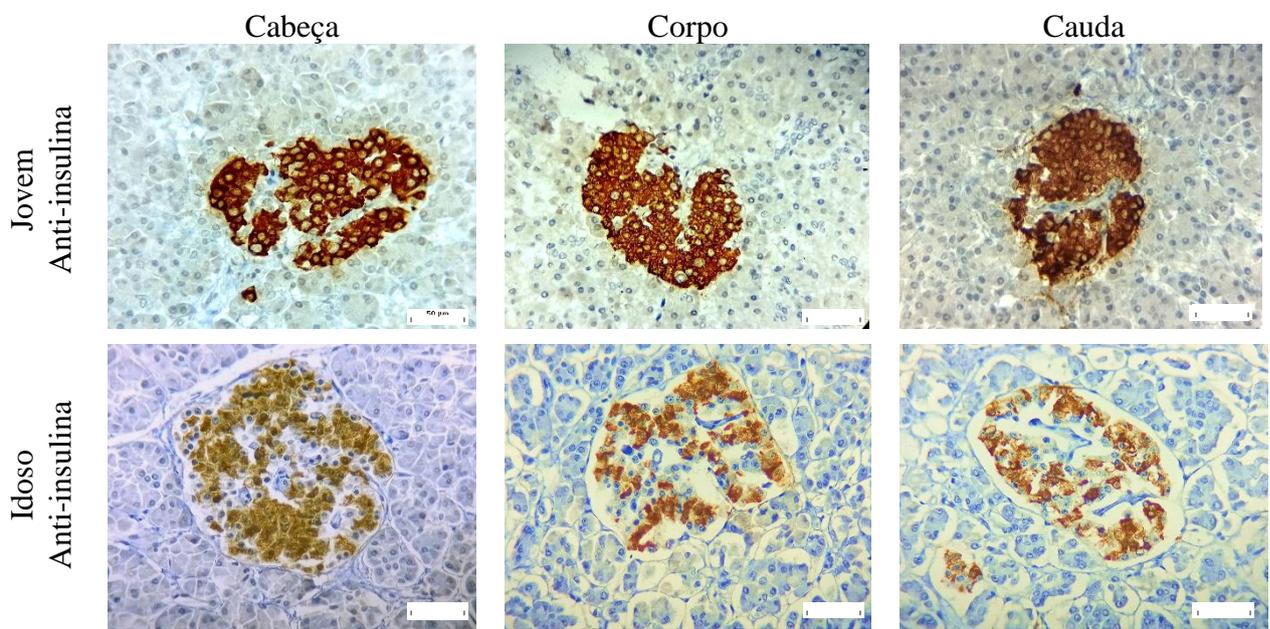
Legendas: Fotomicrografia da ilhota pancreática marcada por anti-CD31 em indivíduo jovem e indivíduo idoso. Barra de escala em 50µ, aumento de 400x.

Fonte: O autor, 2024.

4.4 Densidade de células alfa e beta na ilhota

Como o envelhecimento é acompanhado de uma perda da função endócrina do pâncreas, analisamos as quantidades de células beta e alfa, nas três regiões do pâncreas, através da marcação das ilhotas pancreáticas com anticorpos anti-insulina e anti-glucagon, respectivamente (figuras 17 e 18). A quantificação da marcação mostra que as células beta representam em torno de 54% da área da ilhota nas três regiões do pâncreas de adultos jovens. Já em idosos, há uma diminuição significativa de 20% em média na quantidade de células beta na cabeça, corpo e cauda. As células alfa estão presentes em menor quantidade e representam 12% em média da ilhota de adultos jovens, nas três regiões anatômicas. Em contraste com o que acontece com as células beta, a quantidade de células alfa não sofre alterações significativas com o envelhecimento (Tabela 4). E à semelhança dos outros componentes da ilhota investigados nesse estudo, as quantidades de células beta e alfa não diferiram entre as regiões do pâncreas, tanto em adultos jovens quanto em idosos (Tabela 5).

