

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCAR-UNESP**

PATRICIA DE GODOY BUENO

**EFEITOS DA INFUSÃO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM MODELO ANIMAL DE RESISTÊNCIA
INSULÍNICA E DIABETES TIPO 2**

**SÃO CARLOS - SP
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCAR-UNESP**

PATRICIA DE GODOY BUENO

**EFEITOS DA INFUSÃO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM MODELO ANIMAL DE RESISTÊNCIA
INSULÍNICA E DIABETES TIPO 2**

**Tese de Doutorado apresentada
ao Programa Interinstitucional
de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas associação ampla
UFSCar-UNESP como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de Doutora em Ciências
Fisiológicas.**

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ÂNGELA MERICE DE OLIVEIRA LEAL

**SÃO CARLOS - SP
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B928ei

Bueno, Patricia de Godoy.

Efeitos da infusão das células-tronco mesenquimais em modelo animal de resistência insulínica e diabetes tipo 2 / Patricia de Godoy Bueno. -- São Carlos : UFSCar, 2014. 84 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Diabetes *mellitus*. 2. Resistência à insulina. 3. Células-tronco mesenquimais. I. Título.

CDD: 616.462 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado de Patricia de Godoy Bueno

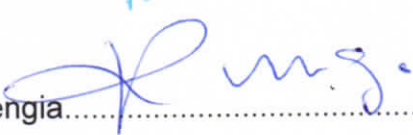
Dia 11/02/2014

Prof.^a Dr.^a Ângela Merice de Oliveira Leal.....

Prof.^a Dr.^a Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo.....

Prof.^a Dr.^a Patricia de Oliveira Prada.....

Prof.^a Dr.^a Keico Okino Nonaka.....

Prof.^a Dr.^a Rozângela Verlengia.....

*Aos meus pais....
Maria Jose Donizetti de Godoy Bueno e
Aparecido Clementino de Godoy Bueno*

*E em memória ao grande pioneiro em
transplante de células-tronco e diabetes
Júlio Cesar Voltarelli*



AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre esteve e estará ao meu lado, me protegendo e amando.

À minha família, principalmente meus pais, meu irmão Auberty, minha cunhada Aline, meu sobrinho e afilhado Miguel, minha madrinha Izabel, meus queridos primos, que sempre me deram o suporte emocional para seguir em frente e lutar pelos meus sonhos.

À minha orientadora Ângela, por me proporcionar todo meu conhecimento.

À Heloísa Araujo que sempre esteve de portas abertas, para me acolher em seu laboratório, e proporcionar o desenvolvimento do meu trabalho, além da grande amizade, respeito e admiração que existe entre nós.

À Keico pelo uso do laboratório e amizade que conquistamos.

À Juliana Ueda, que diretamente ajudou muito na realização desse trabalho, além da amizade e companheirismo em Ribeirão.

À Kelen pelo uso do Hemocentro e ajuda nos experimentos.

Ao grupo de pós-graduandas orientadas pela Ângela: Grá, Rafa, Clara e a técnica Natália.

A Profa. Azair por ceder o biotério para realização dos experimentos com os animais.

A todo grupo de pesquisadores do LBBM: Kelli, Lívia, Carol, Fernanda Duarte,

Aos apoios técnicos que trabalharam muito para a realização desse trabalho: Carol, Lorena e Ana Júlia.

RESUMO

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) está associado à resistência insulínica e à disfunção das células β pancreáticas. A terapia regenerativa celular, em especial, a utilização de células multi/pluripotentes, tem sido investigada como potencial estratégia terapêutica para o DM2. Dentre elas, as células-tronco mesenquimais (MSCs), por seu papel imuno-regulador são importantes candidatos terapêuticos. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de múltiplas infusões de MSCs na regulação da glicemia, resistência à insulina e morfometria das ilhotas pancreáticas de camundongos diabéticos induzidos por dieta hiperlipídica. Foram utilizados camundongos *Swiss* alimentados com dieta padrão (grupo controle) ou dieta hiperlipídica durante 8 semanas. Logo após, os animais diabéticos foram subdivididos em grupo diabético e grupo transplantado com MSCs, e receberam 4 infusões intraperitoniais de $5 - 8 \times 10^6$ MSCs ressuspendidas em solução tampão. A glicemia de jejum (GJ) foi determinada semanalmente e os testes de tolerância à glicose (TTG) e à insulina (TTI) foram realizados 1, 2, 3, e 4 meses após as infusões de MSCs. Quatro meses após as infusões de MSCs, os animais foram decapitados e o soro e o pâncreas foram coletados para análises. Os animais que receberam as MSCs foram classificados em respondedores (GJ < 180mg/dL) ou não respondedores (GJ > 180mg/dL). Segundo este critério, 72,2% e 27,8% dos animais transplantados foram classificados como respondedores e não respondedores, respectivamente. Os animais respondedores apresentaram diminuição significativa de GJ sete semanas após a infusão de MSCs, comparado com grupo diabético não tratado. Quatro meses após as MSCs, os animais respondedores apresentaram diminuição significativa da área sob a curva (AUC) do TTG e TTI, comparado com grupo diabético não tratado. A insulinemia foi significativamente maior nos animais diabéticos comparado com o grupo controle. Não houve diferença estatística na área total da ilhota e no volume de células β nos animais diabéticos, transplantados respondedores e não respondedores. O volume relativo das células α foi significativamente menor nos animais diabéticos e animais transplantados respondedores, comparado ao grupo controle e significativamente maior nos animais transplantados não respondedores comparado aos animais diabéticos. A apoptose das células da ilhota foi significativamente maior nos animais diabéticos e transplantados não respondedores, e significativamente menor nos animais transplantados respondedores, comparado com os grupos controle e diabético, respectivamente. A proliferação das células da ilhota foi significativamente menor nos animais diabéticos, em comparação ao grupo controle. Entretanto, a proliferação das células da ilhota não foi estatisticamente diferente nos animais transplantados comparados aos animais controles e diabéticos. Houve correlação positiva da apoptose das células da ilhota e glicemia de jejum e AUC do TTG e TTI, e correlação negativa da proliferação das células da ilhota e glicemia de jejum. Os resultados demonstram que múltiplas infusões de MSCs podem diminuir a glicemia de jejum e a apoptose nas ilhotas pancreáticas e aumentar a sensibilidade à insulina de animais diabéticos induzidos por dieta hiperlipídica.

Palavras-chave: diabetes mellitus tipo 2, resistência insulínica, células-tronco mesenquimais.

ABSTRACT

Type 2 Diabetes Mellitus (DM2) is associated with insulin resistance and dysfunction of pancreatic β cells. The regenerative cellular therapy, in particular with multi/pluripotent cells has been investigated as a potential therapeutic strategy for T2DM. Among them, mesenchymal stem cells (MSCs) due to their immunoregulatory role are important therapeutic candidates. The purpose of this study was to investigate the effect of multiple infusions of MSCs on blood glucose, insulin resistance and morphometry of the pancreatic islets of diabetic mice induced by high fat diet. Swiss mice were fed a standard diet or a high fat diet for eight weeks. Soon after, the diabetic animals were divided into diabetic group and transplanted MSCs group. The transplanted mice received 4 intraperitoneal infusions of cells ($5-8 \times 10^6$ MSCs resuspended in buffer). Fasting plasma glucose (FPG) was determined weekly and glucose tolerance tests (GTT) and insulin (ITT) were performed at 1, 2, 3, and 4 months after the infusions of MSCs. Four months after infusion of the MSCs, the animals were decapitated and the pancreas and the serum were collected for analysis. The animals that received MSCs were classified as responders (FPG < 180mg/dL) or non-responders (FPG > 180mg/dL). According to this criterion, 72.2 % and 27.8 % of transplanted animals were classified as responders and non-responders, respectively. Responders showed a significant decrease in GJ seven weeks after the infusion of MSCs compared with untreated diabetic group. Four months after MSCs, responders showed a significant decrease of GTT and ITT areas under the curve (AUC), compared with untreated diabetic group. Serum insulin concentration was significantly higher in diabetic animals compared with the control group. There was no statistical difference in the total area and volume of islet β cells in diabetic animals and responders and non-responders. The relative volume of α cells was significantly lower in diabetic animals and responders, compared to the control group and significantly higher in non-responders transplanted animals compared to diabetic animals. Apoptosis of islet cells was significantly greater in diabetic animals and non-responders, and significantly lower in responders, compared with the control and diabetic groups, respectively. Islet cell proliferation was significantly lower in diabetic animals compared to the control group. However, islet cell proliferation was not statistically different in transplanted animals compared to controls and diabetic animals. There was a positive correlation between apoptosis of the islet cells and fasting glucose and AUC of GTT and ITT, and a negative correlation of the proliferation of the islet cells and fasting glucose. The results demonstrate that multiple infusions of MSCs can decrease fasting glucose and apoptosis in pancreatic islets and increase insulin sensitivity in diabetic rats induced by high fat diet.

Key-words: type 2 diabetes, insulin resistance, mesenchymal stem cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Obesidade e fisiopatologia do diabetes tipo 2.....	20
Figura 2. Características histológicas das ilhotas pancreáticas de camundongo e humano.....	21
Figura 3. Proliferação e apoptose nas células β pancreáticas na fisiopatologia do diabetes tipo 2.....	22
Figura 4. Mediadores inflamatórios no Diabetes Mellitus tipo 2.....	25
Figura 5. Características biológicas e aplicações clínicas das MSCs.....	31
Figura 6. Desenho experimental. Os camundongos iniciaram o experimento com 4 semanas de idade e receberam dieta padrão durante 1 semana de aclimação. Após esse período, foram divididos em grupo controle, que permaneceram com a dieta padrão, e grupo dieta hiperlipídica, que receberam dieta hiperlipídica. Após 8 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, os animais diabéticos foram subdivididos em grupo diabético e grupo diabético transplantados com MSC (DMSC). Os animais do DMSC receberam 4 infusões de $5 - 8 \times 10^6$ células intraperitoneal, com 1 semana de intervalo entre as infusões. Glicemia de jejum foi realizada semanalmente e os TTG e TTI foram realizados mensalmente, após a última infusão de MSCs. No final de período experimental, ou seja, quatro meses após a última infusão de MSC, foram realizados também a dosagem de insulina no soro (ELISA) e imunohistoquímica do pâncreas.....	36
Figura 7. Caracterização imunofenotípica das MSC isoladas de medula óssea de rato <i>Wistar</i>. Histograma representativo das MSC na quinta passagem, obtido por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem de células positivas para o antígeno de superfície.....	40
Figura 8. Caracterização da multipotencialidade das MSC. (A) Células-tronco mesenquimais (MSC) na quinta passagem foram definidas com aparência de fibroblasto; (B) diferenciação adipogênica: depósitos de lipídeos corados com Sudan II; (C) diferenciação osteogênica: depósitos de cálcio corados com von Kossa (Aumento de 200x).....	40
Figura 9. (A) Teste de tolerância à glicose (TTG), (B) área sob a curva do TTG, (C) teste de tolerância à insulina (TTI), e (D) área sob a curva do TTI depois de oito semanas de	

tratamento com dieta hiperlipídica. Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D). * p< 0,05, (C) vs. (D).....41

Figura 10. Glicemia de jejum (mg/dL) após 4 infusões de MSC. Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * p< 0,05, (C) vs. (D); # p<0,05, (R) vs. (D); & p<0,05, (NR) vs. (C); + p<0,05, (NR) vs. (R).....43

Figura 11. Insulina em jejum (ng/dL) soro. Valores estão representados como média \pm EPM, n= 2-10 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * p< 0,05, (C) vs. (D).....43

Figura 12. Massa Corporal (g). Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * p< 0,05, (C) vs. (D).....44

Figura 13. Ingestão alimentar (Kcal). Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor. * p< 0,05, (C) vs. (D).....44

Figura 14. Teste de tolerância a glicose (TTG) e área sob a curva (AUC) do TTG 1, 2, 3 e 4 meses após 4 infusões de MSC. Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * p< 0,05, (C) vs. (D); # p<0,05, (R) vs. (D).....46

Figura 15. Teste de tolerância a insulina (TTI) e área sob a curva (AUC) do TTI 1, 2, 3 e 4 meses após 4 infusões de MSC. Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * p< 0,05, (C) vs. (D); # p<0,05, (R) vs. (D); & p<0,05, (D) vs. (NR).....47

Figura 16. Área total da ilhota (um²) pancreática. Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR).....48

Figura 17. Análise morfométrica do pâncreas por imunohistoquímica com marcação para insulina. Imagem representativa das ilhotas pancreáticas dos grupos controle, diabético, respondedor e não respondedor (aumento 200x) (A). Volume relativo de célula β (%) nas ilhotas pancreáticas (B). Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR).....49

Figura 18. Análise morfométrica do pâncreas por imunohistoquímica com marcação para glucagon. Imagem representativa das ilhotas pancreáticas dos grupos controle, diabético, respondedor e não respondedor (aumento 200x) (A). Volume relativo de célula alfa (%) na ilhota pancreática (B). Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * p< 0,05, (C) vs. (D); + p<0,05, (R) vs. (C); & p<0,05, (NR) vs. (D), # p< 0,05 (NR) vs. (R).....50

Figura 19. Análise morfométrica do pâncreas por imunohistoquímica com marcação para caspase-3. Imagem representativa das ilhotas pancreáticas dos grupos controle, diabético, respondedor e não respondedor (aumento 200x) (A). Apoptose celular na ilhota pancreática (células positiva para caspase-3/ um^2 da ilhota) (B). Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * p< 0,05, (C) vs. (D); # p<0,05, (R) vs. (D); + p<0,05, (NR) vs. (C); & p<0,05, (NR) vs. (D); \$ p<0,05, (NR) vs. (R).....51

Figura 20. Análise morfométrica do pâncreas por imunohistoquímica com marcação para Ki-67. Imagem representativa das ilhotas pancreáticas dos grupos controle, diabético, respondedor e não respondedor (aumento 200x) (A). Proliferação celular na ilhota pancreática (células positiva para Ki-67/ um^2 da ilhota) (B). Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * p< 0,05, (C) vs. (D).....50

Figura 21. Correlação de glicemia de jejum com células positivas para caspase (A) e Ki67 (B) na ilhota pancreática; correlação da AUC (área sob à curva) do TTG (teste de

tolerância à glicose) (C) e TTI (teste de tolerância à insulina) (D) 4 meses após a última infusão de MSCs e células positivas para caspase na ilhota pancreática.....	53
Figura 22. Valores das concentrações de citocinas no homogeneizado do pâncreas (pg/g de tecido).....	67
Figura 23. Concentração de citocinas (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e IL-6) no homogeneizado do pâncreas.....	68
Figura 24. Valores das concentrações de citocinas no soro (pg/mL).....	69
Figura 25. Concentração de citocinas no soro (IL-2, IL-6, INF- γ , TNF- α , IL-17A) (pg/mL).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Glicemia de jejum (mg/dL) pré e após tratamento com 4 infusões de MSC.....42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL - ácidos graxos livres

Akt - proteína kinase B

AUC - área sob a curva

bFGF - basic fibroblast growth factor

C - grupo controle

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CMN - células mononucleares

Con A - concavalina

CT - células-tronco

D - grupo diabético

DM1 - diabetes mellitus tipo 2

DM2 - diabetes mellitus tipo 2

DMSC - grupo diabético transplantado com células-tronco mesenquimais

EGF - epidermal growth factor

FFA - fatty free acids

g - gramas

G-CSF - granulocyte colony-stimulating factor

GJ - glicemia de jejum

GLP-1 - glucagon-like peptide-

GLUT 4 - glucose transporter type 4

HGF - hepatocyte growth factor

HGF - hepatic growth factor

i.p. - intraperitoneais

IFN- γ - interferon γ

IGF-1 - insulin-like growth factor-1

IGF-1 - insulin growth factor

IL-1 β - interleucina 1 β

IL-17A - interleucina 17A

IL-18 - interleucina 18

IL-2 - interleucina 2

IL-6 - interleukin 6

IL-8 - interleucina 8

IRS - substrato do receptor de insulina

IKK- β - quinase β de I κ B

JNK - quinase aminoterminal c-Jun (JNK)

MCP-1 - monocyte chemo-attractant protein-1

Kcal - quilocalorias

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MIP-1 α - macrophage inflammatory protein 1 α

MO - medula óssea

MSCs - Multipotent Mesenchymal Stromal Cells ou Mesenchymal Stem Cells

NF- κ B - fator nuclear κ B

NK - natural killer

NOS - sintase do óxido nítrico

NR - grupo não respondedor

PBS - sterile phosphate buffered saline

PDX-1 - Pancreatic duodenal homeobox-1

PHA - fitohemaglutinina

PPAR - peroxisome-proliferator activated receptor

R - grupo respondedor

SOCS - suppressor of cytokine signalling

STZ - estreptozotocina

TGF- β 1 - transforming growth factor β 1

TNF- α - tumor necrosis factor α

TTG - teste de tolerância à glicose

TTI - teste de tolerância à insulina

VCT - valor calórico total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Diabetes Mellitus.....	19
1.2 Diabetes Mellitus e terapia celular.....	26
1.3 Células-tronco mesenquimais.....	28
1.4 Células-tronco mesenquimais e Diabetes Mellitus.....	30
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Animais.....	34
3.2 Infusão das MSCs.....	34
3.3 Monitoramento da glicemia de jejum e testes de tolerância à glicose (TTG) e à insulina (TTI) antes e após infusões de MSC.....	35
3.4 Isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos <i>Wistar</i>	36
3.5 Imunofenotipagem de MSC.....	37
3.6 Diferenciação osteogênica e adipogênica das MSC.....	37
3.7 Obtenção de soro e tecidos dos animais.....	38
3.8 Análise sorológica.....	38
3.9 Reações de imunohistoquímica em tecido pancreático.....	38

3.10	Quantificação do tamanho da ilhota pancreática, volume relativo das células beta e alfa da ilhota e determinação das células positivas para caspase-3 e ki-67 na ilhota.....	39
3.11	Análise dos dados.....	39
4	RESULTADOS.....	40
4.1	Identificação imunofenotípica e potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de rato <i>Wistar</i>	40
4.2	Testes de tolerância à glicose (TTG) e insulina (TTI) após 8 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica.....	41
4.3	Glicemia de jejum e insulinemia.....	42
4.4	Massa corporal e Ingestão alimentar.....	44
4.5	Testes de tolerância à glicose (TTG) e insulina (TTI) um, dois, três e quatros meses após a última infusão de MSCs.....	45
4.6	Análise morfométrica do pâncreas.....	48
4.7	Quantificação de apoptose e proliferação celular na ilhota.....	50
4.8	Análises de correlação.....	53
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÃO.....	65
7	TENTATIVAS DE DOSAGEM DE CITOCINAS NO HOMOGENEIZADO DO PÂNCREAS E NO SORO.....	66
7.1	METODOLOGIA.....	66
7.1.1	Dosagem de citocinas no homogeneizado do pâncreas e no soro.....	66

7.2 RESULTADOS.....	67
7.2.1 Dosagem de citocinas no homogeneizado do pâncreas pelo método de ELISA.....	67
7.2.2 Dosagem de citocinas no homogeneizado do pâncreas e soro pelo método de CBA (<i>cytometric beads array</i>) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD).....	68
8 REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2), a forma mais prevalente de diabetes, presente em aproximadamente 90% dos casos da doença, está associada, basicamente, a dois mecanismos patogênicos, a resistência à ação da insulina e a disfunção secretória/diminuição de massa das células β pancreáticas (BUTLER et al., 2003a; DONATH et al., 2008; WEIR; BONNER-WEIR, 2004).

Geneticamente, o DM2 apresenta formas monogênicas e poligênicas. As primeiras são raras, sofrem mínimas influências ambientais e têm caracterizados os genes envolvidos com resistência insulínica ou deficiência de secreção insulínica. Entretanto, a forma mais frequente de DM2 é poligênica e, embora potenciais *loci* para a suscetibilidade ao DM2 tenham sido identificados em diferentes populações, inúmeras dificuldades metodológicas devem ser vencidas até que sua participação na gênese da doença seja conhecida (ALMIND; DORIA; KAHN, 2001; COX, 2001; KOTA et al., 2012).

Dentre os fatores ambientais determinantes do DM2, destaca-se a obesidade, particularmente, o acúmulo de gordura visceral, cujo comportamento metabólico difere da gordura subcutânea. O tecido adiposo modula o metabolismo pela liberação de ácidos graxos livres (AGL), glicerol, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e hormônios, incluindo a leptina e a adiponectina. O aumento da maioria desses fatores compromete a ação da insulina nos órgãos-alvo, atuando, principalmente, na sua cascata de sinalização e levando à resistência insulínica (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

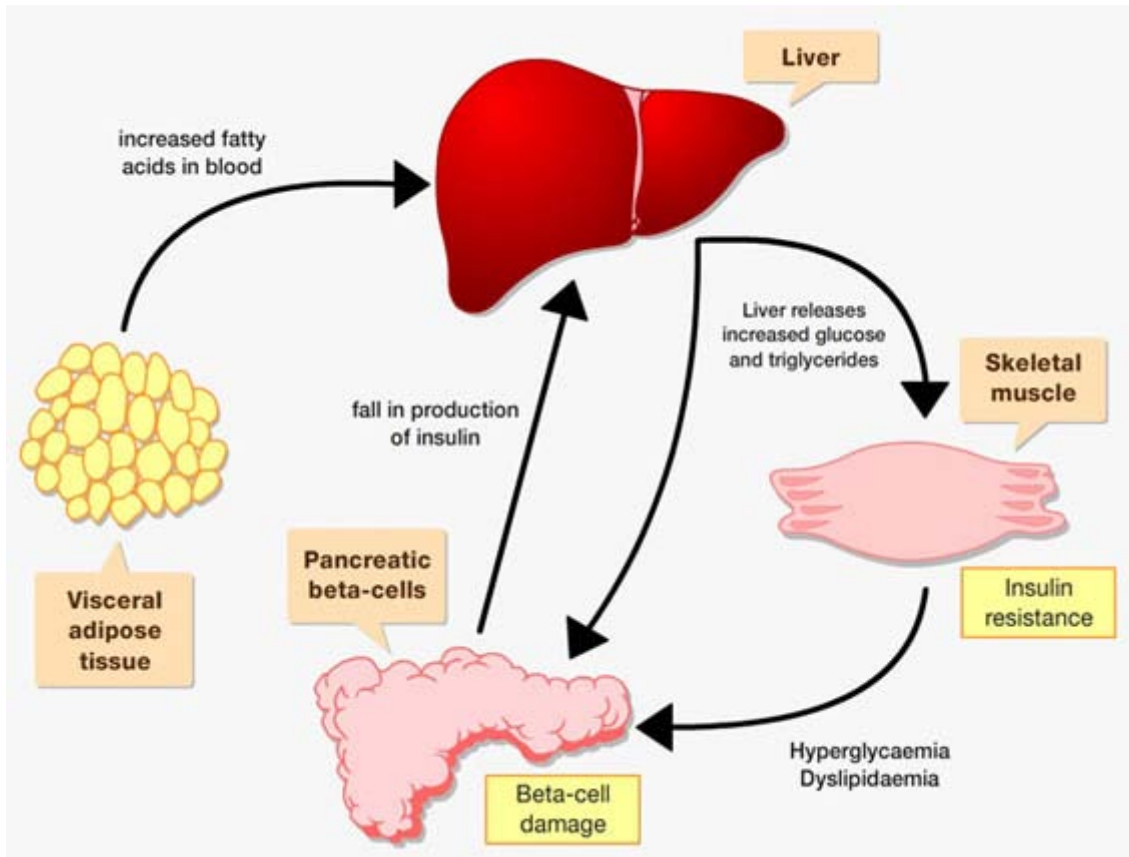


Figura 1. Obesidade e fisiopatologia do diabetes tipo 2 (ABPI).

