



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

PÂMELA SANTANA DALTRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS
E DO MEIO CONDICIONADO NO TRATAMENTO DAS DISFUNÇÕES
CARDÍACAS DECORRENTES DA OBESIDADE E DM2 EXPERIMENTAL.**

**SALVADOR
2020**

PÂMELA SANTANA DALTRO

**AValiação DO POTENCIAL TERAPêUTICO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS
E DO MEIO CONDICIONADO NO TRATAMENTO DAS DISFUNÇÕES
CARDÍACAS DECORRENTES DA OBESIDADE E DM2 EXPERIMENTAL.**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – UFBA/SBBq, como requisito para a obtenção do título de Doutor (a) em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal da Bahia.

Orientador: Simone Garcia Macambira

**SALVADOR– BA
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

D152 Daltro, Pamela Santana

AValiação DO POTENCIAL TERAPêUTICO DAS CélULAS MESENQUIMAIS E DO MEIO CONDICIONADO NO TRATAMENTO DAS DISFUNÇÕES CARDÍACAS DECORRENTES DA OBESIDADE E DM2 EXPERIMENTAL. / Pamela Santana Daltro. -- Salvador, 2020.

117 f. : il

Orientadora: Simone Garcia Macambira.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Bioquímica e Biofísica, 2020.

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Disfunção cardíaca. 3. Obesidade. 4. Terapia celular. I. Macambira, Simone Garcia. II. Título.

CDU 61

PÂMELA SANTANA DALTRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS
E DO MEIO CONDICIONADO NO TRATAMENTO DAS DISFUNÇÕES
CARDÍACAS DECORRENTES DA OBESIDADE E DM2 EXPERIMENTAL.**

Aprovado em 14/02/2020

BANCA DE APRESENTAÇÃO

Simone Garcia Macambira
Universidade Federal da Bahia

Elisalva Teixeira Guimarães
Universidade do Estado da Bahia

Gyselle Chrystina Baccan
Universidade Federal da Bahia

Natalia Machado Tavares
Instituto Gonçalo Moniz-FIOCRUZ

Luciana Souza de Aragão França
Centro de Biotecnologia e Terapia Celular – Hospital São Rafael/IDOR

**SALVADOR – BA
2020**

Dedico este trabalho a todas as pessoas portadoras de doenças cardíacas associadas a obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2, que novas pesquisas possam emergir com o advento desse trabalho, na busca de uma melhor qualidade de vida para estes pacientes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter conseguido chegar até o final deste trabalho, agradeço também por toda dificuldade passada durante a realização do mesmo, obstáculos esses superados e que acabaram por me fortalecer para novos desafios não só na linha acadêmica, como também na vida.

Agradeço a toda minha família, minha mãe, pai, irmã, Roger e Amália que se preocuparam comigo e a todo momento estiveram ao meu lado para que eu chegasse a vitória e finalização desse trabalho. À Quesa, minha grande inspiração de vida, foi por ela que a ideia de trabalhar com diabetes e obesidade surgiu em mim, sinto não tê-la ao meu lado agora na concretização desse sonho, mas sei que um dia iremos nos encontrar.

Ao meu noivo João Fonseca Gomes Jr., meu amigo, companheiro, e incentivador e apoiador em todos os momentos.

Agradeço à minha orientadora Dr^a Simone Garcia Macambira que orientou-me em todos os sentidos, e tornou-se uma amiga e mãe antes, durante e após a realização desse trabalho.

À Dr^a Milena Botelho Pereira Soares, Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, Dr. Bruno Solano e Dr. Ricardo Ribeiro que acreditaram no meu potencial, possibilitando a realização do mesmo e somando inestimáveis contribuições técnico-científicas.

Agradeço a todos os queridos colegas do CBTC, em especial ao Dr. Adriano Alcântara, Dr^a Carolina Nonaka e Dr^a Carine Azevedo que direta ou indiretamente participaram desse trabalho. Agradeço a todos que fizeram parte da equipe de Cardio do CBTC (Pedro Guimarães, Dulce Santana Neta, Pedro Humberto, Paulo Chenaud Neto) que me ajudaram com todo empenho, e em especial aos queridos amigos Gisele Carvalho e Breno Barreto, amizades verdadeiras construídas nesses anos de trabalho.

Aos colegas e amigos conquistados na pós-graduação do PMBqBM por dividirem risadas, alegrias e incertezas, a Juliana Souza, Tamires, Jessica Laís, e Jessica Duarte, por amenizarem os dias difíceis e tornarem cada congresso um sucesso.

À FAPESB pelo financiamento e incentivo na geração da pesquisa.

Ao CBTC/HSR pela excelente infra-estrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

“A vida, mesmo que às vezes sofrida, é tão curta
e tão bonita pra não ser vivida.”

Victor Chaves

DALTRO, Pâmela Santana. **Avaliação do potencial terapêutico das células mesenquimais e do meio condicionado no tratamento das disfunções cardíacas decorrentes da obesidade e DM2 experimental.** Salvador, Bahia, 2020. 130p. Tese (Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade Federal da Bahia, 2020.

RESUMO

Hábitos alimentares com altos teores de gordura e o estilo de vida sedentário são fatores desencadeantes da obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e insuficiência cardíaca. Células mesenquimais (MSC) surgem como uma ferramenta terapêutica capaz de melhorar o quadro de doenças cardiovasculares, mas também de outras condições degenerativas, devido ao seu efeito regenerativo induzido pela sua ação parácrina. Com base nisso, os fatores secretados no meio condicionado (MC) destas células também são investigados na regeneração tecidual. Este estudo visou avaliar o potencial terapêutico das MSC e do seu MC no tratamento das complicações cardíacas em modelo experimental de obesidade e diabetes induzidas por dieta com alto teor de gordura (HFD). Avaliações bioquímicas, murinométricas e funcionais cardíacas foram realizadas nos períodos: pré-indução da obesidade, pós-indução e pós-tratamento. Após 36 semanas de uso da HFD, esta foi substituída pela dieta padrão seguida pelo tratamento: MSC, MC e DMEM. A disfunção metabólica foi avaliada através de parâmetros bioquímicos e índice de massa corpórea. A função cardíaca foi avaliada por eletrocardiografia, ecocardiografia e teste ergométrico. A presença de fibrose no miocárdio foi avaliada por análise histopatológica. Os mecanismos de ação da terapia celular foram investigados no tecido cardíaco por qRT-PCR. A caracterização do MC foi realizada por *protein array* que revelou a presença de 19 proteínas incluindo citocinas e fatores de crescimento. Os camundongos alimentados com HFD apresentaram arritmias cardíacas, expressão alterada de genes cardíacos e fibrose do miocárdio, refletindo na redução da capacidade de efetuar esforço físico. A administração da MSC ou MC reverteu as arritmias e recuperou a capacidade de realizar exercício físico. Na primeira etapa deste estudo, observou-se a melhora funcional cardíaca em consonância com a normalização da expressão dos genes GATA4, conexina 43 e COL1A1 nos corações de camundongos tratados com MSC ou MC. A expressão dos genes troponina I, adiponectina, TGF- β 1, PPAR γ , IGF-1, SOCS3, MMP9 e TIMP1 normalizaram após o tratamento com MSC, mas não com o MC. Além disso, a administração de MSC ou MC reduziu o percentual de área com fibrose. A fim de elucidar a melhora significativa alcançada pelas MSC, na segunda etapa deste estudo, aprofundou-se a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos neste efeito terapêutico. Foi investigada a expressão de genes relacionados ao remodelamento tecidual (SPARC, CTGF e SMAD7), à inflamação (CCL2 e CHI3L3), bem como, à sobrevivência e proliferação celular (PTEN e STAT3) por qRT-PCR. Elevados níveis da expressão gênica do SMAD7, SPARC, CTGF, CCL2, CHI3L3, STAT3 e PTEN foram detectados apenas no grupo tratado com MSC. Os resultados apresentados neste estudo sugerem que MSC e CM têm um efeito benéfico sobre os distúrbios cardíacos decorrentes da obesidade e DM2, corroborando com a ação parácrina das MSC através da modulação de elementos envolvidos em processos de regeneração tecidual, tais como desenvolvimento de fibrose.

Palavras chave: Células-tronco mesenquimais. Disfunção cardíaca. Obesidade. Terapia celular.

DALTRO, Pamela Santana. **Evaluation of the therapeutic potential of mesenchymal cells and conditioned medium in the treatment of cardiac dysfunction due to obesity and experimental DM2.** Salvador, Bahia, 2020. 130p. Thesis (Multicenter Graduate Program in Biochemistry and Molecular Biology) - Federal University of Bahia, 2020.

ABSTRACT

High fat eating habits and sedentary lifestyle are triggering factors of obesity, diabetes mellitus type 2 (DM2) and heart failure. Mesenchymal cells (MSC) appear as a therapeutic tool capable of improving cardiovascular disease, but also other degenerative conditions, due to its regenerative effect induced by its paracrine action. Based on this, the factors secreted in the conditioned medium (CM) of these cells are also investigated in tissue regeneration. This study aimed to evaluate the therapeutic potential of MSC and its CM in the treatment of cardiac complications in an experimental model of obesity and diabetes induced by high fat diet (HFD). Biochemical, murinometric and cardiac functional evaluations were performed in the following periods: pre-induction of obesity, post-induction and post-treatment. After 36 weeks of use of HFD, it was replaced by the standard diet followed by treatment: MSC, MC and DMEM. Metabolic dysfunction was assessed by biochemical parameters and body mass index. Cardiac function was assessed by electrocardiography, echocardiography and treadmill test. The presence of myocardial fibrosis was assessed by histopathological analysis. The action mechanisms of cell therapy were investigated in cardiac tissue by qRT-PCR. CM characterization was performed by protein array which revealed the presence of 19 proteins including cytokines and growth factors. HFD-fed mice had cardiac arrhythmias, altered expression of cardiac genes, and myocardial fibrosis, reflecting the reduced ability to exercise. MSC or CM administration reversed arrhythmias and regained the ability to exercise. In the first stage of this study, cardiac functional improvement was observed in line with normalization of GATA4, connexin 43 and COL1A1 gene expression in the hearts of mice treated with MSC or CM. The expression of troponin I, adiponectin, TGF- β 1, PPAR γ , IGF-1, SOCS3, MMP9 and TIMP1 genes normalized after treatment with MSC, but not with CM. In addition, administration of MSC or CM reduced the percentage of fibrosis area. In order to elucidate the most significant improvement achieved by MSC, in the second stage of this study, the investigation of the molecular mechanisms involved in this therapeutic effect was deepened. The expression of genes related to tissue remodeling (SPARC, CTGF and SMAD7), inflammation (CCL2 and CHI3L3), as well as cell survival and proliferation (PTEN and STAT3) by qRT-PCR were investigated. High levels of SMAD7, SPARC, CTGF, CCL2, CHI3L3, STAT3 and PTEN gene expression were detected only in the MSC treated group. These results suggest that MSC and CM have a beneficial effect on cardiac disorders due to obesity and DM2, corroborating to the paracrine action of MSCs by modulating elements involved in tissue regeneration processes, such as fibrosis development.

Keywords: Mesenchymal stromal cells. Cardiac dysfunction. Obesity. Cell therapy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBESIDADE	17
1.2	DIABETES <i>MELLITUS</i>	18
1.3	RESISTÊNCIA À INSULINA	19
1.4	RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE, DM E RI	24
1.5	OBESIDADE & DM2: COMPROMETIMENTO CARDÍACO	29
1.5.1	Metabolismo Cardíaco na obesidade & DM2	29
1.5.2	Inflamação cardíaca na obesidade & DM2	32
1.5.3	Disfunção cardíaca na obesidade & DM2	33
1.6	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (MSC)	36
1.7	MECANISMOS DE AÇÃO DAS MSC NA REGENERAÇÃO CARDÍACA ..	37
1.8	USO TERAPÊUTICO DO MC NAS DISFUNÇÕES CARDÍACAS	41
	CAPÍTULO 1	44
2	JUSTIFICATIVA	44
3	HIPOTESE	45
4	OBJETIVOS	45
4.1	GERAL	45
4.2	ESPECÍFICOS	45
5	DESENHO EXPERIMENTAL	46
6	MATERIAL E MÉTODOS	47
6.1	INDUÇÃO DA OBESIDADE E DM2	47
6.2	CULTURA E ISOLAMENTO DAS MSC E PREPARAÇÃO DO MC	48
6.3	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DIFERENCIAL DAS MSC	49
6.4	CARACTERIZAÇÃO DO MC	50
6.5	TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS COM MSC E MC	50
6.6	ANÁLISE BIOQUÍMICA E MURINOMÉTRICA	51

6.7	ANÁLISE FUNCIONAL CARDÍACA	52
6.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	53
6.9	ANÁLISE QUANTITATIVA POR RT-qPCR	53
6.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
7	RESULTADOS	55
7.1	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA CELULAR SOBRE AS ALTERAÇÕES CARDÍACAS DECORRENTES DA OBESIDADE E DM2 EM MODELO EXPERIMENTAL	55
7.1.1	Caracterização das MSC e MC	55
7.1.2	A remoção da HFD em camundongos obesos reduz o peso corporal, a glicemia em jejum, TTG e o colesterol total	57
7.1.3	Administração das MSC e do MC revertem as alterações na função cardíaca em camundongos obesos	60
7.1.4	MSC regulam os níveis de expressão de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição em corações de camundongos obesos	63
7.1.5	Reversão da fibrose cardíaca induzida pela HFD após administração de MSC e MC	65
	CAPÍTULO 2	68
8	JUSTIFICATIVA	68
9	HIPOTESE	69
10	OBJETIVOS	69
10.1	GERAL	69
10.2	ESPECÍFICOS	69
11	DESENHO EXPERIMENTAL	70
12	MATERIAL E MÉTODOS	72
12.1	ANÁLISE QUANTITATIVA POR RT-qPCR	72
13	RESULTADOS	73
13.1	AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DA MSC SOBRE AS ALTERAÇÕES MURINOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DA OBESIDADE E DM2 EM MODELO EXPERIMENTAL	73

13.2	MELHOR CAPACIDADE DE REALIZAR EXERCÍCIO EM TESTE ERGONOMÉTRICO APÓS TRATAMENTO DE MSC	75
13.3	MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS EM TECIDO CARDÍACO	75
13.4	REVERSÃO DA FIBROSE CARDÍACA INDUZIDA PELA HFD APÓS ADMINISTRAÇÃO DE MSC	76
13.5	MODULAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO REMODELAMENTO TECIDUAL E APOPTOSE NO CORAÇÃO APÓS ADMINISTRAÇÃO DAS MSC	77
14	DISCUSSÃO	79
15	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via de sinalização da insulina	20
Figura 2 – Via de resistência à insulina	22
Figura 3 – Desenho Experimental	46
Figura 4 – Modelo Terapêutico	51
Figura 5 - Caracterização das MSC dos camundongos C57Bl/6	56
Figura 6 – Caracterização do MC por <i>protein array</i>	57
Figura 7 – Análise do peso corpóreo, glicemia em jejum e colesterol total	58
Figura 8 – Teste de tolerância à glicose (TTG)	59
Figura 9 – Traçados eletrocardiográficos de camundongo tratado com MSC	60
Figura 10 – Gravidade das arritmias	62
Figura 11 – Citocinas e fatores de transcrição por RT-qPCR em tecido cardíaco	64
Figura 12 – Administração de MSC e MC reduz a fibrose cardíaca induzida por HFD	66
Figura 13 – Desenho experimental	71
Figura 14 – Análise do peso corpóreo, glicemia em jejum e TTG	74
Figura 15 - Citocinas e fatores de transcrição por RT-qPCR em tecido cardíaco	76
Figura 16 - Redução da fibrose cardíaca após tratamento com MSC	77
Figura 17 - Modulação de genes cardíacos pelas MSC	78
Figura 18 - Representação esquemática da modulação dos genes cardíacos	82
Figura 19 - Imunomodulação resultante da expressão de genes no tecido cardíaco e seu mecanismo de ação.....	84
Figura 20 - Representação esquemática da ativação da via fibrotica e bloqueio via expressão da SMA7.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da HFD e da STD.	47
Tabela 2 – Presença de arritmias na 36 ^a semana de indução com HFD (pré-tratamento), após 8 semanas de tratamento com MC e 11 semanas de tratamento com MSC (51 semanas).	60
Tabela 3 – Desempenho dos camundongos submetidos à atividade física em esteira ergométrica (Distância em metros) alimentados com dieta STD ou HFD.	63
Tabela 4 – Composição da HFD e da STD	70
Tabela 5 - Desempenho dos camundongos submetidos à atividade física em esteira ergométrica (Distância em metros) alimentados com dieta STD ou HFD.	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGEs	Produtos finais de glicosilação avançada (do inglês: <i>advanced glycosylation end products</i>)
AGL	Ácidos graxos livres
AKT	Proteína cinase B
ANOVA	Análise de variância
AS160	Substrato Akt de 160 kDa (do inglês: <i>Akt substrate of 160 kDa</i>)
ATF2	Fator 2 de ativação da transcrição (do inglês: <i>Activating transcription factor</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
CD	Cardiomiopatia diabética
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CHI3I3	Proteína 1 Semelhante à Quitinase-3 (do inglês: <i>Chitinase-3-like protein 3</i>)
COL1A1	Colágeno tipo 1 alfa 1
CPT1	Carnitina Palmitoil Transferase 1
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo (do inglês: <i>connective tissue growth factor</i>)
Cx43	Conexina 43
DAC	Doença arterial coronariana
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMEM	do inglês: <i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i>
ECG	Eletrocardiograma
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular (do inglês: <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Soro fetal bovino (do inglês: <i>fetal bovine serum</i>)
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos (do inglês: <i>fibroblast growth factors</i>)
GAPDH	Gliceraldeído 3-fostato desidrogenase
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos (do inglês: <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GDP	Guanosina difosfato (do inglês: <i>Guanosine diphosphate</i>)
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1 (do inglês: <i>glucagon-like peptide-1 -</i>)
GLUT	Transportador de glicose (do inglês: <i>glucose transporter</i>)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS (Continuação)

GRB2	Proteína adaptadora GRB2 (do inglês: <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>)
GS	Glicogênio-sintetase
GSK-3β	glicogênio-sintase-quinase (do inglês: <i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>)
GTP	Guanosina trifosfato
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HFD	Dieta rica em gordura (do inglês: <i>high fat diet</i>)
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (do inglês: <i>hepatocyte growth factor</i>)
HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferase
IC	Insuficiência cardíaca
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1 (do inglês: <i>insulin-like growth factors 1</i>)
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (do inglês: <i>intercellular adhesion molecule</i>)
IKB/IKK	inibidor do fator nuclear κ B (do inglês: <i>inhibitor of nuclear factor-κB</i>)
IL-1	Interleucina-1
IL-12	Interleucina-12
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
IRE	Inositol Requiring Enzyme
IRS	Substrato do receptor de insulina (do inglês: <i>insulin receptor substrate</i>)
JAK2	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal cinase
kDa	kilodalton
MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitógenos (do inglês: <i>mitogen activated protein kinases</i>)
MC	Meio condicionado
MCP-1/CCL2	Proteína quimioatrativa de monócitos (do inglês: <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MEC	Matriz extracelular
MEK	Cinase ativadora da MAP quinase
miRNA	MicroRNA

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS (Continuação)

MMP9	Metaloproteinase da matriz 9 (do inglês: <i>matrix metalloproteinase-9</i>)
MyD88	Fator 88 de diferenciação mielóide (do inglês: <i>myeloid differentiation protein</i>)
mRNA	RNA mensageiro
MSC	Células-tronco mesenquimais (do inglês: <i>mesenchymal stem cell</i>)
NF-κB	Fator nuclear kappa B (do inglês: <i>factor nuclear kappa B</i>)
NO	Óxido nítrico (do inglês: <i>nitric oxide</i>)
O-GlcNAc	O-Glicosilação com N-acetilglucosamina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês: <i>phosphate-buffered saline</i>)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês: <i>platelet-derived growth factor</i>)
PDK1	Proteína cinase-1 dependente de proteína 3-fosfoinositídeo
PERK	(do inglês: <i>Protein kinase-like ER kinase</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKB	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
PPA2	Proteína fosfatase 2 (do inglês: <i>protein phosphatase 2</i>)
PPARγ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (do inglês: <i>peroxisome proliferator-activated receptor-α</i>)
PTB	Ligante fosfotirosina (do inglês: <i>phosphotyrosine binding</i>)
PTEN	Fosfatase e tensina deletadas no cromossomo 10 (do inglês: <i>phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10</i>)
PTP1B	Proteína tirosina fosfatase 1B (do inglês: <i>protein-tyrosine phosphatase 1B</i>)
RAF	Quinase específica para Ser/Thr
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistência à insulina
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SCF	Fator de célula-tronco (do inglês: <i>stem-cell factor</i>)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS (Continuação)

SDF-1α	Fator derivado de células estromais Alfa-1 (do inglês: <i>stromal cell-derived factor 1</i>)
SEM	Erro padrão (do inglês: <i>standard error of the mean</i>)
SH2	Proteínas com domínios de homologia à Src2
SHC	Proteína adaptadora SHC
SHP2	Fosfatase fosfotirosina 2
SMAD7	(do inglês: <i>mothers against decapentaplegic homolog 7</i>)
SOCS	Supressor de sinalização de citocina
SOS	(do inglês: <i>son of Sevenless</i>)
SPARC	(do inglês: <i>secreted protein acidic and rich in cysteine</i>)
SRC2	(do inglês: <i>steroid receptor coactivator-2</i>)
STAT-3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (do inglês: <i>signal transducers and activators of transcription</i>)
TGF-β1	fator de crescimento transformante beta 1 (do inglês: <i>transforming growth factor beta 1</i>)
TIMP1	Inibidor da metaloproteinase 1 (do inglês: <i>tissue inhibitor matrix metalloproteinase 1</i>)
TIR	(do inglês: <i>Toll/interleukin-1 receptor</i>)
TIRAP	(do inglês: <i>TIR domain-containing adaptor protein</i>)
TLR	(do inglês: <i>toll like receptors</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α (do inglês: <i>tumor necrosis factor-α</i>)
TNFR1	Receptor 1 do TNF (do inglês: <i>tumor necrosis factor receptor 1</i>)
TNNI3	Troponina I tipo 3
TRAM	(do inglês: <i>TRIF-related adaptor molecule</i>)
TRIF	(do inglês: <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>)
TTG	Teste de tolerância à glicose
UPR	(do inglês <i>unfolded protein response</i>)
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1 (do inglês: <i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VEs	Vesículas extracelulares
VEGF	Fator de crescimento endotelial (do inglês: <i>vascular endothelial growth factor</i>)

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

A obesidade é uma doença endócrino-metabólica de origem multifatorial, caracterizada pelo desequilíbrio no metabolismo energético celular crônico (CARMONA; ÁLVAREZ; OLIVER, 2018). Hábitos da vida moderna, tais como o consumo exagerado de alimentos ricos em gorduras e carboidratos e a inatividade física, promovem o aumento nos estoques de energia, que são convertidos em triglicérides e armazenados em depósitos do tecido adiposo, promovendo o aumento da gordura corporal (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017; CHOOI; DING; MAGKOS, 2019).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a prevalência mundial da obesidade vem crescendo progressivamente nos últimos anos. No ano de 2014, mais de 600 milhões de indivíduos estavam obesos no mundo (NCD-RisC, 2016), em 2016 o número de obesos e/ou sobrepeso ultrapassava 1,9 bilhão. A prevalência mundial da obesidade quase triplicou entre os anos de 1975 e 2016, apesar de décadas de esforços para retardar essa epidemia (WHO, 2017).

No Brasil, a prevalência da obesidade deu um salto de 11,8% em 2006 para 18,9%, em 2017 (BRASIL, 2018). Ao longo das últimas três décadas, o estilo de vida sofreu modificações, tais como o aumento progressivo no consumo excessivo de carboidratos e gorduras na população a nível mundial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; HRUBY; HU, 2015). Em projeções baseadas nas prevalências atuais da obesidade, estimam-se um aumento de 33% nas próximas duas décadas no número de obesos, gerando maiores gastos com a saúde pública, devido ao maior risco de desenvolvimento de comorbidades, a exemplo das doenças cardiovasculares, e o DM2 (FRUH, 2017) característicos da síndrome metabólica (ALBERTI *et al.*, 2009).

A obesidade é um fator de risco importante para o desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), devido à sua associação a resistência à insulina (RI), gerando um impacto negativo sobre a progressão e tratamento do DM2 (CORNIER, 2005; ECKEL *et al.*, 2011) com aumento na taxa de morbi-mortalidade (DESPRES; LEMIEUX, 2006). Cerca de 80% dos casos de DM2 podem ser atribuídos à obesidade (HOLT; HANLEY, 2012).

Intervenções no estilo de vida como prática de exercício físico e reeducação alimentar são consideradas intervenções bem-sucedidas, que reduzem a prevalência da obesidade e que podem resultar em economias substanciais para a saúde do país (FINKELSTEIN *et al.*, 2012).

1.2 DIABETES *MELLITUS*

O DM é um distúrbio que consiste na secreção insuficiente de insulina ou diminuição da sensibilidade periférica tecidual à insulina (HASSAN; LATIF; YACOUB, 2012), resultando na não utilização da glicose pelos tecidos e, conseqüente, hiperglicemia plasmática (ADA, 2009).

Considerada a quinta principal causa de morte no mundo (5,2 %), sua prevalência vem tomando projeções epidêmicas no decorrer dos anos. Em 2002, 173 milhões de pessoas apresentaram DM, em 2016 esse número cresceu para 387 milhões, e estima-se que no ano de 2040 haverão 642 milhões de acometidos no mundo (SBD, 2017; MILECH *et al.*, 2016). O Brasil apresenta-se em quarto lugar na classificação mundial entre os países com as maiores projeções epidêmicas de DM, em 2015 foram 14,3 milhões de pessoas com DM, podendo alcançar 23,3 milhões em 2040 (IDF, 2015; SBD, 2017).

O aumento exponencial do número de indivíduos acometidos pelo DM é atribuído à maior urbanização, à transição epidemiológica, ao envelhecimento populacional, à prevalência progressiva da obesidade, ao sedentarismo e, também, à maior sobrevida de pacientes com DM (MILECH *et al.*, 2016), gerando mundialmente gastos duas a três vezes maiores do que os providos para indivíduos sem DM. O custo mundial em 2015 foi de US\$ 673 bilhões com projeção para o ano de 2040 de US\$ 802 bilhões. No Brasil, o custo avaliado em 2015 foi de US\$ 22 bilhões, projetando-se US\$ 29 bilhões para 2040 (OGURTSOVA *et al.*, 2017; SBD, 2017).

O DM pode ser classificado de acordo com a sua etiologia em tipo 1, tipo 2 e gestacional. A forma mais prevalente é o tipo 2, responsável por 90% a 95% dos casos (ADA, 2014). O surgimento do DM2 guarda íntima relação com a predisposição genética e hábitos de vida inadequados, os quais resultam no desenvolvimento do quadro de resistência celular à insulina e, progressivamente, à produção insuficiente da mesma (MAZZINI *et al.*, 2013). A maioria dos pacientes com esta forma de DM é obeso, visto que a própria obesidade propicia o desenvolvimento da RI (ADA, 2014).

1.3 RESISTÊNCIA À INSULINA

A RI é caracterizada pela ineficácia da insulina em estimular a absorção e utilização de glicose pela célula devido à falha em sua sinalização intracelular, promovendo o comprometimento da utilização da glicose pelos tecidos periféricos como o músculo esquelético, tecido adiposo e músculo cardíaco. Como consequência, o nível plasmático da glicose mantém-se elevado, estabelecendo-se a hiperglicemia (PERRY *et al.*, 2014; SAMUEL; SHULMAN, 2016), que por sua vez, estimula a produção contínua de insulina, levando ao quadro de hiperinsulinemia e a exaustão das células beta pancreáticas (CERF, 2013).