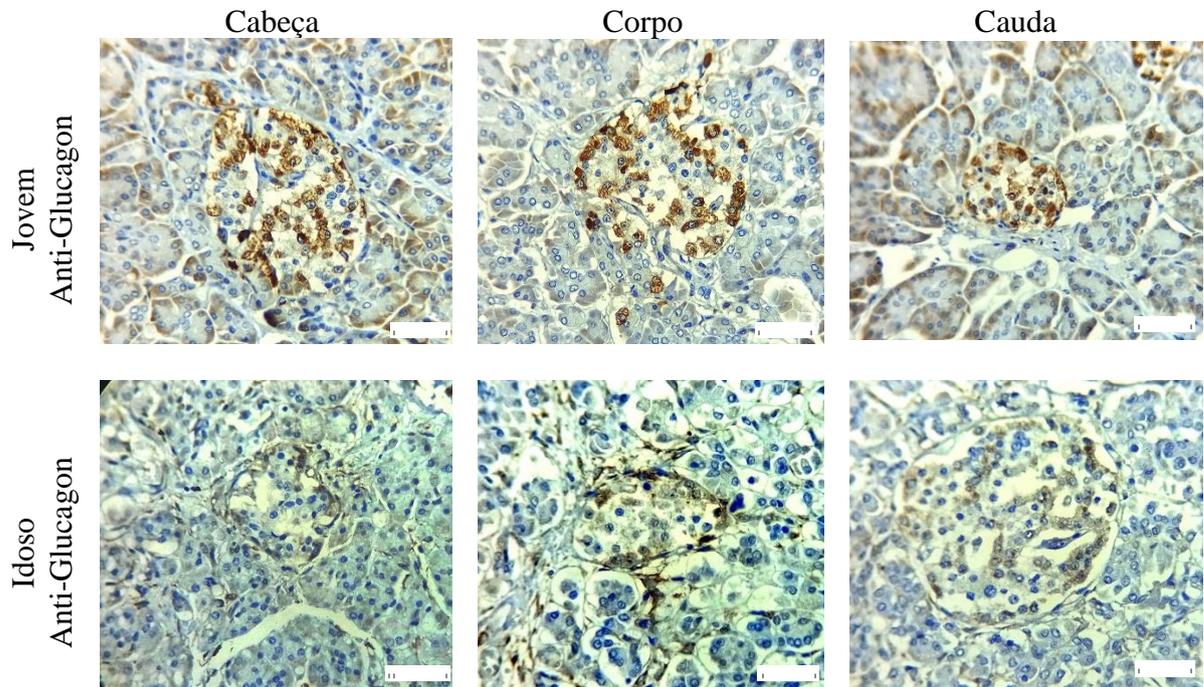
Figura 18 - Fotomicrografia de ilhotas pancreática humanas de jovens e idosos marcadas por anti-insulina.



Legendas: Fotomicrografia de ilhotas pancreáticas humanas marcada por anti-insulina demonstrando que jovens possui um perceptível aumento de células beta em relação a idosos. Barra de escala em 50 μ , aumento de 400x.

Fonte: O autor, 2024.

Figura 19 - Fotomicrografia de ilhotas humanas de jovens e idosos marcadas por anti-glucagon.



Legendas: Ilhotas pancreáticas humanas imuno marcadas por anti-glucagon de jovens e idosos, onde podemos evidenciar uma pequena diferença entre as duas faixas etárias. Barra de escala em 50µ, aumento de 400x.

Fonte: O autor, 2024.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo analisamos os componentes celulares e estromais da ilhota pancreática normal, em amostras de pâncreas obtidas de adultos jovens e idosos, com o objetivo de verificar: (a) se há alterações desses componentes associadas ao envelhecimento; e (b) se essas eventuais alterações podem ser correlacionadas com riscos para o desenvolvimento do DM2. Devido às características de nossas amostras, que eram desprovidas de um histórico médico, era portanto importante afastar tanto quanto possível eventuais comorbidades, incluindo o DM2. Considerando que o DM1 tem prevalência bem menor que o tipo 2 (GBD 2021 Diabetes Collaborators, 2023), e que no tipo 2 mais de 90% dos casos apresentam depósitos amiloide nas ilhotas pancreáticas (Mukherjee et al., 2015), nós inicialmente coramos todas as amostras de pâncreas com o vermelho Congo, que marca especificamente esses depósitos (Westermarck et al., 1999). Nas amostras de tecido selecionadas para o estudo, os resultados dessa coloração foram todos negativos, o que reduz consideravelmente a probabilidade de termos incluído casos com DM2. Portanto, com base nesses achados, e na aplicação de nossos critérios de exclusão, diferenças entre os grupos idosos e adultos jovens podem ser atribuídas com segurança ao fator envelhecimento.

