



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

Ana Lucia Rosa Nascimento

**Análise da expressão de células progenitoras pancreáticas em
camundongos obesos tratados com IGF-1**

Rio de Janeiro
2015

Ana Lucia Rosa Nascimento

**Análise da expressão de células progenitoras pancreáticas em camundongos
obesos tratados com IGF-1**

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole

Rio de Janeiro

2015

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

N266 Nascimento, Ana Lucia Rosa.

Análise da expressão de células progenitoras pancreáticas em camundongos obesos tratados com IGF-1 / Ana Lucia Rosa Nascimento. - 2015.

80 f.

Orientadora: Alessandra Alves Thole.

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

1. Diabetes mellitus - Teses. 2. Obesidade - Teses. 3. Fator de Crescimento Insulin-Like I – Metabolismo. 4. Receptor IGF Tipo 1 - Metabolismo. 5. Transplante de Células-Tronco. I. Thole, Alessandra Alves.. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.379-008.64

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

Assinatura

Data

Ana Lucia Rosa Nascimento

**Análise da expressão de células progenitoras pancreáticas em camundongos
obesos tratados com IGF-1**

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 4 dezembro de 2015.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

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

Rio de Janeiro

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me colocar de pé a cada dia .

Aos meus pais Narciso Moura Nascimento (*in memoriam*) e Helena Rosa Nascimento por todo o amor , estrutura familiar e valores morais que me deram. Amo vocês.

Ao meu grande companheiro , Fernando Teixeira de Souza, por ter estado ao meu lado em cada momento da minha trajetória, alegrando os meus dias.

Aos meus amigos Josefa da Silva Alves, Kátia Cristina Ferreira Lima, Francisco Fábio Barbosa, João Roberto de Campos Perez, Marcelo Gualter Raimundo, que sempre foram muito mais do que colegas de trabalho. Obrigada pelo carinho e apoio.

À Genilza Oliveira toda a minha gratidão, por todo o carinho, dedicação e ajuda durante todo o desenvolvimento do trabalho. Mesmo estando assoberbada sempre me estendeu a mão quando eu precisei.

Aos meus amigos Alan César Nunes de Moraes, Cherley Borba Vieira de Andrade e Verônica Soares de Matos, por todo o incentivo e ajuda primordiais para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Histologia e Embriologia, que me acolheram com carinho e respeito, me incentivando desde o início da minha trajetória profissional.

À minha orientadora, Alessandra Alves Thole, pela coragem e paciência ao me orientar.

“ Todo caminho é resvaloso. Mais cair não prejudica demais...
A gente levanta, a gente sobe, a gente volta...
O correr da vida é assim: esquenta e esfria, aperta e aí afrouxa.
Sossega e depois desinquieta
O que ela quer da gente é a coragem !”

João Guimarães Rosa

RESUMO

NASCIMENTO, Ana Lucia Rosa. *Análise da expressão de células progenitoras pancreáticas em camundongos obesos tratados com IGF-1*. 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O Diabetes mellitus é caracterizado principalmente por uma perturbação na homeostase da glicose e já é reconhecidamente uma epidemia global. Nas ilhotas pancreáticas, encontramos as células β que respondem aos níveis de glicose circulante, e secretam insulina para manter a normoglicemia. Para sustentar a demanda de insulina, as células β apresentam um balanço dinâmico entre replicação, hipertrofia, apoptose e em determinadas condições neogênese a partir de células progenitoras. Quando o processo de morte celular é maior que a reposição é criado um déficit funcional e o diabetes se estabelece. Portanto, é de grande interesse entender o mecanismo de regeneração das células β , seja através de replicação das células beta pré-existentes ou através da neogênese de células precursoras no próprio pâncreas. Nesse sentido, pretendemos avaliar a participação de células progenitoras na homeostase da ilhota pancreática de camundongos obesos após o tratamento com IGF-1. Para isso utilizamos camundongos swiss que foram divididos em grupo controle, alimentado com dieta padrão e grupo obeso, alimentado com dieta hiperlipídica, para indução de obesidade, uma vez que a obesidade promove a hipertrofia das ilhotas pancreáticas com o aumento da demanda de secreção de insulina. Após 11 semanas de dieta os camundongos foram tratados com IGF-1 durante 7 dias consecutivos. Nossos resultados demonstraram que o grupo obeso apresentou hipertrofia das ilhotas pancreáticas assim como alterações ultraestruturais nas células β . Houve uma diminuição da massa corporal e da adiposidade nos camundongos obesos tratados com IGF-1. Também observamos um maior índice de apoptose entre as células pancreáticas do grupo obeso, o que foi minimizado após o tratamento. Avaliamos o fator de transcrição Pdx1, importante para formação e manutenção das células β e observamos que no grupo obeso esse conteúdo estava diminuído e após o tratamento a expressão desse fator ficava semelhante ao grupo controle. Em relação as células progenitoras analisadas (CD105, c-Kit e CD133), observamos que apenas as células CD133 estão presentes nas ilhotas pancreáticas dos animais obesos e permanecem após o tratamento com IGF-1. Embora não tenhamos verificado aumento significativo da expressão de células progenitoras nos camundongos tratados com IGF-1, acreditamos no seu potencial terapêutico, através da redução da obesidade, e melhora no quadro de diabetes mellitus tipo 2.

Palavras-chave: Diabetes mellitus, Obesidade, IGF-1, Células progenitoras.

ABSTRACT

Nascimento, Ana Lucia Rosa. *Expression of pancreatic progenitor cells in obese mice treated with IGF-1*. 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Diabetes mellitus is mainly characterized by a disruption in glucose homeostasis and is already recognized as a global epidemic. In pancreatic islets, β cells secrete insulin in response to glucose levels, to maintain normoglycemia. To sustain insulin demand, β cells present a dynamic balance between replication, hypertrophy, apoptosis and in certain conditions neogenesis from progenitor cells. When cell death is greater than the replacement is created a functional impairment and diabetes is established. It is of great interest to understand the mechanism of regeneration β cells, either by replication of preexisting β cells or neogenesis of progenitor pancreas cells. Therefore, we intend to evaluate the participation of progenitor cells in homeostasis of pancreatic islet of obese mice following treatment with IGF-1. In this study we use swiss mice which were separated in a control group, fed with standard diet, and obese group, fed with high-fat diet to induce obesity, since obesity promotes pancreatic islets hypertrophy with increasing insulin secretion. After 11 weeks of diet the mice were treated with IGF-1 for 7 consecutive days. Our results demonstrate that the obese group showed hypertrophic pancreatic islets as well as ultrastructural changes in β cells. There was a decrease in body weight and adiposity in obese mice treated with IGF-1. We also observed a higher rate of apoptosis of pancreatic cells in the obese group, which was minimized after IGF-1 treatment. Evaluation of Pdx1, an important transcription factor for formation and maintenance of β cells, showed a lower content in obese group. However, after treatment with IGF-1 the expression of Pdx1 was similar to the control group. Regarding the progenitor cells (CD105, c-Kit and CD133), we observed that only CD133 cells were present in pancreatic islets of obese animals and remained after treatment with IGF-1. Although we have not found significant expression of progenitor cells in mice treated with IGF-1, we believe their therapeutic potential through the reduction of obesity, and improvement of diabetes mellitus type 2.

Keywords: Diabetes mellitus, Obesity, IGF-1, progenitor cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema representativo da morfologia do pâncreas.....	16
Figura 2 –	Esquema representativo da morfologia de uma ilhota de Langerhans.....	17
Figura 3 –	Esquema representativo do desenvolvimento do pâncreas.....	19
Figura 4 –	Esquema representativo da secreção de insulina.....	20
Figura 5 –	Esquema representativo dos efeitos causados pela obesidade e resistência à insulina.....	24
Figura 6 –	Esquema representativo do processo de hipertrofia e falência ilhotas pancreáticas.....	25
Figura 7 –	Esquema representativo dos receptores de insulina , IGF-1 e híbridos, e seus efeitos intracelulares.....	31
Figura 8 –	Esquema representativo de diferentes estratégias para a geração de novas células β	33
Figura 9 –	Gráfico representativo da variação de massa corporal dos camundongos dos GC e GO, antes do tratamento com IGF-1.....	43
Figura 10 –	Gráfico representativo da variação de massa corporal dos camundongos, após o tratamento com IGF-1.....	45
Figura 11 –	Gráfico representativo do teste intraperitoneal de tolerância à glicose.....	46
Figura 12 –	Gráfico representativo da área sob a curva.....	46
Figura 13 –	Gráfico representativo da quantificação de insulina pelo método de ELISA.....	47
Figura 14 –	Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas, com imunomarcção para insulina, de GC e CG+IGF-1.....	49
Figura 15 –	Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas, com imunomarcção para insulina, de GO.....	50
Figura 16 –	Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas, com imunomarcção para insulina de GO+IGF-1.....	51
Figura 17 –	Eletromicrografia de ilhota de pancreática de camundongo do GC.....	53

Figura 18 – Eletromicrografia de ilhota de pancreática de camundongo de GC+IGF-1.....	54
Figura 19 – Eletromicrografia de ilhota de pancreática de camundongo do GO.....	55
Figura 20 – Eletromicrografia de ilhota de pancreática de camundongo do GO+IGF-1.....	56
Figura 21 – Gráfico representativo da razão BAX/BCL2 no pâncreas, quantificada por western blotting.....	57
Figura 22 – Gráfico representativo da expressão de Pdx1 no pâncreas, quantificada por western blotting.....	58
Figura 23 – Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas, com imunomarcção para Pdx1 nos GC e GC+IGF-1.....	59
Figura 24 – Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas, comImunomarcção para Pdx1 de GO e GO+IGF-1.....	60
Figura 25 – Gráfico representativo da expressão de CD-105 no pâncreas, quantificada por western blotting.	61
Figura 26 – Fotomicrografia de pâncreas marcado por imunofluorescência, para insulina e CD-105.....	62
Figura 27 – Gráfico representativo da expressão de c-Kit no pâncreas, quantificada por western blotting.....	63
Figura 28 – Fotomicrografia de pâncreas marcado por imunofluorescência, para insulina e c-Kit.....	64
Figura 29 – Gráfico representativo da expressão de CD-133 no pâncreas, quantificada por western blotting.....	65
Figura 30 – Fotomicrografia de pâncreas marcado por imunofluorescência, para insulina e CD-133 dos grupos GC e GC+IGF-1.....	66
Figura 31 – Fotomicrografia de pâncreas marcado por imunofluorescência, para insulina e CD-133 dos grupos GO e GO+IGF-1.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição das dietas controle e ocidental.....	37
Tabela 2 –	Parâmetros biométricos e bioquímicos após tratamento com IGF-1.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACDP	Adenocarcinoma ductal pancreático
ADP	Adenosina diifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CD-105	Endoglina, marcador de células-tronco mesenquimais
CD-133	Marcador de células-tronco endoteliais
CEUA	Comitê de Ética para o cuidado e Uso de Animais experimentais
C-Kit	Receptor tirosina-quinase, marcador de células-tronco hematopoiéticas
CTM	Células-tronco mesenquimais
DAB	Diaminobenzidina
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
GH	Hormônio do crescimento
GIP	Polipeptídeo insulínico dependente de glicose
GLP- 1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLUT	Transportador de glicose
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGF-1R	Receptor de IGF-1
IL-1	Interleucina 1
IMC	Índice de massa corporal
IR	Receptor de insulina
MC	Massa corporal
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
Ngn3	Neurogenina 3
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pancreatite aguda
PBS	Tampão fosfato- salino
PBS/BSA	Tampão fosfato- salino/ albumina bovina
PDX1	Fator de transcrição homeobox pancreático e duodenal
RE	Retículo endoplasmático

ROS	Espécies reativas de oxigênio
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
WB	Western blotting

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
°C	Graus Celsius
ε	Epsilon
Kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
pg	picograma
pH	Potencial de Hidrogênio
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
μg	Micrograma
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	35
1.1	Objetivo geral	36
1.2	Objetivos específicos	36
2	MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1	Modelo experimental de obesidade	37
2.2	Tratamento com fator de crescimento (IGF-1)	38
2.3	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)	38
2.4	Dosagem de insulina plasmática	39
2.5	Histologia	39
2.6	Imunofluorescência	40
2.7	Imunoperoxidase	40
2.8	Microscopia eletrônica de transmissão	41
2.9	Western blotting	41
2.10	Análises Estatísticas	42
3	RESULTADOS	43
3.1	Parâmetros biométricos e bioquímicos	43
3.2	Avaliação Morfológica da Ilhota Pancreática	47
3.2.1	<u>Imunoperoxidase para insulina</u>	47
3.2.2	<u>Microscopia Eletrônica de Transmissão</u>	52
3.3	Análise da morte e sobrevivência das células β	57
3.3.1	<u>Quantificação da razão Bax/Bcl-2 por western blotting</u>	57
3.3.2	<u>Quantificação da expressão de Pdx1 por western blotting</u>	58
3.3.3	<u>Imunoperoxidase para Pdx1</u>	58
3.4	Avaliação de células progenitoras no pâncreas	61
3.4.1	<u>CD-105</u>	61
3.4.2	<u>c-Kit</u>	63
3.4.3	<u>CD-133</u>	64
4	DISCUSSÃO	68
	CONCLUSÕES	74

REFERÊNCIAS	75
ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentai.....	79
ANEXO B – Comprovação de Submissão de artigo.....	80

INTRODUÇÃO

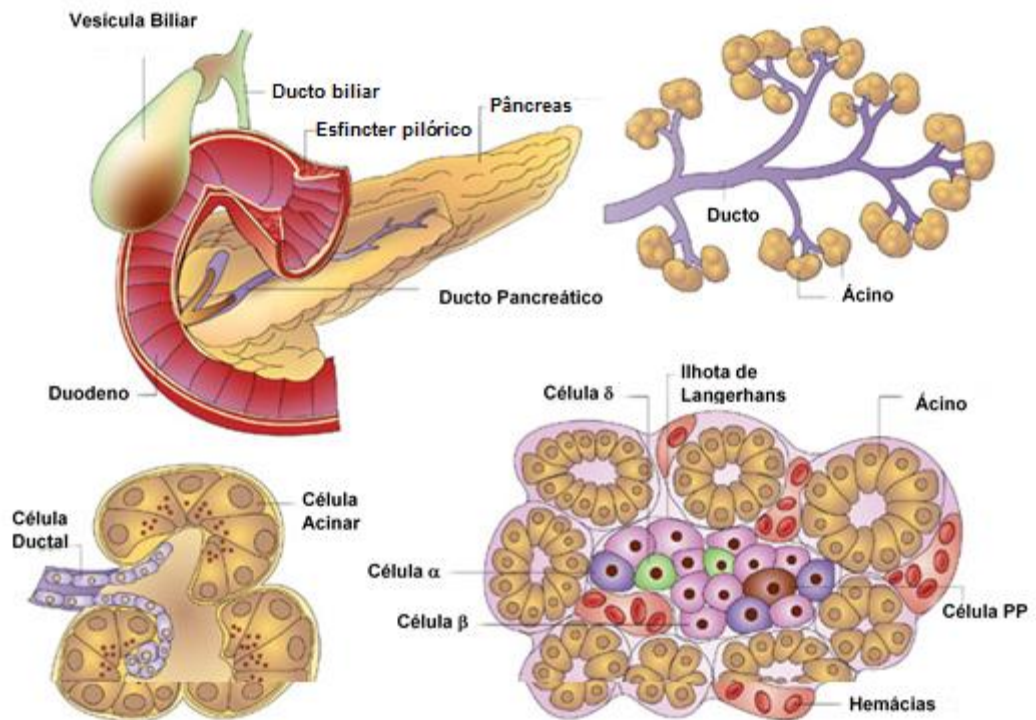
Nosso organismo possui a capacidade de replicar suas células ou regenerá-las através de células progenitoras para manter a homeostase fisiológica do nosso corpo. Quando essa capacidade é perdida, se estabelece um déficit e o funcionamento dos órgãos pode ficar comprometido. Vários estudos vêm buscando por metodologias que possam fazer o reparo de células perdidas e manter a função dos órgãos. No caso do pâncreas, a perda das células β resultam na deficiência de secreção de insulina o que leva ao desenvolvimento do Diabetes, uma doença metabólica que reflete na desregulação da homeostase da glicose no nosso organismo.

A obesidade tem sido considerada uma grande epidemia em todo o mundo nas últimas décadas e tem sido relacionada com o risco de desenvolvimento de comorbidades, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão e doenças cardiovasculares. Durante o desenvolvimento do DM2 inicia-se um processo de resistência à insulina, hiperinsulinemia e hiperplasia de células β , que se desenvolvem para compensar a falta relativa de insulina. Com o avanço da doença ocorre então a falência e apoptose das células β . Portanto, escolhemos o modelo de obesidade para avaliar o mecanismo compensatório que o pâncreas desenvolve para recuperar as células β que caminham para falência e desenvolvimento de DM2. Várias estratégias terapêuticas têm sido propostas na tentativa de se reparar os danos causados pelo DM2 e de restaurar as funções das células β . Com essa finalidade, avaliamos que tipos de células progenitoras estariam envolvidas nesse processo e se o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1) poderia melhorar a capacidade de regeneração das células β .

Morfologia do pâncreas

O pâncreas maduro é um órgão complexo que tem compartimentos endócrino e exócrino, morfológica e funcionalmente distintos (Reichert e Rustg, 2011). A região exócrina é formada por células acinares e ductais, representando 95-99% do pâncreas. As células endócrinas formam agregados dispersos ao longo do pâncreas exócrino, sob a forma de ilhotas de Langerhans (Jain e Lammer, 2009), observadas na figura 1.

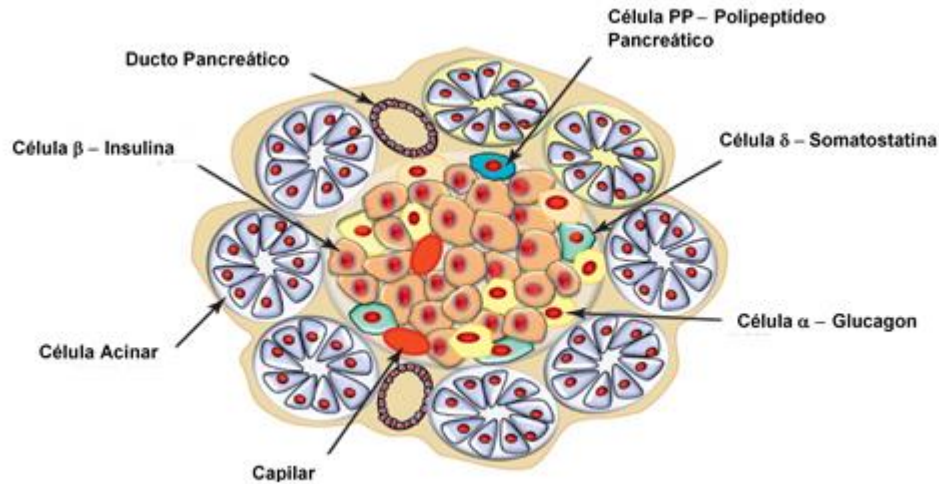
Figura 1 - Esquema representativo da morfologia do pâncreas, mostrando seus diversos compartimentos e tipos celulares



Fonte: Adaptado de Efrat e Russ, 2012.

As ilhotas são formadas por cinco tipos de células endócrinas definidas de acordo com o tipo de hormônio que elas secretam. São elas: as células β , produtoras de insulina; as células α , produtoras de glucagon; células δ produtora de somatostatina, células ϵ produtoras de grelina e células PP, produtoras de polipeptídeo pancreático. As ilhotas de camundongos adultos são formadas por aproximadamente 75% de células β , 20% de células α e 5% de outras células do sistema endócrino (Cano et al., 2014).

Figura 2 - Esquema representativo da morfologia de uma ilhota de Langerhans, com as porções exócrina e endócrina.



Fonte: Adaptado de Trends in Endocrinology and Metabolism, 2012.

Desenvolvimento do pâncreas

O desenvolvimento do pâncreas em roedores apresenta semelhanças com os seres humanos. No entanto, as células só funcionarão como verdadeiras células endócrinas no final do primeiro trimestre em humanos (Piper et al, 2004), e em ratos isto ocorre apenas durante o último terço da gestação (Reusens e Remacle, 2006).

As células endoteliais fornecem sinais indutores que promovem o desenvolvimento do pâncreas, e no embrião, células β pancreáticas necessitam desses sinais endoteliais para sua diferenciação e funcionamento. O tecido mesenquimal, rico em capilares penetra neste grupo de células endócrinas imaturas, que se tornam as ilhotas de Langerhans (Frantz et al., 2012).

O Pâncreas é um órgão do sistema digestório, que desempenha um papel central na manutenção de níveis adequados de glicose no sangue. No camundongo, o desenvolvimento do pâncreas começa por volta E8.5, dia do desenvolvimento embrionário (Jacquemin et al, 2006). Em resposta a sinais provenientes dos tecidos mesodérmicos, ocorre a formação de duas evaginações da endoderme do intestino primitivo para formar o broto pancreático dorsal e, em seguida, o broto pancreático ventral (Reusens e Remacle, 2005). Os dois brotos primordiais pancreáticos (dorsal

e ventral), contêm células progenitoras multipotentes que expressam o fator de transcrição homeobox pancreático e duodenal, o Pdx1.

O destino final das células endócrinas é determinado pela expressão de uma série de fatores de transcrição específicos para cada tipo celular do sistema endócrino. A expansão mais rápida da massa de células β ocorre no final da gestação e a remodelação e maturação adicional ocorre logo após o nascimento (Frantz et al., 2012).