Embora a fisiopatologia exata da RI não seja clara, alguns mecanismos são apontados no seu desenvolvimento (SESTI, 2006). Dentre estes, destacam-se a redução do número de receptores de insulina, diminuição de sua atividade tirosina cinase e, conseqüente, comprometimento da fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1 e 2), atenuação da ativação da proteína fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), redução da translocação dos transportadores de glicose e diminuição da atividade das enzimas intracelulares (ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010).

Fisiologicamente a via de sinalização da insulina é desencadeada pela ligação da insulina ao seu receptor na membrana celular, uma glicoproteína composta de duas subunidades- α e duas subunidades- β unidas entre si por pontes dissulfeto (OTTENSMEYER *et al.*, 2000). As subunidades- α formam os sítios de ligação da insulina, localizadas na superfície extracelular da membrana plasmática. As subunidades- β possuem um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular com atividade cinase por autofosforilação que estão associadas à estabilização do receptor na membrana (LEE *et al.*, 2014). A ligação da insulina às subunidades- α ativa o receptor causando a fosforilação da subunidade- β em múltiplos resíduos de tirosina (SIDDLÉ *et al.*, 2001). Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila substratos proteicos intracelulares em resíduos de tirosina, entre estas o IRS-1 possui seqüências de aminoácidos específicos que ao serem fosforilados, criam locais de ancoramento para proteínas contendo domínios com homologia à Src2, o SH2 (PIROLA; JOHNSTON; VAN OBBERGHEN, 2004; HIRSCH; COSTA; CIRAOLO, 2007). Como exemplo destas proteínas tem-se o receptor do fator de crescimento 2 (do inglês *Growth factor receptor-bound protein 2* - Grb2), a qual é fosforilada pela interação com o IRS-1 ou Shc, e está constitutivamente ligada a proteína trocadora de nucleotídeos (SOS)

(PESSIN; SALTIEL, 2000; HANKE; MANN, 2009). A SOS catalisa a substituição do GDP por GTP na proteína Ras, o que leva a transdução de sinal da família das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK). Dentre estas, as proteínas cinases Raf-1, MEK e ERK desempenham um papel importante na geração dos fatores de transcrição e promovem o crescimento, proliferação e diferenciação celular (SALTIEL; KAHN, 2001; BOUCHER; KLEINRIDDER; KAHN, 2014).

Dentre outras proteínas desta cadeia de ativação destaca-se a PI3K, importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e translocação do transportador de glicose (GLUT, do inglês *Glucose Transporter*) para a membrana plasmática permitindo a captação da glicose (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Os resíduos de tirosina fosforilados do IRS-1 medeiam uma associação com a subunidade reguladora de 85 kDa da PI3K que promove a ativação de sua subunidade catalítica de 110 kDa (SALTIEL; KAHN, 2001), resultando na fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol e levando a formação de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), o qual recruta a proteína cinase-1 dependente de fosfoinosítídeo (PDK1) (Figura 1) (HO; SRIRAM; DIPPLE, 2016).

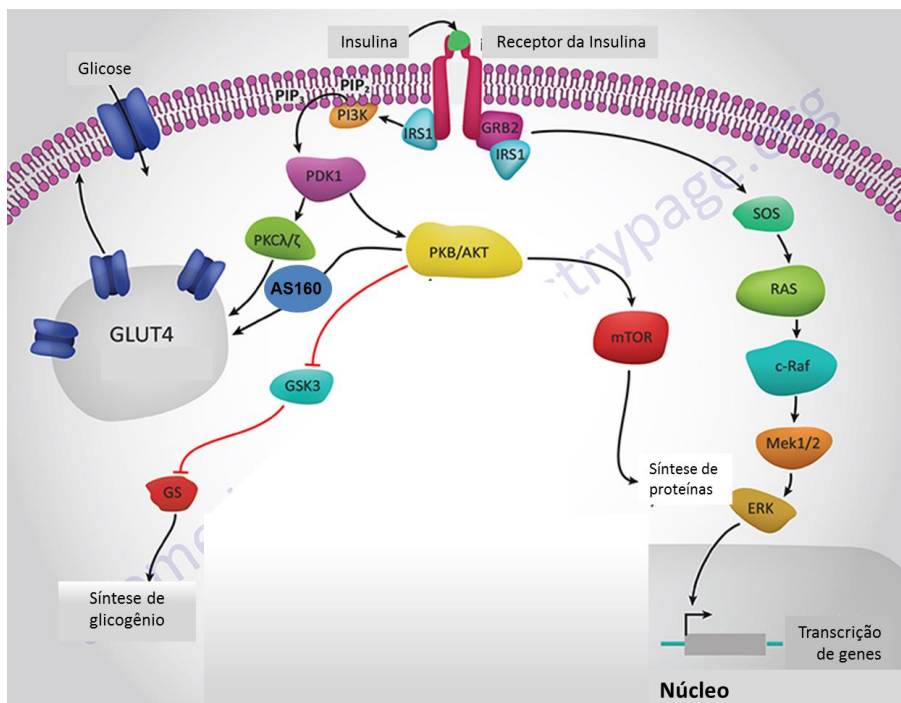


Figura 1: Via de sinalização da insulina. Fonte: Adaptado de themedicalbiochemistrypage.org

A PDK1 por sua vez fosforila e ativa muitos tipos de cinases, incluindo a proteína cinase serina/treonina B (PKB/Akt) e a proteína cinase C (PKC) Λ/ζ (PEARCE; KOMANDER; ALESSI, 2010). A Akt é uma proteína intermediária central para muitas ações metabólicas e de crescimento, identificada como uma das cinases responsáveis pela fosforilação e inativação da glicogênio-sintase-cinase (GSK3), o que diminui a taxa de fosforilação da glicogênio-sintetase (GS) aumentando sua atividade na produção de glicogênio (MORA *et al.*, 2005). A Akt por sua vez também fosforila seu substrato AS160, levando à sua redistribuição na célula e ativação das proteínas Rab, necessárias para a translocação das vesículas contendo GLUT-4 para a membrana plasmática (Figura 1) (ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010).

Dessa forma a sinalização da insulina consiste em uma sequência de eventos específicos e estritamente regulados que ocorrem após a ligação da insulina ao seu receptor, contudo, muitos fatores genéticos e adquiridos acabam induzindo a perda da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (CARVALHEIRA, ZECCHIN; SAAD, 2002). Entre estes fatores, o processo inflamatório crônico decorrente da obesidade caracterizado por elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e adipocinas está relacionado ao comprometimento da atividade tirosina cinase e indução da atividade serina/treonina no receptor de insulina e no IRS (DE LUCA; OLEFSKY, 2008; RIEHLE; ABEL, 2016), sendo este o defeito mais comum e evidente na cascata de sinalização da insulina (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). A fosforilação em resíduos serina/treonina do receptor e de seu substrato IRS por sua vez promove a inibição da ativação da PI3K, levando ao bloqueio da translocação do GLUT para membrana plasmática, e à supressão da transcrição gênica do IRS. Nesta condição fisiopatológica, observa-se o comprometimento de diversos processos fisiológicos dependentes da sinalização insulínica, tais como, captação e metabolização da glicose, síntese proteica, crescimento e sobrevivência celular (CZECH, 2017). A via PI3K/AKT também pode ser negativamente regulada por fosfatases como a homóloga da fosfatase e tensina deletadas no cromossomo 10 (PTEN) que inibe o segundo mensageiro PIP3, através da retirada do fosfato na posição 3 do anel de inositol (WIJESEKARA *et al.*, 2005).

Os mecanismos propostos para a supressão da fosforilação da tirosina e indução da fosforilação do receptor de insulina e seu substrato em resíduos serina/treonina são diversos e ainda não são completamente elucidados (RHODES, 2005). Entre os mediadores da fosforilação em resíduos serina/treonina tem-se a ação da PKC (STEINBERG *et al.*, 2006), do IKK (GAO *et al.*, 2002) e da c-Jun N-cinase terminal (JNK) (AGUIRRE *et al.*, 2000). Na obesidade e no diabetes, os elevados níveis plasmáticos de ácidos graxos livres (AGL)

aumentam a β -oxidação e resultam no acúmulo dos intermediários metabólicos diacilglicerol (DAG) e ceramidas que ativam as proteínas cinases serina/treonina (SHULMAN, 2000). O excesso de DAG induz a fosforilação de serina/treonina de IRS-1 em Ser307, devido à ativação de PKC e $I\kappa\beta$ (KIM *et al.*, 2004; CAI *et al.*, 2005); e as ceramidas inibem a sinalização tanto a nível do IRS quanto da Akt (Figura 2).. No IRS, o aumento da fosforilação dos resíduos de serina/treonina também pode ser desencadeado por outras cinases como p38, ERK, IKK e JNK (NANDIPATI; SUBRAMANIAN; AGRAWAL, 2017), enquanto que a Akt pode ser inibida por dois mecanismos: desfosforilação da Akt pela proteína fosfatase 2A (do inglês: *protein phosphatase 2* - PPA2) (UGI *et al.*, 2004) e inibição da translocação da Akt pela fosforilação mediada pela PKC no resíduo de treonina-34 (LU *et al.*, 2018). A JNK é membro da família MAPK que regulam a expressão gênica através da fosforilação e ativação dos fatores de transcrição c-JUN e ATF2, componentes chave da ativação da proteína-1 (AP-1) (LIU *et al.*, 2006). A JNK é ativada por fatores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , estresse do retículo endoplasmático (RE) e espécies reativas de oxigênio (EROS). Na obesidade a JNK é capaz de impulsionar a RI através da fosforilação inibitória direta dos IRS -1/2, bem como pela promoção da inflamação metabólica (SOLINAS; BECATTINI, 2016).

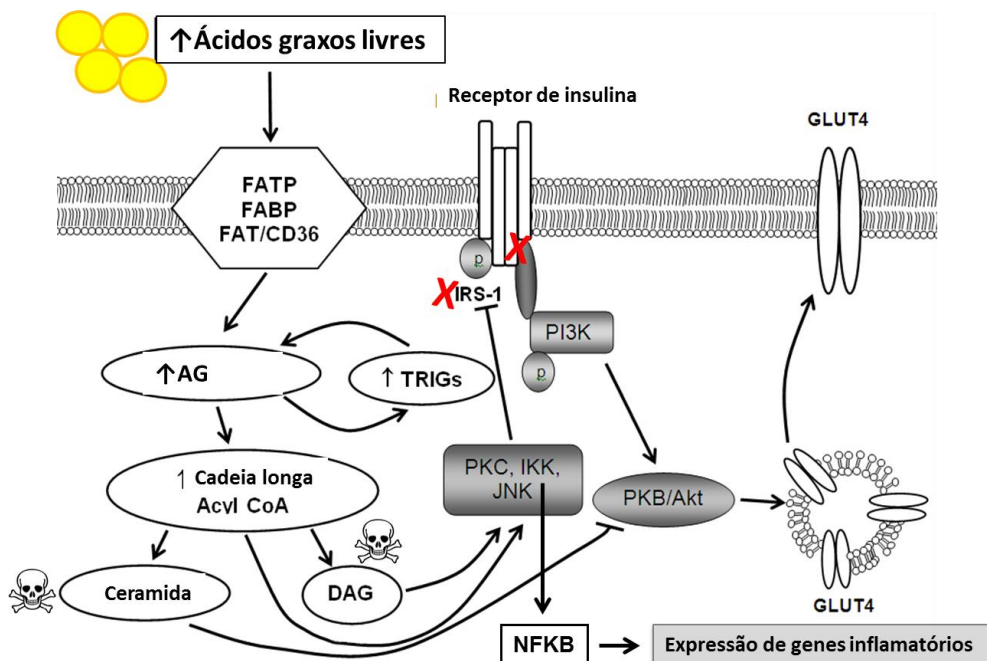


Figura 2: Via de resistência à insulina. Fonte: Adaptado de DONNER, D. G. *et al.* 2015.

A inibição direta do IRS-1 é induzida pela fosforilação do seu resíduo serina-307 (Ser-312 em humanos) localizado na porção C-terminal do domínio do ligante fosfotirosina (do inglês *Phosphotyrosine Binding*- PTB) pela JNK que interrompe a interação entre o domínio catalítico do receptor de insulina e o domínio PTB do IRS, bem como inibe a autofosforilação do IRS-1 em resíduos de tirosina (AGUIRRE *et al.*, 2000; 2002). Da mesma forma, o IRS-2 também é fosforilado pela JNK no resíduo serina 488 com consequências funcionais semelhantes (SHARFI; ELDAR-FINKELMAN, 2008). A JNK também induz a inflamação metabólica por estimular a ação de macrófagos inflamatórios (M1) que elevam os níveis de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo (PERRY *et al.*, 2015). Estas, por sua vez, promovem a RI agindo diretamente na sinalização da insulina dentro das células-alvo, ou indiretamente via estimulação da lipólise do tecido adiposo e consequentemente elevação dos níveis de AGL circulantes (SOLINAS; BECATTINI, 2016).

Além disso, o excesso de AGL circulantes decorrente da obesidade afeta diretamente o metabolismo celular ao ativar proteínas receptoras do grupo *toll* na membrana plasmática denominadas *Toll like receptors* (TLR) que levam à ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e proteína ativadora 1 (AP1) através do recrutamento de um conjunto de proteínas adaptadoras com domínio TIR (Fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88), TIRAP, TRAM e TRIF), resultando na ativação das vias inflamatórias JNK e IKK que interferem na captação de glicose pela sinalização da insulina (GAO *et al.*, 2004; DASU; JIALAL, 2010) e estimulam a expressão de genes relacionadas ao interferon tipo 1 (KIM; SEARS, 2010), indutor do perfil pró-inflamatório dos macrófagos residentes.

A ativação do complexo enzimático IKK (IKK α e IKK β) pode prejudicar a sinalização da insulina por duas formas: (i) Semelhante à JNK, a IKK ativada fosforila diretamente o IRS-1 em resíduos de serina, atenuando a atividade de tirosinas; (ii) Ativação de IKK leva a fosforilação do inibidor do fator nuclear κ B (I κ B α) que ao ganhar grupos fosfatos são formadas cadeias de poliubiquitinas que induzem a degradação proteossomal (HAYDEN; GHOSH, 2008). O I κ B α é um inibidor do NF- κ B e com a sua degradação ocorre um aumento da expressão de NF- κ B que desloca-se para o núcleo (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006) e liga-se ao DNA induzindo a transcrição gênica de mediadores inflamatórios (KEMPE *et al.*, 2005). Instala-se desta forma um sistema de retroalimentação positiva visto que citocinas pró-inflamatórias e o estresse do RE ativam I κ B α (HOUSTIS; ROSEN; LANDER, 2006). Neste ambiente hiperglicêmico e de RI, o estresse do RE acontece pela grande demanda na produção da insulina. Em consequência, tem-se uma sobrecarga da capacidade de dobramento do polipeptídeo pró-insulina, condição que altera a homeostase do RE e compromete seu

adequado funcionamento, levando à ativação da via UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*). Por sua vez, a ativação da UPR tem por objetivo reduzir a quantidade de proteína no lúmen do RE, aumentar a sua capacidade de dobramento através da regulação positiva de transcrição de chaperonas, induzir a morte das células beta e a degradação das proteínas mal dobradas (SCHEUNER; KAUFMAN, 2008), através da detecção e ativação de três componentes constitutivos transmembrana do RE: IRE (do inglês *Inositol-requiring enzyme*), PERK (do inglês *Protein kinase-like ER kinase*) e ATF6 (do inglês *Activating transcription factor 6*) que agem ora simultaneamente, ora sequencialmente para modular os genes de transcrição e tradução nas células sob estresse (HUMMASTI; HOTAMISLIGIL, 2010; BRAVO *et al.*, 2013).

Além disso, as proteínas dos IRS1/2 também podem ser negativamente reguladas pelas proteínas tirosina fosfatases, como a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) e a SHP2, desfosforilando o receptor de insulina e o IRS, prejudicando a transdução de sinal da insulina (ELCHEBY *et al.*, 1999; ZHANG, 2002; STOKER, 2005; YIP; SAHA; CHERNOFF, 2010). Proteínas supressoras da sinalização de citocina-1 (SOCS1) e 3 (SOCS3) também estão envolvidas com a inibição do receptor de insulina (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006), visto que a fosforilação acentuada do receptor e dos IRS1/2 em resíduos de serina/treonina predispõe à ubiquitinação e degradação dos IRS1/2 (KAWAZOE *et al.*, 2001) pelas proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS) quando ligadas ao complexo E3 ubiquitina ligase (do inglês *BC-containing E3 ubiquitin-ligase*) (ZHANG *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2015).

Além disso, o IRS-1 pode ser modificado pós-traducionalmente por O-Glicosilação com N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) em resíduos serina/treonina sob condições hiperglicêmicas (BALL; BERKAW; BUSE, 2006), ou por S-nitrosilação em consequência da geração de óxido nítrico na inflamação (CARVALHO-FILHO *et al.*, 2006). Estas modificações induzem a degradação proteasomal de IRS-1 e conseqüentemente a RI (BADAL; BROWN; RAGOOBIRSINGH, 2006).

1.4 RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE, DM E RI

Na última década, tornou-se cada vez mais evidente a relação entre a obesidade e a inflamação no desenvolvimento da RI. Inúmeros trabalhos revelam uma clara associação

entre a ativação crônica de vias de sinalização, liberação de agentes pró-inflamatórios no tecido adiposo, diminuição da sensibilidade à insulina na obesidade, síndrome metabólica e DM2 (SESTI, 2006; THOTA *et al.*, 2017).

A obesidade é caracterizada por um processo inflamatório crônico de baixo grau, com hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos, decorrente da maior estocagem de calorias sob a forma de triglicerídeos nos adipócitos (KONIGE; WANG; SZTALRYD, 2014). Os adipócitos hipertrofiados passam a requerer um suprimento maior de oxigênio, o que leva ao quadro de hipóxia, e conseqüentemente a ativação das vias de estresse celular (DE LUCA; OLEFSKY, 2008).

Inicialmente, os macrófagos residentes no tecido adiposo bem como o próprio tecido adiposo sofrem uma transformação fenotípica inflamatória, passando a secretar uma variedade de adipocinas, entre elas o TNF- α , resistina e IL-6, que induzem a quimiotaxia de novos macrófagos ao tecido, exacerbando a inflamação tecidual (HOSOGAI *et al.*, 2007; KOH; PARK; QUON, 2008; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014). Esse processo inflamatório, associado ao excesso de AGL resulta em um ciclo vicioso de inflamação e distúrbios metabólicos, resultantes do acúmulo ectópico de lipídios e seus subprodutos nos diversos órgãos reduzindo a sensibilidade à insulina e acarretando no quadro hiperglicêmico (CUSI, 2010; SNEI *et al.*, 2012).

Dentre as adipocinas inflamatórias, o TNF- α é a mais abrangente na obesidade. Produzida por células imunes e também por adipócitos e tecido muscular, o TNF- α age diretamente no adipócito, regulando o acúmulo de gordura e interferido em processos dependentes da insulina, como a homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídios, tendo como alvo a inibição da lipogênese e indução da lipólise (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). Estudos clínicos e pré-clínicos mostram que os níveis de TNF- α no tecido adiposo e sistêmico apresentam-se elevados no quadro de RI e DM (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995; XU; SETHI; HOTAMISLIGIL, 1999; MIRZA *et al.*, 2012). Adicionalmente, foi observado que camundongos *knock-out* para TNF- α ou para o receptor 1 do TNF (TNFR1) não desenvolvem RI causada pela ingestão acentuada de gordura na obesidade (UYSAL *et al.*, 1997; UYSAL; WIESBROCK; HOTAMISLIGIL, 1998).

A via de sinalização desencadeada pelo TNF- α inicia-se com a ativação do seu receptor, promovendo assim a estimulação da via de sinalização do NF- κ B, através da ativação do IKK, e fosforilação de I κ B, o qual se dissocia do NF- κ B, permitindo que o NF- κ B ative múltiplos genes envolvidos na inflamação, incluindo o próprio TNF- α (LAWRENCE, 2009). Ao ativar o IRS-1, o TNF- α induz a fosforilação dos resíduos de serina, reduzindo a transdução de

eventos mediados pela insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996; PERALDI; SPIEGELMAN, 1998), bem como ativa a ação da esfingomielinase causando a liberação de ceramidas da esfingomielina, que por sua vez inibem a fosforilação da Akt e a translocação do GLUT-4 (PERALDI *et al.*, 1996). TNF- α e interleucinas inflamatórias (IL-6 e a IL-1) podem atuar de maneira autócrina e parácrina promovendo a RI através da ativação das vias JNK e NF- κ B, interferindo na sinalização da insulina dos tecidos periféricos (CASTRO *et al.*, 2017).

Outra citocina inflamatória envolvida com vários fatores metabólicos, inflamatórios e hemostáticos é a leptina, uma adipocina produzida pelo tecido adiposo que se liga aos seus receptores no sistema nervoso central, induzindo a sensação de saciedade e promovendo o gasto de energia (SALTIEL; KAHN, 2001). Seus níveis séricos são diretamente proporcionais à massa total de tecido adiposo, encontrando-se elevados em indivíduos obesos que fazem uso de dietas ricas em lipídios, e/ou outras condições inflamatórias. A produção da leptina pode ser regulada por diferentes fatores, incluindo a ingestão de alimentos, níveis de insulina e hormônios esteróides (OTERO *et al.*, 2005). Na obesidade, o consumo excessivo de ácidos graxos saturados na dieta induz a superexpressão crônica da leptina levando ao quadro de resistência periférica de maneira semelhante a RI, desencadeada pelo estresse do RE (OZCAN *et al.*, 2009), ação da PTP1B envolvida na desfosforilação da JAK2 (KASZUBSKA *et al.*, 2002) e da SOCS3 inibidora da transdução de sinal (WUNDERLICH; HÖVELMEYER; WUNDERLICH, 2013). A resistência à leptina ocorre durante os estágios iniciais da obesidade e influencia incisivamente o metabolismo dos ácidos graxos musculares e a sensibilidade insulínica. A via de sinalização da leptina é similar à da insulina no hipotálamo, e ambos os receptores ativam as moléculas JAK2 e STAT-3 (SOUSA, BRÁS-SILVA; MOREIRA, 2009; MAIOR, 2012). Na RI e à leptina ambos os hormônios sinalizam ao hipotálamo a saciedade e o estoque energético alcançado. Os principais achados relacionados com a resposta inflamatória no hipotálamo são induzidos pelo excesso de ácidos graxos da dieta e pela ação dos hormônios pró-inflamatórios. A ativação de proteínas sensíveis à inflamação, como a JNK e a NF- κ B, reduz a sinalização da insulina e leva à transcrição de genes inflamatórios no hipotálamo, resultando no quadro de hiperfagia e ganho de peso (SANDE-LEE; VELLOSO, 2012). Cronicamente a resistência à leptina é capaz de modular respostas imunes inatas e adaptativas pela ativação de células T, monócitos, neutrófilos e pela indução de mediadores pró-inflamatórios (LA CAVA; MATARESE, 2004; MAYA-MONTEIRO; BOZZA, 2008).

A adiponectina é outra citocina produzida rotineiramente pelo tecido adiposo, e possui ações contrárias à leptina e outras adipocinas inflamatórias. A adiponectina possui ação

sensibilizadora da insulina, anti-inflamatória, antiaterosclerótica e protetora do endotélio (YANAI; YOSHIDA, 2019). Os níveis da adiponectina são inversamente relacionados ao índice de massa corporal (IMC), encontrando-se em níveis reduzidos na obesidade e progressão do DM2 (SCHERER *et al.*, 1995; MARQUES-VIDAL *et al.*, 2012). Esta adipocina reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, e a capacidade fagocitária de macrófagos ao produzir marcadores anti-inflamatórios (WOLF *et al.*, 2004). Em humanos, a redução dos níveis de adiponectina está diretamente relacionada à HAS (ADAMCZAK *et al.*, 2003), RI, hiperinsulinemia (WEYER *et al.*, 2001), síndrome metabólica e hiperlipidemia (MOHAN *et al.*, 2005). Além disso, citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-6, possuem atividade inibitória da transcrição do RNAm da adiponectina no tecido adiposo reduzindo a sua secreção (BRUUN *et al.*, 2003).

A resistina é outra adipocina que está potencialmente envolvida na associação da obesidade/DM por seu efeito pró-inflamatório. Secretada por células imunes humanas e pelo tecido adiposo em camundongos, seus efeitos ainda não são bem compreendidos, visto ser a adipocina descoberta mais recente. Contudo, estudos sugerem que a resistina afeta o metabolismo da glicose e a sensibilidade à insulina como um regulador negativo que reduz a tolerância à glicose (STUMVOLL; GOLDSTEIN; VAN HAEFTEN, 2005). Em humanos a resistina é uma molécula inflamatória produzida predominantemente por macrófagos (LAZAR, 2007), que promovem a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-6 e IL-12 (FERNÁNDEZ-REAL *et al.*, 2001).

Além da presença de citocinas inflamatórias, o aumento da hidrólise dos triglicérides circulantes por ação da lipase lipoproteica na obesidade, também é responsável por induzir a ativação da fosforilação de JNK, IKK, PKC e IRS-1 (SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008). O aumento do conteúdo lipídico nos tecidos periféricos resultante da elevada quantidade de ácidos graxos, inibem a captação e oxidação da glicose, a síntese de glicogênio e estimulam a gliconeogênese hepática, induzindo assim, o quadro da obesidade e RI (WESTPHAL, 2008; KISHORE *et al.*, 2006). O palmitato é um exemplo de ácido graxo que desempenha um papel particular na promoção da RI, uma vez que induz o estresse do RE, a produção de citocinas e ativação das vias JNK e NF- κ B através da sua hidrólise (KIM *et al.*, 2001; OZCAN *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2004).

O estresse oxidativo mitocondrial e a RI também estão intimamente relacionados. A sobrecarga na produção de radicais livres pelas mitocôndrias, de enzimas geradoras desses radicais (NADPH oxidase), e os reduzidos níveis de antioxidantes em adipócitos e células musculares esqueléticas, propiciam a instalação do estresse oxidativo (FURUKAWA *et al.*,

2017; YARIBEYGI *et al.*, 2018). A presença de biomarcadores (Malondialdeído, carbonilos proteicos, 4-hidroxi -2 - nonenal, hidroperóxidos, produtos de oxidação de proteínas, 3 - nitrotirosina, produtos finais de glicação avançada (AGEs), metabólitos de carboidratos e 8 - hidroxi - 2 ' - deoxiguanosina) são os sinais mais evidentes de dano oxidativo, reduzindo a sensibilidade à insulina, aumentando a RI nos tecidos periféricos (RAHMANTO *et al.*, 2010; FURUKAWA *et al.*, 2017), e consequentemente a desregulação na síntese das adipocinas (HOUSTIS; ROSEN; LANDER, 2006). O estresse oxidativo ativa várias vias da serina-treonina cinase, como IKK/NF- κ B e JNK, que por sua vez fosforila as proteínas IRS levando à sua degradação (EVANS; MADDUX; GOLDFINE, 2005), e permitindo uma relação mútua de ativação entre o dano oxidativo e a inflamação (ELMARAQBY; SULLIVAN, 2012; YARIBEYGI *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo bem como os AGL, e citocinas pro-inflamatórias ativam a expressão do gene *Nos2*, codificadora da enzima óxido nítrico sintase que produz a molécula óxido nítrico (do inglês *nitric oxide* - NO) (SUGITA *et al.*, 2005). Na via de sinalização da insulina, o NO reduz a atividade do receptor da insulina, IRS-1 e Akt, causando a s-nitrosilação de um resíduo específico de cisteína (YASUKAWA *et al.*, 2005; CARVALHO-FILHO *et al.*, 2005; 2006). Em um estudo prévio evidenciou-se que camundongos knockout para o gene *Nos2*, tornam-se protegidos contra a RI do músculo esquelético induzida pela obesidade devido à melhora da atividade PI3K-Akt (PERREAULT; MARETTE, 2001).

