

Propriedades funcionais de células-tronco mesenquimais vasculares em ratos com diabetes mellitus experimental

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração I - Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Coorientador(a): Dra. Vanessa Capuano de Paula

Uberaba, 4 de abril de 2023.

Banca Examinadora

DR. VALDO JOSÉ DIAS DA SILVA
Orientador - UFTM

DR. HELIO MORAES DE SOUZA
UFTM

DR. ALEXANDRE DE PAULA ROGÉRIO
UFTM

DR. JOSE GERALDO MILL
UFES

DR. ELMIRO SANTOS RESENDE
UFU



Documento assinado eletronicamente por **VALDO JOSE DIAS DA SILVA**, **Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**, em 04/04/2023, às 12:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **HELIO MORAES DE SOUZA, Técnico-Administrativo em Educação**, em 10/04/2023, às 13:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALEXANDRE DE PAULA ROGERIO, Professor do Magistério Superior**, em 10/04/2023, às 15:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **JOSE GERALDO MILL, Usuário Externo**, em 10/04/2023, às 17:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elmiro Santos Resende, Usuário Externo**, em 11/04/2023, às 17:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0963380** e o código CRC **22C6662B**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS VASCULARES EM RATOS COM DIABETES
MELLITUS EXPERIMENTAL**

DIÓGENES RODRIGO MARONEZZI DE PAULA

UBERABA, MG, 2023

DIÓGENES RODRIGO MARONEZZI DE PAULA

**PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS VASCULARES EM RATOS COM DIABETES
MELLITUS EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do Título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Co-orientadora: Dra. Vanessa Capuano de Paula

Abril, 2023

DIÓGENES RODRIGO MARONEZZI DE PAULA

Tese intitulada “*Propriedades funcionais de células-tronco mesenquimais vasculares em ratos com diabetes mellitus experimental*”, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Hélio Moraes de Souza – UFTM

Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogério - UFTM

Prof. Dr. José Geraldo Mill - UFES

Prof. Dr. Elmiro dos Santos Resende – UFU

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva – UFTM

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Uberaba, 04 de abril de 2023.

Se você tem objetivos na vida é preciso muita luta para conquistá-los. E quanto mais valioso este objetivo, mais obstáculos aparecerão. E só consegue superá-los quem acredita em si mesmo.

Agradecimientos

Dedico esta tese de doutorado a Deus, ao meu considerado orientador Professor PhD. Valdo José Dias da Silva, aos professores, técnicos e pesquisadores da UFTM, à minha família, e toda equipe e parceiros da Animalcell®.

Dedico aos animais, que mesmo sem querer ou entender o porquê, foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Dedico em especial à minha esposa e co-orientadora PhD. Dra. Vanessa Capuano de Paula, que me ensinou que o amor é capaz de nos fazer passar pelas maiores dificuldades e com um belo sorriso no rosto. Confesso que houve inúmeros momentos que eu quis desistir, mas você não permitiu. A cada lágrima que as renúncias às minhas vontades e o estresse me trouxeram no decorrer destes vários anos de doutorado, foi sob seu peito, que encontrei a paciência necessária para entender que o tempo de Deus é diferente para cada um e que o amor junto à ciência se torna a maior arma contra a ignorância e nos traz calma e proteção.

Resumo

A macroangiopatia e a aterosclerose acelerada são desfechos importantes em pacientes com diabetes mellitus (DM) e contribuem para a alta morbidade/mortalidade observada nessa doença. Células-tronco mesenquimais vasculares contribuem para a fisiologia da parede vascular e poderiam estar alteradas no DM. Objetivos: avaliar diversas propriedades biológicas das células-tronco mesenquimais vasculares (vMSCs) arteriais e venosas em modelo de DM induzido por estreptozotocina em ratos. Métodos: Após 08 semanas de indução do DM, ratos diabéticos não tratados, tratados e controles tiveram a glicemia e peso corporal avaliados semanalmente. Ao final, a aorta e a veia cava inferior foram excisadas e processadas para histologia e extração de células mononucleares vasculares. Um pool dessas células foi semeado para um ensaio de unidades formadoras de colônias-fibroblastos (CFU-F) para estimar o número de vMSCs. As células restantes foram expandidas para avaliar sua taxa de proliferação, expressão fenotípica de c-Kit e CD45, marcador de células hematopoiéticas, bem como suas habilidades de diferenciação osteogênica, adipogênica e endotelial-like. A análise histológica vascular também foi realizada para quantificar a fibrose vascular com picrosirius red, um marcador de colágeno. Resultados: Ratos DM apresentaram intensa hiperglicemia e baixo peso corporal após 08 semanas. O tratamento com insulina (dose 8UI) foi capaz de prevenir a hiperglicemia e a perda de peso corporal. Os números de CFU-F, expressão de c-Kit/CD45 e taxas de proliferação não foram diferentes para vMSCs arteriais e venosas em todos os grupos experimentais. Em contraste, vMSCs arteriais de ratos DM não tratados apresentaram uma menor capacidade de se diferenciar em linhagens osteogênicas, adipogênicas e endoteliais. O tratamento com insulina impediu o déficit de diferenciação. As aortas de ratos DM mostraram sinais de macroangiopatia, pois apresentaram marcação aumentada de colágeno em comparação com as aortas de animais controles e DM tratados. Conclusão: Os achados sugerem, pela primeira vez, que em ratos com DM crônica, as vMSCs exibem alterações em várias propriedades de diferenciação, que podem estar implicadas na patogênese da macroangiopatia diabética.

Abstract

Macroangiopathy and accelerated atherosclerosis are important outcomes in patients with diabetes mellitus (DM) and contribute to the high morbidity/mortality observed in this disease. Vascular mesenchymal stem cells contribute to the physiology of the vascular wall and could be altered in DM. Objectives: To evaluate several biological properties of arterial and venous vascular mesenchymal stem cells (vMSCs) in a rat model of streptozotocin-induced DM. Methods: After 08 weeks of DM induction, untreated, treated and control diabetic rats had their blood glucose and body weight evaluated weekly. At the end, the aorta and inferior vena cava were excised and processed for histology and extraction of vascular mononuclear cells. A pool of these cells was seeded for a colony-forming unit-fibroblast (CFU-F) assay to estimate the number of vMSCs. The remaining cells were expanded to assess their proliferation rate, phenotypic expression of c-Kit and CD45, a hematopoietic cell marker, as well as their osteogenic, adipogenic and endothelial-like differentiation abilities. Vascular histological analysis was also performed to quantify vascular fibrosis with picrosirius red, a collagen marker. Results: DM rats showed intense hyperglycemia and low body weight after 08 weeks. Insulin treatment (8IU dose) was able to prevent hyperglycemia and body weight loss. CFU-F numbers, c-Kit/CD45 expression and proliferation rates were not different for arterial and venous vMSCs in all experimental groups. In contrast, arterial vMSCs from untreated DM rats showed a lower ability to differentiate into osteogenic, adipogenic, and endothelial lineages. Insulin treatment prevented the differentiation deficit. The aortas from DM rats showed signs of macroangiopathy, as they showed increased collagen labeling compared to the aortas from control and DM treated animals. Conclusion: The findings suggest, for the first time, that in rats with chronic DM, vMSCs exhibit alterations in several differentiation properties, which may be implicated in the pathogenesis of diabetic macroangiopathy.

Sumário

SUMÁRIO

1 Introdução	2
2 Justificativa	23
3 Hipótese	25
4 Objetivos	27
5 Material e Métodos	29
6 Resultados	39
7 Discussão	54
8 Conclusão	59
9 Referências bibliográficas	61

Lista de figuras

Figura 1. Valores médios (\pm erro padrão) da glicemia (A) e do peso corporal (B) dos animais dos três grupos experimentais ao longo das 8 semanas de seguimento.....	39
Figura 2. Valores médios (\pm erro padrão) da contagem numérica de CFU-Fs extraídas da aorta (A) e da veia cava inferior (B) dos animais dos três grupos experimentais ao final das 8 semanas de seguimento.....	41
Figura 3. Gráficos de citometria de células mostrando a distribuição de vMSCs arteriais marcadas com ckit (painéis A e B) e com CD45 (painéis C e D) de um animal do grupo controle, bem como de vMSCs arteriais marcadas com ckit (painéis E e F) e com CD45 (painéis G e H) de um animal do grupo diabético.....	43
Figura 4. Valores médios (\pm erro padrão) da taxa de proliferação celular em número de células/cm ² extraídas da aorta (A) e da veia cava inferior (B) dos animais dos três grupos experimentais ao longo das 8 semanas de seguimento.....	44
Figura 5. Fotomicrografias de luz de diferenciação osteogênica de MSCs derivadas de aorta de ratos controle (A), diabético (B) e diabético tratado (C). (D): Valores médios (\pm erro padrão) da área de diferenciação osteogênica de MSCs extraídas de aorta dos animais dos três grupos experimentais (* p<0,05 versus grupo controle). Fotomicrografias de luz de diferenciação osteogênica de MSCs derivadas de veia cava inferior de ratos controle (E), diabético (F) e diabético tratado (G). (H): Valores médios (\pm erro padrão) da	

área de diferenciação osteogênica de MSCs extraídas de veia cava inferior dos animais dos três grupos experimentais.....46

Figura 6. Fotomicrografias de luz de diferenciação adipogênica de MSCs derivadas de aorta de ratos controle (A), diabético (B) e diabético tratado (C). (D): Valores médios (\pm erro padrão) da área de diferenciação adipogênica de MSCs extraídas de aorta dos animais dos três grupos experimentais (* $p < 0,05$ versus grupo controle). Fotomicrografias de luz de diferenciação adipogênica de MSCs derivadas de veia cava inferior de ratos controle (E), diabético (F) e diabético tratado (G). (H): Valores médios (\pm erro padrão) da área de diferenciação adipogênica de MSCs extraídas de veia cava inferior dos animais dos três grupos experimentais.....48

Figura 7. Fotomicrografias de luz de diferenciação endotelial de MSCs derivadas de aorta de ratos controle (A), diabético (B) e diabético tratado (C). (D): Valores médios (\pm erro padrão) do número de células diferenciadas marcadas com NBT/BCPI sobre o total de MSCs extraídas de aorta dos animais dos três grupos experimentais.....50

Figura 8. Fotomicrografias de luz de fibrose marcada com picrossirius red da parede vascular da aorta de ratos controle (A), diabético (B) e diabético tratado (C). (D): Valores médios (\pm erro padrão) da área de fibrose (% do campo) da aorta dos animais dos três grupos experimentais (* $p < 0,05$ versus grupo controle). Fotomicrografias de luz de fibrose marcada com picrossirius red da parede vascular da veia cava inferior de ratos controle (E), diabético (F) e diabético tratado (G). (H): Valores médios (\pm erro padrão) da área de fibrose

(% do campo) da veia cava inferior dos animais dos três grupos experimentais.....	51
---	----

Lista de tabelas

Tabela 1. Critérios laboratoriais para o diagnóstico de Diabetes Mellitus.....	5
---	---

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

°C – graus Celsius
µm – micrômetro
ACCF - American College of Cardiology Foundation
AGE - Produtos finais de glicação avançada
AHA - American Heart Association
AM - Adrenomedulina
BK - caliceína-bradicinina (Do inglês: Kallikrein-Bradykinin)
CDC - Células derivadas da cardioesfera
CEC - Células endoteliais circulantes
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
CFU-F - Unidades formadoras de colônias tipo fibroblastos
cm² – centímetros quadrados
CO₂ – gás carbônico
CPC - Células progenitoras cardíacas
CSC - Células-tronco cardíacas (Do inglês: Cardiac stem cells)
CT - Células-tronco
CTA - Células-tronco adultas
CTE - Células-tronco embrionária
DAG - Diacilglicerol
DCM - Cardiomiopatia diabética
DCNT - doenças crônicas não transmissíveis
DCV - Doença cardiovascular
DM – Diabetes Mellitus
DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1
DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMG – Diabetes Mellitus Gestacional
EASD - European Association for the Study of Diabetes
EC - Células endoteliais (Do inglês: Endothelial cells)
EGM-2 - Meio de crescimento endotelial (Do inglês: Endothelial Growth Medium)
EOEPC - Células progenitoras endoteliais de início precoce (Do inglês: Early-onset endothelial progenitor cells)
EPC - Células progenitoras endoteliais (Do inglês: Endothelial Progenitor Cells)

epm – erro padrão médio

ER - endoplasmic reticulum

ESC - European Society of Cardiology

FBS – Soro bovino fetal (Do inglês: fetal bovine serum)

G – Giros

hEGF - Human Epidermal Growth Factor

hFGF - Human Fibroblastic Growth Factor

HGF - Fator de crescimento de hepatócitos Hepatocyte growth factor

HSC - Células-tronco hematopoiéticas (Do inglês: Hematopoietic stem cells)

i.p – intra-peritoneal

ICFEP – Insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada

IDF - International Diabetes Federation

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina-1 (Do inglês: insulin-like growth factor type 1)

iPSC - Células-tronco pluripotentes induzidas (Do inglês: induced pluripotent stem cells)

ISCT - International Society for Cellular Therapy

Isl-1⁺ - Células da proteína intensificadora do gene da insulina

kg – kilogramas

LOEPC - Células progenitoras endoteliais de início tardio (Do inglês: Late-onset endothelial progenitor cells)

MCAM - Molécula de adesão celular de melanoma (Do inglês: Melanoma cell adhesion molecule)

mg – miligramas

ml - mililitro

mM - milimolar

mM – milimolar

MSC - Células-tronco mesenquimais (Do inglês: mesenchymal stem cells)

nM - nanomolar

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - solução tampão fosfato (Do inglês: phosphate buffer solution)

PKC - Proteína quinase C (Do inglês: protein kinase C)

RAS - Sistema renina-angiotensina (Do inglês: Renin-angiotensin system)

R-IGF-1 – Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina-1 (Do inglês: Insulin-Like Growth Factor Receptor-1)

Sca1⁺ - Células do antígeno de células-tronco (Do inglês: Stem cell antigen 1)

SMC - Células do músculo liso (Do inglês: Smooth muscle cells)

STRO-1 - Antígeno do antígeno do estroma-1 da medula óssea (Do inglês: Bone marrow stromal antigen-1)

UI – unidade internacional

v/v – volume por volume

VCAM-1 - Molécula de adesão celular vascular 1

VE – Ventrículo esquerdo

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

vMSC - Células-tronco mesenquimais vasculares

VSC - Células-tronco vasculares

µg - micrograma

µl – microlitros

µM - micromolar

ρ – índice de significância

Introdução

1. DIABETES MELLITUS

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Diabetes mellitus (DM) é um importante e crescente problema de saúde para todos os países, independentemente do seu grau de desenvolvimento (SBD, 2020). O DM faz parte das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), que são caracterizadas por um grupo de patologias com etiologia mista, inúmeros fatores de risco e geralmente irreversíveis (WHO, 2014; BRASIL, 2015).

No grupo das DCNTs estão incluídas, além do DM, as doenças cardiovasculares, neoplasias e doenças respiratórias crônicas. Seus principais fatores de risco podem ser modificáveis e sensíveis a ações preventivas, como consumo elevado de álcool, hábito de fumar, dietas menos saudáveis e sedentarismo, bem como não modificáveis, como sexo (WHO, 2018).

No Brasil, esse grupo de DCNT corresponde a 56% das mortes prematuras e, 74% das mortes por causas conhecidas, sendo que o seu controle representa uma das principais prioridades nos planejamentos de saúde do país (WHO, 2014; BRASIL, 2015; BRASIL, 2018).

Uma grande preocupação é o aumento acelerado da prevalência de DM gerando graves consequências. Em 2017, a Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation*, IDF) estimou que 8,8% (intervalo de confiança [IC] de 95%: 7,2 a 11,3) da população mundial com 20 a 79 anos de idade (424,9 milhões de pessoas) vivia com DM. Se as tendências atuais persistirem, o número de pessoas com DM foi projetado para ser superior a 628,6 milhões em 2045. Cerca de 80% dos casos vivem em países em desenvolvimento, nos quais deverá ocorrer o maior aumento dos casos de DM nas próximas décadas (IDF, 2017; SBD, 2020).

Segundo dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2017), 463 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas com alguma classificação clínica do diabetes, e 374 milhões de indivíduos possuem intolerância à glicose.

Dados da última diretriz brasileira de DM (2019-2020) apontam ainda que 90 a 95% dos casos existentes de diabetes correspondem ao DM tipo 2 (DM2) (SBD, 2020).

No Brasil, o DM atinge cerca de 16,8 milhões de indivíduos e no ano de 2019 ocupou a quinta posição no número de indivíduos com diabetes no mundo (IDF, 2017).