Entretanto, a maioria dos obesos e resistentes à insulina não desenvolve hiperglicemia, pois, a célula β pancreática apresenta plasticidade e adapta-se à redução da sensibilidade à insulina, aumentando, tanto a secreção de insulina, como a massa de células β . Os mecanismos adaptativos das células β à resistência insulínica parecem envolver o aumento do metabolismo da glicose, a sinalização por ácidos graxos não esterificados, o aumento da sinalização pela insulina/IGF-1 (*insulin growth factor*) e a ação secretagoga e mitógena da incretina GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) (BERNAL-MIZRACHI et al., 2001; DRUCKER; NAUCK, 2006; FERREIRA MDEL; LOMBARDO; CHICCO, 2010; MATVEYENKO et al., 2009).

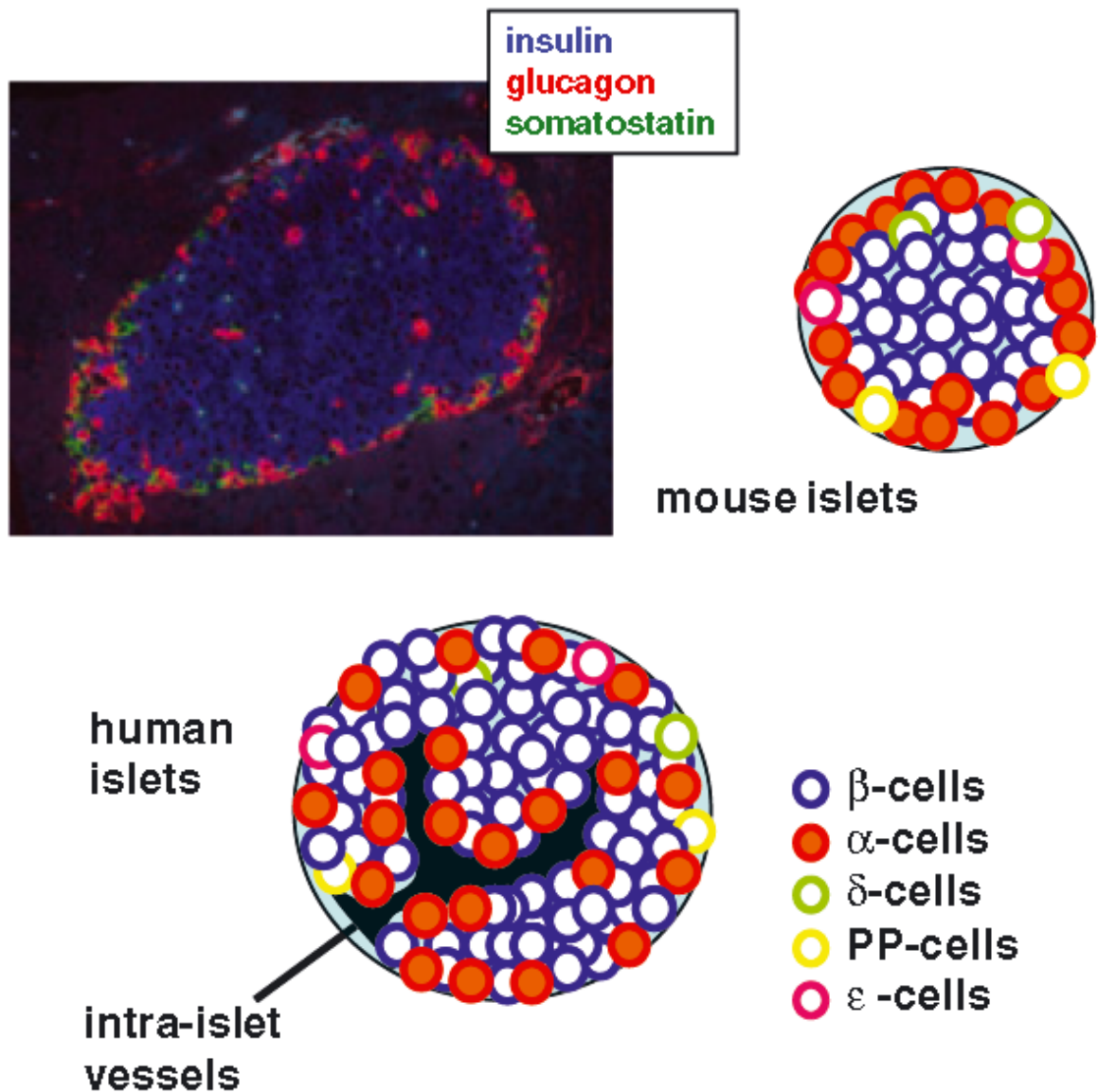


Figura 2. Características histológicas das ilhotas pancreáticas de camundongo e humano (KAWAMORI et al., 2011).

A regulação da massa de célula β parece resultar do balanço dinâmico entre morte celular e neogênese e/ou replicação de célula β existentes. Condições associada com aumento da demanda de insulina incluindo hiperglicemia, resistência à insulina, obesidade e gravidez resultam em aumento da massa de células β em roedores jovens. Entretanto, aumenta da apoptose e/ou diminuição da regeneração nas célula β pode ter impacto na massa de células β e desenvolvimento da hiperglicemia (ASGHAR et al., 2006; BONNER-WEIR, 2001; BUTLER et al., 2003b; CERF, 2013; DOR et al., 2004; PORTE; KAHN, 2001; RAFACHO et al., 2009; THOLE et al., 2012).

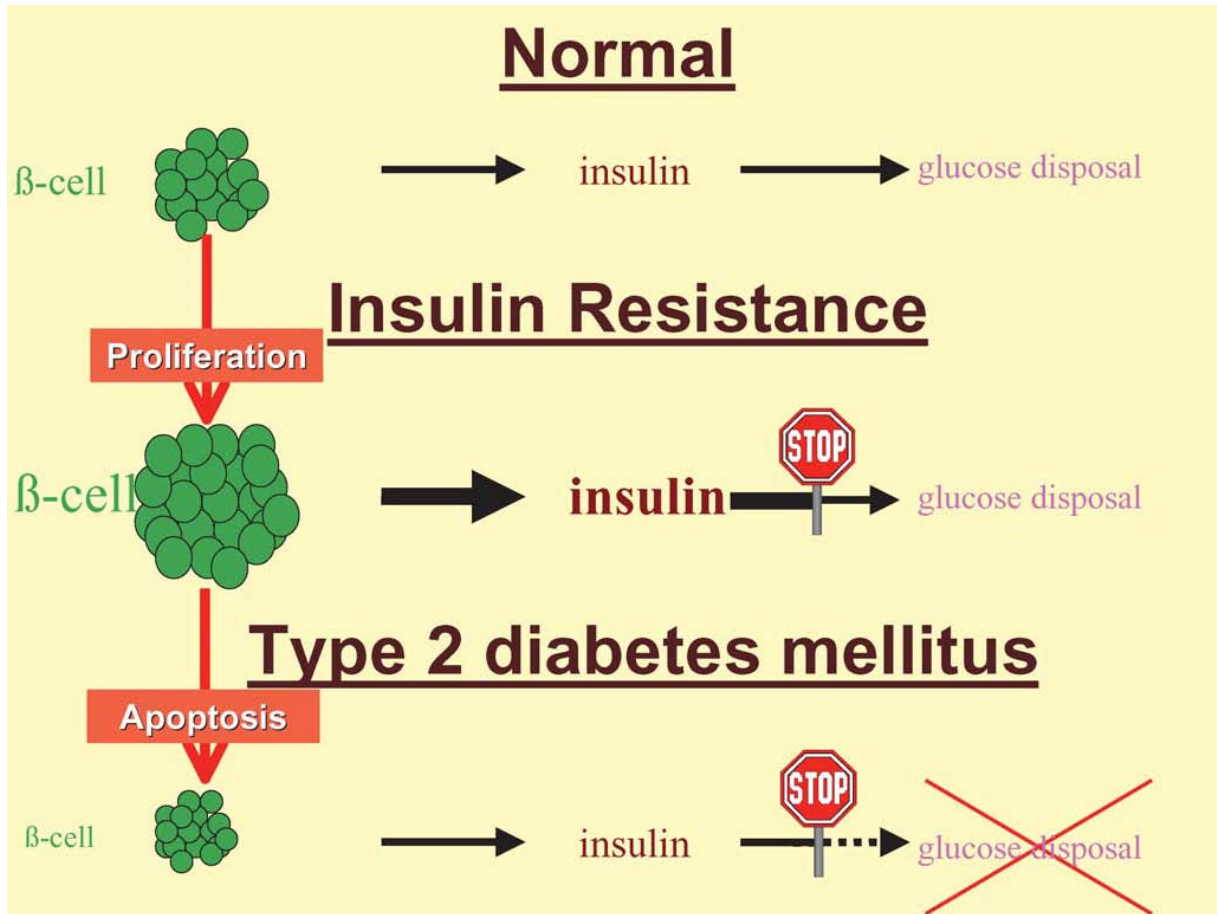


Figura 3. Proliferação e apoptose nas células β pancreáticas na fisiopatologia do diabetes tipo 2 (DONATH et al., 2003).

Nos pacientes com DM2, a resistência insulínica associa-se à disfunção das células β pancreáticas que não apresentam essa resposta adaptativa. Portanto, as anormalidades adaptativas das células β à resistência insulínica são críticas para o desenvolvimento do DM2. As alterações das células β pancreáticas no DM2 são tanto funcionais quanto quantitativas. Assim, a massa de células β reduz-se a aproximadamente 50% do normal por aumento da apoptose e as células β perdem 75% da sua capacidade funcional (BUTLER et al., 2003a; RODER et al., 1998)

Os fatores envolvidos na disfunção das células β já estão bem estabelecidos, e sabe-se que elas deixam de responder aos estímulos secretagogos. Muitas vias de sinalização podem afetar o crescimento e a sobrevivências das células β . Alguns dos muitos mecanismos que podem estar envolvidos nessa disfunção são o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial, o estresse do retículo endoplasmático rugoso, inflamação local e deposição de material amilóide, associados à predisposição genética (DONATH et al., 2008; GLOYN et al.,

2008; LENZEN, 2008; MUOIO; NEWGARD, 2008). A hiperglicemia, decorrente desse processo, e o aumento da concentração dos ácidos graxos livres, acarretando glicolipototoxicidade, são fatores agravantes que aceleram o declínio das células β no DM2 (CNOP et al., 2005; POITOUT; ROBERTSON, 2008; RHODES, 2005).

Atualmente, já há inúmeras evidências experimentais, clínicas e epidemiológicas, da participação do sistema imune e de mediadores inflamatórios nos dois mecanismos básicos do DM2, resistência insulínica e falência da célula pancreática β , tendo como resultado final o desenvolvimento de DM2 (DONATH et al., 2008; HERDER et al., 2005; HOTAMISLIGIL, 2006; KOLB; MANDRUP-POULSEN, 2005; PICKUP, 2004; THORAND et al., 2005).

O aumento da liberação de TNF (tumor necrosis factor)- α , IL (interleukin)-6, MCP-1 (monocyte chemo-attractant protein-1) e de outros fatores solúveis secretados por macrófagos e por outras células residentes no tecido adiposo tem papel fundamental no desenvolvimento da resistência insulínica (GUILHERME et al., 2008). O TNF- α e a IL-6 estimulam as vias da quinase aminoterminal c-Jun (JNK) e quinase β de I κ B (IKK- β) /fator nuclear κ B (NF- κ B), que resultam em aumento da produção de mediadores inflamatórios e resistência insulínica. A fosforilação de I κ B por sua quinase IKK- β leva à degradação de I κ B, liberando NF- κ B para agir como fator de transcrição nuclear em diversos genes envolvidos na resposta inflamatória (KARIN; DELHASE, 2000). As vias que envolvem a indução da supressão de proteínas sinalizadoras de citocinas (suppressor of cytokine signalling, SOCS) e indução da sintase do óxido nítrico (iNOS) podem estar envolvidas no mecanismo de resistência insulínica mediada por citocinas. A secreção dessas proteínas pró-inflamatórias, em especial, o MCP-1 pelos adipócitos, células endoteliais e monócitos aumenta o recrutamento de macrófagos que realimentam o processo (ARKAN et al., 2005; MOONEY et al., 2001; PERREAULT; MARETTE, 2001; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Embora por diferentes mecanismos, a maioria dos fatores inflamatórios age negativamente nas vias de sinalização da insulina, modificando os seus substratos intracelulares, principalmente a fosforilação da família proteica do substrato do receptor de insulina (IRS), com a ajuda de diferentes fatores de transcrição, dentre eles, a família do peroxisome-proliferator activated receptor (PPAR). Assim, as vias metabólicas, inflamatórias e da imunidade inata parecem interagir, levando à resistência insulínica de maneira complexa e ainda pouco clara, apesar dos inúmeros avanços nessa área na última década. O chamado estresse do retículo

endoplasmático e a disfunção mitocondrial, causados, entre outros, por aumento de demanda metabólica, têm sido considerados importantes elos entre as vias metabólicas e inflamatórias envolvidas na resistência insulínica associada à obesidade e ao DM2 (HOTAMISLIGIL, 2006; SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008; TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006).

Embora o reconhecimento da participação do sistema imune na disfunção e morte das células β no DM2 seja bem mais recente, dados clínicos e experimentais, *in vivo* e *in vitro*, indicam que no DM2, assim como no DM1, a inflamação na ilhota de Langerhans (insulite) é uma característica predominante (DONATH et al., 2008; EHSES et al., 2007). Em ilhotas de camundongos submetidos à dieta rica em gordura, foi observado número aumentado de macrófagos bem antes do início de hiperglicemia. Adicionalmente, fatores inflamatórios, incluindo IL-6, IL-8, quimiocina KC, G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) e MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 α*), são produzidos em ilhotas expostas a estresse metabólico (hiperglicemia e hiperlipemia) e em ilhotas isoladas de camundongos submetidos à dieta rica em gordura. Algumas evidências sugerem que o sistema imune local pode estar envolvido no mecanismo de apoptose das células β que acompanha os distúrbios metabólicos prévios e culmina no DM2. Dentre as citocinas envolvidas nesse processo, vale ressaltar a IL-1 β , cuja produção local por células β , sob estímulo com glicose, foi demonstrada e cujo bloqueio sistêmico por injeção de antagonista recombinante do receptor de IL-1 β em 70 pacientes com DM2 levou a aumento da secreção de insulina (BONISCHNETZLER et al., 2008; LARSEN et al., 2007; MAEDLER et al., 2002). A hipótese defendida pelo grupo de pesquisadores que produziu a maioria desses resultados é que o estresse metabólico (hiperglicemia, dislipidemia e adipocinas) levaria à produção de IL-1 β pelas ilhotas, as quais controlariam a sua própria produção e a de outros mediadores inflamatórios e atrairiam macrófagos, perpetuando o processo inflamatório. Este processo culminaria na falência secretória e morte das células β (EHSES et al., 2008). Adicionalmente, há mais de uma década foi demonstrado que a IL-1 β pode induzir a expressão de Fas, receptor de superfície celular envolvido na apoptose de células β (LOWETH et al., 1998). Por outro lado, as ações da IL-1 β nas ilhotas dependem da dose, já que, em pequenas concentrações, pode ter um papel protetor sobre as células β (MAEDLER, 2008).

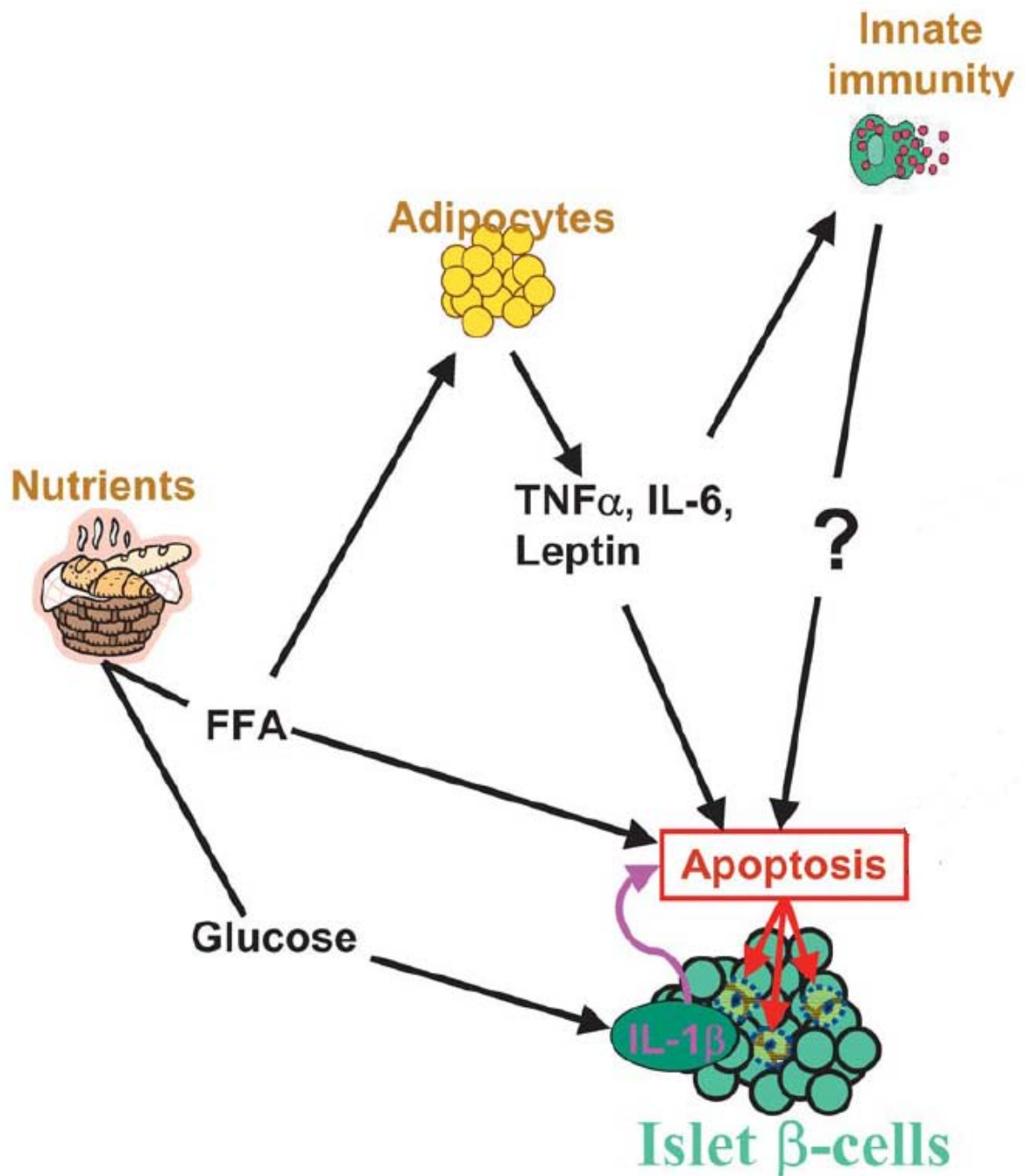


Figura 4. Mediadores inflamatórios no Diabetes Mellitus tipo 2 (DONATH et al., 2003).

O tratamento do DM2 requer múltiplos profissionais e envolve terapia nutricional, exercício físico, diversas drogas orais e, frequentemente, múltiplas injeções diárias de insulina ou de outros medicamentos injetáveis. A aderência à terapêutica costuma ser baixa e mais de 70% dos pacientes apresentam mau controle metabólico (BOSI et al., 2009; CHATURVEDI, 2007; STUMVOLL; GOLDSTEIN; VAN HAEFTEN, 2005). A elevada frequência de complicações crônicas associa-se ao estado de mau controle metabólico

do DM2, estando já bem estabelecido que a hiperglicemia é um dos principais fatores responsáveis pelo desencadeamento das complicações diabéticas crônicas (WATKINS, 1998). Elas decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam a disfunção, dano ou falência de vários órgãos e incluem a nefropatia, com elevada taxa de evolução para insuficiência renal, a retinopatia, principal causa de cegueira adquirida, a neuropatia, principal causa não traumática de amputação de membros inferiores, e manifestações de disfunção do sistema nervoso autônomo, incluindo disfunção sexual (BOULTON et al., 2005; MOLITCH et al., 2004; TESFAYE et al., 1996). Adicionalmente, a associação entre DM e doenças cardiovasculares, que englobam isquemia miocárdica, obstrução arterial periférica e doença vascular cerebral, está bem estabelecida. O DM2 aumenta o risco de doença cardiovascular em 2 a 4 vezes, sendo essa a principal causa de mortalidade em diabéticos (GRUNDY et al., 1999; HAFFNER, 2000). Tudo isso acarreta elevados custos, diretos e indiretos, para os indivíduos portadores de DM, para o sistema público de saúde e para a sociedade como um todo.

Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o DM2 é fundamental. Em se mostrando segura e efetiva, a terapia regenerativa do pâncreas no DM2 poderá vir a ser uma ferramenta importante para o controle metabólico da doença e redução das complicações crônicas.

1.2 Diabetes Mellitus e terapia celular

Os estudos clínicos com utilização de terapia celular para tratamento do DM1 já estão em fase avançada e os resultados, até o momento, parecem promissores (COURI; VOLTARELLI, 2009; VOLTARELLI et al., 2007).

O interesse pelo tratamento regenerativo e pela utilização de terapia celular, mais especificamente, células-tronco (CT) pluri ou multipotentes, para o tratamento do DM2, deriva das evidências clínicas mencionadas acima e da importância da preservação da integridade funcional e quantitativa das células β pancreáticas cuja destruição está envolvida na patogênese do DM2. Adicionalmente, as dificuldades encontradas com a utilização de outros métodos de reposição de células β , tais como transplantes de ilhotas, de pâncreas e de linhagens celulares produtoras de insulina (LANZA; CHICK, 1997; ROCHE et al., 1997) torna a possibilidade de utilização de CT muito atraente (MESPLES et al., 2013).

A utilização de CT, de diferentes fontes, para controle glicêmico em modelos experimentais de DM2 tem sido descrita. Assim, Soria e colaboradores (2000) demonstraram que células secretoras de insulina derivadas de CT embrionárias indiferenciadas implantadas em baço de camundongos com diabetes induzido por estreptozotocina eram capazes de manter normoglicemia. Já Kojima e colaboradores (2004) detectaram células produtoras de insulina em tecidos extra-pancreáticos de ratos e camundongos hiperglicêmicos tratados com células-tronco adultas derivadas da medula óssea. Adicionalmente, Ende e colaboradores (2004) demonstraram diminuição da glicemia, maior sobrevida e atenuação de lesões renais em camundongos obesos com desenvolvimento espontâneo de DM2 tratados com células sanguíneas mononucleares derivadas de cordão umbilical humano. Recentemente, Abraham e colaboradores (2008) relataram aumento da tolerância à glicose e da concentração plasmática de adiponectina em camundongos obesos após transplante intra-ósseo de CT de medula óssea, associado à indução de heme oxigenas, e Chen e colaboradores (2009) relataram melhora da sensibilidade à insulina, da função vascular e da função renal após infusão de células da medula óssea de camundongos não diabéticos em camundongos *db/db* diabéticos (ABRAHAM et al., 2008; CHEN et al., 2009; ENDE; CHEN; REDDI, 2004; KOJIMA et al., 2004; SORIA et al., 2000).