Os diversos estudos que buscam elucidar os mecanismos relacionados à RI possibilitam o avanço e a melhor compreensão sobre a obesidade, contudo deve-se destacar que a obesidade não está apenas associada ao aumento do risco de desenvolver DM, como também possui estreitas correlações com diferentes fatores de risco, tais como os cardiovasculares. A obesidade apresenta elevada associação com o aumento do risco de doenças como dislipidemias, cardiopatias e HAS, as quais lesionam o sistema vascular e favorecem a ocorrência de eventos cardiovasculares, em particular os coronarianos (DE SCHUTTER; LAVIE; MILANIA, 2014).

1.5 OBESIDADE & DM2: COMPROMETIMENTO CARDÍACO

1.5.1 Metabolismo cardíaco na obesidade & DM2

O coração é um órgão muscular que funciona como uma bomba, fornecendo oxigênio e nutrientes presentes no sangue para todos os tecidos do corpo. Devido ao seu trabalho mecânico contínuo, os miócitos cardíacos responsáveis pela contração, necessitam da produção constante de adenosina trifosfato (ATP) (BURTON *et al.*, 2014). Grande parte dos ATPs gerados pelos cardiomiócitos são obtidos da β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (60-90%) (STANLEY; RECCHIA; LOPASCHUK, 2005), e uma parcela menor pela oxidação da glicose, lactato, corpos cetônicos e aminoácidos (10-40%) (WISNESKI *et al.*, 1990; BUCHANAN *et al.*, 2005; LOPASCHUK *et al.*, 2010).

O metabolismo cardíaco é adaptável ao substrato disponível e aos fatores moduladores extracelulares para a produção de ATP (TAEGTMEYER *et al.*, 2004). O AGL é transportado pelo plasma em quilomícrons ou em partículas de lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês *Very low density lipoprotein* - VLDL) (STANLEY; RECCHIA; LOPASCHUK, 2005) para diversos tecidos. Os níveis circulantes de AGL estão elevados na hiperlipidemia plasmática. Estes AGL resultantes da hidrólise de triglicerídeos por ação da enzima lipase hormônio-sensível ativada por catecolaminas (LASS *et al.*, 2011) são responsáveis pela inibição da glicólise intracelular, tornando-se a principal fonte de energia para o miocárdio na resistência insulínica (WALL; LOPASCHUK, 1989; CARLEY; SEVERSON, 2005; GUO; GUO, 2017). Esta inibição devido à oxidação dos AGL em excesso leva ao aumento na [Acetil-CoA]/[CoA] e [NADH]/[NAD⁺] mitocondrial, ativando a enzima piruvato desidrogenase cinase, fosforilando três resíduos serina da subunidade α da piruvato desidrogenase, inativando-a (BHAGAVAN; HA, 2015). A inibição da piruvato desidrogenase compromete o metabolismo da glicose, resultando em acúmulo de citrato citosólico, aumento da glicose 6-fosfato e inibição da hexocinase (GARLAND; RANDLE; NEWSHOLME, 1963; HUE; TAEGTMEYER, 2009).

O transporte dos AGL através do sarcolema dos cardiomiócitos pode ser mediado por difusão passiva ou mediado pelo *cluster* de diferenciação CD36, a translocase de ácido graxo (VAN DER VUSSE; VAN BILSEN; GLATZ, 2000). Em quadros de RI e/ou DM2, os AGL são os substratos preferenciais para a oxidação, pois o CD36 localiza-se predominante no

sarcolema, enquanto que o GLUT-4 insulino dependente fica internalizado no meio intracelular (BATTIPROLU *et al.*, 2013).

No citoplasma do músculo cardíaco, os AGL são convertidos em Acil-CoA pelas acil-CoA sintetases presentes na membrana mitocondrial externa (WATKINS, 1997). Os acil-CoA formados na face citosólica da membrana mitocondrial podem ser utilizados na síntese de lipídeos de membrana no citoplasma ou serem transportados para o interior da mitocôndria e oxidados, produzindo ATP. Neste processo de oxidação mitocondrial, os ácidos graxos estão momentaneamente ligados ao grupo hidroxila da carnitina. A carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1) presente na membrana mitocondrial externa, medeia a conversão de acil-CoA em acilcarnitina de cadeia longa no espaço intermembrana, sendo, posteriormente, translocada para a matriz mitocondrial (MCGARRY; FOSTER, 1980; MCGARRY *et al.*, 1989; STANLEY; RECCHIA; LOPASCHUK, 2005). Na matriz mitocondrial, a carnitina é retirada e a CoA presente na matriz é adicionada ao ácido graxo, formando novamente a molécula de acil-CoA. A acil-CoA será oxidada na β -oxidação e o acetil-CoA resultante entra no ciclo do ácido tricarboxílico produzindo NADH e FADH₂, que entram na cadeia transportadora de elétrons para gerar ATP (STANLEY; RECCHIA; LOPASCHUK, 2005).

Contudo, a CPT1 é inibida pelo malonil-CoA, primeiro intermediário na biossíntese citossólica dos AGL e importante regulador da oxidação de AGL no coração. O malonil-CoA, o primeiro intermediário na síntese de AGL, é produzido pela acetil-CoA carboxilase e inibido pela malonil-CoA descarboxilase (DYCK *et al.*, 1998; HAMILTON; SAGGERSON, 2000). A proteína cinase ativada por AMP (do inglês *AMP-activated protein kinase* - AMPK) por sua vez regula os níveis de malonil-CoA, fosforilando o resíduo Ser219 da acetil-CoA carboxilase levando a inibição da sua atividade e, conseqüentemente induzindo o aumento da oxidação de ácidos graxos (WINDER *et al.*, 1997).

Dessa forma, dentro da célula os AGL competem com glicose como substrato energético e são convertidos em acetil-CoA que ativam as isoformas da PKC (PERSEGHIN; PETERSEN; SHULMAN, 2003), bloqueando a via de sinalização da insulina em quadros de hiperglicemia, estimulando a hiperinsulinemia e por sua vez a RI (POITOUT; ROBERTSON, 2002).

Os níveis plasmáticos de triglicerídeos persistentemente elevados induzem a uma acentuada lipólise que compromete a sinalização insulínica e ativa vias transcricionais, como a do PPAR- α /PGC-1 que aumenta a expressão de genes envolvidos na beta-oxidação dos AGL (BOUDINA; ABEL, 2007). A ativação do PPAR- α aumenta a expressão da enzima piruvato desidrogenase cinase 4 que induz a oxidação do piruvato à acetil-CoA através do

ciclo de Krebs e reduz a oxidação e captação da glicose, característica da RI (NIKOLAIDIS; LEVINE, 2004; BOUDINA; ABEL, 2007).

Concomitantemente, a ativação de PPAR- α aumenta a transcrição e expressão de genes como o CD36 e o FATP1 (do inglês *fatty acid transport proteins*) que são responsáveis pela internalização dos ácidos graxos, e a transcrição de genes como a malonil CoA descarboxilase, a qual degrada o malonil CoA liberando a carnitina palmitoil transferase-1, estimulando a captação mitocondrial de ácidos graxos (CAMPBELL *et al.*, 2002; BOUDINA; ABEL, 2007).

Deste modo, a menor captação e oxidação da glicose, mediadas pela diminuição da expressão e translocação do GLUT4 e pela alterada descarboxilação do piruvato (BELKE *et al.*, 2000), propiciam um aumento significativo da β -oxidação de AGL. Conseqüentemente, a excessiva β -oxidação resulta no acúmulo intracelular de intermediários tóxicos, como a ceramida e DAG, bem como a maior produção de EROs devido ao desacoplamento mitocondrial, gerando o estresse oxidativo e a diminuição da produção de ATP (ECKEL; REINAUER, 1990; KHULLAR *et al.*, 2010).

O acúmulo de metabólitos lipídicos, como ceramida e DAG, ativam serina-treonina cinases que acentuam o comprometimento da sinalização insulínica no miocárdio (DUNCAN *et al.*, 2007; LEWIN *et al.*, 2008; FINCK *et al.*, 2002) e, também, contribuem para a disfunção mitocondrial através do aumento intracelular das EROs (ECHTAY *et al.*, 2003; BOUDINA *et al.*, 2007; BUGGER; ABEL, 2008).

Sob condições fisiológicas, grande parte do oxigênio consumido na cadeia respiratória é utilizado na transferência de elétrons pela membrana mitocondrial, gerando um gradiente eletroquímico ao bombear prótons (H^+) resultantes dos equivalentes redutores (NADH e FADH₂) da matriz para o espaço intermembranar, e assim direcionados à ATP sintase (BUGGER; ABEL, 2008). Do consumo total de oxigênio, apenas 0,1% é retirado da cadeia para gerar EROs. No entanto, na hiperglicemia e RI o potencial eletroquímico gerado por esse gradiente de prótons é alta devido ao maior fluxo dos equivalentes redutores para a cadeia respiratória mitocondrial, oxidando o piruvato derivado da glicose e resultando na hiperpolarização da membrana mitocondrial interna (TESHIMA *et al.*, 2014). A hiperpolarização inibe o transporte de elétrons nos complexo, levando ao acúmulo de elétrons que serão utilizados para a geração de superóxidos (GALLOWAY; YOON, 2015; NISHIKAWA *et al.*, 2000).

Por sua vez, o estresse oxidativo aumenta a atividade da JNK cinase, reduzindo a sinalização insulínica no coração (RON; WALTER, 2007; LEBECHE; DAVIDOFF;

HAJJAR, 2008). Como fator agravante, tem-se a maior liberação de cálcio no citoplasma, resultante da instabilidade da membrana do retículo sarcoplasmático, levando à perda da homeostase de cálcio nos cardiomiócitos, com o comprometimento da mobilização deste íon agravada pela baixa atividade do trocador sódio-cálcio e da bomba cálcio ATPase do sarcolema. O aumento da concentração citosólica de cálcio, acentua a disfunção mitocondrial, reduzindo a produção de ATP por estas organelas (FALCÃO-PIRES; LEITE-MOREIRA, 2012; AROOR; MANDAVIA; SOWERS, 2012) e, ainda, induzindo a apoptose pela ativação das caspases (MANDAVIA *et al.*, 2013).

Portanto, a excessiva produção de ERO, o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e a perda da homeostase do cálcio no coração diabético e obeso induz várias complicações cardiovasculares, incluindo a disfunção cardíaca, induzida pela inflamação, apoptose e fibrose (DALLAK *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2012).

1.5.2 Inflamação cardíaca na obesidade & DM2

A obesidade e o DM2 são duas enfermidades associadas a um estado de baixo grau de inflamação crônica (KARELIS *et al.*, 2005), uma condição subclínica desenvolvida em decorrência aos distúrbios metabólicos, caracterizada por elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, células imunes infiltradas e AGL circulantes decorrentes da maior necessidade de oxidação de lipídios, levando a um estado de estresse oxidativo e maior produção de citocinas, resultando em uma inflamação local e sistêmica (BLUHER, 2016).

Na inflamação sistêmica, os elevados níveis das citocinas inflamatórias causam a RI, uma vez que reduzem a fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor e do IRS-1, e reduzem a ativação da PI3K e Akt, diminuindo a sinalização da insulina (JAGER *et al.*, 2007) nos tecidos periféricos e coração resultando na acentuação da inflamação miocárdica (GRUZDEVA *et al.*, 2013).

O NF- κ B representa um dos fatores transcricionais mais importantes do processo inflamatório, sendo o regulador primário das respostas inflamatórias. A sua ativação no coração está atrelada a exposição à TNF- α , AGL ou glicose (LORENZO *et al.*, 2011) e à liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e linfócitos T (FUENTES-ANTRAS *et al.*, 2014).

Além de induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α , IL-6, pró-IL1 β e pró-IL18, o NF- κ B induz também a expressão da Proteína da família NLR, contendo domínio pirina 3 (do inglês *NLR family pyrin domain-containing 3* - NLRP3) inflamassoma (FUENTES-ANTRÁS *et al.*, 2014). O inflamassoma NLRP3 ativado, ativa a caspase-1 a qual medeia o processamento da pró-interleucina-1 β e posteriormente a liberação de IL1 β , resultando na amplificação da resposta inflamatória com a mobilização de macrófagos e leucócitos para tecido cardíaco inflamado (LUO *et al.*, 2014; PAL *et al.*, 2017).

Dessa forma, a expressão de TLR4 (DONG *et al.*, 2012) e moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) torna-se mais acentuada, promovendo o aumento da migração de monócitos/macrófagos através do endotélio coronariano que por sua vez induz a ativação de macrófagos cardíacos residentes, polarizando-os em fenótipos pró-inflamatórios M1 sob o estímulo de elevados níveis de EROS e redução do NO, enquanto que a resposta anti-inflamatória de macrófagos M2 é reprimida (JIA; DEMARCO; SOWERS, 2016; JIA *et al.*, 2015).

O desenvolvimento da disfunção cardíaca associada à inflamação intramiocárdica pode ser explicada pelo fato de que o grande número de citocinas produzidas e liberadas durante o processo inflamatório pelas células de defesa aumentam a formação dos ânions peroxinitrito e superóxido mediados pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (CAVE *et al.*, 2006), os quais desempenham efeitos diretos na regulação da expressão da bomba de cálcio ATPase no retículo sarcoplasmático (FERDINANDY *et al.*, 2000; NIAN *et al.*, 2004) e indução da fibrose (LI *et al.*, 2000), contribuindo assim para a disfunção contrátil e a IC (WESTERMANN *et al.*, 2007).

1.5.3 Disfunção cardíaca na obesidade & DM2

A obesidade e DM2 estão intimamente associados à hipertrofia cardíaca, a qual é definida como o aumento da massa cardíaca, devido ao crescimento do miócito e/ou do tecido conjuntivo (PETER; BJERKE; LEINWAND, 2016), em consequência do remodelamento cardíaco estabelecido por uma resposta compensatória do miocárdio à maior carga de trabalho. A hipertrofia pode se desenvolver em situações fisiológicas e patológicas, a depender do estímulo oferecido. Quando associada à HAS, a hipertrofia apresenta elevada morbimortalidade nos obesos, devido à presença de arritmias ventriculares, disfunção

ventricular sistólica e diastólica, episódios isquêmicos e morte súbita (EBONG *et al.*, 2014; PATHAK *et al.*, 2015; LAVIE *et al.*, 2016).

Em 1983, um estudo investigou a associação entre a obesidade e a incidência de doenças cardiovasculares, realizado na cidade de Framingham nos Estados Unidos, o qual monitorou 5.209 participantes entre homens e mulheres durante 26 anos, demonstrando que a obesidade é um fator de risco importante e independente para a ocorrência de doenças cardiovasculares (MAHMOOD *et al.*, 2014), as quais podem evoluir para a IC e ter um curso fatal (ORTIZ; KWO, 2015).

Dentre as doenças cardiovasculares a doença arterial coronariana (DAC) é a principal causa de IC em pacientes obesos e diabéticos. Contudo, estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos realizados nos últimos anos evidenciaram que as disfunções metabólicas do DM podem afetar diretamente o miocárdio, gerando alterações estruturais e funcionais no coração independente da HAS ou da DAC (VOULGARI; PAPADOGIANNIS; TENTOLOURIS, 2010; FALCAO-PIRES *et al.*, 2012; KANDULA *et al.*, 2016). Esta lesão, conhecida como cardiomiopatia diabética (CD), foi descrita pela primeira vez por Rubler e colaboradores (1972) em um estudo *post mortem* realizado em quatro indivíduos diabéticos adultos falecidos em decorrência de IC. Nestes indivíduos, foram evidenciadas a presença de hipertrofia ventricular e fibrose miocárdica na ausência de DAC, HAS, doença valvar adquirida ou congênita, apresentando taxa de mortalidade de até 31% ao longo de uma década (DANDAMUDI *et al.*, 2014).

A CD é caracterizada por um dano ao miocárdio proveniente da disfunção metabólica associada à presença de hiperglicemia, hiperlipidemia, e hiperinsulinemia. Observa-se na CD alterações na ativação de fatores de transcrição nos cardiomiócitos e refletindo, consequentemente, na expressão gênica, alteração na utilização de substratos pelo miocárdio, hipertrofia ventricular, disfunção diastólica e/ou sistólica, formação de agentes oxidantes, disfunção endotelial, disfunção mitocondrial e fibrose intersticial (ISFORT *et al.*, 2014; VELEZ; KOHLI; SABBAH, 2014; JIA; DEMARCO; SOWERS, 2016).

Em um estudo de base comunitária monitorando 6814 pessoas sem DAC, realizado por 4 anos, foi evidenciado que os índices crescentes de síndrome metabólica estavam relacionados ao aumento do risco de IC (BAHRAMI *et al.*, 2008). No momento atual, o consumo desenfreado de carboidratos refinados, e especialmente de frutose, induzem a RI que por sua vez estimula a disfunção na produção de ATP cardíaco instalando o quadro da CD associado à vários fatores, entre eles a inflamação (MELLOR *et al.*, 2011).

Em estudo desenvolvido por Monnerat e colaboradores (2016) foi sugerido que o diabetes estimula a produção de IL-1 β por macrófagos residentes dos cardiomiócitos através da ativação do TLR2 e do inflamassoma NLRP3. Por sua vez, os níveis aumentados de IL-1 β levaram a redução da corrente de potássio (I_{to}) induzindo o prolongamento do potencial de ação e a maior liberação das faíscas de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático nos cardiomiócitos, o que causou a arritmia cardíaca.

Além da inflamação, quando a captação do AGL do miocárdio supera a capacidade oxidativa do coração, os AGL passam a se acumular na forma de triglicerídios intramiocárdicos, DAG, acil CoAs de cadeia longa e ceramidas, considerados deletérios para a função cardíaca devido à lipotoxicidade (FINCK *et al.*, 2002; USSHER, 2014).

Adicionalmente a estes processos, o dano proteolítico nos cardiomiócitos resulta na fibrose cardíaca. O aumento da deposição do colágeno é relacionado ao aumento da expressão do fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF- β 1) e do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), que impulsionam a produção de colágeno (CHIU *et al.*, 2008). Além disso, a desregulação na degradação da matriz extracelular (MEC), decorrente da reduzida expressão das metaloproteinases da matriz (MMP) contribui para o aumento da deposição de tecido conjuntivo nos corações diabéticos e obesos (WESTERMANN *et al.*, 2007; VAN LINTHOUT *et al.*, 2008). A fibrose cardíaca tem impactos significantes na estrutura e função cardíaca, levando à rigidez mecânica dos cardiomiócitos, perda da complacência e dilatação do miocárdio (CHATURVEDI *et al.*, 2010). Além disso, o aumento da deposição de MEC entre as camadas de cardiomiócitos pode interromper o acoplamento elétrico, resultando no comprometimento das contrações cardíacas e no aumento do risco de arritmias (PELLMAN; ZHANG; SHEIKH, 2016).

Estas alterações metabólicas que levam às anormalidades estruturais e funcionais do coração compõem o cenário da CD, caracterizada por uma disfunção diastólica precoce com perda da complacência ventricular, aumento do estresse de parede, seguidas do comprometimento sistólico, arritmias, fibrose, apresentando como desfecho final o quadro de IC (BOUDINA; ABEL, 2010; TRACHANAS *et al.*, 2014).

Não há um tratamento eficaz para a CD, e a abordagem terapêutica comumente utilizada tem visado à melhora dos sinais mais precoces do DM como a hiperinsulinemia e hiperglicemia, buscando prevenir o desenvolvimento de comorbidades. No entanto, já existem terapias em estágio de investigação experimental que visam à prevenção e progressão da CD, tendo como alvo o metabolismo alterado dos cardiomiócitos e a deposição de colágeno no miocárdio (SULAIMAN *et al.*, 2010). Entre eles pode-se evidenciar comumente o uso de

hipoglicemiantes orais como os inibidores da dipeptidil peptidase 4 (BOSTICK *et al.*, 2014), agentes indutores da glicosúria como os inibidores do cotransportador de sódio-glicose 2 (HABIBI *et al.*, 2017; HAMMOUDI *et al.*, 2017) e agonistas sintéticos do receptor de peptídeo semelhante a glucagon 1 (do inglês *glucagon-like peptide-1* - GLP-1) (HUYNH *et al.*, 2010; 2013). Um novo agente utilizado no tratamento da CD é o canabidiol, utilizado devido à descoberta de seus efeitos anti-inflamatórios (RAJESH *et al.*, 2010). Contudo, a única opção terapêutica definitiva e eficaz para pacientes com CD agravados pela IC severa é o transplante cardíaco, um procedimento de alto risco, de elevado custo, agravado pelo uso contínuo de imunossuppressores e cuja demanda por órgãos é maior que a oferta.

Neste contexto, a regeneração tecidual atribuída à ação das MSC e de seu MC em situações patológicas, tanto em ensaios pré-clínicos quanto clínicos, torna as MSC e o MC potenciais ferramentas terapêuticas a serem investigadas para o tratamento da IC decorrente da CD.

1.6 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (MSC)

As MSC são um grupo de células multipotentes presentes no estroma da medula óssea, do tecido adiposo e tecidos mesenquimais presentes em todos os órgãos do corpo, como coração, cérebro, pulmão e rim (NOMBELA-ARRIETA; RITZ; SILBERSTEIN, 2011). Estas células indiferenciadas são facilmente isoladas, apresentam potencial de auto-renovação, proliferação (MALAVER-ORTEGA *et al.*, 2012), e diferenciação em diversas linhagens celulares (ANISIMOV *et al.*, 2007; MUNDRA; GERLING; MAHATO, 2013).

Inicialmente as MSC foram isoladas da medula óssea por Friedstein e colaboradores em 1976, caracterizando-as como células capazes de formar unidades de colônia semelhantes a fibroblasto *in vitro*. Em 1991, Caplan definiu as MSC como células que davam origem a outras linhagens celulares diferentes à da sua origem. Em 2005, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (do inglês *International Society for Cellular Therapy* - ISCT) definiu as MSC atendendo aos critérios de serem plásticas aderentes quando mantidas em cultura; com potencial de diferenciação nas linhagens osteogênicas, adipogênicas, e condrogênicas *in vitro*; serem positivas para os marcadores de superfície CD105, CD73, CD90, e negativos para os marcadores

hematopoiéticos CD45; CD34; CD14/CD1b, CD79a/CD19 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006; WADA; GRONTHOS; BARTOLD, 2013).

Como resultado de mais de cinco décadas de investigação, as MSC emergiram como uma fonte celular versátil e frequentemente utilizada nos campos da medicina regenerativa e engenharia de tecidos (FITZSIMMONS *et al.*, 2018), devido à facilidade de isolamento e secreção de moléculas bioativas e microvesículas que ativam os processos de reparo tecidual e promovem a imunomodulação das células imunológicas inflamatórias (HSIAO *et al.*, 2013; CHOI *et al.*, 2015). Além disso, as MSC não apresentam a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade da superfície celular (MHC) de classe II e de moléculas coestimulatórias (CD80/CD86) de células T, o que evita a sua destruição pelo sistema imunológico do hospedeiro e fornece à MSC um estado imunoprivilegiado, visto a imunossupressão farmacológica não ser necessária (JAVAZON; BEGGS; FLAKE, 2004), tornando-as um atraente biofármaco para as inúmeras doenças degenerativas.

1.7 MECANISMOS DE AÇÃO DAS MSC NA REGENERAÇÃO CARDÍACA

As MSC derivadas da medula óssea são o tipo celular mais estudado no campo das doenças cardiovasculares, apresentando-se como uma promissora opção terapêutica (CAPLICE; GERSH; ALEGRIA, 2005), devido às suas características intrínsecas como por exemplo, auto-renovação, plasticidade e imunomodulação. Entretanto, como em todas as terapias celulares, a diferenciação *in situ* de MSC é um evento extremamente raro que não justifica os efeitos observados *in vivo*. O mecanismo de ação proposto de maior evidência é através de sua ação parácrina com a liberação de mediadores solúveis e microvesículas que transferem mRNAs, miRNA, DNA, proteínas e lipídios para células vizinhas, modificando o fenótipo e o microambiente (CAMUSSI *et al.*, 2011; NAWAZ *et al.*, 2014), propiciando a reparação e regeneração dos tecidos (COLLINO *et al.*, 2011; RANGANATH *et al.*, 2012).

Dessa forma, a terapia com MSC para doença cardiovascular evolui da premissa de que as MSC são capazes de recuperar o tecido danificado, através da ação dos mediadores parácrinos, visto promoverem o aumento da oxigenação tecidual (angiogênese) (KINNAIRD *et al.*, 2004), redução da fibrose (MOLINA *et al.*, 2009), inibição da apoptose (HE *et al.*, 2009), modulação do sistema imune (HAMID; PRABHU, 2017), mobilização de células tronco para os tecidos danificados (VAN LINTHOUT *et al.*, 2011), ativação dos progenitores

cardíacos endógenos e proliferação de cardiomiócitos (HATZISTERGOS *et al.*, 2010), promovendo assim a restauração da função celular, tecidual (remodelamento) e funcional (HELDMAN *et al.*, 2014).

A angiogênese ou capacidade das MSC em promover o crescimento de novos vasos sanguíneos é considerada um componente chave do seu potencial terapêutico nas disfunções cardíacas (COPLAND, 2011). As MSC secretam fatores angiogênicos (VEGF, FGF2, SDF1, ANG1, MCP-1, HGF) que induzem diretamente a sobrevivência, proliferação e migração de células endoteliais (TAO *et al.*, 2016), bem como, liberam microvesículas (> 200 µm) e exossomos (~ 50–200 µm) que induzem a angiogênese e a cicatrização em vários modelos experimentais, incluindo o infarto do miocárdio (BIAN *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015; TENG *et al.*, 2015). Em condições de condicionamento com hipóxia, os exossomos derivados das MSC humanas se adaptam ao microambiente de estresse, e produzem um número maior de proteínas associadas à angiogênese, respondendo à necessidade da sobrevivência tecidual (TENG *et al.*, 2015).

Além da angiogênese, as MSC têm um profundo impacto na sobrevivência das células locais. A liberação de um grande número de fatores pró-sobrevivência neutralizam os sinais pró-apoptóticos induzidos pela via extrínseca ou intrínseca, quando o miocárdio encontra-se em estresse oxidativo (WANG *et al.*, 2006) e isquemia (DEUSE *et al.*, 2009). Os fatores antiapoptóticos secretados pelas MSC (HGF, TGF-β1, VEGF, IGF-1, Sfrp2) têm mostrado grande impacto na redução da apoptose (MIROTSOU *et al.*, 2007), e o mecanismo de ação se dá pela ligação desses fatores aos receptores das células locais, ativando diferentes vias de sinalização como da MAP-cinase, PI3K-AKT e SMAD/STAT que promovem a sobrevivência e neutralizam os mediadores pró-apoptóticos (COPLAND, 2011).

Outra característica marcante das MSC que levou à investigação em diversas condições é sua propriedade imunomoduladora, seja através da secreção de fatores solúveis (PGE2, HLA-G5, IL1Rα, IL-10, NO e IDO) (SINGER; CAPLAN, 2011) ou pelo contato célula-célula (GUR-WAHNON *et al.*, 2007). O comprometimento da irrigação sanguínea no coração durante o quadro de isquemia leva à morte das células cardíacas, endoteliais, fibroblásticas e intersticiais, provocando uma intensa resposta inflamatória mediada por neutrófilos e macrófagos dentro da área infartada (ONG *et al.*, 2018). Às MSC são atribuídas diversas ações sobre o sistema imune. Estas células são capazes de bloquear a fase G0 / G1 do ciclo celular dos linfócitos B, inibindo a produção de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) e a diferenciação celular (KEATING, 2008). Também já foi demonstrado a capacidade destas células em inibir a proliferação das células dendríticas e tornando-as tolerogênicas (BIFARI *et*

al., 2008). Adicionalmente, demonstrou-se que as MSC também inibem neutrófilos, monócitos/macrófagos, reduzem a apoptose das células NK, induzem a proliferação de células T regulatórias supressoras (FIBBE; NAUTA; ROELOFS, 2007; NAUTA; FIBBE, 2007), reduzem a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IFN- γ (SOTIROPOULOU *et al.*, 2006) e aumentam a expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10, estimulando a transição de linfócitos T para um perfil Th2 (SEMEDO *et al.*, 2009).

