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

Caroline Gomes da Silva

Efeitos da obesidade na migração, proliferação e diferenciação de células-tronco da medula óssea de camundongos *Swiss*

Rio de Janeiro
2017

Caroline Gomes da Silva

Efeitos da obesidade na migração, proliferação e diferenciação de células-tronco da medula óssea de camundongos *Swiss*

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

Orientador: Prof.ª Dra. Alessandra Alves Thole

Rio de Janeiro

2017

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

S587 Silva, Caroline Gomes da.
Efeitos da obesidade na migração, proliferação e diferenciação de células-tronco da medula óssea de camundongos *Swiss* / Caroline Gomes da Silva – 2017.
60 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. Obesidade - Teses. 2. Células-tronco – Teses. 3. Hipernutrição – Teses. 4. Terapia baseada em transplante de células e tecidos. I. Thole, Alessandra Alves. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-056.52

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

_____ _____
Assinatura Data

Caroline Gomes da Silva

Efeitos da obesidade na migração, proliferação e diferenciação de células-tronco da medula óssea de camundongos *Swiss*

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 6 de novembro de 2017.

Orientadora: Profª. Dra. Alessandra Alves Thole
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

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

_____
Prof.ª Dra. Laís de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

_____
Prof.ª Dra. Simone Nunes de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro
2017

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho, em primeiro lugar, a Deus, pela força e apoio durante toda esta longa caminhada. Dedico também aos meus queridos pais Waldemir e Mônica e a minha irmã Camile.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por sempre me guiar e me dar forças, principalmente nos momentos mais difíceis e sempre me ajudar a escolher os caminhos certos.

Aos pais, Mônica e Waldemir e à minha irmã Camile que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e me incentivaram para chegar até aqui.

Ao meu noivo Paulo, por toda atenção e carinho durante esses dois anos complicados e por todo o apoio quando tudo dava errado.

À minha amiga, Mariana, que mesmo com a distância que a vida nos impôs conseguimos manter a amizade e nos apoiar nessa jornada de vida.

Ao grupo segredinhos, Mariana, Thiago, Matheus, Jéssica (Velma), David e Yasmin, que me proporcionou muitas alegrias, que mesmo não nos vendo todos os dias sei que estamos todos juntos sempre.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela oportunidade que me proporcionou de fazer um excelente curso superior e me fez crescer como pessoa.

À professora e orientadora Alessandra pela dedicação, ajuda, paciência e atenção em todos os momentos durante essa fase.

À professora Laís de Carvalho, que me deu a oportunidade de ingressar no LPCT e me apaixonar pelo mundo da pesquisa.

Às minhas estagiárias Adriana, Érica e Maysa por fazerem meus dias mais felizes e descontraídos além de todo o apoio quando tudo não acontecia do jeito que esperávamos.

À todos os alunos, pós-graduandos, professores e técnicos do LPCT, pela cooperação, atenção e as muitas vezes preocupação comigo, e por proporcionarem um ambiente de trabalho descontraído.

Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo. Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo novas coisas, porque somos curiosos... e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos.

Wall Disney

RESUMO

SILVA, Caroline Gomes da. **Efeitos da obesidade na migração, proliferação e diferenciação de células-tronco da medula óssea de camundongos *Swiss***. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Alberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A Terapia celular visa criar alternativas para a regeneração de tecidos lesionados. Com a descoberta de diferentes tipos de Células-Tronco, seu uso ganhou força por possibilitar o repovoamento além de seu potencial de modulação. Neste requisito as Células-Tronco Mesenquimais (CTM) ganham destaque, pois são conhecidas por seu efeito parácrino anti-inflamatório e ausência de expressão de moléculas do sistema imune. Uma das principais fontes de CTM é a medula óssea. Porém, doenças metabólicas como a obesidade são capazes de alterar o microambiente da medula óssea, alterando as propriedades terapêuticas das células ali existentes. Portanto, a avaliação das condições fisiológicas que se encontram as células da medula óssea de obesos é de fundamental importância, já que a sua capacidade de proliferação, migração e diferenciação são importantes para o sucesso da terapia celular. Para este estudo utilizamos o modelo de hipernutrição durante a lactação (hiperlactação) para a indução da obesidade. Foram avaliados a migração, proliferação e diferenciação adipogênica e osteogênica das células provenientes da medula óssea. Nossos resultados mostraram que a obesidade possui efeitos sistêmicos, além de diminuir a capacidade migratória e proliferativa e aumentar a diferenciação adipogênica e reduzir a osteogênica. Portanto, é possível afirmar que a hipernutrição durante a lactação induz a obesidade na fase adulta e que esta é capaz de alterar características cruciais para o sucesso de um transplante de células-tronco.

Palavras-chave: Terapia celular. Célula-tronco mesenquimal. Migração. Proliferação. Diferenciação. Obesidade. Hiperlactação.

ABSTRACT

SILVA, Caroline Gomes da. **Efects of obesity on migration, proliferation and differentiation of stem cells from the bone marrow of *Swiss* mice.** 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Alberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Cell therapy aims to create alternatives for regeneration of injured tissues. With Discovery of diferente types of stem cells, it use gained stength by enabling repopulation beyond its modulation potential. In this case, the Mesenchymal Stem Cells (MSC) gain prominence, as they are known for their paracrine anti-inflammatory effect and absence of expression of molecules of the imune system. One of main sources of MSC is the bone marrow. However, metabolic diseases such as obesity are capable of altering the microenvironment of the bone marrow, altering the therapeutic properties of the existing cells. Therefore, the evaluation of the physiological conditions found in obese bone marrow cells is of fundamental importance, since their capacity for proliferation, migration and differentiation are importante for the success of the cellular therapy. For this study we used the modelo f hypernutition during lactation (hyperlactation) for the induction of obesity. The migration, proliferation and adipogenic and osteogenic differentiation of cells from the bone marrow were evaluated. Our results showed that obesity has systemic effects, beside decresing migratory and proliferative capacity and increasing adipogenic differentiation and reducing osteogenic differentiation. Therefore, it's possible to affirm that hypernutition during lactation induces obesity in adulthood ant that it's capable of altering characteristics crucial to the success of a stem cell transplant.

Keywords: Cell therapy. Mesenchymal stem cells. Migration. Proliferation. Differentiation. Obesity. Hyperlactation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diferenciação das células hematopoiéticas no processo de hematopoiese..... 17
Figura 2 - Componentes celulares e não celulares da medula óssea..... 18
Figura 3 - Nicho das CTMs na medula óssea..... 21
Figura 4 - Curva de massa corporal dos animais..... 37
Tabela 1 - Valores de comprimento naso-anal, peso da gordura epididimal e retroperitoneal dos animais controles e obesos.... 38
Figura 5 - Gráficos representativos do teste de intolerância à glicose..... 39
Figura 6 - Gráfico representativo dos valores de insulinemia..... 39
Figura 7 - Morfologia do fígado..... 40
Figura 8 - Morfologia do pâncreas..... 41
Figura 9 - Morfologia do Tecido Adiposo..... 41
Figura 10 - Fotomicrografias da medula óssea coradas com HE..... 42
Figura 11 - Fotomicrografias da Imunocitoquímica para TNF-α..... 43
Figura 12 - Gráficos da porcentagem de células $CD105^+$ e c-KIT^+..... 43
Figura 13 - Fotomicrografias da cultura de células controle e obeso..... 44
Figura 14 - Gráfico representativo da taxa de proliferação..... 45
Figura 15 - Gráfico comparativo de viabilidade de células..... 46
Figura 16 - Gráfico representativo da quantificação da área coberta..... 46
Figura 17 - Fotomicrografias durante o teste de migração..... 47
Figura 18 - Gráficos da porcentagem de células $CD105^+$ e c-KIT^+ 48
Figura 19 - Fotomicrografias representativas da diferenciação adipogênica..... 49
Figura 20 - Gráfico representativo da quantificação de acúmulos lipídicos..... 49
Figura 21 - Fotomicrografias representativas da diferenciação osteogênica..... 50
Figura 22 - Gráfico representativo da quantificação de acúmulos de cálcio..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina Trifosfato

C – Grupo Controle

CTM – Célula-Tronco Mesenquimal

CTH – Célula-Tronco Hematopoiética

CFU-F – Colônias Semelhantes a Fibroblasto

CO_2 – Gás Carbônico

DEvH – Doença do Enxerto versus Hospedeiro

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco

DPM – Desvio Padrão da Média

ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática

g - Grama

HE – Hematoxilina-eosina

HLA – Antígeno de leucócitos humanos

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC – Índice de Massa Corporal

IL – Interleucina

KG – quilogramas

MCP-1 - Proteína Quimiotática de Monócitos

MIF - Fator Inibidor da Migração de Macrófagos

mL – mililitro

mm – Milímetros

MMP - Metaloproteinase

MO – Medula Óssea

mg – Miligrama

nM - nanomolar

OB – Grupo obeso

OMS – Organização Mundial de Saúde

RPM – Rotações por minuto

SFB – Soro Fetal Bovino

TAB – Tecido Adiposo Branco

TAM – Tecido Adiposo Marrom

TAMO – Tecido Adiposo de Medula Óssea

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral alfa

UCP – Proteína desacopladora

UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

µL - microlitro

µM – micrometro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	13
1	**OBJETIVOS**.....	29
1.1	**Objetivos específicos**.....	29
2	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	30
2.1	**Modelo Experimental de Obesidade**.....	30
2.2	**Análise da MassaCorporal**.....	30
2.3	**Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose**.....	31
2.4	**Coleta de Dados Biométricos**.....	31
2.5	**Insulinemia**.....	31
2.6	**Processamento do Esterno, Fígado, Pâncreas e Gorduras Epididimal e Retroperitoneal**.....	32
2.7	**Coloração com Hematoxilina-Eosina**.....	32
2.8	**Imunomarcação para TNF-α**.....	32
2.9	**Isolamento e Cultivo das Células de Medula Óssea**.....	33
2.10	C**aracterização Imunofenotípica das Células de Medula Óssea e da Fração Aderente**.....	33
2.11	**Proliferação por WST-1**.....	34
2.12	**Ensaio de Migração**.....	35
2.13	**Diferenciação das CTMS nas Linhagens Adipogênica e Osteogênica**.....	35
2.14	**Análises Estatísticas**.....	36
3	**RESULTADOS**.....	37
3.1	**Dados Biométricos**.....	37
3.1.1	Massa Corporal.....	37
3.1.2	Comprimento Naso-anal e Pesagem da Gordura Epididimal e Retroperitoneal.....	38
3.2	**Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose**.....	38
3.3	**Insulinemia**.....	38
3.4	**Histologia dos Órgão**.....	40
3.5	**Medula Óssea**.....	42

3.5.1 Morfologia da Medula Óssea..... 42
3.5.2 Iminocitoquímica para TNF-α..... 42
3.5.3 Citometria das Células de Medula Óssea..... 43
3.5.4 Cultura das Células de Medula Óssea..... 44
3.5.5 Proliferação das Células Aderentes..... 45
3.5.6 Viabilidade das Células Aderentes..... 45
3.5.7 Teste de Migração..... 46
3.5.8 Citometria das Células Aderentes..... 48
3.5.9 Diferenciação Adipogênica e Osteogênica..... 48
4 **DISCUSSÃO**..... 51
CONCLUSÃO..... 56
REFERÊNCIAS 57

INTRODUÇÃO

A Terapia Celular, inserida na medicina regenerativa, visa criar alternativas para a regeneração de tecidos lesionados. As células da medula óssea estão entre as mais utilizadas para desordens sanguíneas. A medula óssea está presente no interior dos ossos longos e sua principal função é a hematopoiese. Esta é um processo de proliferação e especialização celular, formando as células que compõem o sangue (Watt, F. M.; 2010; Larijani, B.; 2012; Fadine, G. P.; 2014).

Duas importantes linhagens de células-tronco adultas estão presentes na medula óssea: a célula-tronco hematopoiética (CTH) e a célula-tronco mesenquimais (CTM). A primeira possui a função é gerar todos os tipos de celulares presentes no sangue, dando origem às células progenitoras que são responsáveis pela expansão da população de uma linhagem. Já a segunda, as células-tronco mesenquimais, são células-tronco adultas presentes em diversos órgãos como: medula óssea, tecido adiposo, polpa dental, placenta, entre outros (Calvi, L. M.; 2015).

Células-tronco mesenquimais são as células-tronco mais utilizadas do corpo humano devido a facilidade de isolamento e expansão. Existe um consenso geral de que o efeito parácrino destas células são os responsáveis pelo efeito terapêutico. As CTMs liberam uma infinidade de fatores biologicamente ativos como: citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e miRNAs, que são uma alternativa para as terapias celulares. Estudos mostraram que doenças metabólicas como a obesidade e o diabetes levam a defeitos no ambiente da medula óssea, alterando as propriedades terapêuticas encontradas nas CTMs (Dang, L. T.; 2017; Kusuma, G. D.; 2015).

Todavia, alterações metabólicas causadas por doenças como a obesidade são capazes de alterar o nicho onde estas células mencionadas estão inseridas. Sabe-se que a inflamação de baixa intensidade que ocorre durante a obesidade prejudica a hematopoiese, compromete a diferenciação, aumenta a apoptose e altera a capacidade proliferativa das células de medula óssea (de Oliveira, G.; 2014; Fadini, G. P.; 2016) .

O combate à obesidade tem tomado grande importância recentemente pois esta doença está relacionada à diversas doenças como: diabetes mellitus tipo 2,

doenças cardiovasculares, doenças renais e câncer que estão entre as doenças mais letais. Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que 1,1 bilhão de indivíduos adultos no mundo estão acima do peso e 300 milhões possuem obesidade. A obesidade é caracterizada pela metainflamação que é uma resposta inflamatória crônica e de baixa intensidade, causando efeitos sistêmicos, provocada pela necrose dos adipócitos durante o estabelecimento da enfermidade (Iezzi, M. L.; 2017; Mamdouh, M.;2017).

Terapia Celular

A terapia celular está inserida na medicina regenerativa e visa a manipulação de células para regeneração de órgãos e tecidos. Esta se baseia no transplante de células humanas para substituir ou reparar tecido danificado e/ou células. No início no século XIX, o pesquisador Charles-Edward Brown-Sequard tentou parar os efeitos do envelhecimento através da injeção de extrato de testículo de animais, iniciando assim, a terapia celular. O transplante de células da medula óssea é o segundo mais antigo procedimento sendo utilizado para desordens sanguíneas como: leucemias, linfomas, anemias e imunodeficiências. Com novas tecnologias, produtos inovadores e imaginação ilimitada, muitos tipos diferentes de células podem ser usados como parte de uma terapia ou tratamento para uma variedade de doenças e condições (Watt, F. M.; 2010; Lefrère; 2010; Larijani, B.; 2012; AABB; 2017).

Por ano são realizados aproximadamente vinte mil transplantes de CTH alogênico no mundo. Porém ainda existe uma taxa de morbidade e mortalidade de pacientes transplantados. Este fato se dá principalmente pela Doença do Enxerto versus Hospedeiro (DEvH) que é mediada por linfócitos dos doadores alorreativos que residem no enxerto e visam os tecidos do hospedeiro não malignos. As principais proteínas na superfície das células hospedeiras responsáveis pela atividade imunológica são os antígenos de leucócitos humanos (HLAs). As proteínas de classe I (A, B e C) são expressas por todas as células nucleadas, enquanto as de classe II (DRB1, DQB1 e DPB1) são predominantemente expressas em células-tronco hematopoiéticas (Bonin, M.; 2014).