Picro-Sirius

O DM2 está associado a respostas fibróticas no pâncreas, possivelmente mediadas por células esteladas. Por outro lado, a ocorrência de fibrose no pâncreas do idoso não diabético, principalmente na zona peri-ilhota e peri-vascular, foi inferida indiretamente através da expressão elevada de metaloproteinases, e tal evento poderia ser mais importante para fisiopatologia do DM2 do que perdas funcionais da célula beta (Almaça et al., 2014).

Portanto, não apenas há poucas evidências para essa resposta fibrótica, mas também não se sabe se ela ocorre de maneira diferente nas diversas regiões anatômicas do pâncreas. Nossos resultados sugerem que há uma perceptível área fibrótica nas amostras de pâncreas de idosos, principalmente em torno da ilhota. Nos adultos jovens, a área de colágeno peri-ilhota é menor, sugerindo que ocorre uma elevação de depósito de colágeno ao passar dos anos (Yang et al., 2016).

Perlecan

Com o envelhecimento, a marcação desse proteoglicano de heparan sulfato apresenta tendência de aumento nas três regiões do pâncreas, embora a diferença seja significativa apenas na cabeça do pâncreas do idoso, onde há aumento de 100% visto na tabela 4. Perlecan é um proteoglicano de membrana basal (Töpfer, 2023), e, portanto, esperaríamos que tivesse uma marcação semelhante à dos capilares, que são envoltos por esse tecido conjuntivo especializado. No entanto, a quantidade de capilares é relativamente pequena, correspondendo, na marcação de células endoteliais pelo CD31, a 1,5-2,0% da área da ilhota. Além disso, a micro vasculatura da ilhota não apresentou diferenças entre as faixas etárias. Por outro lado, a quantidade de perlecan é bem maior, variando de 15 a 32%, o que pode ser explicado pelo fato de que, além da membrana basal associada aos capilares, a ilhota pancreática humana possui membrana basal externa, formando uma cápsula que penetra na ilhota junto com capilares, dando assim origem a uma dupla membrana basal em torno de vasos (Virtanen et al., 2008). É importante observar também que membranas basais sofrem espessamento com o envelhecimento, como por exemplo, em capilares da retina e no glomérulo (Dybiec et al., 2022; Scioli et al., 2014), o que contribui ainda mais para a existência de maior quantidade de perlecan na ilhota de idosos, principalmente na região da cabeça do pâncreas. Conseqüentemente, há maior biodisponibilidade de cadeias de heparan sulfato nas ilhotas dessa região do pâncreas do idoso.

Essas cadeias por sua vez interagem com o IAPP (islet amyloid polypeptide, ou amylin), aumentando o depósito de amiloide citotóxico na ilhota, levando dessa forma à redução de células beta. Esse evento fisiopatológico é considerado como responsável pela progressão e agravamento do DM2 (Cardoso et al., 2023). Portanto, podemos inferir que a maior quantidade de heparan sulfato no ilhota pancreática de idoso, notadamente na cabeça, como mostrado por nossos resultados, predisporia as ilhotas, e principalmente dessa região, a uma maior formação de amiloide citotóxico. É importante observar que isso é consistente com achados experimentais, que mostram que a redução no número de células beta no DM2 ocorre preferencialmente na cabeça do pâncreas (Wang et al., 2013).

Syndecans

Os syndecans constituem uma família de proteoglicanos de superfície celular que desempenham uma ampla gama de funções na fisiologia normal das células, e estão envolvidos em várias desordens, como doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares, diabetes (Leonova & Galzitskaya, 2015), e câncer (Onyeisi et al., 2022). Assim como o perlecan, os syndecans também são proteoglicanos de heparan sulfato (Leonova & Galzitskaya, 2015).

Nossos resultados mostraram que a quantidade de syndecan-4 está diminuída em idosos. Como esse proteoglicano está ligado às membranas citoplasmáticas, essa redução pode estar associada à diminuição de células endócrinas da ilhota que ocorre com o envelhecimento, como confirmado por nossos resultados. Por outro lado, a quantidade desse proteoglicano na ilhota é bem menor que a do perlecan, de modo que a redução de syndecan-4 no idoso teria pouco efeito sobre a disponibilidade de cadeias de heparan sulfato na ilhota.