No coração isquêmico, as MSC estimulam a apoptose de neutrófilos, o que reduz a liberação de mediadores citoplasmáticos prejudiciais ao tecido, a exemplo das EROS, evitando o recrutamento secundário de neutrófilos. De modo complementar, as MSC têm a capacidade de recrutar macrófagos para os locais de lesão (CHEN *et al.*, 2008) e estimular a transição na polaridade desses macrófagos proinflamatórios (M1) para o perfil anti-inflamatório (M2), tornando-os imunossupressores que secretam elevados níveis de IL-10 (MAGGINI *et al.*, 2010; EGGENHOFER; HOOGDUIJN, 2012).

Contudo, deve-se destacar que as MSC também podem desencadear uma resposta inflamatória, ou até mesmo atuar como células apresentadoras de antígenos, estimulando a resposta dos linfócitos TCD8⁺ e CD4⁺ (CHAN *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2008; FRANÇOIS *et al.*, 2009). Essa dualidade entre desencadear uma resposta inflamatória ou anti-inflamatória, resulta pelo contato das MSC aos sinais de ativação do microambiente aos qual está associada, sejam eles infecções ou lesões teciduais (KRAMPERA, 2011).

Durante a fase inflamatória inicial, macrófagos e células inflamatórias produzem uma variedade de citocinas e fatores de crescimento conhecidos como mediadores fibrogênicos (TGF- β 1; PDGF; FGF; TNF- α ; CTGF e MCP-1) que estimulam a proliferação e diferenciação fenotípica de fibroblastos cardíacos em miofibroblastos produtores de colágeno (MIAS *et al.*, 2009; BAUM; DUFFY, 2011), e aumentam a deposição da MEC (KRENNING; ZEISBERG; KALLURI, 2010). Os efeitos antifibróticos das MSC são mediados em parte pela redução na inflamação crônica e diminuição da apoptose celular. Esses mecanismos contribuem para uma modificação do microambiente, diminuindo assim a fibrose tecidual, aumentando a proliferação de células-tronco residentes e, conseqüentemente, à regeneração tecidual (USUNIER *et al.*, 2014).

Estudos recentes demonstram o efeito antifibrótico das MSC através de diferentes mecanismos. A liberação de fatores mediada pela ação parácrina das MSC, como o HGF, é capaz de atenuar significativamente a fibrose miocárdica evidenciada pela redução na expressão dos colágenos, MMP e inibidor de metaloproteinase (do inglês *tissue inhibitor matrix metalloproteinase* - TIMP) através da ativação das vias Akt, ERK e JAK/STAT

(SHABBIR *et al.*, 2009; 2010). O transplante de MSC pode reduzir a expressão de TGF- β 1 (WU *et al.*, 2013), associado à redução da fosforilação da proteína Smad-2 (LI *et al.*, 2013; UENO *et al.*, 2013), bem como a diminuição da expressão e concentração de CTGF evidenciando a redução da proliferação de células profibróticas, assim como a redução na migração, adesão de fibroblastos e deposição da MEC (FRANQUESA *et al.*, 2012; LINARD *et al.*, 2013).

Foi demonstrado também que as MSC secretam vários fatores quimiotáticos (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CX3CL1, CXCL5, CXCL8, CXCL10 e CXCL12) (CROITORU-LAMOURY *et al.*, 2007; NEDEAU *et al.*, 2008) que contribuem para a ativação e migração de células tronco progenitoras (TANG *et al.*, 2010) e de células progenitoras cardíacas para a área da lesão (HAIDER *et al.*, 2008; NAKANISHI *et al.*, 2008). Estas, por sua vez, promovem cicatrização e regeneração cardíaca, angiogênese e redução da área infartada (DAWN *et al.*, 2005; TANG *et al.*, 2010).

O contato célula-célula entre a MSC com a célula do tecido lesionado é outro importante mecanismo relacionado ao processo regenerativo mediado pelas MSC. Atribui-se a este mecanismo uma troca de organelas, como mitocôndrias, e outros componentes citoplasmáticos, como lipídios e proteínas, através de nanotúbulos de pequeno diâmetro que são projetados das MSC, conectando-se às células do tecido lesionado (VIGNAIS *et al.*, 2017). Numerosos estudos demonstraram que a transferência de mitocôndrias entre as MSC e as células dos tecidos danificados é um mecanismo chave para a regeneração tecidual, visto promover a modulação do metabolismo celular das células receptoras. A regulação da respiração celular pela mitocôndria e, conseqüentemente, dos níveis de ATP, bem como a redução do dano oxidativo, foram observadas em vários estudos *in vitro* em que as MSC foram co-cultivadas com células obtidas de tecidos lesionados (ACQUISTAPACE *et al.*, 2011; AHMAD *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2016).

Sob condições patológicas, as células na área afetada secretam fatores parácrinos levando a um gradiente parácrino que promove a atração das MSC em direção ao órgão afetado, através da expressão de receptores quimiotáticos pelas MSC e de sua interação com as quimiocinas do local (SHEN, 2007; LIU *et al.*, 2012), permitindo assim o processo de regeneração tecidual (GUNAWARDENA *et al.*, 2019). O contato célula-célula promove a liberação estável e sustentada de mediadores solúveis, incluindo o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), o fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e diversas interleucinas (IL-1, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15) pelas MSC para a célula lesionada (BOBIS, 2006).

1.8 USO TERAPEUTICO DO MC NAS DISFUNÇÕES CARDÍACAS

Similarmente às MSC, o MC apresenta potencial terapêutico promissor por consistir no conjunto de fatores bioativos (microvesículas, exossomos e fatores proteicos), liberado no meio de cultura pelas MSC durante a proliferação celular (OSUGI, 2012), considerado uma fonte rica em fatores parácrinos. Segundo dados da literatura dentre estes fatores os mais comumente encontrados no MC são o G-CSF (KIM *et al.*, 2014), VEGF, IGF-1 (SADAT *et al.*, 2007), HGF e SDF-1 (CHINNICI *et al.*, 2019).

Tem-se intensificado nos últimos anos os estudos acerca do uso terapêutico do MC em modelos experimentais de diferentes doenças, tais como acidente vascular cerebral (CHANG *et al.*, 2013; INOUE *et al.*, 2013), lesão da medula espinhal (CANTINIEAUX *et al.*, 2013), lesão pulmonar (SU *et al.*, 2019), lesão hepática aguda (XAGORARI *et al.*, 2013; DU *et al.*, 2013), e infarto do miocárdio (TIMMERS *et al.*, 2011). O racional teórico para esta investigação justifica-se uma vez que os fatores presentes no MC desempenham relevante papel no reparo e na regeneração tecidual através da modulação de diferentes vias de sinalização celular (MIROTSOU *et al.*, 2011; HARRELL *et al.*, 2019). Dentre as ações atribuídas ao MC relacionadas à regeneração tecidual apontam-se as ações antiapoptótica, antifibrótica, imunomodulatória, angiogênica e antitumorígenica (TIMMERS *et al.*, 2011; KOLOSA *et al.*, 2015; ALESSIO *et al.*, 2017).

Dentre as doenças cardiovasculares, o infarto do miocárdio é extensivamente investigado e diversos estudos propõem o uso dos fatores bioativos do MC para a promoção da regeneração estrutural e funcional do coração infartado. Os mecanismos envolvidos neste processo incluem a neovascularização (ESTRADA *et al.*, 2009), a modulação inflamatória e a ação antifibrótica pós-infarto (GNECCHI *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2010; KAMIHATA *et al.*, 2001), o reestabelecimento do metabolismo cardíaco (FEYGIN *et al.*, 2007), recuperação da contratilidade cardíaca (GNECCHI *et al.*, 2006) e a mobilização de células-tronco endógenas (WINDMOLDERS *et al.*, 2014). Estes efeitos foram atribuídos em parte à redução da sinalização do TGF- β 1 e da apoptose através da diminuição dos níveis da Smad 2 fosforilada e da caspase 3 ativada (TIMMERS *et al.*, 2007).

A capacidade antifibrótica do MC das MSC ainda não é completamente entendida, porém foi demonstrada por Ohnishi e colaboradores (2007) que o MC pode inibir a proliferação de fibroblastos cardíacos e atenuar a expressão dos colágenos tipo I e II, revertendo o remodelamento miocárdico após o infarto.

Outro efeito benéfico atribuído aos fatores bioativos liberados pelas MSC é o aumento do acoplamento excitação-contração nos cardiomiócitos ventriculares, resultando na melhora da contratilidade cardíaca. O aumento do transiente de cálcio (Ca^{2+}) e a aceleração no seu decaimento, podem ser explicados pela maior atividade da bomba de cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) por intermédio da ativação PI3K/Akt (DESANTIAGO *et al.*, 2012). As MSC liberam uma série de fatores de crescimento de ação paracrina, e seus efeitos são mediados pela via PI3K/Akt, possibilitando não só uma melhor contratilidade, mas também promovendo efeitos antiapoptóticos e maior sobrevivência dos cardiomiócitos ventriculares (DESANTIAGO *et al.*, 2012).

No coração infartado, os efeitos de reparo e regeneração são potencializados devido à liberação de moléculas associadas ao estresse celular pelos cardiomiócitos no microambiente da lesão, promovendo a superexpressão de fatores parácrinos e, conseqüentemente, a quimiotaxia de MSC transplantadas para o local da lesão (YU *et al.*, 2010).

Demonstrou-se que o coração infartado submetido ao tratamento com MSC apresentou elevados níveis de expressão de várias citocinas angiogênicas, entre elas o VEGF, angiopoietina-1 e 2, fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), HGF (BUSSOLINO *et al.*, 1992), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-B) (TAO *et al.*, 2016). Takahashi e colaboradores (2006) submeteram células mononucleares da medula óssea à condição de normóxia e hipóxia a fim de mimetizar o microambiente decorrente da isquemia cardíaca. Estas células em cultura foram capazes de secretar diversas citocinas (VEGF, IL-1, PDGF, e IGF-1), observando-se uma maior secreção destas em condição de hipóxia. Cardiomiócitos isolados enzimaticamente de coração de ratos adultos, quando cultivados na presença do sobrenadante obtido das células submetidas à hipóxia reduziram a apoptose e preservaram a capacidade contrátil. Os sobrenadantes destas células em normóxia ou hipóxia foram capazes de induzir angiogênese, redução da área fibrótica e melhora da função cardíaca em modelo experimental de infarto agudo do miocárdio quando administrados por via intramiocárdica associada à via intraperitoneal.

Baseado nas descobertas da capacidade benéfica exercida pelos fatores ativos liberados pelas MSC, Gneccchi e colaboradores (2005; 2006) induziram uma maior liberação de moléculas parácrinas por manipulação genética das MSC. A manipulação genética empregada por Gneccchi e colaboradores (2006) foi a superexpressão do gene Akt pelas MSC, as quais foram pré-condicionadas à hipóxia, produzindo um MC capaz de prevenir a morte de miócitos ventriculares isolados, através da redução da necrose e/ou apoptose por uma menor produção

da caspase 3, e assim a redução significativa no tamanho da área infartada (GNECCHI *et al.*, 2006).

Coletivamente, estes estudos com MC embasam a hipótese de que os efeitos terapêuticos das MSC se dão por meio de ação parácrina. Adicionalmente a liberação dos fatores bioativos solúveis, as MSC também secretam exossomos no MC que são de tamanho variável entre 30 e 100 nm que se originam após a fusão de endossomos com a membrana plasmática (LAI; CHEN; LIM, 2011), contendo numerosas moléculas bioativas (proteínas, lipídios, RNA mensageiro - RNAm e microRNAs - miRNAs) encapsuladas, responsáveis pela sinalização intercelular (GALLINA; TURINETTO; GIACHINO, 2015).

A utilização de exossomos purificados presentes no MC ganha destaque na regeneração miocárdica em diferentes ensaios *in vitro* e *in vivo*, atribuindo-se este efeito a modulação da inflamação cardíaca em condição isquêmica. Zhao e colaboradores (2019) demonstraram em modelo experimental de isquemia-reperusão que a administração de exossomos na borda da área de infarto induziu a modulação do perfil inflamatório de macrófagos M1 para M2 através da inibição de TLR4 no macrófago e ativação da via PI3K/AKT, importante para a modulação da polarização M2 (HUA *et al.*, 2007; VERGADI *et al.*, 2017).

Até o momento não há um tratamento específico no que tange as complicações cardíacas decorrentes da obesidade e do DM2 que apresentam, em quase sua totalidade, um curso fatal. Portanto, diante deste promissor cenário do efeito das MSC e/ou MC na regeneração do miocárdio em condições de isquemia cardíaca, torna-se pertinente a investigação acerca do efeito terapêutico das MSC e/ou MC sobre às disfunções cardíacas decorrentes do quadro de obesidade e diabetes que promova a regeneração do miocárdio, sendo a IC e a morte o desfecho da grande maioria dos pacientes acometidos.

CAPÍTULO 1

2 JUSTIFICATIVA

A obesidade possui uma estreita relação com o desenvolvimento de alterações estruturais e funcionais no coração. Estas anormalidades incluem arritmias, fibrose cardíaca, hipertrofia concêntrica (LAVIE *et al.*, 2008), disfunções diastólica (WANG *et al.*, 2015) e sistólica (CRENDAL *et al.*, 2013) do ventrículo esquerdo e hipertrofia excêntrica, agravando-se este quadro quando em associação com o DM2 e CD (ALPERT, 2001). O curso deste comprometimento cardíaco é debilitante, levando à IC e ao maior risco de morte súbita por mecanismos ainda não completamente elucidados (GAASCH; ZILE, 2011; ABEL; LITWIN; SWEENEY, 2008). Devido à eficácia limitada das drogas e das terapêuticas utilizadas na prevenção do remodelamento cardíaco e da progressão à IC em pacientes com obesidade e DM2, a única opção definitiva e eficaz descrita para estes pacientes com IC avançada é o transplante cardíaco, procedimento de alto risco, elevado custo, demanda muito maior do que a oferta, e que necessita do uso contínuo de imunossupressores. Neste cenário, a medicina regenerativa tem trazido novas perspectivas para o tratamento das cardiomiopatias, através de terapias celulares baseadas na utilização de fatores de crescimento (DALTRO *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2013; MACAMBIRA *et al.*, 2009), das MSC, e do MC (TAKAHASHI *et al.*, 2006). Contudo, apesar das evidências acerca dos efeitos benéficos das MSC sobre as anormalidades decorrentes do DM2 e da obesidade (LEE; HSIAO; LEE, 2017), e mais especificamente sobre a CD, ainda não estão elucidados os mecanismos de ação envolvidos na regeneração cardíaca. Por isso no presente estudo, investigaram-se os efeitos terapêuticos das MSC derivadas da medula óssea e do seu MC sobre as anormalidades cardíacas decorrentes da obesidade e do DM2 induzidos em camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica.

3 HIPÓTESE

A terapia celular baseada no transplante de células mesenquimais de medula óssea ou administração do MC obtido da cultura destas reverte as disfunções cardíacas e metabólicas decorrentes da obesidade e do DM2.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o potencial terapêutico das MSC e de seu MC no tratamento das disfunções cardíacas decorrentes da obesidade e do DM2 em modelo experimental, bem como os seus mecanismos de ação.

4.2 ESPECÍFICOS

Avaliar as alterações cardíacas em camundongos submetidos à ingestão de dieta hiperlipídica através de ensaios bioquímicos e funcionais cardíacos;

Avaliar o potencial terapêutico das MSC e do MC sobre as alterações bioquímicas e cardíacas associadas à obesidade e ao DM2 em modelo experimental *in vivo*.

Investigar os mecanismos de ação envolvidos no efeito das MSC e do MC sobre as disfunções decorrentes do uso prolongado da dieta hiperlipídica.

5 DESENHO EXPERIMENTAL

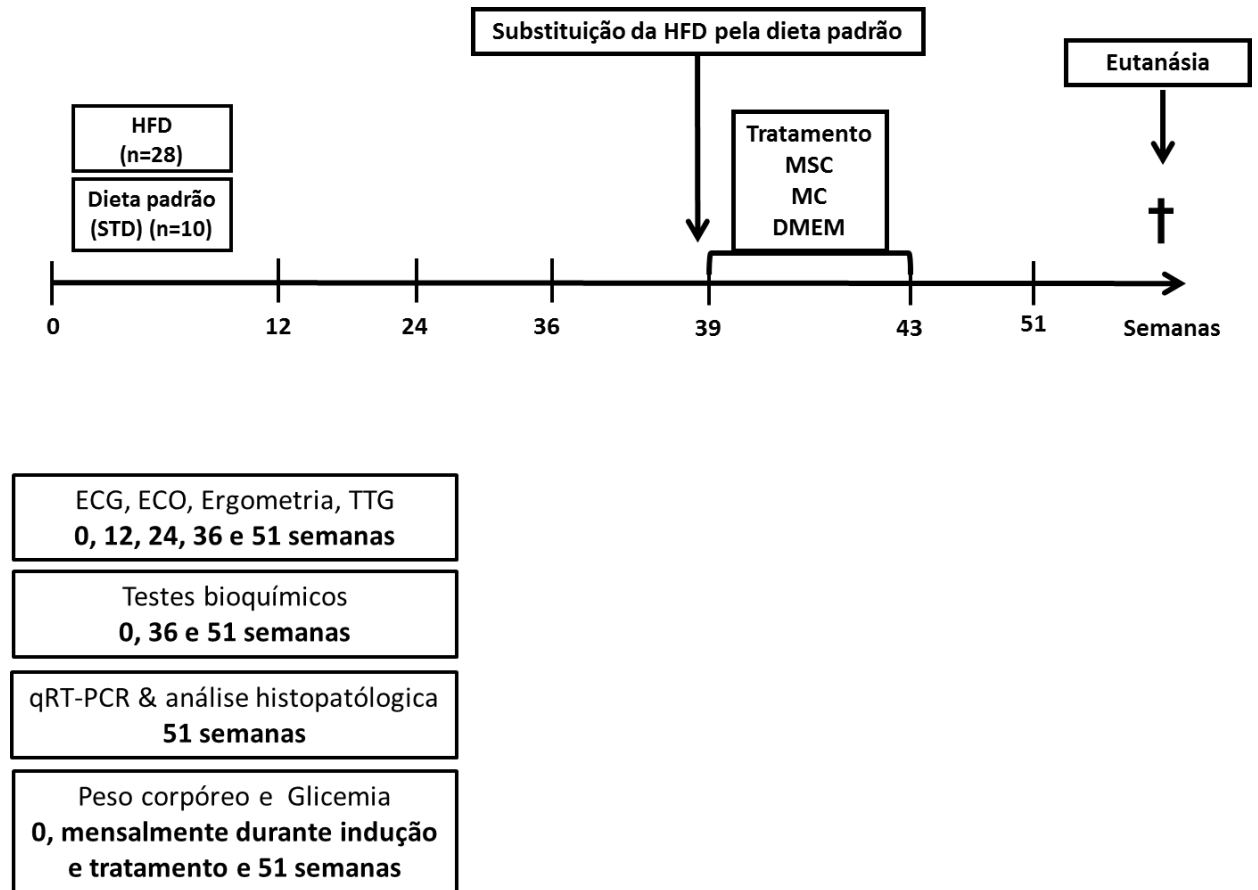


Figura 3 - Desenho experimental. Os animais foram monitorados durante todo o modelo experimental, inclusive no início do desenho experimental (0), antes da administração do tratamento (36 semanas) e com 8 e 11 semanas após o término dos tratamentos com MC e MSC, respectivamente (51 semanas). Animais foram eutanasiados em duas semanas ao fim da reavaliação pós-tratamento.

6 MATERIAL E METODOS

6.1 INDUÇÃO DA OBESIDADE E DM2

Camundongos C57BL/6 machos de seis semanas de idade (n=38) foram mantidos no biotério do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael (Salvador, Brasil), em temperatura constante (20 ± 2 ° C), umidade controlada (50%), acesso *ad libitum* à ração e água com exposição constante ao ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas. Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IGM/FIOCRUZ sob número de protocolo 017/2012.

Todos os camundongos foram alimentados com uma ração padrão durante as 6 primeiras semanas de idade. Em seguida os camundongos foram divididos em dois grupos: dieta padrão (STD; n=10) (Nuvital) e dieta hiperlipídica a base de gordura saturada de banha de porco (HFD; n=28) (Pragsoluções Biociências; Jaú - SP) por 36 semanas para indução de obesidade e DM2 (Figura 3). A composição das dietas é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição da HFD e da STD.

Dieta HF			Dieta ST		
	Gramas %	kcal%		Gramas %	kcal%
Proteínas	23,4	17,5	Proteínas	16,8	16,4
Carboidratos	33,2	24,69	Carboidratos	74,3	73,1
Gorduras	34,6	57,9	Gorduras	4,8	10,5
Total			Total		
Kcal/g	3,87	100	Kcal/g	4,07	100
Ingredientes			Ingredientes		
	Gramas %	kcal%		Gramas	kcal%
Matéria seca	95,7	0	Caseína, 30 mesh	228	912
Fibras	4,2	0	DL-metionina	2	0
Amido de milho	-	928	Maltodextrina 10	170	680
Sacarose	10,0	400	Amido de milho	835	3340
Óleo de soja	8,6	774	Sacarose	0	0
Banha de porco	24,7	2223	Óleo de soja	25	225
Mix mineral	4,6	0	Óleo de coco hidrogenado	40	360
Sódio	2,1	0	Mix mineral S10001	40	0
Potássio	4,60	0	Bicarbonato de Sódio	10,5	0
Cálcio	4,76	0	Citrato de Potássio, 1 H ₂ O	4	0
			Mix de Vitamina V10001	10	40
			Bitartarato de colina	2	0
			FD&C corante amarelo #5	0,1	0
Total	159.26	4325		1366.6	5557

Fonte: Modificado de Nuvital (<https://quimtia.com/pb/pais/brasil/>) e Pragsoluções Biociências (<http://www.pragsolucoes.com.br/>)

6.2 CULTURA E ISOLAMENTO DAS MSC E PREPARAÇÃO DO MC

As MSC de camundongos C57Bl/6 foram obtidas da medula dos fêmures e tíbias, com a inserção de uma seringa de 26G na cavidade do osso e lavagem com injeção de 5 mL de *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, EUA). As células obtidas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e ressuspensas em meio completo (DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 100 UI /ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (ThermoFisher Scientific), onde foram cultivadas e expandidas até a 8ª passagem. As culturas foram mantidas em estufa a 37° C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias, possibilitando a remoção das células não-aderentes da cultura. Ao atingir 90% de

confluência, as células aderentes à placa foram tripsinizadas (Tripsina-EDTA 0,05%; ThermoFisher Scientific) e transferidas para frascos de cultura contendo meio suplementado com SBF (10%) e Pen/Strep (1%). O MC foi preparado utilizando o sobrenadante das MSC na 4ª passagem, apresentando 80-90% de confluência. As células foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato-salino (PBS) e transferidas para um DMEM isento de soro, sem vermelho de fenol, suplementado com Pen/Strep durante 48 h. O MC foi colhido e concentrado 25x por centrifugação a 3.000 g durante 50 min a 20°C, utilizando o sistema de filtração Centriprep de 3 kDa (Millipore, Billerica, MA, EUA). O MC foi armazenado a -80°C até a utilização. Um meio de cultura sem células foi preparado sob as mesmas condições e utilizado como controle negativo.

6.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DIFERENCIAL DAS MSC

As MSC foram tripsinizadas, ressuspensas e lavadas duas vezes em solução salina a 0,9% a 3000 rpm por 2 minutos. As MSC (5×10^5 células) foram incubadas durante 5 minutos com anti-CD16/CD32 (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Posteriormente, as células foram incubadas durante 30 min com os seguintes anticorpos: Sca1-PE-Cy5.5 (Caltag Medsystems, Buckingham, UK), CD45-APC, CD11b, CD44-PE (BD Biosciences), CD29-APC e CD105-PE (BioLegend, San Diego, CA, EUA) ou seus isotipos controle, diluídos 1:100 em tampão PBS 1x com 1% BSA. Após incubação e duas lavagens com PBS 1x, foram adquiridos 50.000 eventos por citometria de fluxo (LSR Fortessa, BD Biosciences) e analisados através do software FACSDIVA (BD Biosciences).

Para avaliar o potencial de diferenciação das MSC, foi realizado o ensaio de diferenciação “trilinear” (adipogênico, osteogênico e condrogênico) com *kits* específicos, seguindo as instruções do fabricante (ThermoFisher Scientific). As culturas foram coradas com *Oil Red O*, *Alcian Blue* e *Alizarin Red S* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) para avaliar a diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, respectivamente.

6.4 CARACTERIZAÇÃO DO MC

O MC das MSC foi preparado e o conteúdo proteico foi caracterizado utilizando o *kit* Proteome Profile Array Mouse XL Cytokine Array (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) para a análise de 111 citocinas diferentes de acordo com as instruções do fabricante. A detecção foi feita por reação de quimioluminescência e quantificada por densitometria através do software ImageJ (NIH, EUA), e por analisador de *Protein Array* de Gilles Carpentier (2010).

6.5 TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS COM MSC E MC

Após 36 semanas de indução da obesidade e DM2, todos os testes bioquímicos e funcionais cardíacos foram repetidos e concluídos em duas semanas. Na 39ª semana a HFD foi substituída pela STD, e os camundongos obesos divididos aleatoriamente em três subgrupos, de acordo com o tratamento a ser administrado: (i) MSC (n=10): 5×10^5 células/camundongo ressuspendidas em 100 μ l de salina via veia da cauda, em 2 dias consecutivos; (ii) MC-MS (n = 10): 100 μ l de MC/camundongo em 3 ciclos com 3 dias alternados de administração i.v./ciclo e (iii) DMEM (n = 8): 100 μ l de DMEM/camundongo em 3 ciclos com 3 dias alternados de administração i.v. O intervalo entre cada ciclo foi de 9 dias (Figura 4). Os camundongos foram eutanasiados duas semanas após o término da reavaliação pós-tratamento, sob anestesia com cetamina (5%) (Vetanarcol; Konig S.A., Buenos Aires, Argentina) e xilazina (2%) (Sedomin, Konig S.A.).

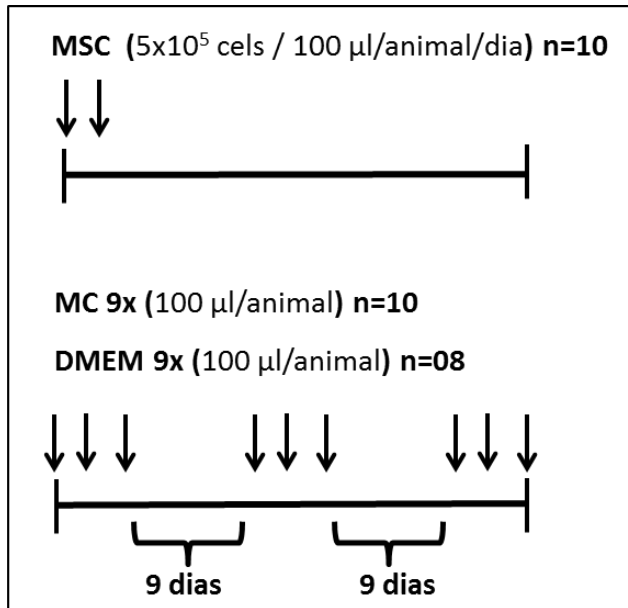


Figura 4 - Modelo terapêutico. Camundongos alimentados com HFD tiveram a ração substituída pela ração STD na 39^a semana experimental e foram divididos em três grupos: Tratados com MSC (Duas injeções i.v. pela veia da cauda, com um intervalo de 24 hs); Tratados com MC ou DMEM (100 µl i.v./animal em três cursos de três injeções em dias alternados, e intervalo de 9 dias entre cada ciclo).