O uso de células-tronco na terapia celular ganhou força com a descoberta de diferentes tipos de células-tronco humanas: embrionárias, adultas e pluripotentes-induzidas (Takahashi; 2006). As células-tronco embrionárias são obtidas do zigoto, sendo caracterizadas como totipotentes, tendo a capacidade de se diferenciar em todas as células que compõem o indivíduo e os anexos embrionários, ou do blastocisto, sendo considerada pluripotentes, possuindo a capacidade de se diferenciar em todas as células que constituem o indivíduo. Já as células-tronco adultas são células indiferenciadas presentes num tecido diferenciado, possuindo a capacidade de auto-renovação e diferenciação em diferentes tipos celulares constituintes do tecido. Estas são multipotentes, apresentando uma alta, porém limitada capacidade de diferenciação. Já as células pluripotentes-induzidas são obtidas através da indução artificial de uma célula diferenciada à pluripotência (Gilber; 2000; IPCT; 2013).

Procedimentos terapêuticos de rotina estão mudando para o uso de recursos biológicos e moleculares. O uso potencial de células-tronco embrionárias e a invenção de células-tronco induzidas aumentou a esperança para fins terapêuticos regenerativos. No entanto, o uso dessas intervenções levou a preocupações com a saúde e as questões éticas surgiram em termos de uso dessas células em aplicações clínicas. Além da capacidade de repovoamento, a terapia celular também visa a capacidade secretora das células transplantadas, que modulam a resposta do hospedeiro através da liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que auxiliam no reparo tecidual.

Atualmente a fonte de células-tronco mais eficaz para a terapia celular são as obtidas de um organismo adulto, que podem ser encontradas em vários tecidos como o cérebro, pele, músculo esquelético, fígado e medula óssea. Esta última é uma das principais fontes utilizadas para transplante, devido ao fácil acesso e por possuir dois importantes tipos de célula-tronco as hematopoiéticas e as mesenquimais (Bonin, M.; 2014). Em relação ao efeito parácrino no reparo tecidual, as Células-Tronco Mesenquimais (CTM) possuem grande vantagem uma vez que liberam um secretoma (Teixeira F. G.; 2017). As CTM possuem ação anti-inflamatória e por ausência de expressão de proteínas do sistema imune não induzem a resposta imunológica. Porém questões éticas e de segurança sobre o uso dessas células ainda é um problema a ser superado (Lee, J. W.; 2009; Dang, L. T.; 2017). Assim, as células-tronco adultas tornaram-se mais atrativas e as células-

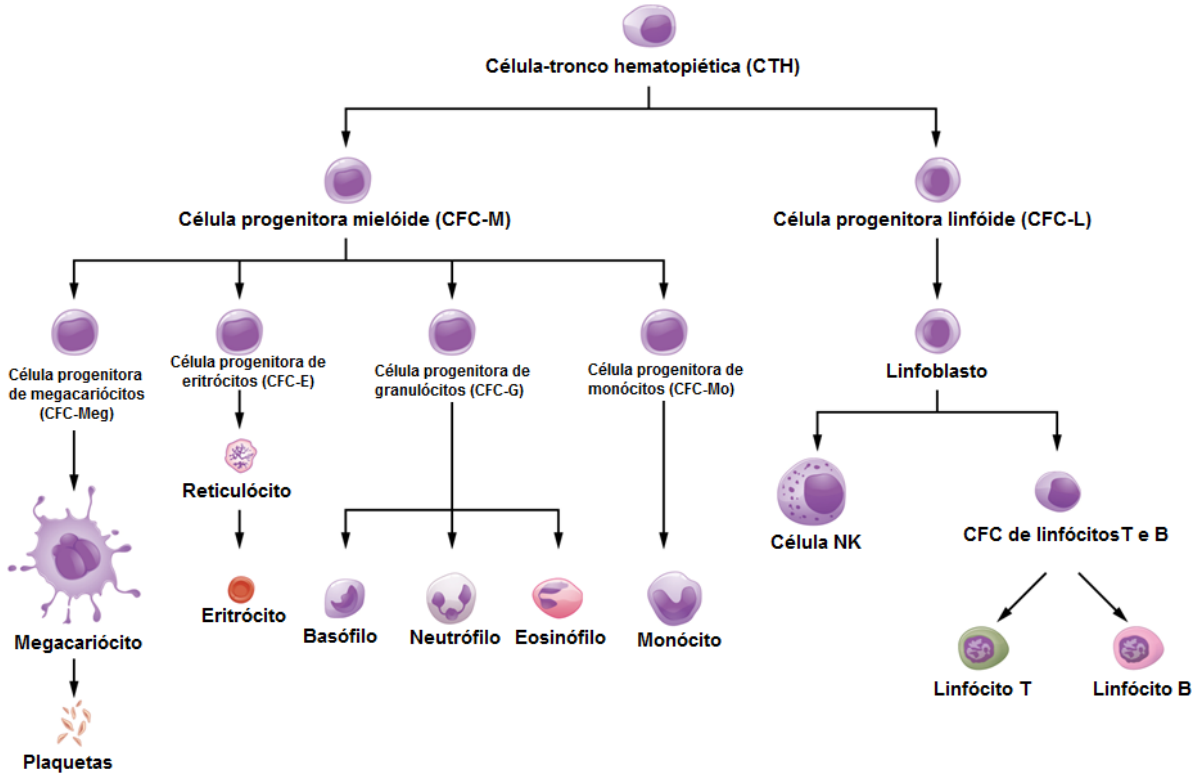
tronco mesenquimais se mostraram uma promessa de terapia celular regenerativa com um nível limitado de risco (Rohban, R.; 2017).

Medula Óssea

A medula óssea (MO) está localizada no interior de ossos longos e chatos, ocupando o espaço entre as trabéculas ósseas. Sua função primária é o abrigo e a regulação do processo de formação celular sanguíneo (hematopoiese) por toda vida adulta. A medula pode ser classificada como medula vermelha, com hematopoiese ativa e extremamente celularizada, ou amarela, rica em adipócitos que preenchem o espaço intertrabecular com celularidade e hematopoiese reduzida. Os vasos arteriais entram na MO através de forames nutriciais e depois dividem-se em arteríolas, capilares e sinusóides que permeiam a medula central e endosteal (Fadine, G. P.; 2014).

A hematopoiese é um processo de proliferação e especialização celular. Células de diversos níveis de diferenciação estão presentes na medula simultaneamente. As Células-Tronco Hematopoiéticas (CTH) são responsáveis por gerar todos os tipos celulares presentes no sangue, dão origem ás células progenitoras que são responsáveis pela expansão da população de uma linhagem. Essas, por sua vez, dão origem a células totalmente diferenciadas que realizam a função específica ao seu tipo celular (Figura 1). As células-tronco ocupam a região endosteal, localizada na superfície interna do osso, enquanto as células progenitoras e diferenciadas vão progressivamente ocupando a medula em direção a região central (Cordeiro-Spinetti, E.; 2015).

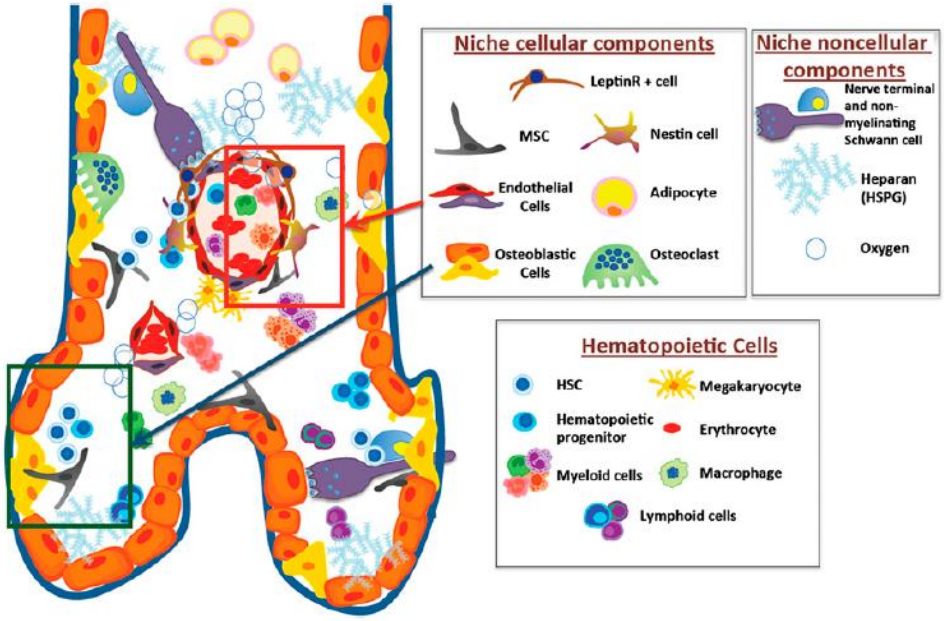
Figura 1 - Diferenciação das células hematopoiéticas no processo de hematopoiese



Fonte: Adaptado do https://www.khanacademy.org

Duas populações distintas de células compõem a medula óssea: células relacionadas diretamente à hematopoiese e células que participam indiretamente da hematopoiese. As células que participam indiretamente da hematopoiese são chamadas de fração estromal, um tecido conectivo composto por células reticulares estromais semelhantes a fibroblastos, células endoteliais, células perivasculares, adipócitos, osteoblastos, nervos simpáticos e células de Schwann não mielinizadoras e células-tronco mesenquimais (Calvi, L. M.; 2015) (Figura 2).

Figura 2 - Componentes celulares e não celulares da medula óssea



Fonte: Adaptado de Fadine, G. P.; 2014.

As Células-Tronco Mesenquimais (CTM) possuem papel importante no nicho da medula óssea. Estas atuam como componentes celulares do nicho e fornecem sinais de sobrevivência para as CTH além de serem simultaneamente células progenitoras osteoblásticas que reabastecem o nicho endosteal. As CTMs ocupam anatomicamente locais distintos dentro da medula óssea: endosteal, estromal e perivascular. As CTMs perivasculares desempenham um papel crítico na manutenção do pool de CTH quiescentes e entrantes na medula óssea com a produção de quimiocinas (CXCL2 e SDF-1) que medeiam o retorno e a sobrevivência dessas células (Bonin, M.; 2014; Bara, J. J.; 2014).

Tecido Adiposo de Medula Óssea

Na Medula Óssea são encontrados adipócitos que tem a função de regular a hematopoiese. Este tecido adiposo representa mais de 5% do total da massa da Medula Óssea e 10% da massa adiposa total em seres humanos magros e saudáveis. O Tecido Adiposo de Medula Óssea (TAMO) aumenta em casos de:

osteoporose, deficiência em estrogênio, anorexia nervosa, restrição calórica, Diabetes Mellitus Tipo 1 e tratamento com glicocorticoides, não sendo relacionado ao aumento de massa corporal do indivíduo nem à obesidade (Susntol, R. J.; 2016).

Os adipócitos que compõem o TAMO são uma população heterogênea derivada de múltiplas fontes. Sua origem ainda divide opiniões entre os pesquisadores, podendo ser através de células-tronco da linhagem de osteoblastos em direção à linhagem de adipócitos ou através de células do revestimento ósseo, células fibroblásticas planas que expressam marcadores da linhagem osteogênica. Existem dois tipos de TAMO na Medula Óssea e eles são classificados como: TAMO constitutivo que possui adipócitos grandes e localizados na região distal da tíbia, sendo compostos principalmente por lipídios não saturados, e TAMO regulado que é encontrado na tíbia proximal intercalada com a hematopoiese ativa e composta por lipídios saturados (Rendina-Ruedy, E.; 2017).

Recentemente foi descoberto que o TAMO contribui para a circulação de adiponectina e produz adipocinas que medeiam benefícios cardio-metabólicos. Além disso, foi verificado que a expansão do TAMO exerce efeitos sistêmicos, portanto, esse tecido é considerado um órgão endócrino. Ele também produz adipocinas, citoquinas e lipídios que exercem efeitos locais no osso (Susntol, R. J.; 2016).

O reconhecimento do TAMO como órgão endócrino é apoiado por estudos com leptina e adiponectina. A leptina é um regulador da homeostase energética que circula em proporção ao Tecido Adiposo Branco (TAB), agindo como um indicador de energia a longo prazo das reservas corporais. Sua sinalização ocorre no hipotálamo para regular a saciedade, o balanço energético, a fertilidade e a função imunológica. Estudos *in vitro* observaram que os adipócitos provenientes da medula óssea produzem leptina (Susntol, R. J.; 2016).

Outro estudo revelou que os adipócitos do TAMO também produzem adiponectina que pode exercer efeitos benéficos incluindo a melhora à tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, sobrevivência das células β pancreáticas e função vascular. Apesar da adiponectina ser produzida quase exclusivamente pelo tecido adiposo, as concentrações circulantes são inversamente proporcionais à adiposidade periférica. Em contraste com o TAB, o TAMO aumenta durante a restrição calórica, quando a adiponectina está elevada comprovando sua relação (Susntol, R. J.; 2016).

Célula-Tronco Mesenquimal

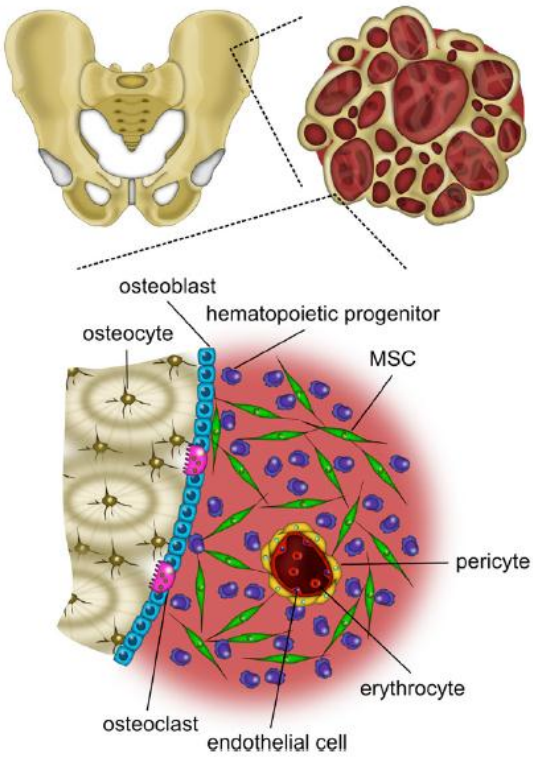
Descoberta em 1976 por Friedenstein, as Células-Tronco Mesenquimais (CTM) possuem um enorme potencial terapêutico por sua capacidade de proliferação, potencial de multilinhagem, capacidade proangiogênica, imunossupressão e relativa falta de preocupações éticas. Além disso, as Células-Tronco Mesenquimais são as células-tronco mais utilizadas do corpo humano devido a facilidade de isolamento e expansão. Esta é utilizada para tratar diversas doenças como: doença do enxerto contra o hospedeiro (DEcH), doença de Crohn e osteoartrite do joelho (Hoch, A. I.; 2015; Dang, L. T.; 2017).

As CTMs demonstram estar envolvidas no auto reparo *in vivo* e processos de autorregeneração de tecidos animais. Em estudos pré-clínicos observou-se que as CTMs mostraram morfologia e fenótipo inalterados. Elas também expressam supressores de tumor e oncogenes em níveis normais, mesmo depois de sofrer uma cultura a longo prazo. Não há evidências que a formação de tumores está associada ao transplante de CTM. Além disso, as CTMs podem ser induzidas a se diferenciar em neurônios funcionais, células epiteliais da córnea e cardiomiócitos sob pré-tratamentos específicos *ex-vivo* e *in vitro* que ampliam a capacidade dessas células em intervenções terapêuticas (Dang, L. T.; 2017; Rohban, R.; 2017).

A importância do uso destas células se dá pelo alcance de resultados positivos relacionados aos 3Rs (Reposição, Reparação e Regeneração). Além disto tem um ótimo potencial terapêutico, seu isolamento é viável, existe uma fonte abundante e as preocupações éticas são mínimas. As CTM podem ser isoladas de diversos tecidos, incluindo: medula óssea, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical, cordão umbilical, polpa dental, apêndices fetais e placenta (Dang, L. T.; 2017).