Em seres humanos, há raros relatos de estudos que verificaram o efeito de tratamento com CT sobre o controle glicêmico no DM2. Dentre eles, Novoa e colaboradores (2009) relataram, recentemente, menores concentrações glicêmicas e necessidade de menores doses de insulina, em 126 pacientes diabéticos com doença arterial periférica grave, tratados com infusão autóloga de células mononucleares (CMN) da medula óssea no músculo gastrocnêmio. Já Estrada e colaboradores (2008) submeteram portadores de DM2 à combinação de infusão intrapancreática de CMN autólogas derivadas da medula óssea e oxigenioterapia hiperbárica e, após acompanhamento de 1 ano, observaram redução significativa da glicemia de jejum, da hemoglobina glicosilada e das doses diárias de insulina e hipoglicemiantes orais, assim como aumento das concentrações plasmáticas de peptídeo-C. Em trabalho recente, Viña e colaboradores (2009) relataram o efeito benéfico da infusão local, por via intra-arterial, de CMN da medula óssea em 58 pacientes diabéticos tipo 2, persistindo durante 36 meses de seguimento. Embora, os autores desses relatos sugiram efeitos benéficos da terapia com CT sobre a angiogênese, mecanisticamente, o mecanismo de ação envolvido ainda não foi abordado, principalmente pelas dificuldades metodológicas de estudos em humanos. Entretanto, em análise de autópsias, Butler e colaboradores (2004) avaliaram o

pâncreas de 31 indivíduos, dos quais dois diabéticos tipo 2, submetidos a transplante de CT hematopoéticas ao longo da vida e não observaram a presença de células β derivadas das células hematopoéticas dos doadores, concluindo ser pouco provável que estas células possam se transdiferenciar em células β (BUTLER et al., 2007; ESTRADA et al., 2008).

1.3 Células-tronco mesenquimais

Célula-tronco é uma célula capaz de dar origem a outra célula-tronco idêntica (auto-renovação), diferenciar-se em células especializadas, e fazer a reconstituição funcional *in vivo* de um tecido. O desenvolvimento de tecidos e órgãos durante a embriogênese depende dessas células e no adulto perdas celulares frequentes são compensadas pela diferenciação das células-tronco adultas (ZIPORI, 2004). A medula óssea contém, além das células-tronco hematopoéticas, precursores de linhagens não-hematopoéticas que incluem as células mesenquimais estromais multipotentes, as quais são referidas como MSCs (Multipotent Mesenchymal Stromal Cells ou Mesenchymal Stem Cells) (DOMINICI et al., 2006; ZHANG et al., 2005). Uma pequena subpopulação delas tem propriedade de células-tronco (auto-renovação, proliferação indefinida, plasticidade), sendo denominadas células-tronco mesenquimais. As MSCs constituem uma população rara de progenitores multipotentes que contribuem para a regeneração de tecidos mesenquimais tais como: ósseo, cartilaginoso, muscular, ligamento, tendão, tecido adiposo e estroma medular, além de exercerem um papel fundamental na hematopoese (PITTENGER et al., 1999). As MSCs caracterizam-se pela ausência de expressão de marcadores de linhagens hematopoéticas tais como CD34, CD45, CD14, glicoforina A e marcadores de células T e B, e pela expressão de vários marcadores celulares tais como CD44, CD29, CD51/61, CD13, CD54, CD90, CD49e, CD73, CD105, STRO e KDR, bem como algumas moléculas de adesão essenciais envolvidas na interação com células T, como VCAM-1, ICAM-1, e LFA-3. Elas expressam MHC de classe I e não expressam MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86. Portanto, apresentam um imunofenótipo não-imunogênico ou hipo-imunogênico (LE BLANC; PITTENGER, 2005). Desse modo, as MSCs escapam da vigilância do sistema imune, porque possuem antígenos de superfície que são pobremente reconhecidos pelas células T aloreativas e células NK. Sendo assim, elas podem ser transplantadas de forma alogênica, autóloga e em xenoenxertos (ZHANG et al., 2005).

Outra propriedade atribuída às MSCs é a sua capacidade de imunossupressão *in vitro e in vivo*. Em 2003, Le Blanc e colaboradores mostraram que MSCs exerceram um

efeito imunomodulador em culturas mistas de linfócitos, onde em altas concentrações essas células não só suprimiram a aloreatividade das células T como também reduziram a proliferação dos linfócitos causadas por potentes mitógenos de células T, como PHA e Con A (LE BLANC et al., 2003). Di Nicola e colaboradores (2002) confirmaram a atividade inibitória de células estromais da medula óssea na proliferação de células T desencadeada tanto por estímulos celulares quanto humorais, sendo que este efeito foi revertido pela adição de anticorpos monoclonais neutralizantes anti-TGF- β 1 e anti-HGF (DI NICOLA et al., 2002). Trabalhos mais recentes demonstraram que as MSCs inibem a proliferação de células T pela regulação negativa da expressão de ciclina D2 (GLENNIE et al., 2005) e que a inibição da proliferação deve-se à ativação da via de sinalização por PD-1 (AUGELLO et al., 2005). Além de atuarem sobre linfócitos T, outros trabalhos recentes mostraram que as MSCs exercem uma regulação geral sobre as respostas imunes, atuando também sobre outras células do sistema imune inato e adaptativo (AGGARWAL; PITTENGER, 2005). Recentemente, Maccario e colaboradores (2005) demonstraram que a interação de MSCs humanas com cultura mista de linfócitos inibe a diferenciação de células dendríticas mielóides e favorece a diferenciação de subpopulações de células T CD4⁺ que expressam um fenótipo regulatório/supressor (MACCARIO et al., 2005).

Além da modulação de respostas imunes, outra propriedade interessante das MSCs consiste em sua capacidade de migração para um sítio de injúria tecidual, após administração intravenosa. Esta extraordinária capacidade das MSCs foi demonstrada em casos de fratura óssea, infarto do miocárdio, injúria cerebral isquêmica, dentre outros (LE BLANC; PITTENGER, 2005). Assim, devido à facilidade com que essas MSCs podem ser cultivadas e expandidas *in vitro* tem incitado muitos pesquisadores a propor possíveis aplicações clínicas para estas células (WEXLER et al., 2003). Com base em suas propriedades imunológicas, principalmente sua capacidade imunossupressora, acredita-se que as MSCs podem ser aplicadas terapêuticamente no tratamento de doenças inflamatórias humanas. Além do potencial imunossupressor e imunomodulador, há o potencial de diferenciação celular e regeneração tecidual das MSCs, visando à reconstrução dos tecidos lesados.

As MSCs representam, portanto, uma fonte de células-tronco adequada para terapias celulares em virtude de seu fácil isolamento, expansão e capacidade imunossupressora. Nesse contexto, fazem-se necessários estudos pré-clínicos em modelos animais, com o objetivo de avaliar a eficácia e os efeitos do tratamento com MSCs.

1.4 Células-tronco mesenquimais e Diabetes Mellitus

Estudos prévios demonstraram que as MSCs são capazes de reduzir a hiperglicemia em animais e humanos com diabetes tipo 1 e 2 (BHANSALI et al., 2009; EZQUER et al., 2011a; EZQUER et al., 2008; HO et al., 2012; JIANG et al., 2011; LEE et al., 2006; SI et al., 2012; ZHOU et al., 2009).

O transplante de MSCs em modelos diabéticos exerceu efeitos anti-diabéticos, que resultaram em aumento do número de ilhotas pancreáticas (DINARVAND; HASHEMI; SOLEIMANI, 2010; EZQUER et al., 2011a; SI et al., 2012), aumento das células produtoras de insulina (EZQUER et al., 2008; LEE et al., 2006), restrita expansão das células produtoras de glucagon (EZQUER et al., 2008) e diferenciação das células-tronco, incluindo MSC e células-tronco pancreáticas endógenas (LIN et al., 2009). Além disso, transplante de MSCs promoveu a expressão de insulina e PDX-1 (*Pancreatic duodenal homeobox-1*) no pâncreas (BOUMAZA et al., 2009). PDX-1 é um fator de transcrição responsável pelo desenvolvimento pancreático durante embriogênese, diferenciação das células β , e manutenção da função das células β no adulto (HOLLAND et al., 2005).

A infusão autóloga das MSCs derivadas da medula óssea em ratos diabéticos induzido por STZ (estreptozotocina) aumentou as concentrações de insulina, e a expressão de PDX-1 (*Pancreatic duodenal homeobox-1*) na ilhota dos animais diabéticos comparadas com os animais não tratados, com conseqüente diminuição da hiperglicemia. Além disso, as MSC modificaram o padrão de citocinas das células T, sugerindo que os fatores de crescimento e moléculas bioativas expressas pelas MSC depois da infusão, podem promover ativação, sobrevivência ou desenvolvimento das células β (BOUMAZA et al., 2009).

Dinarvante e colaboradores (2010) demonstraram que o transplante sinérgico de MSCs induzidas em diferenciação hepática pode reverter o diabetes induzido por STZ em camundongos, devido ao aumento do número de ilhotas, aumento da sensibilidade à insulina e diminuição da hiperglicemia. Esses autores sugerem que as citocinas produzidas pelas MSCs promovem a sobrevivência das células por mecanismo parácrino.

De acordo com Si e colaboradores (2012), o transplante de MSCs em ratos com DM2 induzido por STZ e dieta hiperlipídica, diminui a hiperglicemia e aumenta a sensibilidade da insulina nos tecidos-avlos, devido ao aumento da expressão do transportador

de glicose e sinalização de insulina no músculo esquelético e tecido adiposo. Mais recentemente, Hao e colaboradores (2013) demonstraram que múltiplas infusões de MSC em ratos com DM2 induzido por STZ e dieta hiperlipídica, diminuíram a hiperglicemia, aumentaram a sensibilidade à insulina observada no teste de tolerância à glicose, e as análises de imunofluorescência de insulina e glucagon demonstraram restauração do número e estrutura das ilhotas, e que os fatores de crescimento e citocinas liberados pelas MSC infundidas são os responsáveis pelos efeitos observados (HAO et al., 2013).

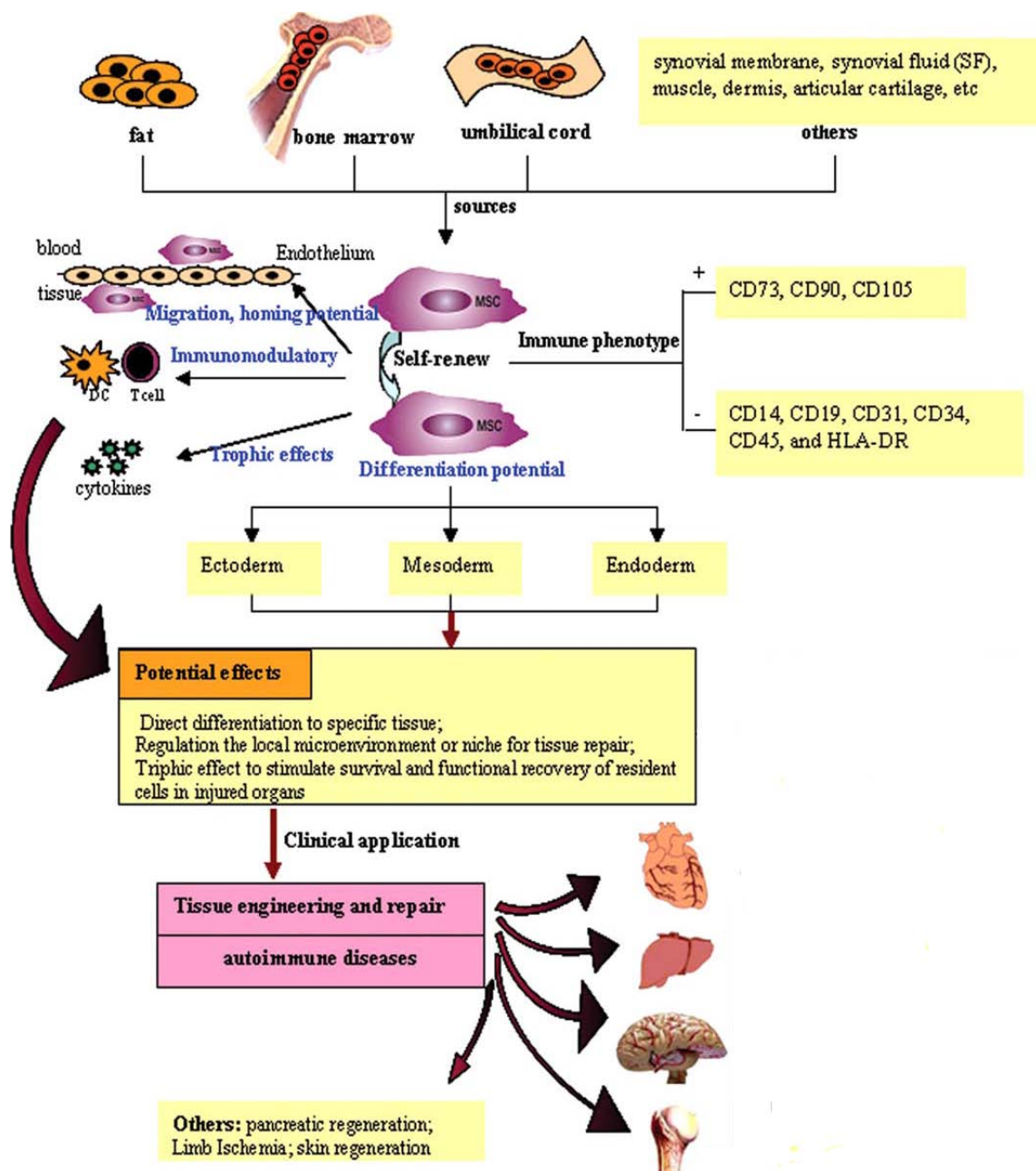


Figura 5. Características biológicas e aplicações clínicas das MSCs (SI et al., 2011)

Dada a importância da infusão de MSCs em modelos animais de DM2, foram estudados os efeitos de múltiplas infusões de MSCs na regulação da glicemia, resistência à insulina e aspectos morfométricos da ilhota pancreática, em camundongo com DM2 induzido por dieta hiperlipídica.

2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da infusão de células-tronco mesenquimais (MSCs) em camundongos com DM induzido por dieta hiperlipídica.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar os possíveis efeitos da infusão de MSCs em:

- Evolução da glicemia de jejum;
- Evolução da tolerância à glicose e resistência à insulina;
- Área total da ilhota pancreática;
- Volume relativo das células produtoras de insulina e glucagon;
- Proliferação e apoptose das células da ilhota pancreática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos *Swiss* ($24,0 \pm 0,4$ g) machos, adultos, com 4 semanas de idade fornecidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB - Campinas, São Paulo, Brasil) foram utilizados neste projeto. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em biotério com temperatura, umidade e iluminação (7-19h: claro; 19-7h: escuro) controladas e oferta de água *ad libitum*. Os animais foram pesados e a ingestão alimentar foi medida diariamente. Após 1 semana de aclimação, os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: grupo controle (C) alimentado com dieta padrão para roedores composta de 4% de gordura, 20% de proteína e 76% de carboidrato em relação ao valor calórico total (VCT) contendo 3,83Kcal/g de energia metabolizável, e grupo dieta hiperlipídica (D) alimentado com dieta rica em gordura saturada composta de 60% de gordura, 20% de proteína e 20% de carboidrato em relação ao VCT, contendo 5,24Kcal/g de energia metabolizável. (Prag Soluções, São Paulo, Brasil).

Após 8 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, os animais tornaram-se obesos, hiperglicêmicos (glicemia de jejum > 180 mg/dL) e resistentes à insulina.

3.2 Infusão das MSCs

Na nona semana, os animais diabéticos foram subdivididos aleatoriamente nos grupos: diabético (DM) e diabético transplantado com MSC (DMSC). Os camundongos do grupo DMSC receberam 4 infusões intraperitoneais (i.p.) de $5 - 8 \times 10^6$ células resuspensas em 200uL de PBS (*sterile phosphate buffered saline*), com 1 semana de intervalo entre as infusões. As células infundidas encontravam-se nas quarta e quinta passagens. Os camundongos do grupo diabético receberam infusão de 200uL de PBS. A via de infusão intraperitoneal foi escolhida porque, a infusão intravenosa, apesar de ser mais comumente utilizada, aumenta o risco de morte por embolia pulmonar, visto que, as MSC de rato apresentam diâmetro maior do que os capilares pulmonares dos camundongos (WILSON; VITKIN; MATTHEWS, 2009).

3.3 Monitoramento da glicemia de jejum e testes de tolerância à glicose (TTG) e à insulina (TTI) antes e após infusões de MSC

A glicemia foi determinada em amostra sanguínea coletada da cauda por glicosímetro portátil (Accu-Check, Roche Diagnostic, Indianopolis, USA).

O TTG foi realizado em jejum, com injeção intraperitoneal (i.p.) de glicose (1,5mg/g massa corporal) e coleta de sangue caudal aos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos para dosagem de glicemia. O TTI foi realizado em jejum, com injeção i.p. de insulina regular (0,75U/Kg massa corporal) e coleta de sangue caudal aos 0, 30, 60 e 90 minutos para dosagem de glicemia.

O TTG e o TTI foram realizados antes e 1, 2,3 e 4 meses após a última infusão de MSC. A glicemia de jejum foi monitorada semanalmente após a última infusão de MSC.

Desenho experimental

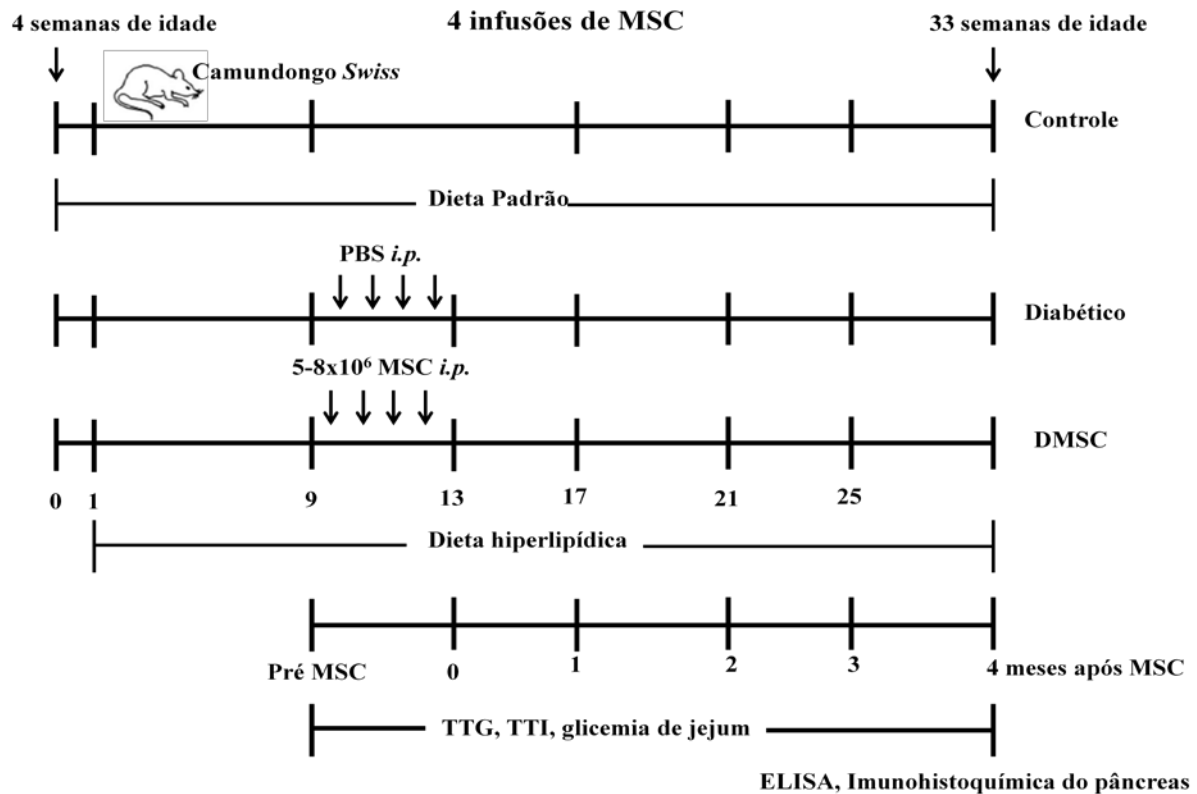


Figura 6. Desenho experimental. Os camundongos iniciaram o experimento com 4 semanas de idade e receberam dieta padrão durante 1 semana de aclimação. Após esse período, foram divididos em grupo controle, que permaneceram com a dieta padrão, e grupo dieta hiperlipídica, que receberam dieta hiperlipídica. Após 8 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, os animais diabéticos foram subdivididos em grupo diabético e grupo diabético transplantados com MSC (DMSC). Os animais do DMSC receberam 4 infusões de $5 - 8 \times 10^6$ células intraperitoneal, com 1 semana de intervalo entre as infusões. Glicemia de jejum foi realizada semanalmente e os TTG e TTI foram realizados mensalmente, após a última infusão de MSCs. No final de período experimental, ou seja, quatro meses após a última infusão de MSC, foram realizados também a dosagem de insulina no soro (ELISA) e imunohistoquímica do pâncreas.

Todos os procedimentos de experimentação foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Protocolo CEEA no 053/2008).

3.4 Isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos *Wistar*

Ratos *Wistar*, machos, com 6 semanas de idade, foram sacrificados por deslocamento cervical e submetidos à remoção cirúrgica e estéril do fêmur e tíbia mantidos em PBS. Em seguida, foi realizada a extração da medula óssea pelo procedimento de lavagem do osso com PBS. Após a coleta, as células mononucleares da medula óssea foram

centrifugadas por 10min a 1200rpm. Após contagem, 5×10^7 células mononucleares da medula óssea resuspendidas em meio de cultura alpha-MEM (Gibco, Auckland, NZ), suplementado com 15% de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT, USA) e 1mM de L-glutamina, foram colocadas em placas (150x20mm) específicas para células que se aderem ao plástico, e incubadas à temperatura de 37°C em atmosfera umidificada. As células não aderentes foram removidas 72h por mudança de meio de cultura. A primeira cultura confluenta foi lavada com PBS e incubada com tripsina à 37°C durante 5 minutos. RPMI1640 (Gibco, Auckland, NZ) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT, Canadá) foi utilizado para neutralizar o excesso de tripsina. As células foram centrifugadas e colocadas em placas novamente. As passagens subsequentes foram realizadas similarmente.

3.5 Imunofenotipagem de MSC

Alíquotas de 100 µl de células-tronco mesenquimais na quarta e quinta passagens (1×10^6 células/ml) foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro, com 5µl de anticorpos monoclonais ou isotipos controles diretamente conjugados a fluorocromos (isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE)). Após a incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 500g, lavadas duas vezes com PBS, ressuspendidas em 200 µl de PBS e analisadas no citômetro de fluxo FACSsort (Becton-Dickson) usando o software *Cellquest* (BD). Para a caracterização imunofenotípica das MSCs foram utilizados anticorpos monoclonais contra CD31 (marcador de células endoteliais), CD45 (marcador de célula hematopoiética), CD11b (marcador de macrófagos), CD29 (integrina beta 1 – molécula de adesão) e CD44 (glicoproteína de membrana – marcador de células-tronco).