6.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA E MURINOMÉTRICA

A indução da obesidade e do DM2 foi monitorada mensalmente através da medição do peso corporal e dos níveis de glicemia de jejum, além de uma avaliação trimestral da tolerância à glicose, com amostras sanguíneas coletadas da veia da cauda.

As medições individuais de peso foram realizadas com o auxílio de uma balança semi-analítica (Tepron – Equipment, São Paulo, Brasil). O teste de glicemia em jejum foi realizado 7 horas após a última ingestão alimentar, enquanto que o teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado após o jejum de 4 horas, injetando uma solução de glicose (Sigma) composta por 2g /kg de peso do animal, diluída em salina e administrada via intraperitoneal. Amostras de sangue da cauda foram colhidas no tempo inicial do teste (finalização do jejum), e em 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção de glicose. As mensurações glicêmicas foram realizadas utilizando um glicosímetro Accu-check (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Para a avaliação do colesterol total, amostras de plasma foram coletadas no período de pré-indução (T0), 36^a e 51^a semana do modelo experimental. As amostras de sangue foram coletadas, dispensadas em microtubos e centrifugados a 1000 rpm a 4°C por 10 min para a obtenção do

plasma, que foi armazenado a -80°C para posterior análise no LabMax 560 (LABtest Diagnostic SA, Lagoa Santa, Brasil), através do método colorimétrico enzimático.

6.7 ANÁLISE FUNCIONAL CARDÍACA

A avaliação da função cardíaca dos camundongos realizada trimestralmente incluiu a ecocardiografia (ECO), a eletrocardiografia (ECG) e o teste ergométrico. Para a realização do ECO e do ECG, os camundongos foram anestesiados com isoflurano inalado (0,5%) (Visual Sonics; Toronto, Canadá).

O ecocardiograma transtorácico foi realizado utilizando o ecossistema Vevo 770 (Visual Sonics) equipado com um transdutor de 30 MHz (modelo 707B RMV; Visual Sonics). Os camundongos foram posicionados em decúbito dorsal e mantidos em uma placa termoregulada a 37°C , possibilitando a obtenção das imagens em diferentes janelas acústicas.

A aquisição dos registros do ECG foi realizada utilizando a derivação bipolar I, obtido do Sistema PowerLab Bio Amp (PowerLab 2/20, ADInstruments, Castle Hill, Austrália), permitindo o registro de sinais biológicos em animais com isolamento elétrico completo. Todos os registros adquiridos foram analisados no Windows Chart 5 (PowerLab) e filtrados (1 a 100 Hz) para minimizar os ruídos do sinal ambiental a uma taxa de amostragem de 1 kHz.

Para avaliar a capacidade de realizar exercício físico do animal, utilizou-se uma câmara de acrílico com esteira motorizada (LE 8700, Panlab, Barcelona, Espanha), na qual a velocidade e a intensidade de choque (mA) foram controladas por um potenciômetro (LE 8700-treadmill control, Panlab), a fim de avaliar a capacidade física desses animais em realizar exercício. A temperatura ambiente média foi de $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após um período de adaptação de 30 min na câmara da esteira, os camundongos foram exercitados em 5 velocidades diferentes (7,2, 14,4, 28,8, 43,2 e 57,6 m/min), com aumentos iniciais de velocidade de 5 min e a partir da terceira velocidade 10 min de exercício em cada velocidade. A velocidade da esteira foi aumentada até que o animal não conseguisse mais sustentar a velocidade exposta e permanecesse mais de 10 s em uma grade de aço inoxidável eletrificada, a qual fornecia estímulo elétrico para manter os camundongos em movimento.

6.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os corações dos 38 camundongos foram removidos e divididos igualmente, de modo que a metade dos átrios e ventrículos foi usada para histologia, enquanto a outra metade foi usada para extração de RNA.

Os corações foram removidos e fixados em formalina tamponada a 10%. As secções cardíacas foram analisadas por microscopia óptica após a inclusão em parafina e microtomia, seguida de coloração com Sirius Red para avaliar a presença de fibrose. As imagens foram digitalizadas utilizando uma câmara de vídeo digital colorida (CoolSnap, Montreal, Canadá) adaptada ao microscópio BX41 (Olympus, Tóquio, Japão). As imagens foram analisadas usando Image Pro 7.0 (Media Cybernetics, San Diego, CA, EUA).

A análise cega foi realizada em 10 campos capturados por coração, identificando áreas de fibrose e evitando vasos sanguíneos (aumento de 200x). A porcentagem de fibrose foi estimada em cada campo utilizando o software Image-Pro Plus, onde a porcentagem da área vermelha foi comparada com as demais áreas do campo.

6.9 ANÁLISE QUANTITATIVA POR RT-qPCR

Corações foram removidos e utilizados para a extração de RNA, conforme descrito na seção anterior. O RNA foi extraído do tecido cardíaco com 1mL do reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) para 100 mg de tecido, e a concentração determinada por medição no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). O *kit high-capacity cDNA reverse transcription* (Thermo Scientific) foi utilizado para sintetizar cDNA a partir de 1 µg de RNA, de acordo com as recomendações do fabricante Thermo Scientific. A análise da expressão do RNA foi realizada através de PCR em Tempo Real usando o Taqman™ Universal PCR Mastex Mix (Thermo Scientific) e as sondas TaqMan para Adipoq (Mm00456425_m1), Tnf (Mm00443258_m1), Gata4 (Mm00484689_m1), Tgfb1 (Mm00441724_m1), Pparg (Mm01184322_m1), Mmp9 (Mm00442991_m1) Timp1 (Mm00441818_m1), Cx43 (Mm00439105_m1), Tnni (Mm00437164_m1), Socs3 (Mm 00545913_s1), Colla1 (Mm 00801666_g1), Igf1 (Mm004395 60_m1), Vegf (Mm 00437304_m1), juntamente com o SYBR™ Green PCR Master Mix. Todas as reações foram realizadas em duplicata no

equipamento de PCR em Tempo Real ABI 7500 (Applied Biosystems). As amostras foram normalizadas com GAPDH (controle endógeno), um controle sem amostra e outro sem a transcrição reversa também foram incluídos. O método do *threshold cycle* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) foi utilizado para analisar os resultados (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad versão 5 (San Diego, CA, EUA).

6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) para o número de animais em cada grupo. O teste t de Student foi utilizado para comparar as variáveis quantitativas dos dois grupos em um ponto. Quando dois ou mais grupos foram comparados, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada, seguida por Bonferroni pós-teste. A Diferença significativa considerada foi de $P < 0,05$. A análise estatística foi realizada com o software Graph Pad Prism 5.0. (San Diego, CA, EUA).

7 RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA CELULAR SOBRE AS ALTERAÇÕES CARDIACAS DECORRENTES DA OBESIDADE E DM2 EM MODELO EXPERIMENTAL

7.1.1 Caracterização das MSC e MC

As MSC de medula óssea foram submetidas com sucesso às diferenciações adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas (Figuras 3A-C), e foram caracterizadas por citometria de fluxo, com expressão dos marcadores celulares CD29, CD44, CD105 e Sca-1 na maioria das células, e baixa frequência dos marcadores de células hematopoiéticas CD11b e CD45 (Figura 3D). Através da análise do *protein array* foi possível detectar a presença de 19 citocinas, incluindo quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão e outras proteínas envolvidas na apoptose, inflamação e angiogênese (Figura 4).

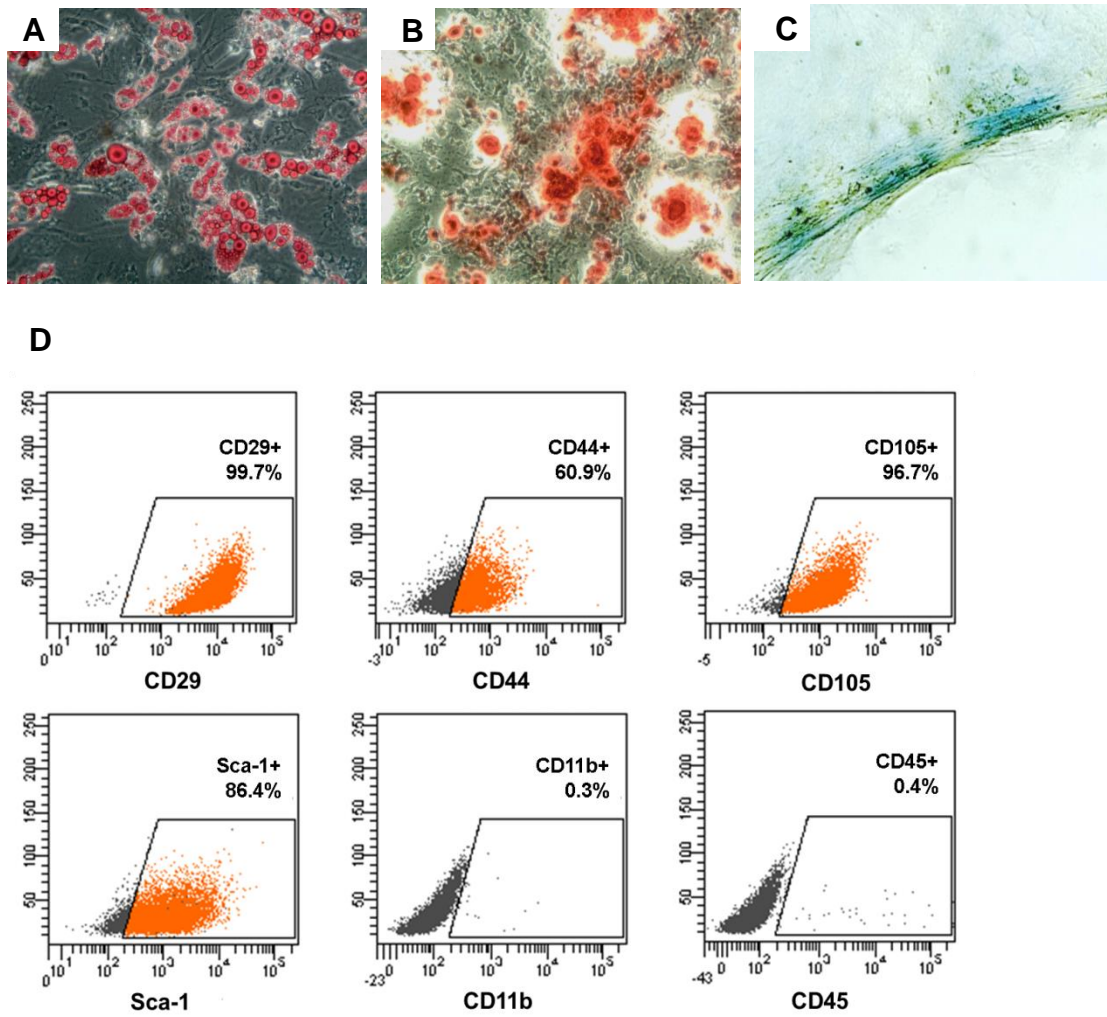


Figura 5 - Caracterização das MSC dos camundongos C57Bl/6. MSC foram positivas para a diferenciação em adipócitos utilizando o *oil red* (a), positivas para osteócitos com *alizarin red S* (b) e positivas para condrócitos com *alcian blue* (c). Análises no citômetro de fluxo mostraram que as MSC (8^a passagem) foram positivas para CD105, Sca-1, CD29 e CD44, e negativas para CD11b e CD45 (d).

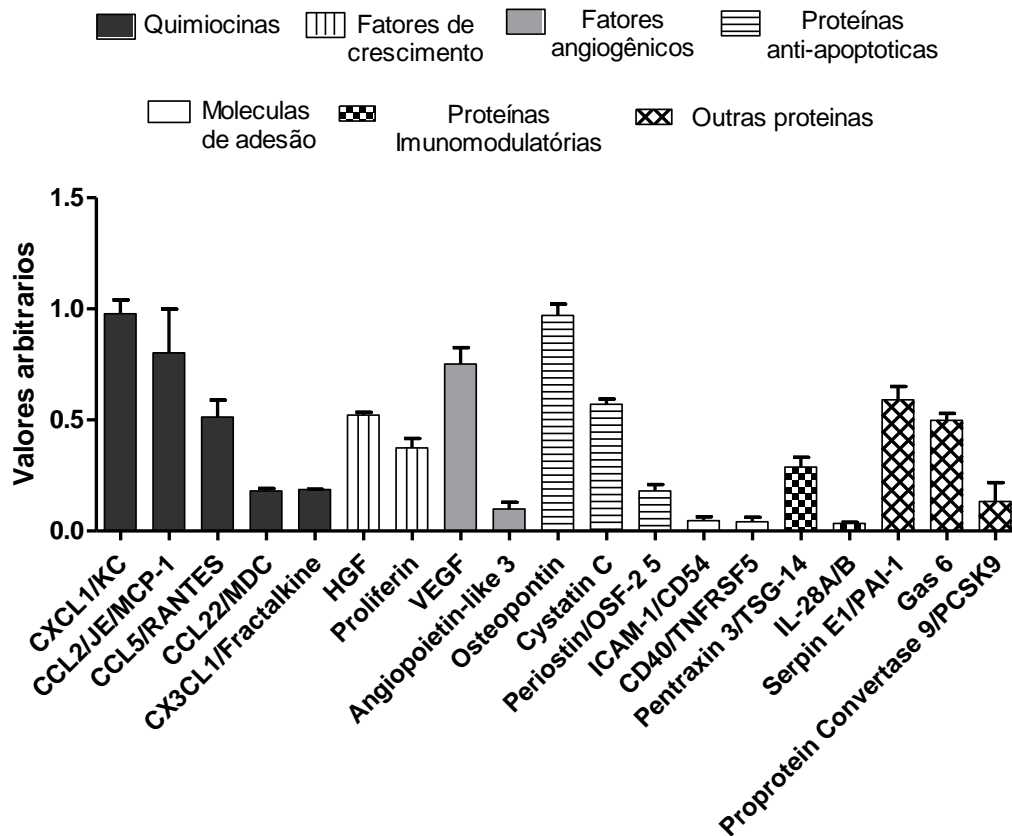


Figura 6 - Caracterização do MC por *protein array*. Análise das proteínas presentes no MC realizada através de um *kit* de detecção de até 111 proteínas com anticorpos de captura, incluindo citocinas, moléculas de adesão e fatores tróficos. A quimioluminescência das citocinas detectadas foi semi-quantificada avaliando a intensidade de cada *spot* em uma escala de cinza. A densidade de cada proteína é mostrada como média \pm SD de spots duplicados.

7.1.2 A remoção da HFD em camundongos obesos reduz o peso corporal, a glicemia em jejum, TTG e o colesterol total

Na 28ª semana de indução de obesidade e DM2 com a HFD, foi observado um aumento significativo do peso corpóreo, da glicemia em jejum, colesterol total (Figuras 5A-C) e do TTG (Figuras 6B), em comparação aos camundongos alimentados com a dieta STD. Diferenças estatisticamente significativas nos resultados do peso corpóreo e glicemia em jejum foram encontradas com 28 semanas de indução (Figuras 5A e B). Na 39ª semana, a HFD foi substituída pela dieta STD, enquanto os camundongos recebiam as administrações de MSC, MC ou DMEM. Na 40ª semana, independente do tratamento administrado, os grupos apresentaram uma considerada redução do peso corpóreo e glicemia em jejum. Oito e onze semanas após o término dos tratamentos (51 semanas), os níveis plasmáticos de glicose e de

colesterol foram reduzidos em todos os camundongos que, também, apresentaram perda de peso corpóreo, sem diferenças estatísticas significativas entre os diferentes grupos experimentais (Figura 5).

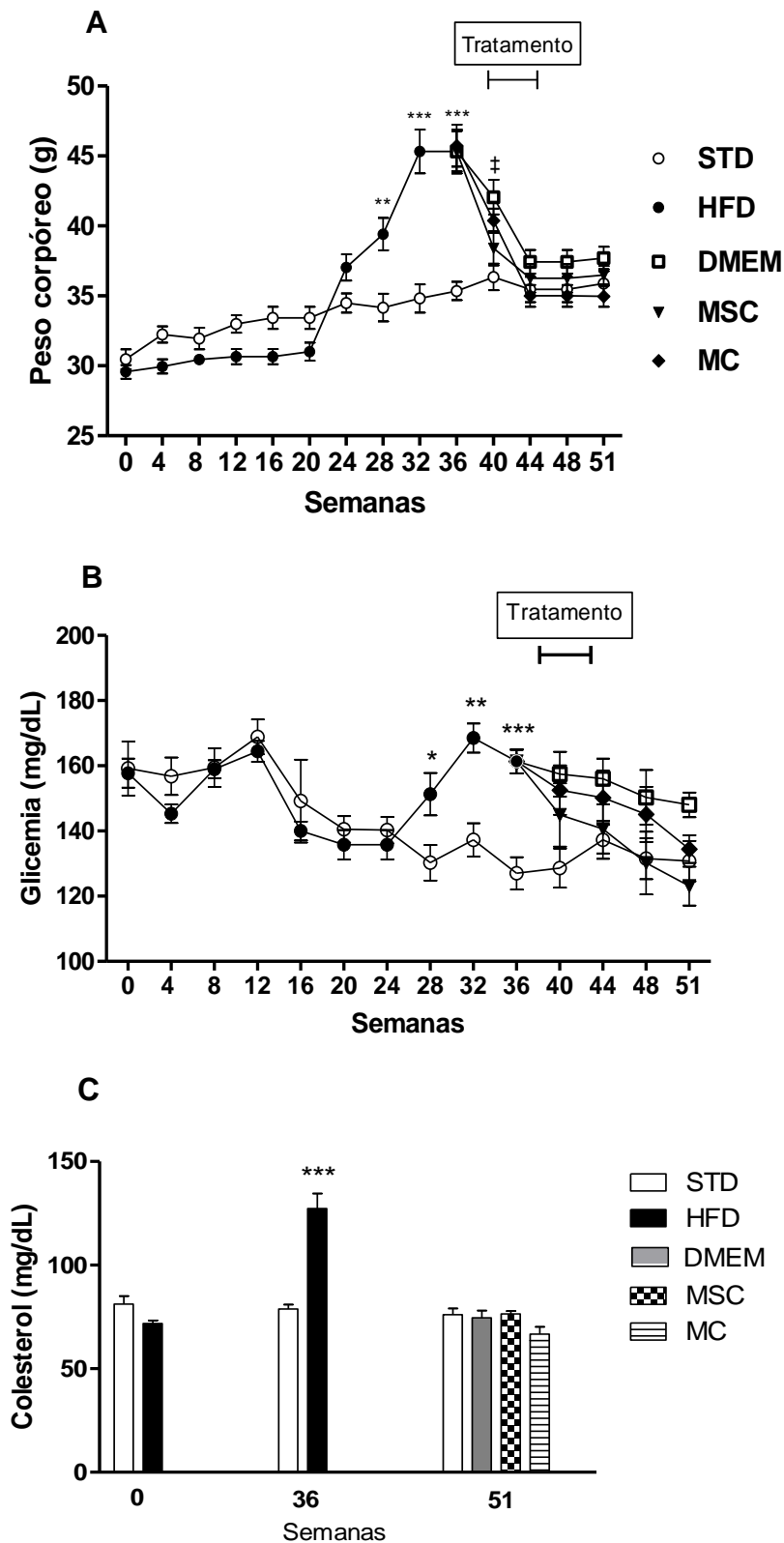


Figura 7 - Análise do peso corpóreo, glicemia em jejum e colesterol total. Peso corpóreo (a) e glicemia em jejum (b) foram mensurados mensalmente até o fim do desenho experimental (51 semanas). O colesterol total (c) foi avaliado no período basal, em 36 semanas de indução e com 51 semanas de experimento. Após a indução com a HFD, os camundongos tiveram a dieta substituída pela padrão e receberam os tratamentos com MSC ou MC, ou DMEM (39 semanas). Valores são expressos como média \pm SEM de 8 a 10 camundongos/grupo. Camundongos alimentados com dieta padrão (STD) vs. Alimentados com HFD, *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$. Camundongos alimentados com dieta padrão (STD) vs. Tratados com DMEM, † $P \leq 0.05$).

A HFD induziu intolerância à glicose, evidenciada na ausência na redução dos níveis de glicose plasmática para os valores iniciais da concentração glicêmica após 120 minutos da injeção intraperitoneal de glicose (Figuras 6A e B). A intolerância à glicose também foi revertida na 51ª semana, independentemente do tratamento (Figura 6C).

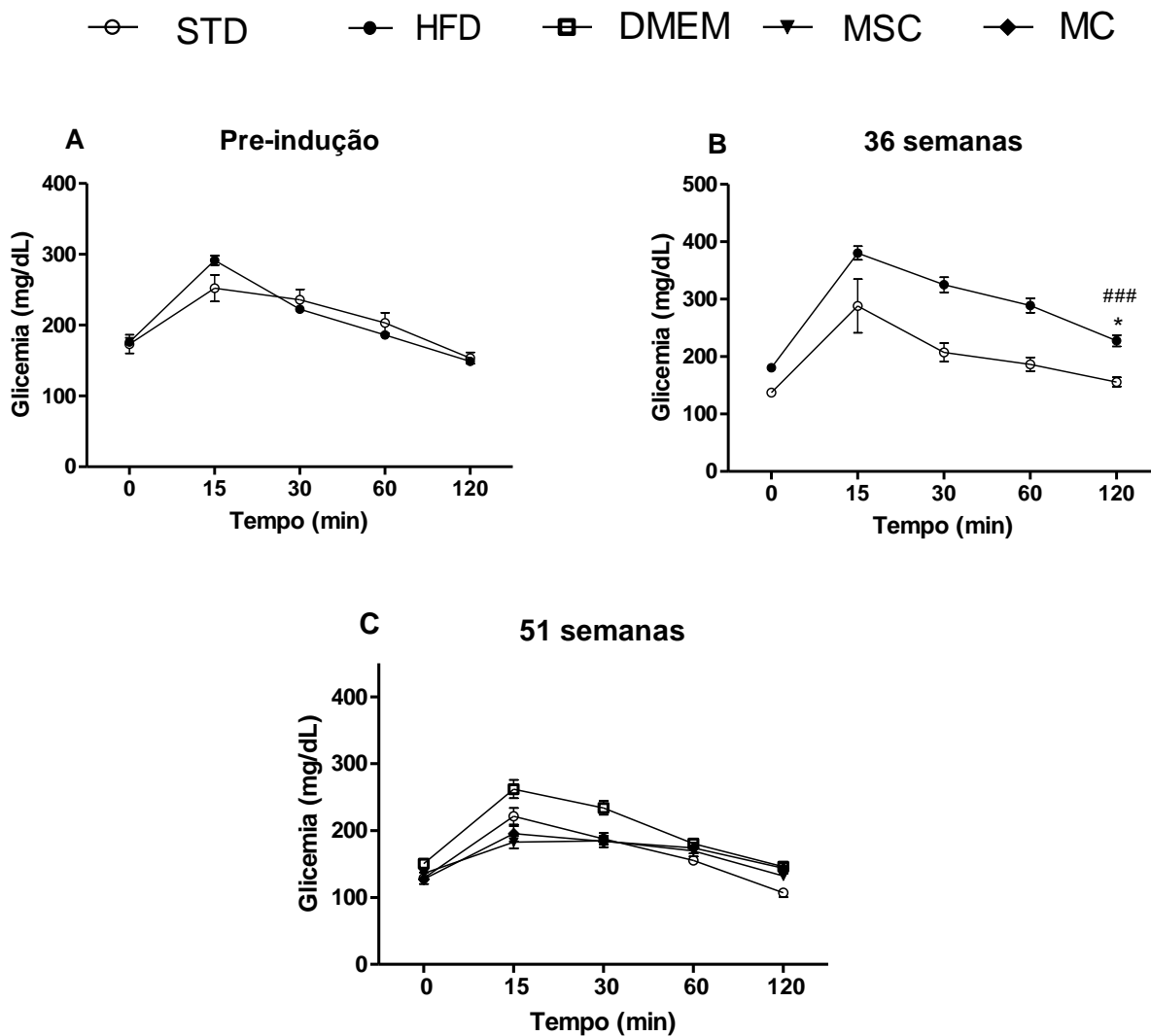
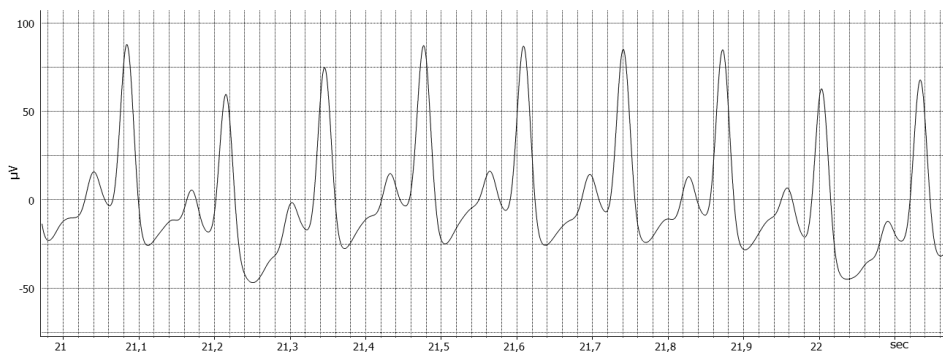


Figura 8 - Teste de tolerância à glicose (TTG). Glicemia foi mensurada do início (pré-indução ou tempo 0) (a) até a conclusão da 36ª semana de indução com a HFD (36 semanas) (b), e ao final de 8 e 11 semanas após o fim do tratamento com MC e MSC, respectivamente (51 semanas) (c). Após a indução, os animais com RI e obesidade, retornaram para a dieta padrão, recebendo MSC, MC ou DMEM como tratamento. (Valores são expressos como média \pm SEM de 8 a 10 camundongos/grupo. Camundongos alimentados com dieta padrão vs. Alimentados com HFD, * $P \leq 0.05$. HFD em 120 min vs. HFD no tempo basal ### $P \leq 0.001$).

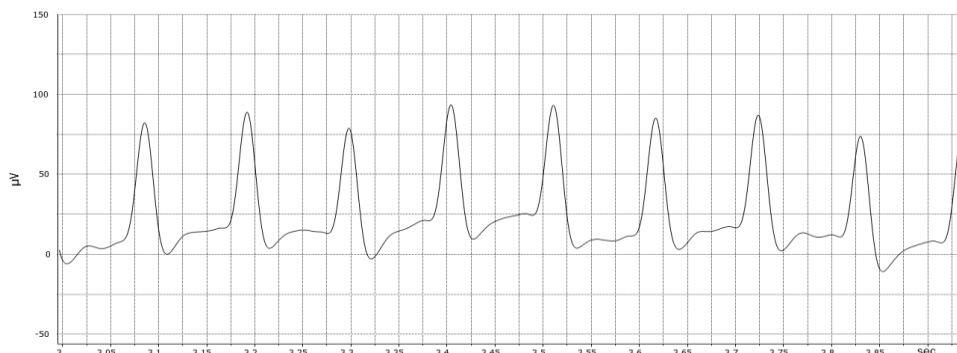
7.1.3 Administração das MSC e do MC revertem as alterações da função cardíaca em camundongos obesos

Após trinta e seis semanas de administração da HFD, camundongos obesos desenvolveram arritmias cardíacas de diferentes graus de gravidade, tais como, bloqueio atrioventricular de 1º grau e total, distúrbio de condução atrial ou ventricular, ritmo juncional (Figura 7B), bigeminismo ventricular, e taquicardia ventricular polimórfica, enquanto que nenhum distúrbio elétrico foi registrado nos camundongos alimentados com a dieta STD (Tabela 2, Figura 7A). A terapia celular reverteu as arritmias em 75% dos animais tratados com MSC e em 66,6% com MC (Tabela 2). Em contra partida, os camundongos alimentados com HFD e tratados com DMEM não apresentaram melhoras nas arritmias (Tabela 2, Figura 8).