Correspondendo ao maior número de casos, o DM2 acomete em sua maioria indivíduos adultos com mais de 40 anos de idade (SBD, 2020). Seu surgimento está diretamente relacionado ao estilo de vida, e seu tratamento é baseado na terapia nutricional e incentivo à prática de atividade física regular, associada ou não ao uso de hipoglicemiantes orais e/ou insulina (SBD, 2020; IDF, 2017).

O aumento da prevalência do DM está associado a diversos fatores, como: rápida urbanização, a transição epidemiológica (maior impacto das condições crônico-degenerativas), transição nutricional, maiores hábitos de vida sedentários, aumento da frequência de sobrepeso e obesidade, crescimento e envelhecimento populacional e aumento da sobrevida dos pacientes já diagnosticados com DM (SBD, 2020).

1.2 CONCEITO, CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DO DM

O DM constitui umas das mais abrangentes DCNT, e define-se como um distúrbio metabólico gerado pela deficiente secreção e/ou ação da insulina no organismo humano, caracterizando-se principalmente por hiperglicemia (SBD, 2020).

Os fatores etiológicos do DM podem ser genéticos, biológicos e ambientais, e sua classificação clínica divide-se em DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) e outras formas específicas menos comuns (ADA, 2019).

O DM1 é definido pela destruição das células beta que levam a deficiência de insulina, esse ainda é subdividido em tipo 1A (autoimune) e tipo 1B (Idiopático); o DM 2 é a forma mais comum verificada na população, cerca de 95% dos casos, caracterizado por distúrbios na ação e secreção da insulina e ainda na regulação hepática da glicose. Já os outros tipos específicos de DM são as formas de apresentação menos comuns, é bastante variada e depende da alteração de base, seja associada ou genética, a exemplos: diabetes neonatal, mitocondrial e outros. E o DM gestacional, caracteriza-se por qualquer espécie de intolerância à glicose, durante a gestação (SBD, 2020).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2020), nos últimos 40 anos houve mudanças nos critérios diagnósticos “devido ao surgimento de novas evidências referentes à associação de valores cada vez menores de glicemia a risco de complicações micro e macrovasculares” conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios laboratoriais para o diagnóstico de Diabetes Mellitus.

	Glicose em jejum (mg/dL)	Glicose 2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose (mg/dL)	Glicose ao acaso (mg/dL)	HbA1c (%)	Observações
Normoglicemia	< 100	< 140	–	< 5,7	OMS emprega valor de corte de 110 mg/dL para normalidade da glicose em jejum. ²
Pré-diabetes ou risco aumentado para DM	≥ 100 e < 126*	≥ 140 e < 200 [#]	–	≥ 5,7 e < 6,5	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de pré-diabetes.
Diabetes estabelecido	≥ 126	≥ 200	≥ 200 com sintomas inequívocos de hiperglicemia	≥ 6,5	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de DM. Método de HbA1c deve ser o padronizado. Na ausência de sintomas de hiperglicemia, é necessário confirmar o diagnóstico pela repetição de testes.

Fonte: SBD, 2020; BAX et al., 2007. OMS: Organização Mundial da Saúde; HbA1c: hemoglobina glicada; DM: diabetes mellitus. * Categoria também conhecida como glicemia de jejum alterada. # Categoria também conhecida como intolerância oral à glicose.

1.3 COMPLICAÇÕES DO DM

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a glicemia elevada seja uma grande causa de mortalidade prematura, superada apenas por pressão arterial elevada e tabagismo (SBD, 2020). A hiperglicemia persistente está associada a complicações crônicas micro e macrovasculares, aumento de morbidade, redução da qualidade de vida e elevação da taxa de mortalidade (WHO, 2016). Sabe-se que o DM é capaz de provocar mortes e altos custos direcionados ao seu tratamento e complicações (ADA, 2018).

O DM e suas complicações constituem as principais causas de mortalidade precoce na maioria dos países; aproximadamente 5 milhões de mortes em pacientes entre 20 a 79 anos, devido ao DM, em 2015 (SBD, 2020).

As complicações crônicas podem ser classificadas como: (a) macrovascular, que são decorrentes de alterações nos grandes vasos e acarretam em infarto agudo do

miocárdio, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica; (b) microvascular, que incluem a vasculopatia, nefropatia diabética, a retinopatia diabética e a neuropatia diabética (PAPATHEODOROU et al., 2018).

As complicações agudas do DM incluem: (a) descompensação hiperglicêmica aguda, que ocorre devido a valores muito elevados de glicemia, podendo haver evolução para complicações mais graves como cetoacidose diabética e síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica; (b) hipoglicemia, que ocorre devido a valores muito baixos de glicemia e as consequências podem ser tonturas, distúrbios de comportamento e perda de consciência (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Para além destas, ainda existem outras não vasculares como as alterações gastrointestinais, genito-urinárias, dermatológicas, infecções, cataratas, glaucoma e a doença periodontal (FAUCI et al., 2008).

DM é uma doença complexa e crônica, que requer tratamento médico contínuo, através de estratégias multifatoriais para redução de fatores de risco, além do controle glicêmico. Estímulo à educação e ao autocuidado, além de suporte à saúde, são críticos para se evitar complicações agudas ou crônicas (ADA, 2019).

2. DIABETES MELLITUS E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morbimortalidade nos pacientes diabéticos e, direta ou indiretamente, é o principal fator para o elevado custo que a doença exerce sobre o sistema de saúde (SBD, 2020; KALYANI et al., 2018). Observam-se nas pessoas com DM um aumento duas a três vezes maior no risco de desenvolver doenças cardiovasculares (SARWAR et al., 2010).

A etiologia das doenças cardiovasculares nas pessoas com DM está relacionada a diversos fatores como a doença aterosclerótica coronariana, a neuropatia autonômica cardiovascular e a cardiomiopatia diabética (DOKKEN, 2008).

3. CARDIOMIOPATIA DIABÉTICA

A cardiomiopatia diabética caracteriza-se por alterações funcionais e/ou estruturais na ausência de doença arterial coronariana, hipertensão ou doença valvar significativa, em indivíduos com DM (LEE & KIM, 2017; JIA et al., 2018).

Em 2013, a American College of Cardiology Foundation (ACCF), a American Heart Association (AHA) (YANCY et al., 2013) e a European Society of Cardiology (ESC) em colaboração com a European Association for the Study of Diabetes (EASD) (RYDEN et al., 2013) definiu cardiomiopatia diabética como uma condição clínica de disfunção ventricular que ocorre na ausência de aterosclerose coronariana e hipertensão em pacientes com DM.

Hiperglicemia, resistência sistêmica à insulina e sinalização metabólica da insulina cardíaca prejudicada são as principais anormalidades clínicas no DM, e todas estão envolvidas na patogênese da cardiomiopatia diabética (JIA et al, 2018).

Acredita-se que a etiopatogenia da cardiomiopatia diabética envolva fatores como a neuropatia autonômica cardiovascular, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, fibrose miocárdica intersticial, microangiopatia e alterações metabólicas (hiperglicemia, aumento de ácidos graxos livres circulantes e de triacilgliceróis, citocinas inflamatórias) (JIA et al., 2018; CHONG et al., 2017; TARQUINI et al., 2011).

O primeiro estágio da cardiomiopatia diabética é clinicamente assintomático e é caracterizado por aumento da fibrose e rigidez; há redução do enchimento diastólico

precoce e aumento do enchimento e alargamento atrial, bem como elevação da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (VE) (WESTERMEIER et al., 2016).

O segundo estágio da cardiomiopatia diabética é caracterizado por hipertrofia do VE, remodelação cardíaca, disfunção diastólica cardíaca avançada e consequente surgimento de indicações clínicas de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (ICFEP) (JIA et al., 2016).

Com a progressão da cardiomiopatia diabética, disfunção diastólica e complacência cardíaca reduzida podem coexistir com disfunção sistólica levando a fração de ejeção reduzida, desempenho de pré-ejeção prolongado, câmara ventricular esquerda aumentada, período de ejeção reduzido e este último por aumento da resistência ao enchimento com maiores pressões de enchimento (JIA et al., 2016).

Assim, a disfunção cardíaca em corações diabéticos progride de anormalidades cardíacas subclínicas, como fibrose do VE, para disfunção diastólica e, eventualmente, disfunção sistólica acompanhada por fração de ejeção reduzida. Várias técnicas não invasivas, incluindo ecocardiografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética cinematográfica, foram aplicadas para detectar alterações da estrutura cardíaca e função (JIA et al., 2016).

A cardiomiopatia diabética é classicamente definida no contexto de ausência de doença arterial coronariana evidente. No entanto, a cardiomiopatia diabética pode estar associada à disfunção microvascular coronariana que prejudica o fluxo sanguíneo coronariano e a perfusão miocárdica, a função ventricular e os resultados clínicos, incluindo DCV (SANDESARA et al., 2018).

3.1 COMPLICAÇÕES VASCULARES NO DM

As complicações vasculares são a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos. Estes resultam de interações entre anormalidades metabólicas sistêmicas, como hiperglicemia, dislipidemia, moduladores genéticos e epigenéticos e respostas locais do tecido a metabólitos tóxicos. As complicações macrovasculares envolvem obstruções ateroscleróticas / trombóticas, como as que ocorrem nas doenças coronárias, cerebrais e das artérias periféricas. As patologias microvasculares clássicas incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia, mas cérebro, miocárdio, pele e outros tecidos também são afetados (BARRETT et al., 2017).

Os elementos celulares da microvasculatura parecem ser particularmente sensíveis a lesões de hiperglicemia sustentada. Essa lesão (e as respostas do corpo direcionadas ao seu reparo) causa disfunção de tecido / órgão que afeta a qualidade e a duração da vida de pessoas com DM1 ou DM2. Apesar da patogênese díspar dessas duas formas comuns de diabetes, elas (junto com as formas secundárias de diabetes resultantes de mutações genéticas ou intervenções farmacêuticas ou cirúrgicas) compartilham lesão / disfunção microvascular como um resultado crônico (BARRETT et al., 2017).

As anormalidades estruturais na microcirculação coronária incluem obstrução luminal, infiltração inflamatória, remodelação vascular e fibrose perivascular (SHOME et al., 2017).

As anormalidades funcionais na microcirculação coronária incluem disfunção endotelial e das células musculares lisas e comprometimento do relaxamento e constrição vascular e reperfusão isquêmica (SHOME et al., 2017).

Várias vias bioquímicas ligam os efeitos adversos da hiperglicemia com complicações vasculares. Os mecanismos celulares incluem o seguinte: glicação não

enzimática e a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs); aumento da produção e ações reativas de oxigênio; estresse do retículo endoplasmático (ER); e a ativação da via do polioliol, a via do diacilglicerol (DAG) -proteína quinase C (PKC), homologia Src-2 domínio contendo fosfatase-1 (SHP-1) e o sistema renina-angiotensina (RAS) e sistemas de calicreína-bradicinina (BK). É provável que as alterações intracelulares e extracelulares induzidas pela hiperglicemia alterem as vias de transdução de sinal, afetando assim a expressão gênica e a função da proteína e causando disfunção e dano celular (KOYA & KING, 1998).

A doença macrovascular (ou cardiovascular) das artérias de condutos maiores é um processo inflamatório complexo que leva a infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica. O processo patológico primário associado à doença macrovascular é a aterosclerose, que no DM é acelerada com extensa distribuição de lesões vasculares (KATTOOR et al., 2017).

Além dessas alterações funcionais, uma inflamação de baixo grau associada nas células endoteliais e musculares lisas da parede vascular causa proliferação celular, hipertrofia, remodelação e apoptose (SAVOIA et al., 2011).

Isso acelera a interrupção do equilíbrio entre as proteínas de suporte da parede arterial, elastina e colágeno, que determinam a complacência vascular, uma forma de “envelhecimento vascular”, que é um fenótipo característico da hipertensão (HARVEY et al., 2015; GUZIK & TOUYZ, 2017; BARTON et al., 2016; YIN, 2016).

O enrijecimento vascular leva ao alargamento da pressão do pulso arterial e ao aumento do cisalhamento pulsátil, exacerbando a disfunção endotelial e a doença vascular (ZIEMAN et al., 2005).

A doença microvascular leva à retinopatia, nefropatia e neuropatia, que são as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com diabetes (PETRIE et al., 2017).

As alterações patognomônicas da microangiopatia diabética incluem espessamento da membrana basal capilar, aumento da permeabilidade endotelial e disfunção endotelial e das células musculares lisas vasculares. A hiperglicemia é o estímulo chave para esses processos ao estimular vias de sinalização vaso-lesivos, ativar a via do poliol, aumentar o estresse oxidativo, estimular fatores de transcrição pró-inflamatórios e ativação de respostas imunes. Processos semelhantes são induzidos pela hipertensão (MADONNA et al., 2017).

4. CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CT) são tipos de células indiferenciadas e auto-renováveis. Elas têm a capacidade única de se dividir assimetricamente e diferenciar nos vários tipos de células do corpo, enquanto se replicam simultaneamente para manter uma linhagem de células-tronco (ALESSANDRINI et al., 2019).

A autorrenovação é o processo pelo qual as células-tronco geram células-filhas indiferenciadas. A autorrenovação é necessária para preservar as populações de células-tronco em diferentes tecidos (GARGETT, 2009; SMITH, 2005).

As células-tronco estão presentes em quase todos os tecidos humanos e são classificadas quanto à sua origem em: células-tronco embrionária (CTE), que derivou da massa celular interna de embriões pré-implantação e tem a capacidade de formar todas as três camadas germinativas embrionárias (ou seja, ectoderme, endoderme e mesoderma) e células-tronco adultas (CTA), que se encontram em vários tecidos e órgãos, e têm a

capacidade de produzir pelo menos um tipo de progênie funcional diferenciada (ALISON et al., 2002; FU et al., 2010; BOARD, 2002; LI & XIE, 2005; NANDEDKAR & NARKAR, 2003; ALESSANDRINI et al., 2019).

As CTA, como as células-tronco hematopoiéticas (HSC), não apenas se multiplicam, mas também se desenvolvem em células sanguíneas, enquanto as células-tronco mesenquimais (MSCs) desencadeiam a geração de gordura, osso e cartilagem. As CTA também ajudam na reparação e substituição de tecidos danificados, juntamente com o desenvolvimento do sistema nervoso central e das células musculares (MCCALL et al., 2009; SHEIK, 2015).

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) são capazes de serem geradas a partir de uma variedade de células somáticas e dar origem a células de linhagem endodérmica, mesodérmica e ectodérmica (YOSHIDA & YAMANAKA, 2011; NIIBE et al., 2011).

As CT também são classificadas de acordo com seus potenciais de diferenciação em: Totipotente, Pluripotente, Multipotente e Unipotente. As células totipotentes, como zigoto e blastômeros iniciais (1-3 dias da fertilização do oócito) têm a capacidade de produzir todos os tipos de células, enquanto as células pluripotentes, como a massa celular interna dos blastocistos (dias 4-14 após a fertilização do oócito) podem gerar todos os tipos de células, excluindo a linhagem extra-embriônica (GARGETT, 2009; LI & XIE, 2005; JAENISCH & YOUNG, 2008; KRAMPERA et al., 2007; ALESSANDRINI et al., 2019). As células-tronco multipotentes têm a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células dentro de uma linhagem particular (JAENISCH & YOUNG, 2008; KRAMPERA et al., 2007) e as células-tronco unipotentes são definidas como células que têm a competência de se diferenciar em apenas uma linhagem (GARGETT, 2009).

As células-tronco não são especializadas, tendo o potencial de se regenerar e se diferenciar em células especializadas, como miócitos, hepatócitos, leucócitos, linfócitos, eritrócitos, músculos e células nervosas sob condições ambientais e sinais adequados (SHEIK, 2015).

O potencial terapêutico das células-tronco pode ser atribuído a três principais mecanismos de ação incorporados. Em primeiro lugar, as células-tronco administradas sistemicamente sofrem "*homing*" que ainda migram para o local da lesão, possivelmente devido à quimioatração mediada por receptores de superfície celular, como os receptores de quimiocinas. Embora o mecanismo exato das células-tronco e da interação endotelial no local alvo não esteja bem estabelecido, as integrinas e selectinas foram sugeridas para mediar tais interações (KOUREMBANAS, 2015; NAWAZ et al., 2016).

A transmigração das células-tronco para o ponto focal da lesão ocorre através do endotélio através da molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e sinalização do receptor acoplado à proteína G (TEO et al., 2012).

Em segundo lugar, a célula-tronco transplantada pode sofrer diferenciação em vários tipos de células, que após o enxerto local podem substituir os tecidos danificados e induzir a restauração de sua função (AGGARWAL & PITTENGER, 2005; DI NICOLA et al., 2002).

Em terceiro lugar, as células-tronco também podem secretar fatores de crescimento / bioativos, que podem potencialmente influenciar positivamente os processos fisiológicos locais e sistêmicos (RAFFAGHELLO et al., 2008).