3.6 Diferenciação osteogênica e adipogênica das MSC

Foi verificado o potencial de diferenciação em osteócitos e adipócitos das MSC estudadas. A diferenciação osteogênica foi induzida em cultura confluenta de MSC por 3 semanas em meio alpha-MEM (Gibco, Auckland, NZ) suplementado com 7,5% de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT, USA), 1µM de dexametasona, 200µM de ácido ascórbico e Beta-glicerolfosfato 10mM (pH 7,2). Para observar os depósitos de cálcio, as culturas foram avaliadas por meio da coloração de Von Kossa. As células aderidas às lamínulas foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada, as células foram incubadas no escuro em solução de nitrato de prata 5%.

As lamínulas contendo as células foram expostas à luz branca de uma lâmpada de 100W posicionada a 30 cm de distância das amostras por 45 minutos. Após este período, as células foram incubadas durante 2 minutos em solução de tiosulfato de sódio 5%, lavadas com água destilada e, por fim, coradas com Hematoxilina de Harris durante 5 minutos, e analisadas em microscópio. Para a diferenciação adipogênica, as MSC confluentes foram cultivadas por 2 semanas em meio alpha-MEM (Gibco, Auckland, NZ) suplementando com 15% de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT, USA), dexametasona 100mM, 10ug/mL de insulina, indometacina 100uM (pH 7,2). Para verificar a ocorrência de diferenciação adipocítica, as células aderidas às lamínulas foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após 3 minutos de incubação com álcool 70%, as células foram coradas com Sudan II-Escarlate e Hematoxilina de Harris (PITTENGER et al, 1999).

3.7 Obtenção de soro e tecidos dos animais

Os animais foram decapitados 4 meses após a última infusão de MSCs. O sangue do tronco foi coletado e centrifugado a 2000rpm durante 10 minutos e o soro armazenado em temperatura -20° C.

3.8 Análise sorológica

A dosagem de insulina no soro em jejum dos camundongos foi realizada pelo método de ELISA, seguindo as instruções do fabricante (Millipore, cat. # EZRMI-13K).

3.9 Reações de imunohistoquímica em tecido pancreático

Os animais foram dissecados e amostras de pâncreas foram fixadas em formaldeído 10% tamponado. O tecido foi incluído em paraplaste, cortado em micrótomo com espessura de 5µm e os cortes foram montados em lâminas de vidro mantidos em forno seco a 60° C *overnight* para adesão na lâmina. Em seguida, o material foi desparafinado e hidratado em uma bateria de xilol, álcool e água. A recuperação antigênica foi realizada por meio de fervura dos cortes, em tampão citrato, pH 6.0, durante 50 minutos em banho-maria a 100°C. Após recuperação, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com o reagente *Peroxidase-Blocking Reagent* (DAKO). Foi utilizado PBS+BSA 1% por 20 minutos para bloqueio das ligações inespecíficas e em seguida o anticorpo primário purificado *rabbit anti-mouse anti-insulin* (diluição 1:100; Santa Cruz) ou anti-glucagon (diluição 1:2000; AbCam) foi incubado por 1h. Já, o anticorpo primário purificado rabbit-mouse anti-Ki67 (marcador

nuclear de proliferação celular; diluição 1:100; Abcam) e o rabbit-mouse anti-caspase-3 (marcador citoplasmático de apoptose celular; diluição 1:500; Abcam) foram incubados *overnight*. O kit Universal LSAB™+ Kit/HRP foi usado posteriormente como fonte do anticorpo secundário e estreptavidina. A reação foi revelada com DAB e contracorada com hematoxilina. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico (Axiolab; Carl Zeiss) com ampliação de 20x, equipado com câmera *AxionCam HRc* (Carl Zeiss).

3.10 Quantificação do tamanho da ilhota pancreática, volume relativo das células beta e alfa da ilhota e determinação das células positivas para caspase-3 e ki-67 na ilhota

Para estabelecer o tamanho da ilhota pancreática e o volume relativo das células beta e alfa, 15 ilhotas por animal foram selecionadas aleatoriamente e analisada a área imunomarcada para insulina ou glucagon em relação à área total da ilhota, utilizando o programa Image-Pro® Plus (Media Cybernetics). A contagem das células positivas para caspase-3 e Ki67 foi realizada em 15 ilhotas por animal, e para tal foi utilizado o programa Image J. O volume relativo das células beta e alfa foi determinado pela área positiva para insulina ou glucagon dentro da ilhota dividido pela área total da ilhota e o resultado expresso em porcentagem. A determinação do grau de apoptose e proliferação nas células da ilhota foi determinado pela divisão do número de células positivas para caspase-3 ou Ki67 pela área total da ilhota.

3.11 Análise dos dados

Para comparações pré e pós-tratamento foi utilizado o *test t student* pareado. Para comparações entre dois grupos diferentes foi utilizado o *test t student* não-pareado. E para determinar as diferenças existentes entre 4 grupos experimentais foi utilizado o teste Two-way ANOVA com teste post-hoc *Tukey*. Foi utilizado teste de correlação de Pearson para avaliar correlações entre glicemia de jejum e AUC dos TTG e TTI 4 meses após a última infusão de MSCs e a positividade celular para caspase e Ki67 na ilhota pancreática. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação imunofenotípica e potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de rato *Wistar*

O histograma representativo da imunofenotipagem das MSC na quinta passagem confirma o imunofenótipo característico dessas células, que apresentam marcadores de superfície positivos (CD44, 71,86% e CD29, 84,10%) e negativos (CD45, 21,29%, CD31, 5,87% e CD11b, 14,97%) (Fig. 7). Adicionalmente, as MSC apresentaram morfologia semelhante aos fibroblastos (Fig. 8A) e foram capazes de se diferenciar em linhagens de osteócitos e adipócitos, por meios indutores específicos, descritos anteriormente (Fig. 8B e C). Esses resultados caracterizam essas células como células-tronco mesenquimais, como descrito em estudos prévios (DOMINICI et al., 2006; PITTENGER et al., 1999).

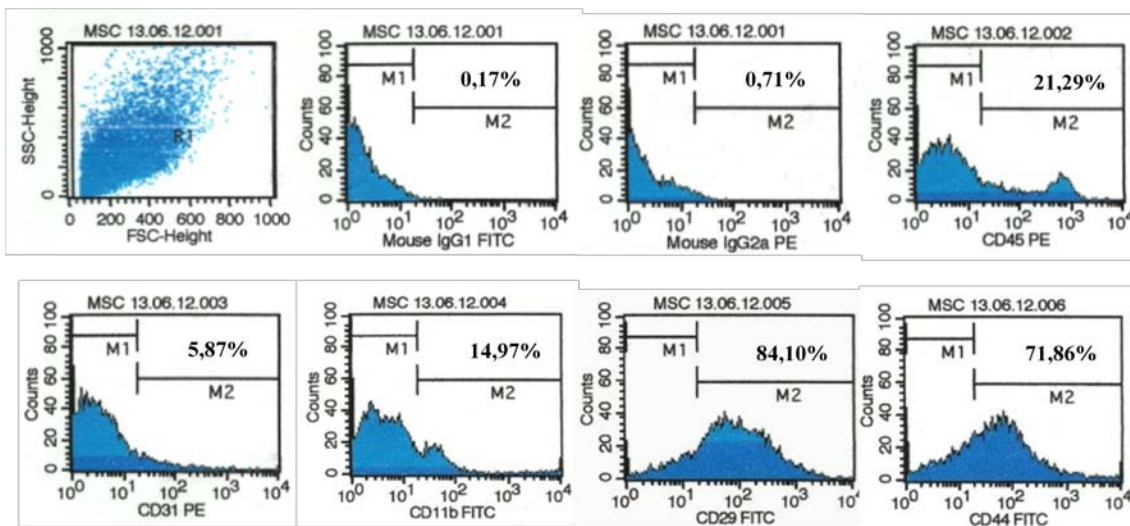


Figura 7. Caracterização imunofenotípica das MSC isoladas de medula óssea de rato *Wistar*. Histograma representativo das MSC na quinta passagem, obtido por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem de células positivas para o antígeno de superfície.

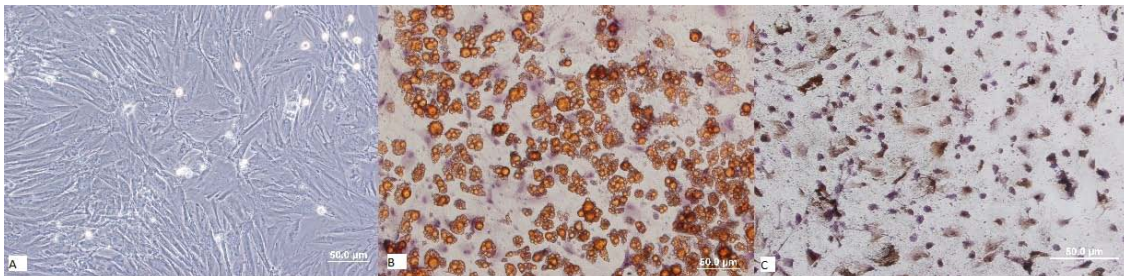


Figura 8. Caracterização da multipotencialidade das MSC. (A) Células-tronco mesenquimais (MSC) na quinta passagem foram definidas com aparência de fibroblasto; (B) diferenciação adipogênica: depósitos de lipídeos corados com Sudan II; (C) diferenciação osteogênica: depósitos de cálcio corados com von Kossa (Aumento de 200x).

4.2 Testes de tolerância à glicose (TTG) e insulina (TTI) após 8 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica

Após oito semanas, as concentrações sanguíneas de glicose em jejum e a área sob a curva dos testes de tolerância à glicose e insulina aumentaram significativamente ($p < 0,05$) nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica em relação ao grupo controle, caracterizando o modelo animal de obesidade, resistência à insulina e hiperglicemia (Fig. 9). Foram considerados diabéticos os animais com glicemia de jejum > 180 mg/dL (URBAN et al., 2008).

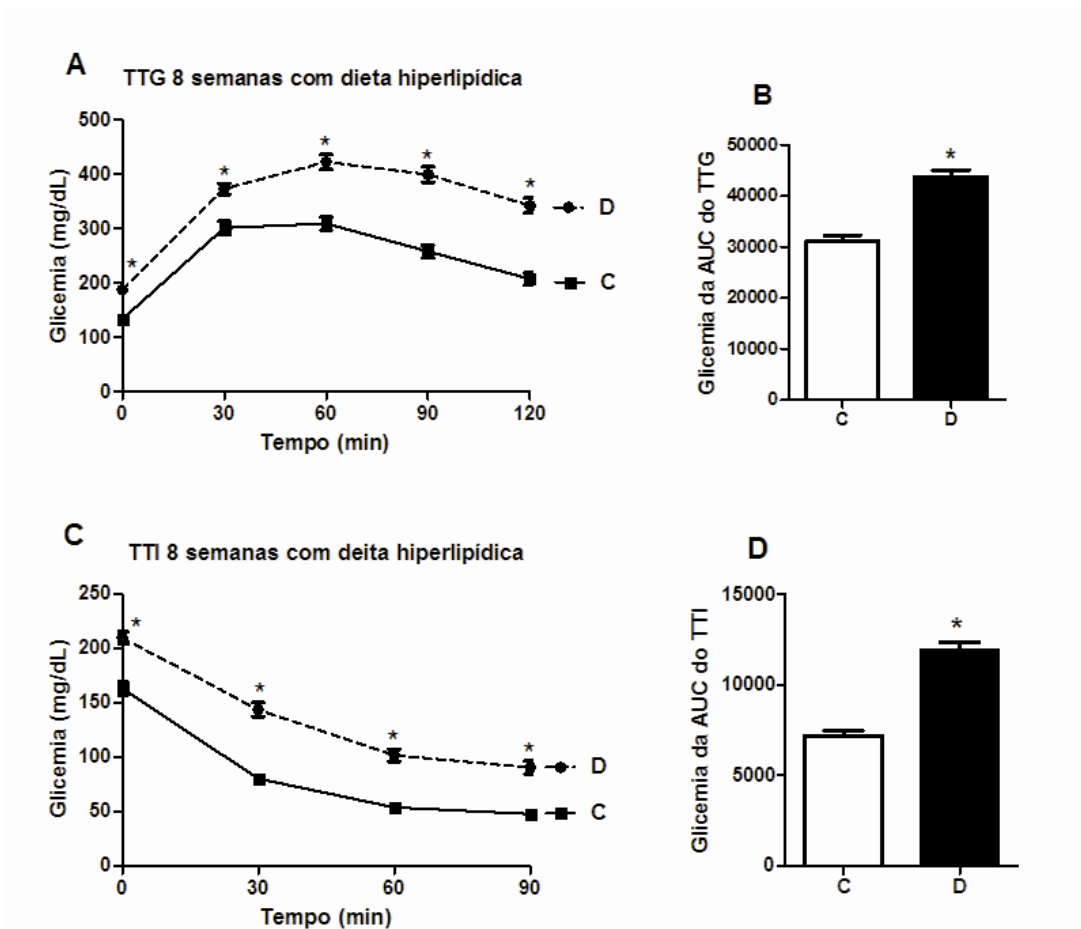


Figura 9. (A) Teste de tolerância à glicose (TTG), (B) área sob a curva do TTG, (C) teste de tolerância à insulina (TTI), e (D) área sob a curva do TTI depois de oito semanas de tratamento com dieta hiperlipídica. Valores estão representados como média \pm EPM, $n=10-13$ camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D). * $p < 0,05$, (C) vs. (D).

4.3 Glicemia de jejum e insulinemia.

Após o transplante, foram considerados respondedores os animais diabéticos que apresentaram glicemia de jejum menor do que 180 mg/dL, quatro meses após a última infusão das MSC. Segundo este critério, 72,2% da amostra (n=13) foram respondedores e 27,8% (n=5) não respondedores. Na tabela 1 é possível observar a diminuição significativa ($p < 0,05$) da glicemia de jejum quatro meses após a última infusão de MSC comparada aos valores pré-transplante ($214,0 \pm 20,8$) nos animais respondedores ($140,5 \pm 22,4$).

Tabela 1. Glicemia de jejum (mg/dL) pré e após tratamento com 4 infusões de MSC

Respondedores	Pré-tratamento	4 meses após tratamento
1	184	167
2	214	119
3	226	167
4	215	148
5	234	157
6	218	147
7	180	115
8	221	112
9	227	121
10	248	119
11	220	125
12	180	158
13	215	171
Média	214,0±20,8	140,5±22,4*

* $P < 0,05$ (Pré-tratamento vs. pós-tratamento)

A primeira diminuição significativa ($p < 0,05$) da glicemia de jejum nos animais respondedores ocorreu 7 semanas após a última infusão de MSC e manteve-se até o final do período experimental, comparado com o grupo diabético. Os animais diabéticos apresentaram aumento significativo da glicemia de jejum durante todo período experimental, com relação ao grupo controle. Além disso, dezesseis semanas após a última infusão de MSC, os animais não respondedores apresentaram aumento significativo da glicemia de jejum em relação ao grupo controle e animais respondedores (Fig. 10).

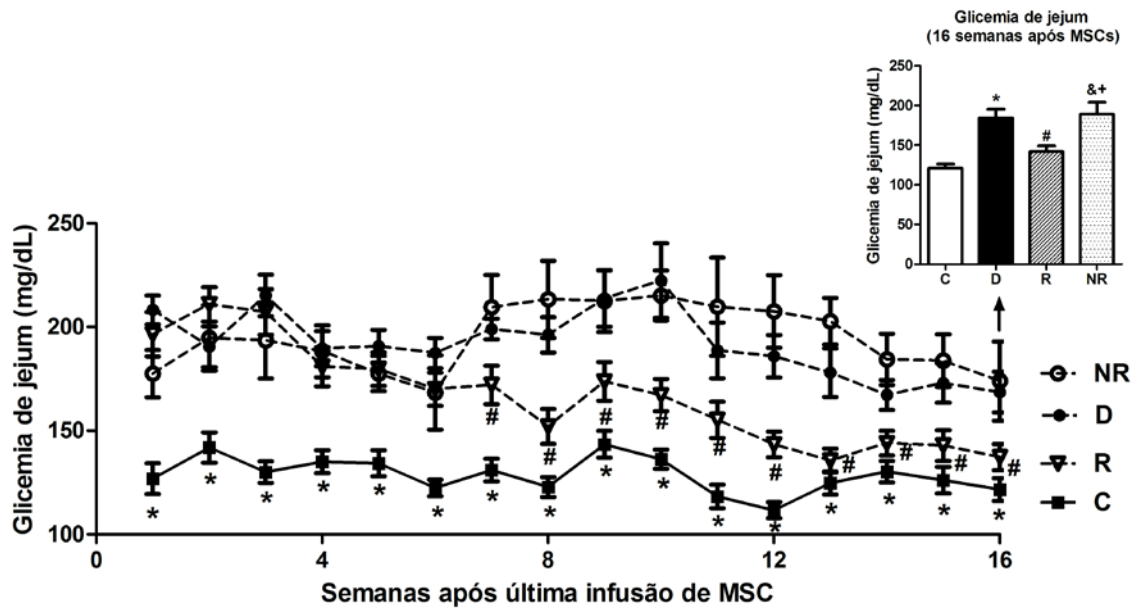


Figura 10. Glicemia de jejum (mg/dL) após 4 infusões de MSC. Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * p < 0,05, (C) vs. (D); # p < 0,05, (R) vs. (D); & p < 0,05, (NR) vs. (C); + p < 0,05, (NR) vs. (R)

A concentração de insulina no soro dos animais diabéticos foi significativamente ($p < 0,05$) maior comparado ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os animais respondedores e não respondedores (Fig. 11).

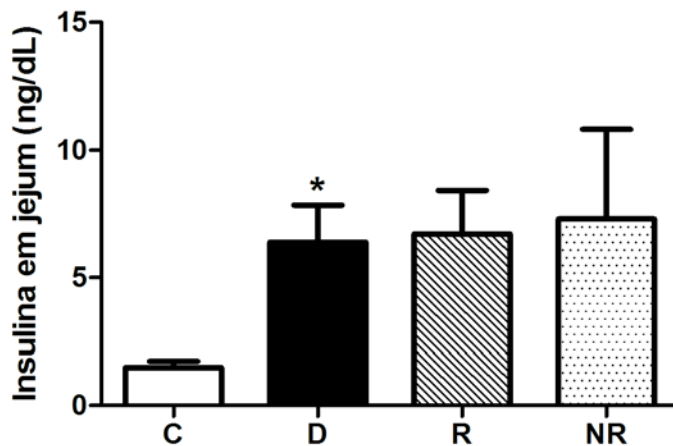


Figura 11. Insulina em jejum (ng/dL) soro. Valores estão representados como média \pm EPM, n= 2-10 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * p < 0,05, (C) vs. (D).

4.4 Massa corporal e Ingestão alimentar

A massa corporal dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica aumentou significativamente ($p < 0,05$), a partir da sétima semana de tratamento, e houve também aumento significativo ($p < 0,05$) da ingestão calórica durante todo o período experimental, em relação ao grupo controle (Fig. 12 e 13).

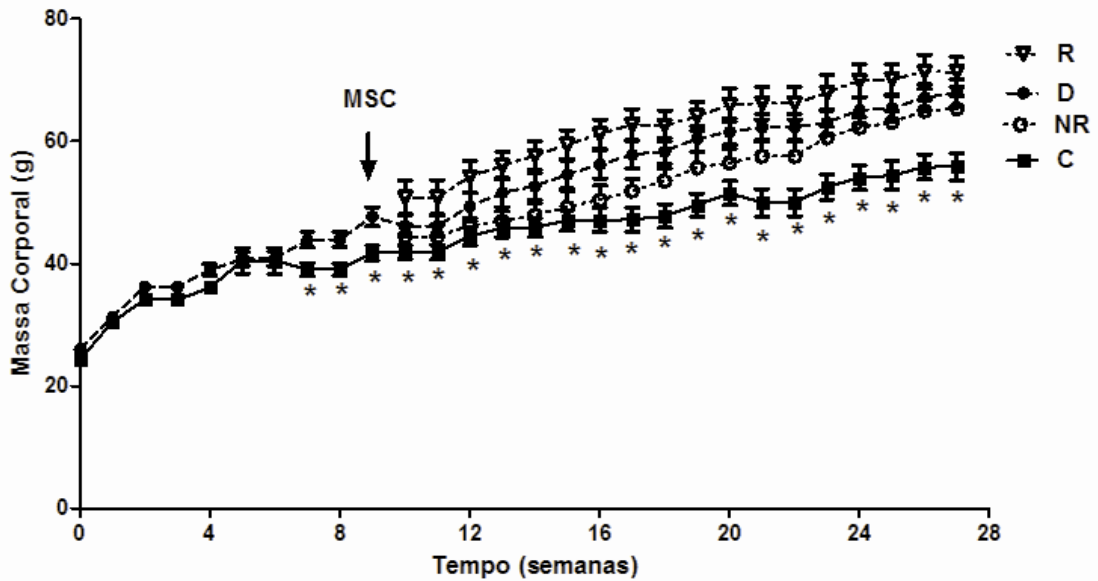


Figura 12. Massa Corporal (g). Valores estão representados como média \pm EPM, $n=10-13$ camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * $p < 0,05$, (C) vs. (D).

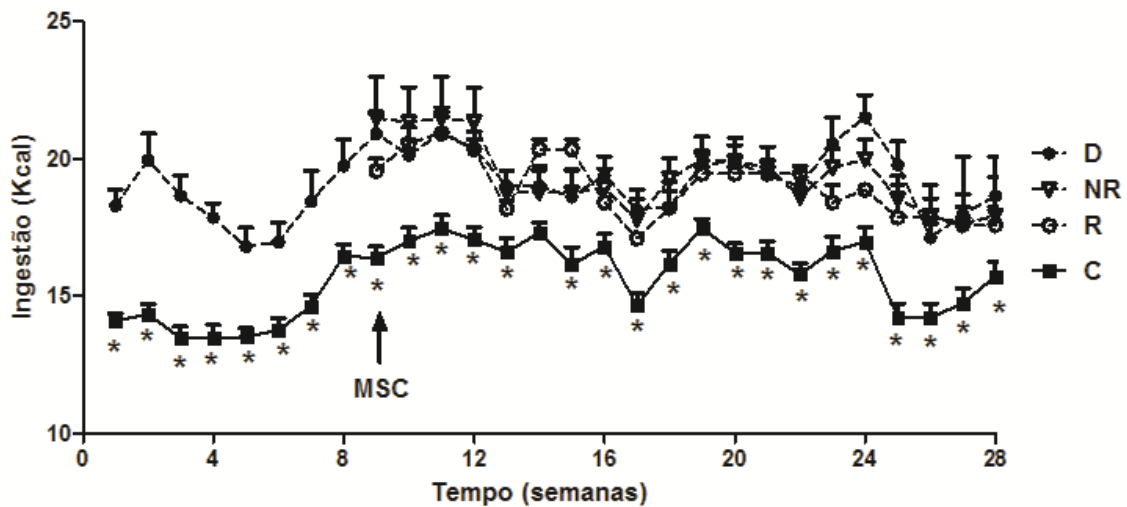


Figura 13. Ingestão alimentar (Kcal). Valores estão representados como média \pm EPM, $n=10-13$ camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor. * $p < 0,05$, (C) vs. (D).

