

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE TERAPIAS COM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

SIANE CAMPOS DE SOUZA

Salvador
2010

SIANE CAMPOS DE SOUZA

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE TERAPIAS COM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

Siane Campos de Souza

Tese de doutorado submetida à Pós-Graduação em biotecnologia em saúde e medicina investigativa, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), visando a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Orientador: Dr. Luis Antônio Rodrigues de Freitas

**Salvador
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Siane Campos

“Avaliação dos efeitos de terapias com células de medula óssea em modelo experimental de diabetes *mellitus* tipo 2”/ Siane Campos de Souza. Salvador, CPqGM - FIOCRUZ, 2010.

xvii, 115p.: il.

Orientadora: Milena Botelho Pereira Soares.

Co-orientador: Dr. Luis Antônio Rodrigues de Freitas.

Tese (Doutorado) – Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz – CPqGM, Fundação Oswaldo Cruz.

1. Diabetes tipo 2 2. NASH 3. Terapia celular I. Soares, Milena Botelho Pereira / Freitas, Luis Antônio Rodrigues de. II. Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz. III. Avaliação dos efeitos de terapias com células de medula óssea em modelo experimental de diabetes *mellitus* tipo 2

Ao meu marido, Rodolfo,
por transmitir determinação
e doçura em nossa caminhada.

À minha filha, Beatriz,
que demonstra a todo tempo
um encontro do Certo e do Bem.



Aos meus pais,
Edson e Yolanda,
por me ensinarem,
desde pequena, a importância
de ser ética.

Aos meus irmãos,
Savio e Suian,
pela eterna participação
na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por me apoiar sempre e nunca me deixar desistir.

À Dra Milena Soares e Dr Ricardo Ribeiro dos Santos pela oportunidade e orientação durante todo o tempo da elaboração desse trabalho.

À Dr. Luis Antônio Rodrigues de Freitas pela orientação durante todo o desenvolvimento da tese e Dr. Washinton Luis pela grande ajuda nas análises patológicas renais.

Ao CPqGM / FIOCRUZ pela excelente infra-estrutura disponibilizada para o desenvolvimento do trabalho.

À FAPESB pela concessão da bolsa de doutorado.

As alunas de iniciação científica, Alice Kiperstok e Ludmila Chaves, que foram importantíssimas durante todo o período de elaboração desse trabalho, além de se tornarem grandes amigas.

Ao amigo Ricardo Lima pela colaboração nos experimentos, pela troca de experiência e por se tornar juntamente com sua família, um grande amigo.

Aos colegas do LETI: todos os ICs, Vera e Roberta que administram muito bem a louca rotina do laboratório, Álvaro, Marcos, Carine, Sheilla, Renata, Matheus, Fernando, Cláudio e Juliana pela alegria no laboratório e ajuda no desenvolvimento deste trabalho e, em especial, Mara, Daniele e Flávia pelo apoio oferecido transformando anos de convivência em uma grande amizade e sociedade.

“A fórmula da minha felicidade: um sim, um não, uma linha reta, um objetivo.”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é uma disfunção metabólica que afeta milhões de pessoas em números crescentes em todo o mundo. É caracterizado pela resistência dos tecidos-alvo à insulina e/ou defeitos na sua secreção, acarretando uma hiperglicemia crônica, que pode gerar danos no sistema cardiovascular, nervoso, olhos, rins e fígado e representam um ônus para os sistemas de saúde. Doença de etiologia múltipla, o DM2 resulta da interação entre predisposição genética e fatores ambientais, destacando-se a obesidade. O tratamento do DM2 geralmente envolve mudanças de hábito e drogas anti-hiperglicemiantes ou hipoglicemiantes que podem acarretar efeitos colaterais. As recentes descobertas sobre a plasticidade e o potencial terapêutico das células-tronco de medula óssea indicam uma possível aplicação destas no tratamento do DM2 e suas complicações. Para investigar esse potencial, foi estabelecido um modelo de diabetes em camundongos C57Bl/6 através da administração de dieta hipergordurosa. Após o período de indução, os animais apresentavam obesidade, hiperglicemia, intolerância à glicose, proteinúria e esteato-hepatite não-alcoólica. Camundongos C57Bl/6 fêmeas não desenvolvem obesidade, hiperglicemia e DM2 quando submetidas à mesma dieta que os machos. Apenas os machos foram então tratados com células mononucleares de medula óssea e acompanhados durante seis meses. A terapia com células mononucleares de medula óssea não reduz o peso corpóreo dos animais obesos e diabéticos. Três e seis meses após a terapia, não foi observada redução da glicemia de jejum dos animais. Três meses após a terapia, observou-se redução da intolerância a glicose nos animais alimentados com dieta *high-fat*. Houve uma redução da fibrose perissinusoidal no fígado após 3 meses de terapia e esta diferença se manteve até 6 meses após a terapia.

Palavras-Chave: Diabetes mellitus tipo 2; célula-tronco; dieta hipergordurosa; terapia celular.

ABSTRACT

Type 2 diabetes *mellitus* (T2DM) is a metabolic disorder that affects millions of people and grows worldwide. It is characterized by insulin resistance in peripheral tissues and/or impaired insulin secretion, leading to chronic hyperglycemia associated with long-term consequences that include damage and dysfunction of the cardiovascular system, eyes, kidneys and nerves. T2DM is a multifactorial disease determined by genetic and environmental factors, especially obesity. The usual treatment involves antihyperglycemic and hypoglycemic drugs that can provoke undesirable side effects. Recent findings on hematopoietic stem cell plasticity and therapeutic potential suggest their use as an alternative treatment for T2DM and its consequences. In order to investigate this potential, a model of diabetes was induced in C57Bl/6 mice through administration of a high-fat diet. Animals developed obesity, hyperglycemia, glucose intolerance, proteinuria and non-alcoholic steato-hepatitis. Female C57Bl/6 mice do not developed obesity, hyperglycemia and T2DM when submitted the male's diet. After the induction period, only the male mice were treated with bone marrow mononuclear cells and observed during 6 months. Cell mononuclear from bone marrow therapy do not reduced body weight from obesity and diabetes animals. Three and six months after the therapy, we do not observed reduction from glycemia. Three months after the therapy, observed reduction glucose intolerance in mice high-fat fed. Reduction in fibrosis perisinusoidal liver after three months from therapy and this difference still until six months after therapy.

Key-words: Type 2 diabetes *mellitus*; stem cell; high-fat diet ; cell therapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Classificação das células-tronco segundo Wagers e Weissman (2004).
- Figura 2** Possíveis mecanismos para justificar a plasticidade das células-tronco adultas.
- Figura 3** Representação esquemática do período de caracterização do modelo.
- Figura 4** Representação esquemática dos sacrifícios e análise histológicas.
- Figura 5** Representação esquemática do período de indução e terapia com células mononucleares de medula óssea
- Figura 6** Peso corpóreo das fêmeas durante o período de indução.
- Figura 7** Aumento de peso nos camundongos machos durante período de indução com dieta
- Figura 8** Acúmulo de tecido gorduroso em camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta *high-fat*
- Figura 9** Glicemia de jejum nos camundongos machos durante o período de indução.
- Figura 10** Teste de tolerância à glicose nos machos durante o período de indução.
- Figura 11** Dosagem de proteínas totais em urina de machos durante o período de indução.
- Figura 12** Análise bioquímica dos animais com 9 meses de indução do modelo.
- Figura 13** Dosagem dos parâmetros bioquímicos do sangue após 12 meses de indução do modelo.
- Figura 14** Análise macroscópica dos órgãos
- Figura 15** Esteatose hepática
- Figura 16** Resultado histológico característico de NASH
- Figura 17** Presença de adenoma nos fígados de animais 12 meses após a alimentação *high-fat*

- Figura 18** Fibrose perissinusoidal
- Figura 19** Análise histológica renal
- Figura 20** Histologia do pâncreas
- Figura 21** Ganho de peso corporal dos animais após a terapia celular
- Figura 22** Glicemia de jejum 3 meses após o transplante
- Figura 23** Tolerância à glicose 3 meses após o transplante
- Figura 24** Parâmetros bioquímicos do plasma
- Figura 25** Parâmetros bioquímicos mensurados no plasma de camundongos 6 meses após a terapia.
- Figura 26** Micrografias de secções histológicas de tecido hepático
- Figura 27** Secções de fígado coradas com picro-sirius vermelho
- Figura 28** Morfometria da fibrose hepática após o transplante

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Classificação da indução do diabetes tipo 2 em modelo animal.
- Tabela 2** Composição das rações *high-fat* e *low-fat*
- Tabela 3** Descrição dos experimentos quanto as suas características.
- Tabela 4** Caracterização da população de células mononucleares de medula óssea.

LISTA DE ABREVIATURAS

DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
CT	Célula-tronco
IR	Do inglês <i>insulin receptor</i>
IRS	Do inglês <i>insulin receptor substrate</i>
PI 3-cinase	Fosfatidilinositol 3-cinase
TNF-α	Do inglês: <i>tumor necrosis factor-α</i>
IL-6	Interleucina-6
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
NASH	Do inglês <i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
CTH	Célula-tronco hematopoética
MAPC	Do inglês <i>multipotent adult progenitor cells</i>
ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
HE	Hematoxilina-eosina
TGF-β	Do inglês: <i>transforming growth factor-β</i>
PDGF	Do ingles: <i>platelet-derived growth factor</i>
MEC	Matriz extracelular
MMP	Do ingles: <i>matrix metalloproteinase</i>

SUMÁRIO

1 – REVISÃO DA LITERATURA	
1.1 Aspectos gerais	1
1.2 Diabetes melitus tipo 2	2
1.3. – Patogênese do DM tipo 2	4
1.4 – Fatores de risco	9
1.4.1 – Obesidade e resistência à insulina	11
1.4.2 – Síndrome metabólica	16
1.4.3 – Doença hepática gordurosa não alcoólica	17
1.5– Modelos experimentais	21
1.6 – Células tronco	32
1.6.1 – Características gerais	32
1.6.2 – Células tronco embrionárias	34
1.6.3 – Células tronco somáticas	35
1.6.4 – Plasticidade e mecanismo de ação	37
1.7 – Células tronco e diabetes	39
2 – OBJETIVOS	42
2.1 – Geral	42
2.2 – Específicos	42
3 – MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 – Indução do diabetes e esteato-hepatite por dieta high-fat	43
3.2 – Caracterização do modelo	44
3.2.1 – Controle do peso corporal	45
3.2.2 – Dosagem glicêmica do sangue	45
3.2.3 – Parâmetros bioquímicos do plasma	45
3.2.4 – Teste de tolerância a glicose	45
3.2.5 – Dosagem de proteinúria	46
3.2.6 – Sacrifício e análise histológica	46
3.3 – Transplante de células mononucleares de medula óssea	47
3.3.1 – Citometria de fluxo	48
3.3.2 – Medições de peso corporal e parâmetros bioquímicos do plasma	49
3.3.3 – Teste de tolerância a glicose	49
3.3.4 – Sacrifício e análise histológica	49
3.4 – Análise estatística	50
4 – RESULTADOS	51
4.1 – Caracterização do modelo	51
4.1.1 – Peso e glicemia	51
4.1.2 – Tolerância a glicose	56
4.1.3 – Proteinúria	58
4.1.4 – Parâmetros bioquímicos do sangue	60
4.1.5 – Análise histológica	63
4.2 – Caracterização das células mononucleares transplantadas	72
4.3 – Análises após a terapia celular	73
4.3.1 – Peso e glicemia	73
4.3.2 – Tolerância a glicose	75
4.3.3 – Proteinúria	76
4.3.4 – Análise bioquímica	77
4.3.5 – Análise histológica após terapia	80
5 – DISCUSSÃO	84
5.1 – Indução do modelo do diabetes tipo 2 e NASH	84
5.2 – Terapia celular	92

6 – SUMÁRIO DE RESULTADOS	99
7 – REFERENCIAS	100

1 – REVISÃO DA LITERATURA

1.1 – Aspectos gerais

O diabetes *mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos, caracterizado por uma hiperglicemia crônica que pode acarretar danos no sistema cardiovascular, nervoso, olhos, rins e fígado resultantes de alterações micro e macrovasculares (WILD *et al.*, 2006). Em consequência do aumento de aterogênese, a longo prazo o DM leva à disfunção, dano ou falência de vários órgãos (STUMVOLL *et al.*, 2005). Complicações como cegueira, insuficiência renal, infarto do miocárdio e amputação das extremidades acarretam um decréscimo na expectativa de vida (MALECKI, 2005), transformando o DM em um importante problema sócio-econômico responsável por elevados gastos nos sistemas de saúde (STUMVOLL *et al.*, 2005).

O DM resulta da interação entre a predisposição genética e comportamental e fatores de riscos ambientais. A incidência do diabetes está crescendo em todo o mundo (TUOMILEHTO *et al.*, 2001), atingindo proporções epidêmicas (ZIMMET *et al.*, 2001). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que existam mais de 180 milhões de diabéticos no mundo, valor que pode dobrar até 2030. Em 2005 foram registrados cerca 1,1 milhões de mortes por diabetes e 2,9 milhões de casos onde a doença contribuiu para o óbito (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2006).

O DM pode ser classificado de acordo com a sua etiologia, sendo os tipos 1 e 2 as formas prevalentes (GALINDO *et al.*, 2006). O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é caracterizado por lesão das células beta do pâncreas, acarretando uma secreção insuficiente de insulina, e decorre usualmente de doenças auto-imunes ou infecções virais (GUYTON *et al.*, 2002). O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é responsável por cerca de 90% da prevalência da doença (MALECKI, 2005) e apresenta dois componentes: resistência periférica à insulina e deficiência relativa na sua secreção (MAITRA & ABBAS, 2005; ZIMMET *et al.*, 2001).

Terapias para o DM2 visam à redução da glicemia e ao aumento da sensibilidade à insulina. Muitas vezes isso pode ser alcançado através de mudanças no estilo de vida, incluindo a redução de peso e a prática de exercícios, podendo estar associadas a drogas hipoglicemiantes e anti-hiperglicemiantes e até à administração de insulina exógena (STUMVOLL *et al.*, 2005). Por outro lado, mudanças no estilo de vida são difíceis de serem obtidas, comprometendo a melhora do quadro clínico geral.

1.2 – Diabetes Mellitus Tipo 2

O DM2 é uma desordem metabólica que resulta de interações complexas de múltiplos fatores e é caracterizada pela presença de duas anormalidades: diminuição da secreção de insulina pelo pâncreas e resistência à ação da insulina em várias células como as do músculo, fígado e do tecido adiposo, o que resulta em aumento da glicose (CHENG & FANTUS, 2005; MALECKI, 2005). Na maioria dos casos, o paciente apresenta graus variados de resistência à insulina e deficiência relativa da função das células β e de secreção da insulina (OKAMOTO *et al.*, 2005), refletindo a natureza multifatorial da doença (LEITE, 2006).

O DM2 ocorre quando o pâncreas pára de secretar insulina suficiente para suportar a demanda metabólica, possivelmente devido à disfunção de secreção adquirida pelas células β e/ou diminuição da massa de células β (RHODES, 2005). Apesar da causa primária do desenvolvimento da doença permanecer desconhecida, sabe-se que a resistência à insulina participa precocemente nessa patogênese e que defeitos na secreção de insulina por células β pancreáticas contribuem para a progressão da hiperglicemia (LOWELL & SHULMAN, 2005).

A evolução para o diabetes ocorre ao longo de um período de tempo variável, passando por estágios intermediários que recebem as denominações de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída. Os primeiros representariam evidências precoces de disfunção de célula beta; os segundos, na presença de glicemia de jejum normal, representariam quadro de resistência insulínica. Na

presença de ambos os estágios, haveria um quadro misto, com maior risco para progressão para diabetes e doença cardiovascular (DAVIES *et al.*, 2000).

Devido à evolução lenta e gradual, com sintomas inicialmente leves, frequentemente a doença cursa durante anos sem o devido diagnóstico (GALINDO *et al.*, 2006). O diagnóstico, na maioria dos casos, é feito a partir dos 40 anos de idade, associado com o excesso de peso na maioria dos pacientes. Contudo, nos últimos anos, a incidência de diabetes do tipo 2 vem crescendo entre crianças e jovens, como demonstrado nos Estados Unidos da América, em associação ao aumento da obesidade e estilo de vida sedentário (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2000; ZIMMET *et al.*, 2001).

1.3 - Patogênese do DM tipo 2:

Para entender os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelo diabetes tipo 2 é necessário que se conceitue a estrutura no controle da glicemia (STUMVOLL *et al.*, 2005). A regulação da glicose sanguínea é fundamental para a homeostase do metabolismo de carboidrato, gordura e proteína e depende da ação da insulina, hormônio anabólico secretado pelas células beta das ilhotas de Langerhans, no pâncreas (CARVALHEIRA *et al.*, 2002a). Em um organismo saudável, a elevação da glicemia após a ingesta estimula a síntese e a liberação da insulina na circulação sistêmica pelas células β . O hormônio se liga a receptores específicos nos tecidos-alvo (músculo esquelético, tecido adiposo e fígado), iniciando uma cascata de sinalização intracelular que inibe a gliconeogênese no fígado, suprime a lipólise no tecido adiposo e estimula a entrada da glicose nas células adiposas e musculares (CHENG & FANTUS, 2005).

A insulina é então, o principal hormônio na regulação dos níveis de glicose no sangue e, geralmente, uma glicemia normal é mantida pelo equilíbrio entre a ação da insulina e a sua secreção (STUMVOLL *et al.*, 2005). Defeitos na secreção de insulina e/ou na sua ação podem acarretar uma hiperglicemia crônica, característica comum ao

grupo de doenças metabólicas englobadas pelo diabetes *mellitus* (MAITRA & ABBAS, 2005).

A resistência à insulina é a redução da capacidade de resposta dos tecidos alvos aos efeitos deste hormônio, como supressão da produção de glicose no fígado e utilização da glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo (FUJIMOTO, 2000). Normalmente, em resposta a elevação de glicose no plasma, a insulina é secretada pelas células β nas ilhotas de Langerhans e promovem aumento de energia, do metabolismo e do armazenamento (BRADY, 2004). No diabetes, a partir da insulino-resistência, ocorrerá uma seqüência de eventos como elevação do glucágon no sangue, e aumento da captação e conversão de substratos em glicose no fígado. Assim, a insulina não reduz o nível plasmático de glicose, acarretando uma hiperglicemia (FUJIMOTO, 2000), que por sua vez, contribui para a formação de um ciclo vicioso (resistência insulínica – hiperglicemia – diminuição da secreção - resistência insulínica) (SHERWIN, 2005).

Alterações em diversos pontos da via de sinalização da insulina são responsáveis pelo quadro de resistência. Dentre eles, destaca-se a redução da concentração e da atividade quinase do seu receptor (*insulin receptor* - IR) e conseqüente redução de concentração e fosforilação do substrato do receptor (*insulin receptor substrate* - IRS-1 e 2), da translocação de transportadores de glicose e da atividade das enzimas intracelulares (ZECCHIN *et al.*, 2004).

Os eventos que ocorrem após a ligação da insulina são específicos e estritamente regulados. A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , que atua como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade “a” permite que a subunidade “b” adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação, que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor (PATTI & KAHN, 1998; ZECCHIN

et al., 2004). Dez substratos do receptor de insulina já foram identificados. Quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS (WHITE, 1998). Outros substratos incluem Shc, Gab-1, p60dok, Cbl, JAK2 e APS (SAAD *et al.*, 1996 ; CARVALHEIRA *et al.*, 2002a). Tais substratos intracelulares da tirosina quinase agem como sinalizadores intracelulares, localizados abaixo dos receptores de insulina que ficam na superfície da célula. Danos causados em IRS-1 e IRS-2 levam à resistência à insulina, indicando assim que essas proteínas são importantes na ação desse hormônio (RHODES, 2005).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em resíduos de tirosina (WHITE, 1998). A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia à Src 2 (SH2). Dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase), uma molécula importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e no transporte de glicose estimulado pela insulina (CARVALHEIRA *et al.*, 2002a).

O receptor de insulina, além de ser fosforilado em resíduos de tirosina, também pode ser fosforilado em resíduos de serina. Tal fosforilação gera a sua ubiquitinação e degradação, atenuando a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo por insulina (RHODES, 2005). Essas fosforilações inibitórias causam um *feedback* negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina (CARVALHEIRA, *et al.*, 2002b; RHODES, 2005). Os mecanismos que causam a fosforilação em serina são considerados multifatoriais. O substrato do receptor da insulina da família IRS-2 tem papel particularmente importante no desenvolvimento do DM2. A redução desse substrato devido à fosforilação em resíduos de serina/treonina acarreta tanto a resistência à insulina quanto a apoptose de células beta pancreáticas (RHODES, 2005).

Somente a redução na sensibilidade à insulina não caracteriza o DM2, já que as ilhotas pancreáticas respondem a essa resistência expandindo a massa de células β e a sua capacidade de secretar insulina, gerando uma hiperinsulinemia. A

hiperinsulinemia não é suficiente para compensar a resistência à insulina e a produção do hormônio responde tardiamente à refeição, ocorrendo hiperglicemia pós-prandial (LEITE, 2006). Com o passar do tempo, as células β não conseguem mais enfrentar a elevada demanda por insulina (BRADY, 2004) e, caso o aumento de produção não seja mantido, a doença pode se desenvolver (PRENTKI e NOLAN, 2006). Pacientes diabéticos apresentam inicialmente um aumento compensatório na massa de células beta, seguido de um decréscimo da mesma, onde a apoptose dessas células supera a sua replicação e neogênese. Nessa situação, o organismo já não consegue se adaptar a aumentos na carga metabólica, inclusive à resistência à insulina (RHODES, 2005), gerando um quadro de hiperglicemia mais acentuada (GUYTON *et al.*, 2002).

As alterações fisiológicas decorrentes do diabetes trazem conseqüências graves para o paciente, comprometendo a sua qualidade de vida devido à limitação de várias funções vitais, tais como renal, hepática, cardíaca e a visão. Essas alterações decorrem, na maioria dos casos, de anormalidades micro e macrovasculares que levam à disfunção ou à falência de vários órgãos. Os pacientes diabéticos apresentam risco maior de doença vascular aterosclerótica, como doença coronariana, doença arterial periférica e doença vascular cerebral (WHO, 2006).

O diabetes causa ainda alterações específicas na estrutura renal. A nefropatia diabética é uma complicação relevante do DM2, caracterizada por hipertrofia de glomérulos e proliferação de células mesangiais levando à glomerulosclerose (WEI *et al.*, 2004). A glomerulosclerose clássica caracteriza-se por espessamento da membrana basal glomerular, esclerose mesangial difusa, hialinose, microaneurisma e arteriosclerose hialina (GROSS *et al.*, 2006).

A nefropatia diabética é uma complicação crônica, tradicionalmente definida pela perda de proteínas na urina, ou proteinúria. É caracterizada em estágios de acordo com os valores de excreção urinária de albumina e está associada a um importante aumento de mortalidade, principalmente relacionada à doença cardiovascular (GROSS *et al.*, 2006). Atualmente, nos Estados Unidos da América,

calcula-se que mais de 40% dos pacientes que ingressam em programas de diálise ou necessitam de transplante renal são diabéticos (WEI *et al.*, 2004).

Outra alteração importante nesta patologia é a dislipidemia. Sabe-se que a resistência à insulina conduz a um aumento da síntese hepática de triglicerídeos. Se este incremento na gênese de trigliceróis pelo fígado não for incorporado a lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), gera um aumento no conteúdo lipídico intra-hepático. Esse acúmulo de gordura no fígado gera a esteatose hepática, que poderá evoluir para uma esteatohepatite não alcoólica e para cirrose hepática (CRUZ *et al.* 2005). Além disso, a dislipidemia é um dos principais fatores de risco para doença cardiovascular em pacientes diabéticos, cuja influência é maior que os demais (LEHTO *et al.*, 1997). As alterações lipídicas mais freqüentes na população diabética são hipertrigliceridemia, HDL-colesterol (HDL-c) baixo e alterações qualitativas nas lipoproteínas, tais como a formação de partículas de LDL-colesterol (LDL-c) pequenas e densas (SBD, 2002).

1.4 - Fatores de risco:

O diabetes *mellitus* tipo 2 tem etiologia múltipla, resultando da interação entre uma predisposição genética e fatores ambientais (TUOMILEHTO *et al.*, 2001). De fato, o DM2 ocorre principalmente em pacientes com sobrepeso ou obesidade, com histórico familiar dessa doença e de diabetes gestacional, bem como portadores de hipertensão e dislipidemia (GALINDO *et al.*, 2006).

Apesar do componente genético da doença ainda não está bem elucidado (ZECCHIN & SAAD, 2006), a importância do papel dos genes são demonstrados em estudos de gêmeos monozigóticos e dizigóticos, que mostraram a alta taxa de concordância no diabetes tipo 2 atingindo aproximadamente 50% e 15%, respectivamente. (MALECKI, 2005). Além disso, história familiar positiva confere um aumento no risco para DM2 de 2-4 vezes e, 15-25% dos parentes de primeiro grau dos pacientes com DM2 desenvolvem enfraquecimento na tolerância à glicose ou

diabetes. O risco de vida (aos 80 anos) para DM2 tem sido calculado em 38% se um dos pais apresentarem DM2. Se ambos os pais são afetados, a prevalência do DM2 para a prole é estimada em aproximadamente 60% aos 60 anos (STUMVOLL *et al.*, 2005).

Outra evidência genética está na associação de bebês com baixo peso ao nascer e aumento no risco de desenvolvimento de DM2 quando adultos (RHODES, 2005). Estudos como esses enfatizam a importância de fatores genéticos, contudo sabe-se que a alta incidência de DM2 também está associada com fatores ambientais assim como estilo de vida e dieta (MALECKI, 2005). Além disso, existem populações com elevada prevalência de DM2, onde a doença não pode ser atribuída apenas aos fatores ambientais (AGUIAR & SILVA, 2006; MALECKI, 2005). De acordo com a contribuição dos fatores genéticos, o DM2 pode ser classificado em monogênico ou poligênico.

As formas monogênicas são menos comuns e resultam da mutação em um único gene. Caracterizadas por um defeito grave na secreção de insulina ou grande redução da sua sensibilidade, o quadro clínico é geralmente grave e apenas levemente influenciado por fatores ambientais, sendo o diagnóstico precoce (MALECKI, 2005). As formas poligênicas são ditas multifatoriais e representam a maior parte dos casos de DM2. A ação de vários genes com freqüentes polimorfismos gera uma suscetibilidade à doença, mas não é o fator determinante. O diagnóstico é tardio e os fatores ambientais têm grande importância no desenvolvimento da patologia (MALECKI, 2005; ZECCHIN & SAAD, 2006). A influência dos fatores ambientais é tão grande que o DM2 é considerado uma doença do estilo de vida moderno dos países ocidentais (AGUIAR & SILVA, 2006). A globalização foi acompanhada por mudanças de comportamento e modo de vida de seres humanos. O sedentarismo, a alimentação inadequada e o envelhecimento populacional acentuaram os casos de obesidade e diabetes (ZIMMET *et al.*, 2001).

Embora a base genética do DM2 ainda tenha que ser identificada, existe fortes evidências que fatores de risco modificadores, como a obesidade e a inatividade física, são os principais determinantes não genéticos da doença (TUOMILEHTO *et al.*, 2001).

1.4.1 – Obesidade e resistência à insulina

A causa do DM2 tem estado associada freqüentemente com a inatividade física, à dieta rica em gordura e o consumo de alimentos de alta densidade energética. Sabe-se que obesidade é o fator de risco predominante para o começo da resistência a insulina (BRADY, 2004), e que um terço dos obesos desenvolve DM2 (RHODES, 2005). Além disso, a obesidade também está associada com a capacidade reduzida de estimular insulina diante da glicose disponível no músculo, como demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* (PENDER *et al.*, 2005).

Portanto, a obesidade é um fator de risco significativo para o desenvolvimento do DM2, que gera impacto negativo sobre a sua progressão e tratamento (CORNIER, 2005), havendo um aumento da morbidade e mortalidade entre pacientes obesos com diabetes (LIVINGSTON & KO, 2005). Embora nem todos os indivíduos obesos desenvolvam diabetes e nem todos os indivíduos diabéticos são obesos, a prevalência do excesso de peso ou obesidade entre adultos diabéticos corresponde a 85%. O ganho de peso, independente do índice de massa corporal (IMC), é um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença. Estima-se que cerca de 80% dos casos dessa doença podem ser atribuídos à obesidade (HU *et al.*, 2001). Estudos sugerem que o tipo de dieta ou a composição da dieta pode influenciar independentemente o risco do indivíduo para o desenvolvimento do diabetes, mas, certamente, dietas com alto teor de gordura estão associadas com excesso de peso e obesidade (CORNIER, 2005).