As CT são importantes para os organismos vivos devido às suas funções de manutenção do tecido homeostático e substituição de células disfuncionais e senescentes. Devido às suas notáveis capacidades regenerativas, as células-tronco estão

sendo aplicadas em tratamentos para várias doenças como uma nova intervenção terapêutica, que também é conhecida como medicina regenerativa. Em anos anteriores, o papel das células-tronco foi amplamente estudado por seu potencial terapêutico para tratar o DM e complicações relacionadas (BIEHL & RUSSELL, 2009; NELSON et al., 2009).

4.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Friedenstein foi um dos pioneiros da teoria de que a medula óssea é um reservatório de células-tronco de tecidos mesenquimais em organismos adultos (ANDRZEJEWSKA et al., 2019; FRIEDENSTEIN et al., 1968).

A condição para a identificação de células-tronco mesenquimais (MSCs) é o crescimento de células *in vitro* como população aderente ao substrato, assim como no caso de células de origem humana, fenótipo caracterizado pela presença de antígenos de superfície CD73, CD90, CD105 e ausência de expressão de proteínas como: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a ou CD19 ou antígenos de complexo de histocompatibilidade de classe II (HLA II, antígenos de leucócitos humanos de classe II). Além disso, essas células devem ter a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (HORWITZ et al., 2005; DOMINICI et al., 2006).

Além dos marcadores mencionados nas diretrizes da International Society for Cellular Therapy (ISCT), os seguintes antígenos mostraram-se úteis no isolamento das MSCs humanas da medula óssea: STRO-1 (antígeno do estroma-1 da medula óssea, antígeno de superfície celular expresso por elementos do estroma na medula óssea humana-1), VCAM / CD106 (molécula de adesão celular vascular 1) e MCAM / CD146 (molécula de adesão celular de melanoma), que caracterizam as células que crescem *in vitro* de forma aderente, com alto grau de clonogenicidade e capacidade de diferenciação

multidirecional (SIMMONS & TOROK-STORB, 1991; GRONTHOS et al., 2003; SACCHETTI et al., 2007).

4.2 CÉLULAS-TRONCO E PROGENITORAS CARDÍACAS

O coração adulto é tradicionalmente considerado um órgão pós-mitótico sem capacidade significativa de autorrenovação. No entanto, este ponto de vista mudou recentemente com a detecção de que o coração é capaz de - embora bastante limitado - a renovação dos cardiomiócitos (BERGMANN et al., 2009; KAJSTURA et al., 2010).

Beltrami *et al.*, foram os primeiros a descobrir células c-Kit⁺ auto-renováveis no coração adulto, capazes de se diferenciar em cardiomiócitos, células endoteliais e células do músculo liso e de apoiar a regeneração do tecido cardíaco lesado (BELTRAMI et al., 2003; BEARZI et al., 2007; ELLISON et al., 2013).

Durante a última década, várias populações diferentes de células-tronco cardíacas (CSCs) e células progenitoras cardíacas (CPCs), como células derivadas da cardioesfera (CDCs) (CHIMENTI et al., 2010; MALLIARAS et al., 2012; WHITE et al., 2013; MESSINA et al., 2004), células do antígeno de células-tronco (Sca) -1⁺ (UCHIDA et al., 2013; WANG et al., 2006; OH et al., 2003), células da proteína intensificadora do gene da insulina (Isl) -1⁺ (LAUGWITZ et al., 2005; GENEAD et al., 2010; CAI et al., 2003) e células da população do lado cardíaco (PFISTER et al., 2005; MARTIN et al., 2004; OYAMA et al., 2007), foram encontrados. Além disso, vários estudos de mapeamento de destino indicavam que as células estaminais e progenitoras cardíacas residentes podem contribuir para a cardiomiogênese por diferenciação direta (HSIEH et al., 2007; MALLIARAS et al., 2013; SENYO et al., 2013).

Logo após a descoberta de CSCs *in vivo*, experimentos foram iniciados levando a resultados promissores (MÜLLER et al., 2018).

4.3 CÉLULAS-TRONCO VASCULARES

Durante o desenvolvimento, os vasos sanguíneos são geralmente formados por meio de dois processos: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese refere-se à criação da rede vascular primária, observada durante o desenvolvimento embrionário, onde os vasos sanguíneos são formados de novo a partir de células progenitoras (angioblastos) (FLAMME et al., 1997).

A angiogênese consiste no surgimento de novos vasos sanguíneos das redes vasculares preexistentes e pode ocorrer a qualquer momento da vida de um organismo. A plasticidade vascular, seja por vasculogênese ou angiogênese, contribui tanto para o reparo vascular quanto para o desenvolvimento de doença vascular (CARMELIET, 2003).

Estudos acumulados revelaram que tanto a vasculogênese quanto a angiogênese requerem o *homing* ou recrutamento de células progenitoras vasculares, proliferação e diferenciação em células endoteliais (ECs) e células do músculo liso (SMCs), entre outros tipos de células. Essas células-tronco vasculares / progenitoras desempenham um papel fundamental na formação de todos os tipos de vasos durante o desenvolvimento (KOVACIC et al., 2008).

Em adultos, a parede arterial é composta por 3 camadas: túnica íntima, que é a camada mais interna que consiste em uma monocamada de ECs circundada por uma lâmina basal e delimitada pela lâmina elástica interna; túnica média, a camada intermediária, que compreende predominantemente SMCs suportadas por proteínas da matriz extracelular (fibras elásticas e de colágeno); a adventícia, que é a camada externa do

vaso sanguíneo contendo uma variedade de tipos de células, incluindo fibroblastos, macrófagos, adipócitos e pericitos. Durante o desenvolvimento de doenças vasculares, acredita-se que a disfunção / morte da EC induzida por fatores de risco, por exemplo, tabagismo e diabetes mellitus, poderia ser um iniciador que é seguido por infiltração de células inflamatórias e deposição de lipídios oxidados (ROSS, 1993; LIBBY & HANSSON, 2015).

Nesse processo, alguns SMCs na média podem se desdiferenciar e migrar para a íntima junto com as células inflamatórias para formar a neoíntima (ALEXANDER & OWENS, 2012).

Se o processo ocorrer repetidamente, lesões graves podem se desenvolver, podendo bloquear a luz dos vasos. Curiosamente, estudos recentes indicam a presença de células-tronco / progenitoras em todas as 3 camadas da parede do vaso (XU, 2006; YU et al., 2017).

Além disso, é demonstrado que essas células participam ativamente do reparo / regeneração endotelial e da formação de lesões neointimais, em resposta à lesão (WÖRSDÖRFER et al., 2017; XU, 2008).

5. DIABETES MELLITUS E AS CÉLULAS-TRONCO

O DM não apenas perturba os regulamentos de glicose no sangue, mas também altera o metabolismo a longo prazo se for mal administrado (PENG et al., 2018).

A capacidade de regeneração e diferenciação das células-tronco permite explorar seu potencial terapêutico para tratar e controlar as complicações diabéticas. Especificamente, as células-tronco multipotentes, como MSCs / HSCs, células-tronco progenitoras, células-tronco específicas de tecido e células-tronco pluripotentes

(CTE e iPSCs) são consideradas no combate aos distúrbios associados ao DM (BERNARDI et al., 2012; KHAMAISI & BALANSON, 2017).

Portanto, a seleção da fonte adequada de células-tronco é crítica para garantir a diferenciação das células-tronco em células endoteliais e perivasculares para reparar complicações diabéticas (KEATS & KHAN, 2012).

5.1 CARDIOMIOPATIA DIABÉTICA E CÉLULAS-TRONCO

A cardiomiopatia diabética (DCM) é desenvolvida principalmente devido à apoptose celular. A DCM reduz as células-tronco específicas do tecido, intensifica a fibrose e diminui a perfusão nos capilares (YOON et al., 2005; TOFFOLI et al., 2012).

As MSCs também têm sido implicadas na regeneração das células do miocárdio para restaurar a função normal do coração (ZHANG et al., 2008).

Além disso, as MSCs também induzem miogênese e angiogênese pela liberação de vários fatores angiogênicos, mitogênicos e antiapoptóticos, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), adrenomedulina (AM) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (KOUREMBANAS, 2015).

5.2 CÉLULAS-TRONCO NAS COMPLICAÇÕES VASCULARES DO DIABETES MELLITUS

Tratando-se do sistema vascular, são encontrados os vasos sanguíneos e fazendo parte dessas estruturas, o endotélio vascular, considerado um tecido ativo e dinâmico com características importantes na manutenção da circulação sanguínea (PAGAN et al., 2018), caracterizado por uma monocamada de células endoteliais que reveste o interior desses

vasos atuando como uma camada protetora entre os demais tecidos e o sangue circulante (STORCH et al., 2017).

Além de controlar a permeabilidade vascular, é capaz de influenciar significativamente a hemostase, a proliferação celular, as respostas imunológicas e inflamatórias e o tonus vascular, além de modular a expressão fenotípica e as funções da célula muscular lisa. Tais capacidades devem-se, em grande parte, à síntese de vários fatores vasoativos dependentes dessa estrutura (PERSSON, 2015; PAGAN et al., 2018; KISELEVA et al., 2018).

As células-tronco vasculares (VSCs) são capazes de diferenciar células progenitoras endoteliais (EPCs) e são um alvo potencial para o tratamento de complicações macrovasculares diabéticas. A célula progenitora vascular isolada de células de músculo liso vascular humano sob condições adequadas foi capaz de crescer em redes vasculares (CHEUNG & SINHA, 2011).

As EPCs possuem grande apelo terapêutico, pois são capazes de induzir angiogênese e neovascularização em tecidos isquêmicos (OKAMOTO & CAMPOS, 2004).

Segundo Araújo et al., (2005) e França et al., (2011), as EPCs podem formar novos vasos favorecendo a revascularização por três mecanismos: angiogênese – capilares que resultariam de brotos originados de vasos já existentes; arteriogênese – aparecimento de vasos que estariam “adormecidos”, embora alguns acreditem na possibilidade de neoformação; vasculogênese – formação de novos vasos ou remodelamento dos já existentes por EPCs ou angioblastos que migram para o local específico, diferenciam e proliferam em resposta a vários estímulos (ARAÚJO et al., 2005; FRANÇA et al., 2011).

As EPCs são atualmente classificadas com base nas propriedades da cultura como células progenitoras endoteliais de início precoce (EOEPCs) ou células progenitoras endoteliais de início tardio (LOEPCs). EOEPCs foram encontrados elevados em pacientes um a dez dias após um insulto, como acidente vascular cerebral isquêmico e infarto do miocárdio. Sua finalidade é a restauração da função endotelial por meios parácrinos, uma vez que carecem de efeitos vasculogênicos diretos (RICHARDS et al., 2014; MORANCHO et al., 2013). EOEPCs têm um fenótipo hematopoiético e não são de linhagem endotelial (MINAMI et al., 2015). Em contraste, os LOEPCs atingem o pico em números aproximadamente quatro a seis semanas após o insulto e possuem efeitos vasculogênicos diretos juntamente com sua produção de fatores angiogênicos (MINAMI et al., 2015; SIEVEKING et al., 2008); eles compartilham semelhanças genéticas e fenotípicas com células endoteliais (MINAMI et al., 2015). Além disso, as EPCs são diferentes na aparência; Os EOEPCs têm um formato de fuso, enquanto os LOEPCs têm uma aparência de paralelepípedo. A citometria de fluxo e as técnicas de cultura podem ser utilizadas para identificar esses diferentes derivados de células mononucleares (RICHARDS et al., 2014); entretanto, na prática, a separação e definição dessas linhagens celulares ainda não foram integradas (MINAMI et al., 2015).

Embora o endotélio tenha inúmeras funções, a disfunção endotelial é automaticamente associada à perda da sua vasodilatação dependente (FERNANDES & LAURINDO, 2010; PAGAN et al., 2018), sendo influenciada por vários fatores de risco cardiovascular, como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, obesidade e tabagismo (FERNANDES & LAURINDO, 2010).

Pacientes com DM são propensos à aterosclerose em grandes artérias, finalmente desenvolvendo complicações macrovasculares na artéria. A hiperglicemia e a aterosclerose

prolongadas aumentam o risco de infarto do miocárdio, doença arterial e acidente vascular cerebral (BERNARDI et al., 2012; BECKMAN et al., 2002).

A função endotelial reflete o balanço entre lesão e reparação do endotélio vascular. Essa relação levou ao desenvolvimento de ensaios para quantificar o descolamento das células endoteliais maduras e de micropartículas derivadas para representar o grau de dano. Células endoteliais circulantes (CEC), que se desprendem quando há ativação ou perda de integridade do endotélio vascular, podem ser medidas na circulação por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência. Uma vez iniciado o processo de apoptose endotelial, ocorre aumento abrupto da liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático, fazendo com que a membrana celular saia do estado repouso (RIBEIRO et al., 2012).

Dados da literatura sugerem que há uma relação direta entre o aumento o número CEC na circulação periférica e a extensão da lesão endotelial em pacientes com doença aterosclerótica e inflamação vascular (SZMITKO et al., 2003).

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores parecem indicar um efeito deletério do DM sobre células endoteliais e musculares lisas vasculares, com implicações marcantes sobre o dano do DM em vasos sanguíneos. Células recentemente descritas nos grandes vasos, as células-tronco mesenquimais vasculares (vMSC), não foram investigadas até o presente momento no DM. Como estas células desempenham um importante papel de suporte para a árvore vascular e para a integridade da matriz extracelular de vasos, alterações funcionais das mesmas no contexto do DM podem ter importantes implicações no desenvolvimento de lesões vasculares e, conseqüentemente, o surgimento da cardiomiopatia diabética e aterosclerose. Assim sendo, a justificativa para o presente projeto é a de que nada é conhecido sobre uma eventual modificação do perfil biológico destas células no contexto do DM. Este trabalho, inédito e atual, possibilitará o conhecimento da relação entre células-tronco mesenquimais vasculares e o DM, e sugere que as mesmas possam estar envolvidas na fisiopatologia da doença.

Hipótese

3 HIPÓTESE

A hipótese central do presente trabalho é que as vMSCs apresentam-se com seu número e função alteradas no modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina em ratos Wistar.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil biológico de células-tronco mesenquimais vasculares (vMSCs) em ratos com diabetes mellitus tipo I induzido por estreptozotocina.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o perfil numérico das vMSCs em ratos diabéticos, via ensaio de CFU-F.

Estudar a atividade proliferativa mitótica das vMSCs extraídas de aorta e veia cava de ratos diabéticos.

Avaliar algumas propriedades funcionais (diferenciação osteogênica, adipogêncica e angiogênica) *in vitro* das vMSCs provenientes de aorta e veia cava de ratos diabéticos.

Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram empregados 45 ratos Wistar com idade de 20 semanas. Os animais foram mantidos em condições controladas e estáveis em biotério (temperatura 22° C, umidade de 40-70% e ciclo claro-escuro de 12/12 horas), alojados em caixas padrão para ratos com no máximo 05 animais por caixa, onde tiveram livre acesso à água e ração.

Todos os animais foram provenientes do biotério setorial da disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em Uberaba/MG, e receberam cuidados humanos em conformidade com as normas e regulamentos estabelecidos pelo CONCEA. Os protocolos experimentais foram executados após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFTM.

5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS:

Os animais deste estudo foram divididos em três grupos experimentais:

- **Grupo Controle** (n = 17) - composto por ratos controle não diabéticos.
- **Grupo Diabético** (n = 16) - composto por ratos diabéticos induzidos a partir da 20ª semana por injeção intraperitoneal de estreptozotocina (55mg/Kg).
- **Grupo Tratado** (n = 12) - composto por ratos diabéticos induzidos a partir da 20ª semana por injeção intraperitoneal de estreptozotocina (55mg/Kg) e tratado por injeções diárias de insulina NPH100, na dose de 8UI, por via subcutânea, por 08 semanas.

Para a administração de estreptozotocina, os animais em jejum prévio de 10 a 12 horas (*overnight*) foram previamente anestesiados com tribromoetanol (250mg/Kg, via intra-peritoneal) e em seguida, o agente diabetogênico foi administrado, via intra-peritoneal, através de seringa de 500 uL em bolus. A seguir, após a recuperação anestésica, os animais foram realojados em suas gaiolas plásticas.

O peso corporal foi avaliado em todos os animais semanalmente por 08 semanas, bem como a glicemia, via sangue da artéria caudal e glicofita (Roche Diagnostics®). Um jejum prévio de 06 horas foi respeitado antes da avaliação da glicemia por glicofita.

5.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

A eutanásia dos animais foi realizada via anestesia com tionembutal em dose supra-anestésica (100mg/Kg, i.p.) e após a pesagem dos animais em balança. Após a anestesia profunda, uma toracotomia foi efetuada e aorta e veia cava inferior de cada animal foram excisadas, efetivando-se assim a eutanásia do animal. Os vasos excisados foram divididos ao meio. Uma metade de cada órgão foi submetida à análise histológica, sendo a outra metade processada imediatamente para isolamento e cultura de vMSCs *in vitro*.