4.5 Testes de tolerância à glicose (TTG) e insulina (TTI) um, dois, três e quatros meses após a última infusão de MSCs.

Os animais respondedores apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) da área sob a curva do TTG e TTI em relação ao grupo diabético, somente após 4 meses a última infusão de MSCs. Além disso, os animais não respondedores também apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) da área sob a curva do TTI comparado ao grupo diabético, quatro meses após a última infusão de MSCs. Os animais diabéticos apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) da área sob a curva do TTG e TTI em relação ao grupo controle, durante todo período experimental (Fig. 14 e 15).

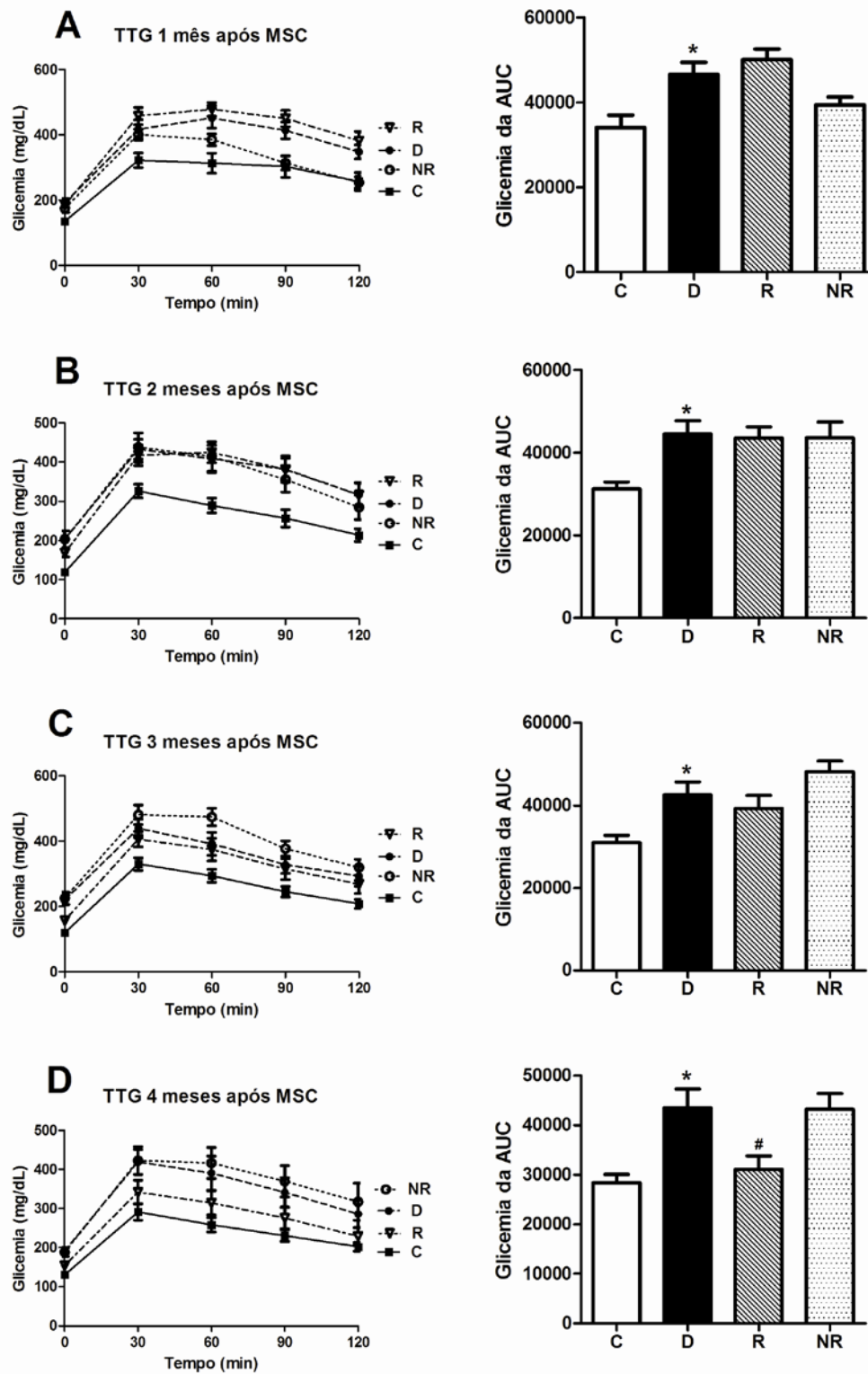


Figura 14. Teste de tolerância a glicose (TTG) e área sob a curva (AUC) do TTG 1, 2, 3 e 4 meses após 4 infusões de MSC. Valores estão representados como média \pm EPM, $n=10-13$ camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * $p < 0,05$, (C) vs. (D); # $p < 0,05$, (R) vs. (D).

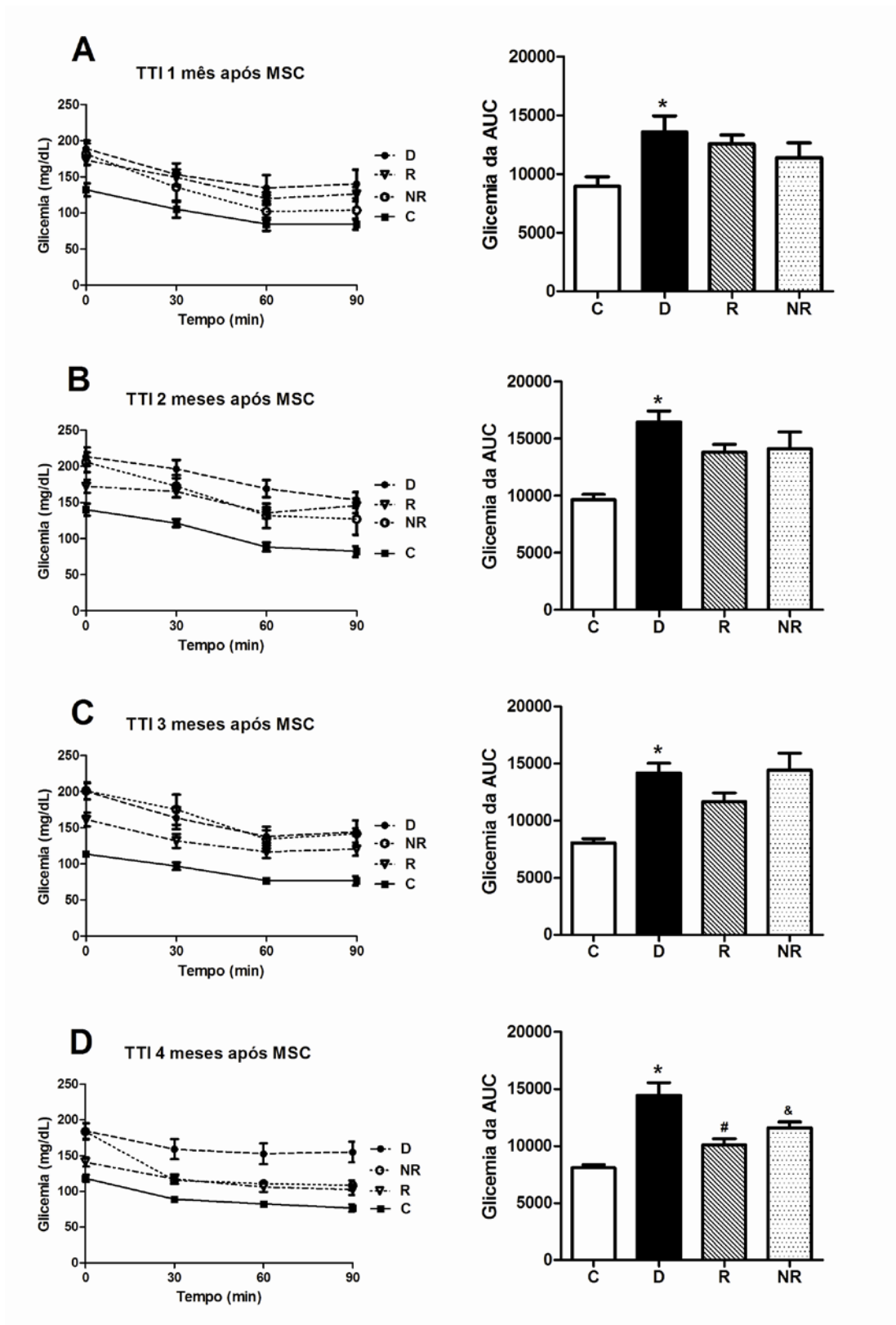


Figura 15. Teste de tolerância a insulina (TTI) e área sob a curva (AUC) do TTI 1, 2, 3 e 4 meses após 4 infusões de MSC. Valores estão representados como média \pm EPM, $n=10-13$ camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * $p < 0,05$, (C) vs. (D); # $p < 0,05$, (R) vs. (D); & $p < 0,05$, (D) vs. (NR).

4.6 Análise morfométrica do pâncreas

Não houve diferença significativa na área total da ilhota e na porcentagem de células β dos animais diabéticos comparado ao grupo controle, e respondedores e não respondedores comparados ao grupo diabético (Fig. 16 e 17A e B).

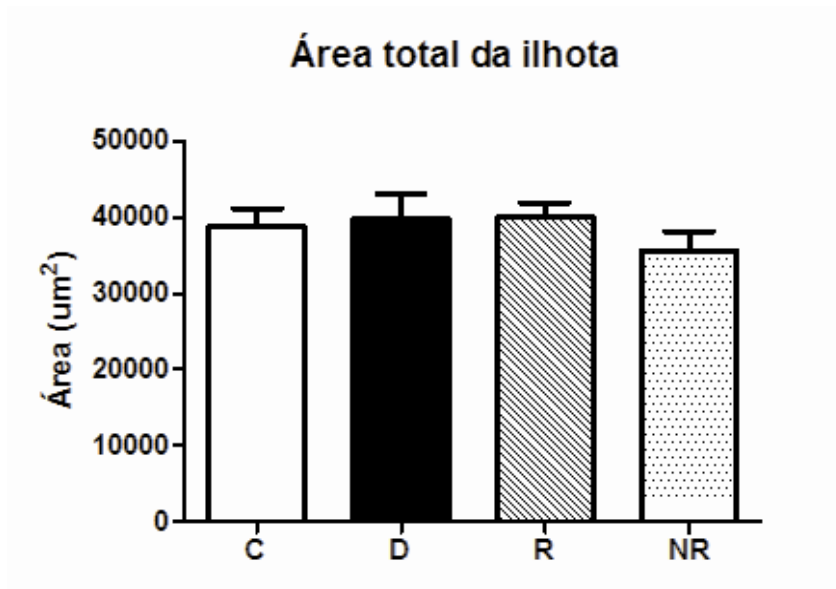


Figura 16. Área total da ilhota (μm^2) pancreática. Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR).

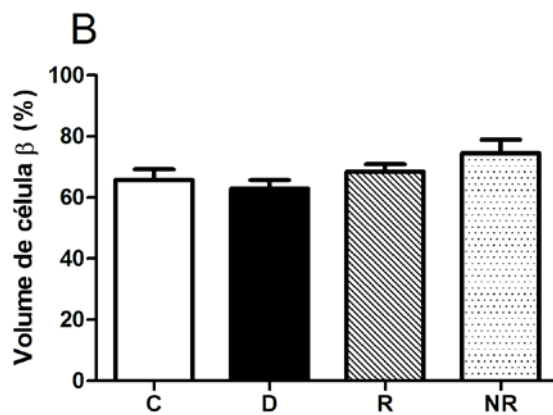
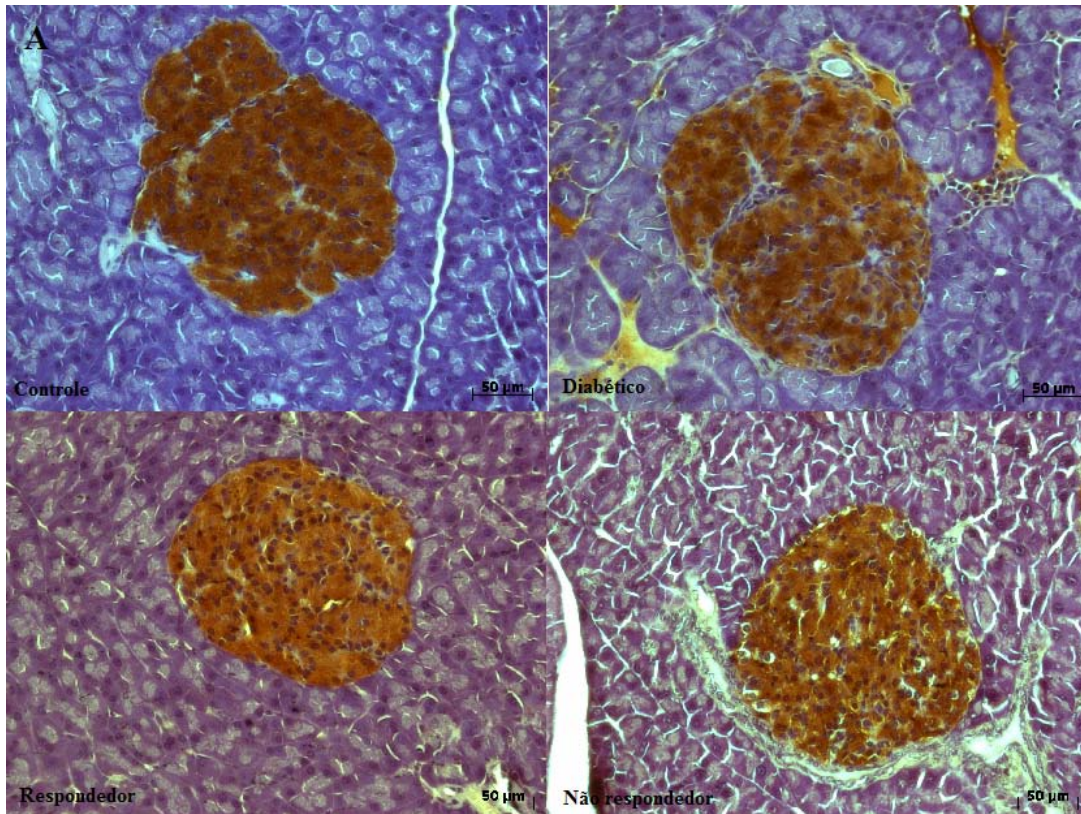


Figura 17. Análise morfométrica do pâncreas por imunohistoquímica com marcação para insulina. Imagem representativa das ilhotas pancreáticas dos grupos controle, diabético, respondedor e não respondedor (aumento 200x) (A). Volume relativo de célula β (%) na s ilhotas pancreáticas (B). Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR).

O volume relativo das células β diminuiu significativamente ($p < 0,05$) nos animais diabéticos e respondedores comparados com o grupo controle. Entretanto, os animais não respondedores apresentaram aumento significativo do volume de células β tanto em relação ao grupo diabético quanto ao grupo respondedor (Fig. 18A e B).

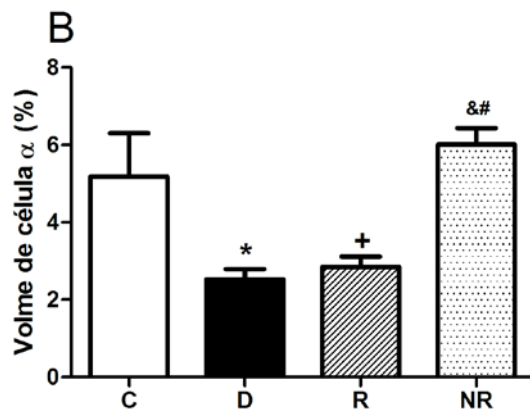
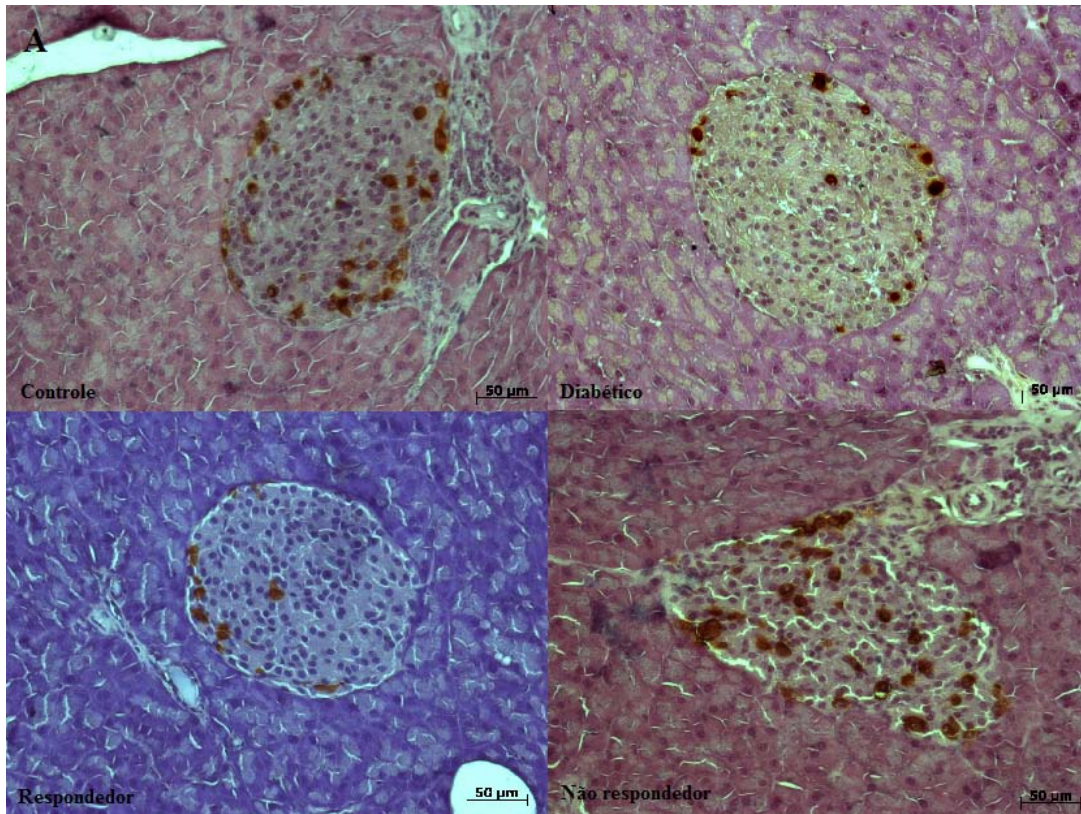


Figura 18. Análise morfométrica do pâncreas por imunohistoquímica com marcação para glucagon. Imagem representativa das ilhotas pancreáticas dos grupos controle, diabético, respondedor e não respondedor (aumento 200x) (A). Volume relativo de célula alfa (%) na ilhota pancreática (B). Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * $p < 0,05$, (C) vs. (D); + $p < 0,05$, (R) vs. (C); &# $p < 0,05$, (NR) vs. (D), # $p < 0,05$ (NR) vs. (R).

4.7 Quantificação de apoptose e proliferação celular na ilhota

A apoptose nas células das ilhotas dos animais diabéticos aumentou significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Já, os animais respondedores apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) da apoptose nas ilhotas comparados com o

grupo diabético. Entretanto, a apoptose celular nas ilhotas dos animais não respondedores aumentou significativamente em relação aos 3 grupos (controle, diabético e respondedores) (Fig. 19 A e B).

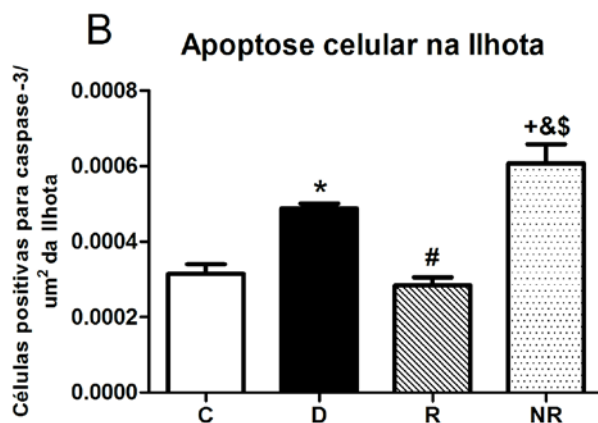
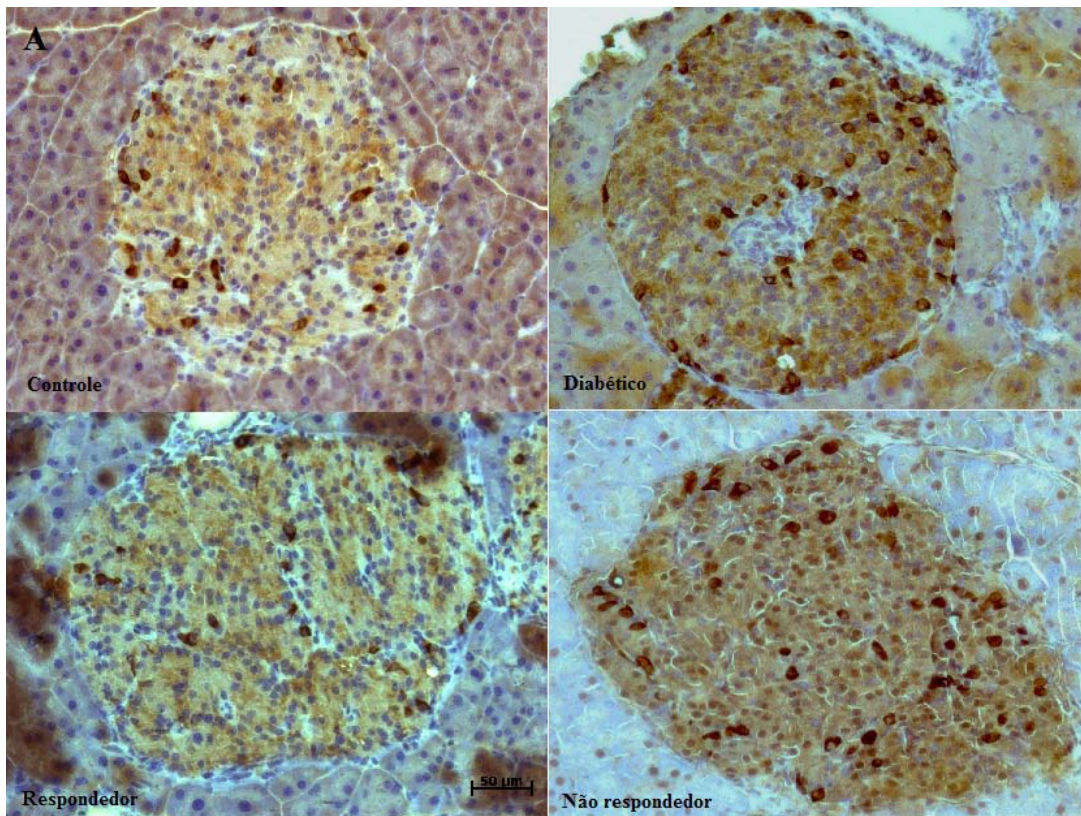


Figura 19. Análise morfométrica do pâncreas por imunohistoquímica com marcação para caspase-3. Imagem representativa das ilhotas pancreáticas dos grupos controle, diabético, respondedor e não respondedor (aumento 200x) (A). Apoptose celular na ilhota pancreática (células positiva para caspase-3/um² da ilhota) (B). Valores estão representados como média \pm EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * p< 0,05, (C) vs. (D); # p<0,05, (R) vs. (D); + p<0,05, (NR) vs. (C); & p<0,05, (NR) vs. (D); \$ p<0,05, (NR) vs. (R).