CD31 e SMA

Um fator importante na fisiologia normal de ilhota é a sua micro vasculatura. Esse fator foi assim analisado por meio da marcação de células endoteliais, com anticorpos anti-CD31, e de células de músculo liso, com anticorpos anti-SMA. Nenhum desses marcadores apresentou diferença significativa nas comparações entre adultos jovens e idosos (Tabela 4). Nota-se, no entanto, uma tendência para diminuição de células endoteliais e de músculo liso nos idosos, nas três regiões anatômicas do pâncreas, especialmente no corpo o que é consistente com os achados da vascularização, visto que essas células estão funcionalmente associadas aos capilares da ilhota. Como já observado em relação aos proteoglicanos, a concentração na ilhota de CD31 e SMA não apresenta diferenças significativas entre as regiões anatômicas do pâncreas, independente de faixa etária (Mateus Gonçalves & Almaça, 2021).

A redução nos capilares das ilhotas em indivíduos idosos pode ser devida ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial, o que leva à apoptose das células vasculares. A pronunciada fibrose peri-ilhotas em indivíduos idosos normais, juntamente com uma redução na vascularização intra-ilhotas, pode contribuir para o aparecimento de diabetes tipo 2, (UNGVARI et al., 2018).

Insulina e glucagon

A análise da marcação mostra que as células beta representam em torno de 54% da área da ilhota nas três regiões do pâncreas de adultos jovens. Já em idosos, há uma diminuição significativa de 20% em média na quantidade de células beta na cabeça, corpo e cauda, isso pode significar uma possível disfunção da ilhota na regulação de insulina ao passar dos anos. As células alfa estão presentes em menor quantidade e representam 12% em média da ilhota de adultos jovens, nas três regiões anatômicas. Em contraste com o que acontece com as células beta, a quantidade de células alfa não sofre alterações significativas com o envelhecimento, isso demonstra um dado importante na regulação do glucagon em indivíduos idosos, porque permanece com o mesmo potencial de produção dos jovens. Visto que já se sabe que o envelhecimento é acompanhado de uma perda da função endócrina do pâncreas, mas esta perda não ocorre nas células alfa. Em semelhança dos outros componentes da ilhota investigados nesse estudo, as quantidades de células beta e alfa não diferiram entre as regiões do pâncreas, tanto em adultos jovens quanto em idosos.

Limitações

A principal limitação desse estudo é o tamanho pequeno das amostras, o que reduz o "power" dos testes estatísticos, aumentando dessa forma o risco de erro estatístico tipo II. Entretanto, essa limitação é inerente a investigações que utilizam amostras de tecidos humanos normais que só podem ser obtidas durante necrópsia e que empregam métodos laboratoriais complexos. Essas investigações estão assim sujeitas a várias restrições logísticas, técnicas, e éticas. Por exemplo, no estudo mencionado anteriormente a respeito da diversidade morfológica da ilhota pancreática humana, certos dados sobre marcadores celulares, como CD31 e insulina, foram obtidos em grupos de cinco ou até de apenas um indivíduo (Dybala & Hara, 2019). De maneira similar, em uma análise genômica sobre mutações em neuroblastomas de crianças, adolescentes, e adultos jovens, alguns grupos tinham cinco ou seis indivíduos (Cheung et al., 2012). Gostaríamos de salientar que esses dois exemplos citados foram publicados em revistas médicas altamente conceituadas.

Uma outra limitação é a inexistência de registro médico para os corpos encaminhados ao Instituto Médico Legal e que não foram reclamados, o que torna possível haver "confounding factors" que poderiam afetar as variáveis em estudo. Essa possibilidade foi reduzida, no entanto, devido aos critérios de exclusão que estabelecemos para selecionar as amostras.

CONCLUSÃO

Baseado nas análises dos componentes celulares e estromais da ilhota pancreática normal, este estudo oferece “insights” valiosos sobre as mudanças associadas ao envelhecimento e suas potenciais implicações no desenvolvimento do DM2.