O potencial regenerativo das CTMs é diferente dependendo da sua fonte. As derivadas de medula óssea participam da hematopoiese ou regeneração da medula óssea (Figura 3). Elas também tem o potencial para dar origem a pericitos, que são as células perivasculares na camada externa dos capilares que suportam a estabilidade dos capilares e direcionam o fluxo sanguíneo. Em estudos com CTM humanas foi demonstrado a sua participação com sucesso na neovasculogênese e colaboração com as células formadoras de colônias endoteliais para o estabelecimento de microvasos perfundos *in vivo*. As CTM de medula óssea tem sido considerada padrão ouro para regeneração osteogênica e condrogênica (Rohban, R.; 2017).

Figura 3 - Nicho das CTMs na medula óssea



Fonte: Adaptado de Hoch, A. I.; 2015.

A identificação das CTM se dá por diversas características: formato fusiforme quando cultivada *in vitro*, propriedade de autorrenovação, formar colônias semelhantes a fibroblastos (CFU-F), aderência a superfícies poliméricas como o plástico e capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Além disso expressam um perfil de marcadores moleculares específicos: positivo

para CD29, CD51, CD73, CD90 e CD105, e negativo para marcadores hematopoiéticos CD14, CD19, CD31, CD34, CD45 e HLA-DR. Não expressam o MHC classe II e apenas expressam o MHC classe I em baixos níveis. São consideradas hipoimunogênicas pois não expressam fas ligante e moléculas co-estimulantes com B7 e CD40 (Dang, L. T.; 2017; Rohban, R.; 2017).

As CTMs compõem aproximadamente 0,01% das células mononucleares na medula óssea, uma pequena porcentagem que diminui com a idade. Por isso, a expansão *in vitro* dessas células é fundamental para o seu uso. O cultivo de células-tronco mesenquimais não possui ainda padronização, sendo utilizado diferentes técnicas dependendo do objetivo e da fonte das células. Estudos mostraram que o plaqueamento direto, em contraste ao isolamento utilizando gradientes de densidade, permitiu a retenção inicial de células hematopoiéticas que segregam sinais que mantém uma maior fração de clonogenicidade das CTMs (Hoch, A. I.; 2015).

Estudos revelaram que em transplantes sistêmicos de CTMs há uma quantidade baixa de células enxertadas no tecido alvo. Existe um consenso geral de que o efeito parácrino destas células são os responsáveis pelo efeito terapêutico. As CTMs liberam uma infinidade de fatores biologicamente ativos como: citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e miRNAs, que são nomeados de secretomas e são uma alternativa para as terapias celulares (Kusuma, G. D.; 2017).

Doenças Metabólicas e as CTMs

O microambiente onde estão inseridas as CTMs afetam as propriedades destas. Estudos mostraram que doenças metabólicas como a obesidade e a diabetes levam a defeitos no ambiente da medula óssea, alterando as propriedades terapêuticas encontradas nas CTMs (Fadini, G. P.; 2016).

Trabalhos recentes mostraram que uma dieta rica em gordura é capaz de alterar a hematopoiese, aumentando o número de CTMs comprometidas com a diferenciação adipogênica e osteogênica, prejudicando a osteoblastogênese e reduzindo o número de CTHs. Essas alterações são resultado da elevação dos níveis de PPARγ através da dieta High-fat (Luo, Y.; 2015). Um trabalho do nosso

grupo demonstrou que o pool de células obtidas de medula óssea de camundongos obesos induzidos por dieta ocidental, tem uma deficiência na capacidade oxidativa sob normoxia, indicativo de dano mitocondrial, além de um metabolismo energético prejudicado, aumento dos níveis de apoptose e diminuição da capacidade proliferativa, o que por sua vez, pode diminuir a capacidade das células se diferenciarem, comprometendo a capacidade regenerativa dessas células (de Oliveira, G; 2014).

Rui Yue e colaboradores em 2016 mostraram que a leptina atua dentro da medula óssea regulando a diferenciação das CTMs e inibindo a diferenciação de osteoclastos. Uma dieta rica em gordura aumentou a adipogênese e reduziu a osteogênese através da sinalização da leptina e seu receptor em resposta à obesidade e à dieta. A exclusão do receptor de leptina das Células-Tronco Mesenquimais não causa obesidade, mas aumenta a intolerância à glicose (Yue, R.; 2016).

O Diabetes e a hiperglicemia levam a múltiplos defeitos microambientais na medula óssea, como: microangiopatia, neuropatia e mobilização de células estaminais prejudicadas. Em relação às CTMs o ambiente hiperglicêmico reduz o potencial proliferativo, aumenta a senescência e a apoptose das células. Além disto, a capacidade de diferenciação, migração e imunomodulação também são alterados (Fadine, G. P.; 2014; Dang, L. T.; 2017).

A obesidade é conhecida como uma doença com efeito sistêmico, prejudicando até o nicho celular da medula óssea. Portanto, é possível que em um transplante de células-tronco autólogas de um indivíduo obeso não sejam encontrados os mesmos efeitos benéficos já estudados.

Obesidade

A obesidade representa um estado de desequilíbrio energético criado por gastos de energia incompatíveis com a atividade física desproporcionalmente baixa, juntamente com o aumento da ingestão de energia (Cuthbertson, D. J.; 2017). Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que 1,1 bilhão de indivíduos adultos no mundo estão acima do peso e 300 milhões com índice de

massa corporal (IMC) acima de 30. A taxa de sobrevivência de pessoas com obesidade diminui de 8 a 10 anos em comparação às pessoas sem essa desordem metabólica (Mamdouh, M.; 2017).

Dados da Pesquisa de Orçamento Familiar que foi produzido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicam que em menos de 10 anos cerca de dois terços da população brasileira poderão de ter excesso de peso. Um estudo realizado com adolescentes brasileiros em 2008-2009 constatou que 25% possuíam sobrepeso e que os adolescentes do sexo masculino tinham maior prevalência de hipertensão e obesidade (Block, K. V.; 2016). Um estudo deste ano mostrou que na população americana aproximadamente 24% das crianças e adolescentes estavam acima do peso e aproximadamente 18% com obesidade (Iezzi, M. L.; 2017)

O gasto total de energia é composto pelos gastos de energia de repouso (60% do total), efeitos térmicos dos alimentos e despesas de energia da atividade (física ou termogênese). A desordem metabólica causada pela obesidade é dada a partir do desbalanço energético provocado pelo consumo excessivo de calorias, levando ao acúmulo deste excesso em forma de tecido adiposo. O sobrepeso e a obesidade podem causar complicações metabólicas como: resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão além de diabetes tipo 2, doenças renais, câncer, doenças cardiovasculares e doença hepática não alcoólica (Cuthbertson, D. J.; 2017; Iezzi, M. L.; 2017).

A obesidade está envolvida com a Síndrome Metabólica que é um conjunto de anormalidades metabólicas interconectadas. Esta síndrome é caracterizada por danos no metabolismo da glicose (diabetes mellitus), metabolismo lipídico (hipercolesterolemia e dislipidemia), pressão sanguínea elevada e obesidade. Também está relacionada com estados pró-trombóticos e pró-inflamatórios, esteatose hepática não alcoólica e distúrbios reprodutivos. A síndrome metabólica já atinge 20 – 25% da população adulta do mundo (Ranasinghe, P.; 2017; Fernandez-Mendonza, J.; 2017).

Um grande aumento no número de casos de obesidade nos últimos trinta anos está envolvido com uma mudança no estilo de vida. Este fato é atribuído ao aumento da ingestão de alimentos industrializados, que são ricos em gordura saturada e açúcares, além da adoção de um estilo de vida sedentário (Popkin, B. M.; 2011; Biddle, S.; 2017).

Estudos recentes afirmam que a obesidade materna afeta o peso corporal e pode alterar funções imunológicas da prole. Um estudo recente com mães que ingeriam bebidas adoçadas artificialmente durante a gravidez mostrou que esta condição provocou aumento do tamanho dos bebês no nascimento além de aumento no risco de sobrepeso e obesidade aos 7 anos de vida destas crianças (Guo, W.; 2017; Zu, Y.; 2017).

A obesidade na infância aumenta o risco de obesidade na vida adulta e está associada ao aumento de incidência de doenças cardiovasculares na vida adulta. O sobrepeso e obesidade infantil estão associados com hiperinsulinemia, e resistência à insulina com o aumento da incidência de dislipidemia, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares já na infância e adolescência. Estas condições podem persistir na fase adulta mesmo sem a manutenção do alto peso. Skinner e colaboradores descobriram que crianças de três anos obesas já possuem marcadores inflamatórios, que são característicos da obesidade, elevados (Skinner, A. C.; 2010; Iezzi, M. L.; 2017).

O combate à obesidade tem sido um assunto bastante debatido. Diversos tratamentos são criados para combater essa enfermidade através da prática de exercícios físicos, medicamentos, dietas, entre outros. Apesar disto, alguns parâmetros fisiológicos modificados pela obesidade ainda não foram elucidados. Com isso, os modelos experimentais de obesidade são uma ferramenta de estudo que mimetizam a obesidade encontrada em humanos (Patel, M. S.; 2011; Lutz, T. A.; 2012). Levando em conta a importância do período pós-natal, já se sabe que alterações durante esse período são capazes de alterar a predisposição a doenças. Nesse contexto surge o termo Metabolic Imprinting que é uma adaptação do organismo às condições atípicas durante o período pós-natal. Porém essas alterações não são benéficas quando ao longo do desenvolvimento, as condições tornam-se favoráveis (Marques, E. B.; 2015).

Modelos experimentais utilizam do princípio do Metabolic Imprinting para desenvolver patologias em cobaias. Plagemann em 1992, desenvolveram um modelo experimental de obesidade através da hiperlactação. Neste modelo, a redução da ninhada de ratas para 3/4 filhotes por lactante foi capaz de induzir os filhotes ao ganho de massa corporal pelo acúmulo de gordura além de alterações metabólicas presentes na obesidade que não eram observadas quando não havia a

redução da ninhada (Plagemann, A.; 1992; Plangemann, A., 1999, Plangemann, A., 2010).

Tecido Adiposo

O tecido adiposo é considerado um tecido heterogêneo, sendo formado por diversos tipos celulares como: adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e outras células do sistema imune (Van Greevenbroek, M. M.; 2013). Existem três tipos de tecido adiposo: branco (desempenha um papel fundamental no armazenamento de energia), marrom (medeia termogênese adaptativa através da abundância de mitocôndrias desacopladas) e o bege (tecido transdiferenciado do tecido branco com morfologia e fisiologia semelhante ao marrom) (Sulston, R. J.; 2016).

O tecido adiposo branco (TAB) é o maior órgão endócrino, secreta diversos hormônios, lipídios, citocinas e outros fatores com efeitos locais e sistêmicos (Sulston, R. J.; 2016). A obesidade altera a função metabólica e endócrina do TAB e leva a uma maior liberação de ácidos graxos, hormônios e moléculas pró-inflamatórias que contribuem para complicações associadas à obesidade (Weisberg, S. P.; 2003).

O TAB reage rapidamente e dinamicamente às alterações durante a privação e excesso de nutrientes através da hipertrofia (aumento de tamanho dos adipócitos) e hiperplasia (aumento do número de adipócitos no tecido). O remodelamento deste tecido é um processo contínuo e acelerado durante a obesidade. O processo de remodelamento envolve o recrutamento de células precursoras adipogênicas juntamente com a indução de várias outras vias, incluindo a via da renina-angiotensina, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular. Em contraste, durante o estabelecimento da obesidade, a expansão do TAB possui angiogênese limitada e hipóxia resultando em mudanças secundárias envolvendo a indução de fibrose tecidual, morte celular de adipócitos e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Durante este processo há maior infiltração de macrófagos M1 (perfil pró-inflamatório) do que macrófagos M2 (perfil anti-inflamatório) (Sun, K.; 2011; Cuthbertson, D. J.; 2017).

O remodelamento do disfuncional do TAB contribui para a deposição visceral e no fígado de gordura. Assim, inicia-se a disfunção metabólica com desenvolvimento de componentes da síndrome metabólica (obesidade, aumento da circunferência abdominal e da cintura, dislipidemia, hipertensão e resistência à insulina) (Cuthbertson, D. J.; 2017).

O estado inflamatório observado no TAB prejudica a capacidade metabólica do tecido e leva a progressão da obesidade. Juntamente ao estado inflamatório a ativação de vias de sinalização de estresse do retículo endoplasmático também contribui para a inflamação na obesidade (Bujisic, B.; 2017). Citocinas pró-inflamatórias como: IL-6, TNF-α, IL-1, IL-10, espécies reativas de oxigênio e moléculas de adesão endotelial são secretadas por células do TAB e possuem efeito parácrino e sistêmico. A concentração de IL-6 expressa no TAB e nas células mononucleares do sangue periférico aumentam progressivamente com a obesidade (Wellen, K. E.; 2003; Iezzi, M. L.; 2017).

As adipocinas são moléculas bioativas que regulam: o balanço energético sensibilização à insulina, regulação do apetite, resposta inflamatória e homeostase vascular. As adipocinas relacionadas à inflamação como: fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), Metaloproteinases de Matriz MMP2, MMP9, IL-6, PAI-1, VEGF e leptina são regulados positivamente pela hipóxia (Sun, K.; 2011; Mamdouh, M.; 2017).

A metainflamação observada na obesidade é caracterizada pela resposta inflamatória crônica e de baixa intensidade. Ela envolve muitos componentes da resposta inflamatória clássica a patógenos e inclui aumentos sistêmicos de citocinas inflamatórias circulantes e proteínas da fase aguda, recrutamento de leucócitos (Lumeng, C. N.; 2011).

O tecido adiposo marrom (TAM) está associado ao aumento do consumo de energia e regula a termogênese adaptativa (sem tremor) em roedores pequenos e recém-nascidos de mamíferos. Nas mitocôndrias do tecido adiposo marrom, a força motora dos prótons através da membrana interna é dissipada como calor em vez de convertida em ATP. Este processo bem regulado é catalisado pela proteína de desacoplamento 1 (UCP1). A alta capacidade termogênica do tecido adiposo marrom ativado em normotermia também pode desempenhar um papel na regulação do equilíbrio energético diante da nutrição hipercalórica. Porém é um tecido

considerado escasso, pois em indivíduos adultos sua massa não excede 100 gramas (Sulston, R. J.; 2016; Klingenspor, M.; 2017).

Os adipócitos beges se assemelham aos brancos em condições basais, têm baixa expressão basal de UCP1, mas têm a capacidade de induzir UCP1 após estimulação e oxidar lipídios e conduzir a termogênese. Como a atividade dos adipócitos bege é indutível, e uma série de recentes modelos de ratos mostraram que a indução de adipócitos bege está ligada a saúde metabólica melhorada, os adipócitos bege estão ganhando muito interesse de pesquisa. Em adultos, o TAM é geralmente composto de adipócitos brancos e marrons e o gene padrão de expressão lembra mais os adipócitos bege de roedores do que os clássicos adipócitos marrons de roedores. Portanto, dada a natureza induzível da gordura bege roedor, é provável que o que hoje chamamos TAM humano é bege (Hoffman, J.; 2017).

Uma vez que a obesidade provoca alterações sistêmicas, afetando diversos órgãos e tecidos, a avaliação das condições fisiológicas que se encontram as células da medula óssea de indivíduos obesos é de fundamental importância, já que a sua capacidade de proliferação, migração e diferenciação são importantes para o sucesso da terapia celular.

1 **OBJETIVOS**

Analisar a viabilidade das células da medula óssea de camundongos obesos avaliando a capacidade de proliferação, migração e diferenciação de células de medula óssea de camundongos *Swiss* obesos.