Expressão de Pdx1 aparece durante E8.5 na endoderme ventral e dorsal da porção distal do estômago e no epitélio duodenal (Frantz et al., 2012). Posteriormente, a expressão de Pdx1 se torna restrita à linhagem de células β .

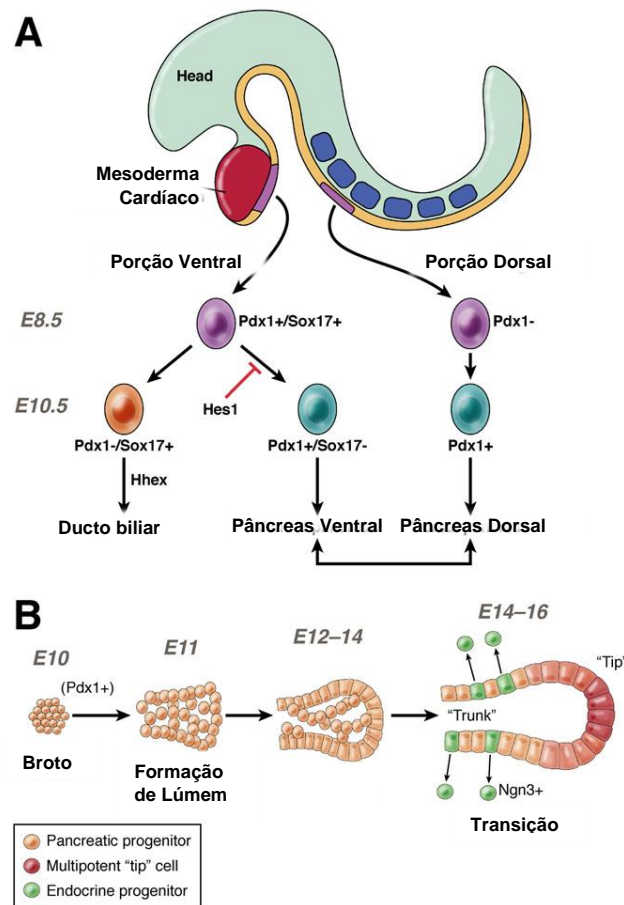
O Pdx1 também desempenha um papel importante no desenvolvimento do pâncreas, sendo necessário para morfologia pré-natal do órgão, manutenção pós-natal de produção de insulina, sensibilidade à glicose e controle do equilíbrio entre componentes endócrinos e exócrinos (Sandovici et al., 2013).

A rotação do intestino em E11.5, leva à fusão dos brotos pancreáticos, e sua expansão para o mesênquima. Entre E12 e E14, as células progenitoras do ducto produtoras de Pdx1 localizados numa posição central dos brotos pancreáticos em desenvolvimento, em justaposição com a vascularização, seguem uma trajetória endócrina. Esse percurso é inicialmente marcado pela expressão do fator de transcrição Ngn3 (neurogenina3). Vários fatores de transcrição atuam em conjunto com a Ngn3, regulando a formação de vários tipos celulares dentro das ilhotas.

Expressão de neurogenina 3, outro fator de transcrição envolvido no desenvolvimento do pâncreas, começa no E9 ou E9.5, com picos em E15.5 durante a formação da maior parte das células endócrinas, e é muito reduzida no nascimento, com pouca ou nenhuma expressão no pâncreas adulto. Outros fatores de transcrição, Pax4 e Arx, desempenham papéis cruciais e antagonistas na distribuição das linhagens endócrinas. O subtipo: Pax4 orienta o destino das células β e δ , enquanto Arx promove o desenvolvimento de células α e PP (Jain e Lammert, 2009).

Por volta de E15.5 a especificação do destino de todos os tipos de células do sistema endócrino é concluída. A migração das células endócrinas diferenciadas e a formação das ilhotas de Langerhans ocorrem entre E16.5 e o nascimento (Figura 3).

Figura 3 - Esquema representativo do desenvolvimento do pâncreas.



Fonte: Adaptado de Stanger e Hebrok, 2013.

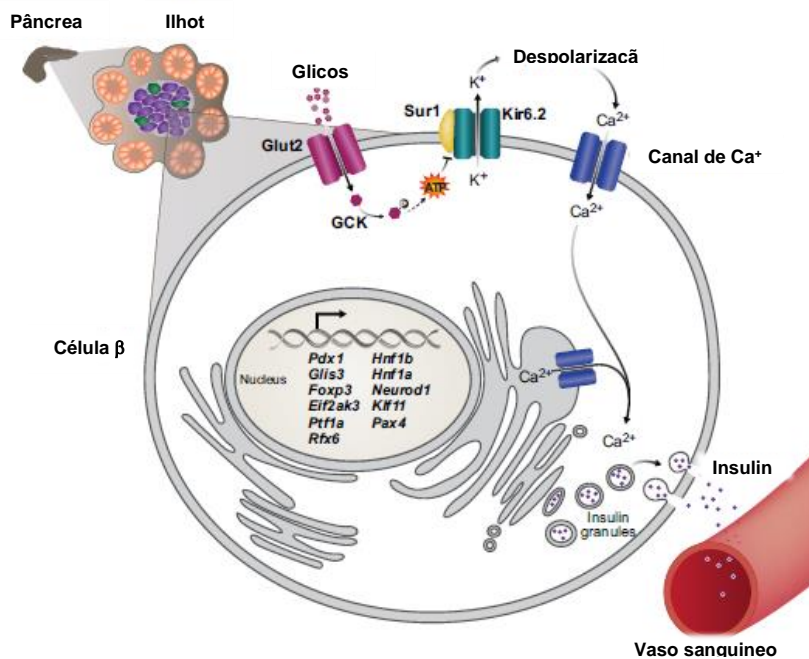
Produção de insulina

A insulina, que é secretada a partir de células β pancreáticas, é o hormônio chave na regulação do metabolismo da glicose. A secreção de insulina é um processo altamente dinâmico regulado por mecanismos complexos. É regulado por estado dos nutricional, fatores hormonais, como o hormônio gastrointestinal incretina ,ou seja , o peptídeo semelhante ao glucagon 1 - GLP- 1 e polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP).

A glicose é transportada para dentro da célula β por transportadores de glicose (GLUT) e em seguida metabolizados. Isso conduz a um aumento na concentração de ATP (ou ATP/ADP), ao fechamento de canais de K^+ (KATP) ATP-sensível, a despolarização da membrana celular β , e a abertura de canais de Ca^{2+}

dependentes de voltagem, permitindo assim o influxo de Ca^{2+} . O aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular provoca a secreção de insulina pelas células β (Seino et al., 2011), como mostra a figura 4.

Figura 4 - Esquema representativo da secreção de insulina por célula β em resposta ao aumento do nível de glicose.



Fonte: Adaptado de Pagliuca e Melton, 2013.

Patologias encontradas no pâncreas

O pâncreas pode apresentar alterações patológicas importantes para a fisiologia do sistema digestório e metabolismo da glicose.

Pancreatite

A gravidade da pancreatite aguda (PA) está associada ao fato da resposta inflamatória ser resolvida ou amplificada, formando uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Baixo grau de inflamação persistente é uma característica de pancreatite crônica. A inflamação crônica pode ser provocada por pancreatite, obesidade, fatores genéticos ou ambientais (Gukovsky et al., 2013).

O adenocarcinoma ductal pancreático é o tipo mais comum de câncer de pâncreas e é notável por sua agressividade, imunossupressão, e a resistência à terapias. Dois tipos de inflamação podem contribuir para iniciação e progressão do ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático). Uma delas é a inflamação crônica provocada por pancreatite, obesidade, genética ou fatores ambientais, e a outra é associada à inflamação do tumor (Gukovsky et al., 2013).

Esteatose pancreática

A esteatose é uma outra patologia que pode acometer o pâncreas e este termo pode ser usado para a descrição ao acúmulo de todos os tipos de gordura. Pode estar relacionada à substituição de células pancreáticas por adipócitos em associação com obesidade e outras diferentes síndromes clínicas como diabetes mellitus tipo 2 e o câncer de pâncreas (Smits and van Geenen, 2011).

O Diabetes Mellitus

O Diabetes mellitus é caracterizado principalmente por uma perturbação na homeostase da glicose e já é reconhecido como uma epidemia global. Diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 constituem os dois principais tipos de diabetes (Zhao et al, 2013).

A prevalência de diabetes mellitus está aumentando dramaticamente no mundo inteiro. Em 2010, o diabetes afetou cerca de 285 milhões de pessoas em todo o mundo e é esperado um aumento de 1,5 vezes (439 milhões de pessoas) para 2030 (Back e Randal, 2012).

O Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) está associada com uma predisposição genética e é uma doença caracterizada por uma deficiência de insulina como consequência da destruição de células β pancreáticas, mediada por autoimunidade (Feng et al, 2015). A apoptose de células β pancreáticas é o passo final do desenvolvimento de DM1, levando à uma diminuição crítica da massa de células β , contribuindo para o aparecimento de hiperglicemia (Quan et al.,2013).

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é a doença metabólica mais prevalente no mundo e é caracterizada por defeitos na secreção de insulina e uma resistência periférica à insulina no músculo esquelético, no tecido adiposo e fígado (Esser et al, 2014).

Em ambos estados diabéticos, as células β são expostas a um ambiente hiperglicêmico que resulta na deterioração progressiva das células β , perda função e a indução de apoptose das mesmas.

A resistência à insulina comumente visto em obesidade é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de DM2. A resistência à insulina somente não é suficiente para causar diabetes (Esser et al, 2014).

No entanto, a disfunção das células β , com incapacidade de secreção de insulina para compensar a resistência é a causa primária de ambos os tipos de diabetes mellitus, sendo essencial para a instalação da patologia (Roat et al, 2014).

Percebe-se cada vez mais que DM2 só se desenvolve em indivíduos com resistência à insulina com o aparecimento da disfunção de células β . Nos estados insulino-resistentes, as ilhotas pancreáticas geralmente respondem por aumentar a secreção de insulina para manter a normoglicemia, em um processo denominado compensação celular. A compensação envolve a expansão da massa células β , aumento na biossíntese de insulina e aumento da capacidade de secreção em resposta à entrada de nutrientes (Prentki e Nolan, 2006). O nível de insulina sistêmica pode ser aumentado por um dos dois mecanismos gerais: aumento da secreção de insulina pelas células β e aumento do número total destas células (Kimple et al, 2014).

A ligação da insulina aos seus receptores (IR) regula a captação de glicose a partir da circulação por induzir a translocação de transportadores de glicose a partir do citoplasma para a membrana plasmática. A insulina promove a absorção de glicose em tecido adiposo e muscular, estimula a síntese de glicogênio no fígado e nos músculos, e lipogênese nos adipócitos. Finalmente, a insulina também é um fator de crescimento que determina o crescimento de células e inibe apoptose (Giustina et al, 2015).

Durante o período pré-clínico, as células β pancreáticas respondem a resistência à insulina através do aumento da massa celular (hiperplasia de células β) e secreção de insulina (hiperinsulinemia). Quando essa expansão anatômica ou funcional das células β falha para compensar a resistência à insulina, o DM2 se manifesta (Quan et al., 2013).

Células β pancreáticas possuem um retículo endoplasmático (RE) altamente desenvolvido, necessário para o empacotamento e exportação de insulina. Estudos

demonstraram que as células β são particularmente sensíveis a disfunção do RE, induzida por estresse (Laybutt et al. 2007).

Estudos mostram que o estresse do RE contribui para a perda de células β e a resistência à insulina, tendo, portanto, um papel importante na patogênese do diabetes. Muitos estímulos podem desencadear o estresse do RE em células β , incluindo hiperglicemia e/ou estados de hiperlipidemia, depósitos de amilóide, e citocinas inflamatórias (Zhao et al, 2013).

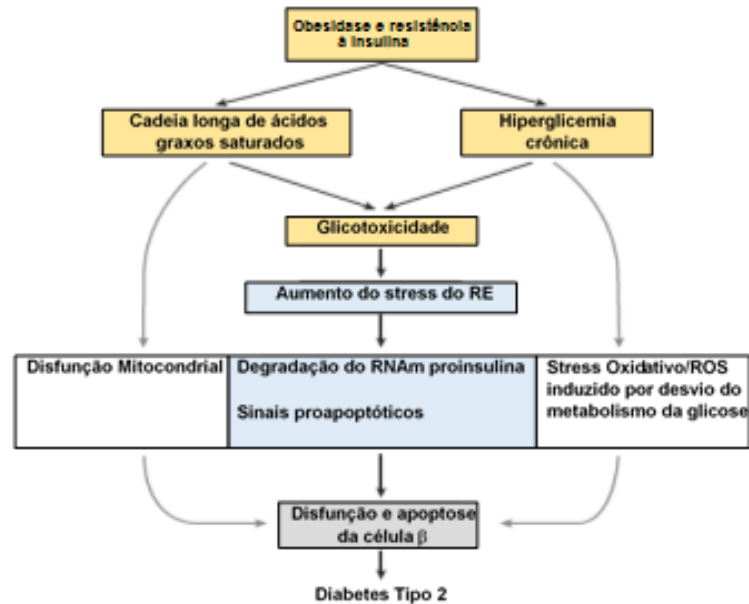
O Pdx1, um fator chave de transcrição para o desenvolvimento e manutenção do fenótipo maduro de células β , também regula função do RE. Pdx1 regula genes envolvidos na formação e empacotamento de proteínas (Cnop et al, 2012).

A proinsulina sintetizada no RE, é processada para a sua forma biologicamente ativa e armazenada em grânulos secretores. Quando os níveis de glicose no sangue aumentam, a insulina é liberada a partir de grânulos de armazenamento e mantem um nível de glicose normal no sangue. Alterações do nível de glicose no sangue levar a um aumento máximo de 25 vezes na síntese de pró-insulina, e por conseguinte, a síntese de pró-insulina impõe um fardo pesado sobre a biossíntese de células β (Back e Kaufman, 2012).

Esta resposta é um mecanismo adaptativo, especialmente importante em células secretoras, que serve para expandir dinamicamente tanto o tamanho do RE e a sua capacidade, de acordo com a demanda funcional, levando ao caminho da exocitose de insulina (Cnop et al, 2012). Este mecanismo de estresse é acionado em vários órgãos como fígado, músculo, tecido adiposo e pâncreas e em condições relacionadas à obesidade e diabetes tipo 2.

Quando o aumento da síntese de proteínas se torna crônico, ocorre um aumento no número de ribossomos e o estresse do RE se intensifica, podendo resultar em um esgotamento das células β pancreáticas (Asahara et al, 2009). Deste modo, pode causar glicotoxicidade, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) no RE regulados por estresse, levando à diminuição da expressão do gene da insulina, falência das células β e apoptose. O estresse do RE, via ROS é uma das principais causas para o início e/ou a progressão da diabetes tipo 2 (Figura 5) (Back e Kaufman, 2012).

Figura 5 - Esquema representativo dos efeitos causados pela obesidade e resistência à insulina, no retículo endoplasmático.



Fonte: Adaptado de Back e Kaufman, 2012.

A Obesidade e o Pâncreas

A obesidade está intimamente associada com um aumento em doenças tais como diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), hipertensão, esteatose hepática, doenças cardiovasculares, doenças das vias aéreas, neurodegeneração, e vários tipos de câncer (Gregor e Hotamisligil, 2011). Cerca de 90% dos pacientes com DM2 têm um IMC de 23,0, ou seja, ainda não são obesos. Esse risco de desenvolver o diabetes é grandemente aumentado por uma história familiar da doença ou diabetes gestacional e ganho de peso precoce.

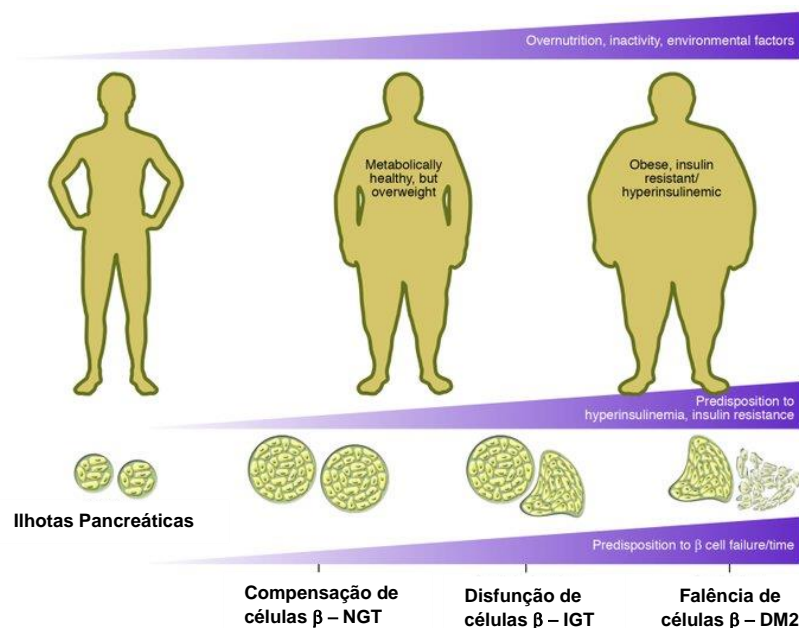
A inflamação crônica induzida pela obesidade pode ser melhor descrita como uma resposta inflamatória de baixo grau iniciada pelo excesso de nutrientes nas células. Inflamação e autofagia são mecanismos de defesa celular. Quando esses processos são desregulados (deficientes ou superativados) eles produzem efeitos patológicos, tais como estresse oxidativo, deficiências metabólicas e morte celular (Gregor e Hotamisligil, 2011). A inflamação é uma característica fundamental, presente em diversas desordens pancreáticas. A associação da obesidade com o

desenvolvimento de DM2 pode estar relacionada com a secreção de adipocinas pelo tecido adiposo através da modulação da sensibilidade à insulina.

No DM2, que está relacionado com o sobrepeso e obesidade, há uma perda parcial de células β variável de acordo com o grau de resistência à insulina e defeito na produção de insulina pela célula β (Cnop, Welsh *et al.*, 2005). Já foi descrito em modelos animais, que a população de células β aumenta após a ligação do ducto pancreático (Wang, Kloppel *et al.*, 1995) no DM2 e obesidade (Chua, Liu *et al.*, 2002) e durante a gravidez (Sorenson e Brelje 1997). Ou seja, quando ocorre um aumento na demanda de insulina, as células β demonstram sua capacidade de regeneração. Portanto o modelo de obesidade se mostra eficiente para a análise de mecanismos de regeneração das células β mesmo durante a vida adulta.

Em resposta à hiperinsulinemia e resistência à insulina as células β tentam uma compensação, resultando em hipertrofia das ilhotas. Como consequência, os indivíduos progridem de um quadro de tolerância à glicose (NGT) para intolerância à glicose (IGT) e falência das células β , estabelecendo o DM2, como mostra a figura 6.

Figura 6 - Esquema representativo do processo de hipertrofia e falência das ilhotas pancreáticas.



Fonte: Adaptado de Prentki e Nolan, 2006.

Células Progenitoras Pancreáticas

Diferentes tipos celulares residentes no pâncreas se propõem ao posto de célula-tronco pancreática ou célula progenitora, no entanto ainda é necessário muita investigação para comprovar a eficácia dessas células. Vários modelos de regeneração do pâncreas adulto têm sido estudados para a identificação das células precursoras das ilhotas pancreáticas. Um número considerável de estudos propõe que a regeneração das células das ilhotas pancreáticas ocorre a partir de células progenitoras que residem na própria ilhota.

A identificação de marcadores de células progenitoras de células β é de grande interesse no tratamento da diabetes para a produção dessas células *in vitro* para transplante e para desenvolver meios de expandir a massa de células beta nos pacientes com DM2.

Lesões teciduais, como inflamação, por exemplo, induzem à ativação de células precursoras que levam à expansão da massa de células β . A diferenciação destes precursores controla a função da embriogênese do pâncreas endócrino. A possibilidade de neogênese de células β a partir de precursores de células não- β foi controversa até o aparecimento da tecnologia de rastreamento de linhagem (Li et al, 2010).

No pâncreas adulto lesionado, o epitélio do ducto muitas vezes contém insulina, glucagon ou células expressando GLUT-2, que sugeriram a presença de neogênese de ilhotas. Então, a neogênese de células β a partir de precursores de células não- β (por exemplo, precursores ductais) pode ser uma fonte notável de regeneração destas células no pâncreas humano (WU et al, 2014).

A proteína CD-133 (também conhecida por AC133 ou Prominina-1) despertou grande interesse por causa da sua expressão por várias células-tronco e progenitoras, provenientes de várias fontes, incluindo o neural e sistema hematopoiético, o que é altamente importante para a engenharia de tecidos e terapias à base de células-tronco (Bauer et al, 2008).

O CD-133 tornou-se rapidamente um instrumento geralmente usado para definir uma população de células em processo de auto-renovação em vários tecidos, como um marcador de células-tronco e progenitoras diversos tipos celulares como, células progenitoras endoteliais, sangue periférico, células tronco do sistema nervoso central humano e células estreladas hepáticas (Peichev, Naiyer *et al.*, 2000). Já ficou claramente demonstrada a existência de células progenitoras no

pâncreas adulto, através da presença de células tronco CD-133⁺ no pâncreas, e de células insulino-positivas no ducto pancreático de camundongos, nos estágios iniciais de DM2 (Thole, Rodrigues-Cunha et al., 2012)

O receptor tirosina-quinase, o c-Kit (ou CD-117), e os seus ligantes, controlam uma variedade de processos celulares. Já foi demonstrado que o marcador de células-tronco hematopoiéticas c-Kit é importante para o desenvolvimento e a função das ilhotas de Langerhans, principalmente dando suporte à proliferação, maturação e sobrevivência de células β . O aumento de c-Kit e abundância de Pdx1 também são observados em ilhotas de pâncreas de ratos diabéticos, induzidos por estreptozotocina, o que sugere que c-Kit está envolvida na regeneração de células β (Feng et al, 2012). O c-Kit é detectável não só na região ductal pancreática, mas também numa subpopulação de células \square com uma elevada capacidade proliferativa. Células que expressam c-Kit participam da reversão de danos no pâncreas e diabetes, auxiliando na regeneração do sistema endócrino desse órgão, sugerindo que o c-Kit pode ser necessário para a manutenção da população de células-tronco/progenitoras do pâncreas (Feng et al, 2015).