A ausência de depósitos amiloides nas ilhotas pancreáticas das amostras analisadas fornece uma base sólida para a exclusão de casos de DM2, permitindo assim uma investigação mais precisa sobre os efeitos do envelhecimento nos tecidos pancreáticos.

A observação da fibrose peri-ilhota, principalmente na zona peri-ilhota e peri-vascular, em amostras de pâncreas de idosos não diabéticos destaca a possível relevância dessa resposta fibrótica na patologia do DM2. A tendência de aumento na marcação do proteoglicano perlecan com o envelhecimento, especialmente na cabeça do pâncreas, sugere um potencial associação com o aumento do depósito de amiloide citotóxico na ilhota, contribuindo para a progressão do DM2.

Além disso, a diminuição da quantidade de syndecan-4 em idosos pode estar associada à redução de células endócrinas da ilhota, enquanto a análise da microvasculatura revela uma tendência para diminuição de células endoteliais e de músculo liso nos idosos, o que pode influenciar na vascularização das ilhotas.

A redução significativa na quantidade de células beta, enquanto as células alfa permanecem relativamente estáveis com o envelhecimento, destaca a importância da regulação do glucagon em indivíduos idosos e sugere uma possível disfunção na regulação da insulina ao longo dos anos.

Em suma, este estudo ressalta a complexidade das mudanças nos componentes celulares e estromais da ilhota pancreática relacionadas ao envelhecimento e destaca áreas potenciais para investigações futuras sobre as bases moleculares e fisiológicas do DM2 e outros distúrbios metabólicos relacionados à idade.

REFERÊNCIAS

- AMIN, M. B.; AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER; AMERICAN CANCER SOCIETY (EDS.). **AJCC cancer staging manual**. Eight edition / editor-in-chief, Mahul B. Amin, MD, FCAP ; editors, Stephen B. Edge, MD, FACS [and 16 others] ; Donna M. Gress, RHIT, CTR-Technical editor ; Laura R. Meyer, CAPM-Managing editor ed. Chicago IL: American Joint Committee on Cancer, Springer, 2017. Doi: 10.3322/caac.21388
- ABALYMOV, A. et al. Strategies for Anisotropic Fibrillar Hydrogels: Design, Cell Alignment, and Applications in Tissue Engineering. **Biomacromolecules**, v. 24, n. 11, p. 4532–4552, 13 nov. 2023. Doi: 10.1021/acs.biomac.3c00503
- ARROJO E DRIGO, R. et al. New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. **Diabetologia**, v. 58, n. 10, p. 2218–2228, out. 2015. Doi: 10.1007/s00125-015-3699-0
- BERGER, C. et al. Matrix decoded – A pancreatic extracellular matrix with organ specific cues guiding human iPSC differentiation. **Biomaterials**, v. 244, p. 119766, jun. 2020.
- BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 608–616, out. 2002.
- BOSCO, D. et al. Importance of cell-matrix interactions in rat islet beta-cell secretion in vitro: role of alpha6beta1 integrin. **Diabetes**, v. 49, n. 2, p. 233–243, 1 fev. 2000.
- CARDOSO LEM, MARINHO TS, Martins FF, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Treatment with semaglutide, a GLP-1 receptor agonist, improves extracellular matrix remodeling in the pancreatic islet of diet-induced obese mice. **Life Sci**. 2023;319:121502. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121502
- CARLOS ALBERTO MANDARIM DE LACERDA. **Métodos quantitativos em MORFOLOGIA**. 1 ed. Rio de Janeiro: EDUERJ, 1995: 131 p. ISBN: 9780294604672
- CAÑAMARES-ORBÍS, P.; GARCÍA-RAYADO, G.; ALFARO-ALMAJANO, E. Nutritional Support in Pancreatic Diseases. **Nutrients**, v. 14, n. 21, p. 4570, 31 out. 2022. Doi: 10.3390/nu14214570
- DOLENŠEK, J.; RUPNIK, M. S.; STOŽER, A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. **Islets**, v. 7, n. 1, p. e1024405, 2015. Doi: 10.1080/19382014.2015.1024405
- DRAKE, R. L. **Gray Anatomia Clinica Para Estudantes**. 4. ed. Rio de Janeiro, RJ: Grupo Gen, 2023. ISBN: 978-85-951512-0-8
- DYBALA MP, HARA M. Heterogeneity of the Human Pancreatic Islet. **Diabetes**. 2019;68:1230-1239. Doi: 10.2337/db19-0072
- DYBIEC J, SZLAGOR M, MŁYNARSKA E, Rysz J, Franczyk B. Structural and Functional Changes in Aging Kidneys. **Int J Mol Sci**. 2022;23(23):15435. doi: 10.3390/ijms232315435