5.4 MEDIDA DO COMPRIMENTO DA TÍBIA DOS ANIMAIS

Após a eutanásia foi medido o comprimento da tíbia dos animais para análise proporcional do comprimento da tíbia em relação ao peso corporal, a fim de se determinar a perda de massa corporal dos ratos diabéticos em relação aos ratos do grupo controle.

5.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TECIDOS VASCULARES

A metade dos vasos de todos os animais foi fixada em paraformaldeído 4% à temperatura ambiente e foi feita a inclusão do tecido em blocos de parafina para a coloração com *Picrosirius Red* para qualificação e, em sequência, a quantificação de fibras colágenas das artérias e veias dos ratos, pelo uso do programa de computador Image J.

5.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As amostras de vasos foram fixadas em formol 10% por 15 dias. A desidratação foi realizada utilizando as concentrações de álcool etílico 70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II por duas horas cada. Após esta etapa, foi realizada a diafanização das amostras em Xilol I e II por quinze minutos cada e, posteriormente, a inclusão em parafina.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Leica®, São Paulo, SP). Foram obtidos cortes histológicos com 5 µm de espessura. A coloração realizada foi *Picrosirius*, por métodos convencionais.

As fibras colágenas foram evidenciadas pela técnica de coloração *Picrosirius*. As lâminas foram desparafinizadas em xilol *overnight*. A hidratação foi realizada em: álcool absoluto I, álcool absoluto II e álcool 70% e, em seguida, lavagem em água corrente. As lâminas foram imersas em solução Sirius Red por 30 minutos e lavadas em água destilada. A contra coloração foi realizada com hematoxilina por 5 minutos, e para a diferenciação as lâminas foram colocadas em água por 15 minutos. Foi feita a desidratação (álcool 90%, álcool absoluto I, e álcool absoluto II), diafanização (xilol por 15 minutos) e montagem das lâminas com Entellan® (Merk KGaA, 64271 Dannstadt, Germany).

5.7 OBTENÇÃO DE IMAGENS

As imagens foram obtidas em aumento de 20x no microscópio AXIO Vert A1 (Zeiss®, Göttingen, Lower Saxony, Germany) e as figuras foram montadas com o programa Photoshop 7.0.1®.

5.8 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS E vMSCs

Células de aorta e de veia cava inferior foram isoladas de ratos dos diferentes grupos, via fragmentação mecânica do tecido, seguida de digestão enzimática com Colagenase tipo II para os grandes vasos por 20 minutos em banho-maria à 37°C, e centrifugação a 360G por 5 minutos repetindo este ciclo por 3 vezes. Células mononucleares oriundas deste processo foram separadas de miócitos cardíacos e vasculares, diferenciados por centrifugação diferencial. As células pequenas e intactas foram ressuspendidas e os grumos de células foram removidos por filtração (cellstranier 70µm, BDBiosciences). As células foram então incubadas em placas de cultura multi-poços sob meio de cultura específico composto por DMEM baixa glicose, soro bovino fetal (SBF) a 10% e para os grandes vasos a porcentagem de SBF será de 15%, glutamina 200mM e penicilina/estreptomicina, para o ensaio de quantificação de unidades formadoras de colônias tipo fibroblastos (CFU-F) bem como para a expansão até a 5ª passagem. O ensaio de CFU-F possibilita a quantificação das vMSCs, através da contagem do número de colônias, visto que cada colônia é formada por uma única célula-mãe original. Em cada poço foi plaqueada a mesma quantidade de células (80 mil células por poço para os grandes vasos e para cada tecido de ensaio foi realizado em duplicata para os grandes vasos). O meio de cultura acima descrito foi trocado no 3º dia após plaqueamento,

e depois novamente no 8º dia. No 13º dia de incubação, as células foram submetidas à revelação através de coloração por Giemsa, diluído em metanol. Posteriormente, o número de colônias foi contado com o auxílio de microscópio invertido de contraste de fase e expresso em número de CFU-f por 80.000 células plaqueadas, dos grandes vasos. Para a expansão *in vitro* até a 5ª passagem, a densidade de plaqueamento inicial foi de 20.000 de células em cada poço na placa de 24 wells para os grandes vasos. Ao longo das passagens sucessivas, a taxa de proliferação celular *in vitro* foi quantificada separadamente em uma placa de 24 wells com uma concentração celular inicial de 20.000 células/ml/ cm² em cada poço e quantificada a cada 48 horas após a ação da tripsina para soltura total de todas as células em câmara de Neubauer.

5.9 CITOMETRIA DE FLUXO

Após a quinta passagem das células-tronco mesenquimais dos vasos foram contados 1×10^6 células/mL e pipetado 100µL da suspensão de células em tubos de citometria para marcação celular, sendo marcados 04 tubos para cada amostra celular, portanto, um tubo branco (não marcado), um tubo isotipo PE + FICT, um tubo C-KIT e um último tubo denominado CD45. Cada tubo foi centrifugado a 300G por 10 minutos, após desprezar o sobrenadante, foi pipetado a cada tubo 100µL de soro de cavalo e aguardada a incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. Passado este tempo foram ressuspendidas as células em 2 ml de PBS (solução tampão fosfato) e centrifugados a 300 G por 10 minutos. Foram desprezados os sobrenadantes e ressuspendidas as células-tronco mesenquimais em 500µL de PBS, foram adicionados 1µL de Fc-block em cada tubo e incubados por 20 minutos a 4°C (geladeira). Foram acrescentados no tubo Isotipo PE +

FICT, 1µl de anticorpos FITC, no tubo C-KIT, 2µl de anticorpos de FITC c-kit e por fim no tubo CD45, 2µl de anticorpos PE CD45. Foram deixados todos os tubos, inclusive o branco ao abrigo da luz por 90 minutos a 4°C (geladeira). Os tubos foram lavados 3x com PBS, atendendo ao fato de que, cada etapa consistiu em ressuspender as células centrifugadas no fundo do tubo em 500µl de PBS e submeter à centrifugação à 300G por 10 minutos. A última lavagem consistiu na ressuspensão das células em 500µl de PBS ou em 500µl de PBS acrescido de PFA 2% v/v caso não fosse realizada a leitura no citômetro de fluxo no mesmo dia.

5.10 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO DAS vMSCs

As vMSCs em cultura na 5ª passagem foram estimuladas, mediante protocolo específico, a se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e em células endoteliais. O protocolo de diferenciação baseou-se em Neuhuber e seus colaboradores (NEUHUBER *et al.*, 2008).

5.11 PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Para a indução de diferenciação osteogênica, as vMSCs em P5 foram plaqueadas em placas de cultura contendo 06 wells, numa densidade de 6.000 cels/ ml/ cm². Dois dias após o plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por meio de indução osteogênico, constituído por DMEM acrescido de 15% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 100nM dexametasona, 50µM ascorbato-2-fosfato e 10mM de glicerol-fosfato. O meio de indução osteogênica foi substituído a cada 3-4 dias e, no 18º dia, foi feita a análise da diferenciação, via fixação das células na placa através da utilização de paraformaldeído 4% (20 minutos),

seguido pela aplicação do corante Alizarin-Red (SIGMA), o qual cora a matriz óssea em vermelho, por 5-10 minutos e análise microscópica.

A análise da capacidade de diferenciação *in vitro* das vMSCs, arteriais e venosas, tanto dos animais diabéticos tratados ou não, quanto dos controles foi analisada qualitativa e quantitativamente através da medida da área relativa (em percentual) ocupada pela coloração específica em relação à área total do campo microscópico estudado, após a indução da diferenciação osteogênica.

5.12 PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

Para a indução de diferenciação adipogênica, as vMSCs em P5 foram plaqueadas em placas de cultura contendo 06 wells, numa densidade de 20.000 cels/ml/cm² e cultivadas até próximo da confluência de 100%, quando o meio de cultura foi substituído por meio de indução adipogênico, constituído por DMEM acrescido de 15% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 1µM dexametasona, 0,5mM isobutil-metil-xantina, 10µg/mL insulina e 100µM indometacina. Após 03 dias, o meio de indução adipogênica foi substituído por meio de manutenção adipogênica, constituído por DMEM acrescido de 15% FBS, 1% penicilina/estreptomicina e 10µg/mL insulina. Após 24 horas, o meio de indução adipogênica foi novamente substituído por meio de indução adipogênico por 03 dias, quando foram substituídas por meio de manutenção adipogênica por novas 24 horas. Completando-se 03 ciclos de troca de meios de indução e manutenção, as células permaneceram 05 dias com o meio de manutenção, quando foi realizada a análise da diferenciação. Essa análise da diferenciação consistiu de remoção do meio de indução adipogênica, fixação das células na placa através da utilização de paraformaldeído 4% (60

minutos), aplicação do corante Oil-Red, o qual cora lipídios em vermelho, por 5-10 minutos e análise microscópica.

À semelhança da diferenciação osteogênica, a análise da capacidade de diferenciação adipogênica *in vitro* das vMSCs, arteriais e venosas, tanto dos animais diabéticos tratados ou não, quanto dos controles foi analisada qualitativa e quantitativamente através da medida da área relativa (em percentual) ocupada pela coloração específica pelo Oil-Red em relação à área total do campo microscópico estudado, após a indução da diferenciação adipogênica.

5.13 PROTOCOLO DA DIFERENCIAÇÃO ENDOTELIAL “LIKE”

As CTM isoladas após a quinta passagem foram plaqueadas em placas de 24 wells para a aderência celular, na concentração de 20.000 cels/ml/cm². Após a adesão celular, foi retirado totalmente o meio de cultura e adicionado meio de crescimento endotelial EGM-2 (EGMTM-2[®] *Endothelial Cell Growth Medium*, Lonza, Walkersville, EUA) suplementado com 2% de SBF, VEGF, hFGF-B, R-IGF-1, hEGF, heparina, ácido ascórbico, GA-1000 e glutamina penicilina-estreptomicina 100x. As células foram cultivadas pelo período de duas semanas em temperatura de 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, com troca total do meio EGM-2 a cada três dias. As modificações de forma e organização celulares foram observadas em microscópio invertido a cada 48 horas. Passado este período, as células foram submetidas à marcação de imuno-histoquímica usando (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato/NitroBlue Tetrazolium) Sistema de Substrato Líquido BCIP / NBT (Sigma Aldrich,EUA), com um volume de 1 ml por poço por 10 minutos, à temperatura ambiente e contrastada com corante Eosina. Com este método, um substrato é convertido pela

fosfatase alcalina presente nas células endoteliais produzindo assim uma mancha azul escura. Usando um microscópio invertido (Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Alemanha), vinte campos aleatórios foram adquiridos por fotos e a análise foi realizada através da porcentagem de diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas da artéria aorta e veia cava inferior em células endoteliais e posteriormente comparadas entre os três grupos do estudo.

5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os parâmetros avaliados foram expressos como média \pm epm e comparados entre si empregando-se ANOVA “one-way” seguido do teste de Tukey ou ANOVA de Krukall-Wallis seguido do teste de Dunn quando apropriados. Um valor de probabilidade menor que 0,05 foi utilizado para expressar a significância das comparações. Todos os testes estatísticos foram realizados empregando-se o software Sigmastat 2.0.3 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA, USA).

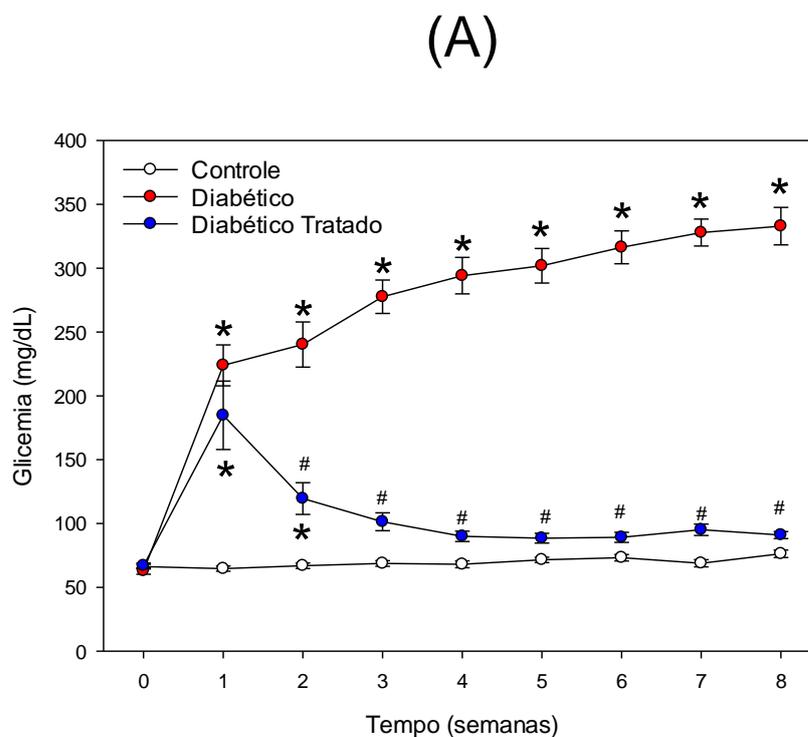
Resultados

6 RESULTADOS

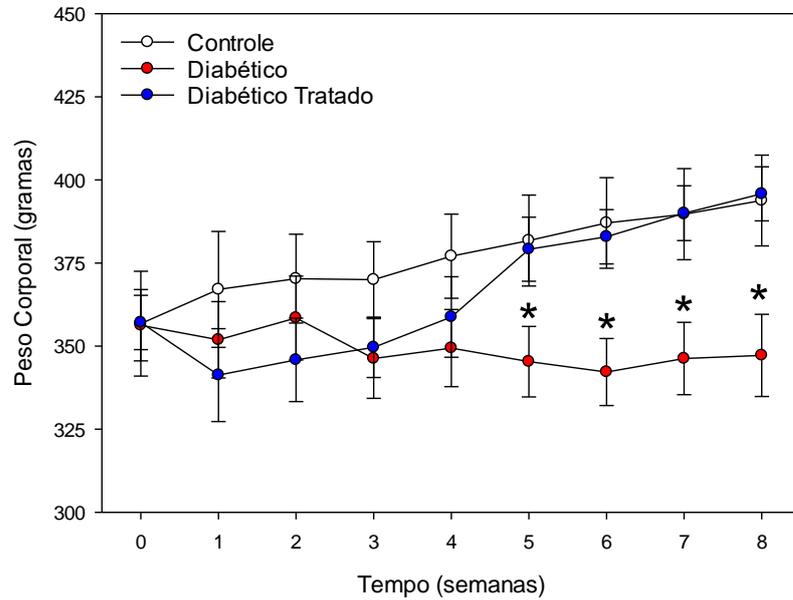
6.1 CARACTERIZAÇÃO DO DIABETES MELITUS EXPERIMENTAL

Ao final de 08 semanas de indução do DM, todos os animais diabéticos apresentaram-se com intensa hiperglicemia, conforme mostrado na figura 1A. Este estado hiperglicêmico foi acompanhado de intenso consumo de água de beber e grande poliúria diária (não quantificada), associado ao menor peso corporal ao final das 08 semanas (Figura 1B). O tratamento com insulina NPH100, 8UI diárias ao longo das últimas 07 semanas de observação foi capaz de praticamente normalizar a glicemia e a perda de peso corporal (Figuras 1A e 1B).

Figura 1. Valores médios (\pm erro padrão) da glicemia (A) e do peso corporal (B) dos animais dos três grupos experimentais ao longo das 8 semanas de seguimento (* $p < 0,01$ versus grupo controle; # $p < 0,01$ versus grupo diabético).