1.1 **Objetivos específicos**

a) Avaliar os parâmetros biométricos (massa corporal, comprimento naso-anal e peso da gordura epididimal e retroperitoneal), glicemia e insulinemia dos animais dos grupos controle e obeso;
b) Avaliar o perfil inflamatório da medula óssea através da expressão de TNF-α;
c) Caracterizar imunofenotipicamente as células de medula óssea após plaqueamento de 7 dias dos camundongos dos grupos controle e obeso, por citometria de fluxo;
d) Avaliar a taxa de proliferação das células aderentes da medula óssea dos camundongos dos grupos controle e obeso, por WST;
e) Analisar a mobilidade das células aderentes da medula óssea dos grupos experimentais em cultura através de ensaio de migração (wound healing);
f) Avaliar a capacidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais de medula óssea de camundongos controle e obeso nas linhagens adipogênica e osteogênica.

2 **MATERIAL E MÉTODOS**

2.1 **Modelo experimental de obesidade**

Para obtenção de camundongos obesos foi utilizado o modelo de redução de ninhada durante a lactação com camundongos *Swiss* machos (Plagmann, A.; 1991). Após o acasalamento, fêmeas prenhas foram mantidas em gaiolas individuais, sob condições padrão de ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura ambiente de 23ºC, recebendo água e ração comercial padrão, própria para roedores *ad libtum*. Após 3 dias do nascimento, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (C): formado pelas ninhadas que permaneceram com 9 filhotes durante o período de lactação e após o desmame, aos 21 dias, foram separados 3 machos por gaiola; e Grupo Obeso (OB): formado pelas ninhadas que permaneceram com apenas 3 filhotes machos por gaiola. Os animais de ambos os grupos receberam água e ração comercial padrão após o desmame, própria para roedores *ad libtum* até a data da eutanásia.

A eutanásia foi realizada aos 90 dias de vida dos animais e cada grupo foi composto por 5 animais. Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética (protocolo CEUA/039/2012).

2.2 **Análise da massa corporal**

Para avaliar o efeito da hiperalimentação durante a lactação sobre a massa corporal dos animais, estes foram pesados a cada 10 dias a partir da data de nascimento em balança analítica de precisão até completar 90 dias de vida.

2.3 **Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose**

Uma semana antes da eutanásia dos animais foi realizado o teste intraperitoneal para avaliação de tolerância à glicose. Os animais foram submetidos a 12 horas de jejum para a realização do teste. A injeção de glicose foi realizada na concentração de 1g de Glicose/Kg do animal. Os valores de glicose foram medidos nos tempos: 0 (jejum), 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose. O nível de glicose no sangue foi medido usando um glicosímetro e tiras de teste Accu-Chek Active (Roche Diagnostics, Alemanha).

2.4 **Coleta de Dados Biométricos**

Após a eutanásia dos animais em câmara de CO_2, foram obtidos os dados biométricos dos animais como o peso das gorduras retroperitoneal e epididimal e o comprimento naso-anal utilizando-se de paquímetro.

2.5 **Insulinemia**

Foi coletado o sangue periférico no dia da eutanásia, com seringa contendo heparina e alocado em um eppendorf e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos para separar o plasma. Em seguida, o plasma foi aliquotado e mantido a -80°C, para posterior quantificação da insulina plasmática por ELISA (Elisa Kit – Rat Mouse Insulin, EMD Millipore, EZRMI-13K) seguindo as recomendações do fabricante.

2.6 **Processamento do Esterno, Fígado, Pâncreas e Gorduras Epididimal e Retroperitoneal**

Após a aferição dos dados biométricos, foram coletados o esterno, para análise por microscopia de luz da medula óssea. O fígado, pâncreas e as gorduras retroperitoneal e epididimal também foram coletados e processados para avaliação histológica do perfil obesogênico dos animais. Os tecidos foram fixados em formalina por 48 horas. Após a fixação foram lavados em água corrente seguido de desidratação em bateria de álcool em concentrações crescentes. Em seguida, foram diafanizados em xilol, submetidos a dois banhos de parafina e emblocados na parafina definitiva. Em seguida foram obtidos cortes de 5 µM de espessura para coloração e imunomarcação.

O esterno passou pelo processo de descalcificação em solução de EDTA na concentração de 10M. Esses tecidos foram mantidos por 48 horas na solução e após seguiram para o processamento.

2.7 **Coloração com Hematoxilina-Eosina**

Após a obtenção das lâminas histológicas, estas foram coradas para a análise da morfologia dos órgãos. As lâminas de fígado, pâncreas, gordura epididimal e retroperitoneal e medula óssea presente no Esterno foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). Estas lâminas coradas foram analisadas no microscópio Olympus DP72 e as imagens capturadas no programa ImagePro plus 7.0.

2.8 **Imunomarcação para TNF-α**

Para a observação da presença desta molécula pró-inflamatória na medula óssea, foram utilizadas lâminas histológicas do esterno. O processo de imunomarcação iniciou-se com a desparafinização e hidratação dos cortes. Em

seguida houve a adição de peróxido de hidrogênio para oxidar a peroxidase endógena, imersão em tampão citrato para recuperação dos sítios antigênicos, bloqueio (R.T.U. Normal horse serum (2,5%) - Kit). Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário anti-TNF- α (Santa Cruz Biotechnology) na concentração de 1:100 *overnight*. No dia seguinte, os cortes foram incubados com anticorpo secundário (R.T.U. Biotinylated Pan-Specific Antibody anti-mouse/ rabbit/ goat IgG - Kit) seguido de estreptavidina (Streptavidin/ Peroxidase complex - Kit) e revelados com DAB. Os núcleos foram corados com Hematoxilina e a lâmina montada com Entelan. Foi utilizado o Kit Vectastain Kit Rápido com Peroxidade fabricado por Vector Laboratories, Inc U.S. Headquarters.

2.9 **Isolamento e cultivo de Células de medula óssea**

A obtenção de células provenientes da medula óssea dos animais estudados foi feita através da dissecção dos fêmures e tíbias dos animais após a eutanásia. Estes ossos foram transportados para o fluxo laminar onde as células foram isoladas. Suas epífises foram retiradas para a exposição do canal medular. As diáfises dos ossos foram alocadas em tips para ponteiras p1000 que se encontravam dentro de tubos falcon de 15 mL. Foi realizada uma centrifugação a 1500 RPM por 5 minutos, para coleta da medula óssea. Após a centrifugação foi adicionado às células tampão de lise de hemácias e centrifugado novamente nas mesmas condições citadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado, restando o pellet formado pelas células que foram ressuspendidas com PBS e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e foi realizada a contagem de células com câmara de Neubauer. Também foi realizado o teste de viabilidade celular com Azul de Tripan. Após o ajuste do número de células $1x10^8$ foi adicionado meio DMEM suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB) nas células e estas foram alocadas em garrafas de cultura de 25 mm. O meio foi substituído 2 vezes na semana. As células de medula óssea permaneceram plaqueadas durante 7 dias. Para observação da aparência das células *in vitro* foram feitas fotomicrografias destas no microscópio Nikon eclipse Ti.

2.10 **Caracterização Imunofenotípica das células de medula óssea e da fração aderente**

Para a determinação do perfil de antígenos de superfície das células da medula óssea, estas foram isoladas e ajustadas para 1 x 10^5 de células para a realização do protocolo de imunomarcação para citometria de fluxo. Após a contagem, as células foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Para evitar ligações inespecíficas foi utilizado albumina para bloqueio. Após o bloqueio foi realizada a incubação das células com os anticorpos CD105-PE (marcador de superfície de células-tronco mesenquimais) (abCam) na concentração de 1:50, c-kit-APC (marcador de células-tronco hematopoiéticas) (abCam) na concentração de 1:50. Em seguida as células foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri de acordo com os canais informados para cada anticorpo.

Para a análise do perfil das células aderentes após o primeiro plaqueamento estas células foram cultivadas por 7 dias, tripsinizadas e contadas. 1 x 10^5 de células foram bloqueadas, marcadas com os anticorpos citados acima e lidas no citômetro de fluxo BD Accuri.

2.11 **Proliferação por WST-1**

Para a análise da proliferação das células aderentes após o primeiro plaqueamento, estas foram tripsinizadas e contadas. 1x 10^5 células foram plaqueadas em poços da placa de 96 poços em triplicata. Após 24 horas de aderência, as células não aderidas foram descartadas e as aderentes foram incubadas com 2 µL de WST-1 (Roche) diluído em DMEM. Após 2 horas de incubação, o substrato produzido da reação foi lido em leitor de ELISA nos comprimentos de onda 450 e 630 nm.

2.12 **Ensaio de migração (*Wound-healing*)**

As células isoladas da medula óssea foram plaqueadas em placas de cultura 35mm, até à confluência das células por 7 dias. Quando estas apresentaram uma monocamada confluente foi feita uma “ferida” artificial com o auxílio de uma ponteira estéril. Um campo fixo da cultura foi fotografado digitalmente no microscópio Nikon eclipse Ti no início do experimento (tempo 0) e nos intervalos de tempo 3, 18 e 24 horas para avaliar a migração das células. A análise do resultado foi avaliada com o auxílio do software Image J a partir da medida da área da fenda, atribuindo-se 100% no tempo de 0h.

2.13 **Diferenciação das CTMs nas linhagens adipogênica e osteogênica**

Diferenciação adipogênica

Para indução da diferenciação adipogênica foi utilizado meio DMEM suplementado com 10% de SFB, insulina (concentração de 2,5 µg/mL), dexametasona (concentração de 100 nM), indometacina (concentração de 100 µM) e rosiglitasona (concentração de 5 µM). Foram realizados ciclos da seguinte maneira: as células foram mantidas no meio de indução por 3 dias e por 24 horas no meio de manutenção. A indometacina e a rosiglitasona foram utilizadas apenas na preparação do meio de indução. Após 21 dias de diferenciação as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e coradas com Oil Red *O* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Diferenciação osteogênica

Foi utilizado meio DMEM suplementado com 10% de SFB, β-Glicerosfato (concentração de 14,5 mM), Ácido L-ascórbico (concentração de 100 µM) e dexametasona (concentração de 100 nM) para a diferenciação osteogênica. O meio

foi trocado a cada três dias durante um período de 21 dias. As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e o acúmulo de cálcio foi corado com Alizarina S.

2.14 **Análises Estatísticas**

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) de 5 animais por grupo. Para avaliar a normalidade da distribuição dos dados foi feito o teste de Kolmogorov-smirnov e após a certificação do pareamento dos resultados foi feito o teste t de Student não pareado através do software *Graph Pad Prisma* 6, $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

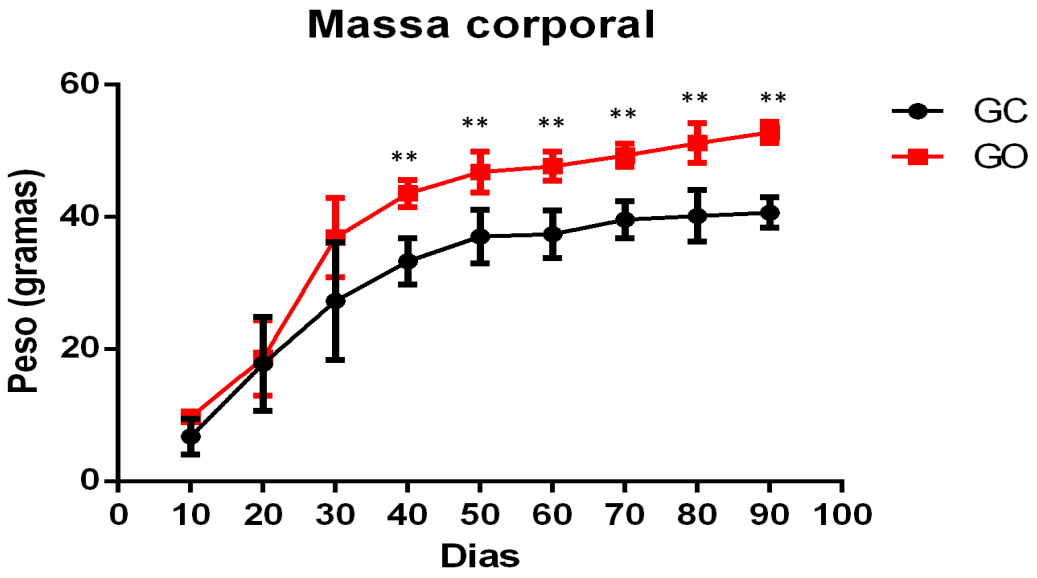
3 **RESULTADOS**

3.1 **Dados Biométricos**

3.1.1 Massa corporal

Nossos resultados demonstraram que os animais hiperalimentados durante a lactação apresentaram aumento de massa 30 % superior aos animais do grupo controle (GC 90d: 40,62 ± 2,38, GOb 90d: 52,75 ± 1,58). Este aumento de massa foi significativo a partir dos 40 dias de vida (Figura 4).

Figura 4 - Curva de massa corporal dos animais dos grupos controle e obeso



Legenda: Os resultados representam média ± DPM de cada grupo. **P<0,01.

3.1.2 Comprimento naso-anal e Pesagem da gordura Epididimal e Retroperitoneal

Para avaliar se o ganho de massa estava associado ao tamanho do animal foi avaliado o comprimento naso-anal. Não houve diferença significativa entre os grupos, comprovando o ganho de massa. Também foi avaliado o peso das gorduras epididimal e retroperitoneal para analisar seu acúmulo de tecido adiposo. No grupo obeso observamos aumento significativo do acúmulo de gordura em relação ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores de comprimento naso-anal, peso da gordura epididimal e retroperitoneal dos animais controles e obesos

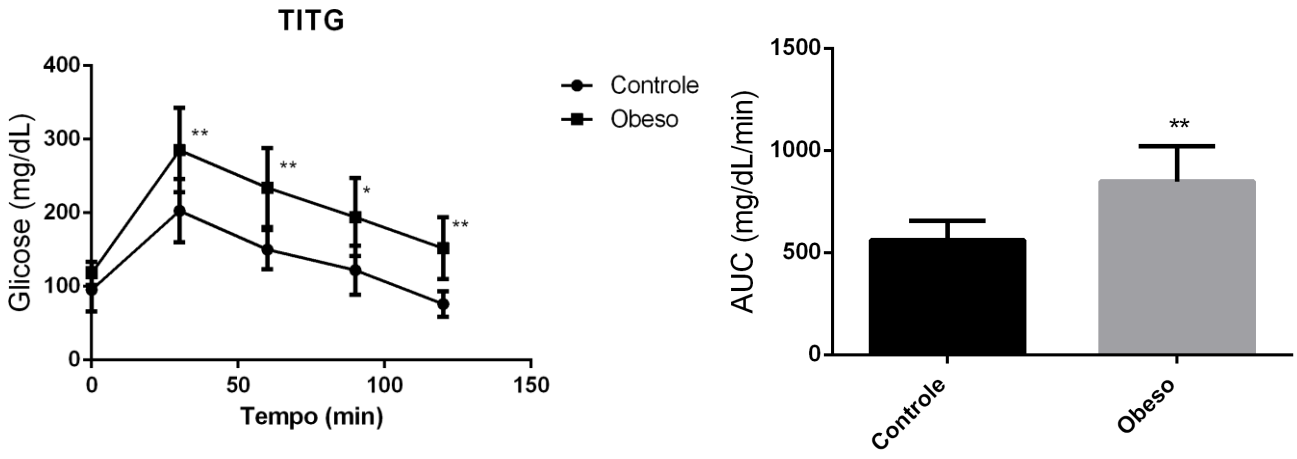
Animais	Controle	Obeso
Comprimento Naso-anal	94,8 ± 3,1	95,3 ± 2,5
Gordura Epididimal	0,76 ± 0,06	1,43 ± 0,18*
Gordura Retroperitoneal	0,38 ± 0,03	0,83 ± 0,25**

Valores apresentados como média + DPM *p<0,05 **p<0,01.