No contexto da pesquisa em diabetes, já foi demonstrado que as células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam várias possibilidades que poderiam ser exploradas. As CTMs podem gerar células produtoras de insulina, controlar a auto-imunidade, melhorar o enxerto de ilhotas, melhorar o controle metabólico em modelos animais para o DM2, e tratar complicações crônicas decorrentes do diabetes (Domingues-Bendala et al, 2012).

As CTMs têm propriedades de auto-renovação e a capacidade de se diferenciar em linhagens, tais como múltiplos osteócitos, adipócitos e condrócitos. Este potencial rendeu-lhes um foco de estudo para substituição de células através de terapia celular e engenharia de tecidos. CTMs foram consideradas como uma fonte ideal de células-tronco para a terapia, medicina regenerativa, e transplante. Elas podem ser purificadas e expandidas para apresentarem propriedades multipotentes.

Vários estudos mostraram que a expressão de marcadores fenotípicos em CTMs, tanto em tecido adiposo quanto em osso compacto foram positivas para CD-29, CD-44, CD-105, e Sca-1. No entanto, o marcador CD-105 (ou Endogлина), foi detectado na maioria das CTMs (Sung, Yang, Park et al, 2008).

A identificação de marcadores de células progenitoras de células β é de grande interesse no tratamento do diabetes para a produção dessas células *in vitro* para transplante e para desenvolver meios de expandir a massa de células β nos pacientes com DM2.

Estratégias Terapêuticas para o tratamento do Diabetes

O Diabetes mellitus é uma doença crônica que exige a manutenção do atendimento médico e autogerenciamento contínuo do paciente. Vários medicamentos, com diferentes mecanismos de ação são usados para tratar DM2 como a metformina, que aumenta a liberação de insulina, e Sulfonilureias (tiazolidinedionas e meglitinidas) que aumentam a sensibilidade à insulina (Xi and Bu, 2014). Além dos medicamentos, várias outras estratégias terapêuticas têm sido propostas pela comunidade científica, a fim de se reduzir o risco de complicações a longo prazo, causadas pelo DM2.

Insulinoterapia

A terapia de reposição de insulina estabiliza alguns dos distúrbios metabólicos. No entanto, não é uma cura e, normalmente, não pode evitar futuras complicações que se originam dos episódios hiperglicêmicos produzidos por doses de insulina incorretas (Tudurí e Kieffer,2011). Devido à dificuldade de se manter a glicemia dentro da faixa fisiológica, é vista a necessidade da pesquisa de alternativas melhores.

Já foi evidenciada a ligação da entre inflamação e patogênese de DM2, resultando em redução da secreção de insulina e/ou desencadeando apoptose de células β . Então já foram propostas estratégias anti-inflamatórias para a sua prevenção e tratamento, com utilização de anticorpos anti-IL-1 e anti-TNF- α , salicilato de sódio e a aspirina (Esser et al, 2014).

Imunoterapia

Uma outra opção proposta é a utilização de imunoterapia a nível celular, que é conseguida através da manipulação das próprias células do sistema imunológico. A eliminação ou inibição de vários tipos de células, tais como células CD11⁺, várias populações de células T, e ainda mastócitos em modelos de camundongos obesos, produziram efeitos metabólicos benéficos. Os estudos, embora ainda recentes e

inconclusivos, podem representar uma promessa em doenças relacionadas com a obesidade, como o diabetes (Gregor e Hotamisligil, 2011).

Terapia hormonal

Um aspecto diferente da disfunção da célula β está sendo tratado recentemente como alvo terapêutico para o DM2, a potencialização da secreção de insulina em resposta à glicose. As incretinas são hormônios secretados a partir do sistema digestório. Estes agem sobre o pâncreas e outros tecidos periféricos provocando efeitos biológicos, incluindo o aumento da secreção de insulina estimulada por nutrientes. Este efeito das incretinas é perdido ou anulado em DM2 e pode ser um alvo para novas estratégias terapêuticas. Drogas como alvo o peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1), um receptor de incretina, tem sido utilizado clinicamente como uma proposta terapêutica para o tratamento de DM2, aumentando a secreção de insulina (Kimple et al, 2014).

Uma outra vertente aplicada como estratégia terapêutica é o tratamento da obesidade, com o intuito de amenizar suas consequências, como o DM2. Para isso tem se usado terapias hormonais. Indivíduos com resistência à insulina induzida pela obesidade podem ser beneficiados, a longo prazo, com melhorias na composição corporal, tais como redução do tecido adiposo e aumento da massa muscular esquelética, os quais podem ser induzidos por terapia com hormônio do crescimento, o GH (Berryman *et al*, 2013). O GH tem efeitos diretos sobre os adipócitos maduros que resultam em estimulação da lipólise com a liberação de ácidos graxos livres.

Já o IGF-1 pode atuar diretamente sobre o pâncreas endócrino, influenciando na sobrevivência e replicação das células β , na síntese hormonal, assim como suprimir a produção de glucagon (Giustina et al 2015).

Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1)

O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) é um polipeptídeo que desempenha um papel chave em condições normais de crescimento e desenvolvimento (Parekh et al, 2010). É um potente agente, é conhecido por agir de maneira endócrina, tanto de forma autócrina quanto parácrina (Chowdhury et al, 2014).

O IGF-1 é normalmente produzido e secretado principalmente pelo fígado e outras fontes, incluindo o pâncreas. Agindo através do seu receptor, o IGF-1 promove o desenvolvimento embrionário, crescimento pós-natal, e maturação dos principais órgãos (Chowdhury et al, 2014).

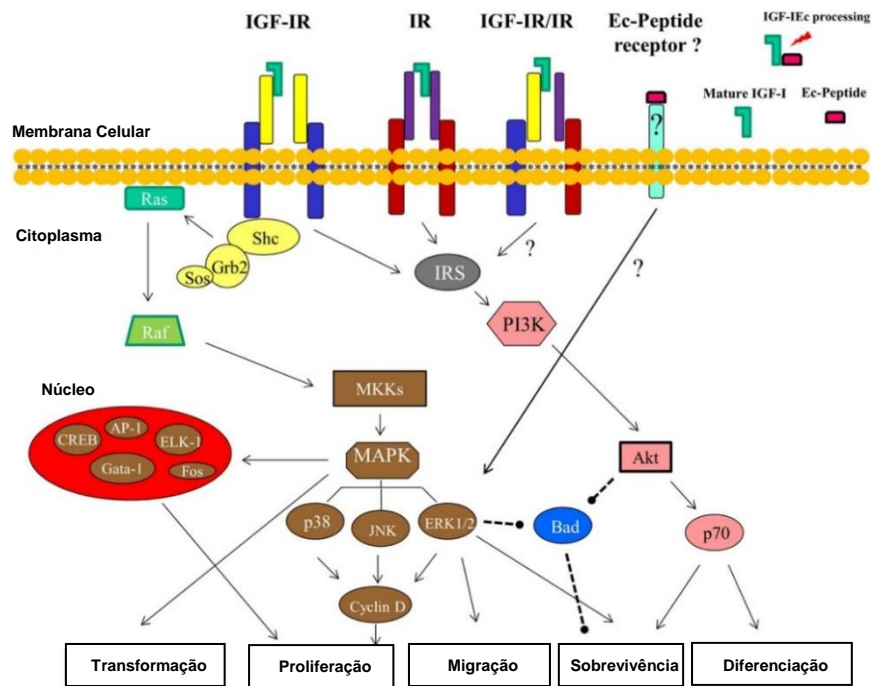
A molécula de insulina apresenta cerca de 50% de homologia com a molécula de IGF-1 e as subunidades β de seus receptores apresentam aproximadamente 80% de homologia. Além dessas semelhanças, também compartilham mecanismos e vias intracelulares comuns (Guevara-Aguirre e Rosenbloom, 2015).

Estudos mostraram que o IGF-1 tem a capacidade de recrutar células de medula óssea circulantes para locais de danos lesados de músculo esquelético. Também já foi visto que a superprodução de IGF-1 aumenta o número de células-tronco e crescimento de tecido cardíaco isquêmico, levando a um aumento no número de cardiomiócitos (Agudo et al, 2008).

Já foi demonstrado que a administração da IGF-1 exógeno reduziu os níveis de glicose no soro tanto em indivíduos saudáveis, como em pacientes com resistência à insulina, com DM1 e DM2. Além disso, essa redução induzida por IGF-1 foi acompanhada por uma melhora na sensibilidade à insulina (Chowdhury et al, 2014).

Enquanto a insulina exerce suas ações preferencialmente em vias metabólicas como um regulador glicêmico e principal determinante da distribuição de energia, quer imediato utilização ou armazenamento, o IGF-1 tem um papel mais direcionado para o crescimento e divisão das células.

Figura 7 - Esquema representativo dos diferentes receptores de insulina (IR), de IGF-1 (IGF-IR) e receptores híbridos (IGF-IR/IR), e seus efeitos intracelulares.



Fonte: Adaptado de Philippou, 2013.

O receptor de insulina (IR) e o receptor de IGF-1 (IGF-1R) apresentam estruturas similares e ambos compostos por duas subunidades extracelulares α e duas subunidades transmembrana β , ligadas por pontes dissulfeto. Devido à similaridade, os receptores IR e IGF-1R podem formar heterodímeros, resultando em receptores híbridos resistentes à insulina (Imrie et al, 2012). Cerca de 99% do IGF-1 em circulação se encontra ligado a uma das seis proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs), principalmente a IGFBP-3 e IGFBP-5 (Figura 7) (Giustina et al, 2015).

Os efeitos do IGF-1 na regeneração do pâncreas podem ser direto, agindo induzindo a replicação de células β remanescente, e / ou indireto, atuando em outros tipos celulares, que podem diferenciar-se em células β (Agudo et al, 2008).

Transplante

Duas principais linhas estão sendo amplamente estudadas com o objetivo de desenvolver estratégias de substituição de células β : a regeneração e o transplante. O transplante de ilhotas pancreáticas através da veia porta hepática foi já visto como um tratamento muito eficaz para o diabetes (Pagliuca e Melton, 2013). Seus benefícios, porém, que conferem independência de insulina e melhora na hiperglicemia, diminuem ao longo dos primeiros 5 anos na maioria dos pacientes (Pavlakakis e Khwaja, 2007).

Além disso, há uma oferta limitada de pâncreas para transplantes e acaba sendo necessário a utilização de ilhotas de vários doadores para alcançar a independência da insulina. Outro ponto negativo é a necessidade de tratamento imunossupressor pós-transplante, que pode produzir efeitos indesejados (Tudurí e Kieffer, 2011).

Terapia celular

A restauração de uma massa de células β funcional representa o objetivo central da terapia de diabetes. Nos estudos para a geração de novas células β , três estratégias têm merecido destaque: a diferenciação de células-tronco pluripotentes, a reprogramação a partir de outros tipos de células, e a indução da replicação em células β existentes (Wu et al, 2014).

Muitos tecidos adultos contêm células-tronco ou progenitoras, que são mais fáceis de expandir do que em células maduras desses tecidos. Além disso, a reprogramação nuclear de células de tecido adulto pode, em princípio, pode ser realizada in vivo, evitando assim a necessidade de manipulação de células em cultura, e permitindo a conversão de células autólogas em células β (Efrat e Russ, 2012).

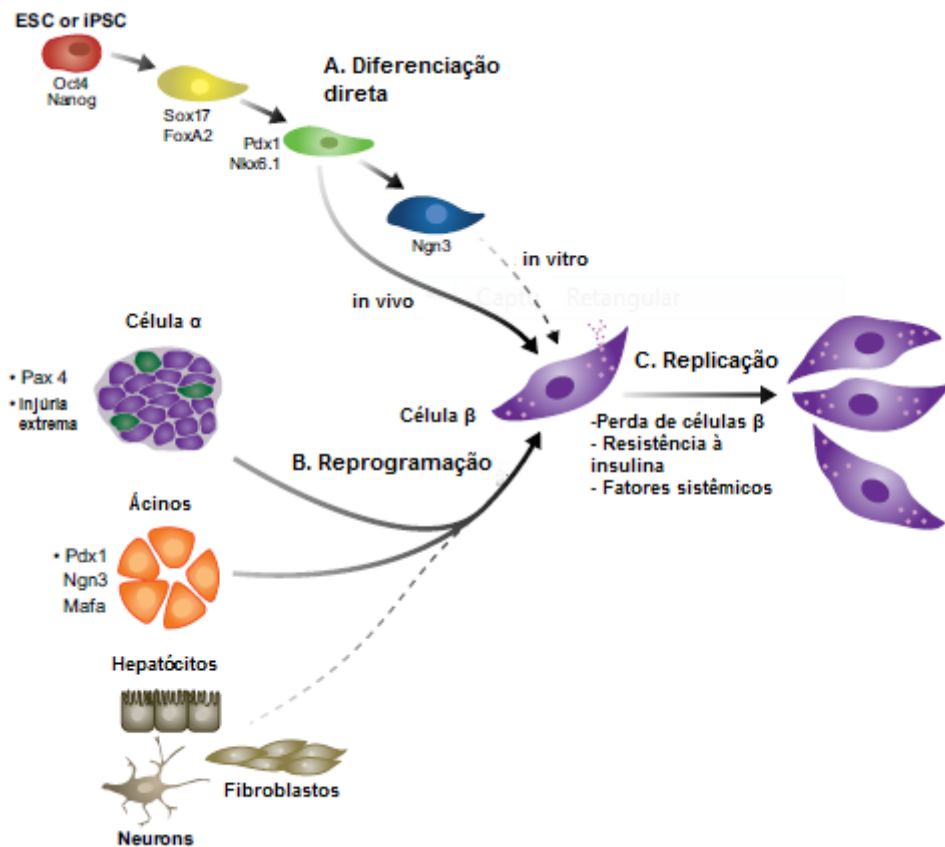
A utilização de fatores de crescimento e outras moléculas pode conduzir células-tronco pluripotentes a diferentes estágios de diferenciação do pâncreas de uma maneira semelhante ao desenvolvimento normal, induzindo a formação de novas células β . No entanto, vários genes importantes devem ser expressos em cada fase.

Outra alternativa é a reprogramação de células diferenciadas (iPS), tais como acinares ou células- α , podem ser usadas para gerar células β in vivo, usando as estratégias de supressão ou superexpressão de fatores. A reprogramação de outros

tipos celulares, tais como hepatócitos, fibroblastos ou neurônios, em células β , é uma das estratégias almeçadas por cientistas e tem sido testadas *in vitro* (Pagliuca et al, 2014).

A indução da replicação de células β existentes é uma estratégia primária para a geração de novas células β . Estudos também demonstram o papel importante dos ductos pancreáticos na regeneração das células β após lesão. Além da autoduplicação de células acinares e endócrinos ocorre desdiferenciação ou regressão de células epiteliais do ducto para estágios progenitores menos diferenciados, que se expandem e, em seguida, se rediferenciam em células exócrinas e endócrinas diferenciadas seguindo o programa de desenvolvimento embrionário (Figura 8) (Li et al, 2010). Desta forma também contribuem para a regeneração da massa de células β .

Figura 8 - Esquema representativo de diferentes estratégias para a geração de novas células β .



Fonte: Adaptado de Pagliuca e Melton, 2013.

Diferentes tipos de células têm sido estudados quanto a sua capacidade potencial para se diferenciarem em células pancreáticas secretoras de hormônios pois estas poderiam representar uma fonte de células produtoras de insulina. No entanto sua localização no pâncreas e os estímulos necessários para que isso ocorra não estão completamente determinados, necessitando ainda de estudos complementares.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar a participação de células progenitoras na homeostase da ilhota pancreática de camundongos obesos após o tratamento com IGF-1.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros biométricos (massa corporal, comprimento naso-anal e peso da gordura epididimária e retroperitoneal), resistência à insulina e glicemia dos animais controles, obesos e nos grupos tratado e não tratado com IGF-1;
- Analisar o conteúdo de células em apoptose no pâncreas;
- Avaliar a ultraestrutura das células β dos grupos experimentais;
- Avaliar a expressão do fator de transcrição Pdx1 em animais obesos e tratados com IGF-1;
- Investigar o potencial terapêutico do IGF-1 na modulação das células progenitoras (CD-133, CD-105 e c-Kit) no pâncreas de animais obesos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Modelo experimental de obesidade

Nosso modelo experimental, para obter um aumento da massa de células β em camundongos adultos e avaliar quais os tipos celulares estariam envolvidos na regularização da secreção de insulina, foi a indução de obesidade através da dieta ocidental. Foram utilizados como modelo experimental camundongos *Swiss* machos (n=32) com 21 dias de idade, obtidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL / Fiocruz, Brasil). Foram divididos em 2 grupos: grupo controle (GC, n=16) e grupo obeso (GO, N=16).

O grupo GC foi alimentado com ração AIN93G (Tikellis et al., 2008) composta de 65,6% de carboidratos, 17,3% de proteínas e 17,1% de lipídios. Já o GO foi alimentado com a dieta hiperlipídica SF05-31, baseada na dieta ocidental, contendo 43.3% de carboidratos, 14% de proteínas e 42,7% de lipídios, acrescida de manteiga clarificada (Ghee). As rações foram fornecidas pela empresa PragSoluções Ltda (Jaú – São Paulo, Brasil) e a composição de cada dieta está descrita na tabela 1.

Tabela 1 - Composição das dietas controle e ocidental

Composição	Dieta Controle	Dieta ocidental
Kcal /g	3.69	4.49
Carboidratos	65.6%	43.8%
- Complexos	53.7%	12.6%
- Simples	11.9%	31.2%
Proteínas	17.3%	13.9%
Lipídios	17.1%	42.4%
Gordura saturada	2.4%	22.3%
Gordura monoinsaturada	4,3%	----
Gordura polinsaturada	10,5%	----
Gordura trans	----	1,7%
Colesterol	----	0,3%

Fonte: A autora, 2015.

Os dois grupos receberam a dieta por 12 semanas, com livre acesso à água e ração e a massa corporal dos animais foi aferida semanalmente.

Os animais foram mantidos durante todo o experimento no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas institucionais de cuidado e uso de animais de laboratório, com aprovação do comitê de ética local, sob número de protocolo CEUA/034/2013. O ambiente foi mantido sob controle de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($60 \pm 10\%$), com ciclos de exaustão de ar (15min / hora) e ciclos de 12 horas de claro e escuro.

Os camundongos foram pesados semanalmente durante toda a administração da dieta e tratamento com IGF-1, em balança de precisão (Shimadzu – AUY220).

2.2 Tratamento com fator de crescimento (IGF-1)

Ao final 11^a semana, o grupo Obeso (n=16) foi dividido em 2 subgrupos, onde 8 animais receberam uma injeção intraperitoneal diária de IGF-1 (100µg/Kg/dia, cada), diluído em solução salina (PBS), por sete dias consecutivos e no outro subgrupo de 8 animais foi injetado apenas com solução salina. O mesmo procedimento foi realizado com o grupo controle. Tivemos então os seguintes grupos:

- ✓ **Controle (GC):** camundongos *Swiss* controle (n=8) que receberam diariamente injeção intraperitoneal de 120µL de PBS, e eutanasiados após 7 dias.
- ✓ **Controle+IGF (GC+IGF):** camundongos *Swiss* controle (n=8) que receberam diariamente injeção intraperitoneal de IGF-1 (100µg/Kg/dia), e eutanasiados após 7 dias.
- ✓ **Obeso (GO):** camundongos *Swiss* obesos (n=8) que receberam diariamente injeção intraperitoneal de 120µL de PBS, e eutanasiados após 7 dias.
- ✓ **Obeso+IGF (GO+IGF):** camundongos *Swiss* obesos (n=8) que receberam diariamente injeção intraperitoneal de IGF-1 (100µg/Kg/dia), e eutanasiados após 7 dias.

2.3 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

No final da 11^a semana, antes do tratamento com IGF-1, foi realizado o teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG). Após jejum de 6 horas foi verificada a glicemia dos grupos controle e obeso, através de sangue da veia caudal. Foi utilizado um glicosímetro e fitas de teste (Accu-Chek Active, Roche Diagnostics, Alemanha). Em seguida os animais receberam injeção intraperitoneal de glicose (1g/kg de peso) e a glicemia foi verificada novamente após 30, 60, 90 e 120 minutos.

Após o tratamento com IGF-1, no final da 12^a semana, foi feito novamente o TITG e os animais foram eutanasiados. No momento da eutanásia foi coletado

sangue para dosagem de insulina no plasma sanguíneo. Foi retirado o pâncreas para avaliação morfológica, imunohistoquímica, dosagem do conteúdo de proteínas por western blotting e avaliação do surgimento de células progenitoras. Também foram coletadas e as gorduras epididimária e retroperitoneal e foi aferido o comprimento naso-anal através de um paquímetro. O pâncreas e as gorduras foram pesados em balança de precisão.