A proliferação celular da ilhota nos animais diabéticos diminuiu significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa da proliferação celular na ilhota dos animais respondedores e não respondedores (Fig 20A e B).

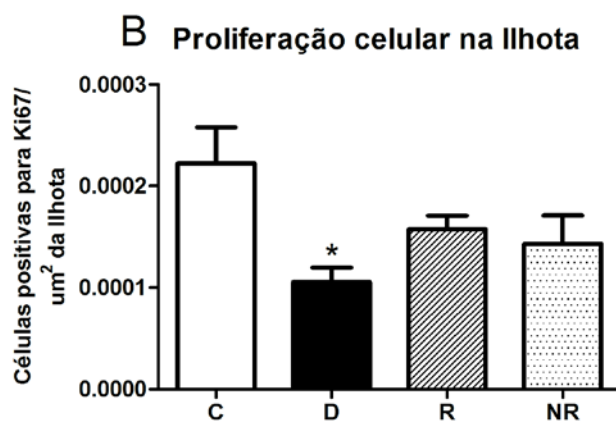
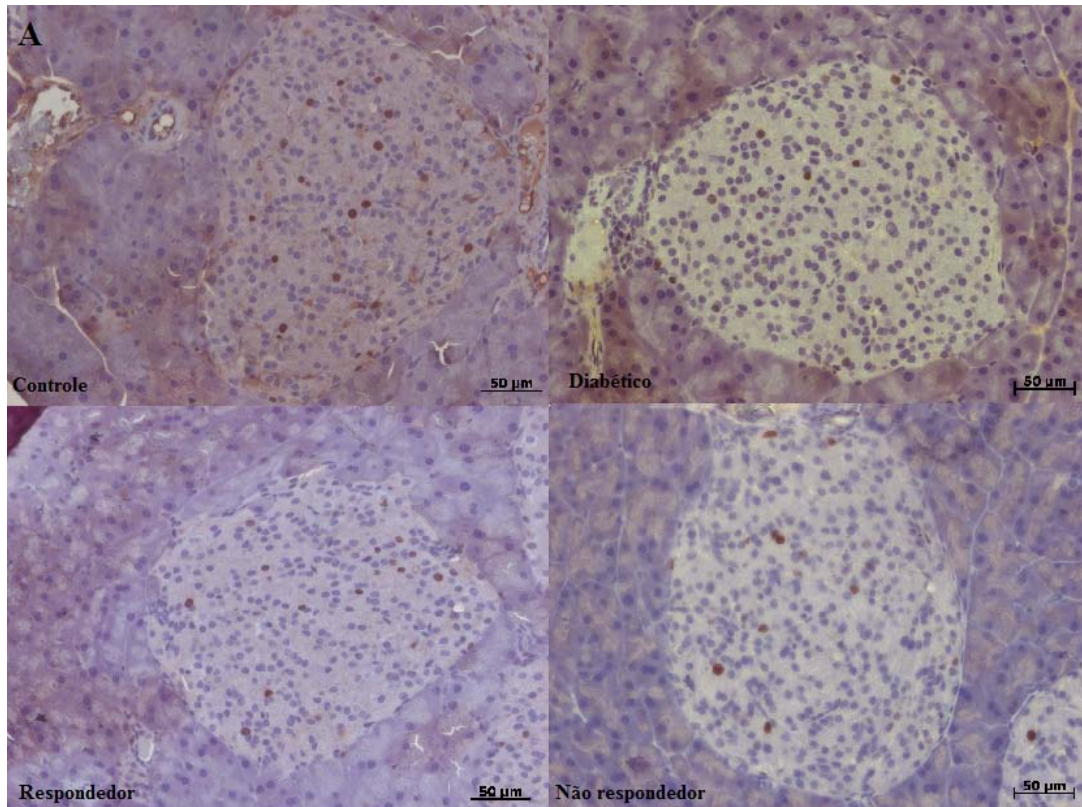


Figura 20. Análise morfométrica do pâncreas por imunohistoquímica com marcação para Ki-67. Imagem representativa das ilhotas pancreáticas dos grupos controle, diabético, respondedor e não respondedor (aumento 200x) (A). Proliferação celular na ilhota pancreática (células positiva para Ki-67/um² da ilhota) (B). Valores estão representados como média ± EPM, n=10-13 camundongos por grupo. Grupo controle (C), grupo diabético (D), grupo respondedor (R), grupo não respondedor (NR). * $p < 0,05$, (C) vs. (D).

4.8 Análises de correlação

Foi observada correlação diretamente proporcional das células positivas para caspase-3 na ilhota pancreática e glicemia de jejum ($r = + 0,56$; $p = 0,002$), AUC do TTG ($r = + 0,59$; $p = 0,001$) e AUC do TTI ($r = + 0,42$; $p = 0,03$). Além disso, houve correlação inversamente proporcional das células positivas para Ki67 na ilhota pancreática e glicemia de jejum ($r = - 0,39$; $p = 0,03$).

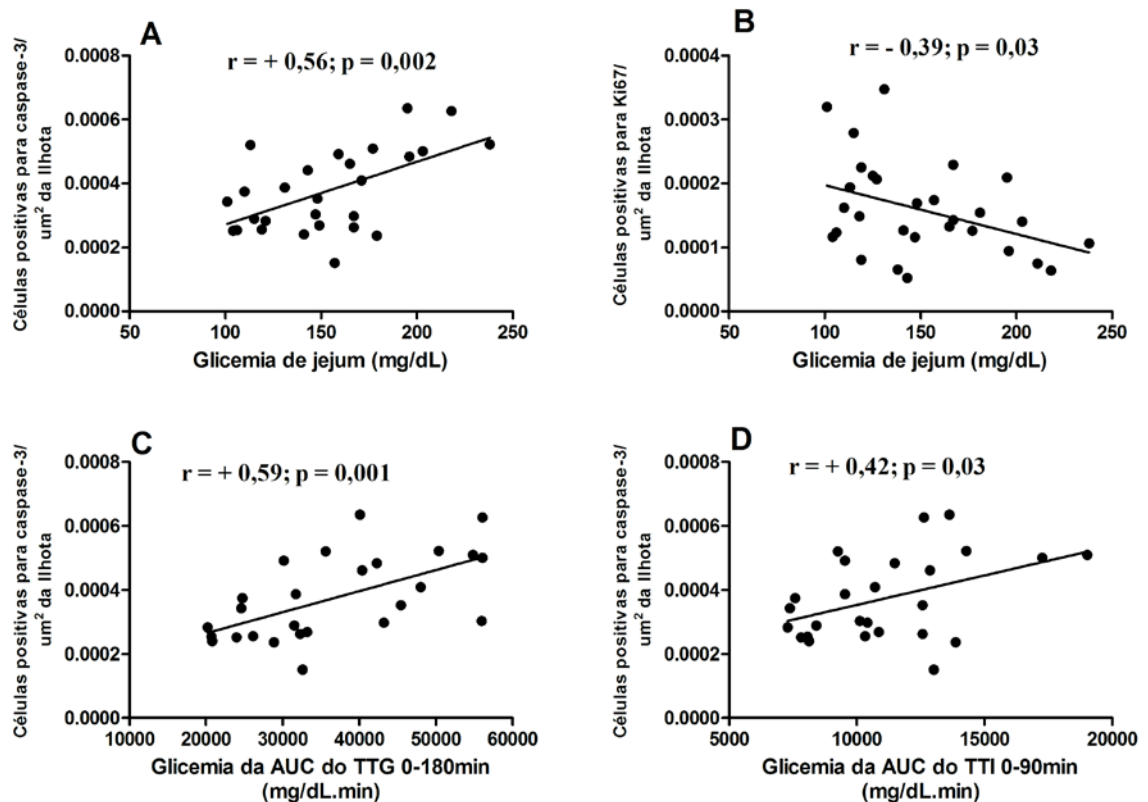


Figura 21. Correlação de glicemia de jejum com células positivas para caspase (A) e Ki67 (B) na ilhota pancreática; correlação da AUC (área sob à curva) do TTG (teste de tolerância à glicose) (C) e TTI (teste de tolerância à insulina) (D) 4 meses após a última infusão de MSCs e células positivas para caspase na ilhota pancreática.

5 DISCUSSÃO

A dieta hiperlipídica causou obesidade, aumento da ingestão calórica, hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e resistência à insulina nos animais estudados. Esses resultados estão de acordo com relatos prévios (DE SOUZA et al., 2005; ROSSMEISL et al., 2003). Segundo Lemke e colaboradores (2008), camundongos *Swiss* desenvolvem espontaneamente diabetes mellitus tipo 2 (DM2) com o aumento da idade e com o consumo de dieta hiperlipídica, desenvolvem fenótipo que se assemelha à síndrome metabólica humana, constituindo assim, modelo animal adequado para estudar os aspectos fisiopatológicos e mecanismos terapêuticos do DM2 (LEMKE et al., 2008).

A maior dificuldade enfrentada no desenho experimental deste estudo foi a escolha do modelo adequado para o propósito da pesquisa, já que ele deveria se aproximar, ao máximo, da fisiopatologia da doença humana, que é poligênica e associada não só à obesidade e resistência insulínica, mas também à disfunção das células beta pancreáticas. Entretanto, nenhum dos modelos animais existentes reflete totalmente a doença humana em toda sua complexidade, havendo vantagens e desvantagens a serem consideradas em cada um desses modelos, extensamente revisados na literatura (KARASAWA et al., 2009; LUO et al., 1998; MASIELLO, 2006; NUGENT; SMITH; JONES, 2008; OKAMOTO et al., 2008; REED et al., 2000; REES; ALCOLADO, 2005; ROSSMEISL et al., 2003; SRINIVASAN; RAMARAO, 2007; SRINIVASAN et al., 2005).

O DM2 é caracterizado por resistência à insulina nos tecidos alvos, principalmente músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, e disfunção das células beta pancreáticas. A obesidade está intimamente associada à resistência à insulina, e nessas condições, ocorre inicialmente expansão das células beta para aumentar a secreção de insulina, e se este mecanismo de compensação for inadequado, desenvolvem-se intolerância à glicose e DM2 (ASGHAR et al., 2006; BUTLER et al., 2003b).

A redução da massa de células beta pancreáticas é um dos principais fatores na patogênese do DM2, mas permanece controverso se essa redução é a única causa da hiperglicemia (BUTLER et al., 2003a; BUTLER et al., 2003b; DONATH et al., 2008; WEIR; BONNER-WEIR, 2004). Os camundongos tratados com dieta hiperlipídica durante 7 meses, não apresentaram diminuição significativa do volume relativo das células beta em comparação ao grupo controle. Sone e Kagawa (2005) também não observaram diminuição significativa

da porcentagem de células β na ilhota de camundongos (C57BL/6J) tratados durante 12 meses com dieta hiperlipídica em comparação ao grupo controle. Somente os camundongos (C57BL/6J) tratados com dieta hiperlipídica durante 4 meses apresentaram aumento significativo da porcentagem de células β na ilhota em relação ao grupo controle, demonstrando assim o mecanismo compensatório de aumento de células β frente à resistência à insulina (SONE; KAGAWA, 2005). Além disso, Lemke et al (2008) observaram que os camundongos *Swiss* apresentaram as características do estágio final do DM2 somente após 12 meses de idade, com progressiva caquexia, doença do pâncreas e fígado. Esses dados sugerem que o diabetes tipo 2, nesses modelos animais tratados com dieta hiperlipídica, inicia-se quando as células β não manifestam a adaptação compensatória da hipertrofia da ilhota, em resposta à resistência à insulina.

De acordo com Porte e Kahn (2001), a diminuição significativa das células β , provavelmente, não ocorre no início da hiperglicemia clínica do DM2, já que a diminuição de 25-50% das células beta é observada depois de muitos anos da doença em humanos (PORTE; KAHN, 2001). Embora, as pesquisas relatem que ocorre redução da massa relativa de células beta em pacientes diabéticos obesos em relação aos sujeitos controles obesos, a hiperglicemia clínica não deve ser atribuída somente à diminuição da massa de células β (BUTLER et al, 2003a).

A progressão do DM2 pode também estar relacionada à evolução da disfunção das células β . No estágio inicial da doença, denominada fase de adaptação ou compensada, ocorre obesidade e adaptação das células β à resistência à insulina, com hipertrofia e hiperplasia das células β , aumento da secreção de insulina estimulada pela glicose e manutenção da glicemia de jejum. Já na fase de descompensação, ocorre leve hiperglicemia, alterações de genes envolvidos no metabolismo de glicose, diminuição da secreção de insulina estimulada pela glicose, podendo ocorrer ou não alterações estruturais na ilhota. Na última fase da doença, descompensação severa, ocorre redução da massa de células β , hiperglicemia severa, mudanças estruturais nas ilhotas, apoptose, depósitos amiloides, acúmulo de lipídeos e fibrose (BONNER-WEIR, 2001; WEIR; BONNER-WEIR, 2004). Provavelmente, no presente estudo, os camundongos tratados com dieta hiperlipídica passaram à fase de descompensação do DM2, pois não apresentaram mudanças nas células β da ilhota, mas são hiperglicêmicos comparados ao grupo controle.

As terapias atuais para o DM2 incluem hipoglicemiantes orais e injeções de insulina ou incretinas (PIYA; TAHRANI; BARNETT, 2010). Esses tratamentos diminuem a hiperglicemia ou aumentam a resposta à insulina em tecidos alvos, entretanto aproximadamente 70% dos pacientes diabéticos não atingem as metas de controle metabólico estabelecidas pelas sociedades especializadas (HU et al., 2009).

A terapia regenerativa do pâncreas está sendo ativamente investigada para o tratamento do DM. Entretanto, as dificuldades encontradas com a utilização de outros métodos de reposição de células β , tais como transplantes de ilhotas, de pâncreas e de linhagens celulares produtoras de insulina, tornam a terapia regenerativa com células-tronco multi e pluripotentes atraente. A medula óssea (MO) é uma importante fonte de células-tronco hematopoiéticas, células-tronco mesenquimais (MSC), e células endoteliais e de fácil acesso (LEVESQUE et al., 2007). Estudos prévios demonstraram que o transplante de células derivadas da MO em animais diabéticos diminuiu a hiperglicemia e causou regeneração pancreática (CHEN et al., 2009; GAO et al., 2008; HASEGAWA et al., 2007; HESS et al., 2003; IANUS et al., 2003). Além disso, Ianus e colaboradores (2003) demonstraram que as células derivadas da MO podem se transdiferenciar em células beta.

As células-tronco mesenquimais (MSC) são células-tronco adultas multipotentes, de fácil isolamento e que podem ser expandidas em cultura, definidas como indiferenciadas, auto-renováveis, presentes na medula óssea e tecidos mesenquimais. As MSC podem se diferenciar em adipócitos, osteoblastos e condrócitos *in vitro* e *in vivo*. Comparada com as células derivadas da medula óssea, as MSC apresentam vantagens, como fácil disponibilidade, menos implicações éticas e baixa imunogenicidade (CAPLAN, 1994; PITTENGER et al., 1999; SI et al., 2011).

As MSC são capazes de escapar do reconhecimento imune, devido à falta de expressão de antígenos do complexo-II de histocompatibilidade (MHC classe II) e outros marcadores de superfície como CD11b, CD14, CD31, CD34 e CD45. Isso resulta na falha em iniciar a ativação das células CD4⁺. Além disso, as MSC possuem a capacidade de inibir a proliferação das células-T e prevenir o desenvolvimento das células-T citotóxicas, inibindo a resposta imune (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; KRAMPERA et al., 2003; MADEC et al., 2009).

Estudos prévios demonstraram que as MSC são capazes de reduzir a hiperglicemia em animais experimentais e humanos com diabetes tipo 1 e 2 (BHANSALI et al., 2009; EZQUER et al., 2012; EZQUER et al., 2008; EZQUER et al., 2011b; HAO et al., 2013; HO et al., 2012; JIANG et al., 2011; LEE et al., 2006; SI et al., 2012; ZHOU et al., 2009). Neste estudo, 72,2% dos camundongos diabéticos que receberam as múltiplas infusões de MSC, apresentaram diminuição significativa da glicemia de jejum, 4 meses após a última infusão de MSC. Além disso, os resultados obtidos nos TTG e TTI demonstram aumento da sensibilidade à insulina e diminuição da intolerância à glicose, nos animais transplantados.

A hiperglicemia de jejum no diabetes é resultado direto da disfunção que leva a aumento da liberação de glicose hepática (BARON et al., 1987). A resistência insulínica hepática ocorre em animais alimentados com dieta hiperlipídica (WIEDEMANN et al., 2013), e aumento da gliconeogênese nesse tecido, contribuindo para o aumento da glicemia de jejum (BOCK et al., 2007; RIZZA, 2010). Nos animais transplantados ocorreu diminuição significativa da glicemia de jejum nos animais respondedores comparados ao grupo diabético, 7 semanas após a última infusão de MSCs. Esse efeito das MSC na glicemia de jejum pode estar relacionado com a diminuição da resistência à insulina no fígado, já que a o aumento da sensibilidade à insulina e diminuição da intolerância à glicose nos testes de TTG e TTI só foram observados 16 semanas após a última infusão de MSC. Esses dados sugerem que as MSCs inicialmente aumentam a sensibilidade à insulina no fígado.

Estudos anteriores demonstraram que a diminuição da glicemia ocorre após 1 semana de transplante (EZQUER et al, 2008, 2011; SI et al, 2012; SORIA et al, 2000). Soria et al (2000) sugerem que a redução rápida da glicemia não está atribuída a regeneração da massa das células β porque a regeneração pancreática em camundongos é lenta, levando aproximadamente 6 a 8 semanas, como no caso de animais 60% pancreatectomizado (MARTIN et al., 1999). Além disso, 40% dos camundongos normoglicêmicos transplantados desenvolveram hiperglicemia 12 semanas após o transplante, indicando que esse processo é reversível (SORIA et al, 2000).

A manutenção da glicemia de jejum nos animais respondedores, após sua diminuição significativa, permaneceu até o final do experimento. Entretanto, Si et al (2012) demonstraram que o efeito benéfico de uma única infusão de MSC na diminuição da hiperglicemia em ratos diabéticos foi mantida por apenas um curto período de tempo, não excedendo 4 semanas (HO et al, 2012). Ho et al (2012) demonstraram que MSC diminuem

gradualmente a hiperglicemia de jejum depois de 3 doses de MSC. Contudo, a glicemia de jejum apenas atinge valores normais após 7 doses de transplante de MSC. É interessante resaltar a importância das múltiplas doses de MSC, já que apenas 1 infusão de MSC não consegue manter a diminuição da glicemia.

Além da diminuição da glicemia de jejum, a administração sistêmica de MSC nos camundongos com diabetes tipo 2 também diminuiu a hiperglicemia sob maciça carga de glicose (TTG), somente 4 meses após a última infusão de MSC. Ezquer et al (2008; 2011) demonstraram que a administração de 1 ou 2 doses de MSC em camundongos com diabetes tipo 1 não corrige a curva de tolerância à glicose anormal, mas reverte a hiperglicemia basal. Por outro lado, Si et al (2012) demonstraram temporariamente redução da resposta glicêmica a carga de glicose 4 semanas depois de 1 dose de MSC em camundongos diabético tipo 2 induzido por estreptozotocina (STZ) e dieta hiperlipídica (EZQUER et al, 2008; 2011; SI et al, 2012).

A resistência à insulina é fundamental na patogênese do diabetes tipo 2. Como demonstrado na fig. 7, o tratamento com MSC aumentou significativamente a sensibilidade à insulina 4 meses após a última infusão de MSCs. Si et al (2012) demonstraram que a infusão de MSC em ratos com diabetes tipo 2 resultou em aumento da expressão de GLUT4 e da fosforilação do receptor substrato 1 da insulina (IRS-1) e Akt (proteína kinase B) em tecidos alvos da insulina. Ho et al (2012) demonstraram que após múltiplos transplantes de MSC em camundongos diabéticos induzido por STZ, a glicemia pode se estabilizar na presença de baixas concentrações de insulina, sugerindo a possibilidade do aumento da sensibilidade à insulina. Esses dados sugerem que as MSCs podem aumentar a sensibilidade à insulina nos tecidos-alvos, com conseqüente diminuição da hiperglicemia.

A resistência à insulina está intimamente relacionada à obesidade e à ação de citocinas pró-inflamatórias (JIN; FLAVELL, 2013). E é possível que a ação das MSC na sensibilidade à insulina estejam associadas ao seu papel imunomodulador (HAO et al, 2013; HO et al, 2012; SI et al, 2012).

Ainda não está claro como múltiplas infusões de MSCs diminuem a hiperglicemia em animais com DM, visto que a transdiferenciação das MSCs em células pancreáticas é muito limitada ou inexistente (CHOI et al., 2003; EZQUER et al., 2008; LECHNER et al., 2004). Nesse contexto, alguns estudos sugerem que a liberação de citocinas

e fatores de crescimento, após a infusão de MSCs, é responsável pelo aumento da sensibilidade à insulina, sobrevivência de células β e proteção do pâncreas contra a ação de citocinas pró-inflamatórias (EZQUER et al., 2012; EZQUER et al., 2011a; HAO et al., 2013; JIANG et al., 2011; PARK et al., 2010; YEUNG et al., 2012). De acordo com Chen e colaboradores (2009), o transplante de células derivadas da medula-óssea em camundongos diabéticos induzidos por obesidade, diminuiu a hiperglicemia, provavelmente devido à melhora do perfil de citocinas pró-inflamatórias (CHEN et al., 2009). Ezquer e colaboradores (2012) também observaram diminuição da hiperglicemia e da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-18, TNF- α , MCP1) no pâncreas de camundongos com DM1, após a infusão de MSCs. Esses dados sugerem que as MSCs podem aumentar a sensibilidade da ação à insulina, diminuindo a hiperglicemia devido à secreção de citocinas.

Para avaliar a influência do tratamento das MSCs no pâncreas de camundongos diabéticos induzidos por dieta hiperlipídica, foi realizada a análise histopatológica do pâncreas. Não foram observadas alterações na área total da ilhota pancreática, volume de células β e insulinemia nos animais que receberam as infusões de MSCs (respondedores e não respondedores). Entretanto, foi demonstrado que em camundongos diabéticos tratados com MSC-humana aumentaram o número de ilhotas pancreáticas e células produtoras de insulina (LEE et al, 2006). Além disso, em camundongos diabéticos induzidos por STZ transplantados com MSC derivadas da medula-óssea ocorreu reparo das ilhotas pancreáticas (DINARVAND; HASHEMI; SOLEIMANI, 2010). Em adição, camundongos diabéticos induzidos por STZ transplantados com células da medula-óssea também apresentaram aumento da ilhota pancreática (HASEGAWA et al., 2007). Nossos dados sugerem que a diminuição da hiperglicemia em animais respondedores, após as infusões de MSCs, pode estar relacionada à diminuição da resistência à insulina, melhor do que aumento do volume de células pancreáticas e secreção de insulina.