Pesquisas recentes mostraram que o número de receptores de insulina no tecido adiposo diminui em ratos alimentados com dietas hipercalóricas com alto teor de gordura quando comparado com ratos alimentados com dieta apenas rica em

carboidratos, além de aumentar a resistência à insulina e diminuir a sensibilidade à insulina (PETRO *et al.*, 2004).

Desse modo, a ligação entre a obesidade e o diabetes é a resistência à insulina e alguns trabalhos indicam que a resistência à insulina induzida pela obesidade pode ser decorrente da ativação seqüencial da proteína quinase C (PKC) e da quinase inibidora do fator nuclear kB (IKkB), entretanto os detalhes dessa via de sinalização ainda não estão claros (KIM *et al.*, 2001; YUAN, *et al.*, 2001).

Um fator que merece destaque é o padrão de distribuição de gordura e não apenas a sua quantidade. O mecanismo mais comumente implicado na gênese da resistência à insulina decorre do acúmulo de gordura visceral. A simples medida da cintura correlaciona-se bem com a área visceral de gordura medida por tomografia computadorizada, podendo ser utilizada como um marcador de adiposidade central (ITO *et al.*, 2003). Vários estudos mostram que, independente do IMC (índice de massa corporal), a circunferência da cintura se associa diretamente à incidência de doença coronariana (POULIOT *et al.*, 1994; REXRODE *et al.*, 1998). Além disso, a gordura central se correlaciona mais com a resistência à insulina do que os depósitos periféricos (glúteo, subcutâneo) (MAITRA & ABBAS, 2005), representando um fator de risco maior para o desenvolvimento do DM2 (MATOS *et al.*, 2006). Essa relação se dá principalmente através de duas vias: ácidos graxos livres (AGL) e adipocinas.

Os AGL circulantes são provenientes da lipólise e estão elevados em muitos estados de resistência à insulina. Nessa situação ocorre o acúmulo de triglicérides e metabólitos derivados de ácidos graxos no músculo e fígado, inibindo a captação e oxidação da glicose, a síntese de glicogênio e estimulando gliconeogênese hepática. Os elevados níveis de AGL circulantes também estão associados à redução da fosforilação do IRS-1 em tirosina e da sua associação com a PI 3-quinase (MAITRA & ABBAS, 2005; ZECCHIN & SAAD, 2006). Adipócitos da gordura abdominal visceral são maiores e acumulam mais triglicérides do que os da gordura subcutânea. Assim,

eles liberam mais ácidos graxos e acentuam a resistência à insulina (MATOS *et al.*, 2006).

O impacto negativo do aumento da quantidade de gordura corporal sobre a sensibilidade à insulina pode ser claramente demonstrado na maioria dos indivíduos. A obesidade interfere na resistência através da atuação do tecido adiposo como órgão endócrino, liberando hormônios em resposta a alterações metabólicas. Tais hormônios são chamados coletivamente de adipocinas, e podem influenciar profundamente o metabolismo e o gasto energético, contribuindo para agravar a resistência à insulina e predispor à aterogênese (SHOELSON *et al.*; 2006).

Adiponectina, leptina, citocinas pró-inflamatórias (ex. TNF-alfa), fatores de crescimento celular, resistina, inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), entre outros, interferem na ação da insulina. A leptina é responsável pela sensação de saciedade, está elevada nos pacientes obesos, indicando uma provável resistência a esse hormônio (ZECCHIN & SAAD, 2006). A adiponectina reduz com a progressão do DM tipo 2 e parece estar relacionado à redução da resistência à insulina e a efeitos antiinflamatórios, antiateroscleróticos e protetor do endotélio (MATOS *et al.*, 2006). A resistina é uma adipocina recentemente descoberta. Seus efeitos ainda não são bem compreendidos, mas estudos sugerem que é este fator é um regulador negativo da insulina, reduzindo a tolerância à glicose e a sensibilidade a esse hormônio (ZECCHIN & SAAD, 2006).

A leptina e a adiponectina são produzidos exclusivamente pelo tecido adiposo. Por outro lado, a resistina e citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6), são produzidas por adipócitos e outras células e estão envolvidos no processo inflamatório associado à obesidade (SHOELSON *et al.*, 2006).

Diversos estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que, na obesidade e no diabetes tipo 2, o tecido adiposo apresenta um estado de inflamação crônica de baixo grau (BRUUN, 2007). A expressão aberrante do TNF-alfa na obesidade,

produzido principalmente pelos adipócitos, interfere na ação da insulina e contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina, representando uma ligação entre inflamação, obesidade e resistência à insulina (NEELS *et al.*, 2006).

Estudos mostram que animais de modelos experimentais de obesidade e resistência à insulina produzem níveis significativamente mais elevados de mRNA do TNF-alfa e da proteína em si no tecido adiposo em comparação com os seus controles magros (HOLFMAN *et al.*; 1993). Assim como camundongos, humanos obesos, resistentes à insulina e diabéticos apresentam elevados níveis de TNF- α circulantes (ZECHHIN & SAAD, 2006). Várias estratégias e modelos animais têm sido utilizados para investigar o papel da expressão anormal de TNF-alfa nos estados de resistência à insulina. O tratamento de hepatócitos e adipócitos com TNF-alfa reduz a autofosforilação insulino-estimulada do IR em 20% a 50%, promovendo uma redução em sua atividade catalítica e diminuindo ainda mais a fosforilação do IRS-1 em resíduos de tirosina, associados ou não à redução nos níveis teciduais destas proteínas (FEINSTEIN *et al.*, 1993; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995). Experimentos com diferentes tipos de células em cultura, incluindo hepatócitos, adipócitos e fibroblastos, demonstraram que o TNF-alfa aumenta a fosforilação do IRS-1 e IRS-2 em resíduos de serina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995). Estas modificações são suficientes para reduzir a capacidade dos IRS-1 e 2 de interagir com o IR, bem como bloquear os eventos subseqüentes da sinalização de insulina, incluindo a associação destes substratos com a PI 3-quinase, resultando em estados de resistência à insulina.

Um estudo demonstrou que a co-cultura de adipócitos com fibras musculares induziu resistência à insulina *in vitro*, sugerindo que os adipócitos podem regular a ação da insulina em células musculares através da secreção de seus produtos (DIETZE *et al.*, 2002). O TNF- α pode, ainda, auto-regular a sua biossíntese no tecido adiposo, mantendo os seus níveis elevados na obesidade e contribuindo para a resistência à insulina (NEELS *et al.*, 2006).

A obesidade não está apenas associada com o aumento do risco de desenvolver diabetes, mas também com o aumento da prevalência de outros fatores de riscos cardiovasculares, uma vez que pacientes obesos com diabetes apresentam mais hipertensão arterial e dislipidemia quando comparados com pacientes diabéticos não-obesos (ROGERS *et al.*, 2003; ANDERSON *et al.*, 2003). Medidas de prevenção do diabetes são eficazes em reduzir o impacto desfavorável sobre a morbimortalidade destes pacientes, principalmente em razão de se poder evitar as complicações cardiovasculares. Enfatiza-se em especial a adoção de estilo de vida saudável, com dieta balanceada e exercícios físicos regulares. A restrição energética moderada, baseada no controle de gorduras saturadas, acompanhada de atividade física leve, pode reduzir a incidência de DM2 em 58% das pessoas com risco elevado para o desenvolvimento desta afecção (TUOMILEHTO *et al.*, 2001; KNOWLER *et al.*, 2002). Entretanto, a dificuldade de adesão à dieta e à atividade física leva a maioria dos pacientes diabéticos obesos a necessitar de tratamento farmacológico antiobesidade para auxiliar na perda de peso.

1.4.2 – Síndrome metabólica

Outro fator importante, freqüentemente presente no diagnóstico do diabetes tipo 2, é a síndrome metabólica. Em 1998, com a constatação da freqüente associação entre resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão arterial, dislipidemia e doença aterosclerótica, Gerald Reaven descreveu uma síndrome a que denominou inicialmente de *síndrome X* (REAVEN, 1998). Hoje, a terminologia mais empregada pelas sociedades científicas internacionais é a de síndrome metabólica (SM), caracterizada pela associação, num mesmo indivíduo, de dislipidemia, diabetes *mellitus* tipo 2 ou intolerância à glicose, hipertensão arterial e excesso de peso ou obesidade (ZIMMET *et al.*, 1999). Embora não haja consenso sobre quais componentes deveriam integrar sua definição, uma série de anormalidades metabólicas foi posteriormente sendo acrescentada ao espectro da síndrome,

contribuindo para a compreensão de sua etiopatogenia e de seu impacto no risco cardiovascular.

Interligando estas alterações metabólicas encontra-se a resistência à insulina (hiperinsulinemia), daí também ser conhecida como síndrome de resistência à insulina. É a principal doença responsável por eventos cardiovasculares e está bem documentado que a síndrome metabólica pode estar presente até dez anos antes da detecção de alterações glicêmicas, e que caracteriza um risco aumentado tanto para diabetes quanto para doença cardiovascular (ISOMAA *et al.*, 2001 e FORD *et al.*, 2002 e LAAKSONEN *et al.*, 2002). Estudos envolvendo indivíduos com DM indicam que a presença de SM se associa à maior frequência de complicações crônicas diabéticas, como a doença coronariana, doença vascular periférica, retinopatia e neuropatia (COSTA *et al.*, 2004). A expectativa é de que a SM aumente sua frequência nas populações, uma vez que muitas das anormalidades que a compõem estão relacionadas ao estilo de vida moderno. A prevalência de SM na população americana foi estimada em 22% a 24% (FORD *et al.*, 2002), sendo variável com a etnia (FORD & GILES, 2003).

1.4.3 – Doença hepática gordurosa não alcoólica

Diabetes *mellitus* tipo 2, obesidade e dislipidemia frequentemente coexistem com a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), sendo a associação entre obesidade e diabetes um risco adicional para a doença (OTA *et al.*, 2007). Atualmente, a DHGNA é considerada uma das mais frequentes doenças de fígado, caracterizada como epidemia em muitos locais do mundo (BEDOGNI *et al.*, 2005; CLARCK, 2006) acarretando problemas de saúde pública (CLARK *et al.*, 2002). DHGNA inclui um amplo espectro de patologias hepáticas que se assemelham àquelas geradas pelo álcool, mas ocorrem em pacientes que não o consomem em excesso (CLARK *et al.*, 2002). Assim como no diabetes, a interação entre fatores genéticos e ambientais parece determinar a expressão fenotípica da DHGNA, que se caracteriza pela

presença de esteatose e esteato-hepatite não alcoólica (NASH – *nonalcoholic steatohepatitis*), podendo evoluir para a cirrose criptogênica e carcinoma hepatocelular (ZOU *et al.*, 2006; OTA *et al.*, 2007).

É difícil avaliar quantas pessoas são portadoras de DHGNA devido à falta de um método ideal para realizar essa investigação (MC AVOY *et al.*, 2006). O método mais simples é a realização de ultra-sonografia, que demonstra achados sugestivos de esteatose em mais de 16% das pessoas saudáveis não obesas e em cerca de 95% dos obesos que fazem uso de álcool (LONARDO, *et al.*, 1997). Um estudo que analisou a histologia hepática em pacientes não selecionados (vítimas fatais de acidentes automobilísticos) encontrou esteatose em 24% deles (HILDEN *et al.*, 1977). Outro estudo que analisou necropsias de não alcoólatras encontrou esteatose em 35% dos magros e 70% dos obesos, além de esteato-hepatite em 2,7% dos magros e 18,5% dos obesos (WANLESS & LENTZ, 1990).

A relação entre doença hepática e diabetes é conhecida e envolve múltiplos fatores. A resistência à insulina presente no diabetes é um evento fundamental na patogênese da DHGNA, e é considerado um fator de risco importante, juntamente com a obesidade e a dislipidemia (CLARCK *et al.*, 2002). A esteatose hepática reflete uma doença metabólica em que, por um motivo ainda desconhecido, o organismo desencadeia uma inflamação contra os hepatócitos que tem acúmulo de gordura, e estes são gradualmente destruídos. Dependendo da intensidade desta destruição, isso pode levar à formação de fibrose que vai se acumulando e progredindo até a formação de nódulos, o que caracteriza a cirrose (FALCK-YTTER *et al.*, 2001).

Os mecanismos que desencadeiam a hepatite em um paciente com esteatose simples não são conhecidos, mas estudos recentes já têm mostrado os mecanismos da inflamação e formação de fibrose (MC AVOY, *et al.*, 2006). Sabemos que nestes casos a esteatose é tanto causa quanto resultado da formação de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e *stress* oxidativo, redução na função da cadeia respiratória mitocondrial, depleção de ATPs e produção de citocinas pró-inflamatórias,

incluindo TNF- α (SREEKUMAR et al., 2003). Em modelos animais, observou-se ciclo auto-perpetuado de resistência insulínica e inflamação pela ativação crônica da quinase inibitória kappa beta (IKK β) e interações com o fator de transcrição nuclear NF- κ B (YUAN et al., 2001; GAO et al., 2002; XU et al., 2003). Estudos também demonstraram a natureza pró-fibrogênica pela hiperinsulinemia, hiperglicemia e pela leptina (MC AVOY, et al., 2006).

Ainda em relação à NASH, um estudo investigando elevações nas aminotransferases em uma população geral seguida de exclusão de outras causas demonstrou uma prevalência de 5,5% de suposta NASH em adultos norte-americanos (CLARK et al., 2003; BRUNT, 2004). O risco é maior dessa doença principalmente em obesos, diabéticos e portadores de síndrome metabólica. DM2, hiperglicemia, e intolerância à glicose têm sido descritos em 20%-75% dos pacientes adultos com NASH (REID, 2001).

NASH é uma forma de DHGNA que requer tratamento, já que está bem estabelecido que alguns pacientes com NASH podem evoluir para cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (ITO et al., 2006; SVEGLIATI-BARONI et al., 2006), além do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LORIA et al., 2007). Quando a esteato-hepatite se associa à hipertensão arterial, dislipidemia e hiperglicemia, as complicações cardiovasculares são ainda mais frequentes, aumentando o índice de mortalidade entre os pacientes com NASH (LORIA et al., 2007).

Apesar da dificuldade em estabelecer uma estatística precisa, esses dados sugerem que a doença hepática gordurosa não alcoólica seja a principal causa de doença hepática crônica nos EUA (CLARK et al., 2002). Assim, como reflexo da epidemia de obesidade e síndrome metabólica nas últimas décadas, espera-se uma epidemia subsequente de cirrose e hepatocarcinoma causados pelo NASH nas próximas décadas (SREEKUMAR et al., 2003).

Medidas de prevenção do diabetes e da esteato-hepatite são eficazes em reduzir o impacto desfavorável sobre a morbi-mortalidade destes pacientes, principalmente em razão de evitar as complicações cardiovasculares. A obesidade é descrita em 40 a 100% dos pacientes com NASH e o DM2, em 20-75% deles. O tratamento ideal para a doença em adultos ainda não foi bem estabelecido, mas inclui mudanças no modo de vida que garantam a redução de peso (REID, 2001).

1.5 – Modelos experimentais

Devido à complexa interação entre suscetibilidade genética e fatores ambientais, a patogênese do diabetes muitas vezes fica difícil e mal compreendida nos seres humanos. Além disso, estudos clínicos em pacientes diabéticos muitas vezes são inviáveis por considerações éticas óbvias, tornando os modelos animais extremamente úteis e vantajosos para a pesquisa biomédica. Para melhor compreender o papel de cada um dos elementos envolvidos na fisiopatologia do diabetes, pesquisadores utilizam modelos experimentais que possam determinar de maneira controlada o papel de cada um dos componentes envolvidos na patologia, fornecendo subsídios para sua melhor compreensão (CESARETTI & KOHLMANN, 2006).

Apesar dos modelos animais possuírem uma longa história na área da pesquisa biomédica e contribuírem enormemente à compreensão de muitas doenças humanas, existe uma necessidade por conhecimentos adicionais de vários mecanismos que estão por trás dos defeitos básicos. Esta necessidade requer modelos experimentais seguros e clinicamente relevantes (WINZELL & AHRÉN, 2004). Várias espécies animais que apresentam resistência à insulina e diabetes tipo 2, com características similares aos seres humanos são utilizados como modelos experimentais com causa genética, experimental ou nutritiva (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da indução do diabetes tipo 2 em modelo animal.

Classificação	Modelos de diabetes tipo 2	
	Obesos	Não-obesos
Espontâneos ou geneticamente derivados	Camundongo <i>ob/ob</i>	Camundongo ALS/Lt
	Camundongo <i>db/db</i>	Camundongo mutante (Akita)
	Camundongo KK	
	Camundongo KK/A ^y	
	Camundongo NZO	Rato GK
	Camundongo NONcNZO10	Rato diabético <i>Cohen</i>
	Camundongo TSOD	
	Camundongo M16	
	Rato <i>Zucker fatty</i>	
	Rato ZDF	
Rato SHR/N-cp		
Rato JCR/LA-cp		
Rato OLETF		
Induzido por dietas	Camundongo C57BL/6	
	Camundongo <i>Spiny</i>	
	Rato <i>Sand</i>	-----
Quimicamente induzidos	Camundongo tratado com GTG	Baixas doses de ALX ou STZ em camundongos, ratos, etc.
Animais transgênicos (<i>knock-out</i>)	Camundongo <i>knock-out</i> no receptor β_3	Camundongo transgênico ou <i>knock-out</i> envolvendo genes da insulina ou receptor da insulina (IRS-1, IRS-2, GLUT-4, ect)
	Camundongo <i>knock-out</i> UCP1 (uncoupling protein)	

Fonte: Srinivasan e Ramarao, 2007.

Legenda: *ob/ob* – camundongo com mutação recessiva no gene da leptina; *db/db* - camundongo com mutação recessiva no gene do receptor da leptina; KK - Modelos poligênicos de obesidade e resistência à insulina **com** diabetes moderado, obesidade, hiperinsulinemia e hiperplasia de células beta pancreática; Rato SHR/N-cp - mutação *non-sense* do receptor leptina dos ratos espontaneamente hipertensos; Rato OLETF - modelo poligênico de obesidade (*Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*); NZO – modelo de obesidade poligênica da Nova Zelândia; NONcNZO10 – modelo de obesidade poligênica com diabetes tipo 2; TSOD – modelo espontâneo de diabetes tipo 2; M16 - modelo poligênico de obesidade e diabetes tipo 2 precoce; Rato *Zucker fatty* - uma mutação no gene do receptor da leptina; ZDF - *zucker diabetic fatty*; Rato JCR/LA-cp – rato com ausência completa do receptor da leptina com desenvolvimento de síndrome metabólica; ALX – aloxano; STZ – estreptozotocina; GTG – gold thioglucose.

Animais diabéticos espontâneos ou geneticamente derivados

Dentre os modelos genéticos com desenvolvimento de resistência à insulina existem alguns modelos experimentais que ajudaram a esclarecer características monogênicas da obesidade e foram particularmente importantes pela existência de genes homólogos no homem (PLUM *et al.*, 2005; MARQUES-LOPES *et al.*, 2004). Para se esclarecer o mecanismo de ação da leptina e a resistência à insulina associada à sua disfunção, a primeira alteração descrita foi uma mutação no cromossomo 6 que codifica o gene de síntese da leptina, o gene *ob*. A ausência de leptina nos camundongos *ob/ob* faz com que este camundongo seja hiperfágico, diabético e obeso (MARQUES-LOPES *et al.*, 2004). Na ocasião, ganhou força a hipótese de que a hipoleptinemia pudesse ser a maior determinante da obesidade. Entretanto, estudos posteriores mostraram que mutações no gene que determina a síntese do receptor de leptina também determinavam resistência à insulina em animais hiperleptinêmicos e obesos. São exemplos destes camundongos *db/db* e ratos obesos Zucker (*fa/fa*). A partir destes modelos experimentais desenvolveu-se o conceito de resistência à ação hipotalâmica à leptina (MUNZBERG & MYERS, 2005; CAMPFIELD *et al.*, 1996). Mais recentemente, e à semelhança dos ratos Zucker, uma mutação *non-sense* do receptor leptina dos ratos espontaneamente hipertensos originou uma linhagem de ratos hipertensos e obesos, denominada Koletsy ou SHR-Ob (*ff*) (KEEN *et al.*, 2004).

Modelos poligênicos de obesidade podem ser exemplificados pelos ratos OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*), nos quais a análise genômica demonstrou susceptibilidade nos cromossomos 1, 7, 14 e X. A obesidade e hiperfagia destes animais são devidas a um alelo nulo para síntese do receptor de colecistocinina A, uma substância anorexígena (KANEMOTO *et al.*, 1998). Outros modelos que se enquadram nesta mesma categoria são os camundongos KK (diabetes moderado, obesidade, hiperinsulinemia e hiperplasia de células beta pancreática), o rato israelense, que quando alimentado com ração para roedores desenvolve obesidade,

diabetes, dislipidemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, e os ratos Goto-Kakizaki, que desenvolvem hiperglicemia e hiperinsulinemia, principalmente na idade adulta (SONE, *et al.*, 2001).

Além desses modelos, diversos centros, através de técnicas de biologia molecular, desenvolveram animais resistentes à insulina através da produção de animais transgênicos ou *knockouts*. É importante destacar que o primeiro modelo de *knock-out* para o estudo da resistência à insulina foi o do *knockout* para o próprio receptor da insulina. Neste modelo, os animais heterozigotos tinham apenas 50% dos receptores de insulina viáveis, enquanto que os homozigotos não possuíam este receptor. Na ausência do receptor de insulina, os animais desenvolviam cetoacidose diabética e morriam uma semana após o nascimento, enquanto que os heterozigotos eram capazes de sobreviver (ACCILI *et al.*, 1996). Outros pesquisadores foram capazes de produzir modelos *knock-out* em camundongos, onde a deleção do gene da insulina se faz em tecidos alvos da insulina, como o músculo esquelético (MIRKO, *Muscular Insulin Receptor Knockout*), no cérebro (NIRKO), no fígado (LIRKO) e no tecido adiposo (FIRKO). O *knockout* dos receptores de insulina nas células β do pâncreas mostrou o papel contra-regulatório da secreção de insulina mediado pela própria insulina. Pode-se estudar ainda o papel regulatório da glicose sobre a secreção pancreática de insulina através de produção de animais *knockout* para o substrato do receptor da insulina (*Insulin Substrate Receptor*, IRS) tipo 1 e da glicoquinase pancreática (GK) (NANDI *et al.*, 2004).

Outros modelos de resistência à insulina avaliam a sinalização intracelular da insulina a partir da ligação da insulina ao seu receptor. Desta maneira, já foram produzidos camundongos onde foi realizada a deleção dos complexos de sinalização intracelular IRS-1, IRS-2 e IRS-3. Com estes modelos, estudos evidenciaram o papel do IRS-1 em mediar os efeitos fisiológicos da insulina no músculo esquelético e do IRS-2 no fígado, músculo, tecido adiposo, células β -pancreáticas e no aparelho reprodutor. Camundongos com deleção do gene para síntese de IRS1 (IRS-1^{-/-})

desenvolvem resistência à insulina, principalmente muscular, além de déficit no desenvolvimento, evidenciando o papel desta proteína na homeostase glicídica e na ação do *insulin growth factor-1* (IGF-1) (NANDI *et al.*, 2004; WHITE, 1997). Neste modelo experimental também se observa moderada redução na tolerância à glicose, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e menor resposta vascular à ação vasodilatadora da insulina, além de hiperplasia significativa das células β .

A deleção do IRS-2 também determina uma diminuição do crescimento e da quantidade de células β -pancreáticas, porém, diferentemente da deleção do IRS-1, verifica-se o aparecimento de diabetes somente quando estes animais atingem aproximadamente 10 semanas de idade. Estes estudos mostram que tanto o IRS-1 quanto o IRS-2 estão envolvidos no crescimento e exercem papel ativo no metabolismo de carboidratos. O IRS-2 também atua no desenvolvimento das células β e no papel hipoglicemiante periférico mediado pela insulina. O papel do IRS-3 é evidenciado quando se realiza um duplo *knockout* do IRS-1 e IRS-3, e nestes animais ocorre, além de hiperglicemia e hiperinsulinemia, lipoatrofia com conseqüente diminuição das concentrações de leptina e, portanto, diminuição da resposta anorexígena mediada por este peptídeo (NANDI *et al.*, 2004; WHITE, 1997; BIRNBAUM, 2001).

O papel no metabolismo glicídico da proteína transportadora GLUT-4 está bem evidenciado em animais com *knock-out* desta proteína em tecidos insulino-sensíveis como o músculo esquelético. Nesta situação, verifica-se o aparecimento de resistência à insulina, intolerância à glicose e um aumento significativo na síntese hepática de glicogênio. Nestes animais a avaliação do metabolismo glicídico através da técnica de *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico confirma que a resistência à insulina e a captação de glicose é, conforme esperada, muscular, mas também ocorre diminuição da captação hepática e adiposa de glicose, evidenciando o papel desta proteína na captação de glicose em todos os tecidos insulino-sensíveis (BIRNBAUM, 2001).

Animais diabéticos induzidos por dieta

Animais de laboratório podem ser mantidos em condições rigidamente controladas, consumindo dieta controlada e mantidos livres de patógenos e germes. O fato de animais de laboratório também se tornarem diabéticos espontaneamente, se alimentando de ração comercial, abriu novas áreas para pesquisa nesta área. Dietas com alto teor de carboidratos e/ou alto teor de lipídios, além da dieta de cafeteria, têm sido utilizadas para desenvolver obesidade e diabetes em ratos. O rato *Sand* e a linhagem de camundongos C57Bl/6 são exemplos importantes de modelos de obesidade e diabetes tipo 2 induzidos por dieta (SRINIVASAN & RAMARAO, 2007).

Os ratos *Sand* permanecem normais em seu habitat natural, mas desenvolvem a obesidade e diabetes no cativeiro quando alimentados com dieta de alta energia em vez de sua dieta vegetal usual de baixa energia. Inicialmente, esse modelo desenvolve hiperfagia, obesidade, hiperinsulinemia, intolerância à glicose, seguido por degeneração e necrose das células beta pancreáticas resultando na deficiência profunda de insulina e evidente diabetes que conduz à morte do animal. Esses animais são muito úteis em testes de drogas, tendo sido utilizados no estudo da proteína inibitória tirosina fosfatase e análogos de GLP-1 (*glucagon like peptide-1*) (SRINIVASAN & RAMARAO, 2007).

Camundongos saudáveis da linhagem C57Bl/6 se tornam obesos quando alimentados com ração de alto teor de gordura, além de apresentar hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperlipidemia. Desenvolvem também resistência periférica à leptina e manifestam a maioria das características dos pacientes com predisposição genética para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 quando se tornam obesos. Este modelo animal representa os fatores de risco tanto genéticos quanto ambientais, em contraste com o camundongo *ob/ob*, nos quais os sintomas são geneticamente determinados (SRINIVASAN & RAMARAO, 2007; CESARETTI & KOHLMANN, 2006).

Na tentativa de desenvolver modelos experimentais que permitam o estudo da obesidade e suas conseqüências, esta alta ingestão de ácidos graxos saturados é

muito interessante, visto que já foi demonstrada a contribuição deste tipo de gordura no prejuízo da sensibilidade à insulina decorrente da obesidade (HUNNICUTT *et al.*, 1994; PARKER *et al.*, 1993). Esta alteração insulinêmica parece ter alta correlação com outras doenças associadas, como hipertensão, dislipidemia e aterosclerose. Pereira e cols. desenvolveram uma ração hiperlipídica com alto teor de ácidos graxos saturados, com base nos dados de ingestão alimentar de mulheres obesas brasileiras. Esta ração foi capaz de gerar obesidade e intolerância à glicose em ratas *wistar* saudáveis, permitindo assim o estudo das conseqüências deste consumo alimentar, característico da sociedade moderna (PEREIRA *et al.*, 2003).