(B)

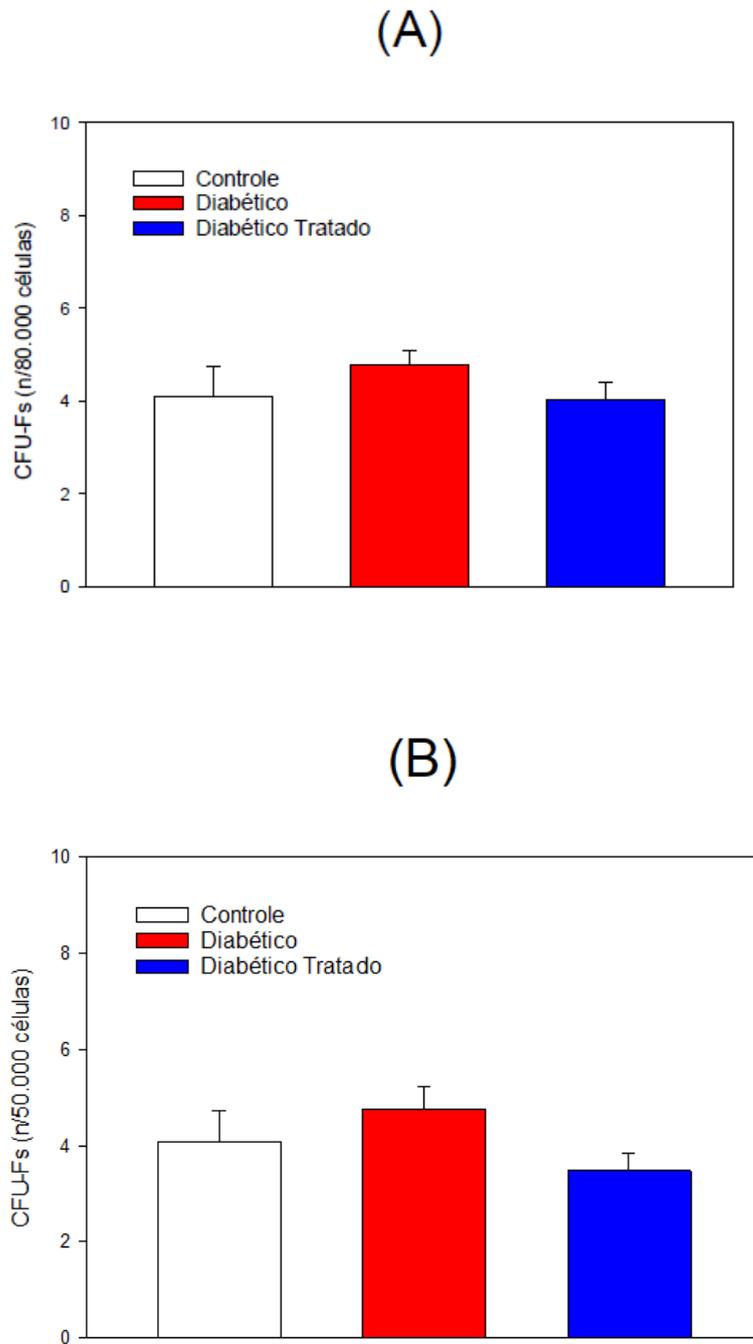


6.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS VASCULARES (vMSCS)

6.2.1. QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS SEMELHANTES A FIBROBLASTOS (CFU-F)

A figura 2 mostra os valores médios de CFU-Fs obtidas de células mononucleares vasculares arteriais (Figura 2A) e venosas (Figura 2B) cultivadas dos animais dos três grupos experimentais. Não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos experimentais.

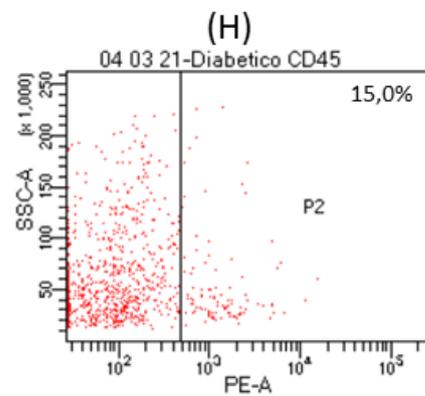
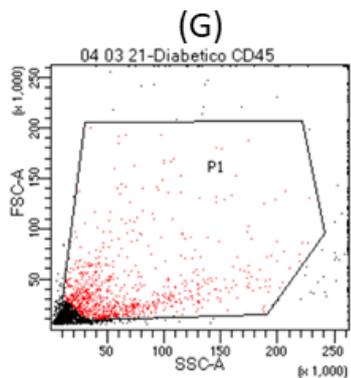
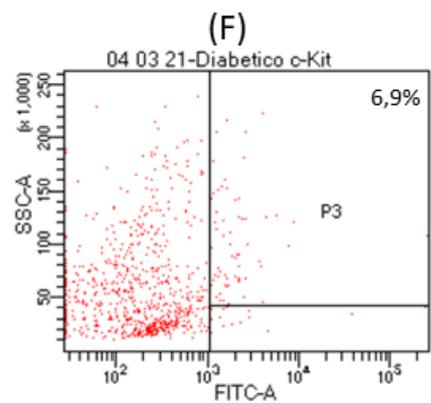
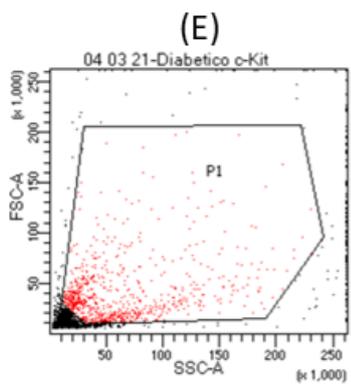
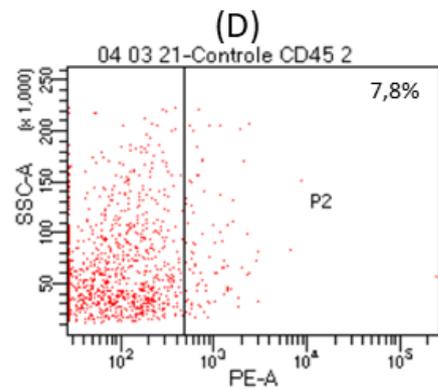
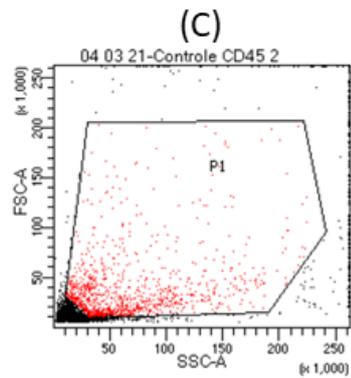
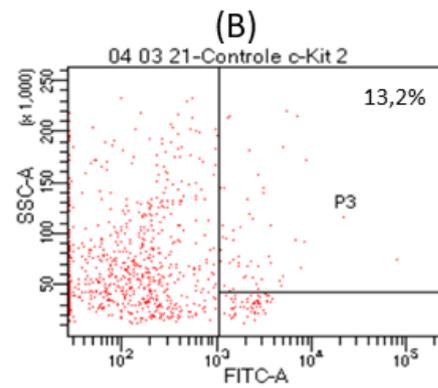
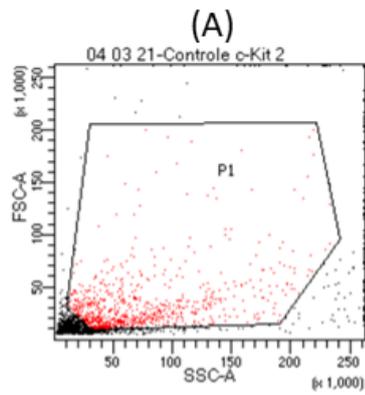
Figura 2. Valores médios (\pm erro padrão) da contagem numérica de CFU-Fs extraídas da aorta (A) e da veia cava inferior (B) dos animais dos três grupos experimentais ao final das 8 semanas de seguimento.



6.2.2 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE C-KIT E CD45

Os marcadores de superfície c-Kit e CD45 foram avaliados nas vMSCs arteriais e venosas em todos os grupos experimentais. Como pode ser verificado na figura 3, a expressão destes dois marcadores, como esperado, foi baixíssima em ambas as vMSCs arteriais e venosas nos três grupos experimentais.

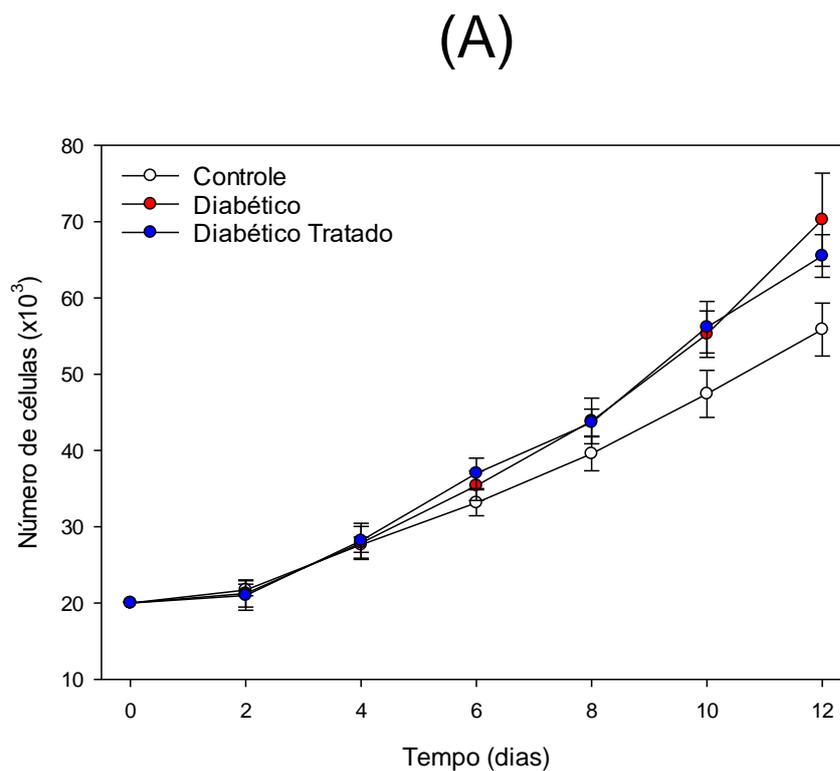
Figura 3. Gráficos de citometria de células mostrando a distribuição de vMSCs arteriais marcadas com ckit (painéis A e B) e com CD45 (painéis C e D) de um animal do grupo controle, bem como de vMSCs arteriais marcadas com ckit (painéis E e F) e com CD45 (painéis G e H) de um animal do grupo diabético.



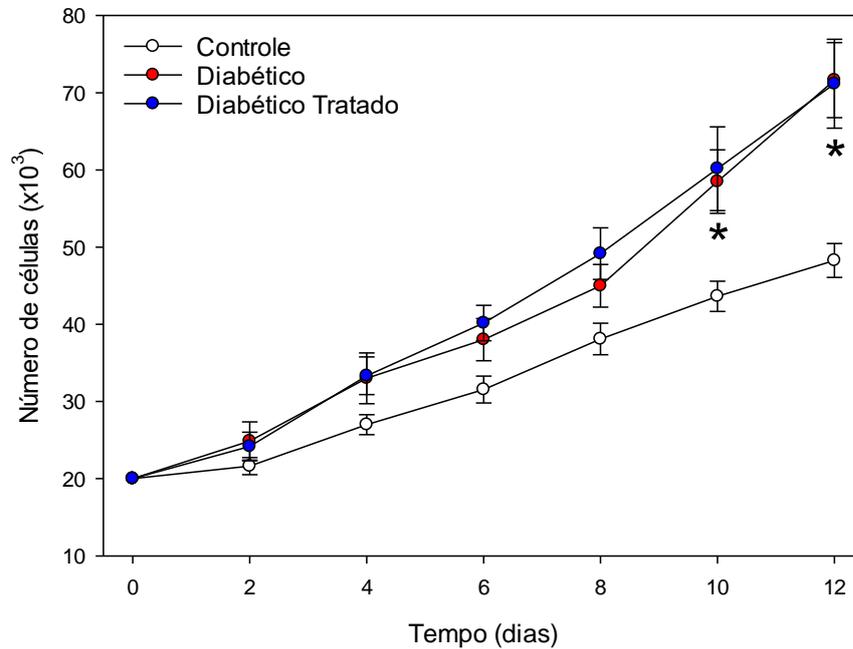
6.2.3 TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A figura 4 mostra, nos três grupos experimentais, a taxa de proliferação celular avaliada em cultura *in vitro* das vMSCs arteriais (Figura 4A) e venosas (Figura 4B). Não houve diferença estatisticamente significativa nas taxas de proliferação dos dois tipos celulares nos três grupos experimentais.

Figura 4. Valores médios (\pm erro padrão) da taxa de proliferação celular em número de células/cm² extraídas da aorta (A) e da veia cava inferior (B) dos animais dos três grupos experimentais ao longo das 8 semanas de seguimento (* $p < 0,05$ versus grupo controle).



(B)

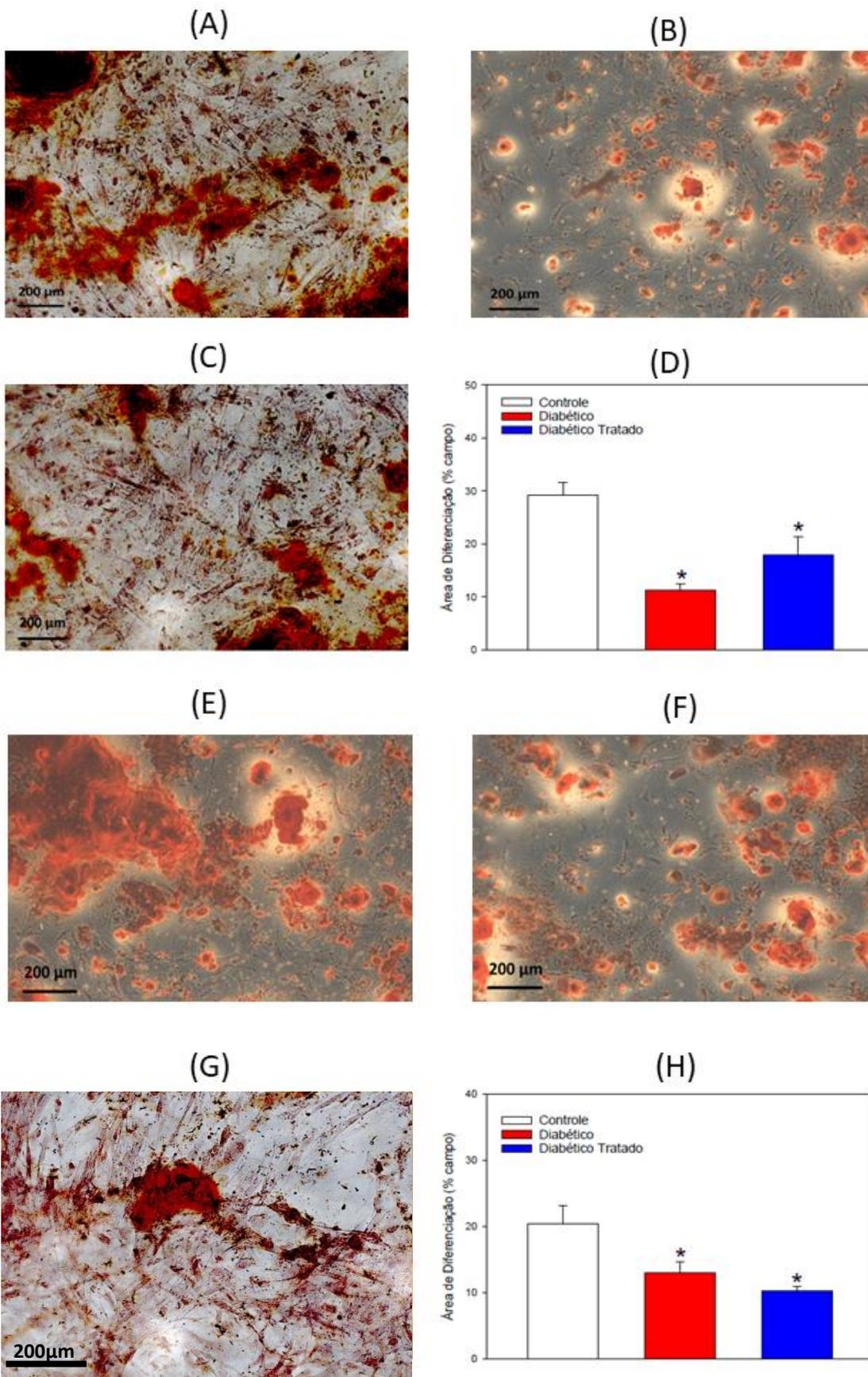


6.3 CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO DAS vMSCS ARTERIAIS E VENOSAS

6.3.1 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Na figura 5, a intensidade de coloração observada após a indução de diferenciação das vMSCs em osteoblastos dos animais controle e diabéticos tratados, foi maior que aquela observada em animais diabéticos não tratados. A representação gráfica da porcentagem de diferenciação osteogênica em todos os grupos pode ser observada na figura 5D e 5H.