2.4 Dosagem de insulina plasmática

No dia da eutanásia, 6 horas de jejum, o sangue dos animais foi coletado em seringa heparinizada, transferido para tubos eppendorf e centrifugados a 3000 rpm, por 10 minutos. Alíquotas de plasma foram então separadas e congeladas a -80°C. Posteriormente foi feita a dosagem de insulina plasmática pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) segundo o protocolo recomendado pelo Rat / Mouse Insulin ELISA Kit EZRMI-13K (EMD Millipore).

2.5 Histologia

Fragmentos de pâncreas foram fixados em paraformaldeído a 4%, diluído em tampão fosfato (PBS), pH=7,2 por 24 horas. Foram desidratados em banhos com concentrações crescentes de etanol 70%, 80%, 90% e 100% (2 vezes). Foi feita a clarificação em 2 banhos de xilol, seguida de infiltração e inclusão em parafina.

Foram feitos cortes com 5 µm de espessura que foram coletados em lâminas recobertas com poli L-lisina 1%. Tais cortes foram utilizados para as técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase.

2.6 Imunofluorescência

Os cortes foram desparafinizados em 3 banhos de xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100%, 90%, 70%) e água destilada. Foi feita a recuperação antigênica com tampão citrato pH=6,0, a 60°C por 20 minutos. As lâminas foram então lavadas com 3 banhos de PBS de 5 minutos cada banho. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi feito com PBS/BSA a 3% por 20 minutos. Em seguida foi feita dupla marcação, onde os cortes foram incubados com anticorpo anti-insulina (sc-57339, Santa Cruz), juntamente com anticorpo anti- CD 133 (sc-23797, Santa Cruz), anti-CD 105 (sc-19793, Santa Cruz) ou anti-c-kit (sc-5535, Santa Cruz).

As lâminas permaneceram overnight em geladeira a 4°C e foi feita a incubação com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 488, para insulina, e Alexa Fluor 555 para CD 133, CD 105 e c-kit.

Os cortes foram observados em Microscópio Confocal de Varredura à Laser Nikon, modelo C2 (Nikon Instruments, Inc., New York, USA), do Departamento de Anatomia Humana / IBRAG / UERJ.

2.7 Imunoperoxidase

Os cortes foram desparafinizados e hidratados conforme descrito anteriormente. Foi feita a inibição da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3%, por 15 minutos, seguida de recuperação antigênica com tampão citrato pH=6,0, a 60°C por 20 minutos. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi feito com PBS/BSA a 3% por 20 minutos. Em seguida foi a incubação com anticorpo anti-insulina ou anti-Pdx1(sc-14664, Santa Cruz), overnight a 4°C. Os cortes foram então incubados com anticorpo secundário biotinilado (Spring) por 1 hora. Seguiu-se a incubação com estreptavidina (Spring) por 30 minutos e revelação com DAB (diaminobenzidina). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris e observados no microscópio (Olympus DP72), do Departamento de Histologia e Embriologia / IBRAG / UERJ.

2.8 Microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos de pâncreas foram fixados em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M, por 24 horas. Foram então lavados com o mesmo tampão e pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1%, acrescido de ferricianeto de potássio 0,8%, em tampão cacodilato. Os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e dois banhos de 100%), com 15 minutos em cada banho. A infiltração foi realizada com banhos em misturas de acetona e epon, nas proporções de 2:1, 1:1 e 1:2 2:2 e epon puro. A inclusão foi feita e epon, com polimerização a 60°C por 48 horas. Cortes ultrafinos com 70 nm de espessura foram obtidos, coletados em grades de cobre e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes foram observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL-JEM 1011, da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, Instituto Oswaldo Cruz.

2.9 Western blotting

Foram analisados os conteúdos protéicos dos membros das famílias: pró-apoptótica (BAX) e anti-apoptótica (Bcl-2), Pdx1, dos marcadores de células-tronco c-kit, CD105 e CD-133.

Fragmentos de aproximadamente 100 mg de pâncreas foram lisados mecanicamente, através de maceração, com acréscimo de tampão de lise (EDTA 1Mm, fluoreto de sódio 100 Mm, tampão HEPES 30 Mm, ortovanadato de sódio 50 Mm, Triton x100 1%). Ao tampão de lise foi adicionado um coquetel de inibidores (40 µL para cada mL de amostra). Foi feita dosagem de proteínas para a verificação da curva padrão, em microplacas, medindo-se a absorbância a 545nm. Foi feita o preparo da amostra, com tampão da amostra (20 µL de tampão para cada 100 µL de amostra). A corrida das amostras foi feita em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), por 1 hora a 150 vAs proteínas foram transferidas para membranas de PDVF, e aparelho de semi-dry (Trans-Blot SD, BioRaid), durante 1 hora, a 15V. As proteínas inespecíficas foram bloqueadas com leite desnatado a 8%, diluído em

tampão T-TBS. As membranas foram incubadas overnight com anticorpos anti-CD-133 (sc-23797, Santa Cruz), anti-CD105 (sc-19793, Santa Cruz), anti-c-Kit (sc-5535, Santa Cruz), anti-BAX (sc-6236, Santa Cruz), anti-Bcl-2 (sc-7382, Santa Cruz), anti-Pdx1 (sc-14664, Santa Cruz) e anti- β actina, diluídos em tampão T-TBS, na concentração de 1:1000. Foi feita a incubação com anticorpo secundário biotinizado (1:2000, Invitrogen), diluído em T-TBS, seguida de incubação com estreptavidina. As membranas foram incubadas com Kit ECL Plus (GE), e a revelação foi realizada através de raio-X no, Serviço de Radiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto-UERJ.

2.10 Análises Estatísticas

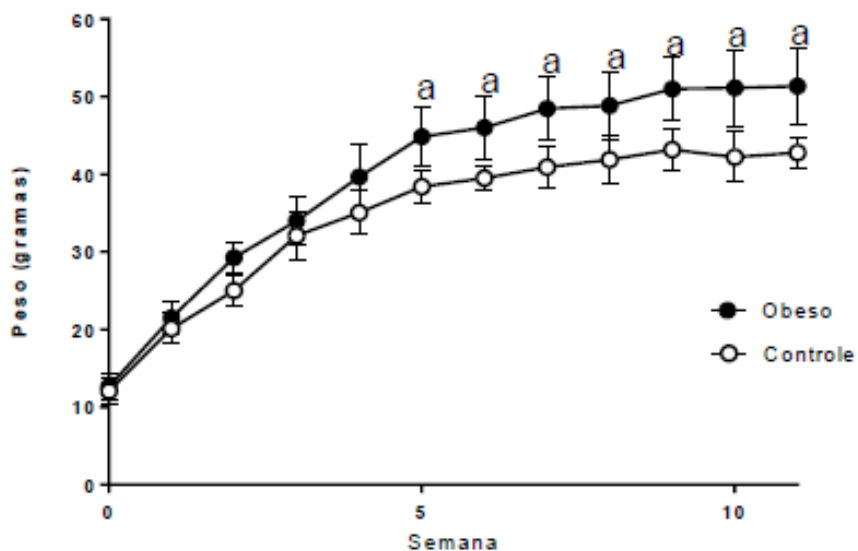
Os resultados foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) de 8 animais por grupo, e a significância estatística foi avaliada por One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, usando nível de significância de $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Parâmetros biométricos e bioquímicos

Os animais dos grupos Controle (GC) e Obeso (GO) apresentaram massa corporal semelhante no início do estudo. A partir da 5ª semana o grupo de camundongos que recebeu dieta ocidental (GO=43,41±3,54g) obteve aumento progressivo no ganho de massa corporal (MC) em relação ao grupo que recebeu dieta controle (GC= 39,02±2,97g), o que caracteriza a capacidade obesogênica da dieta ocidental (Figura 9).

Figura 9 - Gráfico representativo da variação de massa corporal dos camundongos dos GC e GO, antes do tratamento com IGF-1.



Fonte: A autora, 2015.

A análise dos parâmetros biométricos (tabela 2 e figura 10) mostrou que, ao final do experimento a massa corporal (MC) do grupo obeso sem tratamento

apresentou diferença estatística em comparação aos demais grupos. A massa corporal do grupo obeso que recebeu tratamento com IGF-1 (GO+IGF-1) estava semelhante, sem diferença significativa entre o GC (48,50±0,854g) e o GC+IGF-1 (42,87±1,35g). Não houve diferença no comprimento naso-anal dos grupos controle e tratados, indicando que as alterações na massa corporal ocorreram devido à dieta e ao tratamento com IGF-1. Mais uma vez, o único grupo que apresentou valores significativamente maiores em relação a gordura retroperitoneal, gordura epididimária e índice de Lee comparado aos grupos controle foi o GO. Houve diferença na glicemia de jejum entre os grupos controle e obeso, onde os grupos GO (54,74±2,90mg/dL) e GO+IGF-1 (44,87±0,872mg/dL) apresentaram um quadro de hiperglicemia. Apesar do GO+IGF-1 não apresentar diferença significativa do valor de glicemia quando comparado ao GO, podemos observar uma tendência a queda desse valor.

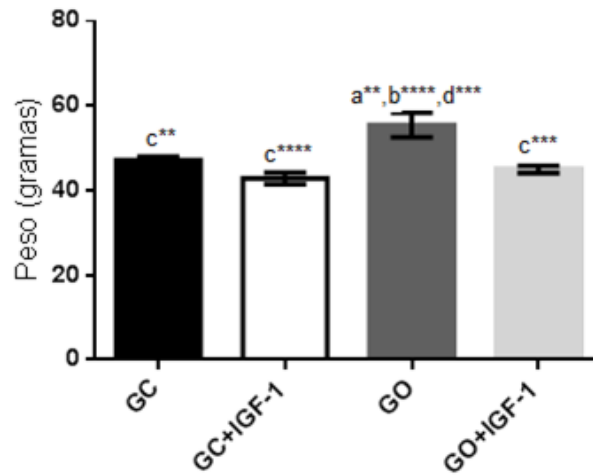
Tabela 2 - Parâmetros biométricos e bioquímicos após tratamento com IGF-1.

Grupos	GC ^a	GO ^b	GC+IGF-1 ^c	GO+IGF-1 ^d
Massa Corporal (g)	47,1±0,8	55,4±2,9 ^{a,c,d}	42,8±1,6	45,0±0,8
Comprimento naso-anal (mm)	93,0±1,0	98,8±1,7	96,0±2,3	93,5±1,7
Gordura Epididimária (g)	1,41±0,30	3,19±0,20 ^{a,c,d}	1,49± 0,17	2,08±0,23
Gordura Retroperitoneal (g)	0,62±0,11	1,24±0,05 ^{a,c,d}	0,63±0,050	0,54±0,025
Glicemia (mg/dL)	84,7± 6,4	145±16,2 ^{a,c}	93,2±5,8	112,2±6,2
Índice de Lee (g/cm)	358,7±7,71	345,9±14,58	416,6±4,77 ^{a,b,d}	283±11,0 ^{a,b}

Nota: Os valores estão representados com média±EPM de 8 animais por grupo. A diferença significativa entre os grupos foi determinada pelo teste One-Way ANOVA e Pós-teste Tukey, usando nível de significância de $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2015.

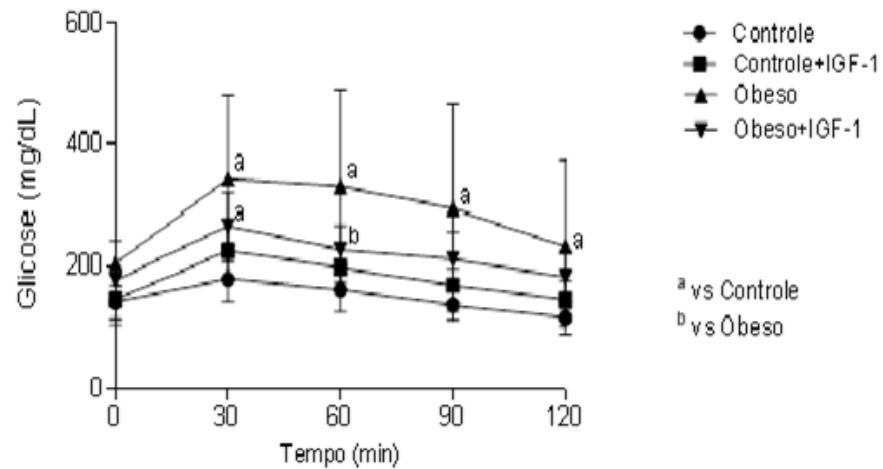
Figura 10 - Gráfico representativo da variação de massa corporal dos camundongos, após o tratamento com IGF-1.



Fonte: A autora, 2015.

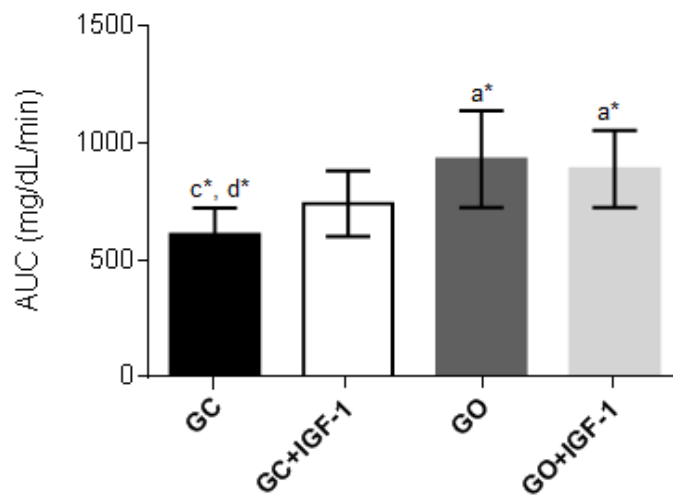
No Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose (Figura 11) observamos uma intolerância à glicose maior no GO. O Grupo Obeso tratado apresentou valores mais próximos aos grupos controle. Porém, ao analisarmos a área sob a curva (Figura 12), observamos que os GO ($628 \pm 46,7$) e GO+IGF-1 ($721 \pm 49,56$) ainda apresentaram maior intolerância à glicose, quando comparados aos GC ($957 \pm 118,9$) e GC+IGF-1 ($822,5 \pm 57,82$).

Figura 11 - Gráfico representativo do teste intraperitoneal de tolerância à glicose.



Fonte: A autora, 2015.

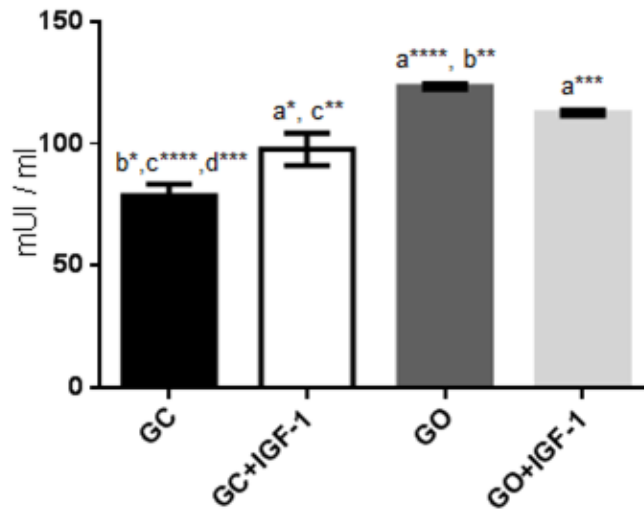
Figura 12 - Gráfico representativo da área sob a curva



Fonte: A autora, 2015.

Os grupos GO ($122,3 \pm 1,05$) e GO+IGF-1 ($112,9 \pm 1,120$) apresentaram níveis de insulina mais altos que os grupos GC ($78,51 \pm 4,98$) e GC+IGF-1 ($102,5 \pm 6,66$), com diferença estatisticamente significativa (Figura 13). Não houve diferença entre os grupos GO e GO+IGF-1, mostrando uma hiperinsulinemia, característica de estágios iniciais de DM2.

Figura 13 - Gráfico representativo da quantificação de insulina pelo método de ELISA.



Fonte: A autora, 2015.

3.2 Avaliação da Morfologia da Ilhota Pancreática

Através da Imunomarcção para Insulina e microscopia eletrônica de Transmissão observamos a morfologia das ilhotas pancreáticas e a ultraestrutura das células β .

3.2.1 Imunoperoxidase para insulina

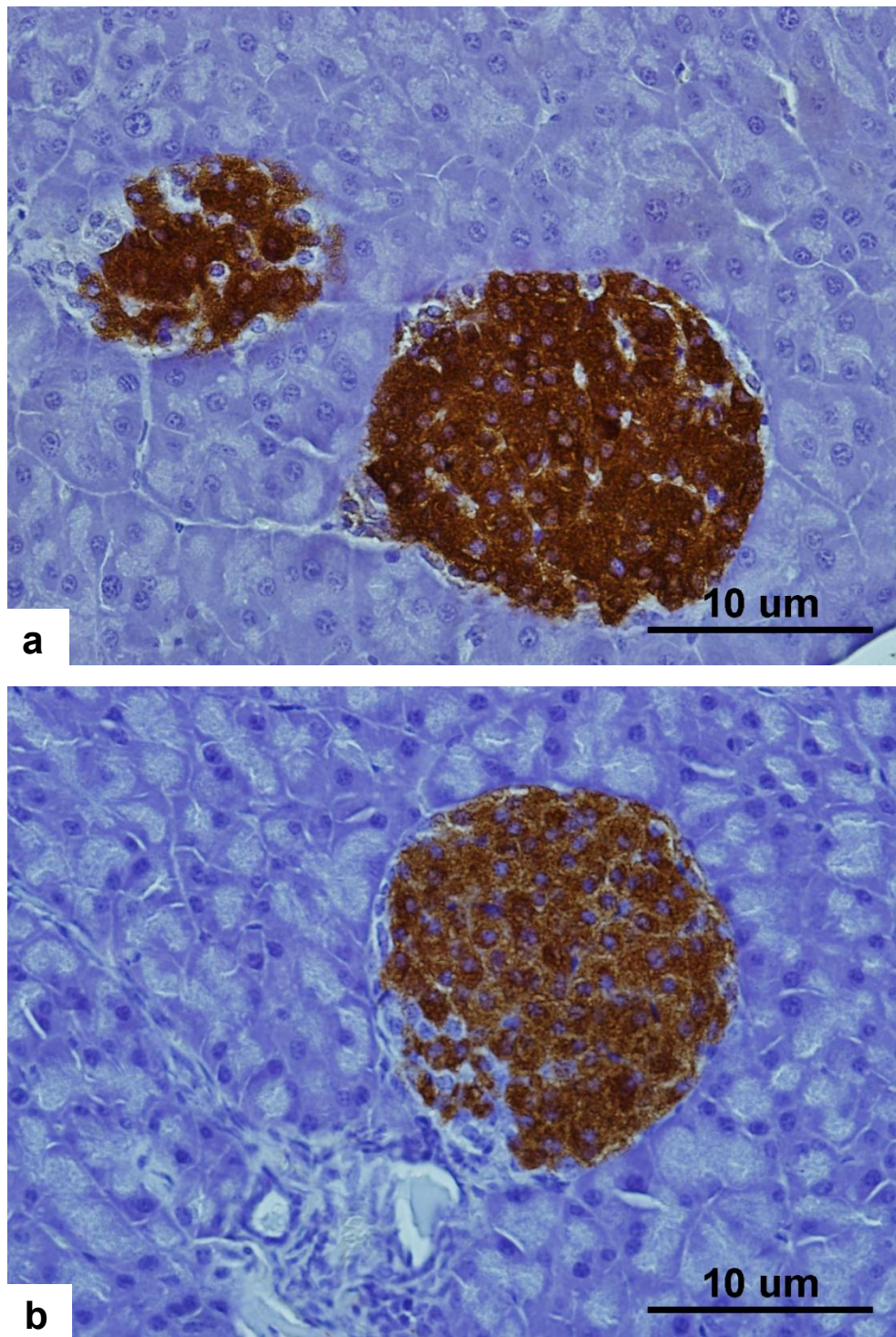
Observamos intensa marcação nos grupos controle, com células insulino-positivas (marrom), no GC (Fig. 14a) e GC+IGF-1 (Fig. 14b), distribuídas uniformemente por toda a ilhota pancreática. O resultado é compatível com síntese normal de insulina.

Nos grupos obesos notamos uma hipertrofia das ilhotas pancreáticas, quando comparado ao grupo controle. Podemos observar no grupo obeso, a marcação (marrom) distribuída por toda a ilhota mas também observamos células insulino-positivas fora das ilhotas pancreáticas (Figura 15a). Também observamos em

algumas ilhotas do GO, uma diminuição na marcação para insulina (Figura 15b), sugerindo deficiência na síntese de insulina. Foi possível visualizar também a presença de infiltrados inflamatórios (asterisco) próximos das ilhotas (Figura 15a), caracterizando um quadro inflamatório induzido pela obesidade e células insulino-positivas no ducto pancreático (seta).