Outros estudos utilizaram a dieta de cafeteria, quando vários alimentos normalmente encontrados em supermercados (como biscoitos, chocolate, salame, queijo etc.) são colocados à disposição dos animais. Esta técnica tinha como objetivo aproximar o consumo dos ratos do consumo feito pelas sociedades modernas, onde grande parte das refeições é feita em cafeterias e *fast foods*, caracterizando uma ingestão com alto teor de gordura denominada de “dieta ocidental” (WHO, 1998; WHO 1990). De fato, alguns trabalhos demonstram aumento da quantidade de gordura em animais alimentados com este tipo de ração, mas algumas limitações são encontradas neste tipo de alimentação (PEREIRA *et al.*, 2003). A dificuldade em medir a ingestão e a variabilidade na seleção dos nutrientes entre os animais submetidos a esta alimentação tem sido motivo de muita controvérsia (ARGILÉS, 1988).

Estas predisposições genéticas para o desenvolvimento da obesidade e diabetes através de dietas com alta densidade energética servem como modelos mais realistas e apropriados para o estudo do diabetes tipo 2 humana do que a alteração de um único gene. Através da utilização de modelos como esses foi possível ampliar bastante o conhecimento sobre diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento do diabetes tipo 2, e as conseqüências endócrinas e metabólicas desta doença.

Animais com diabetes quimicamente induzida

Diabetes quimicamente induzido em animais tem sido amplamente empregado como modelo experimental para os estudos das complicações causadas pelo diabetes. Vários agentes químicos são citotóxicos para as células beta do pâncreas, porém apenas o aloxane e a estreptozotocina (STZ) têm sido sistematicamente investigados e são amplamente empregados para induzir diabetes nos animais.

O aloxano é uma pirimidina com estrutura semelhante ao ácido úrico e à glicose. Em 1943, a propriedade diabetogênica do aloxano foi descoberta e o diabetes foi induzido com sucesso em ratos (DUNN & MCLETCHI, 1943), coelhos (GILLILAND & MENCER, 1951), e cães (WRENSHALL *et al.*, 1950) administrados com essa droga. Diabetes aloxânico foi induzido também em outras espécies animais, incluindo gatos, ovelhas, macacos, porcos e camundongos. No entanto, porcos da Índia (*guinea pigs*) se mostraram completamente resistentes à indução de diabetes pelo aloxano (JOHNSON, 1950). Durante as décadas subseqüentes, a literatura sobre o aloxano como agente diabetogênico tornou-se ampla e extensivamente revisada (RERUP 1970; MORDES & ROSSINI, 1981).

A estreptozotocina (STZ), isolada do *Streptomyces achromogenes*, é efetiva contra organismos gram-positivos e gram-negativos e sua ação anti-tumoral foi descrita por Evans e colaboradores (EVANS *et al.*, 1965). Rakieten e colaboradores relataram que a injeção intravenosa de soluções de STZ induzia diabetes em ratos e cães (RAKIETEN *et al.*, 1963). Desde então, o diabetes tem sido induzido com sucesso em ratos (EVANS *et al.*, 1965; JUNOD *et al.*, 1969), porcos da Índia (BROSKY & LOGOTHETOPOULOS, 1969), camundongos (EVANS *et al.*, 1965; BROSKY & LOGOTHETOPOULOS, 1969), macacos (PITKIN & REYNOLDS, 1970), e cães (RAKIETEN *et al.*, 1963). Porém, coelhos se mostraram resistentes à ação diabetogênica da STZ (KUSHNER *et al.*, 1969).

Os mecanismos de ação do aloxano e da STZ ainda não são completamente compreendidos (MORDES & ROSSINI, 1981; MALAISSE, 1982), mas algumas

características gerais podem ser aferidas. O local de sua ação diabetogênica é a célula beta do pâncreas, sendo a ligação dessas substâncias muito rápida. Ambos, aloxano e STZ, podem ser seletivamente direcionados para as células produtoras de insulina devido à especial capacidade dessas células em reconhecer e metabolizar glicose rapidamente. Estruturalmente, o aloxano é similar à glicose e a STZ é uma glicose com uma cadeia lateral altamente reativa (MANSFORD & OPIE, 1968; VELEMINSKY *et al.*, 1970). Parece então razoável que, alguns açúcares transportáveis, interfiram com a toxicidade de ambos agentes.

Estreptozotocina é atualmente a droga mais popular para a indução do diabetes em ratos e camundongos. A administração de STZ em ratos adultos produz diabetes severa que muitas vezes necessita de administração de insulina quando os ratos precisam sobreviver por longo período. Por outro lado, ratos recém nascidos tratados com STZ desenvolvem hiperglicemia leve a moderada na idade adulta, assemelhando-se ao NIDDM (*non-insulin-dependent diabetes mellitus*) (PORTHA *et al.*, 1989). Embora ambos os tipos de diabetes induzidos pela STZ sejam amplamente utilizados, existem alguns problemas para experimentos crônicos, especialmente recuperação espontânea da hiperglicemia pelo desenvolvimento de insulinoma funcional (STEINER *et al.*, 1970; YAMAGAMI *et al.*, 1985; IWASE *et al.*, 1991) e alta incidência de tumores no fígado e nos rins (ARISON; FEUDALE, 1967, MAUER *et al.*, 1974; IWASE *et al.*, 1989). Esses problemas são devidos à forte ação oncogênica da STZ (KAZUMI *et al.*, 1978). Já o aloxano tem pequena ação oncogênica (YAMAGAMI *et al.*, 1985), mas é menos empregada que esta, devido às dificuldades mostradas por alguns grupos de pesquisa em induzir o diabetes e manter os animais em boas condições.

Modelos experimentais em que os fatores genéticos estão homogêneos e os ambientais podem ser controlados, é conseqüentemente um artigo de valor na sedimentação dos conhecimentos de doenças multifatoriais. É importante lembrar que, apesar da existência de diferentes modelos experimentais para diabetes, uma

caracterização insuficiente de alguns modelos faz com que fique difícil a escolha do modelo certo para um determinado estudo, e um erro nesta etapa pode levar a condução de uma interpretação errônea dos dados ou até mesmo a conclusões erradas.

1.6 – Células-tronco

1.6.1 - Características gerais

As células-tronco (CT) representam atualmente um dos ramos mais intrigantes da pesquisa biomédica, graças à possibilidade de aplicação destas no reparo de tecidos e lesões em amplo espectro de doenças. O seu estudo tem aprofundado o conhecimento sobre o desenvolvimento de um organismo e dos processos que orientam a formação, manutenção e reparo de tecidos (MIMEAULT *et al.*, 2007; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH – NIH, 2007). Tão rapidamente quanto os conhecimentos gerados, surgem novas dúvidas e perguntas a serem respondidas, o que impulsiona as pesquisas.

Células-tronco são células indiferenciadas e não-especializadas, com potencial prolongado ou ilimitado de auto-renovação e capazes de se diferenciar em ao menos um tipo celular (WATT & HOGAN, 2000; ZAGO, 2006). Elas são consideradas não-especializadas devido à ausência de estruturas específicas de tecidos, que permitiriam a realização de funções especializadas. Entretanto, podem originar células especializadas através do processo de diferenciação (NIH, 2007). Durante esse processo, entre a célula-tronco e a célula altamente diferenciada normalmente ocorre uma população de células progenitoras com capacidade proliferativa e potencial de diferenciação limitados. A função dessas células pode ser aumentar o número de células diferenciadas decorrentes de cada divisão da CT (WATT & HOGAN, 2000).

Diferentemente de muitos tipos celulares altamente especializados, as CT podem se replicar inúmeras vezes, mantendo o *pool* de células indiferenciadas

durante um longo período. Os fatores e condições que permitem a manutenção do estado indiferenciado, bem como aqueles que induzem a diferenciação, têm sido muito estudados. Eles são compostos por sinais internos (genes da própria célula) e externos (substâncias secretadas por outras células, contato com células vizinhas, moléculas que ocorrem em determinados microambientes) (NIH, 2007). A interação entre esses fatores determina se a célula permanece quiescente ou entra em divisão celular, o que pode ocorrer através de duas estratégias. A primeira é a determinística, onde a célula-tronco invariavelmente passa pela sua divisão assimétrica característica, gerando outra CT e uma célula que irá se diferenciar. A segunda estratégia é conhecida como estocástica ou aleatória. Nela, ocorrem apenas divisões simétricas: parte da população de CT origina apenas células indiferenciadas para manter o *pool*, enquanto outra parte gera apenas células que se diferenciarão (RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2004; WATT & HOGAN, 2000).

Wagers e Weissman (2004) classificam as células-tronco de acordo com o seu potencial de originar células diferenciadas (Figura 1). Células totipotentes são aquelas capazes de originar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, correspondendo à célula ovo e às resultantes das suas primeiras divisões. As CT pluripotentes são aquelas com capacidade para gerar todos os tecidos dos três folhetos embrionários do organismo, como é o caso das CT embrionárias. As multipotentes são capazes de originar um subconjunto de linhagens celulares e as oligopotentes, um subconjunto mais restrito. Por fim, células unipotentes apresentam capacidade para originar apenas um tipo de célula madura.



Figura 1. Classificação das células-tronco segundo Wagers e Weissman (2004).

Os autores classificam as CT de acordo com seu potencial de desenvolvimento. Plasticidade é a capacidade de diferenciação da célula-tronco em diferentes tipos celulares. Fonte: TRUCCO, 2005.

1.6.2 - Células-tronco embrionárias

Células-tronco embrionárias são aquelas derivadas da massa celular interna do blastocisto de mamíferos, que está comprometida com a formação de todo o organismo. (COWAN *et al.*, 2004; RIPPON & BISHOP, 2004; ZATZ, 2004). Elas podem ser coletadas e cultivadas em laboratório, representando uma alternativa de modelo para o estudo de desenvolvimento humano, além das perspectivas de sua utilização terapêutica (DONOVAN & GEARHART, 2001).

Thomson *et al.* (1998) propuseram três características essenciais às CT embrionárias: derivam do embrião em fase de pré-implantação no útero, são capazes de proliferar de forma indiferenciada e prolongada e possuem estabilidade para gerar células derivadas dos três folhetos embrionários, mesmo após cultivo prolongado.

A pluripotência dessas células é evidenciada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No primeiro caso, inúmeros experimentos mostram a diferenciação da CT embrionária em linhagens celulares dos três folhetos embrionários: endoderme, ectoderme e mesoderme (DONOVAN & GEARHART, 2001). *In vivo*, duas demonstrações da pluripotência são utilizadas. A reintrodução das CT embrionárias em blastocistos murinos origina células de todos os tecidos do adulto, inclusive da linhagem

germinativa. Além disso, quando injetadas indiferenciadas em camundongos imunodeficientes, se multiplicam e diferenciam formando tumores com tipos celulares dos três folhetos germinativos, os teratomas (PEREIRA, 2006; RIPPON & BISHOP, 2004).

Ainda que não sejam utilizadas na clínica até o momento, as células-tronco embrionárias desempenham um papel importante como instrumento de pesquisa. A partir delas pode-se gerar modelos animais, através do desenvolvimento de camundongos transgênicos, e modelos de diferenciação *in vitro* (PEREIRA, 2006). Estudos da diferenciação *in vitro* das CT embrionárias humanas podem levar à identificação de possíveis genes-alvo para novas drogas a serem utilizadas em terapia regenerativa ou contra compostos tóxicos e/ou teratogênicos (THOMSON *et al.*, 1998).

1.6.3 - Células-tronco somáticas

Tecidos fetais e adultos apresentam células-tronco com capacidade de diferenciação limitada em relação às embrionárias, ainda assim bastante promissoras do ponto de vista clínico (MIMEAULT *et al.*, 2007). Para fins terapêuticos, CT somáticas podem ser obtidas de medula óssea, sangue periférico, sangue de placenta e cordão umbilical, CT mesenquimais adultas cultivadas e até tecidos fetais, em caso de aborto (ZAGO, 2006).

As CT adultas ocorrem na maioria dos tecidos e são responsáveis pela manutenção da sua integridade através de processos de reparo e remodelação (ZAGO, 2006). Para tal, acreditava-se que elas seriam capazes de se diferenciar apenas em células de tecidos relacionados ao seu tecido de origem. Porém, um número crescente de evidências tem se acumulado indicando uma maior plasticidade dessas células, o que representaria uma grande perspectiva terapêutica (BLAU *et al.*, 2001; JACKSON *et al.*, 2002). A possível multi ou pluripotencialidade das CT adultas começou a ser evidenciada no final da década de 1990, quando cientistas detectaram a migração de CT de medula óssea para o músculo esquelético, participando da sua regeneração (FERRARI *et al.*, 1998).

As células-tronco de medula óssea são as CT adultas mais bem conhecidas. A medula óssea contém células-tronco hematopoéticas e mesenquimais (DOMEN *et al.*, 2006; JACKSON *et al.*, 2002; KRAUSE, 2002). A CT hematopoética (CTH) foi a primeira a ser descrita, é a melhor compreendida e mais amplamente aplicada em protocolos clínicos. Elas são células de fácil acesso (sangue periférico, medula óssea e sangue de cordão umbilical) e precursoras de toda a linhagem hematopoética (NARDI & ALFONSO, 2006). Representam de 0,05% a 0,5% do total de células da medula óssea (NARDI & ALFONSO, 2006) e o seu número depende do balanço entre auto-renovação, diferenciação, migração e apoptose (DOMEN *et al.*, 2006). As CTH são heterogêneas do ponto de vista morfológico, sendo identificadas por parâmetros funcionais (NARDI & ALFONSO, 2006).

As células-tronco de medula óssea são usadas clinicamente desde 1959, em transplantes de medula óssea (DOMEN *et al.*, 2006). A real plasticidade dessas células vem sendo melhor estudada, de forma que a sua aplicação clínica pode ser ampliada. Um dos mais importantes trabalhos nesse sentido foi publicado por Krause e colaboradores em 2001. Eles observaram a diferenciação de células epiteliais do fígado, pulmão, trato gastro-intestinal e pele. Estudos revelam a contribuição das CTH para células musculares esqueléticas (FERRARI *et al.*, 1998) e cardíacas (ORLIC *et al.*, 2001), pancreáticas (IANUS *et al.*, 2003), cerebrais (EGLITIS & MEZEY, 1997) e de parênquima hepático (PETERSEN *et al.*, 1999).

As células-tronco mesenquimais constituem apenas cerca de 0,001% a 0,01% das células nucleadas da medula óssea, mas são aderentes e podem ser expandidas em cultura. Elas são capazes de originar células do tecido conjuntivo, tais como adipócitos, osteoblastos, condrócitos e células do estroma medular (COVAS, 2006). O entusiasmo da comunidade científica com essas células-tronco é em grande parte devido à descoberta da MAPC ("*multipotent adult progenitor cells*") por Jiang e colaboradores (2002). Estas células são capazes de se diferenciar em endotélio,

endoderme e ectoderme tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Quando injetadas em um blastocisto, participaram da formação de quase todos os tecidos somáticos.

1.6.4 - Plasticidade e mecanismos de ação

A plasticidade das células-tronco adultas se refere à capacidade de uma CT originar, além do tecido com o qual está comprometida (esperado), outros tecidos não esperados (HORWITS, 2003). Os mecanismos que permitem essa flexibilidade têm despertado crescente interesse da comunidade científica. Embora eles ainda não sejam bem esclarecidos, o microambiente parece desempenhar um papel fundamental, principalmente no caso de lesões (BLAU *et al.*, 2001; WATT *et al.*, 2000).

Wagers e Weissman (2004) abordam quatro possíveis explicações para a plasticidade das CT adultas: transdiferenciação, desdiferenciação, múltiplas CT, CT pluripotente e fusão celular (Figura 2). A transdiferenciação é a conversão da célula de uma linhagem de tecido em uma célula de linhagem completamente diferente, havendo perda de marcadores específicos e função da célula original e aquisição dos marcadores e função do novo tipo celular. Uma célula tecido-específica poderia também se desdiferenciar, tornando-se mais primitiva e multipotente para então se diferenciar em um novo tipo celular. Isso é observado em anfíbios, mas não há registros claros da sua ocorrência em mamíferos. Há ainda possibilidade de existirem múltiplas populações de CT, cada uma se diferenciando em tipos específicos ou até de existir uma célula pluripotente, capaz de se diferenciar em todos os tecidos. O último mecanismo seria a fusão da célula-tronco com células específicas de tecido.

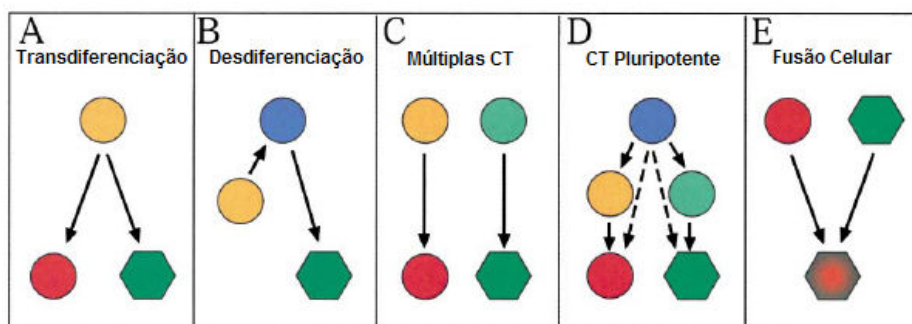


Figura 2. Possíveis mecanismos para justificar a plasticidade das células-tronco (CT) adultas. Círculos laranja e verde representam CT de tecido-específicas; círculos azuis, CT pluripotentes; círculos verdes, células diferenciadas da linhagem laranja e hexágonos verdes representam células diferenciadas da linhagem verde. Fonte: Wagers e Weissman (2004).

O mecanismo de ação das células-tronco nos tecidos durante a terapia ainda não é bem esclarecido. Evidências recentes indicam que ele envolveria três fenômenos distintos: transdiferenciação, fusão celular e efeitos parácrinos (VILAS-BOAS *et al.*, 2006). As primeiras duas opções ajudam a explicar a plasticidade das CT, conforme abordado. Na fusão entre CT transplantada e célula do hospedeiro, há a transferência de conteúdo celular, inclusive material genético (COLLINS *et al.*, 2007). De fato, a produção de células híbridas através de fusão ocorre espontaneamente *in vitro*, de forma que moléculas de uma célula podem reprogramar a expressão gênica da outra (MEDVINSKY & SMITH, 2003). O efeito parácrino consiste na liberação de citocinas e fatores de crescimento que podem estimular a proliferação e diferenciação no tecido do hospedeiro (COLLINS *et al.*, 2007).

1.7 - Células-tronco e diabetes

Muitas doenças, tais como o Parkinson e o diabetes juvenil, resultam da morte ou disfunção de um ou mais tipos celulares. A reposição dessas células representaria um tratamento possivelmente para toda a vida (THOMSON *et al.*, 1998). Nesse

contexto, as células-tronco têm desempenhado um papel fundamental. Elas vêm sendo usadas para reparar tecidos e órgãos lesados na chamada medicina regenerativa, que abre novas perspectivas para o tratamento de doenças crônico-degenerativas (RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2004).

Pacientes com diabetes tipo 2 podem, na maioria das vezes, controlar o seu nível de glicose através de mudanças de hábitos de vida, (dietas adequadas e prática de exercícios físicos) além do uso de fármacos hipoglicemiantes e anti-hiperglicemiantes (ZAGURY, 2005). Tanto os hipoglicemiantes orais (por exemplo: sulfoniluréias) quanto os sensibilizadores de insulina (metformina) costumam ser bem tolerados pelo paciente, acarretando poucas reações adversas, como hipoglicemia e flatulência. Os anti-hiperglicemiantes (como a acarbose) costumam estar associados a efeitos adversos mais graves e predominantemente gastrintestinais (flatulência, meteorismo e diarreia), levando a uma adesão fraca a este tipo de tratamento (RAMALHO & LIMA, 2006). Com o passar do tempo, mesmo com o uso de medicações, 30 a 50% dos casos irão precisar de insulinoterapia (FORTI *et al.*, 2006), e em geral os comprometimentos sistêmicos são inevitáveis. Sendo assim, a utilização de células-tronco desponta como uma alternativa no tratamento do diabetes.

A existência de células-tronco pancreáticas é bastante controversa. Alguns autores acreditam que elas residem entre as células diferenciadas dos ductos pancreáticos. Outros alegam que as próprias células do ducto são capazes de desdiferenciação para um estágio menos maduro capaz de se transformar em célula β (LOJUDICE *et al.*, 2006). A participação de uma possível CT pancreática na regeneração deste órgão ainda não é clara (BOUWENS & ROOMAN, 2005; TRUCCO, 2005).

Estudos mostram que células β pancreáticas podem ser originadas a partir de células tronco da medula óssea, tanto *in vivo* (SORIA, 2001) quanto *in vitro* (IANUS *et al.*, 2003), porém, a sua capacidade de transdiferenciação permanece controversa. Embora resultados experimentais sejam promissores, a maioria foi desenvolvida em

modelos de lesão pancreática com estreptozotocina ou pancreatectomia parcial. Ainda que haja um quadro de falência de células β no diabetes tipo 2, pouco se sabe sobre os efeitos da terapia celular ao longo do desenvolvimento dessa patologia. Além disso, poucos trabalhos analisam os efeitos da terapia nas lesões em outros órgãos, decorrentes do DM tipo 2. A investigação do potencial terapêutico dessas células em modelo murino induzido por dieta hipergordurosa (*high-fat*), que representa a maioria dos pacientes diabéticos é, portanto, de grande relevância.

2 - OBJETIVOS

2.1 – Geral

Desenvolver o modelo experimental de NASH e de indução do Diabetes *mellitus* tipo 2 em camundongos C57Bl/6 através da dieta hipergordurosa (*high-fat*) e avaliar o potencial da terapia celular baseada no transplante de células mononucleares da medula óssea na melhora das disfunções decorrentes dessa patologia.

2.2 – Específicos

- Desenvolver e caracterizar o modelo experimental de NASH baseado em dieta rica em gordura.
- Caracterizar o modelo experimental de DM2 baseado na dieta rica em gordura.
- Avaliar o efeito das células mononucleares de medula óssea na redução de alterações bioquímicas decorrentes do DM2.
- Determinar os efeitos da terapia celular nos tecidos-alvo dessa patologia.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Indução do diabetes e esteato-hepatite por dieta *high-fat*

Camundongos C57Bl/6 machos e fêmeas com 4 semanas de idade foram alimentados *ad libitum* com duas diferentes rações. Foi utilizado duas rações desenvolvidas pela *Research Diets* (*high-fat* e *low-fat*). Um grupo de animais foi submetido a uma dieta hipergordurosa e hipercalórica (*high-fat*) por um período mínimo de 25 semanas e máximo de um ano, para avaliação da indução de obesidade, diabetes tipo 2 e esteatohepatite. O restante foi mantido em dieta *low-fat*, de mesma composição que a *high-fat*, porém menor teor calórico e gordura. Os animais foram separados de forma randômica. A composição das rações está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Composição das rações *high-fat* e *low-fat*.

Produto	<i>Low-fat</i>		Produto	<i>High-fat</i>	
	gm%	kcal%		gm%	kcal%
Proteína	16.8	16.4	Proteína	23.0	16.4
Carboidrato	74.3	73.1	Carboidrato	35.5	25.5
Gordura	4.8	10.5	Gordura	35.8	58.0
total	4.07	100.0	total	5.56	100.0

As rações *high-fat* e *low-fat* foram desenvolvidas por Richard Surwit em 1992. Fonte: www.researchdiets.com

Durante todo o projeto, a cada 3 meses novos grupos eram submetidos à dieta. Foram feitos 5 experimentos com indução e terapia celular em tempos diferentes, somando um total de 149 animais (119 machos e 30 fêmeas) (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos experimentos quanto as suas características.

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5
Nº de animais no início do experimento	60 animais 20 low-fat (10 machos e 10 fêmeas) 40 high-fat (20 machos e 20 fêmeas)	30 animais 10 low-fat 20 high-fat	15 animais 5 low-fat 10 high-fat	14 animais 4 low-fat 10 high-fat	30 animais 8 low-fat 22 high-fat
Sexo dos animais	Macho e fêmeas	Macho	Macho	Macho	Macho
Tempo de indução	25 semanas	25 semanas	25 semanas	29 semanas	30 semanas
Nº de doses	2 doses com intervalo de 15 dias	2 doses com intervalo de 15 dias	2 doses com intervalo de 15 dias	2 doses com intervalo de 15 dias	2 doses com intervalo de 15 dias
Nº de célula injetada / dose	1,0 X 10 ⁷ células mononucleares da medula óssea	1,0 X 10 ⁷ células mononucleares da medula óssea	1,0 X 10 ⁷ células mononucleares da medula óssea	1,0 X 10 ⁷ células mononucleares da medula óssea	1,0 X 10 ⁷ células mononucleares da medula óssea
Via de injeção	Plexo orbital	Plexo orbital	Plexo orbital	Plexo orbital	Plexo orbital
Sacrifício pós terapia celular	3 e 6 meses	1, 3 e 6 meses	4 meses	6 meses	3 meses

3.2 – Caracterização do modelo

Durante todo o período de indução do modelo, os animais foram monitorados quanto ao peso corporal, glicose em jejum, parâmetros bioquímicos do plasma, tolerância à glicose e proteinúria (Figura 3).

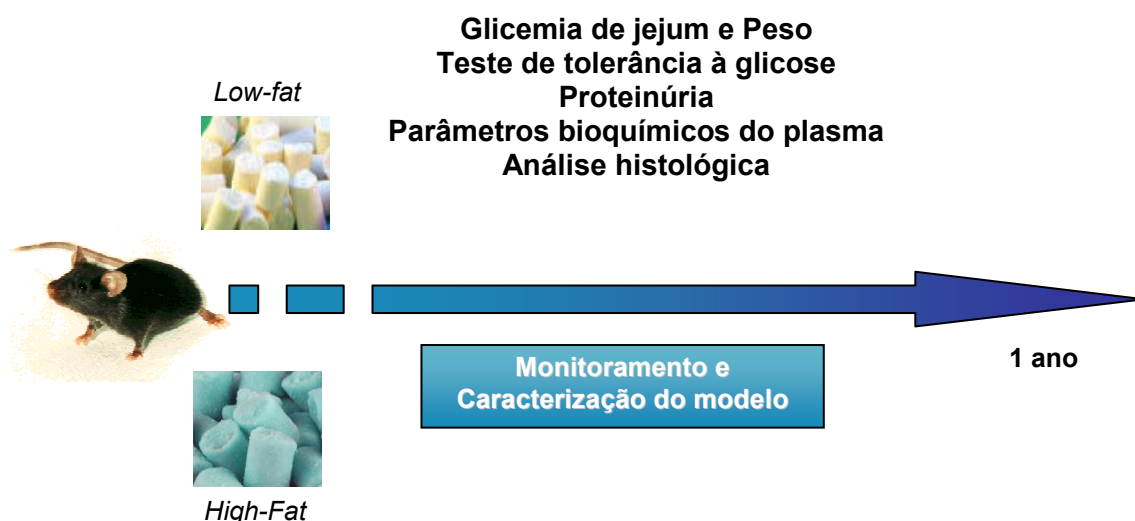


Figura 3: Representação esquemática do período de caracterização do modelo.

3.2.1 - Controle do peso corporal

O peso corpóreo foi acompanhado individualmente a cada 5 semanas. Medições individuais de peso foram obtidas com o auxílio de uma balança, de forma a acompanhar o seu aumento e desenvolvimento da obesidade. Os valores obtidos foram utilizados na construção da curva de ganho de peso corporal, no software Graph Pad Prism 4.0.

3.2.2 – Dosagem glicêmica no sangue

O nível de glicose sanguínea foi mensurado após um período de 7 horas de jejum, com amostras de sangue da ponta da cauda do camundongo e leitura em um glicosímetro Accu-check (Roche). As mensurações para dosagem glicêmica e peso corpóreo foram realizadas individualmente a cada 5 semanas durante o período de indução. Os valores obtidos foram utilizados na construção da curva de glicemia, no software Graph Pad Prism 4.0.

3.2.3 - Parâmetros bioquímicos do plasma

Amostras de sangue foram também coletadas durante o sacrifício dos camundongos, ao final do experimento. Elas foram encaminhadas para análise bioquímica no aparelho Vitros® 950 Chemistry System (Ortho-Clinical Diagnosis – Johnson & Johnson company) no Hospital São Rafael, Bahia. Foram mensurados os níveis de colesterol total, triglicerídeos, alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), a fim de avaliar a alteração no quadro clínico decorrente da indução da obesidade, diabetes e esteatohepatite. Os valores obtidos foram utilizados na construção dos gráficos em barra com os dados de cada parâmetro em pontos específicos, no software Graph Pad Prism 4.0.