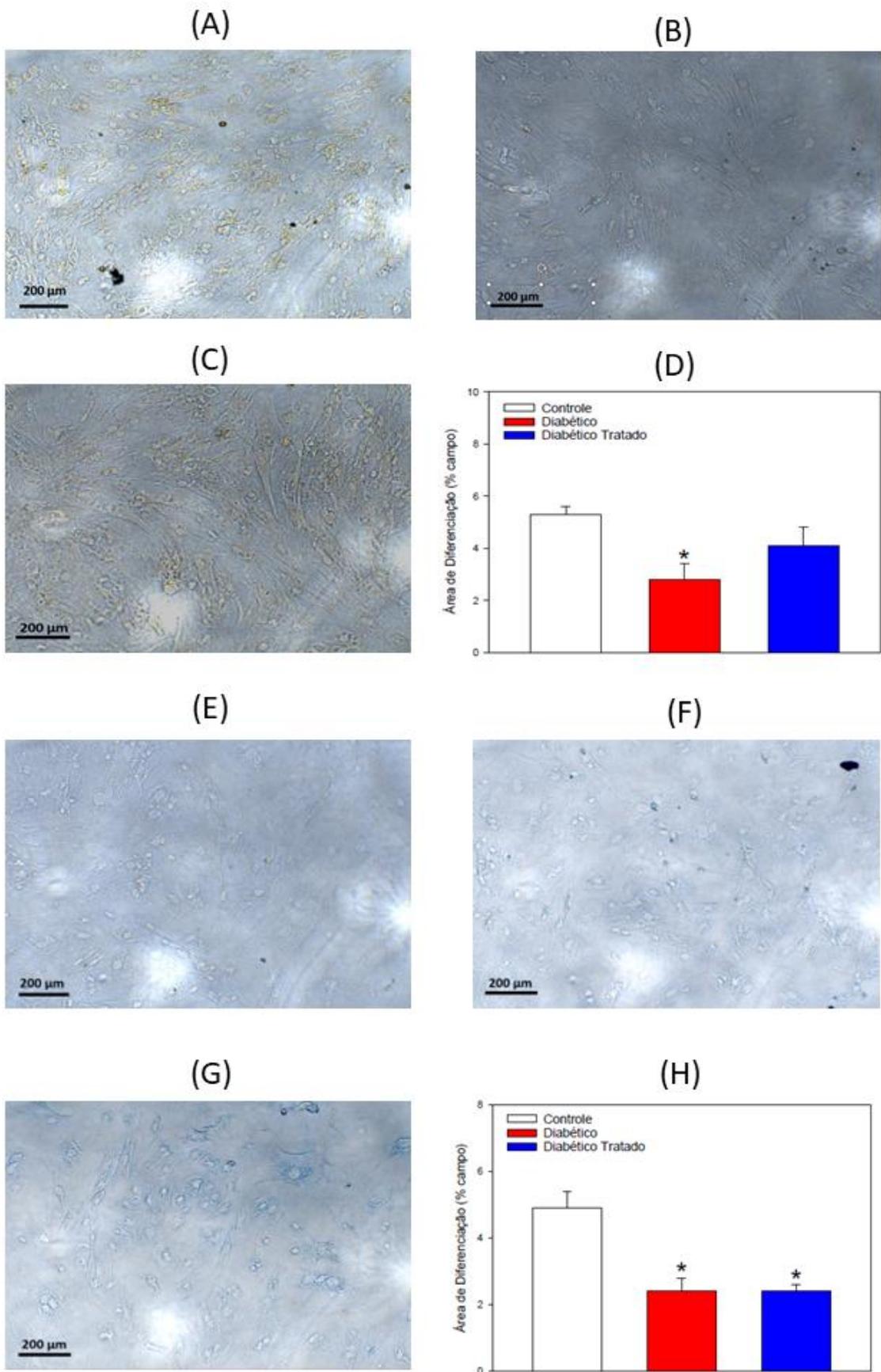
Figura 5. Fotomicrografias de luz de diferenciação osteogênica de MSCs derivadas de aorta de ratos controle (A), diabético (B) e diabético tratado (C). (D): Valores médios (\pm erro padrão) da área de diferenciação osteogênica de MSCs extraídas de aorta dos animais dos três grupos experimentais (* $p < 0,05$ versus grupo controle). Fotomicrografias de luz de diferenciação osteogênica de MSCs derivadas de veia cava inferior de ratos controle (E), diabético (F) e diabético tratado (G). (H): Valores médios (\pm erro padrão) da área de diferenciação osteogênica de MSCs extraídas de veia cava inferior dos animais dos três grupos experimentais (* $p < 0,05$ versus grupo controle).



6.3.2 DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

Na figura 6, a intensidade de coloração observada após a indução de diferenciação das vMSCs em adipócitos dos animais controle e diabéticos tratados, foi maior que aquela observada em animais diabéticos não tratados. A representação gráfica da porcentagem de diferenciação adipogênica em todos os grupos pode ser observada na figura 6D e 6H.

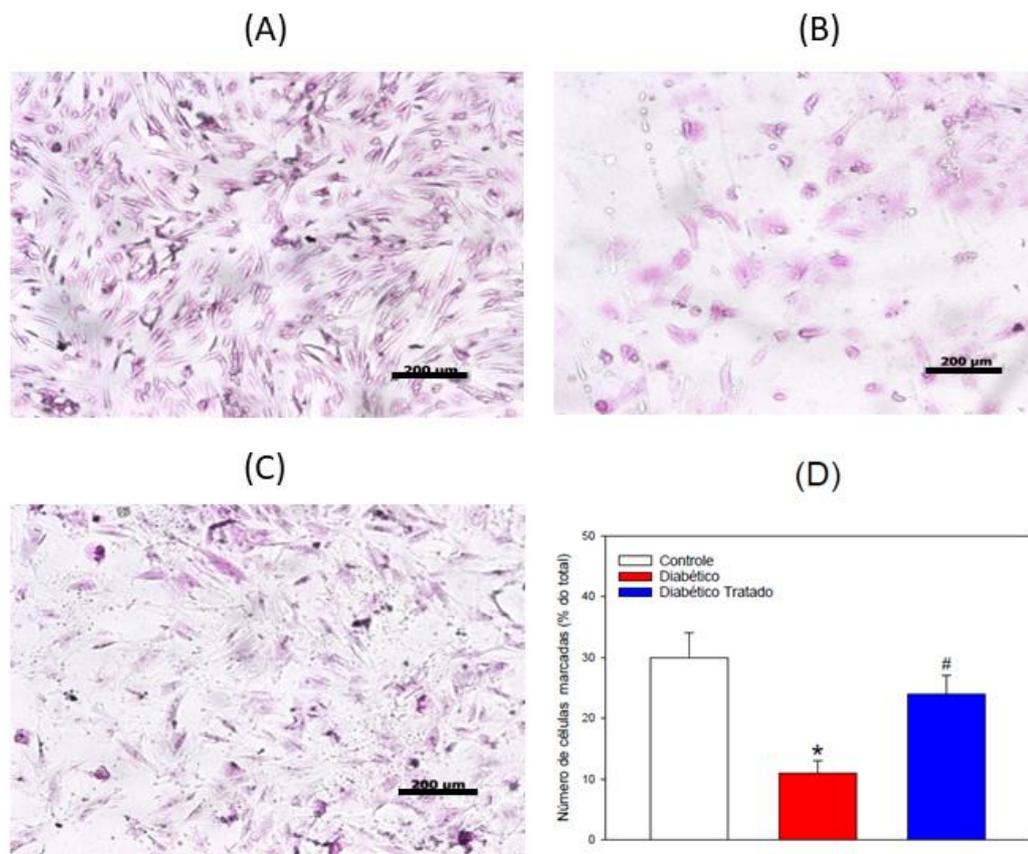
Figura 6. Fotomicrografias de luz de diferenciação adipogênica de MSCs derivadas de aorta de ratos controle (A), diabético (B) e diabético tratado (C). (D): Valores médios (\pm erro padrão) da área de diferenciação adipogênica de MSCs extraídas de aorta dos animais dos três grupos experimentais (* $p < 0,05$ versus grupo controle). Fotomicrografias de luz de diferenciação adipogênica de MSCs derivadas de veia cava inferior de ratos controle (E), diabético (F) e diabético tratado (G). (H): Valores médios (\pm erro padrão) da área de diferenciação adipogênica de MSCs extraídas de veia cava inferior dos animais dos três grupos experimentais (* $p < 0,05$ versus grupo controle).



6.3.3 DIFERENCIAÇÃO ENDOTELIAL “LIKE”

A figura 7 mostra imagens de marcação endotelial com BCIP/NTB para fosfatase alcalina expressa por células endoteliais derivadas da diferenciação de vMSCs arteriais nos três diferentes grupos experimentais. Note a menor marcação nas células diferenciadas do grupo diabético não tratado em relação ao grupo controle. A figura 7D mostra os valores percentuais de marcação em azul em relação à área total do campo microscópico.

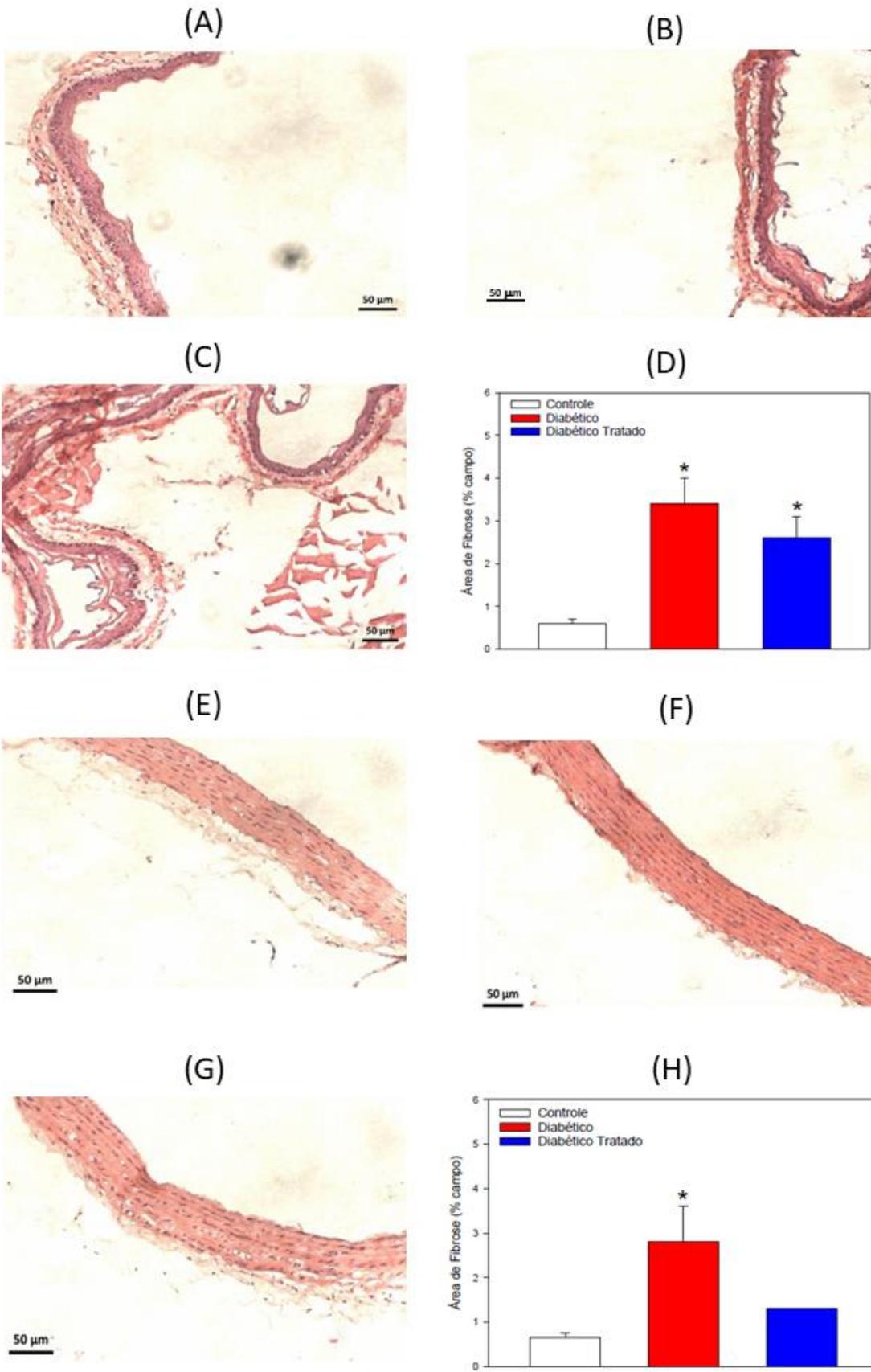
Figura 7. Fotomicrografias de luz de diferenciação endotelial de MSCs derivadas de aorta de ratos controle (A), diabético (B) e diabético tratado (C). (D): Valores médios (\pm erro padrão) do número de células diferenciadas marcadas com NBT/BCPI sobre o total de MSCs extraídas de aorta dos animais dos três grupos experimentais (* $p < 0,05$ versus grupo controle, # $p < 0,05$ versus grupo diabético).



6.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA FIBROSE VASCULAR

Após coloração específica para colágeno com *Picrosirius Red*, pode-se observar um aumento na expressão de colágeno nas camadas sub-endotelial, média e adventícia da parede vascular da aorta e da veia cava inferior, indicativo de fibrose vascular, nos animais diabéticos não tratados em comparação aos controles (Figura 8). O tratamento com insulina preveniu a fibrose vascular.

Figura 8. Fotomicrografias de luz de fibrose marcada com *Picrosirius Red*, da parede vascular da aorta de ratos controle (A), diabético (B) e diabético tratado (C). (D): Valores médios (\pm erro padrão) da área de fibrose (% do campo) da aorta dos animais dos três grupos experimentais (* $p < 0,05$ versus grupo controle). Fotomicrografias de luz de fibrose marcada com *Picrosirius Red*, da parede vascular da veia cava inferior de ratos controle (E), diabético (F) e diabético tratado (G). (H): Valores médios (\pm erro padrão) da área de fibrose (% do campo) da veia cava inferior dos animais dos três grupos experimentais (* $p < 0,05$ versus grupo controle).



Discussão

7 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho são os primeiros na literatura a caracterizar as células-tronco mesenquimais vasculares (vMSCs) em ratos com diabetes mellitus experimental. Ainda que, numericamente não foram observadas diferenças significativas na contagem de vMSCs, os resultados do presente estudo mostraram diferenças marcantes na capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e endotelial das vMSCs, particularmente da parede arterial da aorta. Tais achados podem sugerir que essas vMSCs da parede vascular podem estar implicadas como um novo participante potencial na fisiopatologia da macroangiopatia associada ao diabetes mellitus.

Os dados de glicemia e peso corporal, além da intensa poliúria observada, demonstraram que os animais do grupo diabético estavam em franco processo de diabetes descompensado. E a quase completa recuperação ponderal e glicêmica nos animais diabéticos tratados com insulina, confirmam a natureza insulino-dependente do diabetes mellitus experimental induzido pela estreptozotocina em ratos, estando o nosso modelo de acordo com os incontáveis trabalhos já publicados com este modelo clássico de diabetes mellitus tipo 1 (FURMAN, 2021).

Dados histológicos de coloração com o *Picrosirius Red* da parede vascular aórtica e da veia cava inferior, mostraram um aumento significativo da deposição de colágeno ao longo de todas as camadas das paredes vasculares, indicando que após 08 semanas de diabetes mellitus intenso, alterações vasculares indicativas de macroangiopatia diabética, como a fibrose vascular, já estavam presentes, o que também vai ao encontro de outros trabalhos prévios, que demonstram fibrose vascular aumentada em vasos de animais diabéticos (RAAZ et al., 2015, ZHANG et al., 2020) e também em vasos de seres humanos

diabéticos (TULETA & FRANGOIANNIS, 2021). Tais alterações histológicas, como esperado, não estavam presentes em ratos diabéticos tratados com insulina, confirmando que o tratamento com insulina, na dose administrada, foi suficiente para evitar as alterações decorrente do diabetes mellitus. No presente estudo, encontramos um percentual de fibrose vascular significativamente aumentado nos animais diabéticos não tratados. Como os fibroblastos responsáveis pela secreção de colágeno e pela fibrose são originários da diferenciação de MSCs teciduais (DULAUROY et al., 2012, ROCKEY et al., 2015), um desvio de diferenciação das vMSCs em direção aos fibroblastos pode ser especulado. Dados obtidos de células-tronco mesenquimais de outras fontes, principalmente da medula óssea, mostraram que a diferenciação em fibroblastos e o consequente aumento da secreção de colágeno, ocorre quando as MSCs são estimuladas em um microambiente rico em citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas como o TGF-Beta, espécies reativas de oxigênio e baixos níveis de óxido nítrico (KRSTIC et al., 2018, TAKI et al., 2020). Curiosamente, alterações moleculares semelhantes foram descritas em diferentes microambientes teciduais, incluindo vasos sanguíneos, de animais diabéticos e até mesmo em pacientes diabéticos (ROBERTS & PORTER, 2013, ZEADIN et al., 2013). Assim, é possível que fatores moleculares presentes no microambiente tecidual de indivíduos diabéticos possam induzir a diferenciação de vMSCs em fibroblastos e posteriormente em miofibroblastos, o que levaria então ao desenvolvimento de fibrose vascular, que contribuiria, então, para o desenvolvimento da macroangiopatia associada ao diabetes mellitus. No entanto, mais experimentos são necessários para testar essa hipótese. Dados de nosso laboratório mostraram alterações funcionais na diferenciação de células-tronco mesenquimais cardíacas (DE PAULA et al., 2017) em ratos diabéticos, o que reforça nossos achados no presente estudo. Além disso, dados obtidos em camundongos idosos

com resistência à insulina (CIESLIK et al., 2011) também mostram uma forte associação entre MSCs teciduais e a maior fibrose tecidual, sugerindo que, de fato, alterações no microambiente, em diferentes situações fisiopatológicas, podem induzir a diferenciação de MSCs para o fenótipo de fibroblasto. No entanto, pesquisas futuras precisam ser realizadas para melhor elucidar a existência de um direcionamento da diferenciação de vMSCs para fibroblastos no diabetes mellitus.