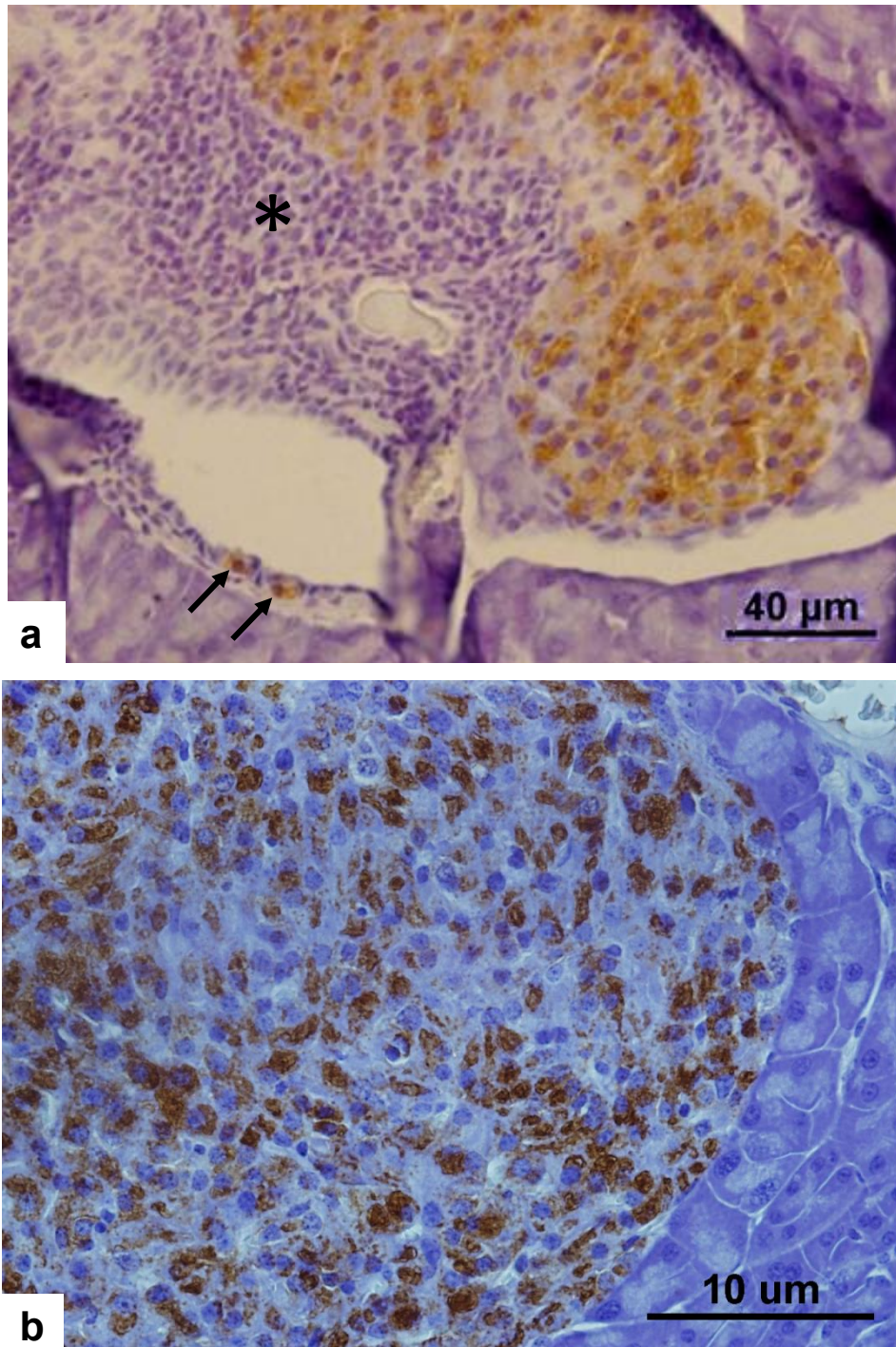
O GO+IGF-1 apresentou padrão de marcação (marrom) semelhante ao GC, com muitas células insulino-positivas distribuídas por toda a ilhota, sugerindo um restabelecimento da síntese de insulina, promovida pelo tratamento com IGF-1 (Fig 16a, b).

Figura14 - Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas, com imunomarcacão para insulina, de GC e CG+IGF-1.



Legenda: Ilhotas pancreáticas com células β positivas para insulina (marrom), marcadas por imunoperoxidase; GC (a) e GC+IGF-1 (b). Aumento de 400x (a, b).
Fonte: A autora, 2015.

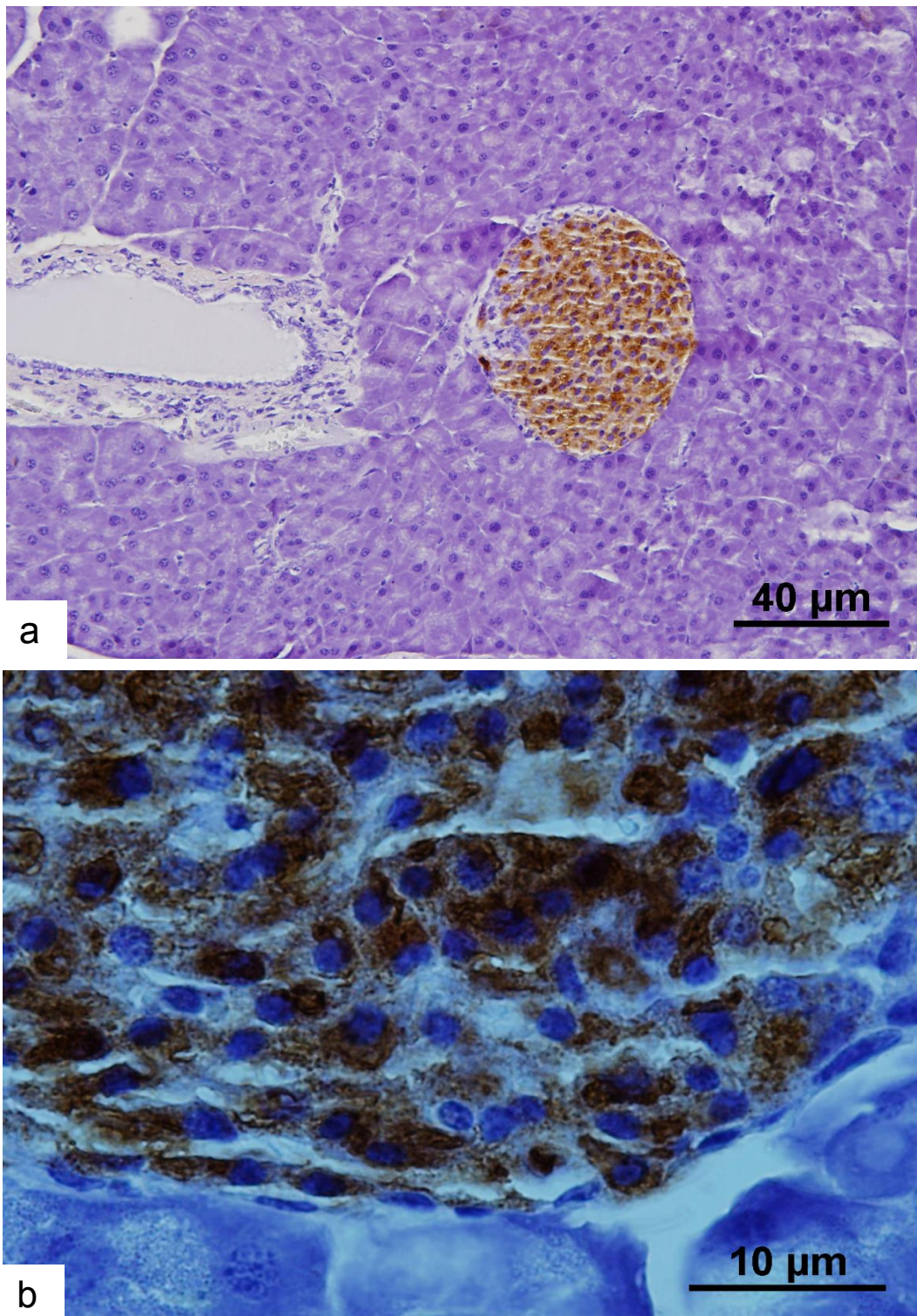
Figura 15 - Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas, com imunomarcacão para insulina, de GO.



Legenda: Células positivas para insulina (marrom), nas ilhotas e no ducto pancreático (seta), marcadas por imunoperoxidase; GO (a, b); infiltrado inflamatório (asterístico).
Aumento de 200x (a) e 400x (b).

Fonte: A autora, 2015.

Figura16 - Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas, com imunomarcação para insulina de GO+IGF-1.



Legenda: Células positivas para insulina (marrom), marcadas por imunoperoxidase; GO (a, b); Aumento de 200x (a) e 400x (b).
Fonte: A autora, 2015.

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

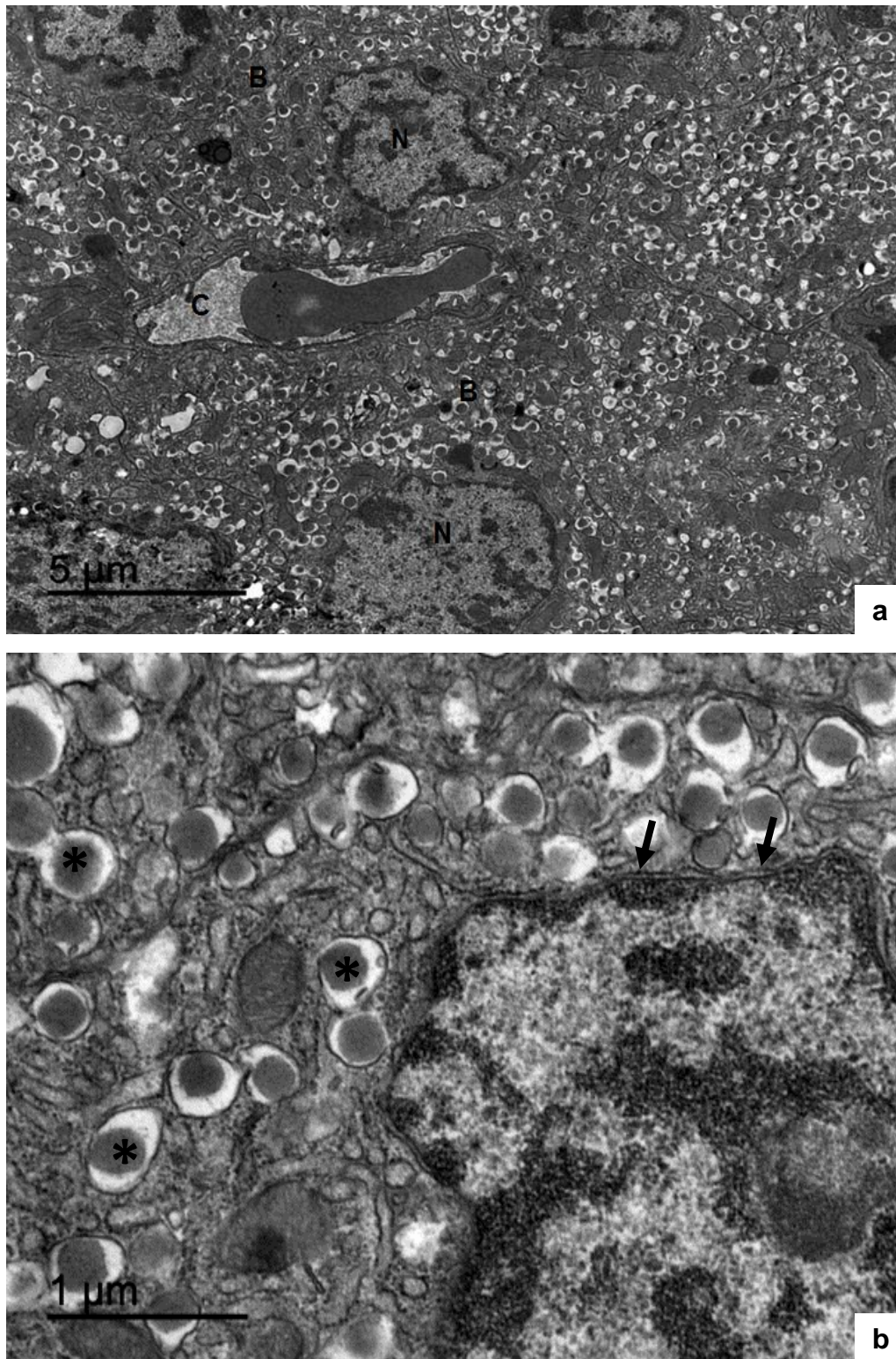
No GC verificamos a ultraestrutura típica das células β . São observados núcleos com cromatina dispersa (N), numerosos grânulos de secreção de insulina em diferentes estágios de maturação, com um núcleo eletrondenso central, circundado por um halo hialino (*) e presença de capilares (C) entre as células (Figura 17a). As células β do GC apresentam cisterna perinuclear do REG (seta branca) com aspecto regular (Figura 18b).

No GC+ IGF-1 são observados numerosos Os grânulos de secreção de insulina (setas) e mitocôndrias (M) bem desenvolvidas. Os grânulos eletrondensos aparecem , em sua maioria, ocupando maior parte ou totalidade dos grânulos de secreção (*), deixando o halo hialino circundante pouco evidente ou ausente (Figura18). O espaço perinuclear, em destaque, (seta) apresenta REG com aspecto regular.

A ultraestrutura de célula β de camundongos do GO (Figura 19 a,b) nos mostra numerosos grânulos eletrondensos (*) e mitocôndrias (M) bem desenvolvidas. O aparelho de Golgi (G) se apresenta bem evidente e desenvolvido, envolvendo grânulos, indicando intensa síntese. O espaço perinuclear, em destaque, apresenta cisternas distendidas e irregulares, com o lúmen pouco eletrondenso (setas).

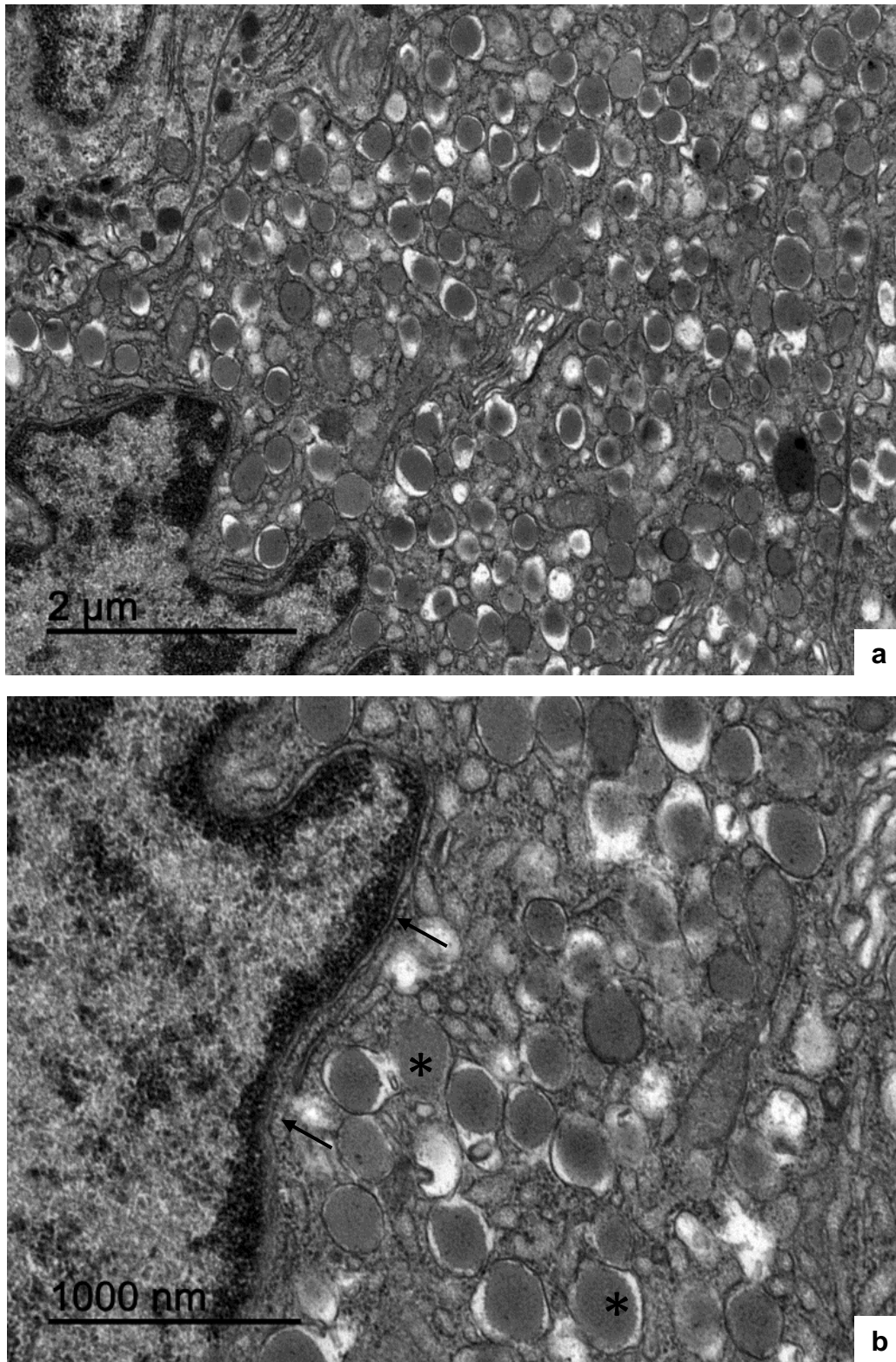
No GO+IGF-1 também observamos numerosas e bem desenvolvidas mitocôndrias (M), Golgi (G) bem evidente, repleto de grânulos eletrondensos de insulina, com núcleos ocupando quase totalidade dos grânulos de secreção, indicando intensa atividade de síntese (Figura 20 a). O REG ainda apresenta alguma dilatação (seta branca) porém a região perinuclear já é vista de forma mais regular (Figura 20 b).

Figura 17 - Eletromicrografia de ilhota de pancreática de camundongo do GC.



Legenda: Célula (B); núcleo (N); capilar (C); grânulo de secreção (Asterístico) ; cisterna perinuclear (seta). Aumento de 8000x (a) e 40000x (b).
.Fonte: A autora, 2015.

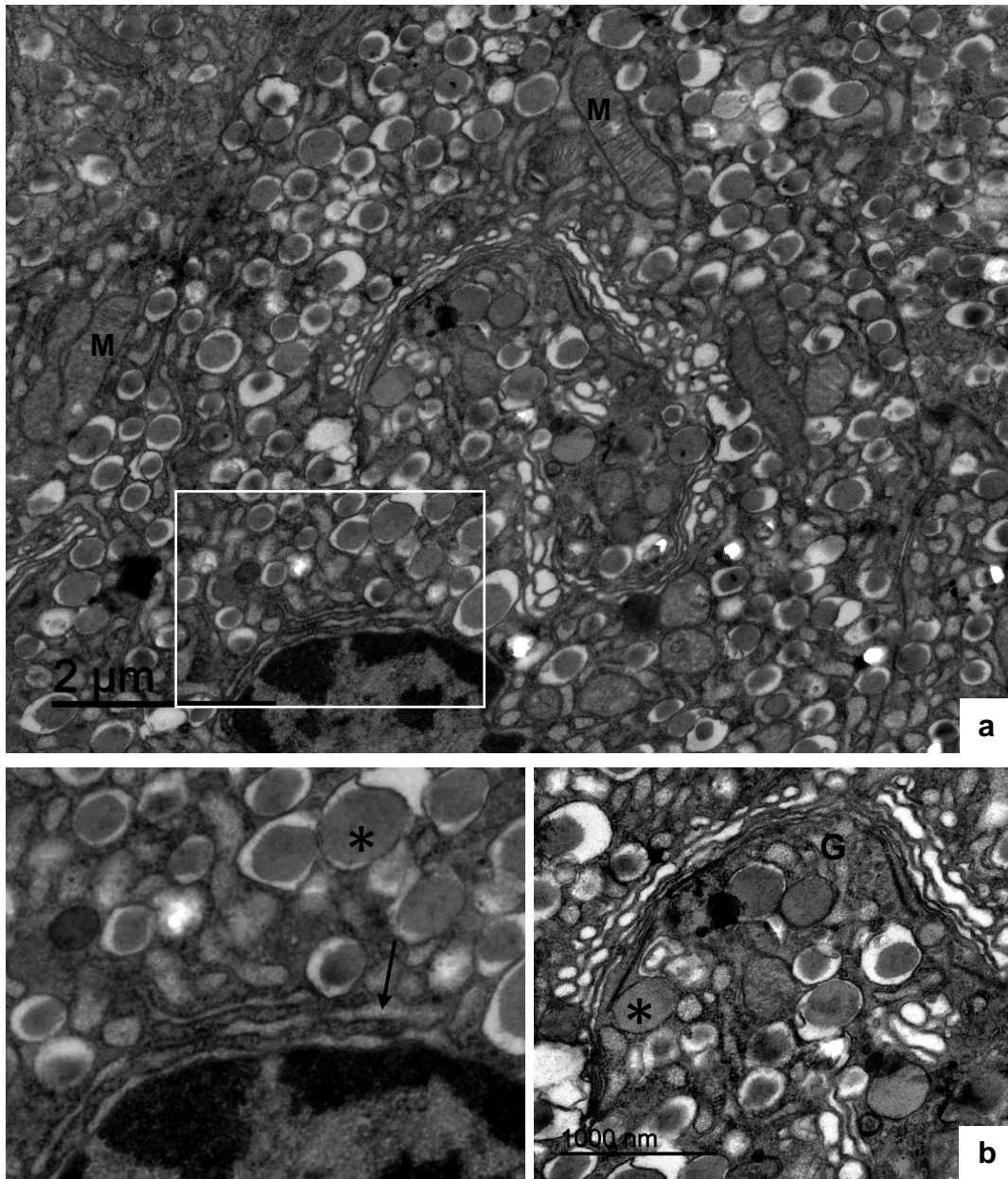
Figura 18 - Eletromicrografia de ilhota de pancreática de camundongo de GC+IGF-1.



Legenda: . : grânulo eletrondenso (Asteristico); cisterna perinuclear (Seta). Aumentos de 25000x (a) e 50000x (b).