3.2 **Teste Intraperitoneal de Tolerância à glicose (TITG)**

A intolerância à glicose foi avaliada através do TITG. Os resultados mostraram que o grupo obeso possuía valores maiores a partir dos 30 minutos após a administração de glicose, perdurando até o final do teste. Este resultado foi comprovado pelo cálculo da área sobre a curva (Figura 5).

Figura 5 - Gráficos representativos do teste de intolerância à glicose

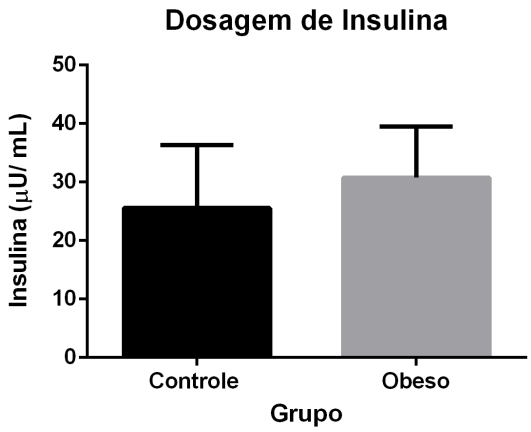


Legenda: Valores apresentados como média ± DPM *P<0,05 **P<0,01.

3.3 **Insulinemia**

A insulinemia foi avaliada através da dosagem plasmática de insulina dos animais. Foi observado aumento de insulina no grupo obeso apesar de não haver diferença significativa. Grupo controle: 25,55 ± 5,371 e Grupo obeso: 30,78 ± 4,352 (Figura 6).

Figura 6 - Gráfico representativo dos valores de insulinemia dos animais de ambos os grupos

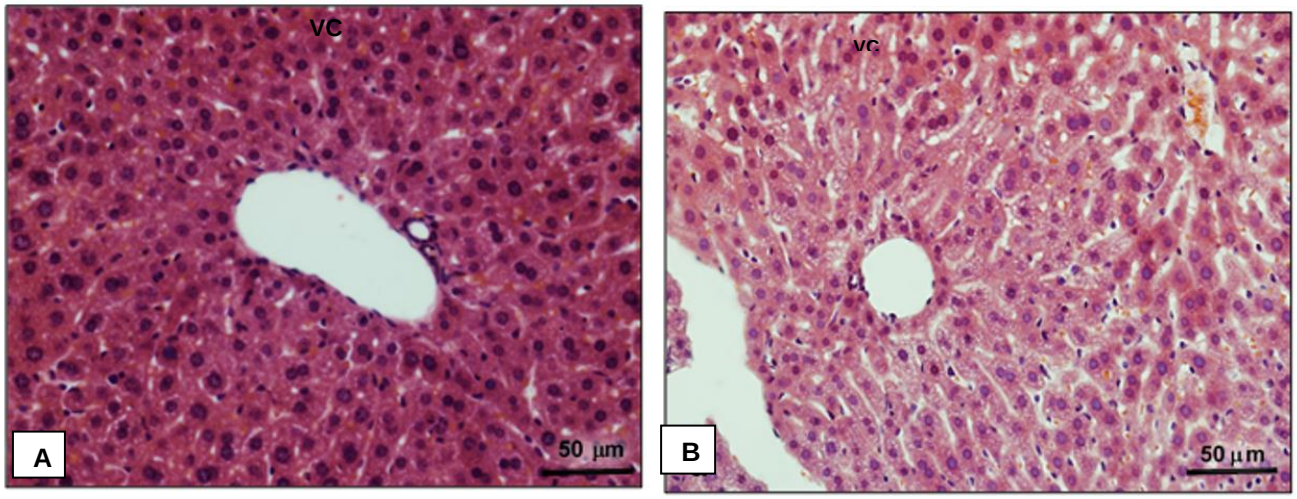


.Legenda: Valores apresentados como média ± DPM.

3.4 **Histologia dos Órgãos**

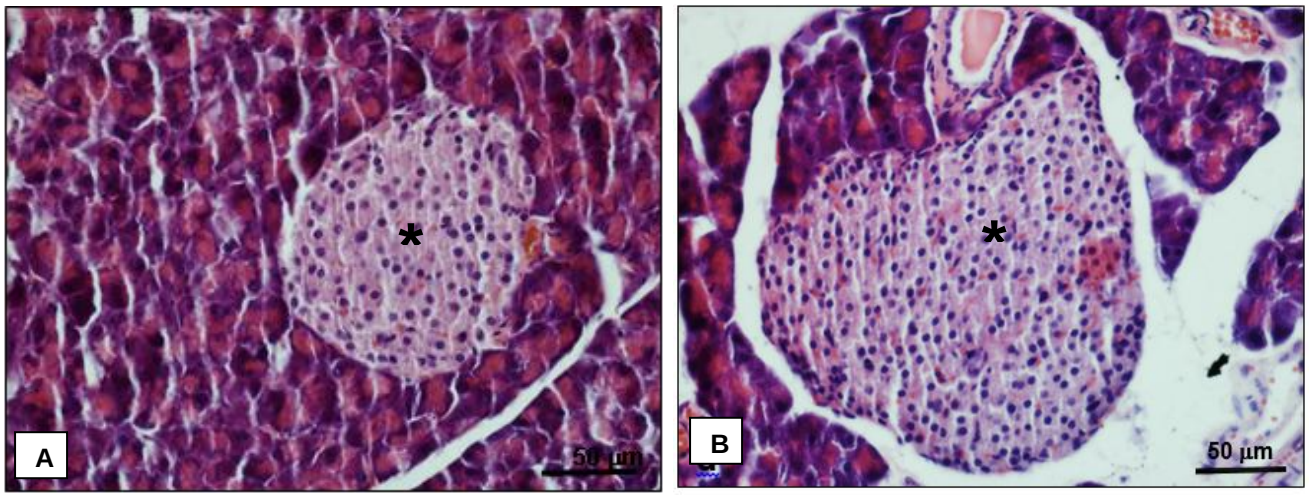
Para avaliar os efeitos sistêmicos da obesidade avaliamos a morfologia do fígado, pâncreas e gordura epididimal e retroperitoneal dos animais de ambos os grupos. Observamos que nos animais do grupo obeso, o fígado apresentava microesteatose (Figura 7), as ilhotas pancreáticas estavam hipertrofiadas (Figura 8) e os adipócitos apresentavam acúmulos lipídicos notavelmente maiores (Figura 9).

Figura 7 - Morfologia do fígado. A coloração de HE mostrou a morfologia dos animais do grupo controle com cordões de hepatócitos e veia centrolobular (VC) ▲ ▲



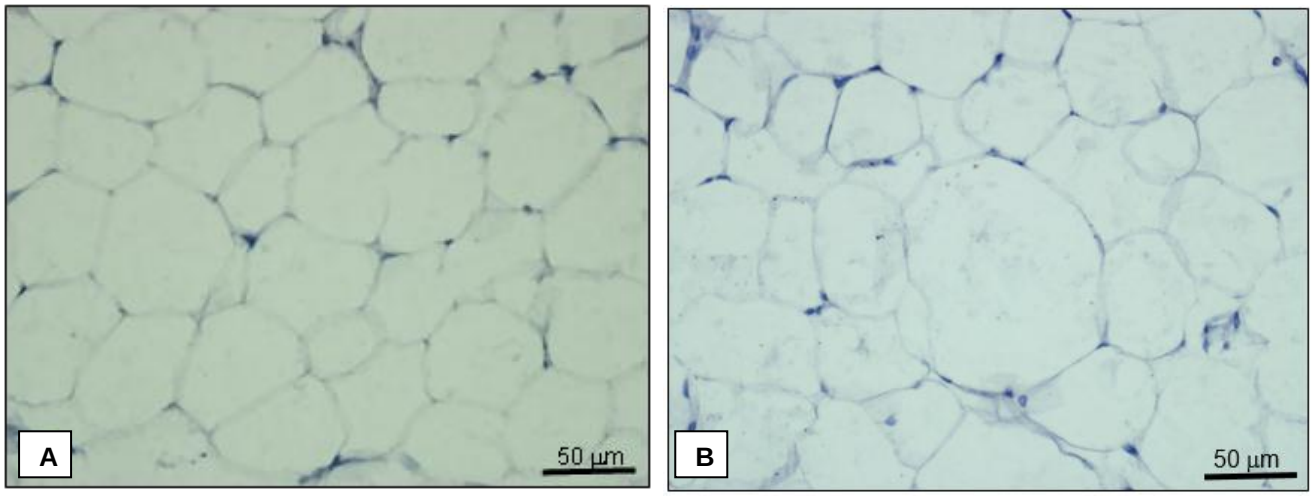
Legenda: (A). No grupo obeso observamos microesteatose (cabeça de seta) (B). Objetiva de 40x.

Figura 8 - Morfologia do pâncreas



Legenda: A coloração HE mostrou a morfologia do pâncreas dos animais do grupo controle com parênquima típico que apresenta ácinos serosos bem corados e ilhotas pancreáticas (*), (A e B). No grupo obeso observamos ilhotas hipertrofiadas (B).
Nota: Objetiva de 40x.

Figura 9 - Morfologia do Tecido Adiposo



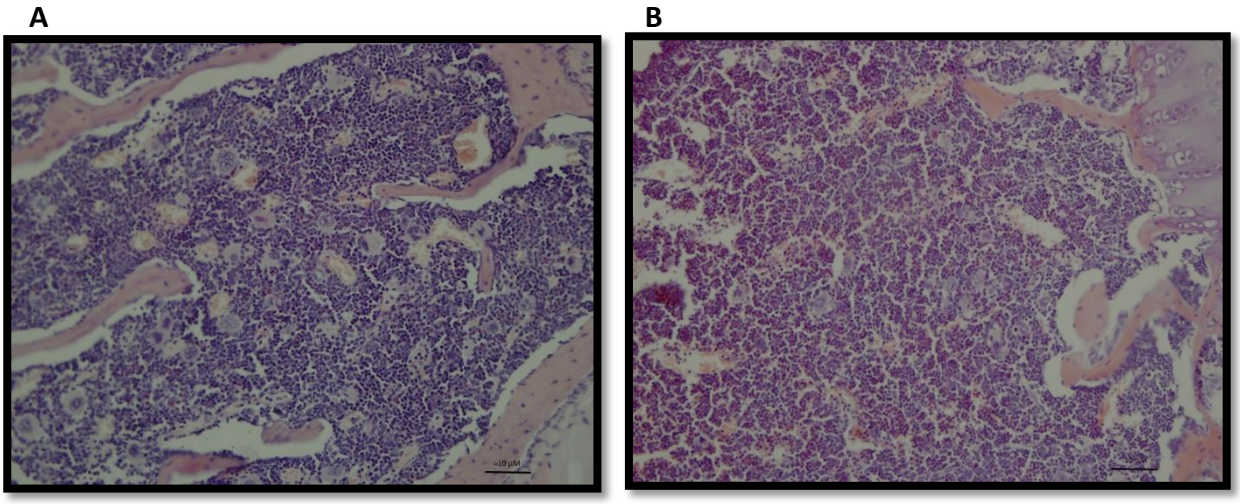
Legenda: A coloração HE mostrou a morfologia dos animais do grupo controle com adipócitos uniloculares característicos do tecido (A). No grupo obeso observamos a hipertrofia dos adipócitos (B).
Nota: Objetiva de 40x.

3.5 **Medula Óssea**

3.5.1 Morfologia da Medula Óssea

Para avaliar a morfologia da medula óssea de ambos os grupos foi realizada uma coloração de rotina Hematoxilina-Eosina (HE). Observamos a presença de células características da medula óssea, sem diferença aparente entre os grupos (Figura 10).

Figura 10 - fotomicrografias da medula óssea coradas com HE

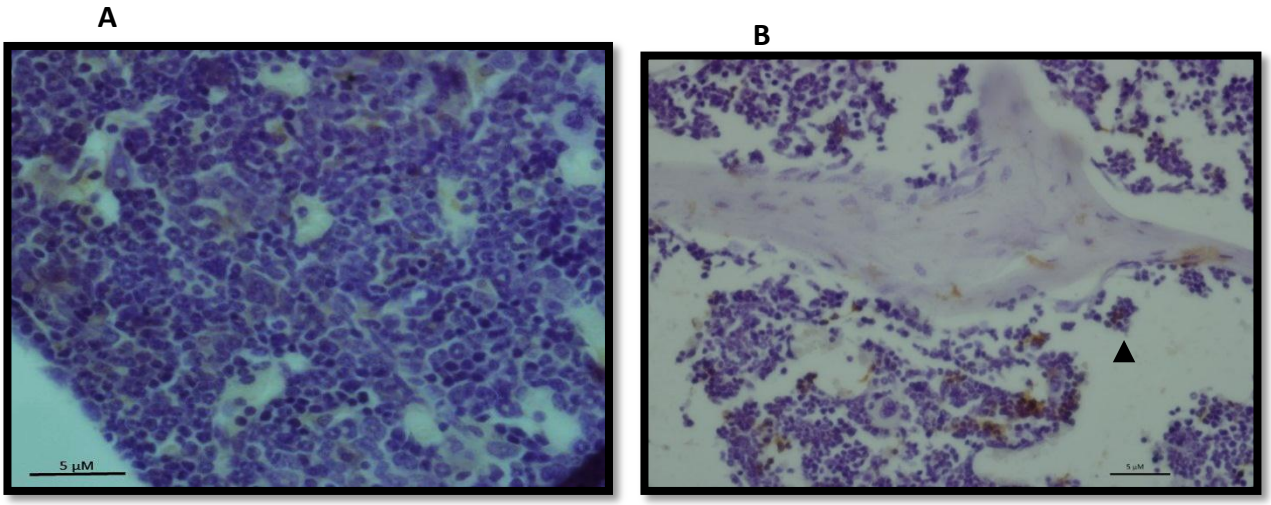


Legenda: Grupo Controle (A) e Grupo Obeso (B).

3.5.2 Imunocitoquímica para TNF-α

Para avaliar o estado inflamatório na medula óssea decorrente da obesidade, foi realizado uma imunomarcação com a molécula pró-inflamatória TNF-α. Foi observado maior marcação aparente no grupo obeso (Figura 11).

Figura 11 - Fotomicrografias da Imunocitoquímica para TNF-α na medula Óssea. Grupo

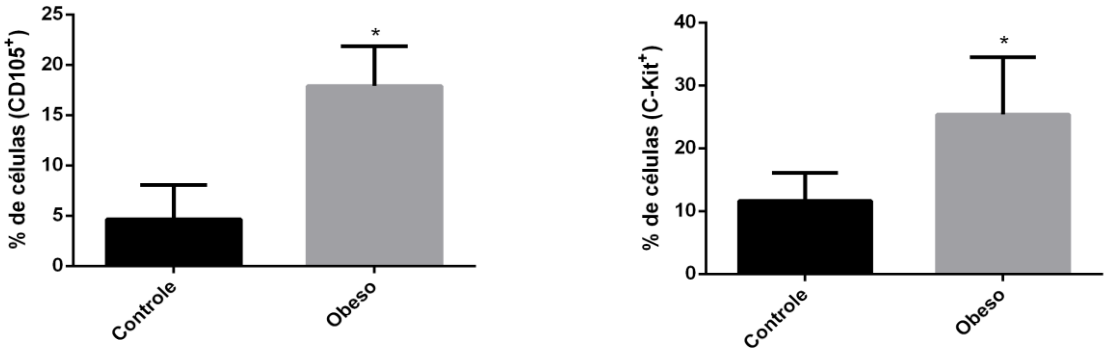


Legenda: Controle (A) sem marcação e Grupo Obeso (B) com marcações acastanhadas (ponta de seta).