Em relação às células-tronco mesenquimais vasculares, descritas pela primeira vez nos vasos por Meirelles et al. (2006), a expressão fenotípica de superfície avaliada por citometria de fluxo em níveis muito baixos dos biomarcadores c-kit e CD45, confirmam o fenótipo não hematopoiético destas células, o que é esperado para este tipo de célula-tronco (MEIRELLES et al., 2008). Em adição, não foi observada alteração significativa no número dessas vMSCs, quantificado pelo ensaio CFU-F, nas paredes vasculares aórtica e da veia cava inferior de animais diabéticos não tratados. Isso sugere que 08 semanas de diabetes mellitus intenso não foi capaz de modificar a taxa de proliferação ou de morte celular das vMSCs na parede vascular dos animais diabéticos. De fato, os ensaios de proliferação celular *in vitro* realizados no presente estudo não mostraram diferenças na taxa de proliferação celular nos três diferentes grupos experimentais e nem nos dois tipos de vMSCs (da aorta e da veia cava inferior).

As células-tronco mesenquimais vasculares, presentes em todas as camadas da parede vascular, principalmente na camada sub-endotelial e na adventícia (CIAVARELLA et al., 2022) são clonogênicas e possuem capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares, principalmente mesodérmicas, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, células endoteliais e fibroblastos/miofibroblastos (CIAVARELLA et al., 2022). A capacidade das vMSCs de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e células

endoteliais foi significativamente reduzida nos ratos diabéticos não tratados com insulina, em comparação com ratos controles e com ratos diabéticos tratados com insulina.

Um particular achado deve ser aqui destacado, que é a reduzida capacidade de diferenciação das vMSCs em células similares a endotélio. É há muito conhecido a intensa disfunção endotelial presente no diabetes mellitus (DE VRIESE et al., 2000, SHI & VANHOUTTE, 2017). Tal disfunção, inclusive, tem profundas implicações na patogênese da aterosclerose acelerada observada em diabéticos (NAKAGAMI et al., 2005, LA SALA et al., 2019). A reduzida capacidade de diferenciação de vMSCs em células endoteliais poderia, de alguma forma, contribuir para a manutenção da disfunção endotelial, tendo em vista que uma eventual reposição de células endoteliais doentes por células novas oriundas de diferenciação local de vMSCs estaria prejudicada. Porém, tal hipótese necessita de mais investigação para atestar sua veracidade.

As razões pelas quais vMSCs de ratos diabéticos apresentam déficits de diferenciação osteogênica, adipogênica e endotelial não são conhecidas e não foram estudadas no presente trabalho. No entanto, a título de especulação, esse déficit pode ser decorrente de alterações metabólicas, sabidamente presentes nos animais diabéticos, decorrentes do estado hiperglicêmico intenso e prolongado (08 semanas) que gera um microambiente agressivo caracterizado por alto teor de estresse oxidativo, estímulos pró-apoptóticos, pró-senescentes e pró-inflamatórios, etc., todos já demonstrados estarem presentes no diabetes mellitus (ROBERTS & PORTER, 2013, ZEADIN et al., 2013).

Conclusão

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, a capacidade de diferenciação das vMSCs da parede de grandes vasos em osteoblastos, adipócitos e células similares a endotélio foi significativamente reduzida em ratos com diabetes mellitus experimental induzido por estreptozotocina, e a deposição de colágeno nos ratos diabéticos foi aumentada. Tais alterações podem estar implicadas na fisiopatologia da macroangiopatia associada ao diabetes mellitus.

Referências Bibliográficas

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2019;42(Suppl 1):S1-193.

ADA. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes - 2018. *Diabetes Care*, v. 41, s. 1-142, 2018.

AGGARWAL S AND PITTENGER MF, “Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses,” *Blood*, vol. 105, no. 4, pp. 1815–1822, 2005.

ALESSANDRINI M, PREYNAT-SEAUVE O, DE BRUIN K, PEPPER MS. Stem cell therapy for neurological disorders. *S Afr Med J*. 2019 Sep 10;109(8b):70-77. doi: 10.7196/SAMJ.2019.v109i8b.14009. PMID: 31662153.

ALEXANDER MR, OWENS GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol*. 2012; 74:13–40. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142315.

ALISON MR, POULSOM R, FORBES S, WRIGHT NA. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002; 197:419-23.

ANDRZEJEWSKA A, LUKOMSKA B, JANOWSKI M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells*. 2019 Jul;37(7):855-864. doi: 10.1002/stem.3016. Epub 2019 Apr 30. PMID: 30977255; PMCID: PMC6658105.

ARAÚJO JD, et al., A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores *J Vasc Br*, 2005; 4(4).

BARRETT EJ, LIU Z, KHAMAI SI M, KING GL, KLEIN R, KLEIN BEK, HUGHES TM, CRAFT S, FREEDMAN BI, BOWDEN DW, VINIK AI, CASELLINI CM. Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Dec 1;102(12):4343-4410. doi: 10.1210/jc.2017-01922. PMID: 29126250; PMCID: PMC5718697.

BARTON M, HUSMANN M, MEYER MR. Accelerated vascular aging as a paradigm for hypertensive vascular disease: prevention and therapy. *Can J Cardiol* 2016; 32:680-6.

BAX JJ, INZUCCHI SE, BONOW RO, SCHUIJF JD, FREEMAN MR, BARRETT EJ, et al. Cardiac imaging for risk stratification in diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30(5):1295-304.

BEARZI C, ROTA M, HOSODA T, TILLMANN S, NASCIMBENE A, DE NGELIS A, YASUZAWA-AMANO S, TROFIMOVA I, SIGGINS RW, LECAPITAINE N, CASCAPERA S, BELTRAMI AP, D’ALESSANDRO DA, ZIAS E, QUAINI F, URBANEK K, MICHLER RE, BOLLI R, KAJSTURA J, LERI A, et al.: Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:14068–14073.

- BECKMAN J. A, M. A. CREAGER, AND P. LIBBY, “Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management,” *JAMA*, vol. 287, no. 19, pp. 2570–2581, 2002.
- BELTRAMI AP, BARLUCCHI L, TORELLA D, BAKER M, LIMANA F, CHIMENTI S, KASAHARA H, ROTA M, MUSSO E, URBANEK K, LERI A, KAJSTURA J, NADALGINARD B, ANVERSA P: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114:763–776.
- BERGMANN O, BHARDWAJ RD, BERNARD S, ZDUNEK S, BARNABE-HEIDER F, WALSH S, ZUPICICH J, ALKASS K, BUCHHOLZ BA, DRUID H, JOVINGE S, FRISEN J: Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009; 324:98–102.
- BERNARDI S, G. M. SEVERINI, G. ZAULI, AND P. SECCHIERO, “Cell based therapies for diabetic complications,” *Experimental Diabetes Research*, vol. 2012, Article ID 872504, 10 pages, 2012. doi: 10.1155 / 2012/872504.
- BIEHL JK AND RUSSELL B, “Introduction to stem cell therapy,” *Journal of Cardiovascular Nursing*, vol. 24, no. 2, pp. 98–103, 2009.
- BOARD S. Stem cells--scientific, medical, and political issues. *N Engl J Med* 2002; 346:1576-9.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Anual de Saúde (PAS). Brasília: Ministério da Saúde; 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde Brasil 2014: Uma análise da situação de saúde e das causas externas. Brasília: Ministério da Saúde; 2015.
- CAI CL, LIANG X, SHI Y, CHU PH, PFAFF SL, CHEN J, EVANS S: Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 2003; 5:877– 889.
- CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003; 9:653– 660. doi: 10.1038/nm0603-653.
- CHEUNG C AND SINHA S, “Human embryonic stem cell derived vascular smooth muscle cells in therapeutic neovascularisation,” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 51, no. 5, pp. 651–664, 2011.
- CHIMENTI I, SMITH RR, LI T-S, GERSTENBLITH G, MESSINA E, GIACOMELLO A, MARBAN E: Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res* 2010; 106:971–980.
- CHONG, C. R.; CLARKE, K.; LEVELT, E. Metabolic remodelling in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*, [s.l.], v. 113, no 4, p. 422–430, 2017. ISSN: 17553245, DOI: 10.1093/cvr/cvx018.

CIAVARELLA C, VALENTE S, PASQUINELLI G. The Characteristics and Survival Potential Under Sub-lethal Stress of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Isolated from the Human Vascular Wall. *Stem Cells*. 2022;40(12):1071-1077.

CIESLIK KA, TRIAL J, ENTMAN ML. Defective myofibroblast formation from mesenchymal stem cells in the aging murine heart rescue by activation of the AMPK pathway. *Am J Pathol*. 2011; 179 (4): 1792-1806.

DE PAULA DRM, CAPUANO V, FILHO DM, CARNEIRO ACDM, DE OLIVEIRA CREMA V, DE OLIVEIRA LF, RODRIGUES ARA, MONTANO N, DA SILVA VJD. Biological properties of cardiac mesenchymal stem cells in rats with diabetic cardiomyopathy. *Life Sci*. 2017;188:45-52.

DE VRIESE AS, VERBEUREN TJ, VAN DE VOORDE J, LAMEIRE NH, VANHOUTTE PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000;130(5):963-74.

DI NICOLA M, C. CARLO-STELLA, M. MAGNI et al., “Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli,” *Blood*, vol. 99, no. 10, pp. 3838–3843, 2002.

DOKKEN, B. B. The pathophysiology of cardiovascular disease and diabetes: Beyond blood pressure and lipids. *Diabetes Spectrum*, [s.l.], v. 21, no 3, p. 160–165, 2008. ISSN: 10409165, DOI: 10.2337/diaspect.21.3.160.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315–317. [PubMed: 16923606].

DULAUROY S, DI CARLO SE, LANGA F, EBERL G, PEDUTO L. Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nat Med*. 2012 Aug;18(8):1262-70.

ELLISON GM, VICINANZA C, SMITH AJ, AQUILA I, LEONE A, WARING CD, HENNING BJ, STIRPARO GG, PAPAIT R, SCARFO M, AGOSTI V, VIGLIETTO G, CONDORELLI G, INDOLFI C, OTTOLENGHI S, TORELLA D, NADAL-GINARD B: Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell* 2013; 154:827– 842.

FAUCI AS, KASPER DL, BRAUNWALD E, HAUSER SL, LONGO DL, JAMESON JL, LOSCALZO J. Harrison’s Principles of Internal Medicine, 17th Edition, 2008.

FERNANDES DC, LAURINDO FRM. Marcadores bioquímicos de função endotelial e estresse oxidativo. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2010; 20(2):182-94.

FLAMME I, FRÖLICH T, RISAU W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1997; 173:206–210. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199711)173:23.0.CO;2-C.

FRANÇA CN, AMARAL JB, IZAR COM, FONSECA FAH. Avaliação morfológica de células endoteliais cultivadas *ConScientiae Saúde*, 2011; 10(4):609-613.

FRIEDENSTEIN AJ, PETRAKOVA KV, KUROLESOVA AI, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6:230–247. [PubMed: 5654088].

FU RH, WANG YC, LIU SP, HUANG CM, KANG YH, TSAI CH, et al. Differentiation of stem cells: strategies for modifying surface biomaterials. *Cell Transplant* 2010; 20:37-47.

FURMAN BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc.* 2021 Apr;1(4):e78.

GARGETT CE. Adult stem cells in the human endometrium. In: Simon C, Pellicer A, eds. *Stem Cells in Human Reproduction: Basic Science and Therapeutic Potential*. 2nd ed. London: Informa Healthcare, 2009:160-76.

GENEAD R, DANIELSSON C, ANDERSSON AB, CORBASCIO M, FRANCO-CERECEDA A, SYLVEN C, GRINNEMO KH: Islet-1 cells are cardiac progenitors present during the entire lifespan: From the embryonic stage to adulthood. *Stem Cells Dev* 2010; 19:1601–1615.

GRONTHOS S, ZANNETTINO ACW, HAY SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003; 116:1827–1835. [PubMed: 12665563].

GUZIK TJ, TOUYZ RM. Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension* 2017; 70:660-7.

HARVEY A, MONTEZANO AC, TOUYZ RM. Vascular biology of ageing-Implications in hypertension. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 83:112-21.

HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7:393–395. [PubMed: 16236628].

HSIEH PCH, SEGERS VFM, DAVIS ME, MACGILLIVRAY C, GANNON J, MOLKENTIN JD, ROBBINS J, LEE RT: Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 2007; 13:970–974.

IDF. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas: Eighth Edition [online]. 2017. Disponível em: www.idf.org/diabetesatlas.

JAENISCH R, YOUNG R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008; 132:567-82.

JIA G, DEMARCO VG, SOWERS JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol*. 2016; 12:144–53. [PubMed: 26678809].

JIA G, HILL MA, SOWERS JR. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res*. 2018;122(4):624-638. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311586.

KAJSTURA J, URBANEK K, PERL S, HOSODA T, ZHENG H, OGOREK B, FERREIRA-MARTINS J, GOICHBERG P, RONDON-CLAVO C, SANADA F, D'AMARIO D, ROTA M, DEL MONTE F, ORLIC D, TISDALE J, LERI A, ANVERSA P: Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ Res* 2010; 107:305–315.

KALYANI, R.R.; CANNON, C.P.; CHERRINGTON A.L.; COUSTAN D.R.; DE BOER I.H.; FELDMAN, H.; FRADKIN, J.; MAAHS, D.; MARYNIUK M.; MUNSHI, M.N.; NEUMILLER, J.J.; UMPIERREZ, G.E. Standards of Medical Care in Diabetes – 2018. *Diabetes Care*. 2018; 41(Suppl 1):S3.

KATTOOR AJ, POTHINENI NVK, PALAGIRI D, MEHTA JL. Oxidative stress in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2017; 19:42.

KEATS EC, KHAN ZA Células-tronco vasculares em complicações diabéticas: evidências de um papel na patogênese e na promessa terapêutica. *Cardiovascular Diabetology*. 2012; 11 (1): p. 37. doi: 10.1186 / 1475-2840-11-37.

KHAMAIISI M., BALANSON SE células-tronco para complicações do diabetes: uma futura cura potencial. *Rambam Maimonides Medical Journal*. 2017; 8 (1, artigo e0008) doi: 10.5041 / RMMJ.10283.

KISELEVA RY, GLASSMAN PM, GREINER CF, HOOD ED, SHUVAEV VV, MUZYKANTOV VR. Targeting therapeutics to endothelium: Are we there yet? *Drug Deliv Transl Res*. 2018; 8(4):883-902.

KOUREMBANAS S, “Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy,” *Annual Review of Physiology*, vol. 77, no. 1, pp. 13–27, 2015.

KOVACIC JC, MOORE J, HERBERT A, MA D, BOEHM M, GRAHAM RM. Endothelial progenitor cells, angioblasts, and angiogenesis—old terms reconsidered from a current perspective. *Trends Cardiovasc Med*. 2008; 18:45–51. doi: 10.1016/j.tcm.2007.12.002.

KOYA D, KING GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998;47(6):859–866.

KRAMPERA M, FRANCHINI M, PIZZOLO G, APRILI G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus* 2007; 5:120-9.

KRSTIC J, TRIVANOVIC D, OBRADOVIC H, KUKOLJ T, BUGARSKI D, SANTIBANEZ JF. Regulation of Mesenchymal Stem Cell Differentiation by Transforming Growth Factor Beta Superfamily. *Curr Protein Pept Sci*. 2018; 19 (12): 1138-1154.

LA SALA L, PRATTICHIZZO F, CERIELLO A. The link between diabetes and atherosclerosis. *Eur J Prev Cardiol*. 2019;26(2_suppl):15-24.

LAUGWITZ KL, MORETTI A, LAM J, GRUBER P, CHEN Y, WOODARD S, LIN LZ, CAI CL, LU MM, RETH M, PLATOSHYN O, YUAN JX, EVANS S, CHIEN KR: Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433:647–653.

LEE, W. S.; KIM, J. Diabetic cardiomyopathy: Where we are and where we are going. *Korean Journal of Internal Medicine*, [s.l.], v. 32, no 3, p. 404–421, 2017. ISSN: 20056648, DOI: 10.3904/kjim.2016.208.