EFRAT, S.; RUSS, H. A. Making β cells from adult tissues. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 278–285, jun. 2012. Doi: 10.1016/j.tem.2012.03.005

eIFU-Leica Biosystems. Disponível em: <https://files.leicabiosystems.com/LBS/BR/pt /All ?keycode=RE7280-CE&lot-range=RE7280_IVDD>. Acesso em: 29 dez. 2023.

ERASMO MAGALHÃES CASTRO DE TOLOSA. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. [s.l.] Editora Manole, 2003. v. 1ª edição ISBN: 85-204-1440-0

FADINI, G. P. et al. Angiogenic Abnormalities in Diabetes Mellitus: Mechanistic and Clinical Aspects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 104, n. 11, p. 5431–5444, 1 nov. 2019. Doi: 10.1210/jc.2019-00980

GARTNER, L. **Tratado De Histologia**. 5. ed. Rio de Janeiro, RJ: Grupo Gen, 2022.

GBD 2021 DIABETES COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. **Lancet (London, England)**, v. 402, n. 10397, p. 203–234, 15 jul. 2023. ISBN: 978-85-951588-0-1

HULL, R. L. et al. Hyaluronan: A Mediator of Islet Dysfunction and Destruction in Diabetes? **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 63, n. 8, p. 592–603, ago. 2015.

KAKAR S, PAWLIK TM, ALLEN PJ, Vauthey J-N. Exocrine pancreas. In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. **AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition**. Springer International Publishing, 2018. DOI 10.1007/978-3-319-40618-3_28

KIM, K. et al. The impact of diabetes status on total and site-specific cancer risk in the elderly population: A nationwide cohort study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 203, p. 110866, set. 2023. Doi: 10.1016/j.diabres.2023.110866

LEONOVA EI, GALZITSKAYA OV. Role of Syndecans in Lipid Metabolism and Human Diseases. **Adv Exp Med Biol**. 2015;855:241-58. doi: 10.1007/978-3-319-17344-3_10. PMID: 26149933.

LESNIKOVA I, SCHRECKENBACH MN, Kristensen MP, Papanikolaou LL, Hamilton-Dutoit S. Usability of immunohistochemistry in forensic samples with varying decomposition. **Am J Forensic Med Pathol**. 2018;39:185-191. doi: 10.1097/PAF.0000000000000408

LESNIKOVA, I. et al. Usability of Immunohistochemistry in Forensic Samples With Varying Decomposition. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 39, n. 3, p. 185–191, set. 2018. Doi: 10.1097/PAF.0000000000000408

LI G, PASSIAS P, KOZANEK M, Shannon BD, Li G, Villamil F, Bono CM, Harris M, Wood KB. Interobserver reliability and intraobserver reproducibility of powers ratio for assessment of atlanto-occipital junction: comparison of plain radiography and computed tomography. **Eur Spine J**. 2009;18:577-82. doi: 10.1007/s00586-008-0877-5

MALONE, J. I.; HANSEN, B. C. Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (DM2)? Or is it the opposite? **Pediatric Diabetes**, v. 20, n. 1, p. 5–9, fev. 2019. Doi: 10.1111/pedi.12787

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; FERNANDES-SANTOS, C.; AGUILA, M. B. Image analysis and quantitative morphology. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 611, p. 211–225, 2010. Doi: 10.1007/978-1-60327-345-9_17

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 75, n. 4, p. 469–486, dez. 2003. Doi: 10.1590/s0001-37652003000400006

MARINHO, T. DE S. et al. Intermittent fasting benefits on alpha- and beta-cell arrangement in diet-induced obese mice pancreatic islet. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 34, n. 3, p. 107497, mar. 2020. Doi: 10.1016/j.jdiacomp.2019.107497