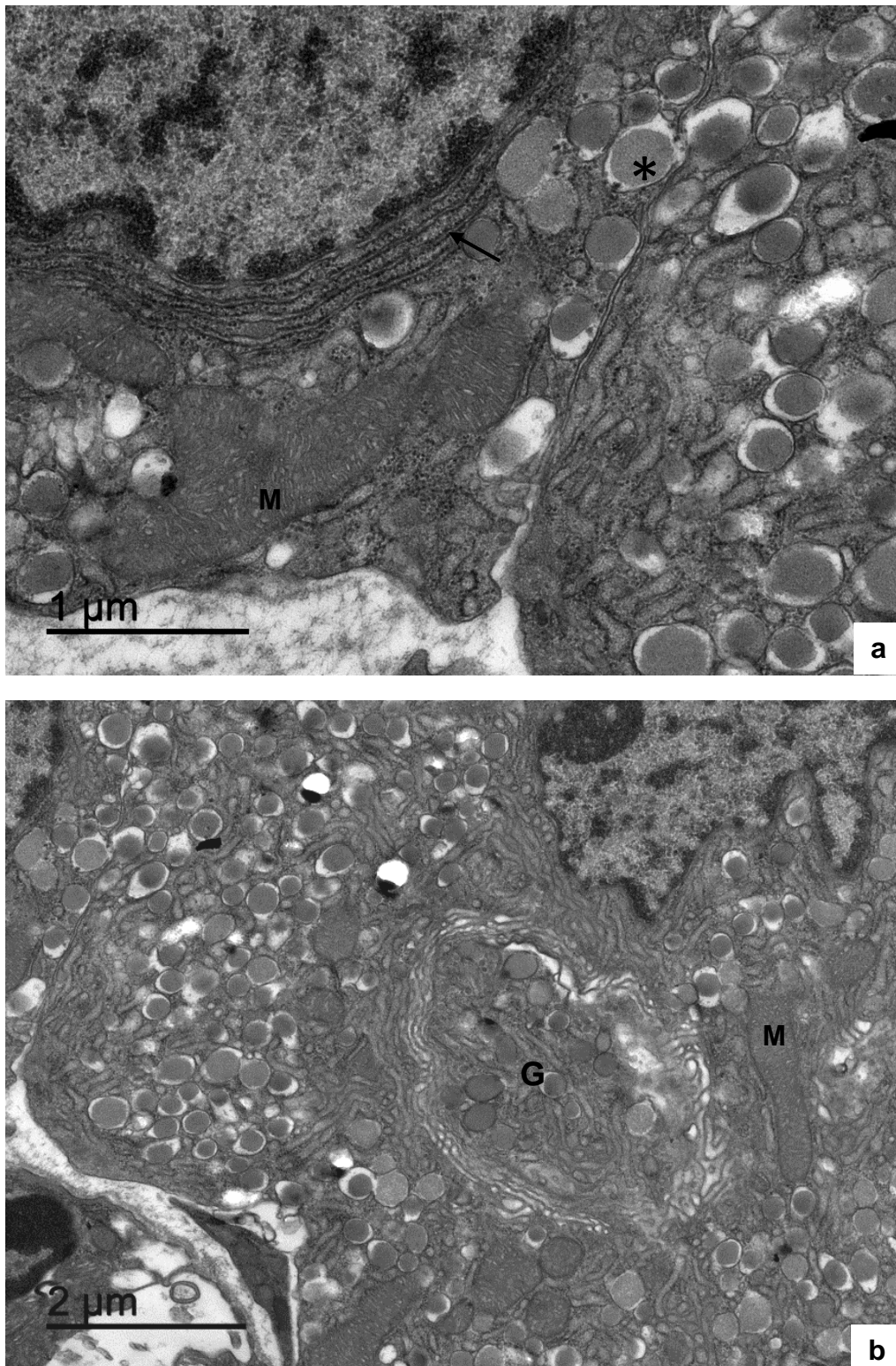
.Fonte: A autora, 2015.

Figura 19 - Eletromicrografia de ilhota de pancreática de camundongo do GO.



.Legenda: grânulo eletrondenso (Asterístico); Mitocôndria (M) ; Aparelho de Golgi (G).
Cisterna perinuclear distendida (seta). Aumentos de 2000x (a) e 50000x (b).
Fonte: A autora, 2015.

Figura 20 - Eletromicrografia de ilhota de pancreática de camundongo do GO+IGF-1.



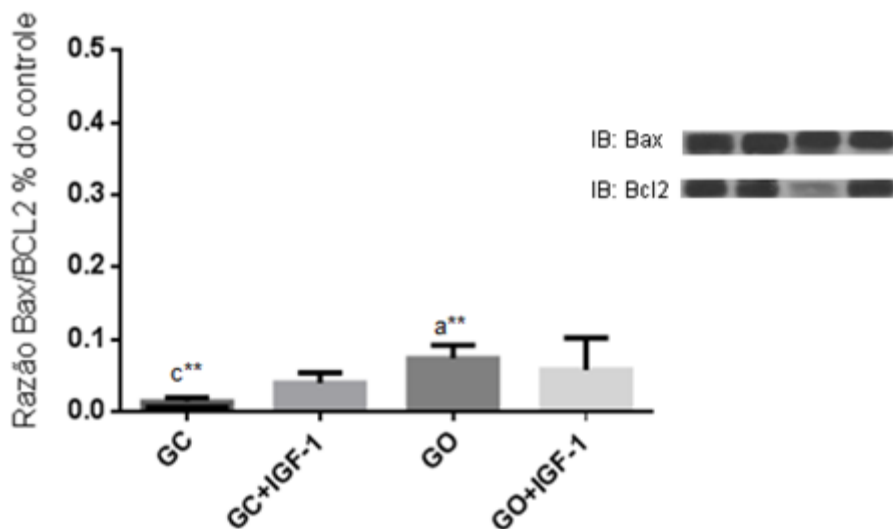
Legenda: grânulo eletrondenso (Asterístico) ; Mitocôndria (M); Aparelho de Golgi (G); Cisterna Perinuclear (seta). Aumentos de 20000x (a) e 40000x (b).
Fonte: A autora, 2015.

3.3 Análise da morte e sobrevivência das células β

Como demonstrado anteriormente, algumas ilhotas pancreáticas do grupo de animais obesos, começavam a expressar uma quantidade menor de células β imunomarcadas para insulina. Ao avaliarmos o balanço entre as proteínas antiapoptótica (Bcl-2) e próapoptótica (Bax) notamos uma diferença significativa na razão dessas proteínas entre GC ($1,02 \pm 0,062$) e GO ($1,151 \pm 0,319$). O GO apresentou um desequilíbrio entre essas duas proteínas revelando o caráter próapoptótico decorrente de obesidade e diabetes (Figura 21). Entretanto, quando os animais obesos foram tratados com IGF-1 notou-se uma tendência a equilíbrio entre essas duas proteínas e provavelmente as células β se mantêm vivas.

3.3.1. Quantificação da razão Bax/Bcl-2

Figura 21 - Gráfico representativo da razão Bax/Bcl-2 no pâncreas, quantificada Pela técnica de western blotting

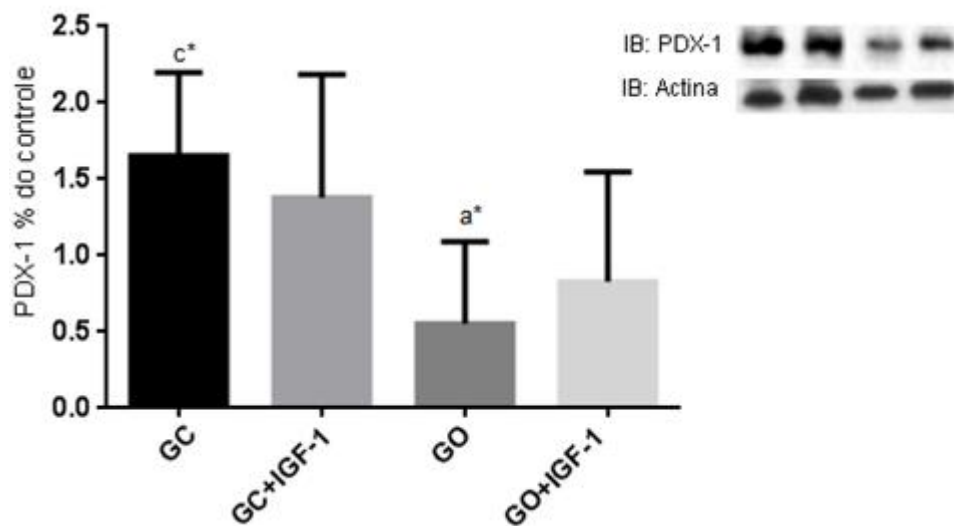


Fonte: A autora, 2015.

3.3.2. Quantificação da expressão de Pdx1

Para corroborar o resultado anterior, analisamos a expressão do Fator de Transcrição Pdx1 (Fig. 22), que é fundamental para a sobrevivência das células β no pâncreas. Nossos resultados demonstraram que o conteúdo de Pdx1 estava significativamente menor no GO ($0,727\pm0,240$) quando comparado ao GC ($1,54\pm0,242$). Após o tratamento com IGF-1 houve uma melhora em relação ao conteúdo de Pdx1, porém essa diferença não foi significativa.

Figura 22 - Gráfico representativo da expressão de Pdx1 no pâncreas, quantificada pela técnica de western blotting.



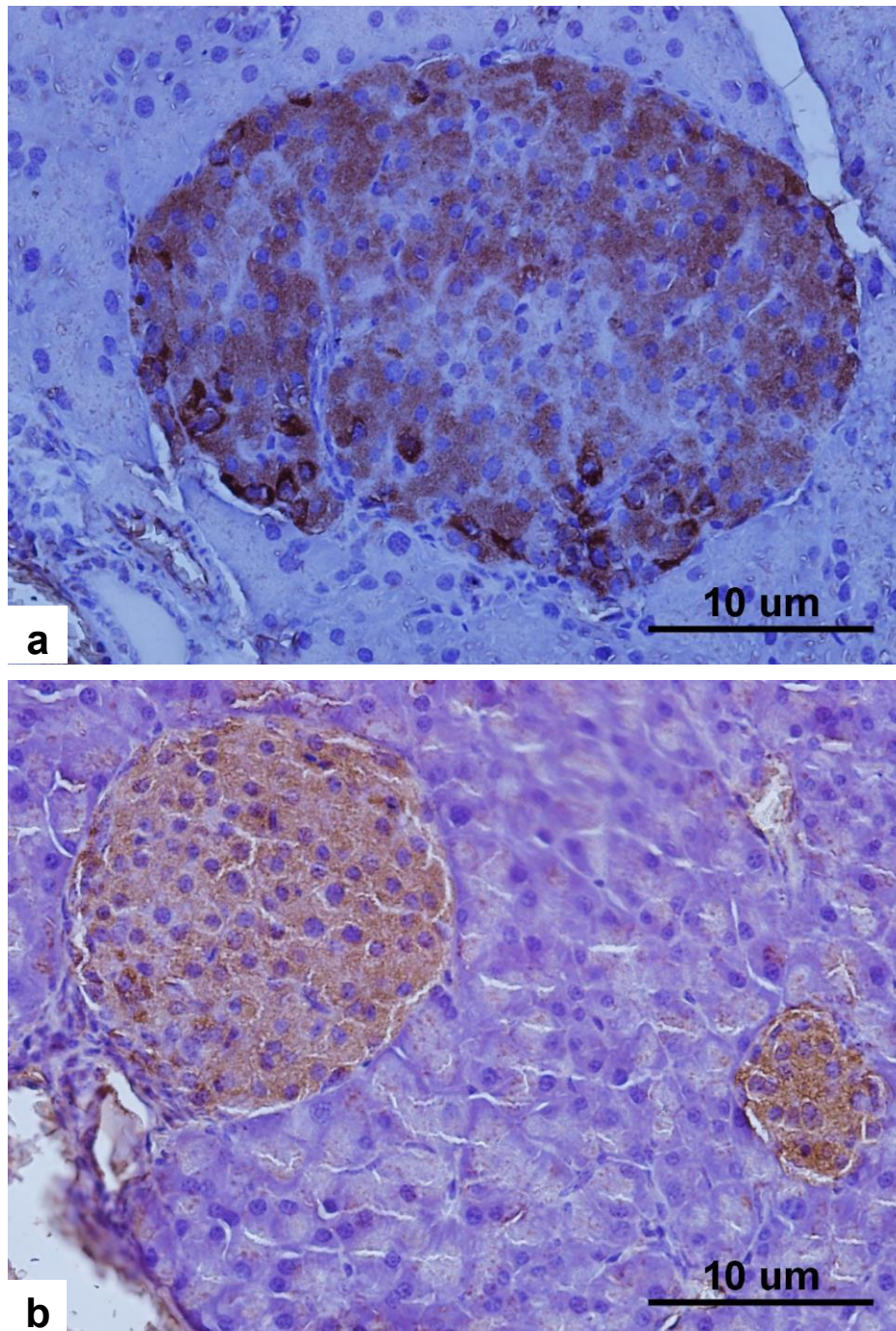
Fonte: A autora, 2015.

3.3.3. Imunoperoxidase para Pdx1

Também realizamos a análise da expressão de Pdx1 através de imunoperoxidase. Nos grupos controle, tratado ou não, a marcação estava distribuída de maneira uniforme e semelhante, por toda ilhota (Figura 23 a,b). No Grupo Obeso foram observadas muitas células não marcadas na ilhota, sugerindo uma deficiência na expressão do Pdx1 (Figura 24 a). Entretanto, após o tratamento

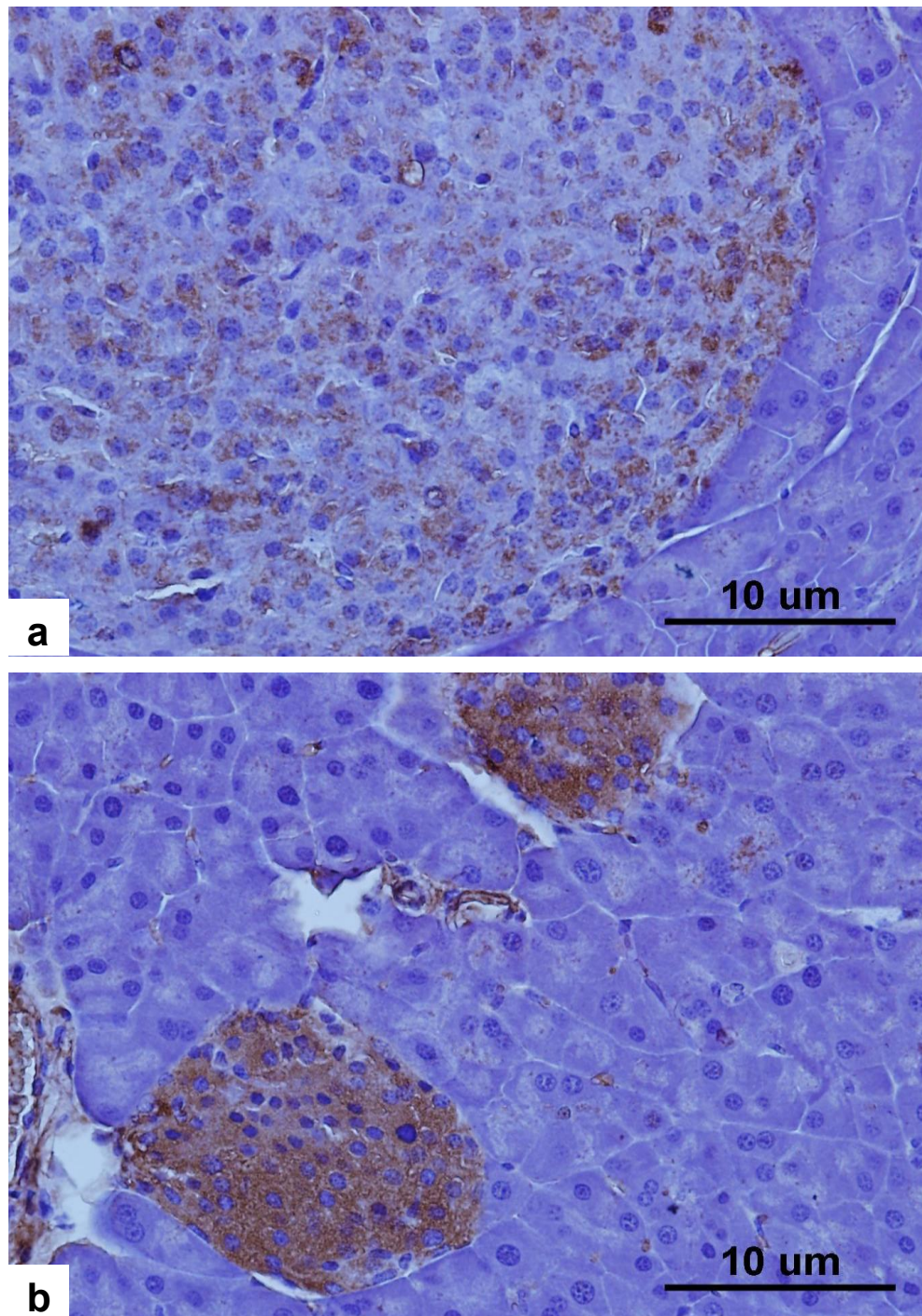
com IGF-1, o Grupo obeso voltou a apresentar uma maior expressão de Pdx1 (Figura 25 b).

Figura 23 - Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas, com imunomarcção para Pdx1 nos GC e GC+IGF-1.



Legenda: Células positivas para Pdx1 (marrom), marcadas por imunoperoxidase; GC (a) e GC+IGF-1 (b); Aumento de 400x (a,b).
Fonte: A autora, 2015.

Figura 24 - Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas, com Imunomarcacão para Pdx1 nos grupos GO e GO+IGF-1.



Legenda: Células positivas para Pdx1 (marrom), marcadas por imunoperoxidase; GO (a) e GO+IGF-1 (b); Aumento de 400x (a,b).
Fonte: A autora, 2015.

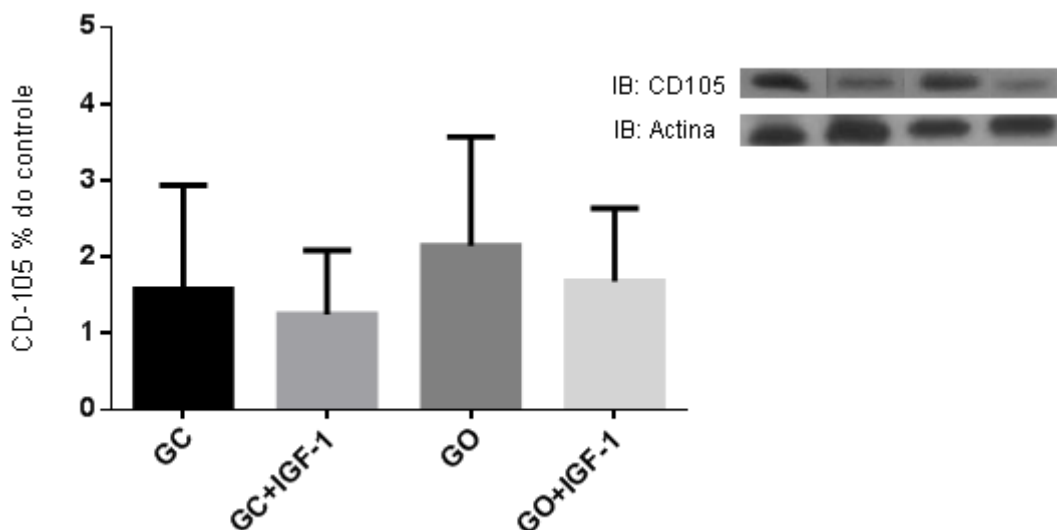
3.4 Avaliação de células progenitoras no pâncreas

Para investigar o potencial terapêutico do IGF-1 na modulação das células progenitoras do pâncreas em animais obesos realizamos a quantificação do conteúdo de proteínas marcadoras de células progenitoras (CD-105, c-Kit e CD-133), assim como sua expressão através de imunofluorescência.