As células α da ilhota, responsáveis pela secreção de glucagon, também foram investigadas, devido à importância do glucagon na homeostasia da glicose. O glucagon é secretado pelas células α da ilhota, em resposta aos nutrientes das refeições, administração de aminoácidos, ação do sistema nervoso autônomo e hipoglicemia (BURCELIN; KNAUF; CANI, 2008). Estudo recente defende a hipótese de que a insulina, principal produto secretório das células β , é responsável por regular reciprocamente a secreção de glucagon pelas células α em humanos (CRYER, 2012). No DM2 a hiperglucagonemia se deve à

disfunção das células β e α , resultado da secreção deficiente de insulina, devido à reduzida massa de célula β funcional (D'ALESSIO, 2011; EHSES et al., 2009). A hipergliconemia aumenta a gliconeogênese no fígado, aumentando principalmente a glicemia de jejum (BURCELIN; KNAUF; CANI, 2008; CRYER, 2012).

Na literatura, os estudos realizados com modelos animais de diabetes e células α são contraditórios. Li e colaboradores (2000) observaram expansão das células β após significativa perda das células β na ilhota pancreática de camundongos diabéticos tipo 1 induzido por STZ (LI; KARLSSON; SANDLER, 2000). Fraulob e colaboradores (2010) observaram aumento tanto das células α , quanto das células β nas ilhotas pancreáticas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica durante 16 semanas (FRAULOB et al., 2010). Schwasinger-Schmidt e colaboradores (2013) observaram diminuição significativa de intensidade em pixels da imunocoloração de glucagon dentro da ilhota de ratos diabéticos (SCHWASINGER-SCHMIDT et al., 2013). Já em estudo feito em mulheres diabéticas tipo 2, os autores observaram diminuição da massa de células β , mas isso não acompanhou aumento da massa de célula α (HENQUIN; RAHIER, 2011). Em estudo recente, Meier e colaboradores (2011) demonstraram que a redução da massa de células β , também não foi acompanhada por mudanças na massa de células α em camundongos tratados com STZ, e que a regulação intrailhota da insulina na função das células α é mais importante do que a expansão da massa de células α (MEIER et al., 2011).

No presente estudo, os animais diabéticos tipo 2 induzidos por dieta hiperlipídica não apresentaram diminuição significativa do volume de células β , entretanto diminuíram significativamente o volume de células α . Esse resultado foi inesperado, pois muitos estudos associam aumento das células α , e conseqüentemente aumento da secreção de glucagon e hiperglicemia de jejum (BURCELIN; KNAUF; CANI, 2008; CRYER, 2012; D'ALESSIO, 2011; EHSES et al., 2009).

Estudos recentes sugerem que no diabetes pode ocorrer aumento da proliferação das células α e posterior transdiferenciação em células β (CHUNG et al., 2010; CHUNG; LEVINE, 2010; THOREL; HERRERA, 2010). Chung e colaboradores (2010) observaram aumento da replicação das células α e diferenciação em células β em animais diabéticos induzidos por aloxana, combinado com ligação do ducto pancreático. Thorel e colaboradores (2010) defendem a hipótese de que a expressão de fatores de transcrição nas células α , como PDX -1, Nkx6.1 ou Pax4 podem regular ou contribuir para a

transdiferenciação das células α em células β , após significativa perda de células β em camundongos. Portanto, é possível considerar que nos animais diabéticos e respondedores, a diminuição do volume de células α possa estar associada à transdiferenciação das células α em células β .

Alguns estudos sugerem que, uma nova estratégia terapêutica para o DM2 pode ter como alvo as células α e o glucagon, pois a diminuição do glucagon no DM2 está associada à diminuição de glicemia de jejum (BURCELIN; KNAUF; CANI, 2008; CRYER, 2012; D'ALESSIO, 2011; GAISANO; MACDONALD; VRANIC, 2012). Entretanto, neste estudo, observou-se redução do volume de células α nos animais diabéticos. Nos animais respondedores também ocorreu diminuição do volume de células α em relação ao grupo controle, mas a diminuição da hiperglicemia de jejum nesses animais pode estar relacionada ao aumento da sensibilidade à insulina, como discutido anteriormente. Curiosamente, os animais não respondedores apresentaram aumento significativo do volume de células α em relação aos grupos, diabético e respondedores. O aumento do volume de células α e possível aumento da secreção de glucagon podem estar relacionados à manutenção da hiperglicemia de jejum nesses animais.

Está descrito na literatura que as MSCs secretam citocinas anti-inflamatórias e inibem a expressão de citocinas pró-inflamatórias pelas células imunes (RASMUSSEN, 2006). Além disso, as MSCs são capazes de produzir fatores anti-apoptóticos e mitogênicos, entre eles, EGF (*epidermal growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) e, bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (CAPLAN; DENNIS, 2006; PHINNEY, 2007), sugerindo efeito trófico das MSCs e possíveis modificações no microambiente do órgão lesado.

Nesse contexto, avaliamos os possíveis efeitos das MSCs na apoptose e proliferação das células da ilhota. Primeiramente, observamos que ocorreu aumento da apoptose e diminuição da proliferação das células da ilhota nos animais diabéticos comparados ao grupo controle. Esses resultados estão de acordo com Sone e Kagawa (2005) que também observaram, em camundongos diabéticos tratados durante 12 meses com dieta hiperlipídica, aumento da apoptose das células β e diminuição da proliferação das células da ilhota.

O aumento da apoptose das células no DM2 tem sido comprovado na literatura em animais e humanos. Butler e colaboradores (2003) estudaram o pâncreas de autópsias de humanos com DM2 e observaram aumento da apoptose das células. Além disso, esses autores também observaram aumento da apoptose em camundongos diabéticos (BUTLER et al, 2003b). Ratos diabéticos induzidos por STZ também apresentam aumento da apoptose das células da ilhota (SIMSEK et al., 2012). É evidente que um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia do DM2 é a apoptose das células da ilhota, principalmente das células β (YONEDA et al., 2013).

Observou-se correlação positiva entre apoptose das células da ilhota e glicemia de jejum e AUC do TTG e TTI 4 meses após a última infusão de MSC, e correlação negativa entre proliferação das células da ilhota e glicemia de jejum. Donath e colaboradores (1999) testaram a hipótese da glicotoxicidade nas ilhotas de camundongos *in vitro*, e observaram que altas concentrações de glicose resultaram em aumento da fragmentação do DNA dose-dependente das células β , entretanto altas concentrações de glicose não induziram fragmentação do DNA das células β de ratos (DONATH et al., 1999). Estudo feito por Tanabe e colaboradores (2011) demonstrou que o tratamento de palmitato e concomitante aumento da glicose em ilhotas primárias isoladas de camundongo causou aumento da apoptose das células β (TANABE et al., 2011). Entretanto, no presente estudo foi possível observar correlação da hiperglicemia e aumento da apoptose nas células totais da ilhota, e não somente nas células β da ilhota. Apesar disso, esses dados sugerem que a hiperglicemia pode contribuir para o aumento da apoptose e diminuição da proliferação na ilhota pancreática.

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo que requer gasto de energia e envolve mudanças morfológicas incluindo brotamento da membrana, encolhimento celular e condensação da cromatina. Apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento, envelhecimento e em várias doenças. A cascata apoptótica inclui vários eventos intracelulares, assim como o desequilíbrio metabólico, modificações no ciclo celular ou dano no DNA, e fatores extracelulares como ativação de receptores relacionados à morte celular (receptores Fas e TNF- α). Além disso, altas concentrações de Ca^{2+} podem induzir enzimas apoptóticas, assim como as cisteínas proteases, também chamadas de caspases (especialmente caspase -3, -8 e -9). Apoptose das células β no DM é dependente da via de caspase-3 (BIARNES et al., 2002; CNOP et al., 2005; CRIDDLE et al., 2007; DONATH et al., 2003; ZEISS, 2003).

Nos animais transplantados ocorreu diminuição da apoptose das células da ilhota nos animais respondedores. É proposto na literatura que as MSCs exercem efeitos citoprotetores, protegendo as ilhotas das citocinas pró-inflamatórias e exercendo efeito anti-apoptótico. Yanai e colaboradores (2013) demonstraram o efeito anti-apoptótico das MSCs com a diminuição da expressão gênica de caspase-3 em co-cultura de MSCs com ilhota em comparação com a ilhota sozinha (YANAI et al., 2013). Além disso, Yeung e colaboradores (2012) realizaram estudo *in vitro* com células β humanas e observaram que as MSCs previnem a apoptose das células humanas na presença de citocinas pró-inflamatórias, concluindo que os fatores citoprotetores que exerceram efeito benéfico na ilhota foram IL-6, HGF, VEGF e MMP2 (YEUNG et al., 2012). A IL-6 previne o prejuízo funcional de IFN- γ , TNF- α , e IL-1 β na ilhota (CHOI et al., 2004). Já, o HGF pode regular a secreção de insulina (GONZALEZ-PERTUSA et al., 2010; PARK et al., 2010).

A proliferação das células β em humanos está aumentada nos 2 primeiros anos de vida e diminui rapidamente depois disso (MEIER et al., 2008). Entretanto, no adulto em condições de resistência à insulina, gravidez e obesidade, as células β apresentam sua capacidade proliferativa (DHAWAN; GEORGIA; BHUSHAN, 2007; SORENSON; BRELJE, 1997). Além disso, Willcox e colaboradores (2010) demonstraram aumento da proliferação das células da ilhota no início do desenvolvimento do DM1 em humanos e esse efeito pode estar associado à inflamação da ilhota nesses pacientes (WILLCOX et al., 2010). Em ratos com resistência à insulina induzida por dexametasona, também ocorre aumento da proliferação das células β , com o subsequente aumento da massa de células β (RAFACHO et al., 2009). Quando as células β falham na manifestação compensatória da proliferação da ilhota, instala-se o DM.

Para avaliar a proliferação das células da ilhota utilizamos o marcador Ki67. Ele é um marcador nuclear muito utilizado no estudo da divisão celular de tecido fixado, e está presente em quase todas as fases do ciclo celular, e somente diminui sua expressão antes das células reiniciarem a fase G0 (WINKING; GERDES; TRAUT, 2004). Observamos diminuição significativa da imunomarcagem de Ki67 nas células da ilhota dos animais diabéticos, entretanto os animais que receberam as infusões de MSCs mantiveram a capacidade proliferativa da ilhota, porque não apresentaram mudanças significativas em relação ao grupo controle. Sone e Kagawa (2005) observaram diminuição da proliferação das

células β em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e sugerem que essa proliferação insuficiente das células β ocorre na fase inicial do DM2.

A manutenção da proliferação das células β nos animais que receberam as infusões de MSCs (respondedores e não respondedores) também pode ser atribuída aos efeitos citoprotetores das MSCs. Yanai e colaboradores (2013) também demonstraram que as MSCs apresentam capacidade proliferativa após observarem aumento da expressão de Ki67 nas células da ilhota co-cultivas com MSCs. Além disso, Ezquer e colaboradores (2012) observaram aumento das concentrações pancreáticas e plasmáticas de EGF (*epidermal growth factor*) após a administração das MSCs em camundongos com DM1. O EGF aumenta a proliferação e diferenciação das células β (SUAREZ-PINZON et al., 2005). Nossos dados sugerem que as MSCs diminuíram a apoptose e mantiveram a proliferação nas células da ilhota, e esse efeito pode estar relacionado à liberação de citocinas e fatores de crescimento citoprotetores.

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que múltiplas infusões de MSCs podem diminuir a glicemia de jejum e a apoptose nas ilhotas pancreáticas e aumentar a sensibilidade à insulina de animais diabéticos induzidos por dieta hiperlipídica.

7 TENTATIVAS DE DOSAGEM DE CITOCINAS NO HOMOGENEIZADO DO PÂNCREAS E NO SORO.

7.1 METODOLOGIA

7.1.1 Dosagem de citocinas no homogeneizado do pâncreas e no soro

Após decapitação dos animais, porções do pâncreas foram coletados, pesados e armazenados com 700 μ L de inibidor de protease (Roche) a -20°C . Para a obtenção do homogeneizado pancreático, pâncreas com inibidor de protease foi descongelado, triturado com auxílio do politron (Brinkman) e centrifugado à 2000rpm durante 10min. O sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem das citocinas IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e IL-6 por ELIZA seguindo as instruções do fabricante (Kits R&D System). Além do método de ELIZA, tentamos também a dosagem das citocinas no soro e homogeneizado pancreático pelo Kit CBA (*cytometric beads array*) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD). Esse Kit quantifica na mesma amostra 7 citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-10). Sete populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL3 do citômetro de fluxo FACScalibur (BD). As populações de *beads* foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência. No CBA, as *beads* de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio "em sanduíche". Os tubos para aquisição foram preparados com: 50 μ L de amostra, 50 μ L da mistura de *beads* e 50 μ L do reagente de detecção Th1/Th2 PE (Mouse Th1/Th2 PE Detection Reagent/1 vial, 4mL). O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogeneizados e incubados por três horas, em temperatura ambiente, no escuro. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software CellQuest (BD).

7.2 RESULTADOS

7.2.1 Dosagem de citocinas no homogeneizado do pâncreas pelo método de ELISA.

Não foi possível utilizar os resultados das concentrações de citocinas pelo método de ELISA, devido ao grande desvio padrão apresentado pelas amostras no mesmo grupo de animais, e baixa sensibilidade do kit. Nas figuras 22 e 23 é possível observar os valores das concentrações de citocinas no homogeneizado do pâncreas em cada grupo estudado.

IL-1 β					IFN- γ				
	C	D	R	NR	C	D	R	NR	
	792,56	270,10	392,43	81,67	92,15	99,10	98,62	21,33	
	1003,46	1296,34		9,35	68,75	43,01		67,36	
	699,30	144,59		52,16	14,50	52,57		47,43	
	582,33	666,19		707,73	43,93	30,00			
	568,56	521,46			104,22	13,28			
	799,77	184,23				17,45			
		3274,63				65,46			
						204,13			
Média	741,00	908,22	392,43	212,73	64,71	65,63	98,62	45,37	
DP	162,26	1116,03		331,33	36,34	62,46		23,08	

TNF- α					IL-6				
	C	D	R	NR	C	D	R	NR	
	607,50	498,35	639,56	236,73	1527,50	5070,00	538,10	503,00	
	1370,38	161,88			293,33	719,57	402,94		
	536,85	52,86			33,75	384,62	860,83		
	395,11	74,07			755,56	204,74	986,47		
	363,36	2237,11			653,68	500,56	201,82		
					718,57	274,80			
					655,29	504,29			
					0,83	737,00			
					477,04	988,75			
						818,70			
Média	654,64	604,85	639,56	236,73	568,40	1020,30	598,03	503,00	
DP	412,48	929,81			458,83	1444,29	323,49		

Figura 22. Valores das concentrações de citocinas no homogeneizado do pâncreas (pg/g de tecido).

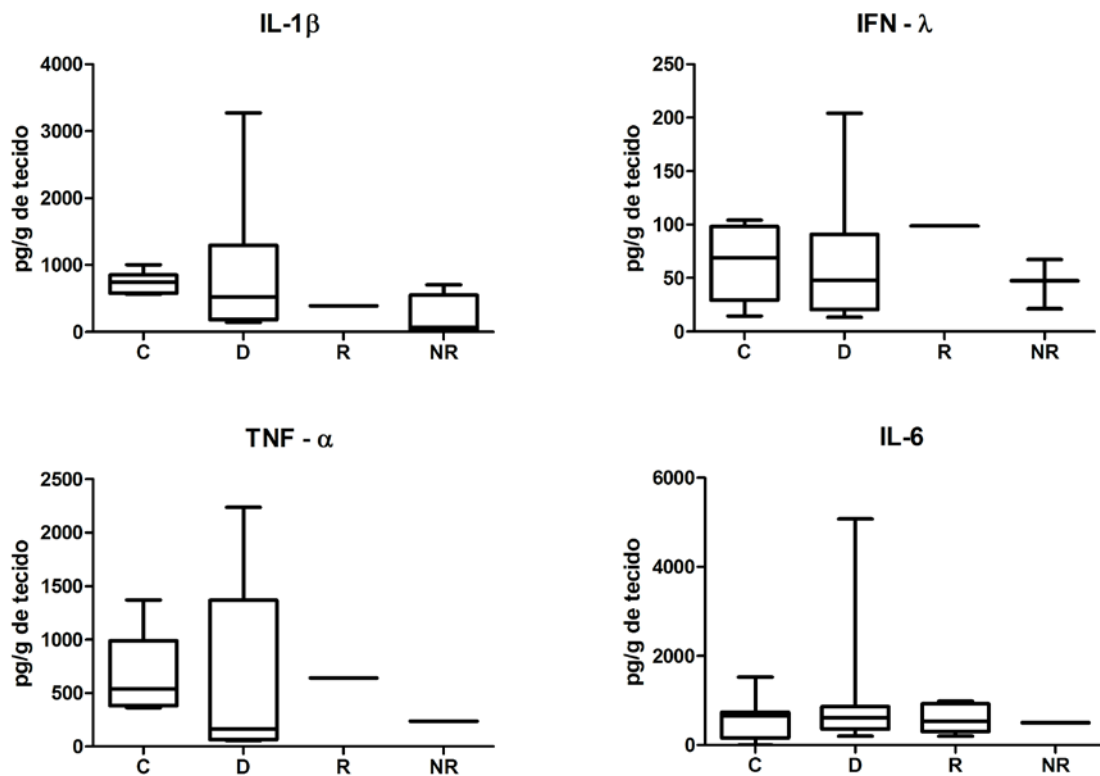


Figura 23. Concentração de citocinas (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e IL-6) no homogeneizado do pâncreas.

7.2.2 Dosagem de citocinas no homogeneizado do pâncreas e soro pelo método de CBA (*cytometric beads array*) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD).

Nós não conseguimos detectar as concentrações das citocinas no homogeneizado do pâncreas. Na verdade, esse kit é para dosagem das citocinas no soro, porém outros pesquisadores já utilizaram o mesmo kit para dosar as citocinas em homogeneizado de pulmão, lágrimas, saliva. Além disso, no soro nós conseguimos quantificar as concentrações de citocinas, entretanto ocorreu o mesmo problema do método de ELISA, desvio padrão muito grande no mesmo grupo de animais. As figuras 24 e 25 representam as concentrações de citocinas no soro de cada grupo estudado.

IL-2					IL-6					IFN				
C	D	R	NR		C	D	R	NR		C	D	R	NR	
	1,39	1,73	1,34	1,99		4,80	0,06	42,90	0,2		2,39	0,03	1,21	
	1,80	1,39	1,57			11,03	261,37	1,52	0,03		2,09	6,36	0,01	
	2,65	1,34	1,29			1,01	44,84	3,22			0,51	0,59		
	1,48	1,48	1,69			0,27	11,73	16,46			0,03	0,69		
	1,48	1,61	1,61			4,36	0,27	0,18			0,01	1,61		
	1,37	1,53	1,39			26,05	19,73	0,33			0,72	1,86		
	1,53	1,76				0,09	0,04	0,27						
	1,99	1,69					8,80							
		1,48					3,64							
		1,57					0,27							
		1,80					0,72							
		1,48					0,27							
		1,84					29,31							
	1,95													
Média	1,71	1,62	1,48	1,99	6,80	29,31	9,27	0,12		0,96	1,86	0,61		
DP	0,44	0,18	0,16	#DIV/0!	9,31	71,08	15,93	0,12		1,03	2,31	0,85		

TNF					IL-17A				
C	D	R	NR		C	D	R	NR	
	2,15	4,50	7,24	2,33		0,18	0,49	0,07	0,23
	2,80	4,93	5,82	3,88		0,46	0,09	0,14	0,11
	3,48	7,24	5,82	1,44		0,88	0,16	0,03	
	1,61	11,53	8,76			0,02	0,14	0,47	
	6,29	5,37	0,53			0,26	0,02	0,35	
	4,93	7,74	7,49			0,07	0,06		
	6,76	2,61				0,02	0,08		
	2,51	8,76				0,17	16,89		
	2,51	11,53				0,29	0,32		
	0,9	3,68				0,26	0,13		
		11,53					0,08		
		3,28					0,38		
		1,43					0,02		
		0,90					0,03		
		6,52					0,29		
		3,28							
		1,43							
Média	3,39	5,66	5,94	2,55	0,26	1,28	0,21	0,17	
DP	1,97	3,58	2,88	1,23	0,26	4,32	0,19	0,08	

Figura 24. Valores das concentrações de citocinas no soro (pg/mL).

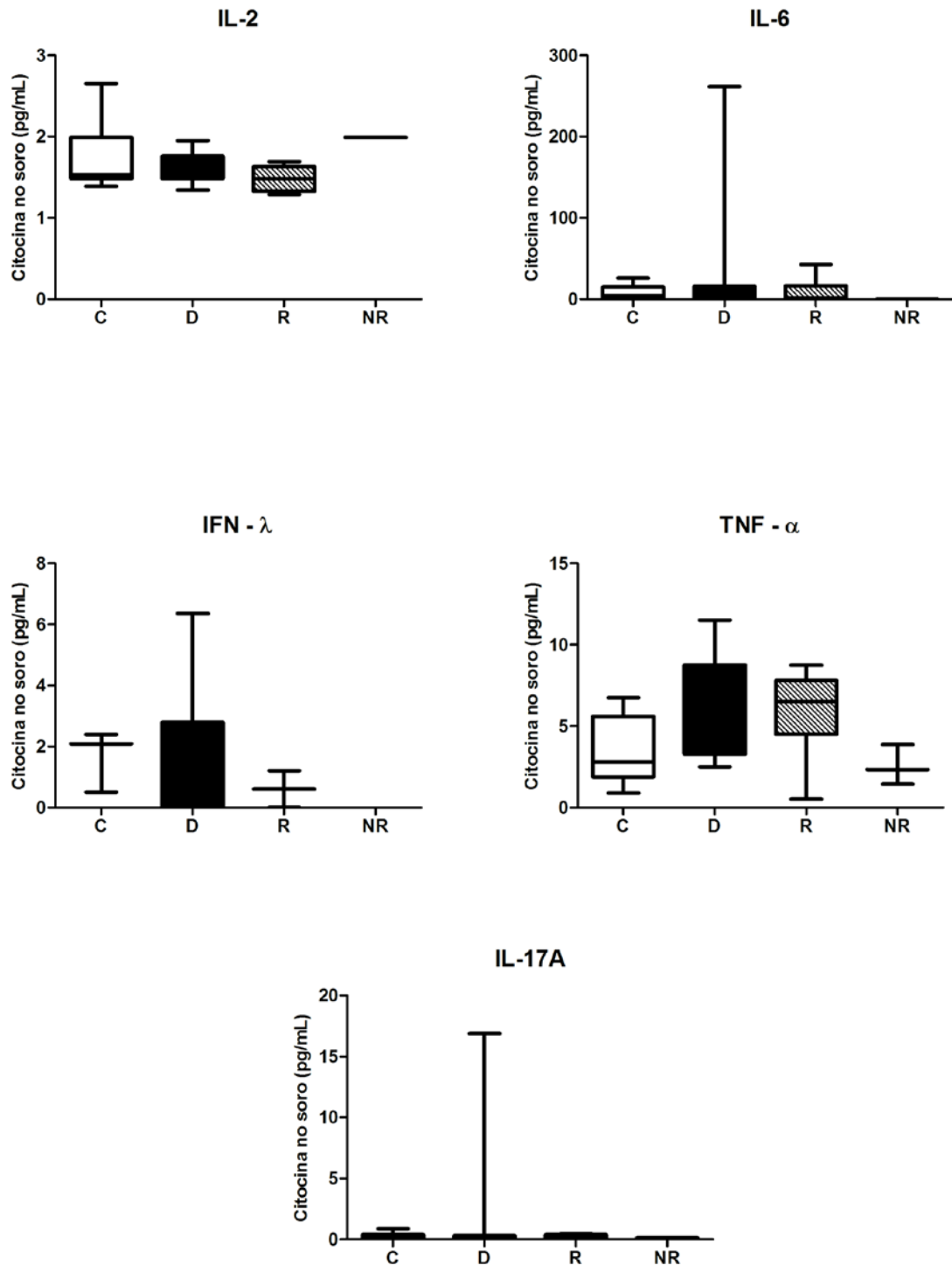


Figura 25. Concentração de citocinas no soro (IL-2, IL-6, INF- γ , TNF- α , IL-17A) (pg/mL).