3.2.4 - Teste de tolerância à glicose

Os testes de tolerância à glicose foram realizados durante o desenvolvimento do modelo, a fim de avaliar a intolerância à glicose e resistência à insulina, características do DM2. Para tal, os camundongos foram mantidos em jejum durante 4 horas, sendo injetada, após esse período, uma solução estéril de salina contendo 2 g de glicose/kg de peso do animal, via intraperitoneal. Amostras de sangue da cauda foram colhidas nos períodos de 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção de glicose (Sigma, St. Louis, MO, EUA), para a medição dos níveis de glicose em glicosímetro Accu-check (Roche).

3.2.5 - Dosagem de proteinúria

Amostras de urina foram coletadas em diferentes momentos da indução (7, 13 e 19 semanas), a fim de se determinar a presença de proteinúria, indicativa de uma possível lesão renal. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas durante 24 horas, sendo coletadas amostras de urina ao final desse período. A determinação quantitativa da proteinúria dessas amostras foi realizada através do teste diagnóstico Sensiprot (Labtest, Brasil). Os valores obtidos foram utilizados na construção dos gráficos em barra com os dados da proteinúria nos pontos específicos, com o software Graph Pad Prism 4.0.

3.2.6 – Sacrifício e análise histológica

Os animais foram acompanhados durante um ano de indução do modelo e foram sacrificados em pontos de 0, 6, 9, 10 e 12 meses (Figura 4). Durante o sacrifício, foram retirados pâncreas, rim, fígado e coração para verificar alterações histopatológicas. Os tecidos foram fixados em formol 10% e inclusos em blocos de parafina. As secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliação das lesões hepáticas, pancreáticas e renais.



Figura 4: Representação esquemática dos sacrifícios e análise histológicas.

Para o estudo do colágeno, foi realizada coloração pelo picro-sirius vermelho, tricrômico de Masson e reticulina, nas secções hepáticas. O tecido fibroso foi quantificado através da seleção aleatória de cinco áreas de cada secção, que foram digitalizadas para realização de morfometria semi-automática, usando o programa Image Pro (Media Cybernetics), nas secções coradas com picro-sirius vermelho e contra-coradas com *fast green*.

3.3 - Transplante de células mononucleares de medula óssea

Após o período de indução e caracterização do modelo, um grupo de camundongos alimentados com a ração *high-fat* foi submetido ao transplante de células mononucleares de medula óssea, enquanto o outro recebeu salina.

Para a obtenção das células mononucleares, camundongos C57Bl/6 transgênicos para EGFP, com 4 a 6 semanas de idade, foram sacrificados e tiveram o fêmur e a tíbia extraídos. As epífises desses ossos foram cortadas e as células da medula deslocadas com agulha e seringa contendo meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Hyclone, Logan, UT, EUA) suplementado com 50 µg/mL (Sigma), procedendo as lavagens e centrifugações. Foi realizada, então, a purificação das células mononucleares através da centrifugação em gradientes de Ficoll-Hypaque 1077 g/mL e 1119 g/mL (500 µL de cada) a 400 g, a 25°C, durante 15 minutos. Por fim, as células foram suspensas em solução salina e contadas em microscópio óptico. Foi analisada a sua viabilidade por exclusão em azul de Trypan.

Uma vez isoladas e contadas, aproximadamente $1,0 \times 10^7$ células mononucleares da medula óssea foram injetadas na circulação sanguínea de cada camundongo através do plexo orbital, em um volume total de 200 µL. Quinze dias após, foi realizado um novo transplante, seguindo a mesma metodologia. A dieta *high-fat* foi mantida após o transplante, até o sacrifício dos animais (Figura 5).

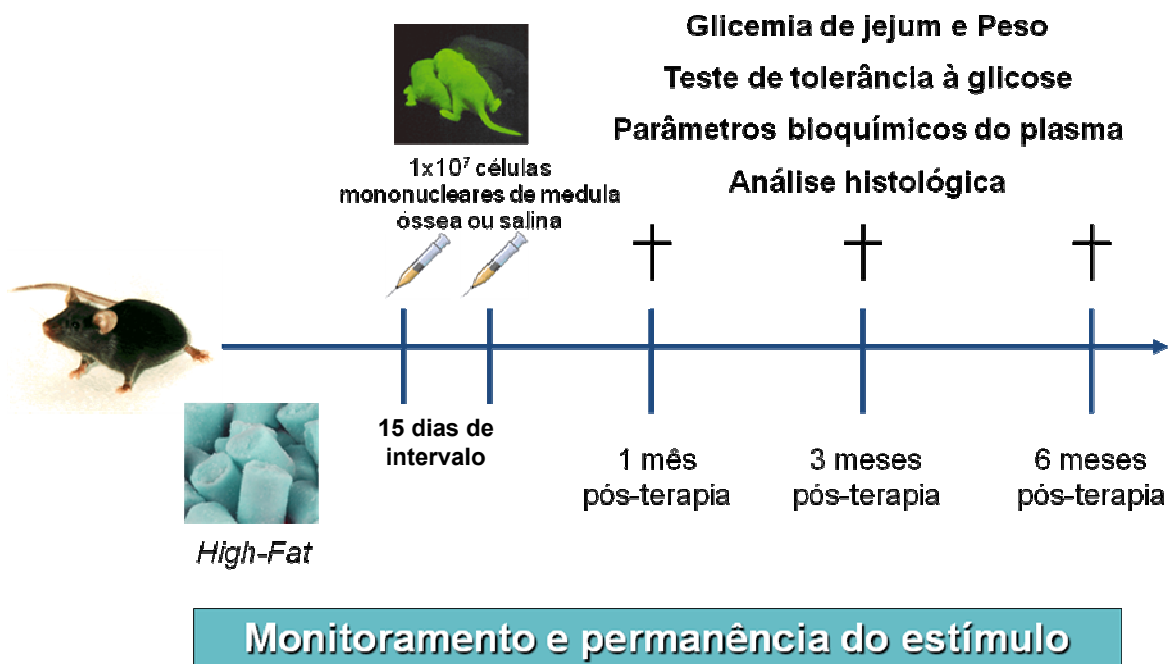


Figura 5: Representação esquemática do período de indução e terapia com células mononucleares de medula óssea.

3.3.1 – Citometria de fluxo

Uma amostra das células mononucleares de medula óssea utilizadas nos dois transplantes foi separada para caracterização por citometria de fluxo. As células obtidas a partir de fêmures e tíbias de camundongos C57Bl/6 transgênicos para GFP ressuspensas em solução salina tamponada (*phosphate buffered saline* – PBS) e azida 0,05% e, após contagem em câmara de Neubauer com líquido de Turk, 10^6 de células foram colocadas em um tubo no volume final de 100 μ L. Em cada tubo, marcar e incubar as células na presença de 100 μ L dos anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, CD117, CD45, CD44, CD34, CD90, CD11b, CD31, Sca-1 para caracterização fenotípica. Após 20 minutos de incubação no escuro e em temperatura de 4°C, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS e azida 0.05%, para retirar o excesso de anticorpos, e colocadas em tubos Falcon específicos para citometria de fluxo em um volume de 500 μ L. As células marcadas foram adquiridas no citômetro FACS Calibur (Becton Dickinson, Co, USA) e analisadas através do programa Cell Quest™ software (Becton Dickinson, Co, USA).

3.3.2 - Medições de peso corporal e parâmetros bioquímicos do plasma

A glicemia e o peso corpóreo foram acompanhados individualmente e com a mesma metodologia utilizada para o período de caracterização do modelo experimental. Amostras de sangue foram também coletadas durante o sacrifício dos camundongos, ao longo do período de acompanhamento e ao final do experimento. Essas amostras foram encaminhadas para análise bioquímica no Hospital São Rafael, utilizando os mesmo aparelhos de medição descritos na caracterização do modelo. Foram mensurados: glicose pós-prandial, colesterol total, triglicerídeos, alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), a fim de avaliar os efeitos da terapia nos animais.

3.3.3 - Teste de tolerância à glicose

Os testes de tolerância à glicose foram realizados durante a indução do diabetes e após o transplante, utilizando a mesma metodologia descrita na caracterização do modelo.

3.3.4 – Sacrifício e análise histológica

Os animais tratados com células mononucleares de medula óssea foram acompanhados durante 6 meses após o transplante. Representantes de cada um dos grupos (tratados com células mononucleares ou com salina) foram sacrificados em pontos de um, três e seis meses pós-transplante. Durante o sacrifício, foram retirados pâncreas, rim, fígado e coração para verificação de alterações histopatológicas. Os tecidos foram fixados em formol 10% e inclusos em blocos de parafina. As secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliação das lesões hepáticas, pancreáticas e renais. Foi realizada também coloração pelo picro-sírius vermelho, tricrômico de Masson e reticulina, nas secções hepáticas para estudo do colágeno. O tecido fibroso foi quantificado através da seleção aleatória de cinco áreas, que foram digitalizadas para realização de morfometria semi-automática, usando o programa Image Pro (Media Cybernetics), nas secções coradas com picro-sírius vermelho.

3.4 - Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva para a exposição dos resultados obtidos em tabelas ou gráficos. Medidas descritivas como mínimo, máximo, média e desvio padrão foram utilizadas. A comparação das variáveis quantitativas foi realizada através do teste *t* de Student para amostras independentes ou o teste de Análise de Variância (ANOVA). As conclusões foram obtidas considerando sempre o nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 4.0.

4 – RESULTADOS

4.1 – Caracterização do modelo

O modelo experimental de diabetes *mellitus* tipo 2 e esteatohepatite por dieta *high-fat* foi padronizado em camundongos C57Bl/6 machos e fêmeas. Para caracterizar o modelo, foi realizado um monitoramento que incluiu medições periódicas de glicemia e peso corpóreo, análises de proteinúria, testes de tolerância à glicose e sacrifícios em pontos 0, 6, 9, 10 e 12 meses para análise histológica dos órgãos.

4.1.1 - Peso e glicemia

Camundongos fêmeas submetidas à dieta *high-fat* não progrediram para a hiperglicemia (dados não mostrados) e obesidade (Figura 6) após o período de indução. A resistência das fêmeas ao desenvolvimento da obesidade e hiperglicemia foi também evidenciada nas análises bioquímicas e morfológicas dos tecidos retirados no sacrifício após o período de indução, nos quais não foram detectadas alterações (dados não mostrados). Diante desses resultados, os experimentos descritos a seguir foram realizados apenas com camundongos machos.

O ganho de peso e o aumento no nível de glicose plasmática foram significativos nos camundongos machos alimentados com a ração *high-fat* quando comparados aos camundongos alimentados com a ração *low-fat*. Após 10 semanas de indução, a diferença de glicemia e peso entre os grupos já era significativa, e esse resultado foi o mesmo em todos os cinco experimentos. A progressão desses parâmetros ao longo do período de indução pode ser observada nas figuras 7, 8 e 9, assim como a diferença no tamanho dos animais entre os grupos e o acúmulo de tecido adiposo intraperitoneal observado nos animais do grupo *high-fat*.

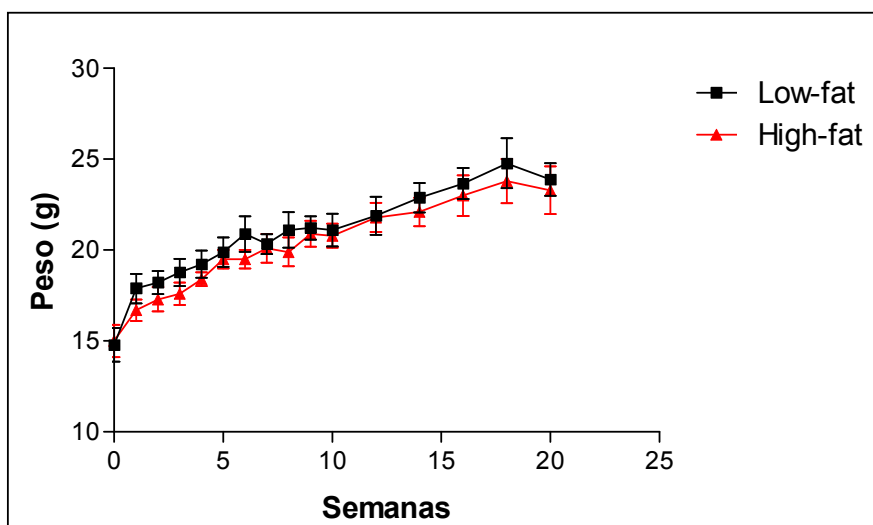


Figura 6. Peso corpóreo das fêmeas durante o período de indução. O ganho de peso foi semelhante em fêmeas alimentadas com ração controle e *high-fat* durante 20 semanas. Número de animais: total de 30 animais (*high-fat*=20 animais e *low-fat*=10 animais). Valores representam a média± SEM de 10-20 animais por grupo. $p>0,05$.

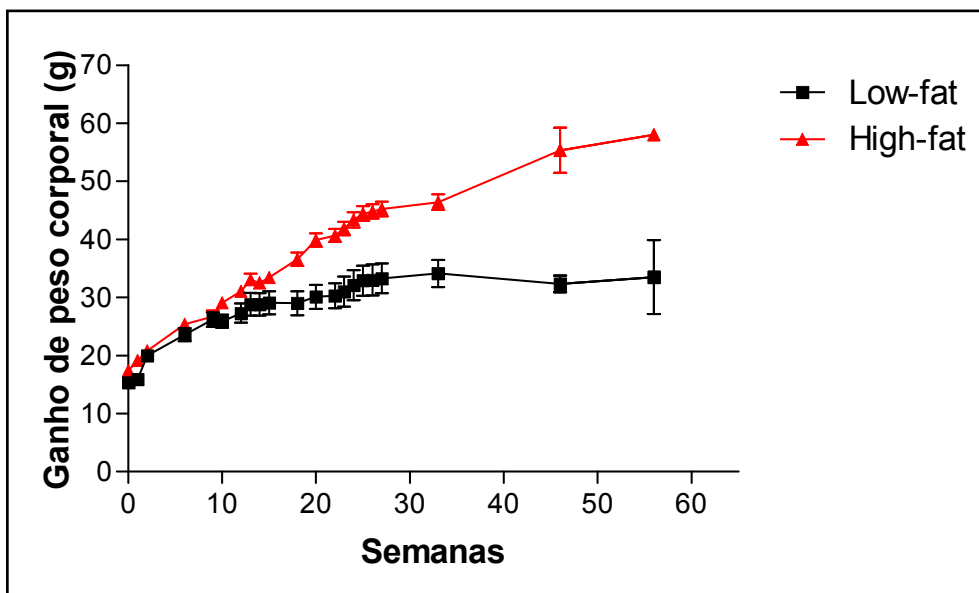


Figura 7. Aumento de peso nos camundongos machos durante período de indução com dieta. Machos alimentados com ração controle e *high-fat* durante o período de 28 semanas de indução. Os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa a partir da décima semana sob alimentação das respectivas rações. Valores representam a média \pm SEM de 10-14 animais por grupo. $p < 0,05$.

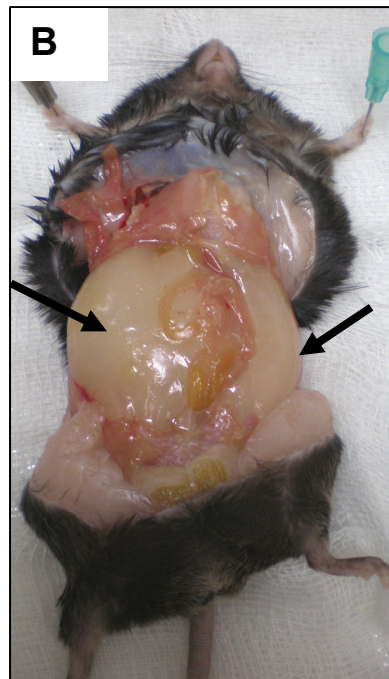
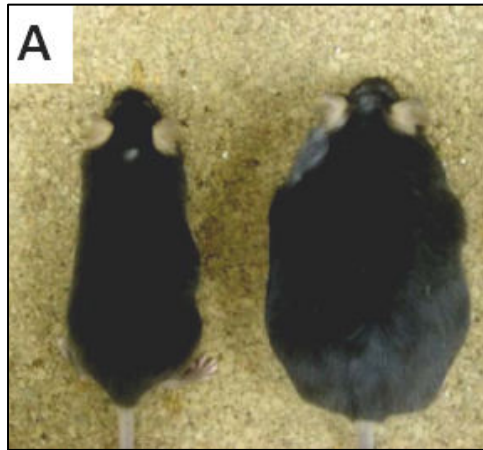


Figura 8. Acúmulo de tecido gorduroso em camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta *high-fat*. (A) Camundongos após 12 meses de alimentação com as rações *low-fat* (esquerda) e *high-fat* (direita). (B) A seta indica o acúmulo de tecido adiposo intraperitoneal após 12 meses de dieta *high-fat*.

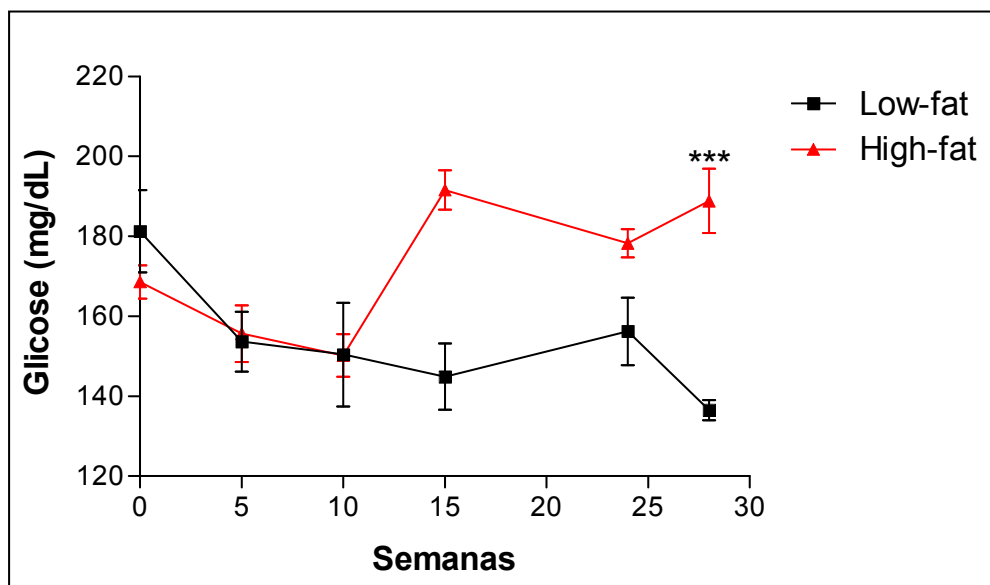


Figura 9. Glicemia de jejum nos camundongos machos durante o período de indução. Aumento dos níveis de glicose no sangue dos camundongos alimentados com ração *high-fat* durante 28 semanas de indução. Valores representam a média±SEM de 9-10 animais por grupo. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos a partir da décima semana da indução, e na vigésima oitava semana apresentaram um valor de *** $p < 0,0001$.

4.1.2 - Tolerância à glicose

Testes de tolerância à glicose foram realizados durante o período de indução do modelo, visando identificar se os camundongos apresentavam intolerância à glicose e uma possível resistência à insulina características do DM2. Após 15 semanas de alimentação com as rações, os animais de ambos os grupos ainda mostravam uma tolerância normal à glicose, reduzindo o nível plasmático de glicose rapidamente após a sua administração (Figura 10A). No entanto, após cinco semanas, observou-se uma intolerância significativa dos animais submetidos à dieta *high-fat*, representada pela dificuldade de se reduzir a glicemia tão rapidamente como na dosagem anterior (Figura 10B). Todos os cinco experimentos apresentaram o mesmo padrão alterado de intolerância à glicose após 20 semanas de alimentação com a ração *high-fat*.

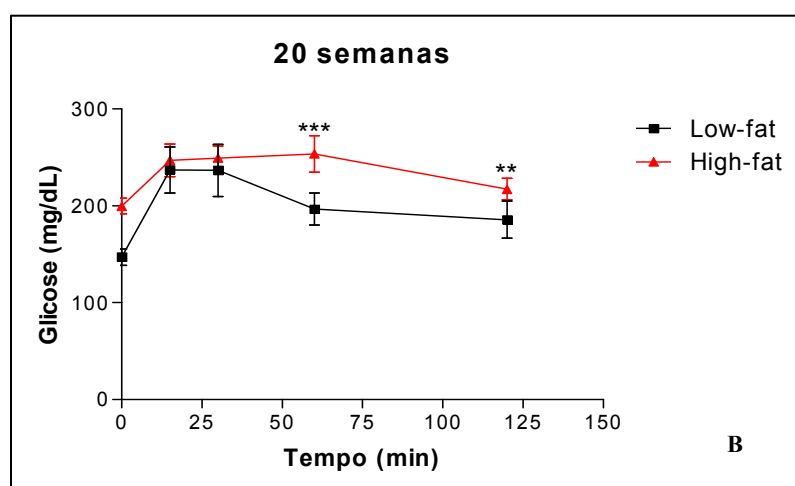
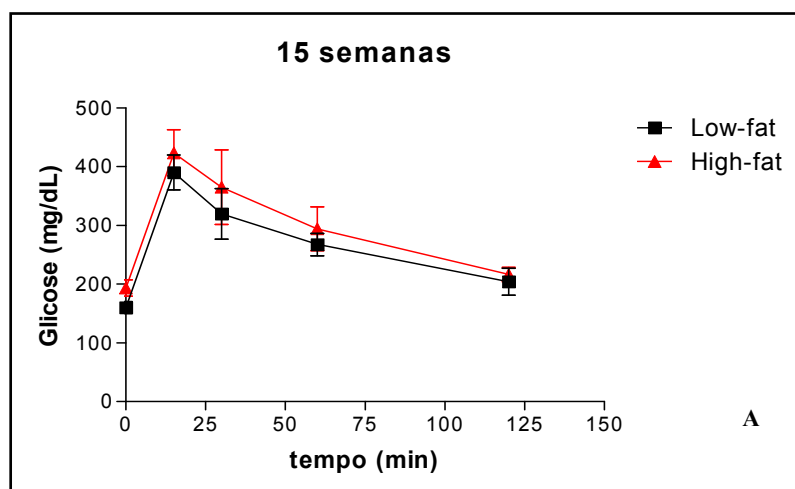


Figura 10. Teste de tolerância à glicose nos machos durante o período de indução. (A) Após 15 semanas de dieta os grupos não apresentaram diferença significativa, sendo valor de $p=0,6267$. (B) Após 20 semanas o grupo high-fat mostra-se intolerante à glicose. Nos pontos de 60 e 120 minutos, os grupos apresentaram diferença estatisticamente significante (***, $p=0,0001$ e **, $p=0,0029$). Valores representam a média \pm SEM de 10-14 animais por grupo.

4.1.3 - Proteinúria

Amostras de urina foram coletadas com o auxílio de gaiolas metabólicas em diferentes momentos da indução para dosagens de proteinúria, a fim de se detectar uma possível disfunção renal. As análises de proteinúria não apresentaram alteração após o período de 7 semanas de indução (Figura 11A). Na dosagem de 13 semanas, os resultados já indicam uma diferença significativa entre os grupos, sendo que o grupo controle apresentou menor concentração de proteínas totais na urina (Figura 11B). Essa significância foi mantida na dosagem seguinte, com 19 semanas de indução, apesar do grupo *high-fat* apresentar uma pequena redução da proteinúria em relação aos valores da dosagem anterior. (Figura 11C). Esse padrão se repetiu em todos os cinco experimentos deste estudo.

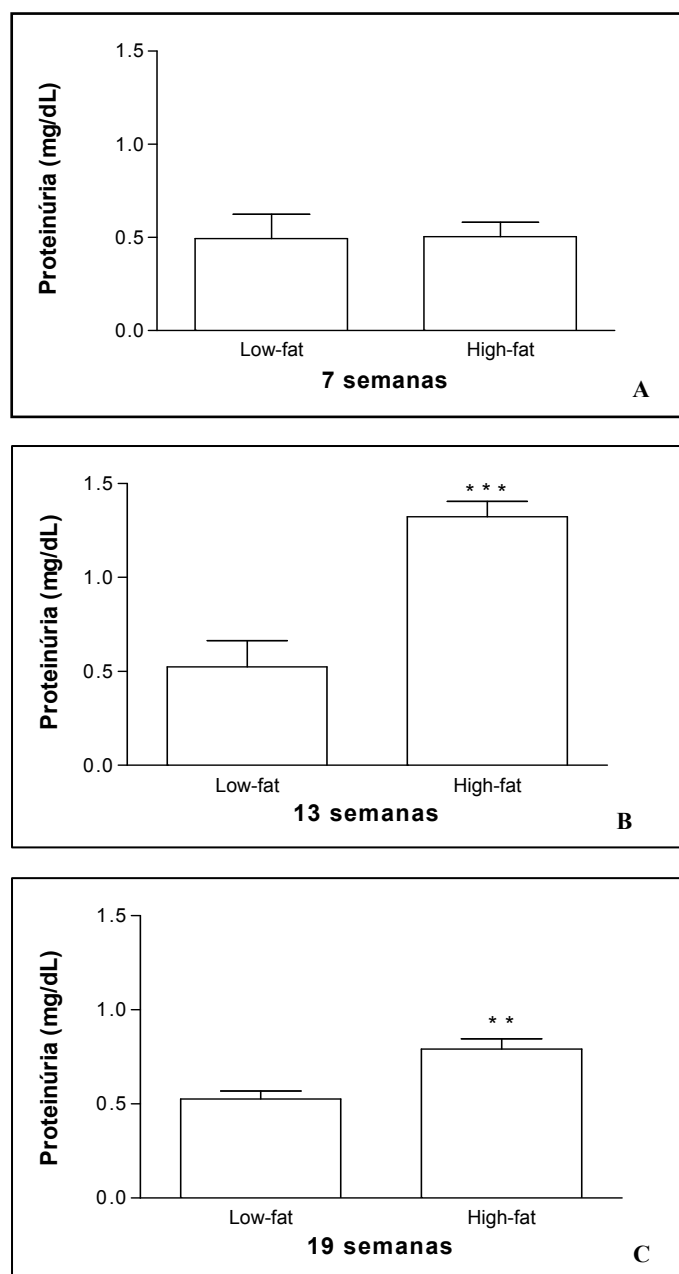
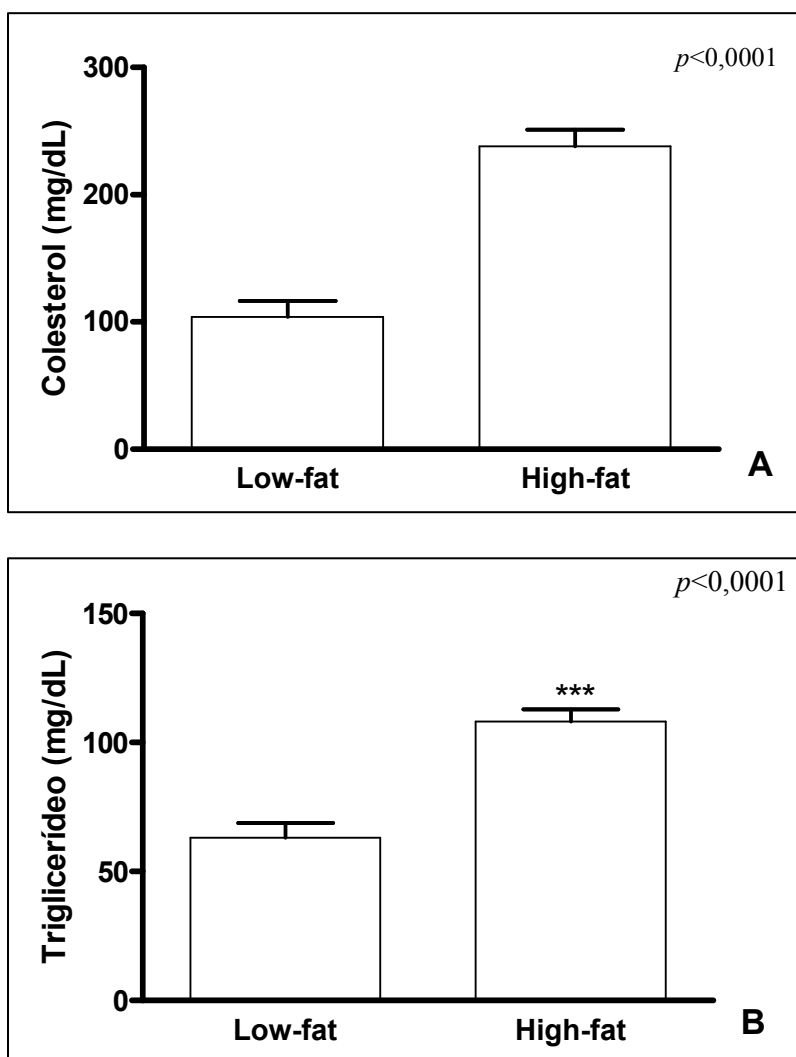


Figura 11. Dosagem de proteínas totais em urina de machos durante o período de indução. (A) A avaliação após 7 semanas de indução não demonstrou diferença estatística entre os grupos. (B) A avaliação após 13 semanas de dieta high-fat apresentou diferença estatisticamente significativa (***p<0,001). (C) A avaliação após 19 semanas de dieta também apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (**p<0,01). Valores representam a média±SEM de 5-14 animais por grupo.