MUKHERJEE A, MORALES-SCHEIHING D, BUTLER PC, SOTO C. Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. **Trends Mol Med**. 2015;21:439-49. Doi: 10.1016/j.molmed.2015.04.005

ONYEISI JOS, LOPES CC, GÖTTE M. Role of syndecan-4 in breast cancer pathophysiology. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2022;323:C1345-C1354. Doi: 10.1152/ajpcell.00152.2022

OSKARSSON, M. E. et al. Heparan Sulfate Proteoglycans Are Important for Islet Amyloid Formation and Islet Amyloid Polypeptide-induced Apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 24, p. 15121–15132, 12 jun. 2015. Doi: 10.1074/jbc.M114.631697

PANDEY, S.; DVORAKOVA, M. C. Future Perspective of Diabetic Animal Models. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets**, v. 20, n. 1, p. 25–38, 2020. Doi: 10.2174/1871530319666190626143832

QUITTOT, N. et al. Cell surface glycosaminoglycans exacerbate plasma membrane perturbation induced by the islet amyloid polypeptide. **The FASEB Journal**, v. 35, n. 2, fev. 2021. Doi: 10.1096/fj.202001845R

RAVI PK, PURKAIT S, SINGH SR, MISHRA PR. Decay score: a guide to the immunoreactivity of human pancreatic islets in autopsy specimen. **Folia Morphol (Warsz)**. 2022;81:101-106. Doi: 10.5603/FM.a2021.0002

SCIOLI MG, BIELLI A, ARCURI G, FERLOSIO A, ORLANDI A. Ageing and microvasculature. **Vasc Cell**. 2014;6:19. Doi: 10.1186/2045-824X-6-19

STREETER GL (1920) Weight, sitting height, head size, foot length and menstrual age of the human embryo. **Contr Embryol Carnegie Inst** 11:143–170

SUH, S.-H.; PAIK, I.-Y.; JACOBS, K. Regulation of blood glucose homeostasis during prolonged exercise. **Molecules and Cells**, v. 23, n. 3, p. 272–279, 30 jun. 2007. PMID: 17646701

SUI, J. et al. Islet Function Changes Among the Elderly Population. **Archives of Medical Research**, v. 50, n. 7, p. 468–475, out. 2019. Doi: 10.1016/j.arcmed.2019.10.013

TALUSAN P, BEDRI S, YANG S, KATTAPURAM T, SILVA N, ROUGHLEY PJ, STONE JR. Analysis of intimal proteoglycans in atherosclerosis-prone and atherosclerosis-resistant human arteries by mass spectrometry. **Mol Cell Proteomics**. 2005;4:1350-7. Doi: 10.1074/mcp.M500088-MCP200

THORENS, B. Neuronal regulation of glucagon secretion and gluconeogenesis. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 13, n. 4, p. 599–607, abr. 2022. Doi: 10.1111/jdi.13745

TÖPFER U. Basement membrane dynamics and mechanics in tissue morphogenesis. **Biol Open**. 2023;12:bio059980. Doi: 10.1242/bio.059980

UNGVARI, Z. et al. Mechanisms of Vascular Aging. **Circulation Research**, v. 123, n. 7, p. 849–867, 14 set. 2018. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.311378

WANG X, MISAWA R, ZIELINSKI MC, COWEN P, JO J, PERIWAL V, RICORDI C, KHAN A, SZUST J, SHEN J, MILLIS JM, WITKOWSKI P, HARA M. Regional differences in islet distribution in the human pancreas--preferential beta-cell loss in the head region in patients with type 2 diabetes. **PLoS One**. 2013;8:e67454. DOI: 10.1371/journal.pone.0067454

WESTERMARK GT, JOHNSON KH, WESTERMARK P. Staining methods for identification of amyloid in tissue. **Methods Enzymol**. 1999;309:3-25. Doi: 10.1016/s0076-6879(99)09003-5

VIJAN, S. Type 2 Diabetes. **Annals of Internal Medicine**, v. 171, n. 9, p. ITC65–ITC80, 5 nov. 2019. Doi: 10.7326/AITC201911050

VOLKER W, SCHMIDT A, BUDDECKE E. CYTOCHEMICAL CHANGES in a human arterial proteoglycan related to atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 1989;77:117-30. Doi: 10.1016/0021-9150(89)90073-7