LI L, XIE T. Stem cell niche: structure and function. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2005; 21:605-31.

LIBBY P, HANSSON GK. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res*. 2015; 116:307–311. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.301313.

MADONNA R, BALISTRERI CR, GENG YJ, DE CATERINA R. Diabetic microangiopathy: pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. *Vascul Pharmacol* 2017; 90:1-7.

MALLIARAS K, LI T-S, LUTHRINGER D, TERROVITIS J, CHENG K, CHAKRAVARTY T, GALANG G, ZHANG Y, SCHOENHOFF F, VAN EYK J, MARBAN L, MARBAN E: Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation* 2012; 125:100–112.

MALLIARAS K, ZHANG Y, SEINFELD J, GALANG G, TSELIYOU E, CHENG K, SUN B, AMINZADEH M, MARBAN E: Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO Mol Med* 2013; 5:191–209.

MARTIN CM, MEESON AP, ROBERTSON SM, HAWKE TJ, RICHARDSON JA, BATES S, GOETSCH SC, GALLARDO TD, GARRY DJ: Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 2004; 265:262–275.

MCCALL M.D, C. TOSO, E. E. BAETGE, AND A. M. J. Shapiro, “Are stem cells a cure for diabetes?” *Clinical Science*, vol. 118, no. 2, pp. 87–97, 2009.

MEIRELLES LS, CAPLAN AI, NARDI NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-99.

MESSINA E, ANGELIS L DE, FRATI G, MORRONE S, CHIMENTI S, FIORDALISO F, SALIO M, BATTAGLIA M, LATRONICO MVG, COLETTA M, VIVARELLI E, FRATI L, COSSU G, GIACOMELLO A: Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004; 95:911–921.

MINAMI Y, NAKAJIMA T, IKUTOMI M, et al.: Angiogenic potential of early and late outgrowth endothelial progenitor cells is dependent on the time of emergence. *Int J Cardiol*. 2015, 186:305-14. 10.1016/j.ijcard.2015.03.166.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica, diabetes mellitus, Brasília, Brasil, 2013.

MORANCHO A, HERNÁNDEZ-GUILLAMON M, BOADA C, et al.: Cerebral ischaemia and matrix metalloproteinase-9 modulate the angiogenic function of early and late outgrowth endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2013, 17:1543-53. 10.1111/jcmm.12116.

MÜLLER P, LEMCKE H, DAVID R. Stem Cell Therapy in Heart Diseases - Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cell Physiol Biochem*. 2018;48(6):2607-2655. doi: 10.1159/000492704. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30121644.

NAKAGAMI H, KANEDA Y, OGIHARA T, MORISHITA R. Endothelial dysfunction in hyperglycemia as a trigger of atherosclerosis. *Curr Diabetes Rev*. 2005;1(1):59-63.

NANDEDKAR T, NARKAR M. Stem cell research: its relevance to reproductive biology. *IJEB* 2003; 41:724-39.

NAWAZ M, F. FATIMA, K. C. VALLABHANENI et al., “Extracellular vesicles: evolving factors in stem cell biology,” *Stem Cells International*, vol. 2016, no. 17, 17 pages, 2016.

NELSON TJ, A. BEHFAR, S. YAMADA, A. MARTINEZ-FERNANDEZ, AND A. TERZIC, “Stem cell platforms for regenerative medicine,” *Clinical and Translational Science*, vol. 2, no. 3, pp. 222–227, 2009.

NIIBE K, KAWAMURA Y, ARAKI D, MORIKAWA S, MIURA K, SUZUKI S, et al. Purified mesenchymal stem cells are an efficient source for iPS cell induction. *PLoS One* 2011;6:e17610.

OH H, BRADFUTE SB, GALLARDO TD, NAKAMURA T, GAUSSIN V, MISHINA Y, POCIUS J, MICHAEL LH, BEHRINGER RR, GARRY DJ, ENTMAN ML,

SCHNEIDER MD: Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:12313–12318.

OKAMOTO OK, CAMPOS AH. Perspectivas em terapia celular: células-tronco einstein. 2004; 2(4):355.

OYAMA T, NAGAI T, WADA H, NAITO AT, MATSUURA K, IWANAGA K, TAKAHASHI T, GOTO M, MIKAMI Y, YASUDA N, AKAZAWA H, UEZUMI A, TAKEDA S'I, KOMURO I: Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 2007; 176:329–341.

PAGAN LU, GOMES MJ, OKOSHI MP. Função Endotelial e Exercício Físico. *Arq. Bras. Cardiol.* 2018; 111(4):540-541.

PAPATHEODOROU, K.; BANACH, M.; BEKIARI, E.; RIZZO, M.; EDMONDS, M. Complications of diabetes 2017. 2018.

PENG BY, DUBEY NK, MISHRA VK, TSAI FC, DUBEY R, DENG WP, WEI HJ. Addressing Stem Cell Therapeutic Approaches in Pathobiology of Diabetes and Its Complications. *J Diabetes Res.* 2018 Jun 25; 2018:7806435. doi: 10.1155/2018/7806435. PMID: 30046616; PMCID: PMC6036791.

PERSSON PB. The multiple functions of the endothelium: More than just wallpaper. *Acta Physiol.* 2015; (4) 213:747-9.; Pagan LU, Gomes MJ, Okoshi MP. Função Endotelial e Exercício Físico. *Arq. Bras. Cardiol.* 2018.

PETRIE JR, GUZIK TJ, TOUYZ RM. Diabetes, Hypertension, and cardiovascular disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can J Cardiol.* 2018 May;34(5):575-584. doi: 10.1016/j.cjca.2017.12.005. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29459239; PMCID: PMC5953551.

PFISTER O, MOUQUET F, JAIN M, SUMMER R, HELMES M, FINE A, COLUCCI WS, LIAO R: CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res* 2005; 97:52–61.

RAAZ U, SCHELLINGER IN, CHERNOGUBOVA E, WARNECKE C, KAYAMA Y, PENOV K, HENNIGS JK, SALOMONS F, EKEN S, EMRICH FC, ZHENG WH, ADAM M, JAGGER A, NAKAGAMI F, TOH R, TOYAMA K, DENG A, BUERKE M, MAEGDEFESSEL L, HASENFUß G, SPIN JM, TSAO PS. Transcription Factor Runx2 Promotes Aortic Fibrosis and Stiffness in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circ Res.* 2015;117(6):513-24.

RAFFAGHELLO L, G. BIANCHI, M. BERTOLOTTA et al., “Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche,” *Stem Cells*, vol. 26, no. 1, pp. 151–162, 2008.

RIBEIRO FA, THOEN RH, KÖHLER I, DANZMANN LC, TORRES MAR. Síndrome metabólica: complacência arterial e a velocidade de onda de pulso. *Rev AMRIGS*. 2012;56(1):75-80.

RICHARDS WO, PRUTZMAN KB, O'HEA MF, AUDIA JP, ALVAREZ DF: Bariatric surgery improves the circulating numbers and biological activity of late outgrowth endothelial progenitor cells. *Surg Obes Relat Dis*. 2014, 10:906-13. 10.1016/j.soard.2014.04.025.

ROBERTS AC, PORTER KE. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diab Vasc Dis Res*. 2013;10(6):472-82.

ROCKEY DC, BELL PD, HILL JA. Fibrosis - a common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med* 2015;373:96.

ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362:801–809. doi: 10.1038/362801a0.

RYDEN L, GRANT PJ, ANKER SD, BERNE C, COSENTINO F, DANCHIN N, DEATON C, ESCANED J, HAMMES HP, HUIKURI H, MARRE M, MARX N, MELLBIN L, OSTERGREN J, PATRONO C, SEFEROVIC P, UVA MS, TASKINEN MR, TENDERA M, TUOMILEHTO J, VALENSI P, ZAMORANO JL, ZAMORANO JL, ACHENBACH S, BAUMGARTNER H, BAX JJ, BUENO H, DEAN V, DEATON C, EROL C, FAGARD R, FERRARI R, HASDAI D, HOES AW, KIRCHHOF P, KNUUTI J, KOLH P, LANCELLOTTI P, LINHART A, NIHOYANNOPOULOS P, PIEPOLI MF, PONIKOWSKI P, SIRNES PA, TAMARGO JL, TENDERA M, TORBICKI A, WIJNS W, WINDECKER S, DOCUMENT R, DE BACKER G, SIRNES PA, EZQUERRA EA, AVOGARO A, BADIMON L, BARANOVA E, BAUMGARTNER H, BETTERIDGE J, CERIELLO A, FAGARD R, FUNCK-BRENTANO C, GULBA DC, HASDAI D, HOES AW, KJEKSHUS JK, KNUUTI J, KOLH P, LEV E, MUELLER C, NEYSES L, NILSSON PM, PERK J, PONIKOWSKI P, REINER Z, SATTAR N, SCHACHINGER V, SCHEEN A, SCHIRMER H, STROMBERG A, SUDZHAIEVA S, TAMARGO JL, VIIGIMAA M, VLACHOPOULOS C, XUEREB RG. Authors/Task Force M; Guidelines ESCCfP. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2013; 34:3035–87. [PubMed: 23996285].

SACCHETTI B, FUNARI A, MICHIEZI S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007; 131:324–336. [PubMed: 17956733].

SANDESARA PB, O'NEAL WT, KELLI HM, SAMMAN-TAHHAN A, HAMMADAH M, QUYYUMI AA, SPERLING LS. The Prognostic Significance of Diabetes and Microvascular Complications in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Diabetes Care*. 2018; 41:150–155. [PubMed: 29051160].

SARWAR, N. et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *The Lancet*, [s.l.], v. 375, no 9733, p. 2215–2222, 2010. ISSN: 1474547X, DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60484-9.

SAVOIA C, SADA L, ZEZZA L, et al. Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental hypertension. *Int J Hypertens* 2011:281240.

SBD (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2020). SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2019-2020. Diretrizes 2019-2020. São Paulo, Editora Clannad, 2020.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DA SÃO PAULO. Linha de cuidado – Diabetes Mellitus – manejo na unidade de saúde. 1ed. São Paulo, 2018. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/atencao-basica/linha-de-cuidado-ses-sp/diabetes-mellitus/manejo_unidade_saude_diabetes_mellitus.pdf>.

SENYO SE, STEINHAUSER ML, PIZZIMENTI CL, YANG VK, CAI L, WANG M, WU TD, GUERQUIN-KERN JL, LECHENE CP, LEE RT: Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 2013; 493:433–436.

SHEIK S ABDULAZEEZ, “Diabetes treatment: a rapid review of the current and future scope of stem cell research,” *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 23, no. 4, pp. 333–340, 2015.

SHI Y, VANHOUTTE PM. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes*. 2017;9(5):434-449.

SHOME JS, PERERA D, PLEIN S, CHIRIBIRI A. Current perspectives in coronary microvascular dysfunction. *Microcirculation*. 2017; 24.doi: 10.1111/micc.12340.

SIEVEKING DP, BUCKLE A, CELERMAJER DS, NG MKC: Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations. *J Am Coll Cardiol*. 2008, 51:660-8. 10.1016/j.jacc.2007.09.059.

SIMMONS PJ, TOROK-STORB B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78:55–62. [PubMed: 2070060].

SMITH A. The battlefield of pluripotency. *Cell* 2005; 123:757-60.

STORCH AS, MATTOS JD, ALVES R, GALDINO IS, ROCHA HNM. Métodos de Investigação da Função Endotelial: Descrição e suas Aplicações. *International Journal of Cardiovascular Sciences*. 2017; 30(3):262-273.

SZMITKO PE, WANG CH, WEISEL RD, DE ALMEIDA JR, ANDERSON TJ, VERMA S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation*. 2003;108(16):1917-23.

TAKI Z, GOSTJEVA E, THILLY W, YASEEN B, LOPEZ H, MIRZA M, HASSUJI Z, VIGNESWARAN S, AHMED ABDI B, HART A, ARUMALLA N, THOMAS G, DENTON CP, SULEMAN Y, LIU H, VENTURINI C, O'REILLY S, XU S, STRATTON R. Pathogenic Activation of Mesenchymal Stem Cells Is Induced by the Disease Microenvironment in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(8):1361-1374.

TARQUINI, R. et al. The diabetic cardiomyopathy. *Acta Diabetologica*, [s.l.], v. 48, no 3, p. 173–181, 2011. ISSN: 09405429, DOI: 10.1007/s00592-010- 0180-x.

TEO G.S.L, J. A. ANKRUM, R. MARTINELLI et al., “Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor- α -activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms,” *Stem Cells*, vol. 30, no. 11, pp. 2472–2486, 2012.

TOFFOLI B, S. BERNARDI, R. CANDIDO, S. ZACCHIGNA, B. FABRIS, AND P. SECCHIERO, “TRAIL shows potential cardioprotective activity,” *Investigational New Drugs*, vol. 30, no. 3, pp. 1257–1260, 2012.

TULETA I, FRANGOIANNIS NG. Diabetic fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021; 1867(4):166044.

UCHIDA S, GASPARI P DE, KOSTIN S, JENNICHES K, KILIC A, IZUMIYA Y, SHIOJIMA I, GROSSE KREYMBORG K, RENZ H, WALSH K, BRAUN T: Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Reports* 2013; 1:397–410.

WANG X, HU Q, NAKAMURA Y, LEE J, ZHANG G, FROM AHL, ZHANG J: The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* 2006; 24:1779–1788.

WESTERMEIER F, RIQUELME JA, PAVEZ M, GARRIDO V, DIAZ A, VERDEJO HE, CASTRO PF, GARCIA L, LAVANDERO S. New Molecular Insights of Insulin in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Physiol*. 2016; 7:125. [PubMed: 27148064].

WHITE AJ, SMITH RR, MATSUSHITA S, CHAKRAVARTY T, CZER LSC, BURTON K, SCHWARZ ER, DAVIS DR, WANG Q, REINSMOEN NL, FORRESTER JS, MARBAN E, MAKKAR R: Intrinsic cardiac origin of human cardiosphere-derived cells. *Eur Heart J* 2013; 34:68–75.

WHO World Health Organization. Global report on diabetes. Geneva; 2016.

WHO. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization, 2014.

WHO. World Health Organization. Time to Deliver: Report of the WHO Independent High Level Commission on Noncommunicable Diseases. Geneva: World Health Organization, 2018.

WÖRSDÖRFER P, MEKALA SR, BAUER J, EDENHOFER F, KUERTEN S, ERGÜN S. The vascular adventitia: an endogenous, omnipresent source of stem cells in the body. *Pharmacol Ther.* 2017; 171:13–29. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.07.017.

XU Q. Stem cells and transplant arteriosclerosis. *Circ Res.* 2008;102: 1011–1024. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.171488.

XU Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006; 3:94–101. doi: 10.1038/ncpcardio0396.

YANCY CW, JESSUP M, BOZKURT B, BUTLER J, CASEY DE JR, DRAZNER MH, FONAROW GC, GERACI SA, HORWICH T, JANUZZI JL, JOHNSON MR, KASPER EK, LEVY WC, MASOUDI FA, MCBRIDE PE, MCMURRAY JJ, MITCHELL JE, PETERSON PN, RIEGEL B, SAM F, STEVENSON LW, TANG WH, TSAI EJ, WILKOFF BL. American College of Cardiology F, American Heart Association Task Force on Practice G. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62: e147–239. [PubMed: 23747642].

YIN H, PICKERING JG. Cellular senescence and vascular disease: novel routes to better understanding and therapy. *Can J Cardiol* 2016; 32:612-23.

YOON Y.S, S. UCHIDA, O. MASUO et al., “Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor,” *Circulation*, vol. 111, no. 16, pp. 2073–2085, 2005.

YOSHIDA Y, YAMANAKA S. iPS cells: a source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50:327-32.

YU B, CHEN Q, LE BRAS A, ZHANG L, XU Q. Vascular stem/progenitor cell migration and differentiation in atherosclerosis [published online ahead of print July 5, 2017]. *Antioxid Redox Signal.* doi: 10.1089/ars.2017.7171.

ZEADIN MG, PETLURA CI, WERSTUCK GH. Molecular mechanisms linking diabetes to the accelerated development of atherosclerosis. *Can J Diabetes.* 2013;37(5):345-50.

ZHANG N, J. LI, R. LUO, J. JIANG, AND J.-A. WANG, “Bone marrow mesenchymal stem cells induce angiogenesis and attenuate the remodeling of diabetic cardiomyopathy,” *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, vol. 116, no. 02, pp. 104–111, 2008.

ZHANG ZY, WANG N, QIAN LL, MIAO LF, DANG SP, WU Y, WANG RX. Glucose Fluctuations Promote Aortic Fibrosis through the ROS/p38 MAPK/Runx2 Signaling Pathway. *J Vasc Res.* 2020;57(1):24-33.

ZIEMAN SJ, MELENOVSKY V, KASS DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:932-43.