4.1.4 – Parâmetros bioquímicos do sangue

Ao longo do período de indução, o sangue dos animais sacrificados nos pontos de 9 e 12 meses, foi mensurado para perfil lipídico (colesterol e triglicerídeos) e indicadores de função hepática (alanina transaminase - ALT e aspartato transaminase – AST). Os animais do grupo *high-fat* mostraram diferença estatisticamente significativa em todos os parâmetros bioquímicos dosados em comparação ao grupo que recebeu ração *low-fat* após 9 meses sob efeitos das rações (Figura 12). Esta diferença entre os grupos também foi observada nos demais experimentos com dosagem aos 9 meses de indução.



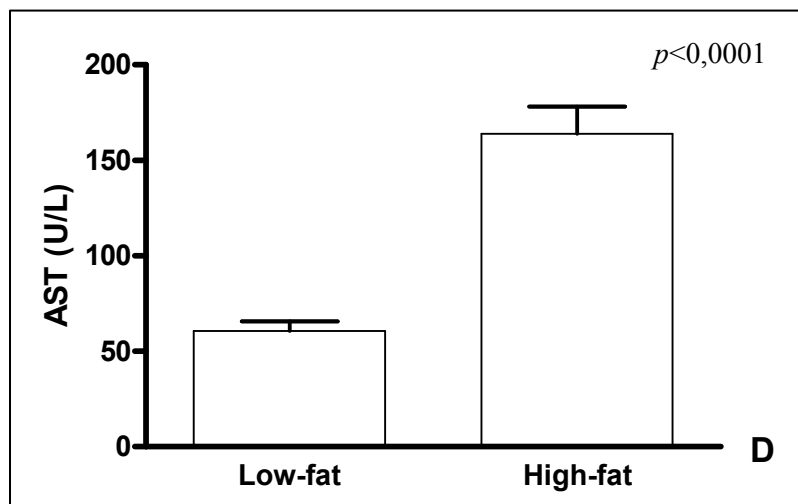
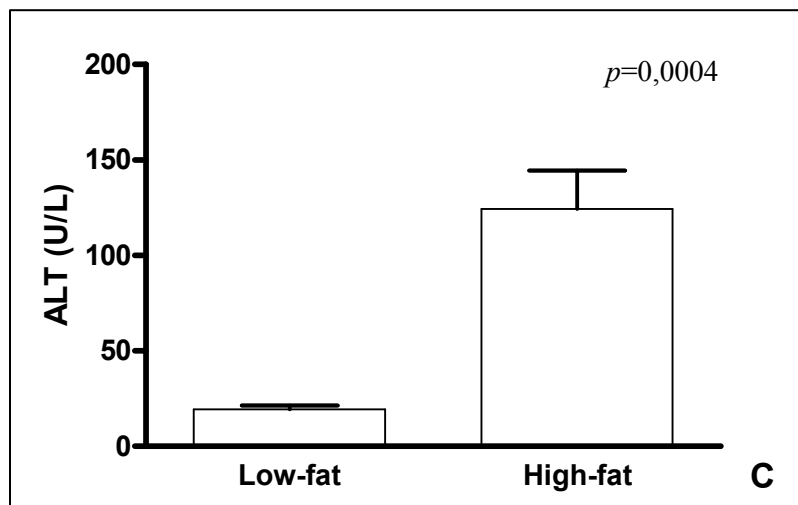


Figura 12: Análise bioquímica dos animais com 9 meses de indução do modelo.

O grupo *high-fat* apresentou níveis elevados em todos os parâmetros bioquímicos testados quando comparados com o grupo *low-fat*. (A) colesterol; (B) triglicerídeos; (C) ALT e (D) AST. Valores representam a média \pm SEM de 8-9 animais por grupo.

O mesmo foi observado nos parâmetros bioquímicos dosados após 12 meses de alimentação com ração *high-fat* e *low-fat* (Figura 13). Essa mesma diferença também foi observada nos demais experimentos deste trabalho.

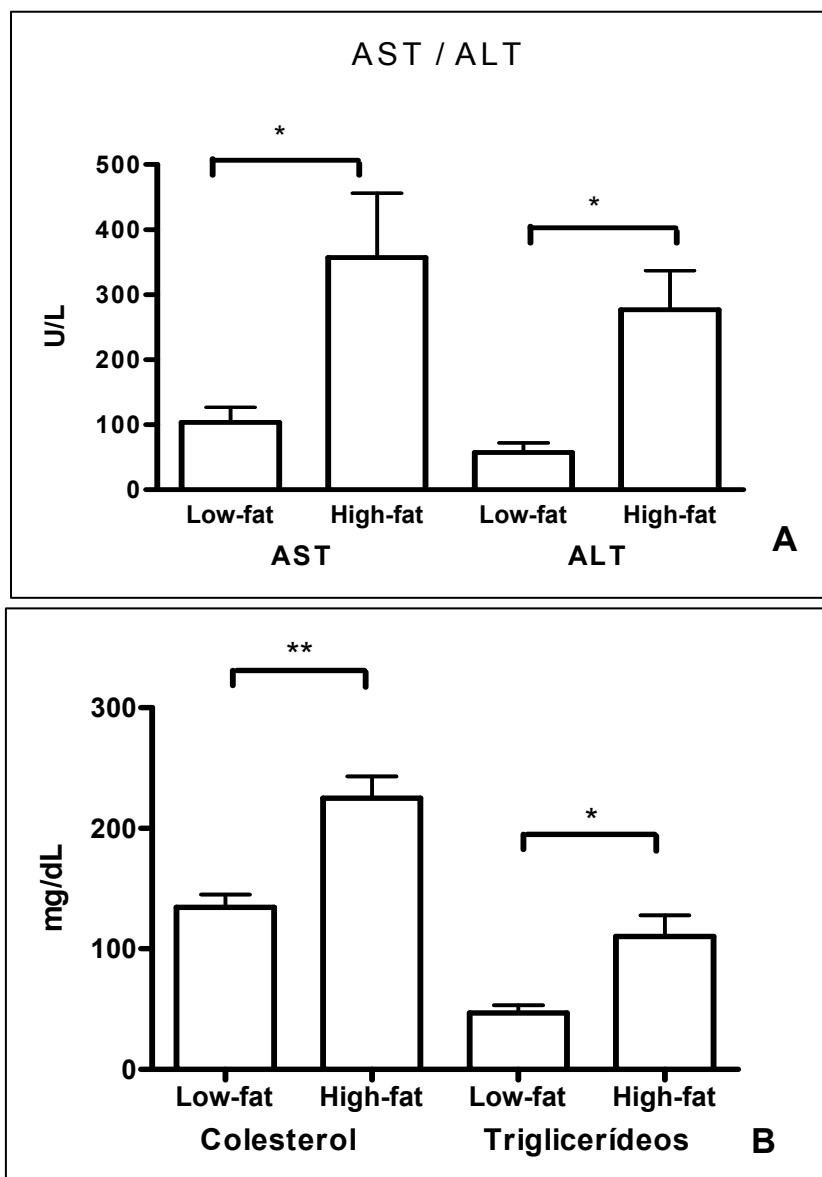


Figura 13. Dosagem dos parâmetros bioquímicos do sangue após 12 meses de indução do modelo. O grupo *high-fat* apresentou aumento nos níveis de ALT e AST (A), colesterol e triglicerídeos (B) em comparação com o grupo *low-fat* (** $p<0,001$ e * $p<0,05$) Valores representam a média \pm SEM de \pm 3-9 animais por grupo.

4.1.5 – Análise histológica

Durante o sacrifício dos animais, foi possível observar que os animais alimentados com ração *high-fat* exibiram, macroscopicamente, uma hepatomegalia significativa, palidez do parênquima hepático comparado com os animais *low-fat*, além de nódulos hepáticos (Figura 14). Além disso, em 3 animais que receberam a ração *high-fat* foi observado presença de nódulos hepáticos. O fígado dos animais do grupo *low-fat* apresentaram parênquima hepático preservado (dados não mostrados). Esse resultado foi observado em todos os cinco experimentos realizados neste trabalho.

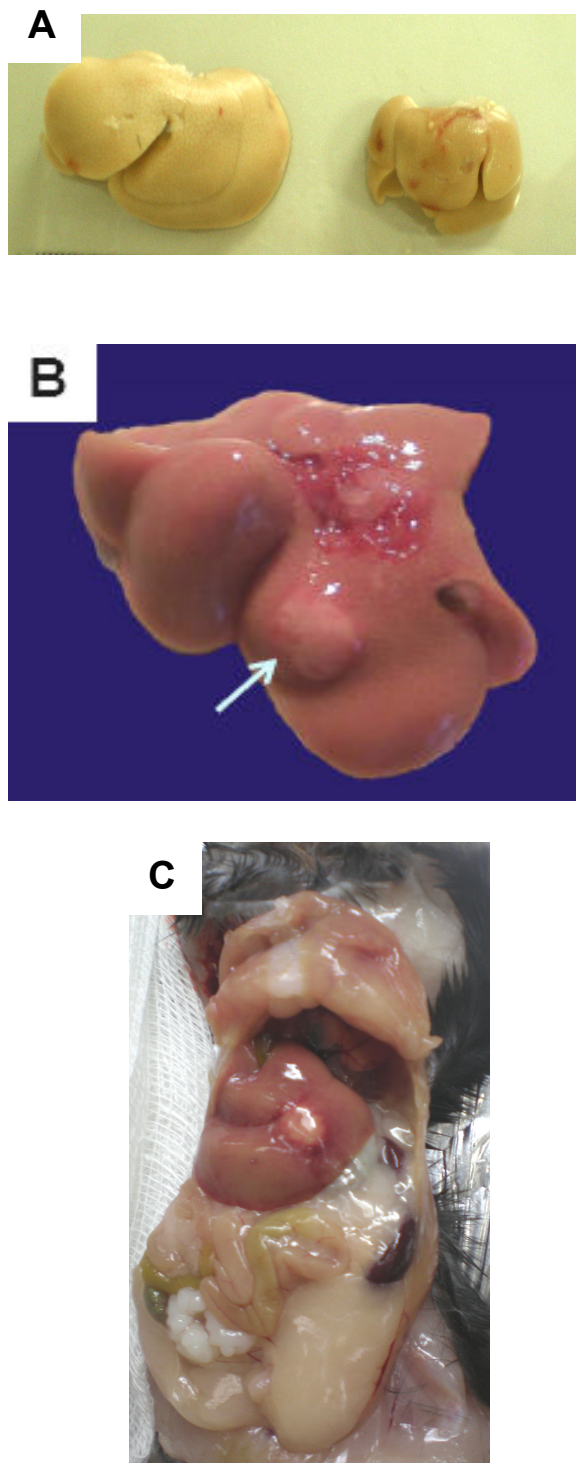


Figura 14. Análise macroscópica dos órgãos. Os animais do grupo *high-fat* apresentaram um aumento no tamanho do fígado em comparação ao grupo *low-fat* (A) e, em alguns casos, a presença de nódulos hepáticos (B e C).

A análise histológica foi feita a partir de secções dos órgãos retirados no momento do sacrifício coradas em hematoxilina-eosina (HE) e análise por microscopia óptica. O tecido hepático dos animais que receberam a dieta *high-fat* apresentou intensa esteatose micro e macrovacuolar, corpúsculos de Mallory e infiltrado inflamatório (Figuras 15 e 16). Conforme observado na análise macroscópica, alguns animais do grupo high-fat apresentaram nódulos hepáticos compatíveis com adenoma hepatocelular (Figura 17). Em secções coradas pelo picro-sirius vermelho, observa-se fibrose perisinusoidal e em alguns casos constituindo septos, caracterizando alteração estrutural estágio 2, achados compatíveis com esteatohepatite não alcoólica - NASH (Figura 18).

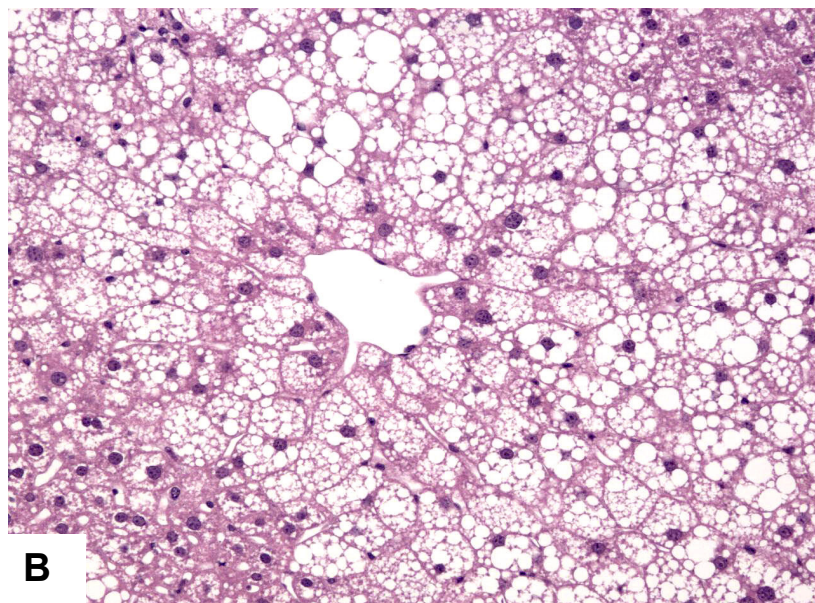
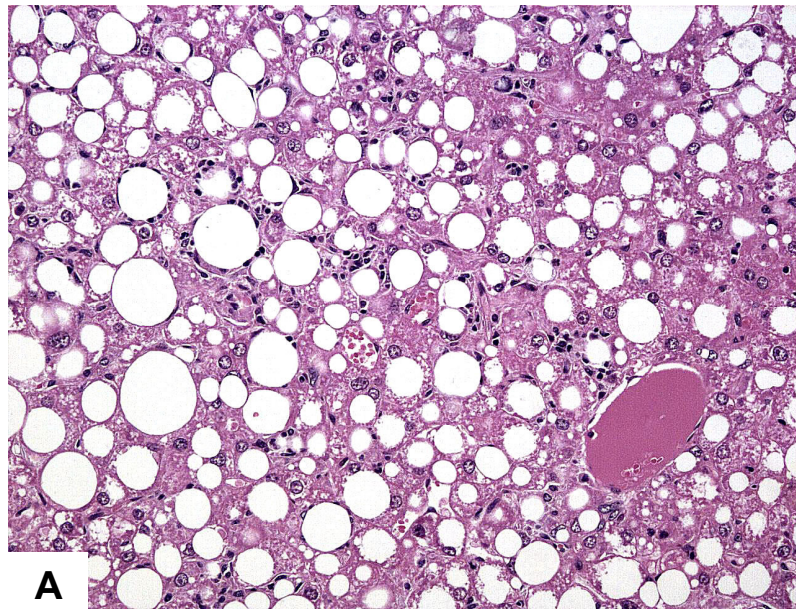


Figura 15. Esteatose hepatocelular. A, detalhe da esteatose macrovacuolar; B, esteatose microvacuolar alterando toda a arquitetura do parênquima hepático dos animais do grupo *high-fat* (Hematoxilina&Eosina, aumento da objetiva de 10x).

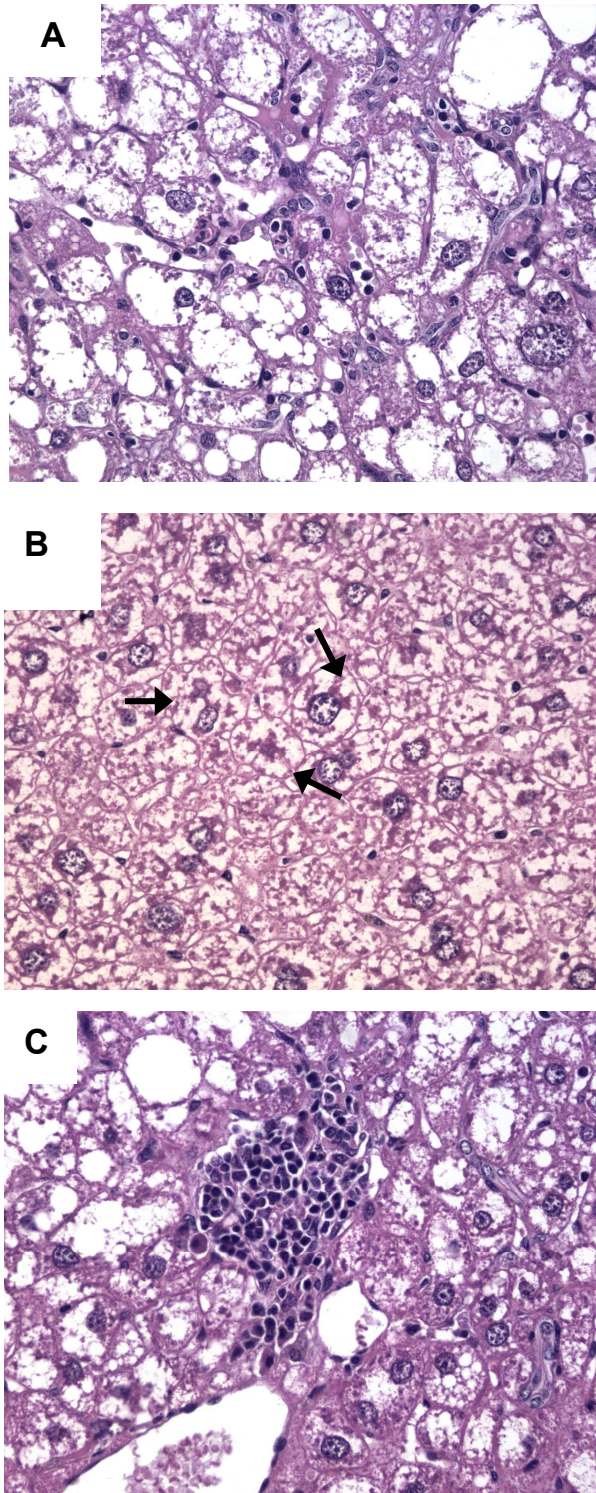


Figura 16. Resultado histológico característico de NASH. Secção histológica de tecido hepático de animais do grupo *high-fat* mostrando balonização hepatocelular (A), corpúsculo de Mallory (B) e infiltrado inflamatório mononuclear (C). (Hematoxilina&Eosina, aumento da objetiva de 10x).

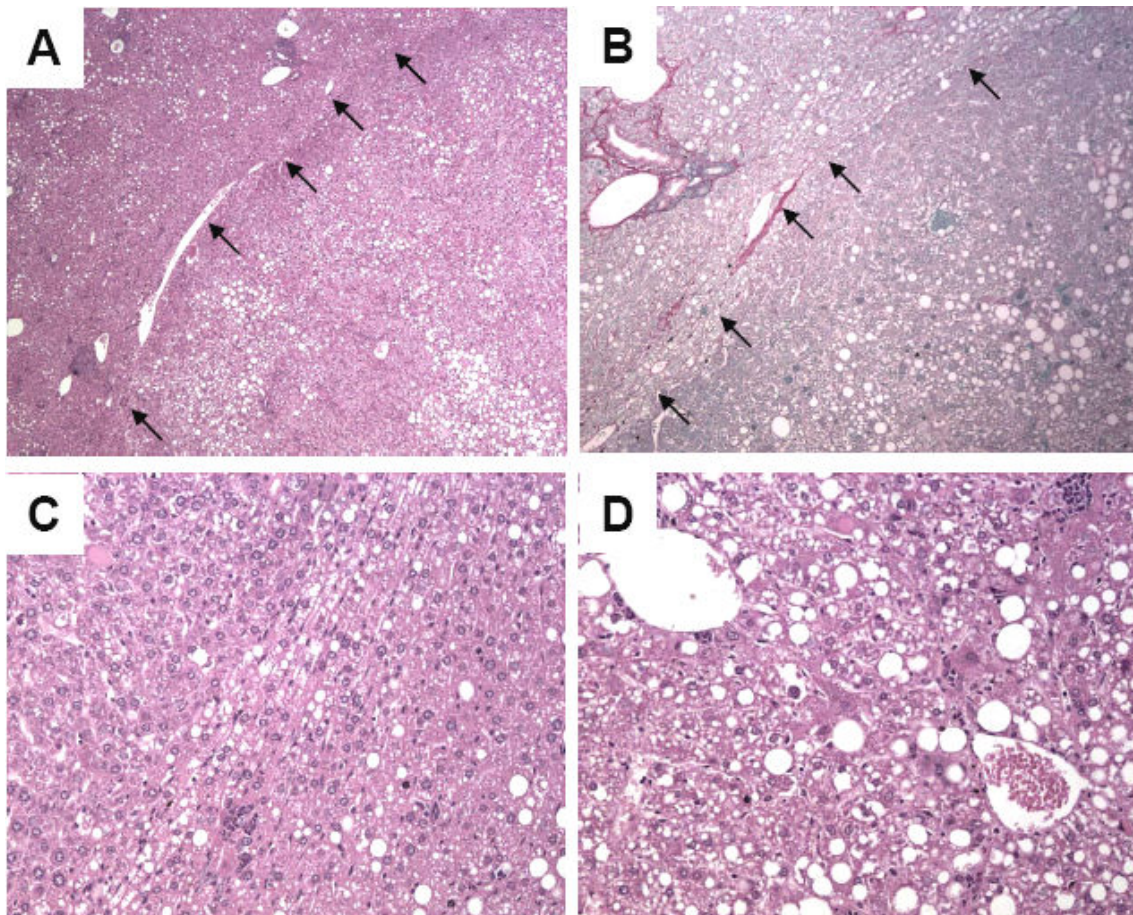


Figura 17: Presença de adenoma nos fígados de animais 12 meses após a alimentação *high-fat*. A, Adenoma hepatocelular (setas) limitando bem o parênquima hepático com ligeira compressão dos hepatócitos, mas sem uma cápsula fibrosa (Hematoxilina&Eosina, aumento de objetiva de 4x). B, Área selecionada marcado com picro-sirius vermelho (aumento com objetiva de 4x). C, Zona da transição entre o adenoma e o fígado não neoplásico. As células no adenoma são os hepatócitos bem diferenciados que crescem em uma massa expansível que comprime o fígado em torno dele (Hematoxilina&Eosina, aumento com objetiva de 10X). D, Adenoma hepatocelular que contém hepatócitos com esteatose e veias (Hematoxilina&Eosina, aumento com objetiva de 10x).

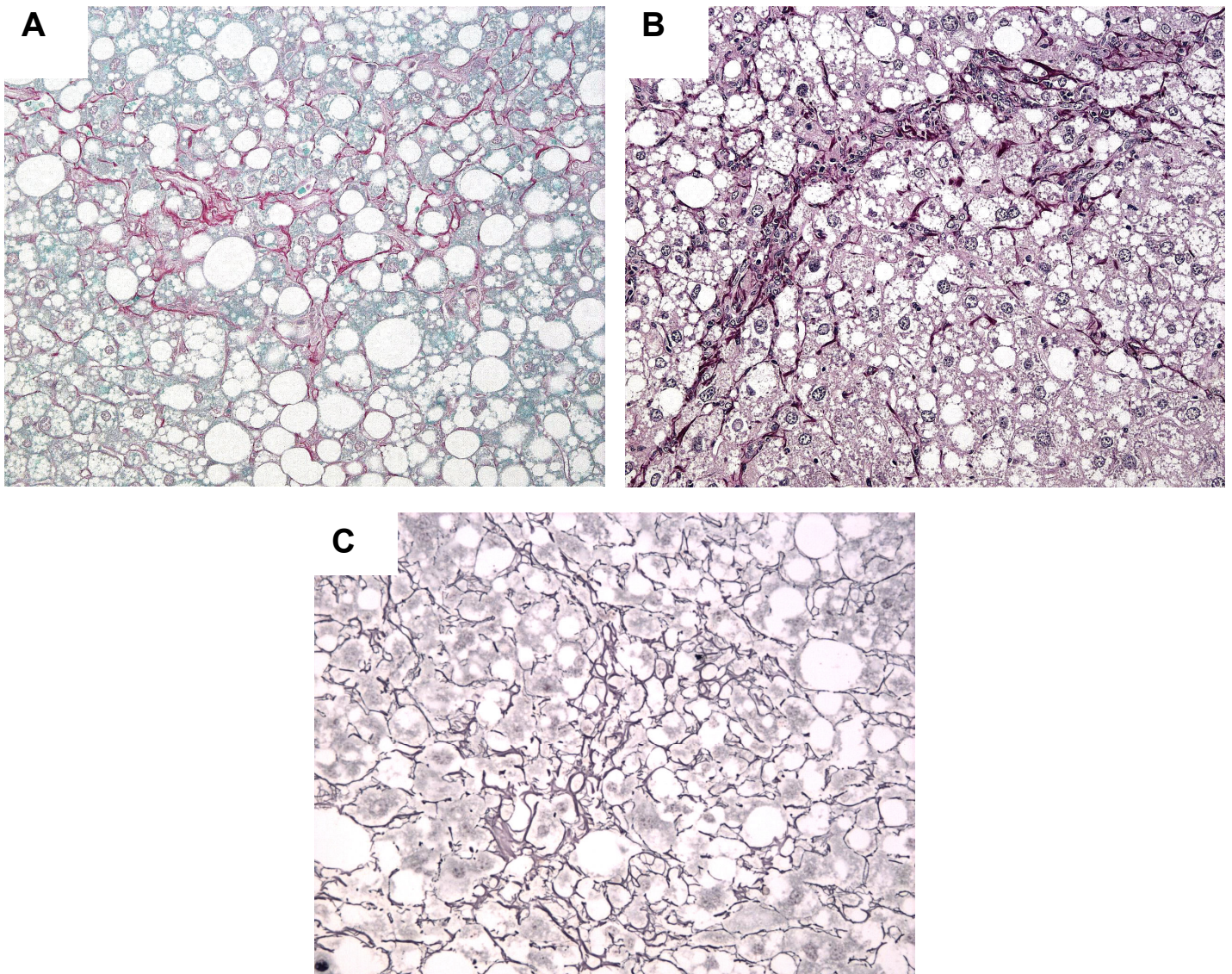


Figura 18. Fibrose perissinusoidal. Depósito de colágeno em torno dos hepatócitos juntamente com esteatose macro e microvacuolar (A) (Picro-sirius vermelho contra corado com fast green, aumento da objetiva de 4x). Em B fibrose perissinusoidal e formação de septos (Picro-sirius vermelho contra corado com hematoxilina, aumento da objetiva de 4x). Em C marcação de matriz conjuntiva com reticulina (objetiva de 4x).

Após 12 meses de indução do modelo através da ração, foi realizada a análise histológica do rim desses animais. Foi observado que houve expansão mesangial e proliferação celular no glomérulo renal dos animais que receberam ração *high-fat* quando comparados aos animais que receberam ração *low-fat* (Figura 19).