3.5.3 Citometria das células da medula óssea

Para analisar o perfil de células-tronco presentes na medula óssea foi realizado uma imunomarcação para CD105 e c-KIT. Os resultados mostraram um aumento no número de células-tronco mesenquimais ($CD105^+$) (GC: 4,63 ± 3,4; GOb: 17,92 ± 3,9) e de células-tronco hematopoiéticas ($c\text{-}KIT^+$) (GC: 11,6 ± 4,48; GOb: 25,39 ± 9,1) no grupo obeso (Figura 12).

Figura 12 - Gráficos representativos da porcentagem de células $CD105^+$ e $c\text{-}KIT^+$ em ambos os grupos

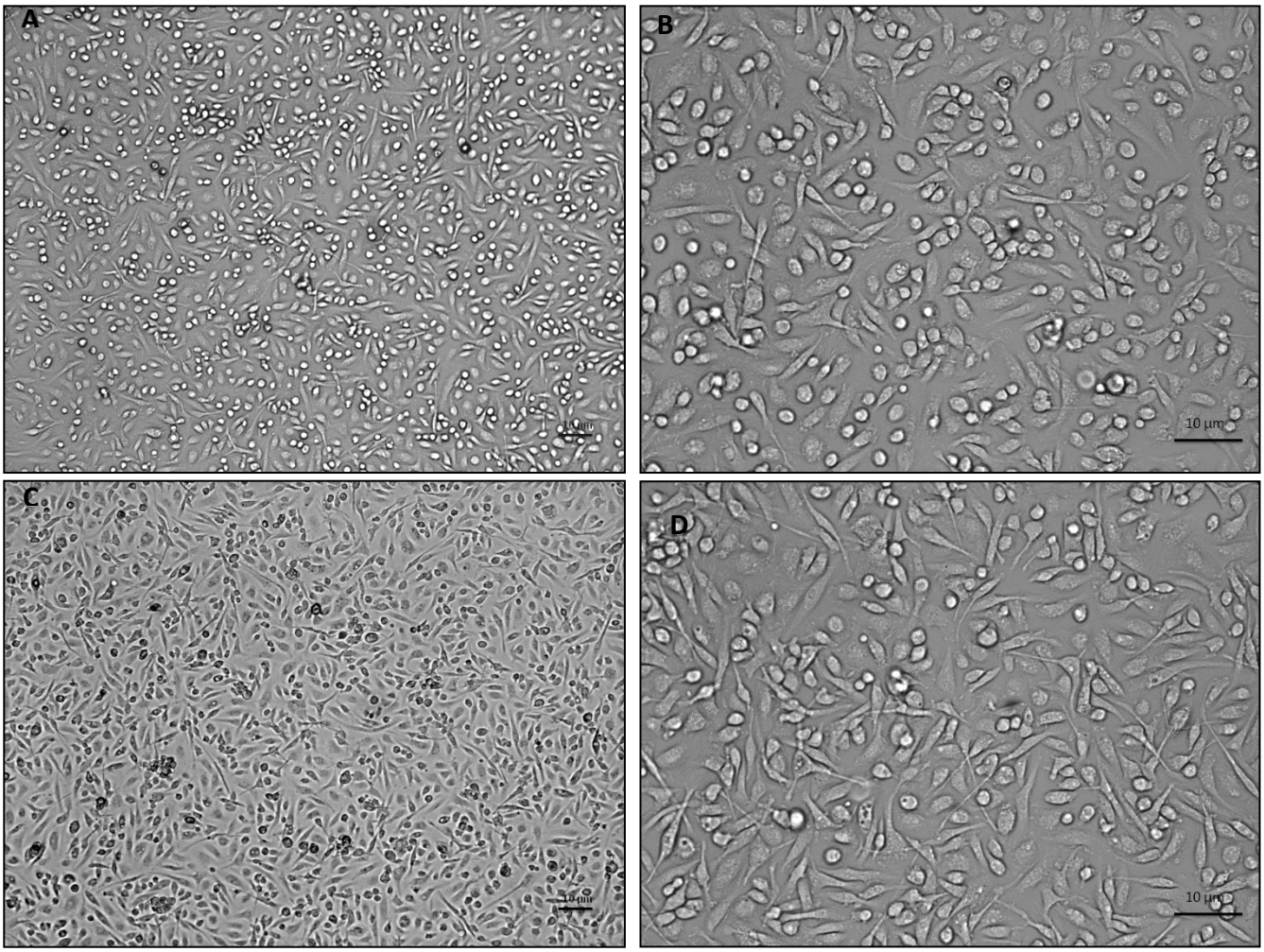


Legenda: Dados apresentados em média ± DPM *p<0,05.

3.5.4 Cultura das células da Medula óssea

Após 7 dias de cultivo avaliamos o perfil morfológico das células aderentes na garrafa de cultura. Observamos que ambos os grupos apresentavam em sua maioria células com morfologia fusiforme, o que é característico das células-tronco mesenquimais (Figura 13).

Figura 13 - Fotomicrografias da cultura

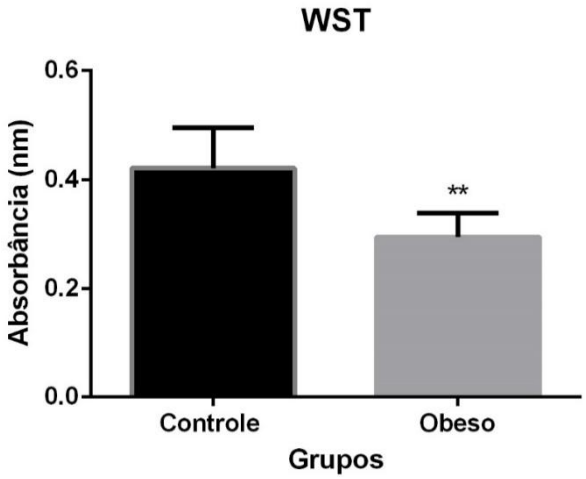


Legenda: Células controle (a;b) e obeso (c;d) em Objetiva de 10x e 20x, respectivamente.

3.5.5 Proliferação das células aderentes

Para avaliar a taxa de proliferação das células aderentes da medula óssea foi realizado o teste utilizando WST. Os resultados mostraram que as células do grupo obeso possuíam uma menor taxa de proliferação em relação ao grupo controle (GC: 0,42 ± 0,07; GOb: 0,29 ± 0,04) (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico representativo da taxa de proliferação dos grupos obeso e controle

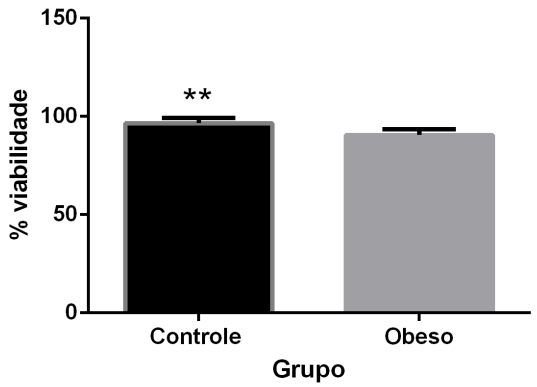


Legenda: Dados expressos como média ± DPM **P<0,01.

3.5.6 Viabilidade das células aderentes

Para avaliação da viabilidade das células foi utilizado o azul de Tripan e contagem em câmara ne Neubauer. Nossos resultados mostraram que a viabilidade das células dos animas obesos era menor quando comparada aos animais controle. Cerca de 99,5% das células controle eram viáveis e 96,4% das células de obesos eram viáveis (Figura 15).

Figura 15 - Gráfico comparativo de viabilidade de células

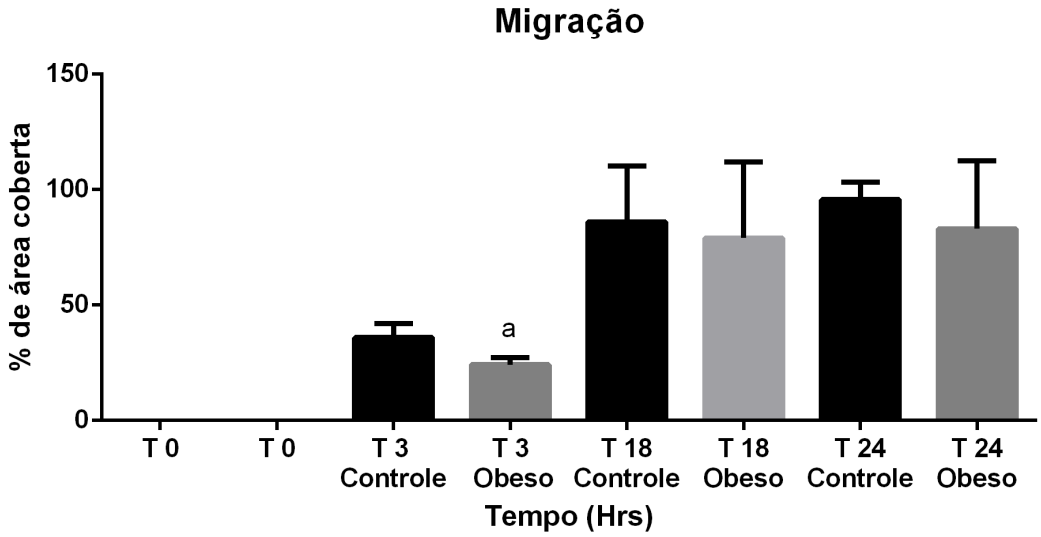


Legenda: Os resultados representam a média ± DPM de cada grupo **p<0,01.

3.5.7 Teste de Migração

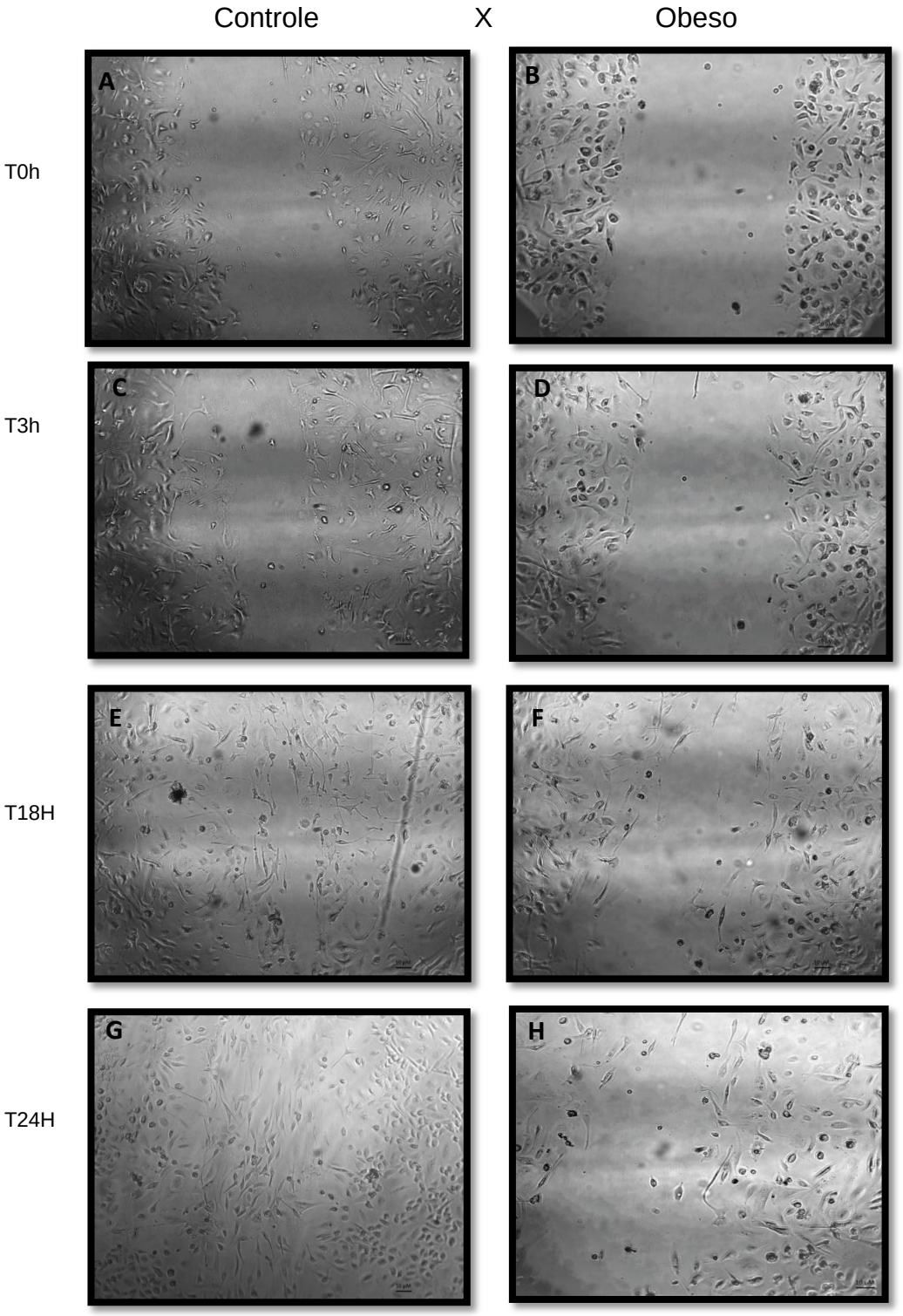
Para avaliar a mobilidade das células de ambos os grupos foi realizado o teste de migração. Os resultados mostraram que as células do grupo obeso apresentavam menor taxa de mobilidade, não sendo capazes de preencher a fenda (Figura 17). Esses resultados foram comprovados pela quantificação do espaço preenchido (GC 0h: 0, GOb 0h: 0; GC 3h: 35,9 ± 3,5, GOb 3h: 24,2 ± 1,7; GC 18h: 86 ± 13,9, GOb 18h: 79 ± 19; GC 24h: 95,6 ± 4,3, GOb 24h: 83 ± 17) (Figura 16).

Figura 16 - Gráfico representativo da quantificação da área coberta



Legenda: Valores apresentados em média + DPM a (p<0,05 T3 Obeso – T3 Controle).

Figura 17 - Fotomicrografias dos grupos obeso e controle durante o teste de migração

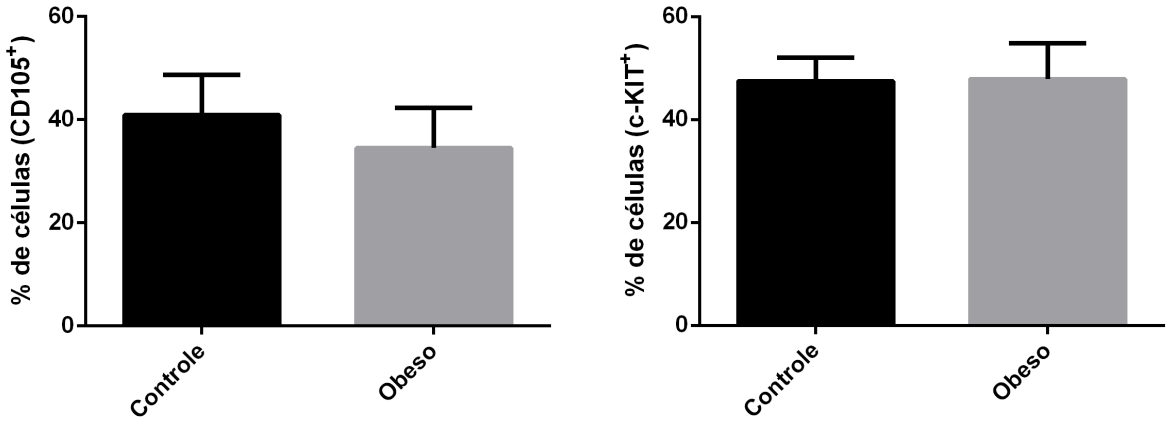


Legenda: A e B (Tempo 0h), C e D (Tempo 3h), E e F (Tempo 18h), G e H (Tempo 24h), controle e obeso, respectivamente. Objetiva de 10x.