8 REFERÊNCIAS

ABPI – The Association of the British Pharmaceutical Industry. Disponível em: http://www.abpischools.org.uk/page/modules/diabetes_16plus/diabetes2.cfm?coSiteNavigation_allTopic=1. Acesso: dezembro de 2013.

ABRAHAM, N. G. et al. Bone marrow stem cell transplant into intra-bone cavity prevents type 2 diabetes: role of heme oxygenase-adiponectin. **J Autoimmun**, v. 30, p. 128-135, 2008.

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, p. 1815-1822, 2005.

ALMIND, K.; DORIA, A.; KAHN, C. R. Putting the genes for type II diabetes on the map. **Nat Med**, v. 7, p. 277-279, 2001.

ARKAN, M. C. et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nat Med**, v. 11, p. 191-198, 2005.

ASGHAR, Z. et al. Insulin resistance causes increased beta-cell mass but defective glucose-stimulated insulin secretion in a murine model of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 49, p. 90-99, 2006.

AUGELLO, A. et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. **Eur J Immunol**, v. 35, p. 1482-1490, 2005.

BARON, A. D. et al. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. **Diabetes**, v. 36, p. 274-283, 1987.

BERNAL-MIZRACHI, E. et al. Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. **J Clin Invest**, v. 108, p. 1631-1638, 2001.

BHANSALI, A. et al. Efficacy of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus. **Stem Cells Dev**, v. 18, p. 1407-1416, 2009.

BIARNES, M. et al. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. **Diabetes**, v. 51, p. 66-72, 2002.

BOCK, G. et al. Contribution of hepatic and extrahepatic insulin resistance to the pathogenesis of impaired fasting glucose: role of increased rates of gluconeogenesis. **Diabetes**, v. 56, p. 1703-1711, 2007.

BONI-SCHNETZLER, M. et al. Increased interleukin (IL)-1beta messenger ribonucleic acid expression in beta -cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1beta in human islets by glucose and autostimulation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, p. 4065-4074, 2008.

BONNER-WEIR, S. beta-cell turnover: its assessment and implications. **Diabetes**, v. 50 Suppl 1, p. S20-24, 2001.

BOSI, P. L. et al. [Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in the urban population of 30 to 79 years of the city of Sao Carlos, Sao Paulo]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, p. 726-732, 2009.

BOULTON, A. J. et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 28, p. 956-962, 2005.

BOUMAZA, I. et al. Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia. **J Autoimmun**, v. 32, p. 33-42, (2009).

BURCELIN, R.; KNAUF, C.; CANI, P. D. Pancreatic alpha-cell dysfunction in diabetes. **Diabetes Metab**, v. 34 Suppl 2, p. S49-55, 2008.

BUTLER, A. E. et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, p. 102-110, 2003a.

BUTLER, A. E. et al. Hematopoietic stem cells derived from adult donors are not a source of pancreatic beta-cells in adult nondiabetic humans. **Diabetes**, v. 56, p. 1810-1816, 2007.

BUTLER, A. E. et al. Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. **Diabetes**, v. 52, p. 2304-2314, 2003b.

CAPLAN, A. I. The mesengenic process. **Clin Plast Surg**, v. 21, p. 429-435, 1994.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J Cell Biochem**, v. 98, p. 1076-1084, 2006.

CERF, M. E. Beta cell dynamics: beta cell replenishment, beta cell compensation and diabetes. **Endocrine**, v. 44, p. 303-311, 2013.

CHATURVEDI, N. The burden of diabetes and its complications: trends and implications for intervention. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 76 Suppl 1, p. S3-12, 2007.

CHEN, J. et al. Adoptive transfer of syngeneic bone marrow-derived cells in mice with obesity-induced diabetes: selenoorganic antioxidant ebselen restores stem cell competence. **Am J Pathol**, v. 174, p. 701-711, 2009.

CHOI, S. E. et al. IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. **Transpl Immunol**, v. 13, p. 43-53, 2004.

CHOI, S. J. et al. Peri-engraftment clinical abnormalities following allogeneic hematopoietic cell transplantation: a retrospective review of 216 patients. **Bone Marrow Transplant**, v. 32, p. 809-813, 2003.

CHUNG, C. H. et al. Pancreatic beta-cell neogenesis by direct conversion from mature alpha-cells. **Stem Cells**, v. 28, p. 1630-1638, 2010.

CHUNG, C. H.; LEVINE, F. Adult pancreatic alpha-cells: a new source of cells for beta-cell regeneration. **Rev Diabet Stud**, v. 7, p. 124-131, 2010.

CNOP, M. et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, p. S97-107, 2005.

COURI, C. E.; VOLTARELLI, J. C. Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus: a review of recent clinical trials. **Diabetol Metab Syndr**, v. 1, p. 19, 2009.

COX, N. J. Challenges in identifying genetic variation affecting susceptibility to type 2 diabetes: examples from studies of the calpain-10 gene. **Hum Mol Genet**, v. 10, p. 2301-2305, 2001.

CRIDDLE, D. N. et al. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? **Cell Death Differ**, v. 14, p. 1285-1294, 2007.

CRYER, P. E. Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. **Endocrinology**, v. 153, p. 1039-1048, 2012.

D'ALESSIO, D. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. **Diabetes Obes Metab**, v. 13 Suppl 1, p. 126-132, 2011.

DE SOUZA, C. T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, p. 4192-4199, 2005.

DHAWAN, S.; GEORGIA, S.; BHUSHAN, A. Formation and regeneration of the endocrine pancreas. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, p. 634-645, 2007.

DI NICOLA, M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, p. 3838-3843, 2002.

DINARVAND, P.; HASHEMI, S. M.; SOLEIMANI, M. Effect of transplantation of mesenchymal stem cells induced into early hepatic cells in streptozotocin-induced diabetic mice. **Biol Pharm Bull**, v. 33, p. 1212-1217, 2010.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.

DONATH, M. Y. et al. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. **Diabetes**, v. 48, p. 738-744, 1999.

DONATH, M. Y. et al. Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. **Cell Metab**, v. 17, p. 860-872, 2013.

DONATH, M. Y. et al. Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. **J Mol Med (Berl)**, v. 81, p. 455-470, 2003.

DONATH, M. Y. et al. Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy. **Diabetes Care**, v. 31 Suppl 2, p. S161-164, 2008.

DOR, Y. et al. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. **Nature**, v. 429, p. 41-46, 2004.

DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 368, p. 1696-1705, 2006.

EHSES, J. A. et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 56, p. 2356-2370, 2007.

EHSES, J. A. et al. Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes. **Biochem Soc Trans**, v. 36, p. 340-342, 2008.

EHSES, J. A. et al. Pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes: from alpha and beta cell compensation to dysfunction. **Arch Physiol Biochem**, v. 115, p. 240-247, 2009.

ENDE, N.; CHEN, R.; REDDI, A. S. Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetic mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 321, p. 168-171, 2004.

ESTRADA, E. J. et al. Combined treatment of intrapancreatic autologous bone marrow stem cells and hyperbaric oxygen in type 2 diabetes mellitus. **Cell Transplant**, v. 17, p. 1295-1304, 2008.

EZQUER, F. E. et al. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 14, p. 631-640, 2008.

EZQUER, F. et al. The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore TH1/TH2 balance and to modify the pancreatic microenvironment. **Stem Cells**, v. 30, p. 1664-1674, 2012.

EZQUER, F. et al. The antidiabetic effect of MSCs is not impaired by insulin prophylaxis and is not improved by a second dose of cells. **PLoS One**, v. 6, p. e16566, 2011a.

EZQUER, M. et al. Intravenous administration of multipotent stromal cells prevents the onset of non-alcoholic steatohepatitis in obese mice with metabolic syndrome. **J Hepatol**, v. 55, p. 1112-1120, 2011b.

FERREIRA MDEL, R.; LOMBARDO, Y. B.; CHICCO, A. beta-Cell adaptation/dysfunction in an animal model of dyslipidemia and insulin resistance induced by the chronic administration of a sucrose-rich diet. **Islets**, v. 2, p. 367-373, 2010.

FRAULOB, J. C. et al. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. **J Clin Biochem Nutr**, v. 46, p. 212-223, 2010.

GAISANO, H. Y.; MACDONALD, P. E.; VRANIC, M. Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes. **Front Physiol**, v. 3, p. 349, 2012.

GAO, X. et al. Transplantation of bone marrow derived cells promotes pancreatic islet repair in diabetic mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 371, p. 132-137, 2008.

GLENNIE, S. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. **Blood**, v. 105, p. 2821-2827, 2005.

GLOYN, A. L. et al. Glucokinase (GCK) and other susceptibility genes for beta-cell dysfunction: the candidate approach. **Biochem Soc Trans**, v. 36, p. 306-311, 2008.

GONZALEZ-PERTUSA, J. A. et al. Novel proapoptotic effect of hepatocyte growth factor: synergy with palmitate to cause pancreatic {beta}-cell apoptosis. **Endocrinology**, v. 151, p. 1487-1498, 2010.

GRUNDY, S. M. et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. **Circulation**, v. 100, p. 1134-1146, 1999.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, p. 367-377, 2008.

HAFFNER, S. M. Coronary heart disease in patients with diabetes. **N Engl J Med**, v. 342, p. 1040-1042, 2000.

HAO, H. et al. Multiple intravenous infusions of bone marrow mesenchymal stem cells reverse hyperglycemia in experimental type 2 diabetes rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 436, p. 418-423, 2013.

HASEGAWA, Y. et al. Bone marrow (BM) transplantation promotes beta-cell regeneration after acute injury through BM cell mobilization. **Endocrinology**, v. 148, p. 2006-2015, 2007.

HENQUIN, J. C.; RAHIER, J. Pancreatic alpha cell mass in European subjects with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 54, p. 1720-1725, 2011.

HERDER, C. et al. Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4). **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, p. S11-17, 2005.

HESS, D. et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. **Nat Biotechnol**, v. 21, p. 763-770, 2003.

HO, J. H. et al. Multiple intravenous transplantations of mesenchymal stem cells effectively restore long-term blood glucose homeostasis by hepatic engraftment and beta-cell differentiation in streptozocin-induced diabetic mice. **Cell Transplant**, v. 21, p. 997-1009, 2012.

HOLLAND, A. M. et al. Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of beta-cells in the adult pancreas. **Diabetes**, v. 54, p. 2586-2595, 2005.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, p. 860-867, 2006.

HU, D. et al. Prevalence and risk factors for type 2 diabetes mellitus in the Chinese adult population: the InterASIA Study. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 84, p. 288-295, 2009.

IANUS, A. et al. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. **J Clin Invest**, v. 111, p. 843-850, 2003.

JIANG, R. et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study. **Front Med**, v. 5, p. 94-100, 2011.

JIN, C.; FLAVELL, R. A. Innate sensors of pathogen and stress: linking inflammation to obesity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 132, p. 287-294, 2013.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, p. 840-846, 2006.

KARASAWA, H. et al. A novel model of type 2 diabetes mellitus based on obesity induced by high-fat diet in BDF1 mice. **Metabolism**, v. 58, p. 296-303, 2009.

KARIN, M.; DELHASE, M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. **Semin Immunol**, v. 12, p. 85-98, 2000.

KAWAMORI, D. et al. Growth factor signalling in the regulation of alpha-cell fate. **Diabetes Obes Metab**, v. 13 Suppl 1, p. 21-30, 2011.

KOJIMA, H. et al. Extrapaneatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 2458-2463, 2004.

KOLB, H.; MANDRUP-POULSEN, T. An immune origin of type 2 diabetes? **Diabetologia**, v. 48, p. 1038-1050, 2005.

KOTA, S. K. et al. Genetics of type 2 diabetes mellitus and other specific types of diabetes; its role in treatment modalities. **Diabetes Metab Syndr**, v. 6, p. 54-58, 2012.

KRAMPERA, M. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v. 101, p. 3722-3729, 2003.

LANZA, R. P.; CHICK, W. L. Transplantation of pancreatic islets. **Ann N Y Acad Sci**, v. 831, p. 323-331, 1997.

LARSEN, C. M. et al. [Interleukin-1 receptor antagonist-treatment of patients with type 2 diabetes]. **Ugeskr Laeger**, v. 169, p. 3868-3871, 2007.

LE BLANC, K. et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scand J Immunol**, v. 57, p. 11-20, 2003.

LE BLANC, K.; PITTENGER, M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. **Cytotherapy**, v. 7, p. 36-45, 2005.

LECHNER, A. et al. No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo. **Diabetes**, v. 53, p. 616-623, 2004.

LEE, R. H. et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 17438-17443, 2006.

LEMKE, L. B. et al. Obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus in Swiss-Webster mice associated with late-onset hepatocellular carcinoma. **J Endocrinol**, v. 199, p. 21-32, 2008.

LENZEN, S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. **Biochem Soc Trans**, v. 36, p. 343-347, 2008.

LEVESQUE, J. P. et al. Mobilization of bone marrow-derived progenitors. **Handb Exp Pharmacol**, v., p. 3-36, 2007.

LI, Z.; KARLSSON, F. A.; SANDLER, S. Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. **J Endocrinol**, v. 165, p. 93-99, 2000.

LIN, P. et al. Evaluation of stem cell differentiation in diabetic rats transplanted with bone marrow mesenchymal stem cells. **Transplant Proc**, v. 41, p. 1891-1893, 2009.

LOWETH, A. C. et al. Human islets of Langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1beta and Fas ligation. **Diabetes**, v. 47, p. 727-732, 1998.

LUO, J. et al. Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 47, p. 663-668, 1998.

MACCARIO, R. et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. **Haematologica**, v. 90, p. 516-525, 2005.

MADEC, A. M. et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. **Diabetologia**, v. 52, p. 1391-1399, 2009.

MAEDLER, K. Beta cells in type 2 diabetes - a crucial contribution to pathogenesis. **Diabetes Obes Metab**, v. 10, p. 408-420, 2008.

MAEDLER, K. et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **J Clin Invest**, v. 110, p. 851-860, 2002.

MARTIN, F. et al. Mechanisms of glucose hypersensitivity in beta-cells from normoglycemic, partially pancreatectomized mice. **Diabetes**, v. 48, p. 1954-1961, 1999.

MASIELLO, P. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 38, p. 873-893, 2006.

MATVEYENKO, A. V. et al. Successful versus failed adaptation to high-fat diet-induced insulin resistance: the role of IAPP-induced beta-cell endoplasmic reticulum stress. **Diabetes**, v. 58, p. 906-916, 2009.

MEIER, J. J. et al. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. **Diabetes**, v. 57, p. 1584-1594, 2008.

MEIER, J. J. et al. Diminished glucagon suppression after beta-cell reduction is due to impaired alpha-cell function rather than an expansion of alpha-cell mass. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 300, p. E717-723, 2011.

MESPLES, A. et al. Early immunotherapy using autologous adult stem cells reversed the effect of anti-pancreatic islets in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus: Preliminary results. **Med Sci Monit**, v. 19, p. 852-857, 2013.

MOLITCH, M. E. et al. Nephropathy in diabetes. **Diabetes Care**, v. 27 Suppl 1, p. S79-83, 2004.

MOONEY, R. A. et al. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. **J Biol Chem**, v. 276, p. 25889-25893, 2001.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, p. 193-205, 2008.

NOVOA, J. E. et al. Diabetes mellitus and autologous bone marrow derived progenitor cell transplant (A-BMDPCT): Cooperative international, Uruguay-Mexico. **Ther Apher Dial**, v. 13, p. A4, 2009.

NUGENT, D. A.; SMITH, D. M.; JONES, H. B. A review of islet of Langerhans degeneration in rodent models of type 2 diabetes. **Toxicol Pathol**, v. 36, p. 529-551, 2008.

OKAMOTO, T. et al. Characterization of STZ-Induced Type 2 Diabetes in Zucker Fatty Rats. **Exp Anim**, v. 57, p. 335-345, 2008.

PARK, K. S. et al. Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation. **Transplantation**, v. 89, p. 509-517, 2010.

PERREAULT, M.; MARETTE, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. **Nat Med**, v. 7, p. 1138-1143, 2001.

PHINNEY, D. G. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. **Cell Cycle**, v. 6, p. 2884-2889, 2007.

PICKUP, J. C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 813-823, 2004.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.

PIYA, M. K.; TAHRANI, A. A.; BARNETT, A. H. Emerging Treatment Options for Type 2 Diabetes. **Br J Clin Pharmacol**, v., p., 2010.

POITOUT, V.; ROBERTSON, R. P. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. **Endocr Rev**, v. 29, p. 351-366, 2008.

PORTE, D., JR.; KAHN, S. E. beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. **Diabetes**, v. 50 Suppl 1, p. S160-163, 2001.

RAFACHO, A. et al. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, p. E681-689, 2009.

RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Exp Cell Res**, v. 312, p. 2169-2179, 2006.

REED, M. J. et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism**, v. 49, p. 1390-1394, 2000.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabet Med**, v. 22, p. 359-370, 2005.

RHODES, C. J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? **Science**, v. 307, p. 380-384, 2005.

RIZZA, R. A. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. **Diabetes**, v. 59, p. 2697-2707, 2010.

ROCHE, E. et al. Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1). **J Biol Chem**, v. 272, p. 3091-3098, 1997.

RODER, M. E. et al. Disproportionately elevated proinsulin levels reflect the degree of impaired B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, p. 604-608, 1998.

ROSSMEISL, M. et al. Variation in type 2 diabetes--related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 52, p. 1958-1966, 2003.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **J Clin Invest**, v. 118, p. 2992-3002, 2008.

SCHWASINGER-SCHMIDT, T. et al. Long-term liraglutide treatment is associated with increased insulin content and secretion in beta-cells, and a loss of alpha-cells in ZDF rats. **Pharmacol Res**, v. 76, p. 58-66, 2013.

SI, Y. et al. Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: identification of a novel role in improving insulin sensitivity. **Diabetes**, v. 61, p. 1616-1625, 2012.

SI, Y. L. et al. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. **Ageing Res Rev**, v. 10, p. 93-103, 2011.

SIMSEK, N. et al. Effects of melatonin on islet neogenesis and beta cell apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats: an immunohistochemical study. **Domest Anim Endocrinol**, v. 43, p. 47-57, 2012.

SONE, H.; KAGAWA, Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. **Diabetologia**, v. 48, p. 58-67, 2005.

SORENSEN, R. L.; BRELJE, T. C. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. **Horm Metab Res**, v. 29, p. 301-307, 1997.

SORIA, B. et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. **Diabetes**, v. 49, p. 157-162, 2000.

SRINIVASAN, K. et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacol Res**, v. 52, p. 313-320, 2005.

SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. **Indian J Med Res**, v. 125, p. 451-472, 2007.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, v. 365, p. 1333-1346, 2005.

SUAREZ-PINZON, W. L. et al. Combination therapy with epidermal growth factor and gastrin increases beta-cell mass and reverses hyperglycemia in diabetic NOD mice. **Diabetes**, v. 54, p. 2596-2601, 2005.

TANABE, K. et al. Glucose and fatty acids synergize to promote B-cell apoptosis through activation of glycogen synthase kinase 3beta independent of JNK activation. **PLoS One**, v. 6, p. e18146, 2011.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, p. 85-96, 2006.

TESFAYE, S. et al. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. **Diabetologia**, v. 39, p. 1377-1384, 1996.

THOLE, A. A. et al. Progenitor cells and TNF-alpha involvement during morphological changes in pancreatic islets of obese mice. **Tissue Cell**, v. 44, p. 238-248, 2012.

THORAND, B. et al. Elevated levels of interleukin-18 predict the development of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Study, 1984-2002. **Diabetes**, v. 54, p. 2932-2938, 2005.

THOREL, F.; HERRERA, P. L. [Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells in diabetic mice]. **Med Sci (Paris)**, v. 26, p. 906-909, 2010.

URBAN, V. S. et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. **Stem Cells**, v. 26, p. 244-253, 2008.

VIÑA R. F. Et al. First report from Argentina of first three years follow up of autologous stem cells implant in diabetes type 2. **Cytotherapy**, v. II, p. 8-9, 2009.

VOLTARELLI, J. C. et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 297, p. 1568-1576, 2007.

WATKINS, P. The UKPDS. A model for gathering the evidence for the management of chronic diseases. UK Prospective Diabetes Study Group. **J R Coll Physicians Lond**, v. 32, p. 510-511, 1998.

WEIR, G. C.; BONNER-WEIR, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 3, p. S16-21, 2004.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest**, v. 115, p. 1111-1119, 2005.

WEXLER, S. A. et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. **Br J Haematol**, v. 121, p. 368-374, 2003.

WIEDEMANN, M. S. et al. Adipose tissue inflammation contributes to short-term high-fat diet-induced hepatic insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 305, p. E388-395, 2013.

WILLCOX, A. et al. Evidence of increased islet cell proliferation in patients with recent-onset type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 53, p. 2020-2028, 2010.

WILSON, B. C.; VITKIN, I. A.; MATTHEWS, D. L. The potential of biophotonic techniques in stem cell tracking and monitoring of tissue regeneration applied to cardiac stem cell therapy. **J Biophotonics**, v. 2, p. 669-681, 2009.

WINKING, H.; GERDES, J.; TRAUT, W. Expression of the proliferation marker Ki-67 during early mouse development. **Cytogenet Genome Res**, v. 105, p. 251-256, 2004.

YANAI, G. et al. Electrofusion of mesenchymal stem cells and islet cells for diabetes therapy: a rat model. **PLoS One**, v. 8, p. e64499, 2013.

YEUNG, T. Y. et al. Human mesenchymal stem cells protect human islets from pro-inflammatory cytokines. **PLoS One**, v. 7, p. e38189, 2012.

YONEDA, S. et al. Predominance of beta-cell neogenesis rather than replication in humans with an impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, p. 2053-2061, 2013.

ZEISS, C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. **Vet Pathol**, v. 40, p. 481-495, 2003.

ZHANG, J. et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. **Exp Neurol**, v. 195, p. 16-26, 2005.

ZHOU, H. et al. Mesenchymal stem cells transplantation mildly ameliorates experimental diabetic nephropathy in rats. **Chin Med J (Engl)**, v. 122, p. 2573-2579, 2009.

ZIPORI, D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. **Blood Cells Mol Dis**, v. 33, p. 211-215, 2004.