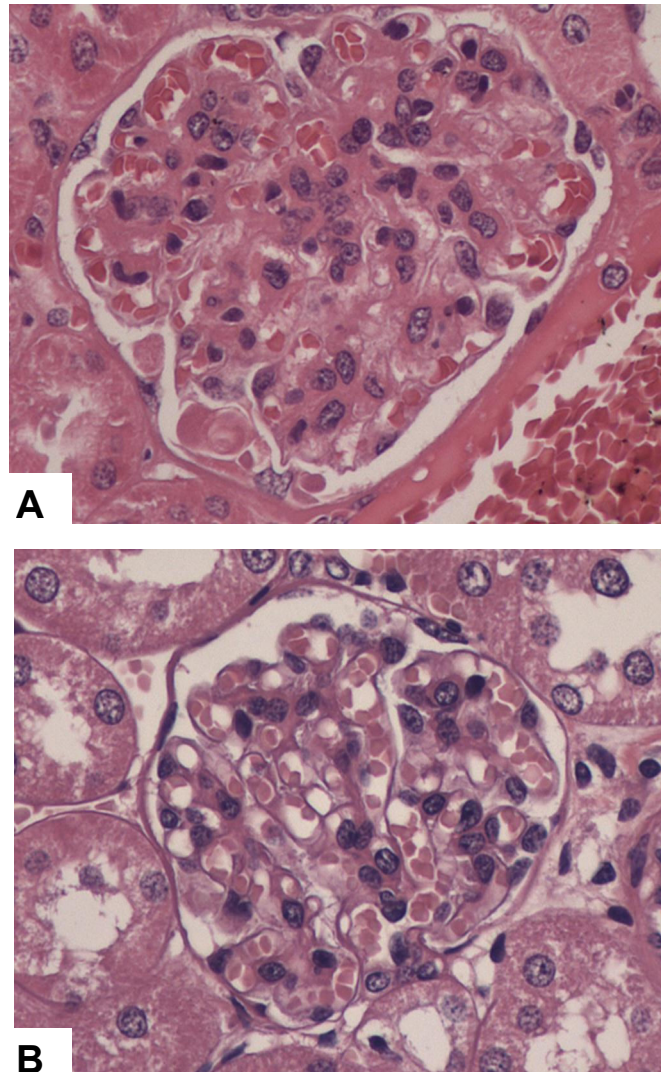


Figura 19. Análise histológica renal. Glomérulo renal com expansão mesangial e proliferação celular em camundongos do grupo *high-fat* (A). Glomérulo sem alterações nos animais do grupo *low-fat* (B) (Hematoxilina&Eosina, aumento da objetiva de 40x).

Após 12 meses de indução, os animais sacrificados não demonstraram alterações histológicas no tecido pancreático dos animais submetidos à ração *high-fat*, assim como os animais submetidos a ração *low-fat* (Figura 20) Foram analisados também os corações desses animais, mas nenhuma alteração foi observada (dados não mostrados).

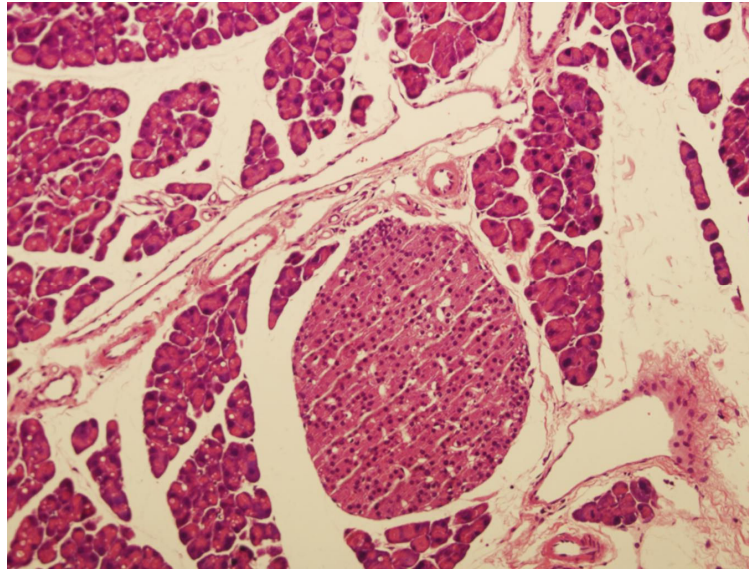


Figura 20. Histologia do pâncreas. Corte histológico do pâncreas de camundongo do grupo *high-fat* não apresentando alterações evidentes (Hematoxilina&Eosina, aumento da objetiva de 10x).

4.2 – Caracterização das células mononucleares transplantadas

As células mononucleares utilizadas nos transplantes foram caracterizadas através de citometria de fluxo para alguns marcadores que identificam diferentes populações celulares. Os marcadores utilizados foram os anticorpos GFP, CD117, CD45, CD44, CD34, CD90, CD11b, CD31 e Sca-1. Para a caracterização das células transplantadas foi utilizado 10^7 células mononucleares extraída da medula óssea de 10 animais EGFP+. Os resultados para todos os marcadores estão apresentados na tabela 3.

Como foram extraídas de camundongos transgênicos para GFP, 98% das células apresentaram expressão de GFP. O mesmo percentual delas expressou também CD45 (antígeno leucocitário comum), presente em todos os precursores de leucócitos. A linhagem mielóide das células hematopoéticas apresenta fenótipo CD11b⁺, correspondendo a 70% do isolado. 47% das células apresentaram expressão de CD31, que é um marcador de células endoteliais, plaquetas e leucócitos. As células-tronco hematopoéticas representam um pequeno percentual do total de células da medula óssea, e apresentam marcação CD34, CD117 e Sca-1. Por outro lado, o CD90, presente em 7% das células, é marcador negativo para CT hematopoética e positivo para CT mesenquimal. Estas também são identificadas por CD117 e CD44 (2 e 80% das células, respectivamente).

Tabela 3. Caracterização da população de células mononucleares de medula óssea.

Marcadores Moleculares	Células marcadas (%)
GFP	98
CD117	2
CD45	98
CD44	80
CD34	1
CD90	7
CD11b	70
CD31	47
Sca-1	5

4.3 – Análises após a terapia celular

Após o período de indução do modelo experimental, parte dos animais alimentados com a dieta *high-fat* foram tratados com células mononucleares de medula óssea em salina, enquanto a outra parte recebeu apenas solução salina. A dieta *high-fat* foi mantida mesmo após a terapia em ambos os grupos.

4.3.1 - Peso e glicemia

O monitoramento através de mensurações de peso e glicemia foi mantido após os transplantes de células mononucleares de medula, juntamente com a dieta *high-fat* e *low-fat*. Os animais continuaram ganhando peso 3 meses após a terapia, independente de terem recebido células ou salina (Figura 21). Também não foi observada diferença significativa na glicemia de jejum dos animais controles e tratados (Figura 22). Esses mesmos resultados foram observados nos demais experimentos.

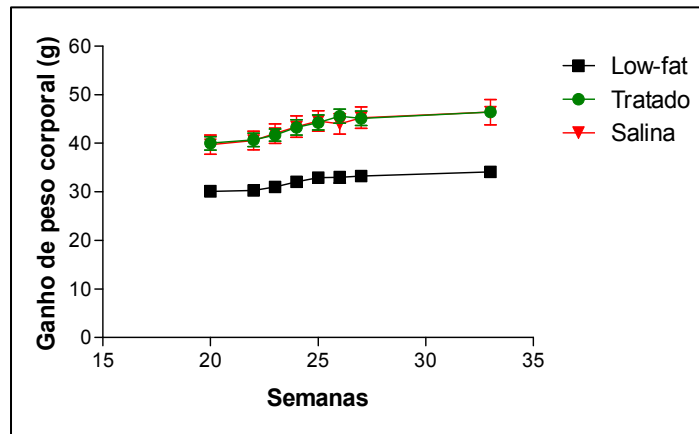


Figura 21. Ganho de peso corporal dos animais após a terapia celular. Camundongos alimentados com dieta *high-fat* que receberam células de medula óssea (Tratado) ou salina (Salina) não apresentaram diferença de ganho ou perda de peso após a terapia celular. Valores representam a média±SEM de 7-10 animais por grupo.

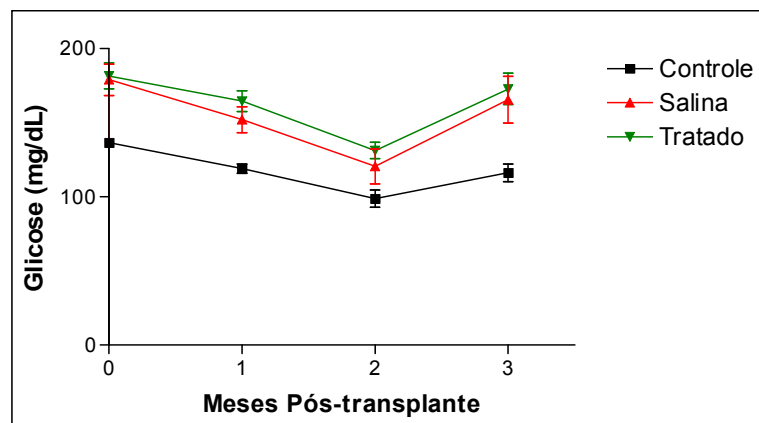


Figura 22. Glicemia de jejum 3 meses após o transplante. Camundongos alimentados com dieta *high-fat* que receberam células de medula óssea (Tratado) ou salina (Salina) não apresentaram diferença na glicemia após a terapia celular. Valores representam a média±SEM de 4-5 animais por grupo.

4.3.2 - Tolerância à glicose

O teste de tolerância à glicose foi aplicado novamente após 3 meses da terapia. A injeção de glicose gerou menores picos de glicemia nos camundongos que receberam célula quando comparados aos controles com salina. Após duas horas, os níveis de glicose eram semelhantes em ambos os grupos, não apresentando diferença estatisticamente significativa (figura 23). Entretanto, esse resultado sugere uma melhora na reação à sobrecarga metabólica, indicando talvez uma maior sensibilidade à insulina nos camundongos tratados. Foi realizado o teste de tolerância à glicose após 3 meses da terapia celular em 3 dos experimentos realizados neste estudo, e todos mostraram o mesmo padrão.

Após 6 meses de terapia celular, um novo teste de tolerância à glicose foi aplicado, e mostrou que os camundongos que receberam célula não apresentavam diferença significativa na tolerância à glicose quando comparados aos controles com salina (dados não mostrados).

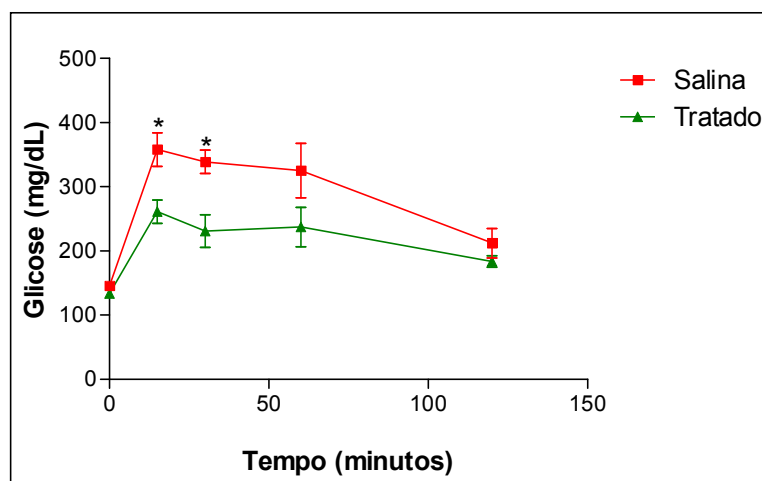


Figura 23. Tolerância à glicose 3 meses após o transplante. Camundongos tratados receberam as células mononucleares de medula óssea e os demais receberam apenas com salina. A glicemia após 15 e 30 minutos da injeção de glicose, os grupos mostraram diferença estatística (* $p < 0,05$). Valores representam a média \pm SEM de 3-5 animais por grupo.

4.3.3 - Proteinúria

Foi realizada dosagem de proteínas totais em amostras de urina coletada dos animais 3 meses após o transplante. Animais alimentados com dieta *high-fat* tratados, *high-fat* salina não apresentaram concentrações significativamente diferentes (dados não mostrados). Os resultados não indicam reversão da proteinúria dos camundongos tratados com célula mononuclear de medula óssea em nenhum experimento realizado neste trabalho.

4.3.4 - Análise bioquímica

O sangue coletado no momento do sacrifício de camundongos após 3 e 6 meses de transplante foi encaminhado para análise bioquímica. Foram mensurados: perfil lipídico (colesterol e triglicerídeos) e indicadores de função hepática (alanina transaminase - ALT e aspartato transaminase – AST). Todos esses parâmetros encontravam-se aumentados nos animais do grupo *high-fat* quando comparados aos animais que receberam ração *low-fat*. Após 3 meses da terapia celular os parâmetros bioquímicos mensurados não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados com célula mononuclear de medula óssea e os animais que receberam salina (Figura 24). Foi realizada esta análise em dois experimentos deste trabalho e ambos apresentaram o mesmo resultado. Porém, houve uma redução significativa naqueles que receberam as células mononucleares de medula óssea, mesmo mantendo a dieta hipergordurosa após 6 meses do transplante (Figura 25). Os parâmetros mensurados e os valores encontrados para os animais transplantados e não transplantados estão apresentados nos gráficos abaixo, assim como o nível de significância. Só foi realizada esta análise em apenas um dos cinco experimentos realizados.

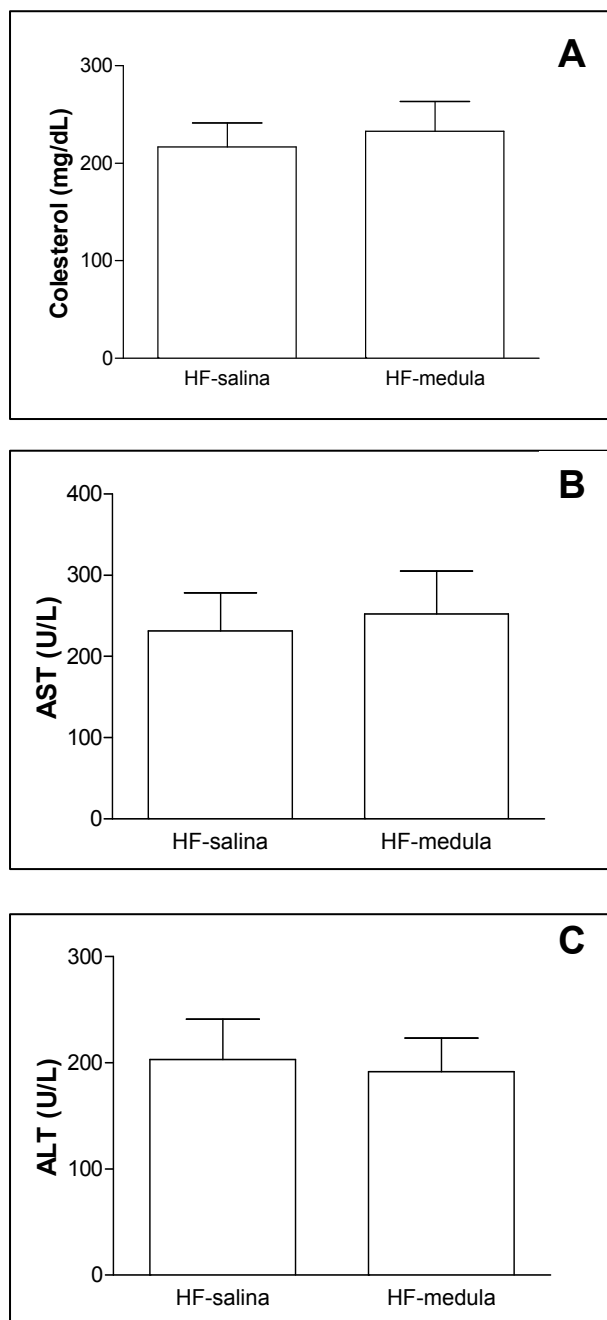


Figura 24. Parâmetros bioquímicos do plasma. Análise bioquímica do plasma do colesterol $p=0.7353$ (A), ALT $p=0.8681$ (B) e AST $p=8097$ (C) entre os camundongos do grupo salina e medula após 3 meses da terapia celular. Valores representam a média \pm SEM de 2-5 animais por grupo.

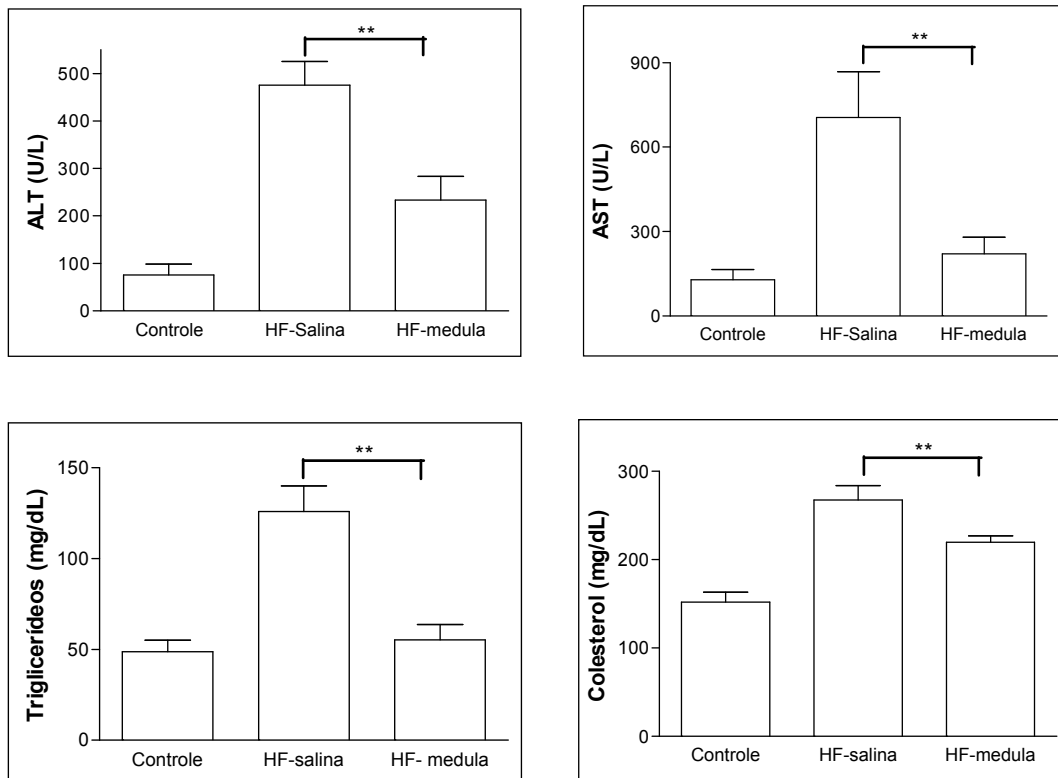


Figura 25. Parâmetros bioquímicos mensurados no plasma de camundongos 6 meses após a terapia. Dosagem de ALT (A), AST (B), triglicerídeos (C), e colesterol (D), sendo $**p < 0,05$. Valores representam a média \pm SEM de 2-4 animais por grupo. Os animais controle receberam ração *low-fat*; animais HF-salina receberam ração *high-fat* e salina; animais HF-medula receberam ração *high-fat* e foram tratados com células mononucleares da medula óssea.

4.3.5 – Análise histológica após a terapia

Secções de pâncreas, fígado e rim dos camundongos foram avaliadas morfológica e morfometricamente por microscopia óptica 1, 3 e 6 meses após o tratamento. Não foram observadas alterações no tecido renal e pancreático dos animais submetidos à terapia quando comparados aos animais que receberam solução salina (dados não mostrados). Assim com também não foi evidenciado alterações histológicas em nenhum órgão analisado (fígado, rim, pâncreas) entre os grupos salina e tratado nos sacrifícios de 1 e 3 meses após transplante.

Todos os animais do grupo *high-fat*, tratados com células e os que receberam solução salina, apresentaram esteatohepatite. Entretanto, os animais tratados com células mononucleares de medula óssea apresentaram menos esteatohepatite macrovacuolar em relação aos animais que receberam solução salina, mas o mesmo não foi observado para a esteatose microvacuolar (Figura 26). Este resultado foi observado com evidência em um dos cinco experimentos com análise aos 6 meses após transplante, e nos demais experimentos esta diferença da esteatose macrovacuolar entre o grupo tratado com células mononucleares de medula óssea e solução salina não foi evidenciado.

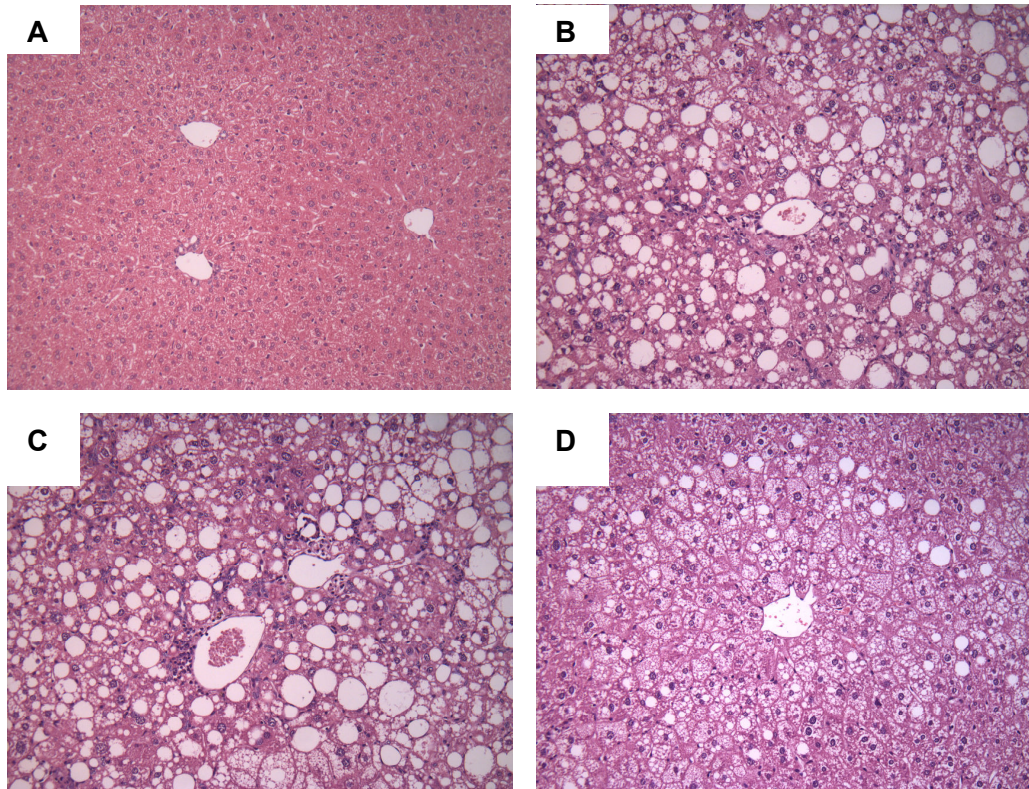


Figura 26. Micrografias de seções histológicas de tecido hepático. Animal controle mostrando tecido hepático normal (A), animal *high-fat* 6 meses após receber solução salina mostrando tecido hepático com esteatose micro e macrovacuolar, foco inflamatório e balonização hepatocelular (B e C), e animal *high-fat* 6 meses após terapia celular, mostrando uma diminuição de esteatose macrovacuolar (D). Hematoxilina-eosina, objetiva de 20X.

Para a avaliação da fibrose no fígado, as secções foram coradas com picro-sirius vermelho. A análise dessas lâminas demonstrou uma fibrogênese hepática ao longo dos espaços perissinusoidais, em todos os animais alimentados com ração *high-fat* (Figura 27). Foi observada uma diminuição do depósito de colágeno nos animais tratados com células de medula óssea quando comparado com os animais que receberam solução salina. Este resultado foi evidenciado no sacrifício de 3 e 6 após a terapia celular, mas não nos animais com 1 mês de tratamento.

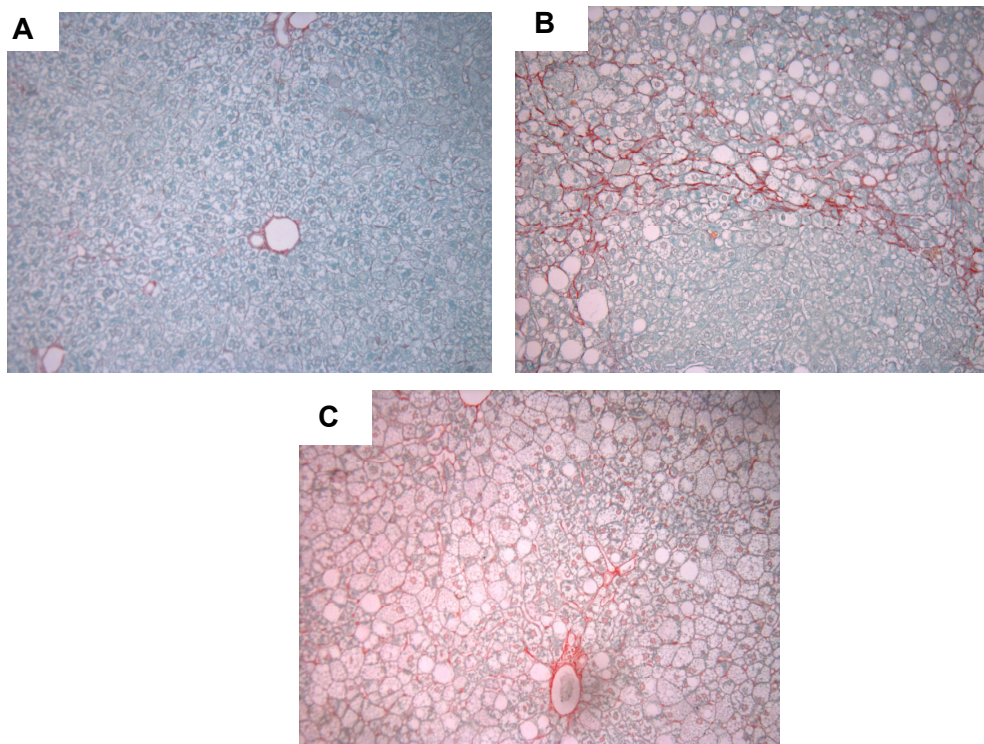


Figura 27. Secções de fígado coradas com picro-sirius vermelho. Fígado de animal alimentado com dieta *low-fat*, sem evidência de fibrose (A); Fígado de animal alimentado com dieta *high-fat* 6 meses após receber injeção de solução salina, mostrando tecido hepático com esteatose micro e macrovacuolar e fibrose perissinusoidal (B), Fígado de animal alimentado com dieta *high-fat* 6 meses após terapia celular, mostrando uma redução da fibrose (C). Objetiva de 20X.

A fibrose foi quantificada por morfometria. Um mês após a terapia celular, não foi registrada uma diferença na fibrose perissinusoidal entre animais tratados com células e os que receberam solução salina. Após 3 meses, os camundongos que receberam célula-tronco exibiram redução significativa, o que foi mantido no sexto mês pós-transplante, mesmo mantendo a dieta hipergordurosa (Figura 28). A quantificação da fibrose de 3 e 6 meses pós terapia foi realizada em apenas um experimento dos cinco realizados neste trabalho. Nos demais experimentos a observação da fibrose foi evidenciada na análise microscópica das secções do fígado.

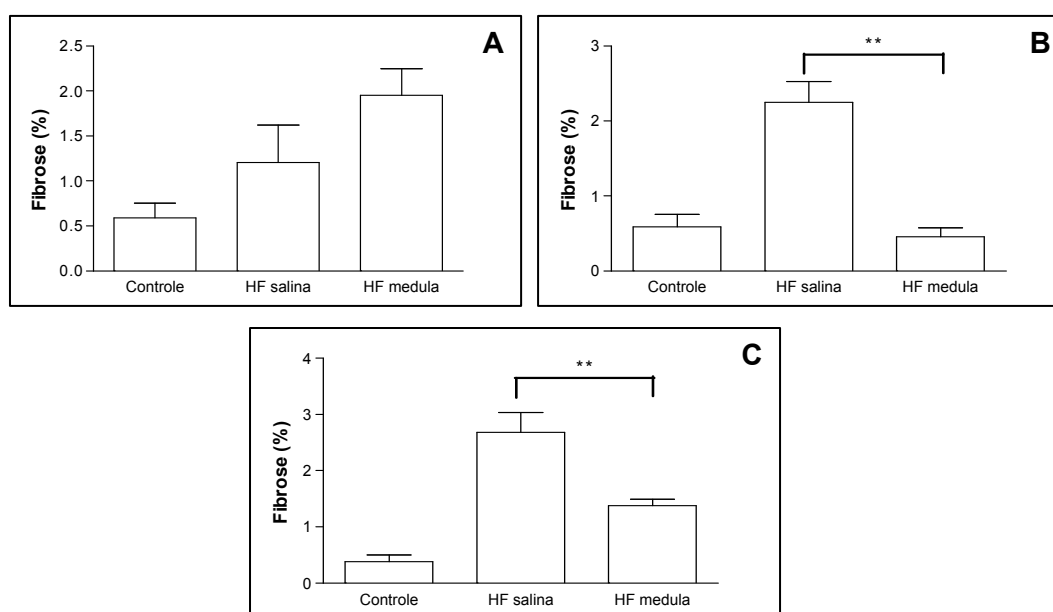


Figura 28. Morfometria da fibrose hepática após o transplante. Não houve diferença entre os animais tratados e não tratados após 1 mês da terapia (A), após 3 e 6 meses, houve uma redução da fibrose nos animais tratados em comparação com os animais não tratados (** $p < 0.001$) (B e C). Valores representam a média \pm SEM de 5-12 animais por grupo.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Indução do modelo de diabetes tipo 2 e NASH

Embora a patogênese do diabetes tipo 2 seja complexa, alguns estudos já comprovaram que o estabelecimento da doença envolve fatores poligênicos e ambientais (PARILLO *et al.*, 2004).