3.4.1. CD-105

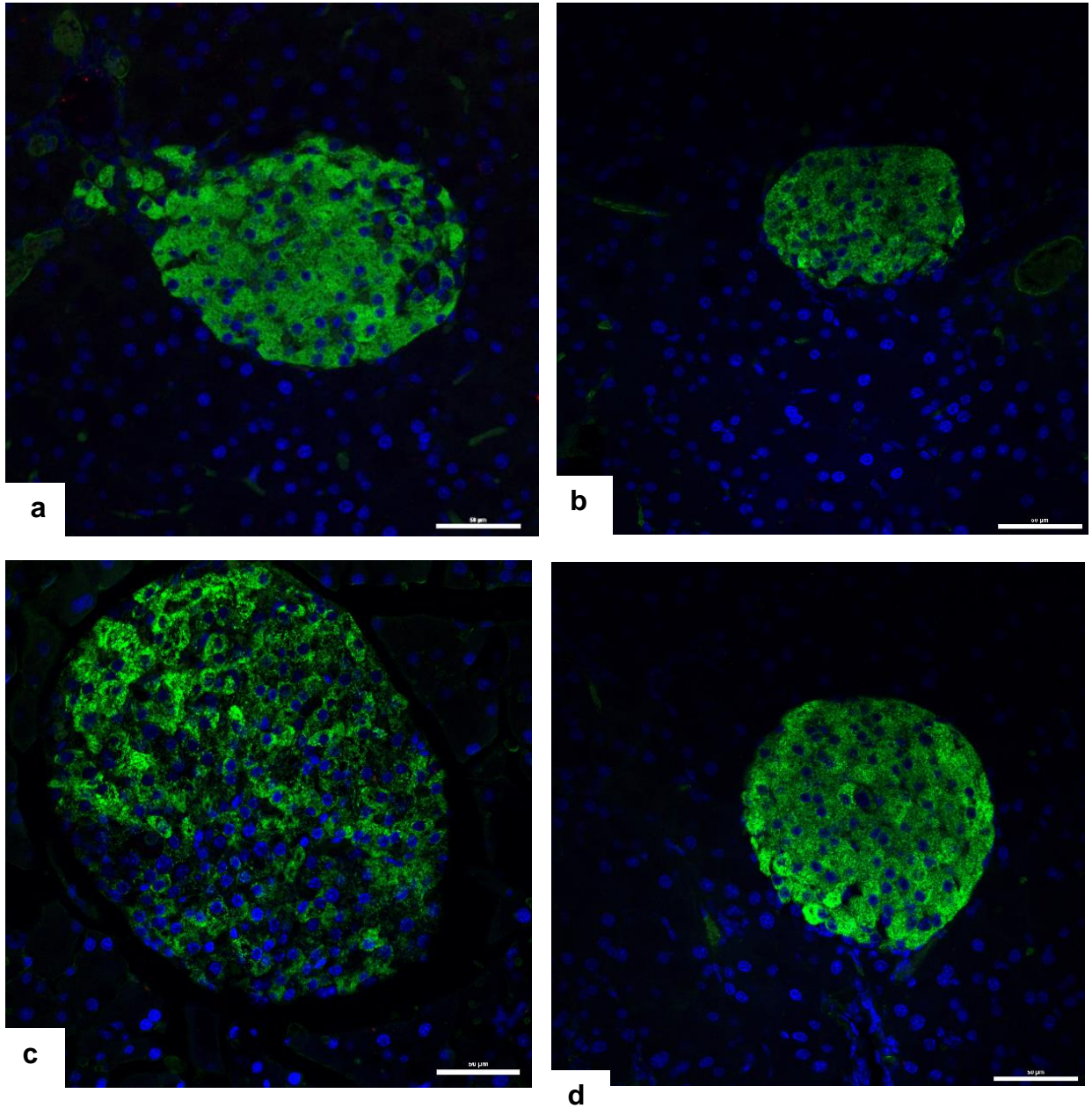
Em relação as células mesenquimais, caracterizadas por expressar CD-105, não foi observada a expressão dessas células no pâncreas de camundongos controle e obesos (Figura 26 a, b, c, d). Em relação ao conteúdo protéico desse marcador (Figura 25), também não foram observadas diferenças significativas entre GC ($0,874 \pm 0,606$), GC+IGF-1 ($1,83 \pm 0,375$), GO ($2,247 \pm 0,6372$) e GO+IGF-1 ($1,51 \pm 0,427$).

Figura 25 - Gráfico representativo da expressão de CD-105 no pâncreas, quantificada pela técnica de western blotting.



Fonte: A autora, 2015.

Figura 26- Fotomicrografia de pâncreas marcado por imunofluorescência, para insulina e CD-105, observado por microscopia confocal a laser.



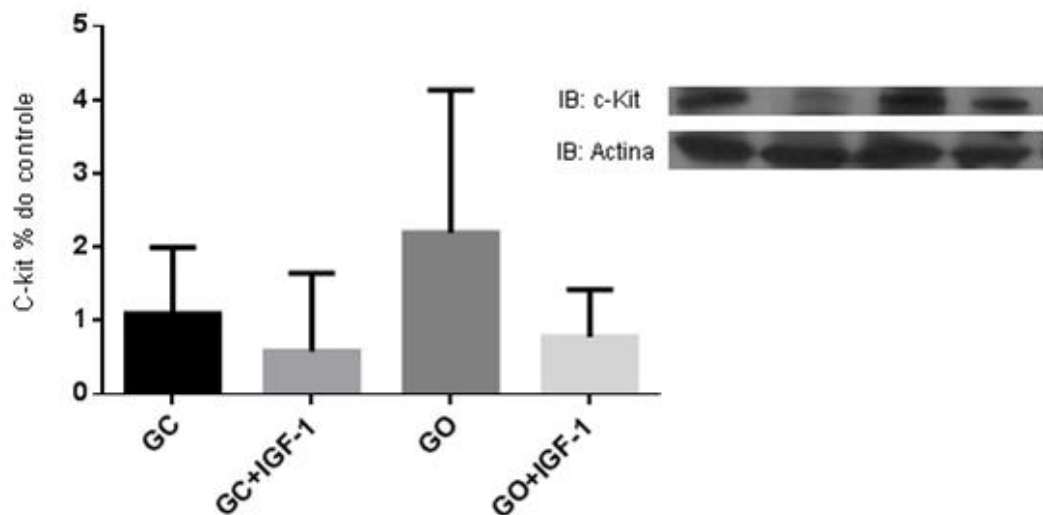
Legenda: Ilhota pancreática com células positivas para insulina (verde) e núcleos marcados com DAPI (azul), nos grupos GC (a), GC+IGF-1(b), GO (c) e GO+IGF-1 (d), (a,b,c,b; aumento de 400x). Não foram observadas células positivas para CD-105.

Fonte: A autora, 2015.

3.4.2 c-Kit

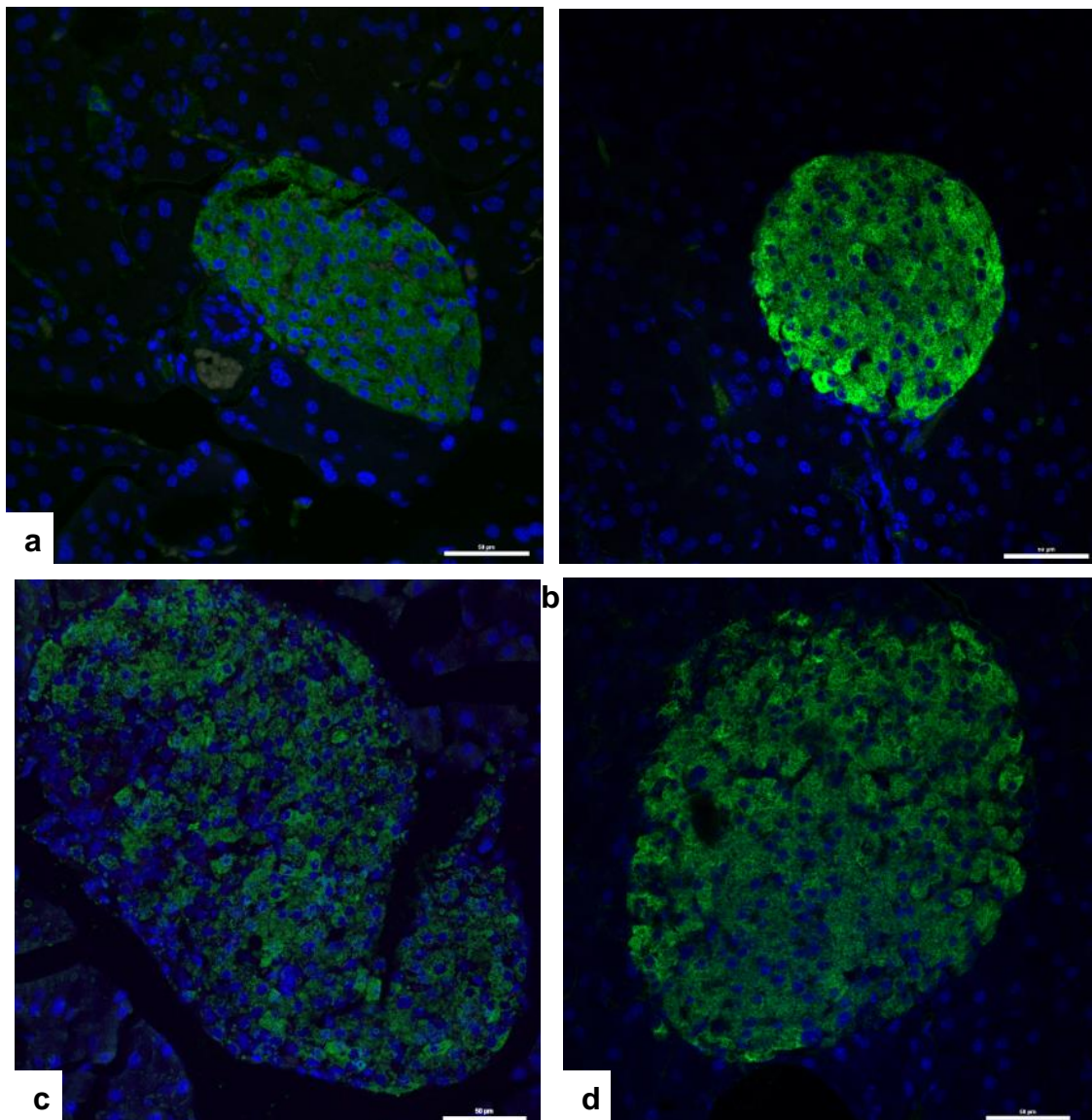
Em relação ao conteúdo protéico do marcador c-kit, de células progenitoras hematopoiéticas (Figura 27), não houve diferença significativa entre os grupos GC ($0,606\pm 0,338$), GC+IGF-1 ($0,191\pm 0,402$), GO ($1,29\pm 0,732$) e GO+IGF-1 ($0,3726\pm 0,244$). Também não observamos a expressão dessas células no pâncreas dos animais de nenhum dos grupos analisados (Figura 28 a,b,c,d).

Figura 27 - Gráfico representativo da expressão de c-Kit no pâncreas, quantificada pela técnica de western blotting.



Fonte: A autora, 2015.

Figura 28 - Fotomicrografia de pâncreas marcado por imunofluorescência, para insulina e c-Kit, observado por microscopia confocal a laser.



Legenda: Ilhota pancreática com células positivas para insulina (verde) e núcleos marcados com DAPI (azul), nos grupos GC (a), GC+IGF-1(b), GO (c) e GO+IGF-1 (d), (a,b,c,b; aumento de 400x). Não foram observadas células positivas para c-Kit.

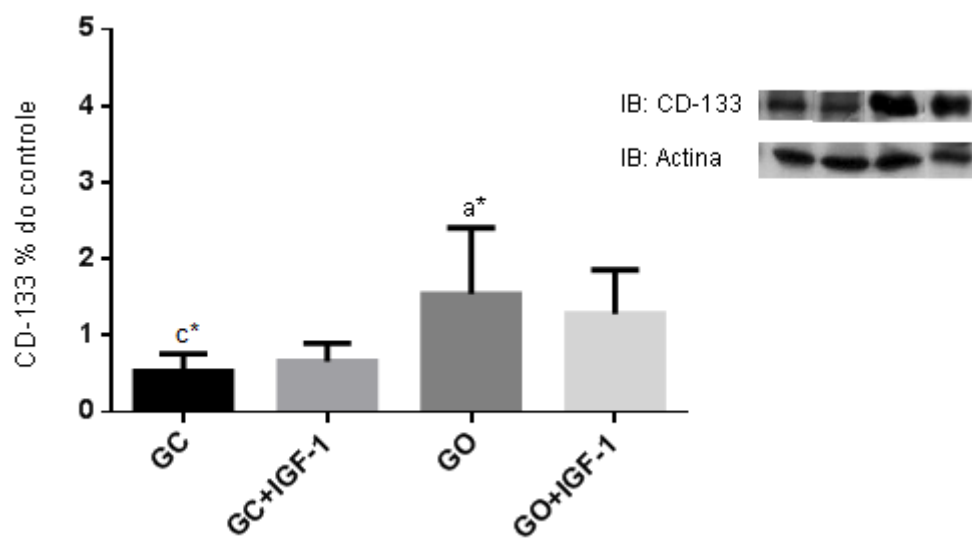
Fonte: A autora, 2015.

3.4.3 CD-133

Na avaliação do conteúdo proteico de CD-133 (Figura 29), um marcador de células progenitoras endoteliais, observamos diferença significativa no GO

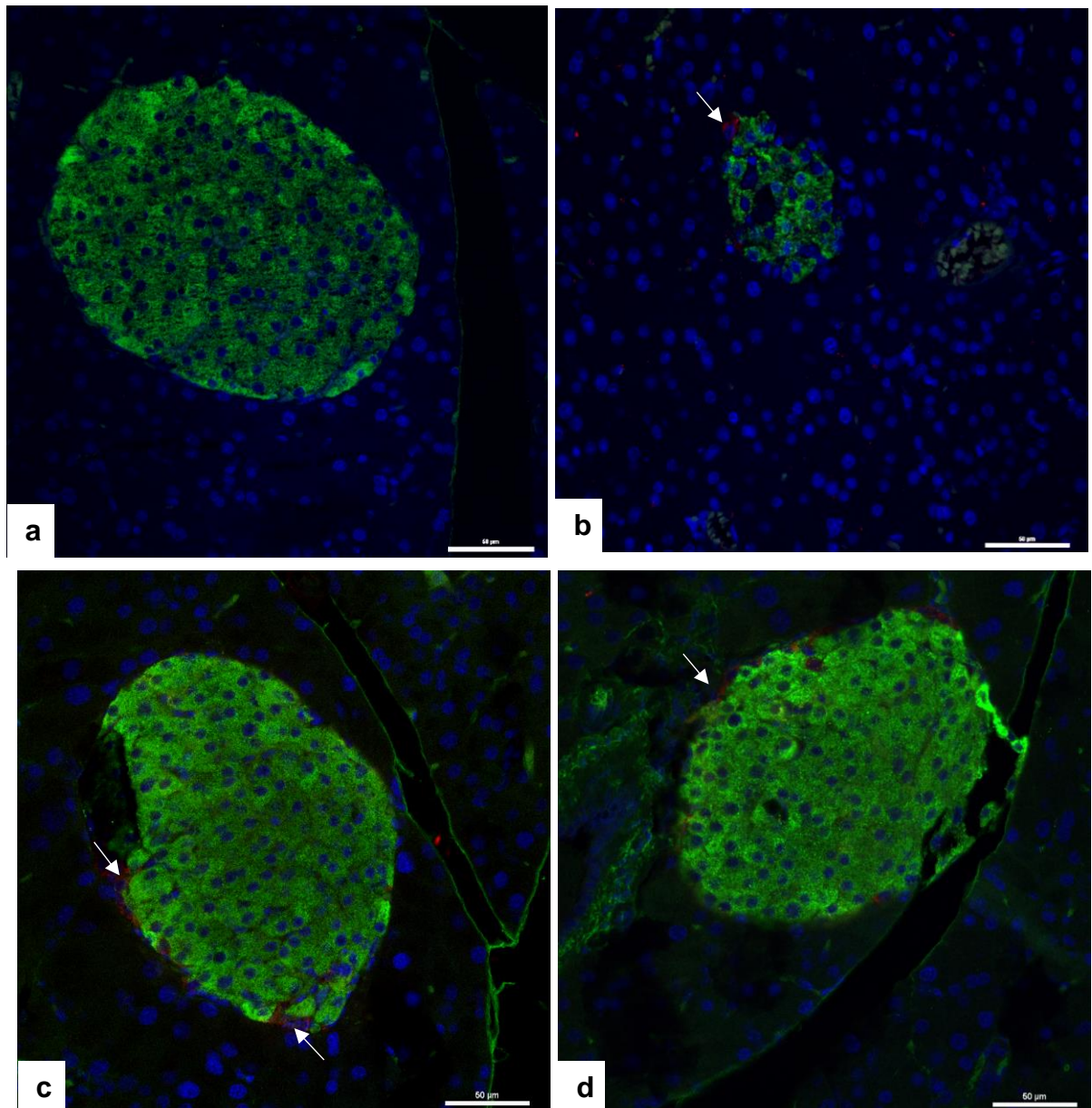
($1,36 \pm 0,387$) em relação ao GC ($0,622 \pm 0,102$). Essa diferença pode ser observada nas fotomicrografias onde a expressão de células CD-133 foi mais evidente nos grupos obesos, tratados ou não. Também foi possível visualizar célula CD-133⁺ em ducto pancreático do GO (Figura 30 e 31).

Figura 29 - Gráfico representativo da expressão de CD-133 no pâncreas, quantificada pela técnica de western blotting.



Fonte: A autora, 2015.

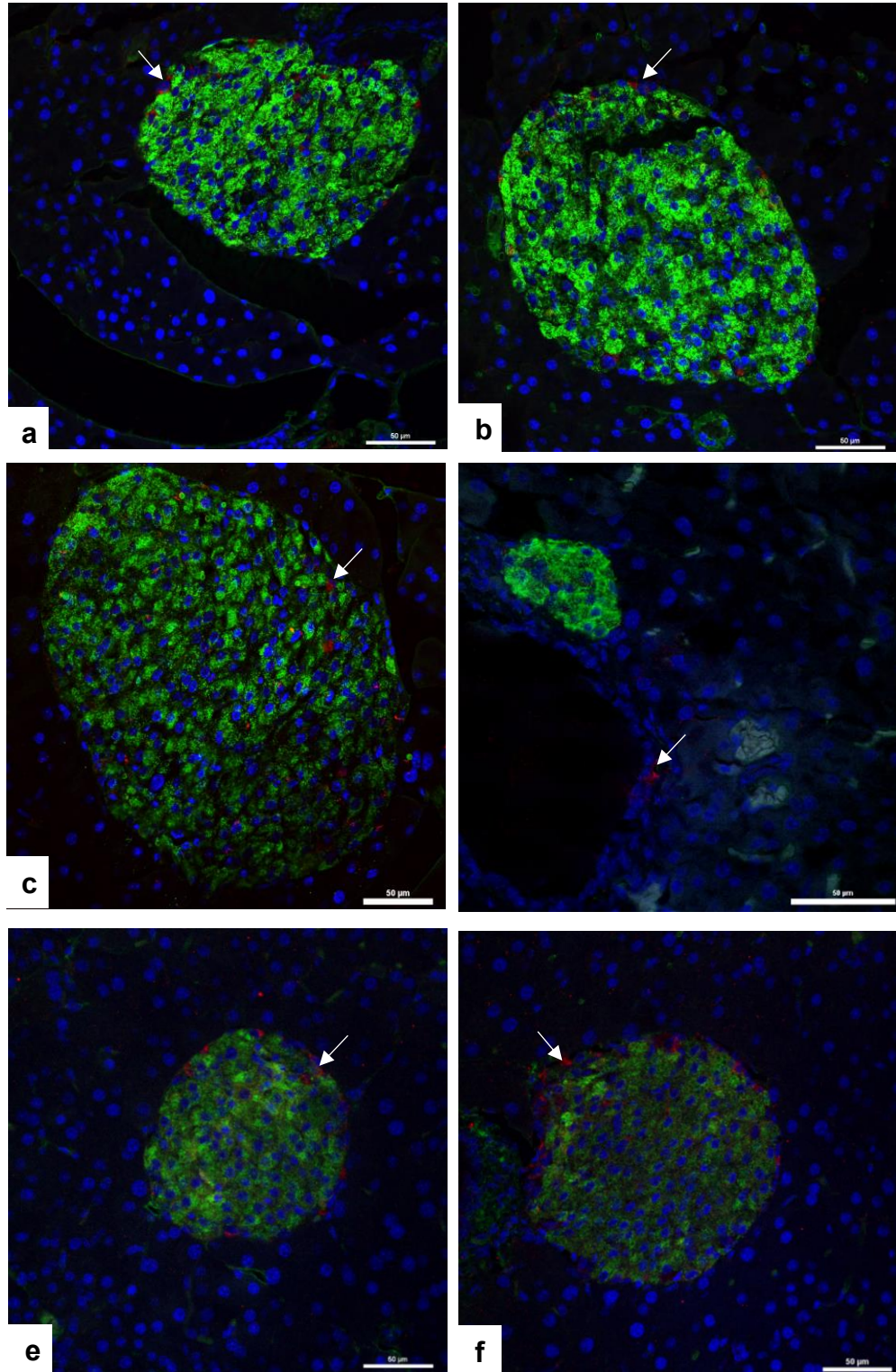
Figura 30 - Fotomicrografia de pâncreas marcado por imunofluorescência, para insulina e CD-133 dos GC e GC+IGF-1, observado por microscopia confocal a laser.



Legenda: Fotomicrografia de microscopia confocal a laser com dupla marcação para insulina (verde), CD-133 (vermelho) e DAPI (azul), nos grupos GC (a, b) e GC+IGF-1 (c, d). São observadas células positivas para CD-133 (setas) na periferia das ilhotas. (a,b,c,d;Aumento de 400X).

Fonte: A autora, 2015.

Figura 31 - Fotomicrografia de pâncreas marcado por imunofluorescência, para insulina e CD-133 dos grupos GO e GO+IGF-1, observados por microscopia confocal a laser.



Legenda: Dupla marcação para insulina (verde), CD-133 (vermelho) e DAPI (azul), nos grupos GO (a, b, c, d) e GO+IGF-1 (e, f). Aumento de 400X (a,b,c,d,e,f;).
Fonte: A autora, 2015.

4 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram o efeito obesogênico da dieta ocidental onde camundongos alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram aumento progressivo da massa corporal (MC) a partir da 5ª semana, assim como aumento no peso de gordura retroperitoneal, gordura epididimária e índice de Lee. Porém, após uma semana de tratamento com o IGF-1, os animais que estavam obesos reduziram esses parâmetros, ficando semelhantes aos animais do grupo controle. Tal resultado mostra a atuação do IGF-1 no metabolismo dos animais obesos, reduzindo a quantidade de gordura corporal (retroperitoneal e epididimária), reduzindo, conseqüentemente a MC (Parekh et al., 2010).