A



B



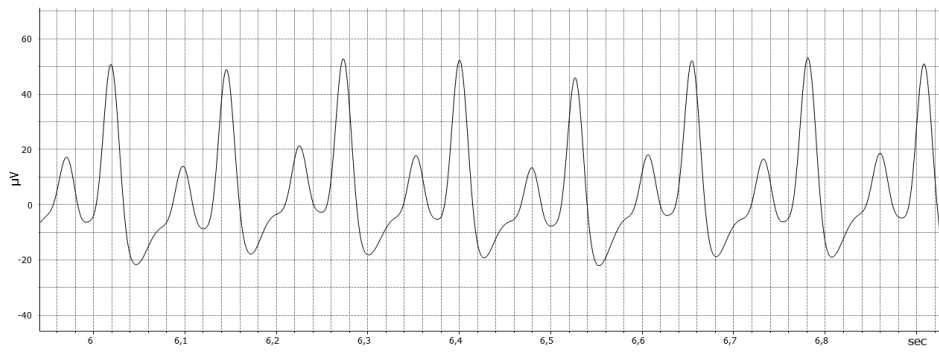
C

Figura 9 - Traçados eletrocardiográficos de camundongo tratado com MSC. No período basal os traçados demonstraram um ritmo sinusal normal (a), enquanto com 36 semanas de indução com a HFD foi observada a presença do ritmo juncional (b), e após tratamento com MSC, o coração volta a apresentar ritmo sinusal normal (c).

Tabela 2 - Presença de arritmias na 36ª semana de indução com HFD (pré-tratamento), após 8 semanas de tratamento com MC e 11 semanas de tratamento com MSC (51 semanas).

	Ritmo sinusal normal		BAV 1º grau		Distúrbio de condução atrial		Ritmo juncional		Distúrbio de condução ventricular		Bigeminismo Ventricular		Taquicardia ventricular polimórfica		Dissociação AV	
	Pré-trat	Pós-trat	Pré-trat	Pós-trat	Pré-trat	Pós-trat	Pré-trat	Pós-trat	Pré-trat	Pós-trat	Pré-trat	Pós-trat	Pré-trat	Pós-trat	Pré-trat	Pós-trat
STD (n=10)	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HF + DMEM (n=08)	2	1	-	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	-	-
HF + MSC (n=10)	2	8 *	1	1	1	-	1	-	1	-	2	-	1	-	1	1
HF + MC (n=10)	1	7 *	2	2	1	-	1	1	1	-	2	-	2	-	-	-

Fonte: Autor

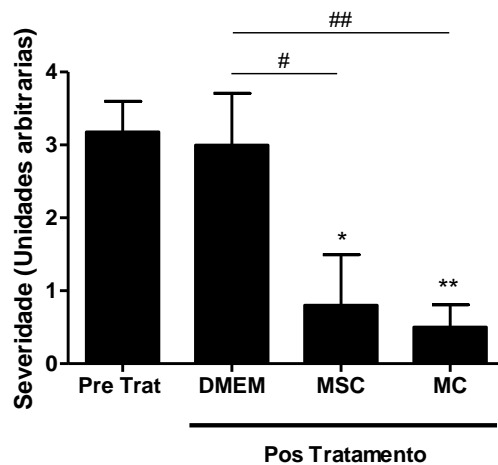


Figura 10 – Gravidade das arritmias. Distúrbios de condução cardíaca apresentados pelos camundongos, expressos em unidades arbitrárias em 36 semanas de indução (Pré-trat) e em 51 semanas (Pós-tratamento). Grau de severidade: 0, sem distúrbios de condução cardíaca; 1, bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau; 2, distúrbio de condução atrial; 3, ritmo juncional; 4, distúrbio de condução ventricular; 5, bigeminismo ventricular; 6, taquicardia ventricular polimórfica; e 7, dissociação AV. (Valores são expressos como média \pm SEM de 8 a 10 camundongos/grupo. Pré-tratamento vs tratados com MSC, pré-tratamento vs tratado com MC, * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. Tratados com DMEM vs tratados com MSC, tratados com DMEM vs tratados com MC, # $P \leq 0,05$; ## $P \leq 0,01$).

Ao final das 36 semanas de indução, camundongos obesos apresentaram uma redução significativa na distância percorrida durante o teste ergométrico quando comparados aos camundongos controles (Tabela 3). Contudo, a capacidade de realizar exercício físico foi parcialmente recuperada nos camundongos obesos tratados com MSC e MC, quando comparado ao grupo HFD em 36 semanas (Tabela 3). Os animais tratados com DMEM não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao período pré-tratamento (36 semanas). As avaliações cardíacas estruturais e hemodinâmicas realizadas por ecocardiograma não detectaram disfunções cardíacas (dados não mostrados).

Tabela 3 - Desempenho dos camundongos submetidos à atividade física em esteira ergométrica (Distância em metros) alimentados com dieta STD ou HFD.

	Pré indução	36 semanas	51 semanas
STD (n=10)	615±29.3	648±25.6	627±37.3
HFD (n=28)	668±20.0	317±15.8***.δδδ	-----
HFD+DMEM (n=08)	-----	-----	426± 21.3***, †††
HFD+MSC (n=10)	-----	-----	524± 30.8*.##
HFD+MC (n=10)	-----	-----	471±12.2 **.#. †

Valores são expressos como média ± SEM. Camundongos alimentados com HFD vs. camundongos alimentados com dieta padrão (STD), * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. Camundongos alimentados com HFD na 36ª semana vs. HFD no período de pré indução, δδδ $P \leq 0.001$. Camundongos alimentados com HFD na 36ª semana vs. Tratados com MSC e Tratados com MC, # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$. HFD no período de pré indução vs. tratados com DMEM e tratados com MC, † $P \leq 0.05$, ††† $P \leq 0.001$. Fonte: Autor.

7.1.4 MSC regulam os níveis de expressão de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição em corações de camundongos obesos

Em seguida, realizamos análises de RT-qPCR em tecidos cardíacos obtidos na 51ª semana após o início do estudo. A expressão gênica da adiponectina estava reduzida nos camundongos obesos tratados com DMEM, em comparação com os camundongos controles que receberam apenas a dieta STD (Figura 9A). O tratamento com MSC ou MC normalizou os níveis de expressão gênica da adiponectina a níveis semelhantes aos dos controles não obesos (Figura 9A). A expressão dos genes TNF α , VEGFa, TGF- β 1 e IGF-1 estavam aumentados nos corações dos camundongos obesos tratados com DMEM, comparados aos controles não obesos (Figuras 9B-E). O tratamento com MSC, mas não com o MC, reduziu significativamente os níveis de expressão gênica do TGF- β 1 e do IGF-1 (Figuras 9D e E). Além disso, os fatores de transcrição SOCS3 e PPAR γ foram significativamente aumentados nos camundongos que receberam DMEM e MC, mas não nos que receberam MSC, quando comparados ao grupo controle não obeso (Figuras 9F e G). Os níveis de transcrição de GATA-4 e conexina 43 foram significativamente reduzidos pelos tratamentos com MSC e

MC, quando comparados aos controles tratados com DMEM (Figuras 9H e I), enquanto que a troponina I foi modulada somente pela terapia com MSC (Figura 9J).

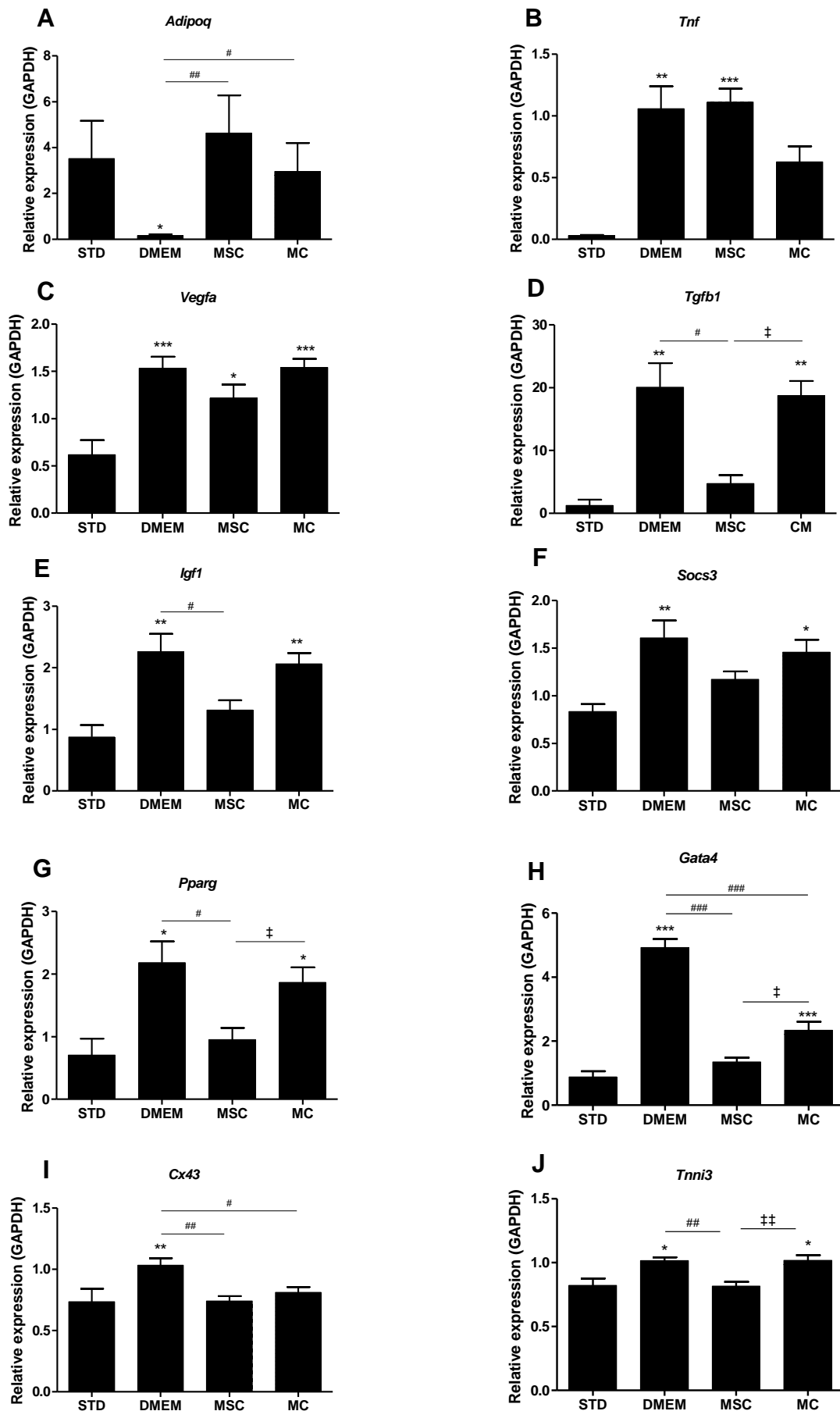


Figura 11 - Citocinas e fatores de transcrição por RT-qPCR em tecido cardíaco. Valores representativos de *Adipoq* (a), *Tnf* (b), *Vegfa* (c), *Tgf-β1* (d), *Igfl* (e), *Socs3* (f), *Pparg* (g), *Gata4* (h), *Cx43* (i) e *Tnni3* (j). Expressão obtida na 51^a semana do estudo. (Valores são expressos como média ± SEM de 7 a 9 camundongos/grupo. Camundongos alimentados com dieta padrão (STD) vs. Camundongos tratados * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. Tratados com DMEM vs. Tratados com MSC ou Tratados com MC, # $P \leq 0.05$; ## $P \leq 0.01$; ### $P \leq 0.001$. Tratados com MSC vs. Tratados com MC ‡ $P \leq 0.05$; ‡‡ $P \leq 0.01$).

7.1.5 Reversão da fibrose cardíaca induzida pela HFD após administração de MSC e MC

A presença de fibrose foi avaliada nas secções cardíacas dos camundongos obesos, e controles não obesos (Figuras 10A-D). Os camundongos obesos tratados com DMEM apresentaram uma maior porcentagem de fibrose cardíaca na 51^a semana quando comparados com os camundongos alimentados com a dieta STD (Figuras 10E). Tanto as administrações de MSC quanto as de MC promoveram uma redução significativa da fibrose nos corações dos camundongos obesos, quando comparados aos camundongos obesos tratados com DMEM (Figura 10E). A análise da expressão gênica no tecido cardíaco mostrou redução do colágeno tipo I pelas MSC e pela administração do MC, atingindo níveis semelhantes aos dos camundongos alimentados com dieta STD (Figura 10F). Finalmente, a expressão gênica de MMP9 e TIMP1, dois genes associados ao remodelamento da MEC, foram normalizados pelo tratamento com MSC, mas não pelo MC (Figuras 10G e H).

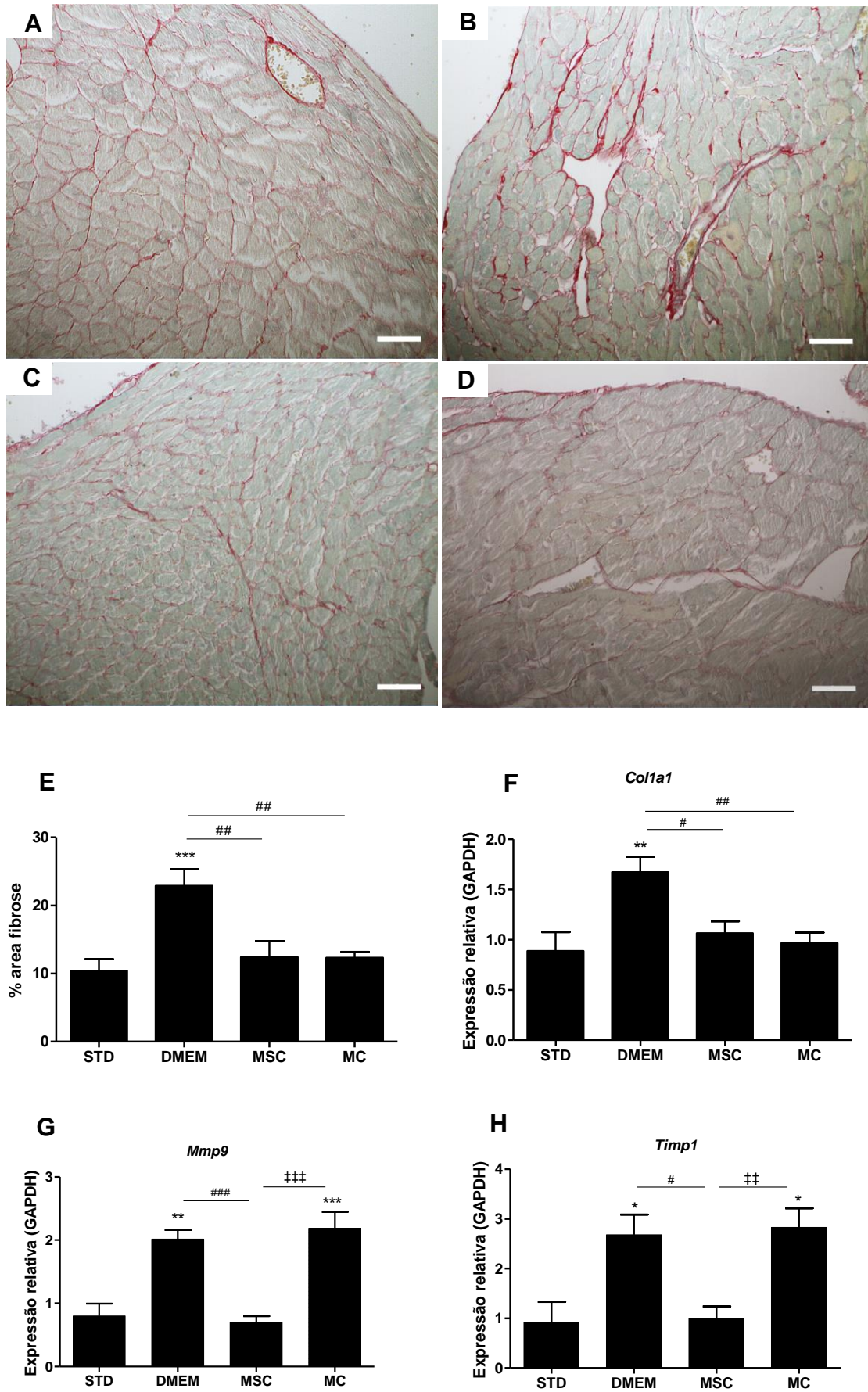


Figura 12 - Administração de MSC e MC reduz a fibrose cardíaca induzida por HFD. Seções cardíacas de camundongos alimentados com dieta padrão (STD) (a), camundongos obesos tratados com DMEM (b),

camundongos obesos tratados com MSC (c) e camundongos obesos tratados com MC (d). Barras de calibração = 50 μ m. Porcentagem de área com fibrose por análise morfométrica (e). Valores expressos em média \pm SEM de 8 camundongos/grupo. Expressão gênica relativa de *Coll1a1* (f), *Mmp9* (g) e *Timp1* (h) no coração. Valores expressos em média \pm SEM de 8 a 10 camundongos/grupo. Camundongos alimentados com dieta STD vs. Tratados com DMEM * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Tratados com DMEM vs. Tratados com MSC ou Tratados com MC # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$. Tratados com MSC vs. Tratados com MC ‡ ‡ $P \leq 0.01$; ‡ ‡ ‡ $P \leq 0.001$.

CAPÍTULO 2

8 JUSTIFICATIVA

As MSC compreendem aproximadamente 0,001-0,08% das células presentes na medula óssea (HAMOU *et al.*, 2009; PITTENGER *et al.*, 1999) e a sua mobilização para a circulação periférica após lesão já foi amplamente demonstrada (HAMOU *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010). No dano tecidual, as células lesionadas secretam fatores como HGF, EGF, VEGF, SFRP-4 (NGUYEN *et al.*, 2010; KATSHA *et al.*, 2011) que induzem a quimiotaxia das MSC da medula, bem como, das células tronco residentes no tecido para o local da lesão, contribuindo para a regeneração tecidual (HAMOU *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010). Diversos estudos demonstraram que as MSC são o tipo de célula-tronco adulta com maior potencial de reparo e regeneração tecidual através de uma ação parácrina (HORIE *et al.*, 2012; GNECCHI *et al.*, 2016). Os processos envolvidos na ação regenerativa das MSC incluem a regulação do remodelamento da MEC (NGUYEN *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2005), modulação da resposta imune (DAYAN *et al.*, 2011), proliferação e diferenciação local das células progenitoras (HATZISTERGOS *et al.*, 2010). Contudo, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nestes processos ainda não estão completamente elucidados.

As MSC e o MC possuem efeito terapêutico sobre as anormalidades cardíacas. Contudo, sugere-se que a ação das MSC é ainda mais eficaz o MC. Uma das possíveis explicações é que a MSC no microambiente da área de lesão promove uma secreção diferenciada de fatores de crescimento e citocinas em relação à observada em condições padrões de cultivo celular. Amiri, Jahanian-Najafabadi e Roudkenar (2015) demonstraram que o cultivo das MSC em condições de estresse aumenta a viabilidade celular. Em modelo experimental de fibrose pulmonar, o pré-condicionamento hipóxico das MSC induz a maior expressão de genes de fatores de crescimento ligados à pró-sobrevivência celular, antiapoptótico e antioxidante em detrimento de fatores inflamatórios e fibróticos, melhorando o quadro da fibrose pulmonar e a sobrevivência das MSC no local do enxerto (LAN *et al.*, 2015).

Neste estudo, visou-se investigar os mecanismos de ação das MSC relacionados à melhora do comprometimento cardíaco decorrentes da obesidade e DM2 descritos anteriormente, através da determinação da expressão gênica de fatores relacionados a

modulação do desenvolvimento da fibrose, apoptose e sobrevivência celular. Optou-se por cultivar as MSC em condições padrões, uma vez que no estudo prévio o protocolo experimental foi baseado no tratamento dos camundongos obesos/DM2 com MSC cultivadas em condições padrão.

9 HIPÓTESE

O potencial terapêutico das MSC sobre as disfunções cardíacas decorrentes da obesidade e do DM2 é mediado por modulação da expressão de fatores relacionados ao desenvolvimento da fibrose, à apoptose e à sobrevivência celular.

10 OBJETIVOS

10.1 GERAL

Avaliar os mecanismos celulares envolvidos na ação das MSC sobre as disfunções cardíacas decorrentes da obesidade e do DM2 em modelo experimental.

10.2 ESPECÍFICOS

Avaliar alterações bioquímicas e funcionais decorrentes do uso prolongado de dieta hiperlipídica em modelo experimental de obesidade e DM2 .

Investigar os mecanismos celulares envolvidos no efeito terapêutico das MSC no coração em modelo experimental de obesidade e DM2.

11 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental consistiu na utilização de camundongos C57Bl/6 machos, submetidos à indução da obesidade e DM2 através do consumo da HFD (n=14) a base de gordura hidrogenada de óleo de palma (Pragsoluções, SP) e camundongos alimentados com dieta STD (Nuvital) como controle (n=8) (Tabela 4). Os camundongos foram submetidos à HFD durante 36 semanas, sendo reavaliados ao final deste período e em seguida a HFD foi substituída pela dieta STD. O tratamento foi administrado na 39ª semana, onde os camundongos obesos foram divididos em: tratados com MSC (n=8); e tratados com DMEM (n=6). Na 51ª semana os grupos foram reavaliados e posteriormente submetidos à eutanásia (Figura 11). Todos os protocolos com o uso de animais nesta investigação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-012/2018) do CBTC/HSR.

Tabela 4 - Composição da HFD e da STD.

Dieta HF			Dieta ST		
	Gramas %	kcal%		Gramas %	kcal%
Proteínas	23,0	16,4	Proteínas	16,8	16,4
Carboidratos	35,5	25,5	Carboidratos	74,3	73,1
Gorduras	35,8	58,0	Gorduras	4,8	10,5
Total			Total		
Kcal/g	5,56	100	Kcal/g	4,07	100
Ingredientes	Gramas %	kcal%	Ingredientes	Gramas %	kcal%
Caseína, 30 mesh	228	912	Caseína, 30 mesh	228	912
DL-metionina	2	0	DL-metionina	2	0
Maltodextrina 10	170	680	Maltodextrina 10	170	680
Amido de milho	175	700	Amido de milho	835	3340
Sacarose	0	0	Sacarose	0	0
Óleo de palma hidrogenada	333,5	3001,5	Óleo de soja	25	225
Mix mineral	40	0	Óleo de coco hidrogenado	40	360
Bicarbonato de Sódio	10,5	0	Mix mineral S10001	40	0
Citrato de Potássio, 1 H ₂ O	4,0	0	Bicarbonato de Sódio	10,5	0
Mix de Vitamina V10001	10	40	Citrato de Potássio, 1 H ₂ O	4	0
Bitartarato de colina	2	0	Mix de Vitamina V10001	10	4
			Bitartarato de colina	2	0
			FD&C corante amarelo #5	0,1	0
Total	975,00	5333,5		1366,6	5557

Fonte: Modificado de Nuvital (<https://quintia.com/pb/pais/brasil/>) e Pragsoluções Biociências (<http://www.pragsolucoes.com.br/>).

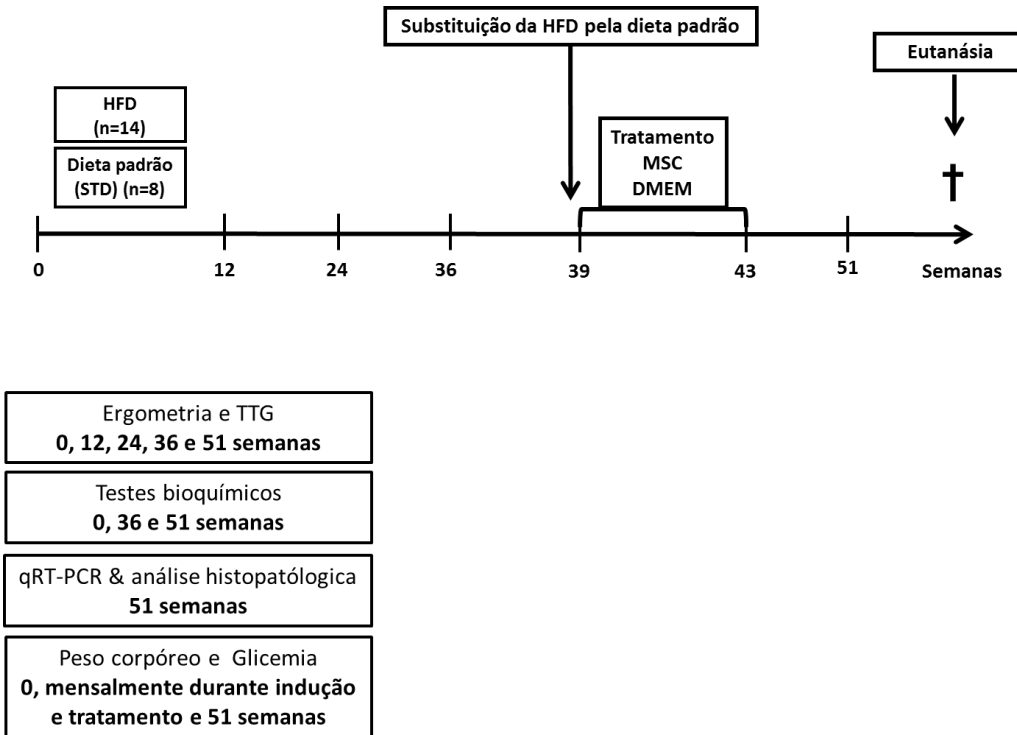


Figura 13 - Desenho experimental. Seguindo o desenho experimental realizado no capítulo 1, após 36 semana de indução da obesidade e DM2 com a HFD, o grupo de camundongos foram reavaliados e tiveram a ração substituída pela padrão e com 39 semanas foram divididos conforme tratamento: MSC (Duas injeções i.v. pela veia da cauda, com um intervalo de 24 h); e tratados com DMEM (100 µl i.v./animal, em três cursos de três injeções em dias alternados, e intervalo de 9 dias entre um ciclo e outro). O monitoramento destes animais manteve-se durante todo o modelo experimental e após o término dos tratamentos com DMEM e MSC (51 semanas).

12 MATERIAL E MÉTODOS

No segundo protocolo experimental, a avaliação murinométrica, os testes bioquímicos e a avaliação funcional por ergometria foram realizados conforme descritos no capítulo 1 deste estudo. As sondas de hibridização ao DNA utilizadas na realização do RT-qPCR estão descritas a seguir.

12.1 ANÁLISE QUANTITATIVA POR RT-qPCR

Corações foram removidos e utilizados para a extração de RNA com a utilização da técnica do PCR em Tempo Real usando o Taqman™ Universal PCR Mastex Mix (Thermo Scientific). As sondas TaqMan utilizadas foram a CHI3L3 (Mm00657889_m1), CCL2 (Mm00441242_m1), SPARC (Mm00486332_m1), RYR2 (Mm00465877_m1), STAT3 os primers foram: Mm 5'- CAATACCATTGACCTGCCGAT e 3'- GAGCGACTCAAAGTCCCT; SMAD7: Mm 5'- GGCCGGATCTCAGGCATTC e 3'- TTGGGTATCTGGAGTAAGGAGG; PTEN: Mm 5'- TGGATTCGACTTAGACTTGACCT e 3'- GCGGTGTCATAATGTCTCTCAG, juntamente com o SYBR™ Green PCR Master Mix. A normalização foi realizada com o controle endógeno (Hprt), um controle sem amostra e outro sem a transcrição reversa. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad versão 5 (San Diego, CA, EUA).