Atualmente, têm sido utilizados em muitos estudos como modelos experimentais de diabetes *mellitus* tipo 2 camundongos geneticamente modificados (SRINIVASAN & RAMARAO, 2007) ou camundongos diabéticos induzidos quimicamente (EVANS *et al.*, 1965; BROSKY & LOGOTHETOPOULOS, 1969). Contudo, tais camundongos são modelos monogênicos (CHUA *et al.*, 1996) ou induzidos por uma destruição tóxica as células beta pancreáticas, e o diabetes desenvolvido não é decorrente da influência de fatores ambientais. Diante disto, é possível inferir que o quadro apresentado por estes animais diverge clinicamente do que realmente ocorre na maioria dos pacientes diabéticos que se apresentam no consultório médico.

Estudos indicam que o consumo de uma dieta hipercalórica e a conseqüente obesidade são duas das principais causas de DM2 (MALEKI *et al.*, 2005; KARASAWA *et al.*, 2008). Deste modo, estabelecer um modelo murino de DM2 relacionado à ingesta de dieta hipercalórica e obesidade em camundongos saudáveis é de extrema importância para os estudos nesta área.

A predisposição genética dos camundongos C57Bl/6 aliada à dieta hipergordurosa os torna um importante modelo de DM tipo 2 (ALIMIND & KAHN, 2004). Em modelo murino, a ingesta de gordura, e não necessariamente de teor calórico, representa o maior estímulo para o desenvolvimento da obesidade na doença (PETRO *et al.*, 2004).

Nesse trabalho, machos alimentados com dieta *high-fat* desenvolveram obesidade, hiperglicemia e intolerância à glicose, indício de resistência à insulina característica do DM2. Esses resultados corroboram com outros estudos nesse modelo, onde foi observado também uma progressiva hiperinsulinemia (PAREKH *et al.*, 1998) e disfunção das células β (WINZELL & AHRÉN, 2004). Não foi realizada a dosagem de insulina para verificar alterações funcionais nas ilhotas pancreáticas, mas a análise histológica não detectou alterações morfológicas após todo tempo de indução. O mesmo também não foi observado no trabalho de Parekh e colaboradores (1998).

Segundo Schmid e colaboradores (2004), camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hipergordurosa constituem um modelo representativo de DM2 por desenvolverem características semelhantes ao diabetes humano. Karasawa e colaboradores (2008) também constataram que camundongos alimentados com dieta *high-fat* desenvolveram obesidade e diabetes severo, caracterizado por hiperglicemia, glicosúria e aumento dos níveis de HbA1c. Segundo os resultados do estudo realizado por Wei e colaboradores (2004), os camundongos alimentados com dieta hipercalórica chegaram a pesar, no mínimo, 8 gramas a mais que os controles, com apenas 9 semanas de indução do diabetes. Dados semelhantes foram observados no presente trabalho quando os animais alimentados com dieta *high-fat*, apresentaram diferença significativa no ganho de peso a partir da décima semana de indução.

A tolerância à glicose diminuída e a glicemia de jejum alterada refletem estados patológicos da resistência à insulina (YATES *et al.*, 2007). A intolerância à glicose observada nos camundongos diabéticos, neste estudo, caracteriza o estado de resistência à insulina. Hull e colaboradores (2005), em estudo em que camundongos foram alimentados com dieta hipergordurosa, não evidenciaram hiperglicemia e intolerância à glicose. Uma possível explicação para esta divergência de resultados seria uma diferença de composição da dieta utilizada entre os estudos.

Já a resistência das fêmeas ao desenvolvimento do diabetes pode estar associada a uma proteção conferida pelo estrógeno. Esse hormônio participa da manutenção da homeostase da glicose e existem evidências de que ele reduz a incidência do DM em humanos e camundongos. Em murinos, o estrógeno atua no tecido adiposo e na prevenção do diabetes, na estimulação do metabolismo de ácidos graxos e supressão de gliconeogênese no fígado e na proteção das células beta em condições de estresse oxidativo (LOUET *et al.*, 2004).

As análises bioquímicas do sangue para perfil lipídico e indicadores de função hepática foram realizadas nove e doze meses após a indução. A dieta hipergordurosa acarretou uma elevação dos níveis séricos de triglicérides e colesterol total. Essa alteração no perfil lipídico indica uma dislipidemia, que é característico do DM2. Outros estudos no mesmo modelo realizaram essas dosagens em menores tempos de indução e também encontraram valores significativamente mais elevados de triglicérides e colesterol após 8 (SCHAFER *et al.*, 2004) e 13 semanas de alimentação hipergordurosa quando comparada à controle (WEI *et al.*, 2004). Deste modo, é possível inferir que os animais diabéticos desenvolveram um desequilíbrio metabólico global, decorrente do estresse oxidativo a que são submetidos pela hiperglicemia crônica.

Segundo Wei e colaboradores (2004), o perfil lipídico exibido pelos camundongos diabéticos diverge discretamente das mudanças observadas em humanos. Em seu estudo, os camundongos mostraram um aumento de colesterol total, de triglicérides e de HDL, enquanto que normalmente o perfil lipídico de pacientes com diabetes tipo 2 é caracterizado por um aumento de triglicérideo sérico, aumento dos níveis de VLDL e redução de HDL. No estudo desenvolvido por Karasawa e colaboradores (2008), a hipercolesterolemia também foi observada nos camundongos obesos e diabéticos, sendo compatível com os resultados obtidos neste trabalho.

A dislipidemia é um fator de risco para a aterosclerose e glomerulosclerose (BONNET & COOPER, 2000). Para analisar a função renal, foram dosadas proteínas totais na urina dos animais. A proteinúria observada já com 13 semanas nos camundongos alimentados com a dieta *high-fat* indica o comprometimento tubular que é característico da nefropatia diabética (ALPERS, 2005). Tais achados corroboram com a análise histopatológica renal, que apresentou expansão de matriz mesangial glomerular difusa e proliferação celular mesangial, representando manifestações precoces clássicas da nefropatia diabética. Resultados similares foram observados por Wei e colaboradores (2004), que demonstraram alterações estruturais e funcionais do glomérulo de camundongos C57Bl/6 após 13 semanas de dieta rica em gordura saturada e também em modelo suíno (LIU *et al.*, 2007).

Associado à dislipidemia, obesidade e hipertensão, a DHGNA é considerada a manifestação hepática na síndrome metabólica (MOSCATELLO *et al.*, 2007). O conhecimento sobre a patogênese e desenvolvimento de novas terapias para uma das suas formas, a esteatohepatite não alcoólica (NASH), é limitado por falta de modelo experimental que represente a condição em humanos. Alguns trabalhos têm se voltado para a reprodução dessa patologia em ratos, através da indução por dieta hipergordurosa (LIEBER *et al.*, 2004; SVEGLIATI-BARONI *et al.*, 2006). No presente trabalho, os camundongos submetidos à dieta *high-fat* apresentaram elevação no nível sérico das aminotransferases e alterações histológicas no fígado, características do NASH, como: esteatose micro e macrovacuolar, inflamação, fibrose perisinusoidal, balonização dos hepatócitos e corpúsculos de Mallory.

Segundo Mattos (2005), a presença de dislipidemia (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, ou ambas) e a resistência à insulina são achados freqüentes nos pacientes com DHGNA, sendo referidos em 20% a 80% dos casos e, quando associados a aumento de transaminases hepáticas, reforça a suspeita clínica de DHGNA. Ito e colaboradores (2006), em estudo com modelo murino de diabetes tipo 2

com dieta hipergordurosa *ad libitum*, descreveram um aumento de AST e ALT nos camundongos obesos, bem como hepatomegalia significativa à macroscopia. Observações semelhantes foram evidenciadas em nosso trabalho. Deng e colaboradores (2005), em modelo murino de diabetes tipo 2 com dieta hipergordurosa administrada por via intragástrica, também relataram o desenvolvimento de obesidade, DM2 e NASH caracterizada por um aumento das transaminases hepáticas e hepatomegalia à macroscopia. Segundo Ota e colaboradores (2007), a dieta hipergordurosa oferecida aos camundongos aumenta a massa do fígado, caracterizando a hepatomegalia, e altera parâmetros metabólicos.

Os critérios histológicos adotados para o diagnóstico de NASH, porém, variam segundo os diversos autores (MATTOS *et al.*, 2005). Em um encontro de consenso sobre NASH realizado pelo NIH (National Institutes of Health, 1998), um grupo de patologistas estabeleceu, como critérios histológicos para o diagnóstico, a presença de esteatose com lesão hepatocelular associada a, pelo menos, um dos seguintes achados: corpúsculos de Mallory ou fibrose sinusoidal e injúria hepatocelular definida como degeneração balonizante dos hepatócitos. Todos esses critérios histológicos descritos acima foram encontrados em nosso trabalho.

Vários trabalhos sobre NASH utilizaram um modelo experimental induzido com dieta de MCD, que exhibe características histológicas similares às aquelas observadas nos pacientes de NASH (GREEN, 2003). Entretanto, o tratamento com dieta de MCD diminui o peso corpóreo e aumenta a sensibilidade à insulina em camundongos, características raramente vistas nos pacientes com NASH (KIRSCH *et al.*, 2003; MARCHESINI *et al.*, 2003; RINELLA & GREEN, 2004). Considerando a etiologia diversa de NASH humano, o impacto direto da composição da dieta assim como diferenças da espécie no desenvolvimento de NASH são assuntos críticos a serem considerados.

Uma hipótese para explicar a patogênese da NASH envolve o acúmulo de lipídios no fígado mediado por uma resistência à insulina. O aumento de ácidos graxos livres tem papel fundamental tanto no acúmulo de lipídios em si, quanto na resistência. A resistência à insulina induzida no fígado pela dieta hipergordurosa é mediada pelo TNF- α e ácidos graxos livres, justificando a relação da esteatohepatite com a obesidade e inflamação (SVEGLIATI-BARONI *et al.*, 2006).

O progresso na compreensão total da patogênese do NASH foi impedido pela falta dos modelos experimentais que reproduzem adequadamente as características da doença humana (SVEGLIATI-BARONI *et al.*, 2006). Enquanto diversos modelos da esteatose existem, poucos modelos de esteato-hepatite estão disponíveis (NANJI, 2004). Neste trabalho descrevemos um novo modelo murino espontâneo de NASH induzido simplesmente através da alimentação composta pelo alto teor de gordura em C57BL/6 não obesos e não manipulados geneticamente.

Camundongos submetidos à dieta *high-fat* apresentaram elevação no nível sérico das aminotransferases e alterações histológicas no fígado, características do NASH, tais como esteatose micro e macrovacuolar, inflamação, fibrose perisinusoidal e septal, balonização dos hepatócitos e corpúsculos de Mallory. Tais alterações, associadas com obesidade, hiperglicemia e dislipidemia, são igualmente descritas em humanos com NASH e síndrome metabólica (MARCHESINI, *et al.*, 2001)

Além disso, observamos, em três animais alimentados com dieta *high-fat*, a presença de neoplasia no fígado. Esse tumor é composto por hepatócitos bem diferenciados formando nódulos expansivos que comprimem o parênquima do fígado. Não foi observada uma invasão vascular das células neoplásicas. O tumor foi classificado como adenoma hepatocelular baseado na diferenciação dos hepatócitos, na densidade celular similar àquela do tecido circunvizinho não-neoplástico e na ausência da invasão vascular (International Consensus Group for Hepatocellular

Neoplasia, 2009). Entretanto, não podemos descartar totalmente a possibilidade de desenvolvimento de carcinomas hepatocelulares bem diferenciadas (CHC), já que a diferenciação de CHC e adenoma hepatocelular é muito sutil. Resultados de adenoma hepatocelular e CHC foram relatados em outros modelos murinos experimentais de DHGNA (SHIOTA, 2005; WATANABE, *et al.*, 2005). Camundongos deficientes de PTEN, por exemplo, apresentam alterações no fígado similares à descrita em NASH e também desenvolvem adenoma hepatocelular e CHC (WATANABE *et al.*, 2005). Entretanto, este modelo não desenvolve características de síndrome metabólica, diferentemente do modelo descrito em nosso trabalho. Além disso, nós não encontramos relatos de casos humanos de NASH relativos a mutações específicas neste gene. Shiota (2005) descreveu o desenvolvimento de adenoma hepatocelular e CHC em camundongos transgênicos que não expressava o receptor do ácido retinóico. A perda da sinalização do ácido retinóico danifica a β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos e causa esteatose hepática (SHIOTA, 2005). A hepatocarcinogênese está associada à ativação da via Wnt e ao estresse oxidativo. Recentemente, Paradis e colaboradores descreveram a presença de CHC bem diferenciado associado com adenoma hepatocelular em pacientes com síndrome metabólica em fígados sem fibrose significativa (PARADIS *et al.*, 2009). Os autores sugerem que a progressão conhecida da fibrose à cirrose e daquela à CHC não seja o caminho principal ao desenvolvimento de CHC no contexto da síndrome metabólica. É possível que os fatores relativos à síndrome metabólica sejam reconhecidos como o fator de risco potencial para CHC tal como a obesidade, diabetes tipo 2, hiperinsulinemia, espécies reativas de oxigênio e peroxidação de lipídeo envolvidos na oncogênese dos hepatócitos nos seres humanos, assim como no modelo de DHGNA apresentado neste trabalho (EL-SERAG, *et al.*, 2004; NAIR *et al.*, 2002; CALDWELL *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2002). A presença de adenoma associados à CHC em muitos casos sugere que o mecanismo envolvido na progressão do adenoma para CHC é uma via ainda a ser investigada.

O modelo descrito no presente trabalho reproduz todos os índices clínicos da DHGNA e de NASH, possuindo um desenvolvimento espontâneo de DHGNA, que progride para a NASH sem outra intervenção. Além disso, apresenta fibrogênese do fígado e progressão para neoplasia em alguns casos. Portanto, reproduz a patologia humana, representando uma promissora ferramenta de estudo da esteatohepatite não-alcoólica, assim como para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

5.2 - Terapia celular

Após o período de indução do diabetes tipo 2, os animais alimentados com a ração *high-fat* foram submetidos ao transplante de células mononucleares de medula óssea (CMMO), enquanto a outra parte recebeu solução salina. Zago e colaboradores (2005) afirmam que o transplante de CMMO é hoje a única forma de tratamento com células-tronco humanas cuja aplicação já faz parte do arsenal médico no mundo todo e é largamente empregada para tratar leucemias, linfomas e algumas doenças hereditárias.

Os estudos que investigam os efeitos da terapia com célula-tronco no diabetes *mellitus* são realizados em modelos de pancreatemia parcial (LECHNER *et al.*, 2004) ou lesão nas ilhotas pancreáticas, comumente induzida pela estreptozotocina (CHOI *et al.*, 2003; HESS *et al.*, 2003; SORIA *et al.*, 2000). Essa droga provoca a destruição seletiva de células beta e tem efeito maior quando administrada em múltiplas doses de baixa concentração, sendo muito utilizado para gerar a lesão na investigação de alternativas de tratamento, inclusive em estudos de regeneração do pâncreas (CHOI *et al.*, 2003). Outros autores utilizam camundongos transgênicos, simulando o diabetes decorrente de mutações monogênicas, sendo muito específico e pouco representativo (ENDE *et al.*, 2004; TANEERA *et al.*, 2006).

Hess e colaboradores (2003) observaram que células-tronco de medula óssea iniciam o reparo da lesão pancreática induzida pela administração de estreptozotocina, revertendo a hipoinsulinemia e hiperglicemia em camundongos C57Bl/6. Esses pesquisadores encontraram células derivadas de medula óssea que expressavam insulina no pâncreas, porém a sua baixa frequência e a ausência de outros marcadores de células β indicam que a melhora provavelmente resultou do estímulo à regeneração endógena do tecido. Múltiplas injeções de células de medula óssea também restauraram as ilhotas pancreáticas lesadas pela estreptozotocina, normalizando a glicemia e a tolerância à glicose em camundongos diabéticos no estudo realizado por Benerjee e colaboradores (2005). Os autores não realizaram ensaios para a identificação de uma possível transdiferenciação das células transplantadas. Um estudo recente demonstrou a derivação de células produtoras de insulina a partir de células-tronco embrionárias humanas *in vitro*. Estas células foram então transplantadas para camundongos imunodeficientes, cujas ilhotas pancreáticas foram lesadas com estreptozotocina, revertendo a hiperglicemia (JIANG *et al.*, 2007).

A pesquisa voltada para a terapia celular no DM tem visado principalmente a regeneração das ilhotas pancreáticas, restabelecendo a produção de insulina. O modelo desenvolvido nesse trabalho não reproduziu a lesão no pâncreas, de forma que não foi investigada uma possível participação das células transplantadas nessa regeneração. Porém, a resistência à insulina é um fenômeno precoce e de grande relevância na obesidade e DM2 (STUMVOLL *et al.*, 2005), de forma que o modelo simula as condições mais comuns do DM2, permitindo uma compreensão do real potencial da terapia com células de medula óssea para a maioria dos pacientes diabéticos. A sua utilização na investigação dos efeitos da terapia celular é inédita.

O aumento de peso corpóreo e a hiperglicemia de jejum não foram alterados pelo transplante de CMMO até 6 meses após a terapia. Parekh e colaboradores (2005) demonstraram que essas características podem, até certo ponto, ser revertidas

apenas pelo retorno à dieta de baixo teor de gordura. Assim, a persistência do estímulo (dieta *high-fat*) após o transplante pode estar associada à manutenção desses parâmetros. Entretanto, existe uma dificuldade dos pacientes diabéticos alterarem seu estilo de vida, sendo fundamental a busca por terapias que dependam o mínimo possível dessa mudança.

Apesar de não ter sido observada uma redução da glicemia de jejum após transplante, o teste de tolerância à glicose mostrou uma melhora na curva glicêmica nos camundongos que receberam CMMO após 3 meses da infusão. Esse resultado reflete uma melhor reação à sobrecarga metabólica. A possível recuperação do metabolismo se reflete também na melhora significativa do perfil lipídico dos camundongos que receberam células infundidas 6 meses antes, embora este resultado ainda precise ser repetido.

Essa recuperação dos camundongos que receberam CMMO quando comparados aos que foram injetados apenas com solução salina pode estar associada a um aumento da sensibilidade à insulina. A recuperação da lesão gerada no fígado parece ser independente de processos de transdiferenciação e fusão celular, ainda que estes não tenham sido avaliados no trabalho. Nesse modelo, parece mais provável que o mecanismo de ação das CMMO seja através de efeitos parácrinos, liberando mediadores que influenciam a cascata de sinalização da insulina ou modelando a liberação dos mesmos por outras células e garantindo uma redução da resistência à insulina e, conseqüentemente, uma melhor tolerância ao hormônio.

O trabalho de Ende e colaboradores (2004) abordam a lesão de outro tecido-alvo do DM2 além do pâncreas, o rim. O transplante de células de cordão umbilical humano em camundongos com DM2 atenuou a hipertrofia glomerular e a dilatação tubular, indicando uma recuperação da lesão renal gerada pelo diabetes. Apesar dos resultados indicarem lesão renal nos camundongos alimentados com a dieta *high-fat*

no nosso modelo, a proteinúria gerada durante o período de indução não foi revertida após a terapia celular.

A terapia com células-tronco é bastante estudada em inúmeras lesões hepáticas, entretanto não foram encontrados trabalhos em NASH descritos na literatura. No modelo utilizado nesse trabalho, foi observada, na análise histológica, uma redução da fibrose e da esteatose macrovacuolar, mas não microvacuolar, após a terapia celular. Tais observações não foram observadas com mesma intensidade em todos os experimentos. A esteatose macrovacuolar está relacionada a alterações no metabolismo de lipídios, acarretando um maior aporte a partir de depósitos periféricos, síntese aumentada e dificuldade de exportação e/ou oxidação. Já a microvacuolar decorre de defeito na oxidação mitocondrial de ácidos graxos, refletindo uma alteração mais grave do metabolismo celular (FREITAS & COTRIM, 2006).

A melhora no tecido hepático atribuída à infusão de CMMO está provavelmente relacionada a uma recuperação metabólica de maior sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos, além de efeitos locais no fígado. A adiposidade central, por aumentar o fluxo de ácido graxo livre para o fígado através da circulação portal, colabora com a deposição de gordura no fígado, tornando-o resistente à insulina, e reduzindo a sua capacidade de extração de insulina, o que piora a hiperinsulinemia (WAJCHENBERG *et al.*, 2006). Sabe-se que a esteatose hepática da resistência a insulina é causada pelo acúmulo de SREBP-1c (*sterol regulatory element-binding proteins*), que está elevado em resposta aos altos níveis circulantes de insulina. O nível elevado de SREBP-1c nuclear aumenta a expressão de genes lipogênicos, a síntese de ácidos graxos e o acúmulo de triglicérides (ZECCHIN & SAAD, 2006) e, quando inapropriadamente elevado, o excesso alimentar levará ao acúmulo de lípidos em tecidos ectópicos (células não adiposas), como hepatócitos e células beta pancreáticas, causando danos a esses tecidos (WAJCHENBERG *et al.*, 2006). No presente estudo, as CMMO poderiam estar atuando na cascata de sinalização da

insulina, proporcionando uma redução da resistência e, assim, aliviando os seus efeitos como o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos, como um efeito imunomodulador.

Diferentemente da esteatose, a redução da fibrose proporcionada pelo transplante de CT em lesão hepática é bem relatada na literatura. Como nos demais tecidos, o mecanismo de atuação da célula-tronco no fígado permanece controverso. Alguns estudos atribuem a redução da fibrose hepática à transdiferenciação das CT (JANG *et al.*, 2004) e outros, à sua fusão com hepatócitos (WANG *et al.*, 2003). O terceiro mecanismo, a ação parácrina, prevê a participação das CT no processo dinâmico de fibrose hepática e vem recebendo uma maior atenção na atualidade.

Durante a fibrogênese, a matriz extracelular (MEC) é alterada quantitativa e qualitativamente, resultado da interação entre fatores fibrogênicos e antifibrogênicos. Em resposta a uma lesão, as células estreladas do fígado sofrem um processo de ativação, tornando-se fibroblastos e miofibroblastos contráteis, que sintetizam elementos da matriz extracelular (colágenos, elastina, proteoglicanos e proteínas de constituição). Essa ativação é dependente de citocinas e outros estímulos locais, como o TGF- β (*transforming growth factor- β*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) e TNF- α (*tumor necrosis factor*) (ANDRADE, 2005; FRIEDMAN, 2000). Quando o estímulo fibrogênico ainda não induziu uma deposição excessiva de componentes da MEC acompanhada de distorção da arquitetura hepática, o processo pode ser reversível. Pode ocorrer a liberação de metaloproteinases (MMP – *matrix metalloproteinase*) que degradam o colágeno intersticial e da membrana basal (PEREIRA, 2006).

Nesse sentido, Sakaida e colaboradores (2005) observaram que as células de medula óssea transplantadas em camundongos cirróticos migraram para as fibras e apresentaram forte expressão de MMP-9, acarretando uma redução da fibrose. Outros estudos indicam que essa melhora pode estar associada à redução dos níveis de

TGF- β (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Apesar de não ter sido avaliada a migração das células de medula para o fígado, a redução da fibrose observada em nosso modelo provavelmente está associada também a ações parácrinas. É importante ressaltar que a dieta *high-fat* continuou sendo oferecida aos camundongos mesmo após a terapia celular, sendo os resultados obtidos atribuídos exclusivamente à atuação das CMMO.

Nesse trabalho a terapia com células mononucleares de medula óssea não reduziu o peso corpóreo dos animais obesos e diabéticos três e seis meses após a terapia, e também não observamos redução da glicemia de jejum dos animais. Porém, três meses após a terapia, observamos redução da intolerância a glicose nos animais alimentados com dieta *high-fat*, além de apresentarem uma redução da fibrose perissinusoidal no fígado após 3 meses de terapia e esta diferença se manteve até 6 meses após a terapia, o que pode sugerir um efeito parácrino das células mononucleares de medula óssea.

6 – SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Camundongos C57Bl/6 machos alimentados com dieta hipergordurosa desenvolvem hiperglicemia, obesidade, intolerância à glicose e proteinúria, além de reproduzir uma esteato-hepatite não-alcoólica (NASH) semelhante à condição em humanos. Constituem, portanto, um modelo representativo do diabetes *mellitus* tipo 2 humano.
- Camundongos C57Bl/6 machos alimentados com dieta *high-fat* desenvolvem esteato-hepatite não-alcoólica (NASH) apresentando esteatose macrovacuolar e microvacuolar, balonização dos hepatócitos, corpúsculo de Mallory, inflamação e fibrose perisinusoidal semelhante à condição em humanos.
- Camundongos C57Bl/6 fêmeas não desenvolvem obesidade, *hiperglicemia* e DM2 quando submetidas à mesma dieta que os machos.
- A terapia com células mononucleares de medula óssea não reduz o peso corpóreo dos animais C57Bl/6 machos obesos e diabéticos.
- Três e seis meses após a terapia, não foi observada redução da glicemia de jejum dos animais.
- Três meses após a terapia, observou-se redução da intolerância a glicose nos animais alimentados com dieta *high-fat*.
- Houve uma redução da fibrose perissinusoidal no fígado após 3 meses de terapia e esta diferença se manteve até 6 meses após a terapia.

7 - REFERÊNCIAS:

- ACCILI D.; DRAGO J.; LEE E.J.; et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. **Nat Genet** 1996;12:106-9.
- AGUIAR, M.J.B., SILVA, S.C. Genética do diabetes. In: Ruy Lira; Ney Cavalcanti. (Org.) **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006, p. 71-77.
- ALMIND, K., KAHN, R. Genetic Determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. **Diabetes** 2004; 53: 3274-3285.
- ALPERS, C.E. O Rim. In: KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. (Ed.) **Patologia Robbins & Cotran**, Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 999-1066.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: type 2 diabetes in children and adolescents – consensus statement. **Diabetes Care** 2000, 23: 381-9.
- ANDERSON JW, KENDALL CW, JENKINS DJ. Importance of weight management in type 2 diabetes: review with meta-analysis of clinical studies. **J Am Coll Nutr** 2003; 22:331—339.
- ANDRADE, Z.A. Regressão da fibrose hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 2005; 38(6): 514-520.
- ARGILÉS JM. The rise and fall of the cafeteria diet: some observations. **J Nutr** 1988;118:1593-4.
- ARISON, R. N.; FEUDALE, E. L. Induction of renal tumour by streptozotocin in rats. **Nature** 1967; 214:1254-1255.
- BEDOGNI G, MIGLIOLI L, MASUTTI F, TIRIBELLI C, MARCHESINI G, BELLENTANI S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology** 2005; 42: 44-52.
- BENERJEE, M., KUMAR, A., BHONDE, R.R. Reversal of experimental diabetes by multiple bone marrow transplantation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2005; 328:318-325.
- BIRNBAUM MJ. Turning down insulin signaling. **J Clin Invest** 2001;108:655-9.
- BLAU, H.M., BRANZELTON, T.R., WEIRMANN, J.M. The evolving concept of a stem cell: Entity or function? **Cell** 2001; 105: 829-841.
- BONNET, F., COOPER, M.E. Potential influence of lipids in diabetic nephropathy: insights from experimental data and clinical studies. **Diabetes and Metabolism** 2000; 26: 254-264.
- BOUWENS, L., ROOMAN, I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. **Physiol Rev** 2005; 85:1255-1270.