3.5.8 Citometria das células aderentes

Para avaliar o perfil das células-tronco presentes na cultura após 7 dias de cultivo, foi realizado uma marcação para CD105-PE e c-KIT-APC. Os resultados mostraram um aumento no número de células-tronco mesenquimais (Grupo Controle: CMO – 4,63% / Po – 40,9%) (Grupo Obeso: CMO – 17,9% / P0 – 34,5%) e Hematopoiéticas (Grupo Controle: CMO – 11,6% / P0 – 47,4%) (Grupo Obeso: CMO – 25,39% / P0 – 47,8%) em relação à citometria realizada com as células totais da medula óssea (Figura 12). Este resultado mostra que houve uma purificação, mesmo que não total, das células-tronco mesenquimais (Figura 18).

Figura 18 - Gráficos representativos da porcentagem de células $CD105^+$ e $c\text{-}KIT^+$ em ambos os grupos



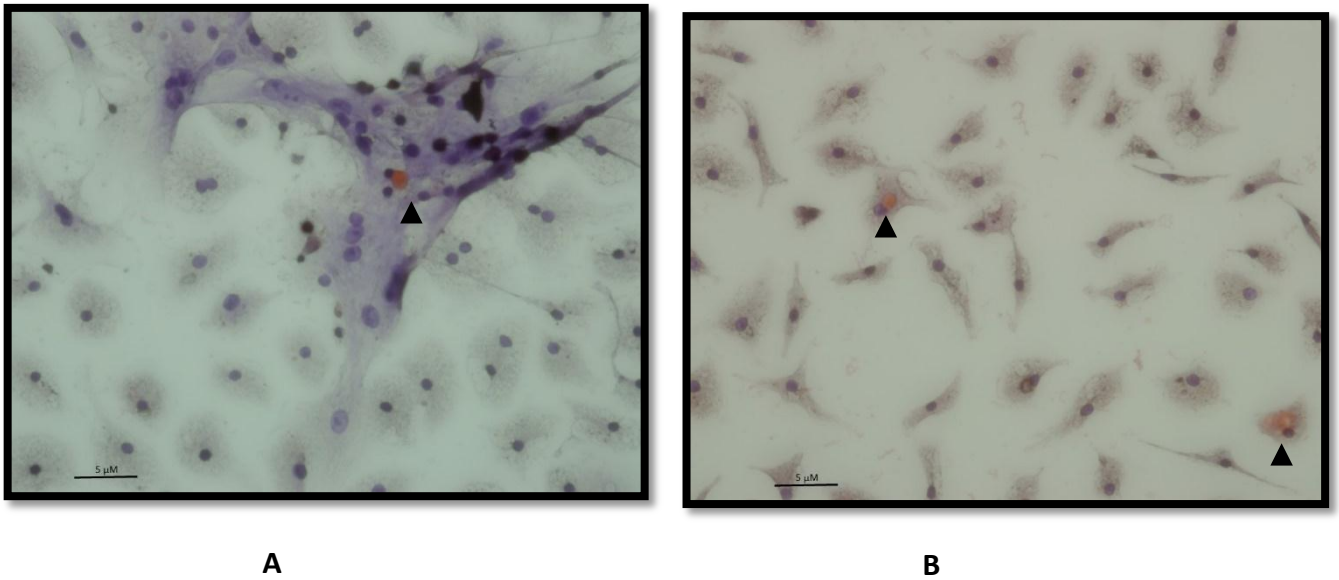
Dados apresentados em média ± DPM.

3.5.9 Diferenciação Adipogênica e Osteogênica

Para avaliar a capacidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais presentes na cultura foram realizadas as diferenciações adipogênica e osteogênica. Observamos que em ambos os grupos da diferenciação adipogênica apresentaram células com acúmulo lipídico, porém o grupo obeso apresentou maiores acúmulos (GC: 0,02 ± 0,003; GOb: 0,05 ± 0,01) (Figura 19 e 20). Na diferenciação osteogênica observamos que em ambos os grupos apresentavam acúmulos de cálcio e o grupo

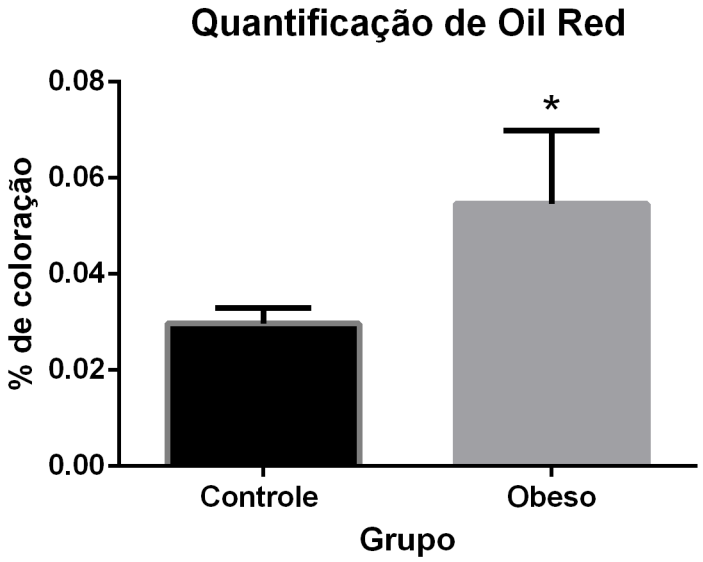
obeso apresentou menores acúmulos de cálcio (GC: 0,67 ± 0,36; GOb: 0,22 ± 0,06) (Figura 21 e 22).

Figura 19 - Fotomicrografias representativas da diferenciação adipogênica



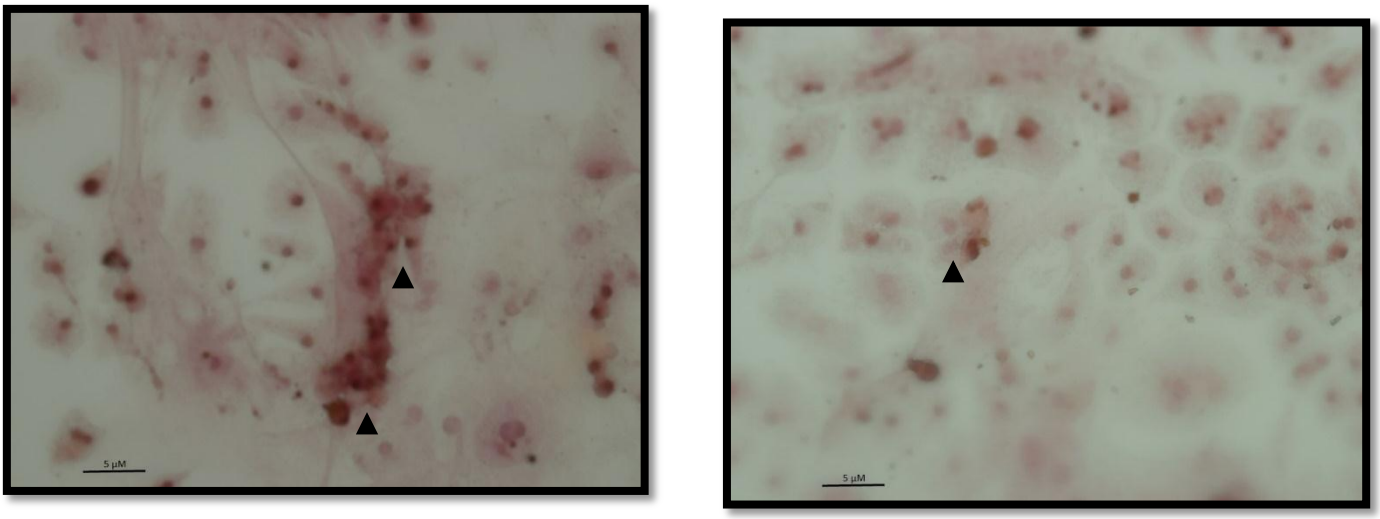
Legenda: Grupo Controle (A) e Grupo Obeso (B), Acúmulos lipídicos (cabeça de seta).

Figura 20 - Gráfico representativo da quantificação de acúmulos lipídicos



Legenda: Valores apresentados como média ± DPM *P<0,05.

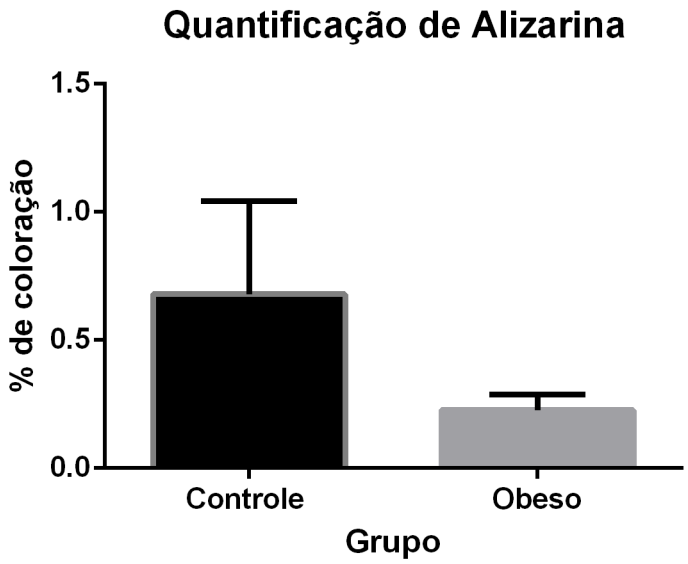
Figura 21 - Fotomicrografias representativas da diferenciação osteogênica



B

Legenda: Grupo Controle (A) e Grupo Obeso (B), acúmulos de cálcio (cabeça de seta).

Figura 22 - Gráfico representativo da quantificação de acúmulos de cálcio



Legenda: Valores apresentados como média ± DPM.

DISCUSSÃO

O ganho de massa superior do grupo obeso desde os 40 dias de vida e 30% maior na massa final em relação ao grupo controle demonstra que o modelo experimental de obesidade utilizado foi capaz de provocar alterações metabólicas que perduraram até a fase adulta. O modelo experimental de obesidade utilizado é baseado na hiperlactação através redução da ninhada após 3 dias do nascimento. Este modelo provoca uma mudança nas concentrações dos nutrientes do leite materno além de um consumo maior de leite pela prole. O modelo de hiperlactação é considerado de fácil obtenção e de baixo custo. (Plagemann, A.; 1992; Martins, A. R.; 2008; Cunha, A. R.; 2009).

Já é sabido que mudanças metabólicas ocorridas durante a infância permanecem durante a vida adulta mesmo sem a manutenção da alta massa corroborando ao observado nos animais do modelo experimental utilizado, onde as alterações metabólicas ocorridas no período de lactação permaneceram até a fase adulta mesmo com a ingestão de dieta padrão. O trabalho de Skinner em 2010, mostrou que a obesidade durante a infância aumenta os riscos de doenças cardiovasculares na vida adulta e que crianças de apenas 3 anos obesas já possuem marcadores inflamatórios elevados.

Juntamente com o ganho de massa, os dados de peso das gorduras viscerais (epididimal e retroperitoneal) confirmam o desenvolvimento da obesidade. Sabe-se que a obesidade visceral desempenha um papel importante para o desenvolvimento da diabetes através da mobilização de ácidos graxos livres e certas citocinas inflamatórias que promovem a resistência à insulina (Day, C.; 2013). Além disso, o tecido adiposo branco, que constitui a gordura visceral secreta uma cascata de citocinas pró-inflamatórias que produzem efeitos parácrinos e sistêmicos (Iezzi, M. L.; 2017). Os resultados sem diferença significativa do comprimento naso-anal dos animais comprovam que o aumento do peso corporal e adiposidade não são relacionados ao aumento do tamanho dos animais.

O aumento da glicemia e a diferença no teste de tolerância à glicose são mais indícios do desenvolvimento da obesidade nesses animais. Juntamente com os dados da insulina mostram que esses animais estão desenvolvendo Diabetes Mellitus tipo 2, sendo esta provocada por todas as alterações metabólicas que a

obesidade promove. A resistência à insulina provoca comprometimento da função endócrina do tecido perivascular, um desequilíbrio na secreção de moléculas vasodilatadoras e vasoconstritoras além de aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, levando a um aumento da morbidade e mortalidade (Mamdouh, M.; 2017).

A presença de microesteatose no fígado, aumento da reserva de gordura dos adipócitos e hipertrofia das ilhotas pancreáticas, indicam que os danos da obesidade são sistêmicos, podendo evoluir para a síndrome metabólica. A resistência à insulina e o remodelamento disfuncional do tecido adiposo contribuem para o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos, levando à esteatose hepática que pode evoluir para formas mais inflamatórias como a fibrose hepática onde há a perda da função do órgão (Alba, L. M.; 2003; Cuthbertson, D. J.; 2017).

Os resultados morfológicos do tecido adiposo visceral demonstram que são formados por tecido adiposo branco, caracterizado por seus adipócitos uniloculares. Além disso os animais do grupo obeso apresentaram aumento dos depósitos de gordura nos adipócitos (hipertrofia), demonstrando maior adiposidade nesses animais. Sabe-se que o tecido adiposo não é apenas um tecido de armazenamento é também o maior órgão endócrino do corpo. Este secreta diversos hormônios, lipídios, citocinas e outros fatores com efeitos locais e sistêmicos. As adipocinas que são as citocinas secretadas pelo tecido adiposo branco contribuem extensivamente para o tecido fisiologicamente e durante um processo patogênico. A obesidade e a resistência à insulina estão associadas à hipoadiponectina, que pode contribuir para a disfunção cardiometabólica associada à obesidade. A inflamação de baixa intensidade observada na obesidade está ligada diretamente à desestruturação do tecido adiposo. A resposta inflamatória desencadeada pela obesidade envolve o recrutamento de leucócitos para os tecidos inflamados e aumento sistêmico de citocinas inflamatórias, prejudicando a capacidade metabólica do tecido adiposo, levando à progressão da obesidade (Lumeng, C. N.; 2011; Sulston, R. J.; 2016; Bujisic, B.; 2017; Cuthbertson, D. J.; 2017).

A massa de células beta é capaz de se modificar em resposta a uma demanda maior de insulina durante a obesidade. Os animais do grupo obeso apresentaram hipertrofia das ilhotas pancreáticas onde se localizam as células beta. Esse resultado juntamente com os de glicemia e insulinemia indicam que esses

animais estão em um processo de estabelecimento da Diabetes Mellitus tipo 2 (Mamdouh, M.; 2017).

A medula óssea é a responsável pela hematopoiese, processo onde são formadas as células sanguíneas. Duas populações compõem a medula óssea células relacionadas diretamente à hematopoiese e células que participam indiretamente da hematopoiese. As células que participam indiretamente da hematopoiese são chamadas de fração estromal composta por células reticulares estromais semelhantes a fibroblastos, células endoteliais, células perivasculares, adipócitos, osteoblastos, nervos simpáticos e células de Schwann não mielinizadoras e células-tronco mesenquimais (Calvi, L. M.; 2015).

A presença de adipócitos na medula óssea demonstra a presença e a importância do Tecido Adiposo de Medula Óssea (TAMO). Esse tecido anteriormente era relacionado à adiposidade do indivíduo, porém Sulston em 2016, comprovou que esse tecido adiposo presente na medula óssea não estava relacionado com a massa corporal do indivíduo e além disso mostrou que TAMO exerce efeitos sistêmicos através da produção de leptina e de adiponectina. Apesar de TAMO não estar relacionado ao aumento da massa corporal do indivíduo, ele aumenta durante os processos de osteoporose, anorexia nervosa e Diabetes Mellitus Tipo I (Rendina-Ruede, E.; 2017).