O IGF-1 também atua como um regulador glicêmico e é determinante na distribuição de energia, seja para imediata utilização ou armazenamento. Em nossos resultados no Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose observamos que o grupo obeso não tratado apresentou uma maior intolerância à glicose em comparação ao grupo controle, porém o grupo obeso tratado também apresentou intolerância à glicose. Nesse caso, o IGF-1 não foi capaz de reduzir a intolerância à glicose nos animais obesos. (Guevara-Aguirre e. Rosenbloom, 2014).

Em relação a insulinemia de jejum, verificamos que os grupos GO, GO+IGF-1 e GC+IGF apresentaram uma dosagem aumentada em relação ao GC. Os GO e GO+IGF-1 não apresentaram diferença significativa entre si, e nem em relação ao GC+IGF-1. A hiperinsulinemia nos animais obesos pode ser justificada por um estágio pré-clínico do DM2, onde ocorre aumento dos níveis de insulina sistêmica, devido ao aumento na massa de células β e/ou aumento na síntese de insulina, na tentativa de restabelecer a normoglicemia (Arai, Kojima et al., 2008). No entanto, o grupo controle tratado com IGF-1 também apresentou níveis de insulina mais elevados em relação ao grupo controle não tratado. Isso demonstra que o IGF-1 é capaz de promover o aumento na síntese de insulina. O IGF-1 pode atuar diretamente sobre o pâncreas endócrino, na síntese hormonal, assim como pode suprimir a produção de glucagon (Giustina, Berardelli et al., 2015).

Podemos relacionar a obesidade com várias alterações patológicas, tais como processos inflamatórios e esteatose, e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer e DM2 entre outras (Zeyda e. Stulnig, 2009). No caso da

obesidade relacionada ao desenvolvimento da DM2, podemos observar alterações morfológicas nas ilhotas pancreáticas que a princípio sofrem uma hipertrofia e hiperplasia das células β para tentar suprir a demanda de glicose no sangue. Em um segundo momento as células β sofrem um esgotamento, entram em apoptose e a DM2 se estabelece (Prentki1 e Nolan, 2006).

Avaliando a morfologia das ilhotas pancreáticas dos grupos experimentais observamos a hipertrofia das ilhotas dos camundongos do grupo obeso, o que já está bem estabelecido nesse quadro de obesidade e já foi demonstrado pelo nosso grupo através de análise morfométrica (Thole , et al., 2012). Ao analisarmos a razão BAX/Bcl-2 no pâncreas dos animais dos grupos experimentais notamos uma diferença significativa entre o GO e GC, estando a apoptose aumentada no GO.

Apesar do grupo obeso tratado com IGF-1 também apresentar uma razão mais elevada entre as proteínas, o grupo não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle. Este resultado mostra uma característica pró-apoptótica em células do pâncreas na obesidade. (Apovian, 2010). Apesar da quantificação dessas proteínas pró e anti apoptóticas terem sido realizadas no extrato do pâncreas total, as fotomicrografias que demonstram ilhotas com escassez de células β nos animais do grupo obeso nos leva a supor que a apoptose esteja ocorrendo nessas células.

Para avaliar a contribuição do IGF-1 na sobrevivência das células β analisamos a expressão de Pdx1 por western blotting e observamos uma diferença significativa entre GO e GC, onde o GO apresenta expressão menor. Pdx1 é um fator de transcrição que desempenha um papel central na a função e sobrevivência das células β pancreática (Fujimoto e Polonsky, 2009).

A hiperglicemia crônica e dislipidemia, que são importantes características de diabetes tipo 2, causam disfunção das células β devido a reduzida expressão Pdx1 (Riedel,,Wang et al, 2011). A deficiência parcial de Pdx1 leva à disfunção das células β e aumenta a sua morte em casos de diabetes, tanto nos roedores quanto em humanos (Bramswig, Everett et al., 2013). Inibição de sinalização do IGF, seguido pela redução da expressão de Pdx1, é uma via comum induzida pela maioria dos mecanismos em células β apoptóticas (Fujimoto e Polonsky, 2009).

Apesar do conteúdo de Pdx1 no grupo obeso tratado com IGF-1 não apresentar diferença significativa em relação ao grupo obeso, podemos notar uma tendência de aumento em seu conteúdo, uma vez que também não é

significativamente diferente do conteúdo do grupo controle. O que chama atenção para essa tendência de melhora no conteúdo de Pdx1 nas ilhotas dos animais obesos tratados com IGF-1 é sua expressão aumentada e de maneira uniforme na análise de imunoperoxidase. Muito semelhante as ilhotas pancreáticas dos animais controle. Já no GO são observadas muitas células não marcadas na ilhota, sugerindo uma deficiência na expressão do Pdx1.

Realizamos também uma avaliação mais detalhada dos efeitos da obesidade nas células β . Através de uma análise ultraestrutural dos grupos estudados podemos observar no GC células β repletas de grânulos de secreção, em diferentes estágios de maturação, contendo, em sua maioria, um núcleo central eletrondenso, circundado por um halo hialino e também REG e mitocôndrias bem desenvolvidos, como já descrito (Wang et al., 2011).

No GO podemos observar numerosas mitocôndrias e grânulos de secreção, com núcleos eletrondensos ocupando maior parte dos grânulos. Observamos o Aparelho de Golgi bem desenvolvido, repleto de grânulos de secreção, indicando intensa síntese. O RE no GO, se apresenta alterado, com dilatações nas cisternas, inclusive no espaço perinuclear. Já está descrito que um RE bem desenvolvido é necessário para a produção, e para o empacotamento, processamento e exportação de insulina, porém, muitos estímulos como hiperglicemia, hiperlipidemia, e citocinas inflamatórias podem desencadear o estresse do RE em células β (Zhao et al, 2013). O Pdx1, também pode interferir na função do RE, pois regula genes envolvidos na formação e empacotamento de proteínas (Cnop et al, 2012). E como a expressão deste está diminuída em animais obesos, essa função pode sofrer alterações importantes.

A proinsulina é sintetizada no RE, e processada para a sua forma biologicamente ativa, ficando então armazenada em grânulos de secreção. Quando os níveis de glicose no sangue aumentam, insulina é libertada a partir de grânulos de armazenamento para que seja mantida uma glicemia normal. A hiperglicemia pode levar a um aumento máximo de 25 vezes na síntese de pró-insulina e, conseqüentemente, sobrecarrega as células β (Back e Kaufman, 2012).

Ocorre então, um mecanismo adaptativo, importante em células secretoras, que provoca uma expansão do tamanho e da capacidade do RE, de acordo com a demanda funcional da célula (Cnop et al, 2012). Tais alterações ocorrem em vários

órgãos como fígado, músculo, tecido adiposo e pâncreas em condições relacionadas à obesidade e diabetes tipo 2, e podem explicar as alterações observadas no GO.

Quando o aumento da síntese de proteínas se torna crônico, o estresse do RE aumenta, podendo resultar em um esgotamento das células β pancreáticas (Asahara et al, 2009). A glicotoxicidade provoca então um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) no RE, levando à diminuição da expressão do gene da insulina, falência das células β e apoptose. O estresse do RE, é uma das principais causas para o início e / ou a progressão do diabetes tipo 2 (Back e Kaufman, 2012).

Nos grupos GC+IGF-1 e GO+IGF-1 também observamos retículo bem desenvolvido, numerosas mitocôndrias e grânulos de secreção, com núcleos eletrondensos ocupando maior parte dos grânulos sugerindo intensa síntese de insulina. O grupo GO+IGF-1 apresenta áreas com dilatação em cisternas do RE, porém com uma maior organização deste, em especial na região perinuclear. Tais resultados corroboram a dosagem de insulina plasmática, que mostram aumento significativo na quantidade de insulina nos grupos tratados, em relação ao GC, sugerindo que o tratamento com IGF-1, promoveu um aumento na síntese de insulina.

Na intenção de minimizar os déficits causados às células β várias estratégias terapêuticas vêm sendo desenvolvidas. Vários modelos de regeneração do pâncreas adulto têm sido estudados para a identificação das células precursoras das ilhotas pancreáticas. Com isso dois mecanismos principais que levam ao aumento de células β foram propostos: a replicação de células β pré-existentes e a diferenciação de novas células β a partir de células tronco/progenitoras (Bonner-Weir, 2008).

Diferentes tipos celulares residentes no pâncreas se propõem ao posto de célula-tronco pancreática ou célula progenitora, no entanto ainda é necessária muita investigação para comprovar a eficácia dessas células. A existência de células progenitoras pancreáticas pós-natal também é de grande importância para a inovação de técnicas terapêuticas que possam estimular a formação de novas células β endógenas, mas sua localização ainda não está definida. Portanto, o tratamento com IGF-1 seria capaz de estimular a proliferação dessas células, além de exercer efeitos anti-apoptóticos, restabelecendo a atividade das células β do pâncreas de obesos.

Alguns estudos demonstram que a terapia com IGF-1 também é capaz de estimular a proliferação e mobilização células tronco da medula óssea (Fuentes et

al., 2011; Zhang *et al.*, 2012). Nesse sentido, investigamos o potencial do IGF-1 em mobilizar algumas células progenitoras para contribuir no processo de hipertrofia das ilhotas pancreáticas e estabilizar as células β .

Já foi discutido que células tronco mesenquimais podem gerar células produtoras de insulina (Domingues-Bendala *et al.*, 2012). Outros estudos já sugerem o aumento de c-Kit concomitantemente com o aumento de Pdx1, em ilhotas de pâncreas de ratos diabéticos, sugerindo a participação deste na regeneração das células β (Feng *et al.*, 2015). Em nosso estudo, a análise da expressão de marcadores de células progenitoras CD-105 (células tronco mesenquimais) e c-Kit (células tronco hematopoiéticas) não apresentou diferenças significativas entre os quatro grupos analisados. Também não foram observadas células CD-105⁺ e c-Kit⁺ pela técnica de imunofluorescência no pâncreas desses animais. Portanto, o estímulo com IGF-1 não estaria mobilizando esses tipos celulares no nosso modelo experimental.

A análise do conteúdo do marcador CD-133 (células tronco endoteliais) por western blotting, mostrou diferença significativa entre o GO e GC. O GO também apresentou maior expressão de CD-133 quando observada por imunofluorescência. Houve expressão de células CD-133⁺ em todos os grupos. No caso, o grupo obeso tratado com IGF-1 não apresentou diferença significativa em relação ao conteúdo do grupo obeso sem tratamento. Portanto, o IGF-1 não estaria relacionado ao aumento de células CD-133⁺ no pâncreas. Thole *et al.* (2012), já demonstrou a presença de células CD-133 no pâncreas de camundongos obesos e relacionou esse aumento ao TNF- α , fator esse também encontrado em grande quantidade nas ilhotas pancreáticas desses animais obesos. Lesões teciduais como inflamação, por exemplo, induzem à ativação de células precursoras que levam à expansão da massa de células β (Li *et al.*, 2010). Portanto, podemos considerar que células CD-133 seriam células progenitoras pancreáticas que aumentam sua expressão em situações de compensação das ilhotas pancreáticas.

Apesar da presença de células progenitoras CD-133⁺ no GO, outros fatores são necessários como o Pdx1, que é um fator chave para o desenvolvimento e manutenção do fenótipo das células β (Cnop *et al.*, 2012). Pdx1 atua na manutenção pós-natal de produção de insulina, sensibilidade à glicose e controle do equilíbrio entre componentes endócrinos e exócrinos (Sandovici *et al.*, 2013). No entanto o

Pdx1, se encontra diminuído neste grupo, dificultando a expansão e o restabelecimento funcional das ilhotas pancreáticas.

CONCLUSÕES

O tratamento com IGF-1 foi capaz de reduzir a adiposidade diminuindo, conseqüentemente, a massa corporal de camundongos obesos e promoveu aumento na síntese de insulina. Promoveu também uma melhora no estresse do retículo endoplasmático, que hoje é considerado um dos responsáveis pela patogênese do diabetes mellitus tipo 2.

Danos teciduais causados por obesidade e diabetes como inflamação, por exemplo, são capazes de recrutar células progenitoras endoteliais (CD-133⁺) para ilhotas pancreáticas, indicando a participação dessas células progenitoras na tentativa de regeneração dos danos decorrentes de diabetes. Somente a presença das células tronco endoteliais nas áreas lesionadas do pâncreas não são suficientes para o restabelecimento funcional das células β , é necessário a presença de fatores, como o Pdx1, para que ocorra proliferação, diferenciação e manutenção fenotípica das mesmas.

Embora o tratamento com IGF-1 não tenha melhorado significativamente aspectos importantes como diminuição do potencial apoptótico e expressão de Pdx1, acreditamos ser possível uma melhora progressiva, com a redução da obesidade e seus efeitos danosos, além do aumento na síntese insulina e melhora no estresse do retículo endoplasmático. Um período maior de tratamento pode ser necessário para a observação de resultados significativos e duradouros.

REFERÊNCIAS

- Agudo, J. et al. IGF-I mediates regeneration of endocrine pancreas by increasing beta cell replication through cell cycle protein modulation in mice. *Diabetologia* . 2008; 51:1862–1872.
- Apovian, C. M. The causes, prevalence, and treatment of obesity revisited in 2009: what have we learned so far? *Am J Clin Nutr* 2010;91(suppl):277S–279S.
- Arai, Y. e al. The metabolic syndrome, IGF-1, and insulin action. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009; 299:124–128.
- Asahara, S. et al. Increased ribosomal biogenesis induces pancreatic b cell failure in mice model of type 2 diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 381: 367–371.
- Back, S.H., Kaufman, R.J. Endoplasmic Reticulum Stress and Type 2 Diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* 2012. 81:767–93.
- Berryman, D. E. et al. The GH/IGF-1 axis in obesity: pathophysiology and therapeutic considerations. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2013; 9: 346–356 .
- Bramswig, N.C. et al, Epigenomic plasticity enables human pancreatic α to β cell reprogramming. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1275–1284.
- Cano, D.A., et al. Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014; 71:2383–2402.
- Chowdhury, S. et al. IGF-I Stimulates CCN5/WISP2 Gene Expression in Pancreatic β -Cells, Which Promotes Cell Proliferation and Survival Against Streptozotocin. *Endocrinology*. 2014;155: 1629–1642.
- Cnop, M. et al. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine*. 2012; 1 (18):59-68.
- Efrat, S., Russ, H.A. Making b cells from adult tissues. *Trends in Endocrinology and Metabolism* . 2012; 23(6):278-285.
- Esser, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014; 105: 141 – 150.
- Feng Z. C. et al. Critical role of c-Kit in beta cell function: increased insulin secretion and protection against diabetes in a mouse model. *Diabetologia* .2012; 55:2214–2225.
- Feng, Z. C. et al. A survival Kit for pancreatic beta cells: stem cell factor and c-Kit receptor tyrosine kinase. *Diabetologia* .2015;58:654–665.

Frantz, E.D.C., et al. Endocrine Pancreas Development -Effects of Metabolic and Intergenerational Programming Caused by a Protein-Restricted Diet. *Pancreas* 2012;41:1-9.

Fujimoto, K., Polonsky, K.S. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic β -cell survival. *Diabetes Obes Metab.* 2009 ; 11(Suppl 4): 30–37.

Fujiwara, K. et al. Migratory Activity of CD105+ Pancreatic Cancer Cells Is Strongly Enhanced by Pancreatic Stellate Cells. *Pancreas.* 2013;42: 1283-1290.

Giovannucci, E., Michaud, E. The Role of Obesity and Related Metabolic Disturbances in Cancers of the Colon, Prostate, and Pancreas. *Gastroenterology.* 2007;132:2208–2225.

Giustina, A. et al. Insulin and GH–IGF-I axis: endocrine pacer or endocrine disruptor? *Acta Diabetol.* 2015; 52:433–443

Gregor, M.F., Gregor, G.F. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 2011; 29:415–45.

Guevara-Aguirre, J. , Rosenbloom, A.L. Obesity, diabetes and cancer: insight into the relationship from a cohort with growth hormone receptor deficiency. *Diabetologia.* 2015; 58:37–42.

Gukovsky, I. et al. Inflammation, Autophagy, and Obesity: Common Features in the Pathogenesis of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Gastroenterology.* 2013;144:1199–1209.

Huang, E.Y. et al. The role of diet in triggering human inflammatory disorders in the modern age. *Microbes and Infection.* 2013; 15: 765-774.

Imrie, H. et al. Novel Role of the IGF-1 Receptor in Endothelial Function and Repair. *Diabetes.* 2012; 61:2359-2368.

Jacquemin, P. et al. An endothelial–mesenchymal relay pathway regulates early phases of pancreas development. *Developmental Biology.* 2006;290:189 – 199.

Jain, R., Lammert, E. Cell–cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2009; 11 (Suppl. 4):159–167.

Kimble, M. E. et al. Inhibitory G proteins and their receptors: emerging therapeutic targets for obesity and diabetes. *Experimental & Molecular Medicine.* 2014; 46, e102.

Laybutt, D. R et al., Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2007;50:752–763.

Leonardi, O. et al. Beta-cell apoptosis in the pathogenesis of human type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology.* 2003;149 :99–102.

- Li, J. et al. Stem cell factor/c-Kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation .The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2006; 38:961–972.
- Liang, J et al. Human Fetal Liver Stromal Cell Co-Culture Enhances the Differentiation of Pancreatic Progenitor Cells into Islet-Like Cell Clusters. Stem Cell Rev and Rep. 2014; 10:280–294.
- Ma, F. et al. Isolation of Pancreatic Progenitor Cells with the SurfaceMarker of Hematopoietic StemCells. International Journal of Endocrinology. 2012; 2:1-8.
- mice. Atherosclerosis. 2015; 239: 276-282.
- Ou, H. et al. The Association between Nonalcoholic Fatty Pancreas Disease and Diabetes. 2013; PLoS ONE 8(5):e62561.
- Pavlakis, M., Khwaja, K. Pancreas and islet cell transplantation in diabetes. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.2007; 14:146–150.
- Prentki, M.; Nolan, C.J. Islet b cell failure in type 2 diabetes J. Clin. Invest. 2006; 116:1802–1812.
- Quan,W. et al. Role of pancreatic β -cell death and inflammation in diabetes. Diabetes, Obesity and Metabolism. 2013; 15 (Suppl. 3): 141–151.
- Reusens, B., Remacle, C. Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2006; 38: 913–922.
- Riedel, M. J. et al. Immunohistochemical characterisation of cells co-producing insulin and glucagon in the developing human pancreas. Diabetologia .2012; 55:372–381.
- Roat R. et al. Alterations of Pancreatic Islet Structure, Metabolism and Gene Expression in Diet- Induced Obese C57BL/6J Mice. PLoS ONE. 2014; 9(2): e86815.
- Saisho,Y. et al. β -CellMass and Turnover in Humans: Effects of obesity and aging. Diabetes Care. 2013; 36:111–117.
- Sandovic, I. et al. Developmental and environmental epigenetic programming of the endocrine pancreas: consequences for type 2 diabetes. Cell. Mol. Life Sci. 2013; 70:1575–1595.
- Seino, S. et al. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. J Clin Invest. 2011;121(6):2118–2125.
- Smits, M. M., van Geenen, E. J. M. the clinical significance of pancreatic steatosis Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2011; 8:169–177.
- Thole, A.A. et al. Progenitor cells and TNF-alpha involvement during morphological changes in pancreatic islets of obese mice. Tissue Cell . 2012; 746:1-11.

Tudurí, E., Kieffer, T.J. Reprogramming gut and pancreas endocrine cells to treat Diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2011; 13 (Suppl. 1): 53–59.

Wu, W. et al. Fat and carbohydrate in western diet contribute differently to hepatic lipid accumulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015; 461: 681-686.

Wu, Y. et al. c-Kit and stem cell factor regulate PANC-1 cell differentiation into insulin- and glucagon-producing cells. *Laboratory Investigation* . 2010; 90: 1373–1384.

Zanini, C. et al. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Pancreatic Islets and Bone Marrow into Islet-Like Cell Phenotype. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28175.

Zeyda, M., Stulnig, T. M. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance – A Mini-Review. *Gerontology*. 2009;55:379–386.

Zhao, L. et al. Effect of Liraglutide on endoplasmic reticulum stress in diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013; 441:133–138.

Anexo A - Certificado de Aprovação da Comissão de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentais



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/034/2013 sobre "Análise da expressão de células progenitoras pancreáticas em camundongos C57BL/6 obesos tratados com IGF-1", sob a responsabilidade de **Alessandra Alves Thole**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **24/07/2013**. Este certificado expira em **24/07/2017**.

Rio de Janeiro, 24 de Julho de 2013.

Patricia C. Lisboa

Israel Felzenszwalb

Prof. Dra. Patricia C. Lisboa

CEUA/IBRAG/UERJ

*Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8*



Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

CEUA/IBRAG/UERJ

1.055

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br

Anexo B – Comprovação de Submissão de artigo


[Contact us](#) | [Help ?](#) |  [Maintenance outages between October-December 2015 ... more](#)
['My EES Hub' available for consolidated users ... more](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) | [Username: alethole@uerj.br](#)
[Switch To: Author](#) | [Go to: My EES Hub](#) | [Version: EES_2015.11](#)

Submissions Being Processed for Author Alessandra Thole

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

Action ▲	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
Action Links		IGF-1 enhances expression of Pdx1 and progenitor cell CD133 in the pancreas of obese mice	Nov 30, 2015	Nov 30, 2015	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.[<< Author Main Menu](#)