- BRADY, M. IRS-2 takes center stage in the development of type 2. **Diabetes** 2004; 114.
- BROSKY G, LOGOTHETOPOULOS J. Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig. **Diabetes** 1969; 18: 606-11.
- BRUNT, E.M. Nonalcoholic Steatohepatitis. **Semin Liver Dis** 2004; 24(1):3-20.
- BRUUN JM, ROESKE-NIELSEN A, RICHELSEN B, FREDMAN P, BUSCHARD K. Sulfatide increases adiponectin and decreases TNF- α , IL-6 and IL-8 in human adipose tissue *in vitro*. **Molecular and Cellular Endocrinology** 2007; 263: 142-148.
- CALDWELL SH, CRESPO DM, KANG HS, AL-OSAIMI AM. Obesity and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology** 2004; 127(5 Suppl 1):S97-103.
- CAMPFIELD LA, SMITH FJ, BURN P. The OB protein (leptin) pathway – a link between adipose tissue mass and central neural networks. **Horm Metab Res** 1996;28:619-32.
- CARVALHEIRA J.B., RIBEIRO E.B., B. G.R., TELLES M.M., VELLOSO L.A., GONTIJO J.A., et al. Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'. **Diabetes** 2002b; 51:A41.
- CARVALHEIRA, J. ZECCHIN, H., SAAD, M. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia** 2002a; 46(4): 479-425.
- CESARETTI M. L. R.; KOHLMANN O.JR. Modelos experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas **Arq Bras Endocrinol Metab** 2006;50/2:190-197
- CHENG A.Y.Y., Fantus I.G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **CMAJ** 2005;172(2): 213-226.
- CHOI, J.B. *et al.* Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. **Diabetologia** 2003; 46: 1366-1374.
- CHUA, S., *et al.* Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. **Science** 1996; 291: 994-996.
- CLARK JM, FREDERICK LB, DIEHL AM. Nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology** 2002; 122: 1649-1657.
- CLARK JM. Weight loss as a treatment for nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Gastroenterol** 2006; 40 Suppl 1: S39-S43.
- CLARK, J.M.; BRANCATI, F.L.; DIEHL, A.M. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. **Am J Gastroenterol** 2003; 98: 960-967.
- COLLINS, S.D., BAFFOUR, R., WAKSMAN, R. Cell therapy in myocardial infarction. **Cardiovascular Revascularization Medicine** 2007; 8: 43-51,.
- CORNIER MA. Obesity and diabetes. **Curr Opin Endocrinol Diabetes** 2005; 12: 260-266.

- COSTA LA, et al. Aggregation of features of metabolic syndrome increases the proportion of diabetic complications in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabet Med.** 2004; 21(3): 252-5.
- COVAS, D.T. Células-tronco mesenquimais. In: Marco Antonio Zago; Dimas Tadeu Covas. (Org.) **Células-tronco: a nova fronteira da medicina.** São Paulo: Atheneu, 2006, p. 35-48.
- COWAN, C.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. **N Engl J Med**, v. 350, n. 13, p. 1353-1356, 2004.
- CRUZ, T. *et al.*, O fígado e a síndrome metabólica. In: Amélio F. de Godoy-Matos. **Síndrome Metabólica.** São Paulo: Atheneu, 2005, p. 259-275.
- DAVIES MJ, Raymond NT, Day JL, Hales CN, Burden AC. **Diabetic Medicine** 2000, 17: 433-40.
- DENG, G., SHE, H., CHENG, J., FRENCH, S., KOOP, D., XIONG, S., TSUKAMOTO, H. Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. **Hepatology** 2005; 42: 905-914.
- DIETZE D, KOENEN M, ROHRIG K, HORIKOSHI H, HAUNER H, ECKEL J. Impairments of Insulin Signaling in Human Skeletal Muscle Cells by Co-Culture With Human Adipocytes. **Diabetes** 2002; 51: 2369-2376.
- DOMEN, J., WAGERS, A., WEISSMAN, I.L. Bone marrow (hematopoietic) stem cells. In: NIH Report. **Regenerative Medicine.** 2006.
- DONOVAN, P.J., GEARHART. J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature** 2001; 414: 92-97.
- DUNN SJ, MCLETCHI NGB. Experimental alloxan diabetes in the rat. **Lancet** 1943; 2: 348-9.
- EGLITIS MA, MEZEY E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94: 4080-4085.
- EL-SERAG HB, TRAN T, EVERHART JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology** 2004; 126(2):460-468.
- ENDE, N., CHEN, R., REDDI, A.S. Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetic mice. **Biochemical and biophysical research communications** 2004; 321:168-171,.
- EVANS JS, GERRITSEN GC, MANN KM, OWEN SP. Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin (NSC-37917) and its cofactor, U-15, 774. **Cancer Chemother Rep** 1965; 48: 1-6.
- FALCK-YTTER, Y.; MC CULLOUGH, A.J. **Sem Liver Disease** 2001; 21(1):17-26.
- FEINSTEIN R, KANETY H, PAPA MZ, LUNENFELD B, KARASIK A. Tumor Necrosis Factor- α Suppresses Insulin-induced Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor and Its Substrates. **The Journal of Biological Chemistry** 1993; 268: 26055-26058.

- FERRARI, G., *et al.* Muscle Regeneration by Bone-Marrow Derived Myogenic Progenitors. **Science** 1998; 279:1528-1530.
- FORD ES, GILES WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. **Diabetes Care**. 2003; 26(3): 575-81.
- FORTI, A., LOUREIRO, R., GUSMÃO, A., TEIXEIRA, L. Doenças do pâncreas endócrino In Endocrinologia Clínica, Editor: Lúcio Vilar e colaboradores Medsi: Editora Médica e científica Ltda, Rio de Janeiro - RJ . 3 ed ; 2006.Capítulo 43 539p
- FREITAS, L.A.R., COTRIM, H. P. Atlas NASH: Guia Fotográfico da Esteato - Hepatite Não Alcoólica. São Paulo: Zambon, 2006, v. 1. 80 p.
- FRIEDMAN, S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **The Journal of Biological Chemistry** 2000; 275(4): 2247-2250.
- FUJIMOTO, W.Y. The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Medicine** 2000; 108: 14S-19S.
- GALINDO, V., CAVALCANTI, N, LYRA, R. Definição, diagnóstico e classificação dos distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono. In: Ruy Lira; Ney Cavalcanti. (Org.) **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006, p. 55-60.
- GAO, Y., XUE, J., LI, X., JIA, Y. HU, J. Metformin regulates osteoblast and adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. **Pharmacy and Pharmacology** 2008; 60: 1695-1700.
- GILLILAND IC, MENCER MARTIN M. Effect of tablets of insulin on normal and alloxan-diabetic rabbits. **Lancet** 1951; 1: 143-6.
- Green RM. NASH--hepatic metabolism and not simply the metabolic syndrome. **Hepatology** 2003; 38(1):14-17.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973p. Cap. 78: Insulina, glucagons e diabete melito.
- HESS, D. *et al.* Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. **Nature Biotechnology** 2003; 21(7).
- HILDEN, M.; CHRISTOFFERSEN, P.; JUHL, E.; DALGAARD, J.B. Liver histology in a normal population – examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties. **Scand J Gastroenterol** 1997; 12: 593-597.
- HOFMANN C, LORENZ K, BRAITHWAITE SS, COLCA JR, PALAZUK BJ, HOTAMISLIGIL GS, SPIEGELMAN BM. Altered gene expression form tumor necrosis factor- α and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. **Endocrinology** 1993; 134: 264-270.
- HORWITS, E.M. Stem cell plasticity: The growing potential of cellular therapy. **Archives of Medical Research** 2003; 34: 600-606

HOTAMISLIGIL GS, ARNER P, CARO JF, ATKINSON RL, SPIEGELMAN BM. Increased Adipose Tissue Expression of Tumor Necrosis Factor- α in Human Obesity and Insulin Resistance. **J Clin Invest** 1995; 95: 2409-2415.

HU, F.B., *et al.* Diet, Lifestyle, and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Women. **N Engl J Med** 2001; 345(11): 790-797.

HULL, R., *et al.* Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. **Diabetologia** 2005; 48: 1350-1358.

HUNNICUTT, J. W.; HARDY, R. W.; WILLIFORD, J.; MCDONALD, J. M. Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes. **Diabetes** 1994; 43(4): 540-5.

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

ISOMAA, B.; HENRICSSON, M.; ALMGREN, P.; TUOMI, T.; TASKINEN, M. R.; GROOP, L. The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with type II diabetes. **Diabetologia** 2001; 44:1148-54.

ITO, M., *et al.* Development of nonalcoholic seteatohepatitis model through combination of high-fat diet annde tetracycline with morbid obesity in mice. **Hepatology Research** 2006; 34: 92-98.

IWASE, M.; NUNOI, K.; WAKISAKA, M. *et al.* Spontaneous recovery from non-insulin-dependent diabetes mellitus induced by neonatal streptozotocin treatment in spontaneously hypertensive rats. **Metabolism** 1991; 40: 10-14.

JACKSON, K.A., *et al.* Stem cells: a minireview. **Journal of Cellular Biochemistry Supplement** 2002; 38: 1-6.

JANG, Y.Y.,*et al.* Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. **Nature Cell Biology** 2004; 6: 532-539.

JIANG, W., *et al.* In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. **Cell Research** 2007; 17: 333-344.

JIANG, Y., *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature** 2002; 418: 41–49.

JOHNSON DD. Alloxan administration in the guinea pig: A study of the histological changes in the islands of Langerhans, the blood sugar fluctuations, and changes in the glucose tolerance. **Endocrinology** 1950; 47:393-8.

JUNOD A, LAMBERT AE, STAUFACHER W, RENOLD AE. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. **J Clin Invest** 1969; 48: 2129-39.

KANEMOTO N, HISHIGAKI H, MIYAKITA A, OGA K, OKUNO S, TSUJI A, *et al.* Genetic dissection of “OLETF”, a rat model for non-insulin-dependent diabetes

mellitus. **Mamm Genome** 1998;9:419-25.

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

KAZUMI, T. *et al.* Tumorigenic action of streptozotocin on the pancreas and kidney in male wistar rats. **Cancer Res** 1978; 38: 2144-2147.

KEEN RHINEHART E, KALRA SP, KALRA PS. Neuropeptidergic characterization of the leptin receptor mutated obese Koletsky rat. **Regul Pept** 2004;119(1-2):3-10.

KIM JK, KIM YJ, FILLMORE JJ, CHEN Y, MOORE I, LEE J, *et al.* Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. **J Clin Invest.** 2001;108:437-46.

KIRSCH R, CLARKSON V, SHEPHARD EG, MARAIS DA, JAFFER MA, WOODBURN VE, *et al.* Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. **J Gastroenterol Hepatol** 2003; 18(11):1272-1282.

KNOWLER, WC; BARRETT-CONNOR, E; FOWLER, SE. *et al.* Diabetes Prevention Program Research Group. **N Engl J Med** 2002; 346: 393-403.

KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Gene Therapy** 2002; 9: 754-758.

KRAUSE, D.S., *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell** 2001; 105: 369–377.

KUSHNER B, LAZAR M, FURMAN M, LIEBERMAN TW, LEOPOLD IH. Resistance of rabbits and guinea pigs to the diabetogenic effect of streptozotocin. **Diabetes** 1969; 18: 542-4.

LAAKSONEN, D. E.; LAKKA, H. M.; NISKANEN, L. K.; KAPLAN, G. A.; SALONEN, J. T.; LAKKA, T. A. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. **Am J Epidemiol** 2002; 156(11): 1070-7.

LECHNER, A., *et al.* No evidence of significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic β -cells in vivo. **Diabetes** 2004; 53: 616-623.

LEHTO S, RÖNNEMAA T, HAFFNER SM, PYÖRÄLÄ, KALLIO V, LAAKSO M. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. **Diabetes** 1997; 46: 1354-9.

LEITE, S.O. Patogênese do pâncreas no diabetes tipo 2. In: Ruy Lira; Ney Cavalcanti. (Org.) **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006, p.87-91.

LIEBER, C.S., *et al.* Model of nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Clin Nutr** 2004; 79: 502-509.

LIU, Y., *et al.* Severe insulin resistance and moderate glomerulosclerosis in a minipig model induced by high-fat/high-sucrose/high-cholesterol diet. **Exp. Anim** 2007; 56(1): 11-20.

LIVINGSTON EH, KO CY. Effect of diabetes and hypertension on obesity-related mortality. **Surgery** 2005; 137:16—25.

LOJUDICE, F.H., *et al.* Células-tronco para o tratamento de diabete melito. In: Marco Antonio Zago; Dimas Tadeu Covas. (Org.) **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, p.159-172.

LONARDO, A.; BELLINI, M.; TARTONI, P.; TONDELLI, E. The bright liver syndrome-prevalence and determinants of a “bright” liver echopattern. **Ital J Gastroenterol Hepatol** 1997; 29: 351-356.

LORIA P, LONARDO A, BELLENTANI S, DAY CP, MARCHESINI G, CARULLI N. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and cardiovascular disease: An open question. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases** 2007.

LOUET, J.F., LEMAY, C., MAUVAIS-JARVIS, F.M. Antidiabetic actions of estrogen: Insight from human and genetic mouse models. **Current Atherosclerosis Reports** 2004; 6(3): 180-185.

LOWELL B.B., Shulman G.I. Mitochondrial Dysfunction and Type 2 Diabetes. **Science** 2005; 307: 384.

MAITRA, A., ABBAS, A.K. O sistema endócrino. In: KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. (Ed.) **Patologia Robbins & Cotran**, Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1207-1282.

MALAISSSE WJ. Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell. A new hypothesis. **Biochem Pharmacol** 1982; 31: 3527-34.

MALECKI, M.T. Genetics of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 68S1, p. S10-S21, 2005.

MANSFORD KRL, OPIE L. Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or alloxan. **Lancet** 1968; 1: 670-1.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes** 2001 Aug;50(8):1844-1850.

MARCHESINI G, BUGIANESI E, FORLANI G, CERRELLI F, LENZI M, MANINI R, *et al.* Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology** 2003 Apr;37(4):917-923.

MARQUES-LOPES I, MARTI A, MORENO-ALIAGA MJ, MARTINEZ A. Genetics of obesity. **Rev Nutr** 2004;17/3:327-38.

MATOS, A.F.G., GUEDES, E.P., VIEIRA, A. O adipócito: funções e relação com a resistência à insulina e o diabetes. In: Ruy Lira; Ney Cavalcanti. (Org.) **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006, p. 117-121

MATTOS, A. Esteato-hepatite não-alcoólica. **Jornal Brasileiro de Gastroenterologia** 2005; 5: 160-165.

MAUER, S. M.; LEE, C. S.; NAJARIAN, J. S. *et al.* Induction of malignant kidney

- tumors in rats with streptozotocin. **Cancer Res** 1974; 34: 158-160.
- MC AVOY, N.C.; FERGUSON, J.W.; CAMPBELL, I.W.; HAYES, P.C. Non-alcoholic fatty liver disease: natural history, pathogenesis and treatment. **Br J Diabetes Vasc Dis** 2006; 6(6): 251-260.
- MEDVINSKY, A., SMITH, A. Fusion brings down barriers. **Nature** 2003; 422: 823-825.
- MIMEAULT, M., HAUKE, R., BATRA, S.K. Stem cells: A revolution in therapeutics - Recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 2007; 82(3): 252-264.
- MORDES JP, ROSSINI AA. Animal models of diabetes. **Am J Med** 1981; 70: 353-60.
- MOSCATELLO, S., MANINI, R., MARCHESINI, G. Diabetes and liver disease: an ominous association. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular diseases** 2007; 17: 63-70.
- MUNZBERG H, MYERS JR. MG. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. **Nat Neuroscience** 2005;8:566-70.
- NAIR S, MASON A, EASON J, LOSS G, PERRILLO RP. Is obesity an independent risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis? **Hepatology** 2002 Jul;36(1):150-155.
- NANDI A, KITAMURA Y, KAHN CR, ACCILI D. Mouse models of insulin resistance. **Physiol Rev** 2004; 84 : 623-47.
- NANJI AA. Another animal model for nonalcoholic steatohepatitis: how close to the human condition? **Am J Clin Nutr** 2004;79(3):350-351.
- NARDI, N.B., ALFONSO, Z.C. Células-tronco hematopoéticas. In: Marco Antonio Zago; Dimas Tadeu Covas. (Org.) **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, p. 49-65.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH – NIH. Stem cell information: Stem cell basics. Disponível em <http://stemcells.nih.gov>. Acesso em: 12 outubro 2007.
- NEELS JG, PANDEY M, HOTAMISLIGIL GS, SAMAD F. Autoamplification of Tumor Necrosis Factor- α . **American Journal of Pathology** 2006; 168: 435-444.
- OKAMOTO H, OBICI S, ACCILI D, ROSSETTI L. Restoration of liver insulin signaling in *Insr* knockout mice fails to normalize hepatic insulin action. **J Clin Invest** 2005; 115: 1314-1322.
- OLIVEIRA, M., LYRA, R., CAVALCANTI, N. Abordagem geral no tratamento do diabetes. In: Ruy Lyra; Net Cavalcanti. **Diabetes Mellitus**, Rio de Janeiro: AC Farmacêutica, 2009, p.229-239.
- ORLIC, D., *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature** 2001; 410: 701-705.
- OTA T, TAKAMURA T, KURITA S, MATSUZAWA N, KITA Y, UNO M, AKAHORI H, MISU H, SAKURAI M, ZEN Y, NAKANUMA Y, KANEKO S. Insulin resistance

accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology** 2007; 132: 282-293.

PARADIS V, ZALINSKI S, CHELBI E, GUEDJ N, DEGOS F, VILGRAIN V, et al. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. **Hepatology** 2009 Mar;49(3):851-859.

PAREKH, P.I., et al. Reversal of Diet-Induced Obesity and Diabetes in C57BL/6J Mice. **Metabolism** 1998; 147(9): 1089-1096.

PARILLO, M., RICCARDI, G. Diet composition and the risk of type 2 diabetes: epidemiological and clinical evidence. **British Journal of Nutrition** 2004; 92: 7-19.

PARKER DR, WEISS ST, TROISI R, CASSANO PA, VOKONAS PS, LANDSBERG L. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations: the Normative Aging Study. **Am J Clin Nutr** 1993;58:129-36.

Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. **Hepatology** 2009 Feb;49(2):658-664.

PATTI M.E, KAHN C.R. The insulin receptor — a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol** 1998;9:89-109.

PENDER C, GOLDFINE ID, KULP JL, TANNER CJ, MADDUX BA, MACDONALD KG, HOUMARD JA, YOUNGREN JF. Analysis of insulin-stimulated insulin receptor activation and glucose transport in cultured skeletal muscle cells from obese subjects. **Metabolism Clinical and Experimental** 2005; 54: 598-603.

PEREIRA LO, FRANCISCHI RP, LANCHA JR AH. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2003;47/2:111-127

PEREIRA, L. V. Células tronco embrionárias e clonagem terapêutica. In: Marco Antonio Zago; Dimas Tadeu Covas. (Org.) **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, p. 21-34.

PEREIRA, Regina Maria. **Avaliação do papel fisiopatológico da angiotensina-(1-7) em modelo experimental de fibrose hepática**. 2006. 157f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

PETERSEN, B.E., et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science** 1999; 284: 1168–1170.

PETRO, A.E., COTTERM J., COPPER, D.A., PETERS, J.C., SURWIT, S.J., SURWIT, R.S. [Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse.](#) **Metabolism** 2004; 24 (4): 454-457.

PITKIN RM, REYNOLDS WA. Diabetogenic effects of streptozotocin in rhesus monkeys. **Diabetes** 1970; 19: 85-90.

PLUM L, WUNDERLICH FT, BAUDLER S, KRONE W, BRUNING JC. Transgenic and knockout mice in diabetes research: Novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives. **Physiology (Bethesda)** 2005;20:152-61.

- PORTHA, B.; BLONDEL, O.; SERRADAS, P. et al. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. **Diabetes Metab** 1989; 31: 61-75.
- POULIOT MC, DESPRÉS JP, LEMIEUX S, MOORJANI S, BOUCHARD C, TREMBLAY A, et al. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. **Am J Cardiol.** 1994; 73: 460-8.
- PRENTKI, M., NOLAN, C.J. Islet β cell failure in type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Investigation** 2006; 116 (7).
- RAKIETEN N, RAKIETEN ML, NADKARNI MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemother Rep** 1963; 29: 91-8.
- RAMALHO, A.C.R., LIMA, M.L. Insulina e antidiabéticos orais. In: Penildon Silva. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 805-823.
- Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes.** 1998 ; 37: 1595-1607.
- Reid AE. Nonalcoholic Steatohepatitis. **Gastroenterology** 2001; 121: 710-723.
- RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacol. Rev** 1970; 22: 485-518.
- REXRODE KM, CAREY VJ, HENNEKENS CH, WALTERS EE, COLDITZ GA, STAMPFER MJ, WILLET WC, MANSON JE. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. **JAMA** 1998 ; 280: 1843-8.
- RHODES, C. Type 2 diabetes – a matter of β -cell life and death? **Science** 2005; 307: 380-384.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., SOARES, M.B.P., CARVALHO, A.C.C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 2004; 37(6): 490-495.
- RINELLA ME, GREEN RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. **J Hepatol** 2004 Jan;40(1):47-51.
- RIPPON, H.J., BISHOP, A.E. Embryonic stem cells. **Cell Proliferation**, v. 37, p. 23-34, 2004.
- ROGERS RG, HUMMER RA, KRUEGER PM. The effect of obesity on overall, circulatory disease- and diabetes-specific mortality. **J Biosoc Sci** 2003; 35:107-129.
- SAAD, M. J.; CARVALHO, C. R.; THIRONE, A. C.; VELLOSO, L. A. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **J Biol Chem** 1996; 271(36): 22100-4.
- SAKAIDA, I., TERAJ, S., NISHIMA, H., OKITA, K. Development of cells therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. **Med Mol Morphol** 2005; 38: 197-202.
- SCHMID, G., *et al.* Effect of high-fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissues, and liver of C57BL/6 mice. **Proteomics**, v.4, p. 2270-2282, 2004.

SCREEKUMAR, R.; ROSADO, B.; RASMUSSEN, D.; CHARLTON, M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology** 2003; 38: 244-251.

SHERWIN, R. Diabetes Mellito In Cecil: Tratado de Medicina Interna. Rio de Janeiro:Elsevier, 2005, p. 242S1: S1658-S1691 v2.

SHIOTA G. Loss of function of retinoic acid in liver leads to steatohepatitis and liver tumor: A NASH animal model. **Hepatol Res** 2005; 33(2):155-160.

SHOELSON SE, LEE J, GOLDFINE AB. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest** 2006; 116: 1793-1801.

Sociedade Brasileira de Diabetes: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2 – Consenso Brasileiro sobre diabetes 2002, 1-73.

SONE H, TAKAHASHI A, IIDA K, YAMADA N. Disease model: Hyperinsulinemia and insulin resistance. Part B – polygenic and other animal models. **Trends Mol Med** 2001;7:373-6.

SORIA, B. In vitro differentiation of pancreatic β -cell. **Differentiation** 2001; 68: 205-219.

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

STEINER, H.; OELZ, O.; ZAHND, G. et al. Studies on islet cell regeneration, hyperplasia and intrainsular cellular interrelations in long lasting streptozotocin diabetes in rats. **Diabetologia** 1970; 6: 558-564.

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

SVEGLIATI-BARONI G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, et al. A Model of Insulin Resistance and Nonalcoholic Steatohepatitis in Rats. **Am J Pathol** 2006; 169: 846-860.

TANEERA, J., et al. Failure of transplanted bone marrow cells to adopt a pancreatic β -cell fate. **Diabetes** 2006; 55: 290-296.

THOMSON, J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, **Science** 1998; 282: 1145-1147.

TRUCCO, M. Regeneration of the pancreatic β cell. **The Journal of Clinical Investigation** 2005; 115(1): 5-12.

TUOMILEHTO J., LINDSTRÖM J., et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. **N Engl J Med** 2001; 344(18): 1343-1349.

VELEMINSKY J, BURR IM, STAUFFACHER W. Comparative study of early metabolic

events resulting from the administration of the two diabetogenic agents alloxan and streptozotocin. **Eur J Clin Invest** 1970; 1: 104-8.

VILAS-BOAS, F., *et al.* Early Results of Bone Marrow Cell Transplantation to the Myocardium of Patients with Heart Failure due to Chagas Disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 2006; 87(2).

WAGERS, A.J., WEISSMAN, L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, p. 639-648, 2004.

WAJCHENBERG, B.L.; SILVA, M.E.R.; SANTOS, R.F.; CUNHA, M.R.; SZTEJNSZNAJD, C. Gordura ectópica e resistência insulínica. In: Ruy Lira; Ney Cavalcanti. (Org.) **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006, p. 123-138.

WANG, X., *et al.* Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. **Nature** 2003, 422(6934): 832-835.

WANLESS, I.R.; LENTZ, J.S. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. **Hepatology** 1990; 12: 1106-1110.

WATANABE S, HORIE Y, SUZUKI A. Hepatocyte-specific Pten-deficient mice as a novel model for nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. **Hepatol Res** 2005; 33(2):161-166.

WATT, F.M., HOGAN, B.L.M. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. **Science** 2000; 287: 1427-1430.

WEI, P., *et al.* Glomerular structural and functional changes in a high-fat diet mouse model of early-stage type 2 diabetes. **Diabetologia**, 2004; 47: 1541-1549.

WHITE MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. **Diabetologia** 1997;40(suppl 2):S2-17.

WHITE, M.F. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Mol Cell Biochem** 1998; 182: 3-11.

WHO - World Health Organization. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva: Technical Report Series, 1990:797.

WHO - World Health Organization. **Obesity – preventing and managing the global epidemic**. Geneva: Report of a WHO Consultation on Obesity, 1998.

WILD, S., ROGLIC, G., GREEN A., SICREE, S., KING, H. Global Prevalency of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes care** 2004; 27: 1047- 1053.

WINZELL MS, AHRÉN B. The high-fat diet-fed mouse: A model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes** 2004; 53(3): S215-S219.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diabetes. Fact Sheet No312. 2006.

WRENSHALL GA, COLLINS-WILLIAMS J, BEST CH. Initial changes in the blood sugar of the fasted anesthetized dog after alloxan. **Am J Physiol** 1950; 160: 228-46.

XU H, GLENN TB, QING Y, GUO T, DASENG Y, CHIEH JC, JASON S, NICHOLS A, ROSS, JS, TARTAGLIA LA, CHEN H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**. 2003; 112(12): 1821-1830.

YAMAGAMI, T.; MIWA, A.; TAKASAWA, S. et al. Induction of rat pancreatic B-cell tumors by the combined administration of streptozotocin or alloxan and poly (adenosine diphosphate ribose) synthetase inhibitors. **Cancer Res** 1985; 45: 1845-1849.

YATES, T. *et al*. The role of physical activity in the management of impaired glucose tolerance: a systematic review. **Diabetologia** 2007; 50: 1116-1126.

YUAN M, KONSTANTOPOULOS N, LEE J, HANSEN L, LI ZW, KARIN M, *et al*. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. **Science** 2001;293:1673-7.

ZAGO, M. Terapia com células-tronco: Fundamentos, oportunidades e obstáculos. **Hipertensão** 2005; 8: 145-150.

ZAGO, M.A. Células-tronco: Origens e Propriedades. In: Marco Antonio Zago; Dimas Tadeu Covas. (Org.) **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, p. 21-34.

ZAGURY, L. (Ed). Atualização Brasileira sobre Diabetes/Sociedade Brasileira de Diabetes. – Rio de Janeiro : Diagraphic, 2005. 140p

ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos Avançados** 2004; 18(51): 247-256,.

ZECCHIN, H. *et al*. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo** 2004; 14: 574-589.

ZECCHIN, H.G., SAAD, M.J.A. Resistência insulínica no diabetes *mellitus* tipo 2. . In: Ruy Lira; Ney Cavalcanti. (Org.) **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006, p. 93-103.

ZIMMET P., ALBERT K.G.M.M., SHAW J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature** 2001; 414: 782-787.

ZOU Y, LI J, LU C, WANG J, GE J, HUANG Y, ZHANG L, WANG Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. **Life Sciences** 2006; 79: 1100-1107.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)