O aumento do número de Células-Tronco Mesenquimais (CTM) observadas nos resultados de citometria das células da medula óssea dos animais do grupo obeso se dá pelo comprometimento dessas células com a diferenciação adipogênica e osteogênica na medula óssea. Esse evento leva ao aumento do PPARγ que afeta o saldo das CTMs. Um trabalho recente evidenciou que a sinalização da leptina e de seu receptor regula a diferenciação de células na medula óssea, em resposta à obesidade e que a exclusão do receptor de leptina aumenta a tolerância à glicose (Luo, Y.; 2015; Yue, R.; 2016). Nosso grupo já demonstrou que apesar do aumento das células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais na fração de células da medula óssea, no grupo obeso há o aumento da apoptose dessas células. Este fato pode ser explicado pelo comprometimento da função mitocondrial e pelo mecanismo de compensação de células existente na medula óssea (de Oliveira, G.; 2014).

Sabe-se que a presença de hiperglicemia reduz significativamente a concentração de células-tronco na medula óssea e diminui os progenitores endoteliais. Além disso, trabalhos mostraram que uma dieta rica em gordura é capaz

de alterar a hematopoiese, aumentando o número de CTMs comprometidas com a diferenciação adipogênica e osteogênica, prejudicando a osteoblastogênese e reduzindo o número de CTHs (Luo, Y.; 2015; Fadini, G. P.; 2016).

A marcação mais evidente e comprovada pela quantificação de TNF-α no grupo obeso mais uma vez reforça o estado inflamatório sistêmico provocado pela obesidade. O TNF- α é uma molécula pró-inflamatória que durante o desenvolvimento da obesidade é produzida pelo tecido adiposo. Este fato se dá pela necrose dos adipócitos causada pela hipóxia do órgão e recrutamento de macrófagos com perfil inflamatório que secretam essas moléculas inflamatórias. Adipocinas relacionadas à inflamação como: Fator Inibidor de Macrófagos (MIF), Metaloproteinases de Matriz (MMP2 e MMP9), IL-6, VEGF e leptina que são regulados positivamente pela hipóxia. Além disso, hormônios e ácidos graxos são liberados sistemicamente (Sun, K.; 2011; Bujisic, B.; 2017; Yezzi, M. L.; 2017).

As Células-Tronco Mesenquimais são as células mais utilizadas para transplantes em seres humanos devido a sua facilidade de isolamento e expansão. As CTMs possuem grande importância para a terapia celular através do seu potencial de regeneração tecidual, e principalmente pela sua ação trófica. Além disso, as CTMs possuem as vantagens de não possuírem questões éticas, são consideradas hipoimunogênicas e podem ser isoladas de diversos tecidos como: tecido adiposo, medula óssea, sangue do cordão umbilical, polpa dental, entre outros (Dang, L. T.; 2017; Rohban, R.; 2017).

As características fundamentais para que as células-tronco serem identificadas são a capacidade de auto-renovação e diferenciação em pelo menos um tipo celular. Diversas características são levadas em consideração para a identificação das CTMs incluindo: a expressão de um perfil de marcadores positivos para CD29, CD51, CD73, CD90 e CD105, e negativos para CD31, CD45 e c-KIT. Além disto quando cultivadas, possuem formato fusiforme, aderência a superfícies poliméricas e diferenciação nas linhagens adipogênica, controgênica e osteogênica. Nossos resultados de citometria com a marcação de moléculas de superfície (CD105 e c-KIT) mostram que apesar da cultura não ter sido purificada totalmente, há um enriquecimento do pool de células aderidas em relação à quantidade encontrada na medula óssea. Ademais, os resultados das diferenciações adipogênica e osteogênica, a aderência ao plástico e o formato fusiforme são indícios da presença de CTMs na cultura (Rohban, R.; 2017; Kusuma, G. D.; 2017).

A presença de menores acúmulos de matriz de cálcio na diferenciação osteogênica e maior presença de células com acúmulo de lipídios no grupo obeso pode ser explicada pelo ambiente desestruturado da medula óssea diante da obesidade. O estudo de Yue em 2016 observou que após a administração de uma dieta High Fat houve aumento da adipogênese e diminuição da osteogênese em ratos através da ação da leptina e de seu receptor na medula óssea, explicando assim nossos resultados encontrados.

O estabelecimento da obesidade nos animais estudados foi capaz de prejudicar a proliferação e viabilidade das células da medula óssea aderentes ao plástico. O trabalho recente de (Dang, L. T.; 2017) mostrou que em um ambiente diabético ou hiperglicêmico há a redução do potencial proliferativo das CTMs, aumento da senescência e apoptose dessas células, corroborando aos nossos resultados encontrados. Um trabalho do nosso grupo mostrou que há maior apoptose e comprometimento da função mitocondrial nas células da medula óssea de animais obesos (de oliveira, G.; 2014).

A hiperglicemia que é uma das enfermidades consequentes da obesidade é capaz de modificar a diferenciação, diminui a capacidade angiogênica, diminui a expressão de marcadores de superfície além de também ser capaz de reduzir a migração das células. Em nossos resultados observamos que o grupo obeso não foi capaz de preencher a fissura mesmo após 24 horas, sendo que o grupo controle conseguiu preencher em 18 horas. Portanto, a obesidade mesmo que indiretamente foi capaz de modificar a migração das células, prejudicando sua mobilidade que é importante durante o processo de terapia celular (Dang, L. T.; 2017).

Sendo assim, a obesidade induzida por hiperlactação através da redução de ninhada é capaz de prejudicar características importantes para o sucesso de um transplante. Com isso, pacientes com obesidade podem não ter o mesmo resultado encontrado em pacientes sadios. Este fato pode ser explicado pelo desbalanço no nicho da medula óssea onde as CTM habitam através de um estado inflamatório crônico.

CONCLUSÃO

Portanto, podemos concluir que o modelo experimental de obesidade induzida por hiperlactação foi capaz de induzir a obesidade nos camundongos Swiss machos estudados mesmo com a ingestão de dieta padrão após o desmame. Além disto podemos afirmar que a obesidade provocou efeitos sistêmicos que foram observados no fígado, pâncreas, gordura epididimal e retroperitoneal e na medula óssea.

O estado inflamatório característico da obesidade foi capaz de afetar a medula óssea modificando a taxa de células-tronco presentes. Além de prejudicar a mobilidade, proliferação e diferenciação das células provenientes dos animais obesos. Em vista disto, sugere-se que o transplante de células-tronco provenientes de obesos não possuem eficácia semelhante às sadias.

REFERÊNCIAS

AABB, 2017. http://www.aabb.org/aabbcct/therapyfacts/Pages/default.aspx. Acesso em 10.10.2017 às 10:30

ALBA, L. M.; LINDOR, K. Non-alcoholic fatty liver disease. Alimentary pharmacology & therapeutics, v. 17, n. 8, p. 977-986, 2003.

BARA, Jennifer J. et al. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. Stem cells, v. 32, n. 7, p. 1713-1723, 2014.

BIDDLE, Stuart JH et al. Screen Time, Other Sedentary Behaviours, and Obesity Risk in Adults: A Review of Reviews. Current Obesity Reports, v. 6, n. 2, p. 134-147, 2017.

BRINDLEY, David A. et al. The impact of market volatility on the cell therapy industry. Cell Stem Cell, v. 9, n. 5, p. 397-401, 2011.

BLOCH, K. V. et al. ERICA: prevalências de hipertensão arterial e obesidade em adolescentes brasileiros. Rev Saúde Pública, v. 50, n. 1, p. 9s, 2016.

BONIN, Malte; BORNHÄUSER, Martin. Concise review: the bone marrow niche as a target of graft versus host disease. Stem Cells, v. 32, n. 6, p. 1420-1428, 2014.

BUJISIC, Bojan; MARTINON, Fabio. IRE1 gives weight to obesity-associated inflammation. Nature Immunology, v. 18, n. 5, p. 479-480, 2017.

CALVI, Laura M.; LINK, Daniel C. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. Blood, v. 126, n. 22, p. 2443-2451, 2015.

CORDEIRO-SPINETTI, Eric; TAICHMAN, Russell S.; BALDUINO, Alex. The bone marrow endosteal niche: how far from the surface?. Journal of cellular biochemistry, v. 116, n. 1, p. 6-11, 2015.

CUNHA, Alessandra Cordeiro de Souza Rodrigues et al. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion—the role of GLUT-2. The Journal of nutritional biochemistry, v. 20, n. 6, p. 435-442, 2009.

CUTHBERTSON, Daniel J. et al. What have human experimental overfeeding studies taught us about adipose tissue expansion and susceptibility to obesity and metabolic complications?. International Journal of Obesity, 2017.

DAY, Caroline; BAILEY, Clifford J. Obesity in the pathogenesis of type 2 diabetes. The British Journal of Diabetes & Vascular Disease, v. 11, n. 2, p. 55-61, 2011.

DANG, Loan Thi-Tung; PHAN, Ngoc Kim; TRUONG, Kiet Dinh. Mesenchymal stem cells for diabetes mellitus treatment: new advances. Biomedical Research and Therapy, v. 4, n. 1, p. 1062-1081, 2017.

DE OLIVEIRA, Genilza Pereira et al. Impaired mitochondrial function and reduced viability in bone marrow cells of obese mice. Cell and tissue research, v. 357, n. 1, p. 185-194, 2014.

FADINI, Gian Paolo et al. Concise review: diabetes, the bone marrow niche, and impaired vascular regeneration. Stem cells translational medicine, v. 3, n. 8, p. 949-957, 2014.

FERNANDEZ-MENDOZA, Julio et al. Impact of the Metabolic Syndrome on Mortality is Modified by Objective Short Sleep Duration. Journal of the American Heart Association, v. 6, n. 5, p. e005479, 2017.

GILBER, S. F. Developmental Biology, 6th edition. Swarthmore College Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. ISBN-10: 0-87893-243-7.

GUO, Weimin et al. Impact of Maternal Obesity and High Fat Diet during Pregnancy and Lactation on Offspring Body Weight, Immune Function, and Resistance to Influenza Infection. The FASEB Journal, v. 31, n. 1 Supplement, p. 434.4-434.4, 2017.

HOCH, Allison I.; LEACH, J. Kent. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. Stem cells translational medicine, v. 4, n. 4, p. 412-412, 2015.

HOFFMANN, Jenny. Bone Morphogenetic Protein 4 regulates white, beige and brown adipose tissue. 2017.

IEZZI, M. L. et al. Effect of Weight Loss on Markers of Inflammation and Endothelial Function in Childhood Obesity. J Obes Weight Loss Ther, v. 7, n. 333, p. 2, 2017.
IPCT; 2013. http://celulastroncors.org.br/celulas-tronco-2/. Acesso em: 10.10.2017 às 10:40.

KLINGENSPOR, Martin et al. Brown adipose tissue. In: Adipose Tissue Biology. Springer International Publishing, 2017. p. 91-147.

KUSUMA, Gina D. et al. Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: opportunities to engineer the therapeutic effect. Stem cells and development, v. 26, n. 9, p. 617-631, 2017.

LARIJANI, Bagher et al. Stem cell therapy in treatment of different diseases. Acta Medica Iranica, v. 50, n. 2, p. 79, 2012.

LEE, Jae W. et al. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 38, p. 16357-16362, 2009.

LEFRÈRE, J.-J.; BERCHE, P. La thérapeutique du docteur Brown-Séquard. In: Annales d'endocrinologie. Elsevier Masson, 2010. p. 69-75.

LUMENG, Carey N.; SALTIEL, Alan R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. The Journal of clinical investigation, v. 121, n. 6, p. 2111, 2011.

LUO, Yubin et al. Microbiota from obese mice regulate hematopoietic stem cell differentiation by altering the bone niche. Cell metabolism, v. 22, n. 5, p. 886-894, 2015.

LUTZ, Thomas A.; WOODS, Stephen C. Overview of animal models of obesity. Current protocols in pharmacology, p. 5.61. 1-5.61. 18, 2012.

MAMDOUH, Mediana et al. Adipokines: potential therapeutic targets for vascular dysfunction in type II diabetes mellitus and obesity. Journal of diabetes research, v. 2017, 2017.

MARQUES, Emiliana B. et al. Spontaneous and Isoprenaline-evoked response of isolated heart preparations from rats submitted to leptin treatment during lactation. International journal of cardiology, v. 195, p. 48-50, 2015.

MARTINS, Mariana Renovato et al. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. Journal of Endocrinology, v. 198, n. 3, p. 591-598, 2008.
MASON, Chris et al. Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential. Regenerative medicine, v. 6, n. 3, p. 265-272, 2011.

PATEL, Mulchand S.; SRINIVASAN, Malathi. Metabolic programming in the immediate postnatal life. Annals of Nutrition and Metabolism, v. 58, n. Suppl. 2, p. 18-28, 2011.

PLAGEMANN, A. et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, v. 99, n. 03, p. 154-158, 1992.

PLAGEMANN, Andreas et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. Brain research, v. 836, n. 1, p. 146-155, 1999.

PLAGEMANN, Andreas et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. Journal of perinatal medicine, v. 38, n. 4, p. 393-400, 2010.

POPKIN, Barry M. Contemporary nutritional transition: determinants of diet and its impact on body composition. Proceedings of the Nutrition Society, v. 70, n. 1, p. 82-91, 2011.

RANASINGHE, P. et al. Prevalence and trends of metabolic syndrome among adults in the asia-pacific region: a systematic review. BMC public health, v. 17, n. 1, p. 101, 2017.

RENDINA-RUEDY, Elizabeth; ROSEN, Clifford J. Bone–Fat Interaction. Endocrinology and Metabolism Clinics, v. 46, n. 1, p. 41-50, 2017.

ROHBAN, Rokhsareh; PIEBER, Thomas Rudolf. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: tissue specificity and regenerative potential. Stem cells international, v. 2017, 2017.

SKINNER, Asheley Cockrell et al. Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood. Pediatrics, v. 125, n. 4, p. e801-e809, 2010.

SULSTON, Richard J.; CAWTHORN, William P. Bone marrow adipose tissue as an endocrine organ: close to the bone?. Hormone molecular biology and clinical investigation, v. 28, n. 1, p. 21-38, 2016.

SUN, Kai; KUSMINSKI, Christine M.; SCHERER, Philipp E. Adipose tissue remodeling and obesity. The Journal of clinical investigation, v. 121, n. 6, p. 2094, 2011.

TAKAHASHI, Kazutoshi; YAMANAKA, Shinya. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. cell, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

TEIXEIRA, Fábio G. et al. Impact of the Secretome of Human Mesenchymal Stem Cells on Brain Structure and Animal Behavior in a Rat Model of Parkinson's Disease. Stem cells translational medicine, v. 6, n. 2, p. 634-646, 2017.

VAN GREEVENBROEK, M. M. et al. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. Neth J Med, v. 71, n. 4, p. 174-87, 2013.

WATT, Fiona M.; DRISKELL, Ryan R. The therapeutic potential of stem cells. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, v. 365, n. 1537, p. 155-163, 2010.

WEISBERG, Stuart P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. Journal of clinical investigation, v. 112, n. 12, p. 1796, 2003.

WELLEN, Kathryn E.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. Journal of Clinical Investigation, v. 112, n. 12, p. 1785, 2003.

YUE, Rui et al. Leptin receptor promotes adipogenesis and reduces osteogenesis by regulating mesenchymal stromal cells in adult bone marrow. Cell Stem Cell, v. 18, n. 6, p. 782-796, 2016.

ZHU, Yeyi et al. Are You What Your Mother Ate: Maternal Artificially-Sweetened Beverages Intake During Pregnancy and Offspring Growth and Obesity Through Age 7 Years?. The FASEB Journal, v. 31, n. 1 Supplement, p. 457.1-457.1, 2017.