13 RESULTADOS

13.1 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DA MSC SOBRE AS ALTERAÇÕES MURINOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DA OBESIDADE E DM2 EM MODELO EXPERIMENTAL

Assim como observado no primeiro capítulo, camundongos alimentados com a HFD apresentaram ganho de peso, hiperglicemia e intolerância à glicose ao final do período de indução (36^a semana) quando comparados aos camundongos alimentados com a STD (Figura 12A, B e D). As diferenças estatísticas do peso corpóreo foram encontradas a partir da 8^a semana de indução até o final do período de indução (Figura 12A). A glicemia em jejum apresentou um pico hiperglicêmico na 8^a e 24^a semana que se perpetuou até a 36^a semana de indução (Figuras 12B). A HFD foi substituída pela STD e o tratamento iniciado na 39^a semana. Após o tratamento, foi possível observar um decaimento progressivo destes parâmetros, contudo sem apresentar diferenças significantes entre os tratados com MSC e DMEM comparados aos camundongos alimentados com STD (Figura 12A e B).

A intolerância à glicose evidenciada pela incapacidade na redução dos níveis de glicose plasmática para os valores iniciais da concentração glicêmica, após 120 minutos da injeção intraperitoneal de glicose (Figuras 12C e D) também foi normalizada na 51^a semana, independentemente do tratamento com MSC (Figura 12E).

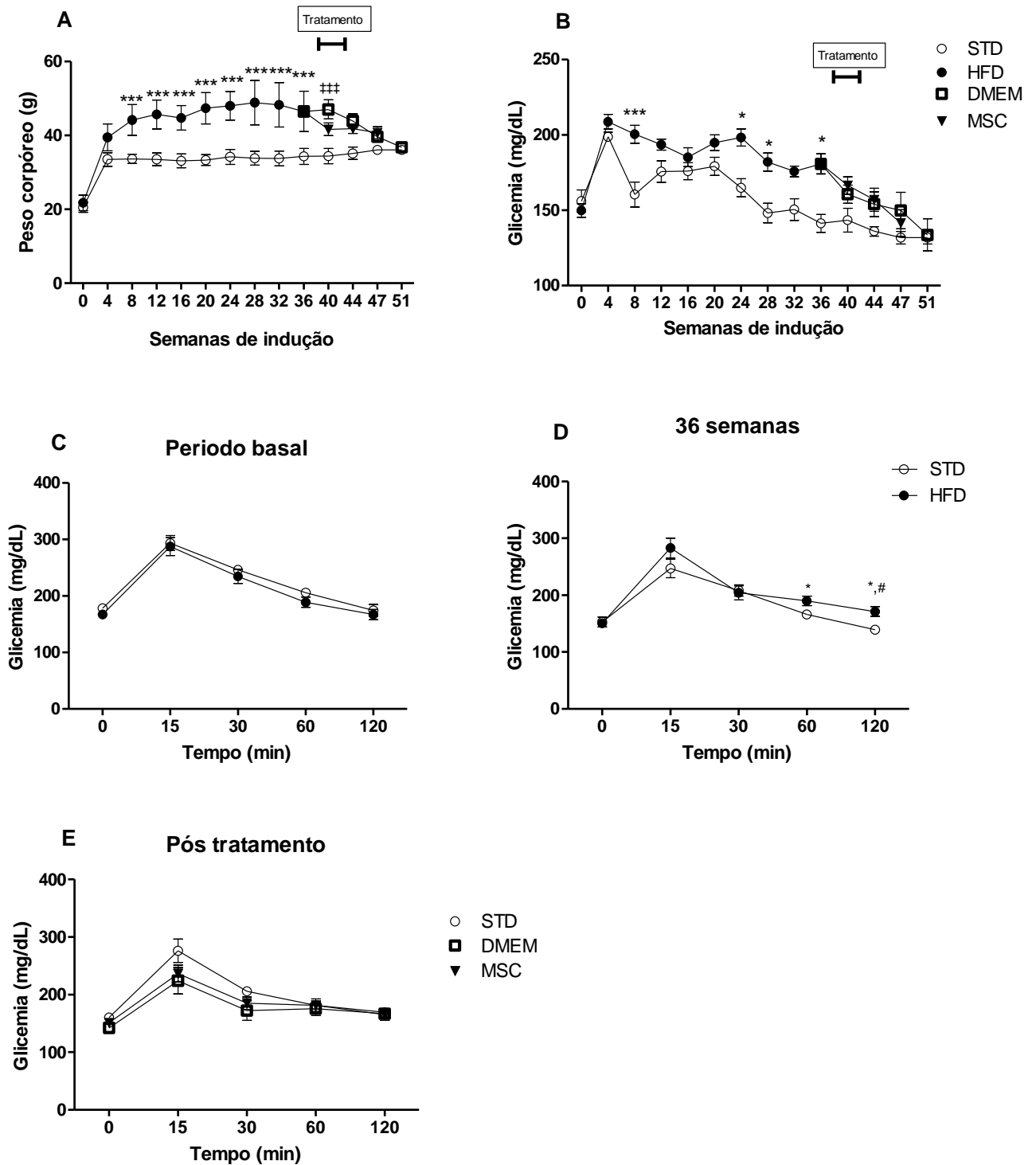


Figura 14 - Análise do peso corpóreo, glicemia em jejum e TTG. Peso corpóreo (a) e glicemia em jejum (b) foram mensurados mensalmente até o fim do desenho experimental (51 semanas). TTG foi mensurado do início (pré-indução ou tempo 0) (c) até a conclusão da 36ª semana de indução com a HFD (36 semanas) (d), e ao final de 8 e 11 semanas após o fim dos tratamentos com DMEM e MSC, respectivamente (51 semanas) (e). Valores são expressos como média \pm SEM de 6 a 14 camundongos/grupo. Camundongos alimentados com dieta padrão (STD) vs. Alimentados com HFD, $*P \leq 0.05$; $***P \leq 0.001$. Camundongos alimentados com dieta padrão (STD) vs. Tratados com DMEM, $††††P \leq 0.001$. HFD em 120 min vs. HFD no tempo basal $\#P \leq 0.05$).

13.2 CAPACIDADE DE REALIZAR EXERCÍCIO EM TESTE ERGOMÉTRICO APÓS TRATAMENTO DE MSC

No período anterior à introdução da HFD não havia diferença na distância percorrida entre os grupos experimentais. Ao fim de 36 semanas de indução com a HFD, os animais obesos tiveram uma redução na distância percorrida em relação ao grupo alimentado com STD. Oito semanas após o término do tratamento com MSC e concomitante substituição da HFD, o grupo tratado com MSC recuperou a capacidade física em realizar exercício na esteira ergométrica, quando comparado ao grupo administrado DMEM e ao não havendo diferenças entre o grupo tratado com o grupo alimentado com dieta STD (Tabela 5).

Tabela 5 - Desempenho dos camundongos submetidos à atividade física em esteira ergométrica (Distância em metros) alimentados com dieta STD ou HFD.

	Pré indução	36 semanas	51 semanas
STD (n=8)	1255±114	739±7,9	541±36,6
HFD (n=14)	1427±76,9	381±24,2 \$\$\$,**	-----
HFD+DMEM (n=6)	-----	-----	356±45,6 ††
HFD+MSC (n=8)	-----	-----	510±27,1#

Valores são expressos como média ± SEM. Camundongos alimentados com HFD no período da pré indução vs. camundongos alimentados com HFD na 36ª semana, \$\$\$ $P \leq 0.001$. Camundongos alimentados com dieta padrão (STD) na 36ª semana vs. camundongos alimentados com HFD na 36ª semana, ** $P \leq 0.01$. Camundongos alimentados com STD na 51ª semana vs. camundongos tratados com DMEM, †† $P \leq 0.01$. Camundongos tratados com MSC vs. tratados com DMEM # $P \leq 0.05$. Fonte: Autor.

13.3 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA HOMEOSTASE CARDÍACA

Em relação à expressão gênica, a administração de MSC aumentou os níveis de expressão da quimiocina CCL2, da Proteína 1 Semelhante à Quitinase-3 (CHI3L3), PTEN e da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT3) (Figuras 13A-D), enquanto que o grupo tratado com DMEM apresentou expressão reduzida destes genes.

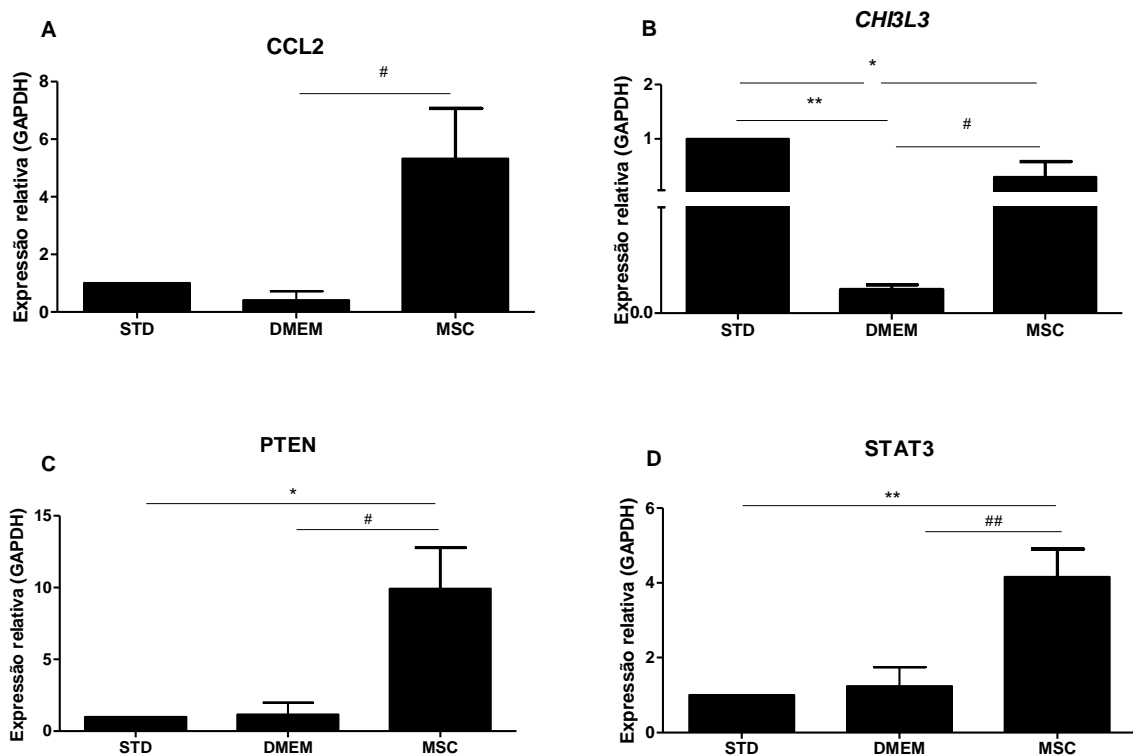


Figura 15 - Citocinas e fatores de transcrição por RT-qPCR em tecido cardíaco. Valores representativos de CCL2 (a), CHI3L3 (b), PTEN (c) e STAT3 (d). Expressão obtida na 51ª semana experimental. (Valores são expressos como média \pm SEM de 6 a 8 camundongos/grupo. Camundongos alimentados com dieta padrão (STD) vs. Camundongos tratados com MSC ou administrados DMEM * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$. Tratados com DMEM vs. Tratados com MSC # $P \leq 0.05$; ## $P \leq 0.01$).

13.4 REVERSÃO DA FIBROSE CARDÍACA INDUZIDA PELA HFD APÓS ADMINISTRAÇÃO DE MSC

A quantificação da fibrose nas secções dos tecidos cardíacos dos camundongos alimentados com HFD e tratados com MSC revelou uma significativa redução quando comparados aos camundongos HFD tratados com DMEM. Não houve diferenças entre o grupo HFD tratado com MSC e o grupo alimentado com dieta STD (Figuras 14D).

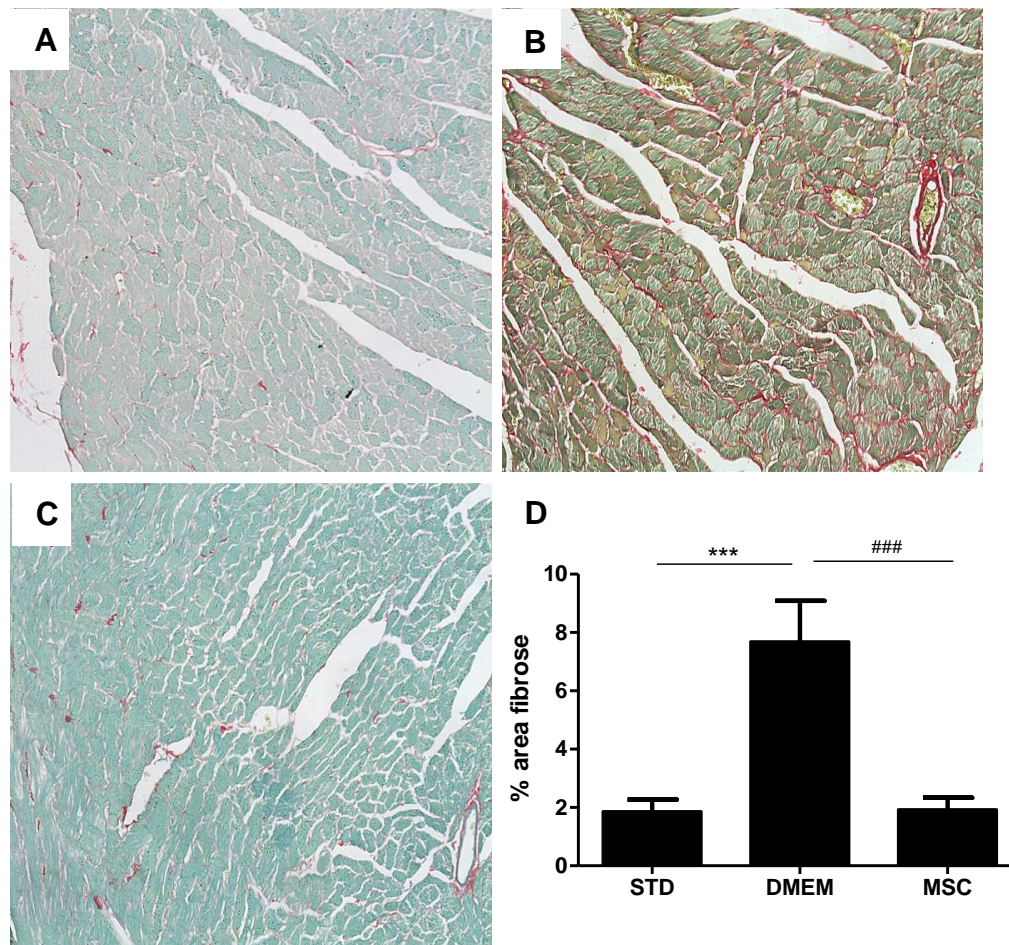


Figura 16 - Redução da fibrose cardíaca após tratamento com MSC. Seções cardíacas de camundongos alimentados com STD (a), camundongos obesos tratados com DMEM (b) e camundongos obesos tratados com MSC (c). Barras de calibração = 50 μ m. Quantificação de fibrose no coração (d). Valores expressos em média \pm SEM de 6 a 8 camundongos/grupo. Camundongos alimentados com dieta STD vs. Tratados com DMEM, ou Tratados com MSC, * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Tratados com DMEM vs. Tratados com MSC # $P \leq 0.05$, ### $P \leq 0.001$.

13.5 MODULAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO REMODELAMENTO CARDÍACO APÓS ADMINISTRAÇÃO DAS MSC

A administração de MSC aumentou a expressão gênica de genes relacionados ao remodelamento tecidual, observando-se elevados níveis de expressão de SMAD7, SPARC (do inglês *Secreted protein acidic and rich in cysteine*) e o CTGF (do inglês *Connective Tissue*

Growth Factor), comparados à expressão apresentada pelo grupo dos camundongos tratados com DMEM (Figura 15A-C).

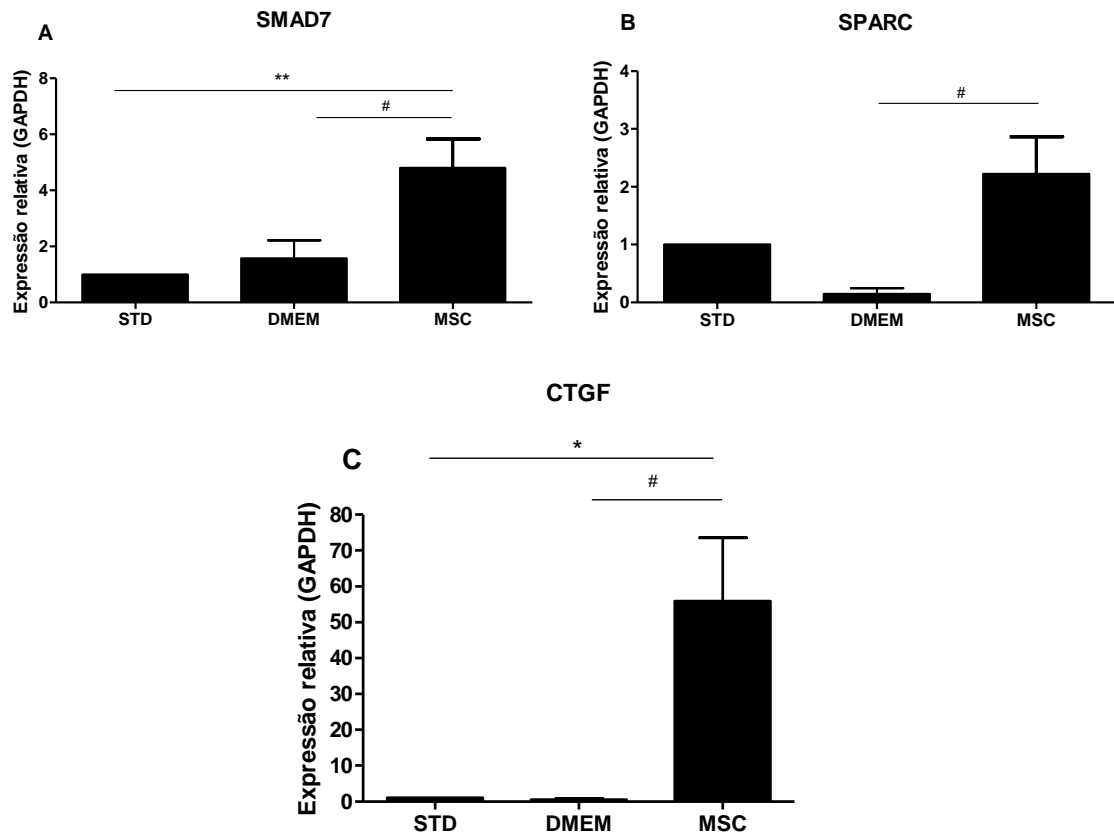


Figura 17 - Modulação de genes cardíacos pelas MSC. Expressão gênica relativa de SMAD7 (a), SPARC (b) e CTGF (d) no coração. Valores expressos em média \pm SEM de 6 a 8 camundongos/grupo. Camundongos alimentados com dieta STD vs. Tratados com DMEM, ou Tratados com MSC, $*P \leq 0.05$; $**P \leq 0.01$. Tratados com DMEM vs. Tratados com MSC $\#P \leq 0.05$.

14 DISCUSSÃO

Devido à crescente prevalência da obesidade, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de novos tratamentos para o controle das disfunções cardíacas e comorbidades. Neste estudo, evidenciamos os efeitos benéficos do tratamento com MSC ou MC sobre a disfunção cardíaca decorrente da obesidade e do DM2 induzidas pela dieta HFD. Isto foi demonstrado pela recuperação na capacidade de realização de exercício físico, reversão de arritmias, regulação da expressão gênica de citocinas, fatores de crescimento, fatores de transcrição e pela redução da fibrose no tecido cardíaco.

No presente estudo, os camundongos C57Bl/6 machos alimentados com a dieta enriquecida com gordura saturada de banha de porco (capítulo 1) ou com gordura trans de óleo de palma (capítulo 2) desenvolveram obesidade e distúrbios miocárdicos, que mimetizam os efeitos fisiológicos associados à obesidade humana decorrentes do comportamento nutricional (JANG *et al.*, 2003; CARROLL; ZENEBE; STRANGE, 2006; OKERE *et al.*, 2006). Os camundongos C57Bl6 são suscetíveis ao desenvolvimento de obesidade e DM2 quando expostos a uma dieta rica em gordura, associando-se neste modelo fatores genéticos e ambientais, semelhante ao observado em seres humanos (NOONAN; BANKS, 2000; PRPIC *et al.*, 2003).

Estudos anteriores demonstraram que mudanças no estilo de vida, como a atividade de exercícios e uma dieta equilibrada com baixos níveis de ácidos graxos saturados, gorduras trans e colesterol, são essenciais para controlar a glicemia e reduzir o risco cardiovascular (CHENG, 2005; DE SIMONE *et al.*, 2010). Alinhado a essa recomendação preconizada pela Sociedade Americana de Diabetes, a HFD foi substituída pela dieta STD, resultando em redução no peso corporal, nos níveis de glicose e nos níveis de colesterol total, independentemente do tratamento, conforme demonstrado em nosso estudo anterior (DALTRO *et al.*, 2015). Contudo, não houve melhora no quadro das anormalidades cardíacas no grupo submetido apenas a mudança da HFD pela dieta STD. Em contraste, a substituição da dieta seguida da administração de MSC ou MC foi capaz de promover a reversão de arritmias, recuperação da capacidade de realizar atividade física e redução da fibrose cardíaca.

Diferentes fatores podem justificar estes achados. A diminuição do grau de gravidade das arritmias está relacionada à redução da fibrose no miocárdio. Esta redução está diretamente ligada aos níveis reduzidos da expressão de colágeno, como também demonstrado por Karantalis & Hare (2015). Justificam-se estes efeitos uma vez que o aumento da deposição da MEC entre as camadas dos cardiomiócitos pode interromper o acoplamento elétrico, resultando no comprometimento da contração cardíaca e no aumento do risco de arritmias (SPACH; BOINEAU, 1997). Através da análise do RT-qPCR foram investigadas as expressões gênicas do TGF- β 1, MMP-9 e TIMP-1, fatores que podem estar associados ao desenvolvimento da fibrose. A superfamília do TGF- β é composta de diversas moléculas de sinalização que estão envolvidas no processo de desenvolvimento biológico. A função das três isoformas humanas de TGF- β (1, 2 e 3), na maioria das células normais, é prevenir a proliferação celular pela indução da expressão de proteínas que inibem o ciclo celular, principalmente na fase G1, através da sinalização autócrina e parácrina. O receptor de TGF- β é uma serina/treonina cinase que promove a expressão de moléculas de adesão celular e moléculas da matriz extracelular (LODISH *et al.*, 2014). Os receptores de TGF- β (Tipo I e Tipo II), uma vez interagindo com ligante, formam o receptor heterodímero que se autofosforila, ativando-se. Este processo leva ao recrutamento e ativação das proteínas citoplasmáticas Smads que pertencem a uma família de fatores de transcrição que regulam diversas vias de crescimento e diferenciação. Após a ativação, as Smads migram do citoplasma para o núcleo onde interagem com outras proteínas regulatórias a fim de modular a transcrição celular de genes envolvidos em desenvolvimento de órgãos ou diferenciação de tecidos (ALBERTS *et al.*, 2017). A excessiva produção de TGF- β 1 resulta na deposição aumentada de proteínas da MEC e de colágeno no coração (MACKENNA; SUMMEROUR; VILLARREAL, 2000), visto estimular a diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos (DESMOULIERE *et al.*, 1993), enquanto ativa a via de sinalização Smad3 para promover a síntese de proteínas da MEC e a preservação da matriz através do aumento da expressão de TIMPs (VERRECCHIA; CHU; MAUVIEL, 2001). Verificou-se que o tratamento com MSC foi capaz de normalizar a expressão de TIMP-1 e MMP-9 a níveis semelhantes aos camundongos alimentados com a dieta STD.

Alterações na expressão e na função da conexina 43 foram descritas em modelos experimentais de DM (LIN *et al.*, 2006), hipercolesterolemia (LIN *et al.*, 2005) e HFD (GÖRBE *et al.*, 2011). Estes incluem padrões alterados de fosforilação, levando a uma maior propensão à degradação proteolítica (LIN *et al.*, 2006). Demonstra-se que a expressão alterada da conexina 43 favorece a arritmia (POELZING; ROSENBAUM, 2004). O aumento dos

níveis de RNAm da conexina 43 induzidos pela HFD neste estudo pode refletir uma resposta compensatória aos níveis diminuídos da proteína funcional, conforme descrito anteriormente (LIN *et al.*, 2005). Curiosamente, foi observado que os níveis de RNAm da conexina 43 diminuíram para níveis semelhantes aos dos camundongos controles, nos grupos tratados com MSC ou MC, o que foi correlacionado com melhorias nas arritmias. Outros mecanismos compensatórios podem estar associados à elevada expressão de VEGF detectada nos camundongos alimentados com a HFD, uma vez que o insulto cardíaco, a fibrose e as arritmias levam ao aumento da produção de VEGF, que por sua vez regula a expressão da conexina 43 (CHINTALGATTU; NAIR; KATWA, 2003; PIMENTEL *et al.*, 2002).

Os níveis de expressão do gene do PPAR γ também foram elevados em camundongos alimentados com HFD, mas modulados nos camundongos tratados com MSC. O PPAR γ é um receptor nuclear e um fator de transcrição, que previamente foi encontrado super-expresso em corações de pacientes com síndrome metabólica e hipertrofia cardíaca em resposta a lesão (KRISHNAN *et al.*, 2009; MARFELLA *et al.*, 2009).

No presente estudo, também foi analisada a expressão cardíaca dos genes envolvidos no processo de remodelamento e desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, incluindo a adiponectina, IGF-1 e GATA-4. Foi demonstrado previamente que a adiponectina tem ação cardioprotetora, inibindo o remodelamento cardíaco através de mecanismos anti-inflamatórios e de pró-sobrevivência (OUCHI; SHIBATA; WALSH, 2006; SMITH; YELLON, 2011). Foi observado que a expressão da adiponectina no coração dos camundongos tratados com MSC ou MC eram semelhantes aos dos camundongos controles, e reduzida nos camundongos alimentados com HFD e tratados com DMEM. Em contraste, GATA4, fator de transcrição que regula a expressão de genes cardíacos específicos, foi aumentado pela HFD nesse estudo e em outros, sendo associado à hipertrofia cardíaca (WANG *et al.*, 2015). Os tratamentos com MSC ou MC foram capazes de restaurar os níveis de RNAm do GATA-4 para um padrão semelhante aos dos camundongos controles. Além disso, o GATA-4 está envolvido na regulação da troponina I (KU *et al.*, 2011), que, quando expressa em níveis elevados, correlaciona-se com um maior risco e gravidade das arritmias cardíacas (APPLE, 1998; MISSOV; CALZOLARI; PAU, 1997; ANTMAN *et al.*, 1996). No presente estudo, apenas os camundongos tratados com MSC apresentaram os mesmos níveis de expressão de troponina I dos camundongos controles após o tratamento, sugerindo sua participação na recuperação cardíaca (Figura 18). O IGF-1 também foi associado ao reparo cardíaco durante o remodelamento (CZUBRYT, 2012), induzindo a expressão de TGF- β 1, que estimula diretamente a expressão do colágeno (PUGLIESE *et al.*, 1997). Assim, a redução da

expressão de IGF1 em camundongos tratados com MSC descrito no presente estudo, poderia ser um dos mecanismos envolvidos na melhora da função cardíaca por reduzir o TGF- β 1 (Figura 18) (DAIAN *et al.*, 2003). O papel dos supressores de sinalização de citocinas (SOCS) nos mecanismos patogênicos do DM é um dos fatores mais investigados dos últimos anos (SUCHY *et al.*, 2013). A correlação entre a expressão de SOCS3 e a RI foi demonstrada previamente pela detecção de altos níveis de SOCS3 em tecidos sensíveis à insulina de pacientes diabéticos (RIEUSSET *et al.*, 2004; FENG *et al.*, 2014) e de animais que desenvolveram RI (UEKI; KONDO; KAHN, 2004; SPANGENBURG *et al.*, 2006). No presente estudo, o nível de expressão cardíaca de SOCS3 foi semelhante aos camundongos controles e aos camundongos tratados com MSC, sugerindo uma melhora na sinalização intracelular cardíaca à insulina.