ANEXO A – Termo de anuência IML

GOVERNO DO ESTADO
RIO DE JANEIROGoverno do Estado do Rio de Janeiro
Secretaria de Estado de Polícia Civil
Superintendência-Geral de Polícia Técnico-Científica
Centro de Estudos e Pesquisas Forenses**TERMO DE ANUÊNCIA**

Prezados Senhores,

Como Diretor do Centro de Estudos e Pesquisas Forenses da Superintendência Geral de Polícia Técnico-Científica na Instituição Secretaria de Estado de Polícia Civil do Rio de Janeiro, declaro estar ciente e de acordo com a proposta de estudo sob o título: **“Citoarquitetura da ilhota pancreática humana e suas semelhanças e diferenças com o modelo experimental em camundongos”**, sob a coordenação da Dr Luiz Eduardo de Macedo Cardoso. Informo que nada obsta para o desenvolvimento do estudo e que o Perito Legista Dr. Reginaldo Franklin e outros pesquisadores sob sua supervisão estão autorizados a desenvolver o projeto nas dependências do Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto.

Esta autorização conta antecipadamente com a responsabilidade dos pesquisadores quanto às seguintes premissas: as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do estudo e o pesquisador responsável se compromete a manter a confidencialidade sobre os dados coletados bem como a privacidade de seus conteúdos, como preconizam os Documentos Internacionais e a Resolução CNS nº 466/12 do Ministério da Saúde.

Rio de Janeiro, 19 de setembro de 2023.

Diego Rissi Carvalhosa
Perito LegistaDiretor do Centro de Estudos e Pesquisas Forenses
Secretaria de Estado de Polícia Civil

ANEXO B - Submissão a Plataforma Brasil CEP

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PEDRO ERNESTO DA
UNIVERSIDADE DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO - HUUERJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DISTRIBUIÇÃO DOS COMPONENTES CELULARES, VASCULARES, E ESTROMAIS DA ILHOTA PANCREÁTICA HUMANA EM AMOSTRAS DE ADULTOS JOVENS, IDOSOS E CAMUNDONGOS.

Pesquisador: Fabio Coelho Das Neves

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 77317624.0.0000.5259

Instituição Proponente: Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.840.818

Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteúdo registrado do protocolo "Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2278030" e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. O diabetes tipo 2 tem alta prevalência e está associado a diversas complicações (insuficiência renal, retinopatia, amputações) (Vijan, 2019) As ilhotas pancreáticas têm sido, portanto, intensamente investigadas. Por exemplo, foi recentemente demonstrado no nosso laboratório que os proteoglicanos de sulfato de heparano desempenham papéis fundamentais na diabetes tipo 2 (Cardoso et al. 2023). No entanto, certos aspectos da composição normal e da vascularização da ilhota humana não são bem conhecidos, especialmente quando se leva em conta a idade e a localização anatômica da ilhota. A distribuição regional da massa de células beta/ilhotas mostra um aumento gradual da cabeça à cauda (Olechnik et al., 2017), mas não se sabe se (a) outros componentes das ilhotas também variam de acordo com a localização anatômica; e (b) essa variação é afetada pela idade. Muitas destas questões são frequentemente investigadas utilizando modelos animais (Pandey & Dvorakova, 2020). Os roedores apresentam muitas vantagens experimentais, mas alguns autores alertam sobre limitações, inclusive anatômicas e histológicas (Dolensek et al., 2015) Estamos também investigando as alterações histológicas de células, vascularização, e estroma na ilhota pancreática em função da idade, pois alguns dados relevantes relativos ao desenvolvimento do

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Após análise do protocolo foi verificado o atendimento à legislação vigente e o protocolo encontra-se apto para início. Caso o pesquisador precise fazer Emenda ao Projeto, é obrigatório o envio antecipado de Relatório Parcial via Notificação. A Emenda só poderá ser solicitada após aprovação da Notificação com relatório parcial. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria ζ APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o item X.1.3.b, da Resolução CNS n. 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais - a contar da data de aprovação do protocolo - que permitam ao CEP

Endereço: Av. 28 de setembro, nº77 - CePeM - Centro de Pesquisa Clínica Multifusário - 2ª andar/sala nº 28 - prédio
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2668-8253 **E-mail:** cep@fupe.uerj.br