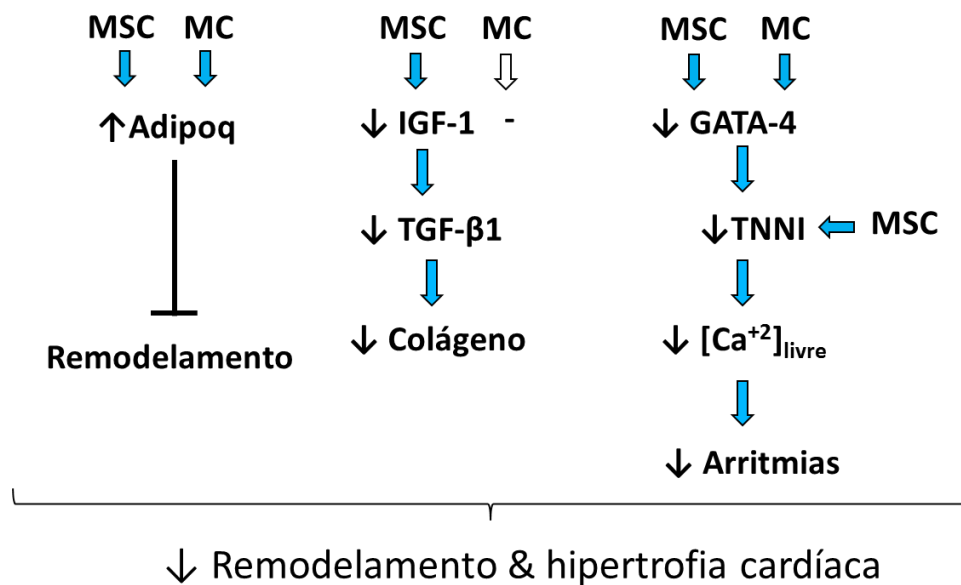


Figura 18 – Representação esquemática da modulação dos genes cardíacos. Ação das MSC ou MC na redução do remodelamento e hipertrofia cardíaca.

O MC das MSC contém vários fatores secretados e isso propõe um provável mecanismo de ação parácrina. Previamente, foi demonstrado que o MC derivado de MSC promove o reparo cardíaco em diferentes modelos experimentais (GNECCHI *et al.*, 2005; TIMMERS *et al.*, 2011; DANIELI *et al.*, 2015). A caracterização do MC por *protein array* revelou a presença de citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas, fatores angiogênicos, proteínas antiapoptóticas e moléculas de adesão, como descrito anteriormente

(PAREKKADAN *et al.*, 2007). Foi demonstrado que as MSC secretam uma ampla gama de citocinas e fatores de crescimento com efeitos anti-inflamatórios, anti-apoptóticos, angiogênicos e antifibróticos, o que pode contribuir para os efeitos terapêuticos da terapia celular observados no coração (ALFARO *et al.*, 2008; KORF-KLINGEBIEL *et al.*, 2008). Além dos mediadores solúveis, as MSC também liberam vesículas extracelulares (VEs) que contribuem para a reparação e regeneração tecidual através da transferência de um repertório de RNAs, miRNA, DNA, proteínas e lipídios (COLLINO *et al.*, 2011; CAMUSSI *et al.*, 2011; NAWAZ *et al.*, 2014). Contudo, quando comparados os efeitos induzidos pelo uso de MSC aos efeitos decorrentes do uso de MC, observa-se que as MSC induzem uma melhora expressiva na função e estrutura cardíaca através da modulação significativa de fatores relacionados ao remodelamento cardíaco e desenvolvimento de fibrose (USUNIER *et al.*, 2014).

Baseados nestes resultados, sugerimos que a maior eficácia das MSC em relação ao MC sobre as disfunções cardíacas decorrentes da obesidade pode estar relacionada à secreção diferenciada de fatores por estas células quando presentes no microambiente da lesão tecidual (BOBIS, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2006). Uma vez que a redução da fibrose pode explicar a melhora na geração e condução do impulso elétrico cardíaco, resultando em uma melhora na severidade das arritmias (PELLMAN; ZHANG; SHEIKH, 2016) e na capacidade física mensurada pelo teste ergométrico, optamos por investigar a modulação exercida pelas MSC sobre outros fatores associados à fibrose, à apoptose e à inflamação.

Diversas quimiocinas desempenham importante papel no processo de reparo, modulando a deposição de colágeno e formação de fibrose, a exemplo do miocárdio. Especificamente em relação à fibrose cardíaca, o CCL2 tem papel de destaque. No estudo aqui apresentado foi observado que o tratamento com MSC induziu aumento nos níveis de expressão gênica do CCL2. A partir deste resultado seria esperado um aumento na fibrose cardíaca, uma vez que esta exerce efeito quimiotático sobre monócitos e induz a diferenciação dos progenitores de fibroblastos (DOBACZEWSKI; FRANGOIANNIS, 2009). Durante o processo de reparo tecidual, este estímulo desencadeia o remodelamento cardíaco devido a ativação de TGF- β 1 e, conseqüentemente, o desenvolvimento da fibrose (GHARAEI-KERMANI, DENHOLM; PHAN, 1996; SAKAI *et al.*, 2006). Este resultado, inicialmente contraditório, pode ser explicado pelo fato de que o tratamento com MSC reduziu significativamente a expressão gênica de TGF- β 1 e aumentou a expressão de SMAD7. Portanto, apesar da CCL2 estar envolvida na formação de fibrose em situações

adversas para o miocárdio, a inibição da via de sinalização do TGF- β 1 pode ser um elemento chave para redução de fibrose a despeito dos níveis elevados de CCL2 (Figura 19).

Os níveis de CHI3L3, um marcador específico da polarização de macrófagos M2 anti-inflamatórios (MANTOVANI *et al*, 2004), foram significativamente reduzidos nos animais HFD tratados com DMEM. Este resultado condiz com o estado inflamatório crônico característico da obesidade e do DM2 (CASTOLDI *et al.*, 2016). Este processo inflamatório estabelecido no tecido adiposo e demais tecidos, como coração e músculo esquelético, é caracterizado por um infiltrado celular predominantemente de macrófagos, associado ao desenvolvimento da RI (CASTOLDI *et al*, 2016). Por outro lado, observou um aumento nos níveis de CHI3L3 no grupo HFD tratado com MSC em relação ao HFD tratado com DMEM, o que está em consonância com a ação imunomoduladora das MSC, levando a melhora do processo inflamatório devido ao aumento da CHI3L3 neste grupo (Figura 19).

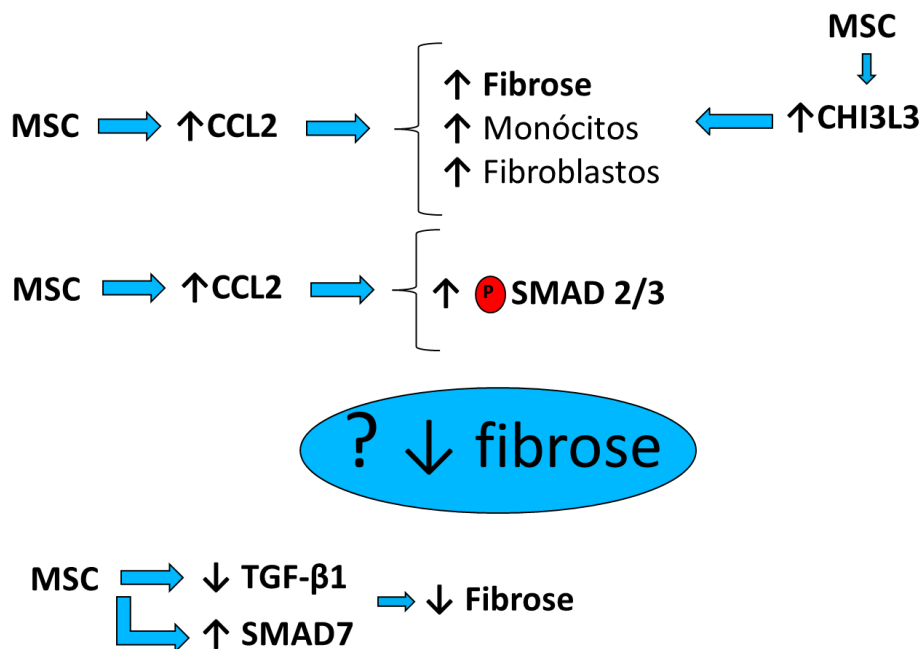


Figura 19 – Imunomodulação resultante da expressão de genes no tecido cardíaco e seu mecanismo de ação. Representação esquemática da expressão relativa e ação dos genes pró-inflamatório CCL2 e anti-inflamatório CHI3L3 no tecido cardíaco.

A via de sinalização da PI3K-AKT é de extrema relevância para sobrevivência celular, apresentando função cardioprotetora. Esta via de sinalização é ativada pela insulina, estando comprometida em casos de RI decorrente da obesidade e DM2. A fosfatase PTEN é fator inibidor desta via que desfosforila o PI(3,4,5)P3 (fosfatidilinositol trifosfato – PIP3), segundo

mensageiro produzido por fosforilação do PI(3,4)P2 (fosfatidilinositol bifosfato – PIP2) mediada pela PI3K. A ação da PTEN impede a ativação da AKT (MOCANU; FIELD; YELLON, 2006) pela PIP3. No presente estudo, observou-se um aumento na expressão gênica da PTEN no grupo tratado com MSC. Este resultado já foi descrito anteriormente quando se observou que ratos submetidos ao tratamento prolongado com atorvastatina, fármaco cardioprotetor em situação de isquemia, apresentaram aumento da ativação da via da PI3K/AKT, seguido da elevação dos níveis de PTEN após o tratamento crônico. Isto decorre do fato de que níveis elevados da atividade da PI3K/AKT por períodos longos podem levar à hipertrofia cardíaca patológica e, portanto, o aumento da expressão da PTEN poderia ser proposto como um mecanismo celular regulatório para a cardioproteção (MENSAH; MOCANU; YELLON, 2005). No modelo de obesidade e DM2 apresentado neste estudo, a substituição da HFD melhora o quadro de hiperglicemia e, conseqüentemente, da RI. O tratamento com MSC poderia estar aumentando a ativação da PI3K/AKT, via de sobrevivência, portanto de cardioproteção. Sugere-se então que a liberação de fatores de crescimento pelas MSC estaria estimulando esta via exacerbadamente, o que levaria a ativação de um mecanismo compensatório pelo aumento da expressão PTEN, visando a proteção contra a hipertrofia cardíaca maligna. O estudo conduzido por Mocanu e colaboradores (2006) demonstrou um possível efeito cardioprotetor da PTEN em modelo de diabetes desenvolvido em ratos Goto Kakizaki, corroborando com nossos dados.

O processo de remodelamento cardíaco em face de estímulos benéficos ou de insultos compartilha de etapas e mediadores em comum, cujo efeito biológico final dependerá do perfil da via de sinalização intracelular ativada. Este efeito biológico pode representar um mecanismo protetor ou adverso. O balanço entre estes dois tipos de mecanismos é modulado por diversas proteínas dentre estas um membro da família das STAT (do inglês *Signal Transducer Activator of Transcription*), a STAT3. No presente estudo, observou-se que os níveis de expressão gênica da STAT3 após o tratamento com MSC estavam elevados em relação aos grupos controle e tratado com DMEM. Uma vez que as células MSC além do efeito imunomodulador, também exercem um importante papel na regeneração tecidual, pode ser proposto que um dos mecanismos envolvidos neste processo regenerador decorrente da terapia celular é a ativação da STAT3. Diversos mecanismos primordiais para a regeneração tecidual são mediados pela STAT3, tais como proliferação, diferenciação, sobrevivência, cardioproteção ao estresse oxidativo, manutenção do metabolismo cardíaco e comunicação entre diferentes tipos celulares tanto em situações fisiológicas e fisiopatológicas (HAGHIKIA *et al.*, 2014). Há muito tempo já foi demonstrado que o STAT3 é um elemento que permite a

integração de várias vias de sinalização nas células ativadas por citocinas, fatores de crescimento e catecolaminas, sendo essencial na adaptação cardíaca ao estresse, no remodelamento cardíaco e na insuficiência cardíaca (BROMBERG; DARNELL, 1999; LEVY; LEE, 2002; ZHANG *et al.*, 2016). Alterações no padrão de expressão e ativação da STAT3 foram demonstradas em situações de falência cardíaca em humanos e modelos animais (FISCHER; HILFIKER-KLEINER, 2007; NG *et al.*, 2003; TSOUTSMAN *et al.*, 2008; CAMPOREALE *et al.*, 2013).

O SPARC também conhecido como osteonectina é uma glicoproteína pertencente à família das proteínas de matriz extracelular que tem por função modular a interação do colágeno entre a matriz e as células, propiciando a formação da fibrose. A sua expressão aumentada é característica de tecidos que estão sob remodelamento tecidual (DOBACZEWSKI *et al.*, 2006), uma vez que, a acentuada expressão de SPARC estimula uma maior fosforilação da SMAD2 aumentando a cascata de sinalização do TGF- β 1 (SCHELLINGS *et al.*, 2009). A ativação dessa cascata de sinalização resulta na maior transcrição de genes relacionados à produção dos componentes da MEC, como colágeno tipo 1 e CTGF, os quais contribuem conjuntamente para formação da fibrose (GABRIEL, 2009). O CTGF age sinergicamente com o TGF- β 1 para estimular a via de transdução de sinal, bem como estimular a proliferação, migração e adesão de fibroblastos e estimular a produção da MEC (Figura 20) (DUNCAN *et al.*, 1999; WESTON; WAHAB; MASON, 2003).

O grupo tratado com MSC apresentou aumento na expressão de SPARC e de CTGF em relação aos grupos controle e tratado com DMEM. Este resultado sugeriria uma elevação no percentual de área fibrótica no coração, o que não ocorreu. Tal resultado aparentemente controverso pode estar relacionado à elevação da expressão de SMAD7 em camundongos tratados com MSC (SUN; ZHANG; LIU, 2015). A Smad 7 é uma molécula citoplasmática inibitória da fosforilação e formação do complexo SMAD2/3, bloqueando assim a propagação da sinalização intracelular do TGF- β (XU *et al.*, 2016). Dessa forma, a redução da expressão do TGF- β 1 impede o desenvolvimento da fibrose miocárdica (HE *et al.*, 2016) em consequência dos elevados níveis de SPARC e CTGF (Figura 20) (CHIU *et al.*, 2008).

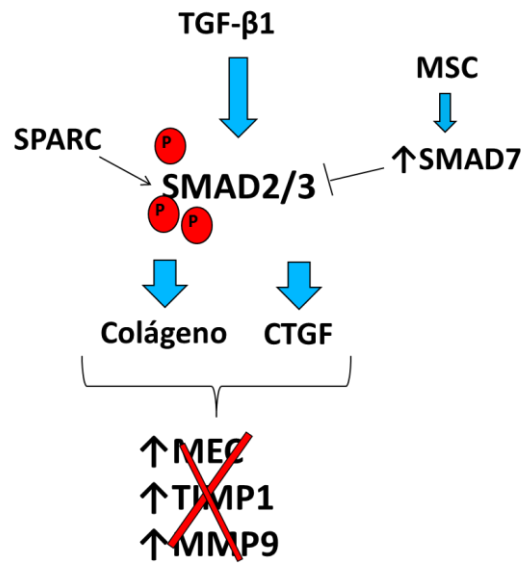


Figura 20 – Representação esquemática da ativação da via fibrotica e bloqueio via expressão da SMA7. Ação das MSC no bloqueio da via da SMA2/3 por superexpressão da SMAD7.

15 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que MSC e MC possuem efeitos benéficos sobre os distúrbios cardíacos decorrentes da obesidade e DM2, contudo o uso das MSC teve efeitos mais proeminentes, corroborando com a ação parácrina das MSC demonstrada em diversos modelos de doenças cardíacas. Estes efeitos são através da modulação de elementos envolvidos em processos de regeneração tecidual, tais como desenvolvimento de fibrose.

REFERÊNCIAS

ABDUL-GHANI, M. A.; DEFRONZO R. A. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, n. 476279, p. 19, 2010.

ABEL, E. D.; LITWIN, E. S.; SWEENEY, G. Cardiac Remodeling in Obesity. **Physiol Rev**, v. 88, p. 389–419, 2008.

ACQUISTAPACE, A. *et al.* Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. **Stem Cells**, v. 29, n. 5, p. 812–24, 2011.

ADAMCZAK, M. *et al.* Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension. **Am J Hypertens**, v. 16, p. 72–75, 2003.

AGUIRRE, V. *et al.* The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 9047–9054, 2000.

AGUIRRE, V. *et al.* Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. **J Biol Chem.**, v. 277, n. 2, p. 1531-7, 2002.

AHMAD, T. *et al.* Miro 1 knockdown in stem cells inhibits mitochondrial donation mediated rescue of bronchial epithelial injury. **Biophys J.**, v. 104, n. 2, p. 659a, 2014.

ALBERTI, K. G. *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, p. 1640–1645, 2009.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALESSIO, N. *et al.* The secretome of MUSE cells contains factors that may play a role in regulation of stemness, apoptosis and immunomodulation. **Cell Cycle** (Georgetown, Tex), v. 16, p. 33–44, 2017.

ALFARO, M. P. *et al.* The Wnt modulator sFRP2 enhances mesenchymal stem cell engraftment, granulation tissue formation and myocardial repair. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 47, p. 18366-71, 2008.

ALPERT, M. A. Obesity cardiomyopathy; pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. **Am J Med Sci.**, v. 321, p. 225-236, 2001.

ADA. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v. 32, p. S62–S67, 2009.

ADA. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v. 37, p. S81–S90, 2014.

AMIRI, F.; JAHANIAN-NAJAFABADI, A.; ROUDKENAR, M. H. In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments: In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability. **Cell Stress and Chaperones**, v. 20, n. 2, p. 237–251, 2015.

ANISIMOV, S. V. *et al.* NeuroStem Chip: a novel highly specialized tool to study neural differentiation pathways in human stem cells. **BMC Genomics**, v. 8, n. 46, 2007.

ANTMAN, E. M. *et al.* Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. **N Engl J Med**, v. 335, p. 1342-9, 1996.

APPLE, F. S. Increased concentrations of cardiac troponin I are equivalent to increased cardiac troponin T in identifying chest pain patients at short-term risk of myocardial infarction. **Clin Chem**, v. 44, p. 1786-9, 1998.

ARoor, A. R.; MANDAVIA, C. H.; SOWERS, J. R. Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms. **Heart Fail. Clin.**, v. 8, p. 609–617, 2012.

BADAL, S.; BROWN, P. D.; RAGOOBIRSINGH, D. Nitric oxide agents impair insulin-mediated signal transduction in rat skeletal muscle. **BMC Biochemistry**, v. 7, n.17., 2006.

BAHRAMI, H. *et al.* Novel metabolic risk factors for incident heart failure and their relationship with obesity: the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) study. **J Am Coll Cardiol.**, v. 51, p. 1775–1783, 2008.

BALL, L. E.; BERKAW, M. N.; BUSE, M. G. Identification of the major site of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. **Molecular Cell Proteomics**, v. 5, p. 313–323, 2006.

BATTIPROLU, P. K. *et al.* Diabetic cardiomyopathy and metabolic remodeling of the heart. **Life Sci.**, v. 92, p. 609–615, 2013.

BAUM, J.; DUFFY, H. S. Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we talking about? **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 57, n. 4, p. 376–379, 2011.

BELKE, D. D. *et al.* Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 279, p. E1104–E1113, 2000.

BHAGAVAN, N. V.; HA, C.E. **Essentials of Medical Biochemistry**. 2nd edition. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press, 2015. 752p.

BIAN, S. *et al.* Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. **J Mol Med.**, v. 92, n. 4, p. 387-97, 2014.

BIFARI, F. *et al.* Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells. **Transfus Med Hemother.**, v. 35, n. 3, p. 194–204, 2008.

- BLUHER, M. Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? **Clinical Science**, v. 130, p. 1603–1614, 2016.
- BOBIS, S. *et al.* Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.44, p.215-230, 2006.
- BOSTICK, B. *et al.* Dipeptidyl peptidase inhibition prevents diastolic dysfunction and reduces myocardial fibrosis in a mouse model of Western diet induced obesity. **Metabolism**, v. 63, p. 1000–1011, 2014.
- BOUCHER, J.; KLEINRIDDERS, A.; KAHN, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 6, n. a009191, 2014.
- BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic cardiomyopathy revisited. **Circulation**, v. 115, n. 25, p. 3213-23, 2007.
- BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 11, n. 1, p. 31-9, 2010.
- BROMBERG, J. F.; DARNELL, J. E. JR. Potential roles of Stat1 and Stat3 in cellular transformation. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.**, v. 64, p. 425–8. 1999.
- BUCHANAN, J. *et al.* Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. **Endocrinology**, v. 146, p. 5341–5349, 2005.
- BUSSOLINO, F. *et al.* Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. **J Cell Biol.**, v. 119, p. 629–641, 1992.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil**, 2017. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2017. Brasília. 2018.
- BRAVO, R. *et al.* Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration. **Int Rev Cell Mol Biol.**, v. 301, p. 215–290, 2013.
- BRUUN, J. M. *et al.* Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 285, p. E527–33, 2003.
- BUGGER, H.; ABEL, E. D. Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. **Clin Sci (Lond)**, v. 114, n. 3, p. 195-210, 2008.
- BURTON, R. A. *et al.* Three-dimensional histology: tools and application to quantitative assessment of cell-type distribution in rabbit heart. **Europace**, v. 16, p. 86-95, 2014.
- CAI, D. *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of I κ K- β and NF- κ B. **Nat. Med.**, v. 11, p. 183–190, 2005.

CAMPBELL, F. M. *et al.* A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. **J Biol Chem.**, v. 277, p. 4098–4103, 2002.

CAMPOREALE, A. *et al.* STAT3 activity is necessary and sufficient for the development of immune-mediated myocarditis in mice and promotes progression to dilated cardiomyopathy. **EMBO Mol Med.**, v. 5, n. 4, p. 572–590. 2013.

CAMUSSI, G. *et al.* Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. **Kidney Int.**, v. 78, p. 838–848, 2011.

CANTINIEAUX, D. *et al.* Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res.**, v. 9, n. 5, p. 641-50, 1991.

CAPLICE, N. M.; GERSH, B. J.; ALEGRIA, J. R. Cell therapy for cardiovascular disease: What cells, what diseases and for whom? **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.**, v. 2, p. 37–43, 2005.

CARLEY, A. N.; SEVERSON, D. L. Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. **Biochim Biophys Acta**, v. 1734, n. 2, p. 112-26, 2005.

CARMONA, W. S.; ÁLVAREZ, E. C.; OLIVER, A. J. S. Obesity as a Complex Chronic Disease. **Curr Res Diabetes Obes J.**, v. 7, n. 1, 2018.

CARPENTIER, G. Contribution: Protein Array Analyzer for ImageJ. **ImageJ News**, 2010.

CARROLL, J. F.; ZENEBE, W. J.; STRANGE, T. B. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 48, p. 65-72, 2006.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.46, n.4, 2002.

CARVALHO-FILHO, M. A. *et al.* s-Nitrosylation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. **Diabetes**, v. 54, p. 959–967, 2005.

CARVALHO-FILHO, M. A. *et al.* Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 291, p. E476–482, 2006.

CASTOLDI, A. *et al.* The Macrophage Switch in Obesity Development. **Front. Immunol.**, v. 6, n. 637, p. 1-11. 2016.

CASTRO, A. M.; DE LA CONCHA, L. E. M.; PANTOJA-MELÉNDEZ, C. A. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. **Rev Med Hosp Gen Méx.**, v. 80, n. 2, p. 101-105, 2017.

CAVE, A. C. *et al.* NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 8, p. 691–728, 2006.

CERF, M. E. Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, n. 37, 2013.

CHAN, J. L. *et al.* Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4817-4824, 2006.

CHAN, W. K. *et al.* MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge. **Exp Hematol.**, v. 36, p. 1545–1555, 2008.

CHANG, C. *et al.* Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. **Clinical Science**, v. 124, n. 3, p. 165–176, 2013.

CHATURVEDI, R. R. *et al.* Passive stiffness of myocardium from congenital heart disease and implications for diastole. **Circulation**, v. 121, p. 979–988, 2010.

CHEN, L. *et al.* Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, p. e1886, 2008.

CHEN, Y. *et al.* Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver. **J Cell Mol Med.**, v. 14, n. 6B, p. 1494–1508, 2010.

CHENG, D. Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. **Nutr Metab**, v. 2, p. 29, 2005.

CHINNICI, C. M. *et al.* Mesenchymal stromal cells isolated from human fetal liver release soluble factors with a potential role in liver tissue repair. **Differentiation**, v. 105, p. 14-26, 2019.

CHINTALGATTU, V.; NAIR, D.; KATWA, L. C. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. **J Mol Cell Cardiol**, v. 3, p. 277–286, 2003.

CHIU, J. *et al.* PARP mediates structural alterations in diabetic cardiomyopathy. **J Mol Cell Cardiol**, v. 45, p. 385–393, 2008.

CHOI, J. R. *et al.* In situ normoxia enhances survival and proliferation rate of human adipose tissue-derived stromal cells without increasing the risk of tumourigenesis. **PLoS ONE**, v. 10, n. e0115034, 2015.

CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, v. 92, p. 6-10, 2019.

COLLINO, F. *et al.* MicroRNAs and mesenchymal stem cells, **Vitam Horm**, v. 87, p. 291-320, 2011.

COPLAND, I. B. Mesenchymal stromal cells for cardiovascular disease. **J Cardiovasc Dis Res.**, v. 2, n. 1, p. 3–13, 2011.

CORNIER, M. A. Obesity and diabetes. **Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity**, v. 12, n., p. 260-266, 2005.

CRENDAL, E. *et al.* Myocardial deformation and twist mechanics in adults with metabolic syndrome: impact of cumulative metabolic burden. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 12, p. E679-86, 2013.

CROITORU-LAMOURY, J. *et al.* Human mesenchymal stem cells constitutively express chemokines and chemokine receptors that can be upregulated by cytokines, IFNbeta and Copaxone. **J Interferon Cytokine Res.**, v. 27, p. 53–64, 2007.

CUSI, K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Curr Diab Rep.**, v. 10, p. 306-15, 2010.

CZECH, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nat Med.**, v. 23, n. 7, p. 804–814, 2017.

CZUBRYT, M. P. Common threads in cardiac fibrosis, infarct scar formation, and wound healing. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 5, p. 19-29, 2012.

DAIAN, T. *et al.* Insulin-Like Growth Factor-I Enhances Transforming Growth Factor- β -Induced Extracellular Matrix Protein Production Through the P38/Activating Transcription Factor-2 Signaling Pathway in Keloid Fibroblasts. **J Invest Dermatol.**, v. 120, n. 6, p. 956-62. 2003.

DALLAK, M. M. *et al.* Oxidative stress as a common mediator for apoptosis induced-cardiac damage in diabetic rats. **Open Cardiovasc Med J.**, v. 2, p. 70 – 78, 2008.

DALTRO, P. S. *et al.* Administration of granulocyte-colony stimulating factor accompanied with a balanced diet improves cardiac function alterations induced by high fat diet in mice, **BMC Cardiovasc Disord**, v. 15, n. 162, 2015.

DANDAMUDI, S. *et al.* The Prevalence of Diabetic Cardiomyopathy: A Population-Based Study in Olmsted County, Minnesota. **Journal of Cardiac Failure**, v. 20, n. 5, p. 304-9, 2014.

DANIELI, P. *et al.* Conditioned medium from human amniotic mesenchymal stromal cells limits infarct size and enhances angiogenesis. **Stem Cells Transl Med.**, v. 4, p. 448–458. 2015.

DASU, M. R.; JIALAL, I. Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via toll-like receptors. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 300, p. E145–E154, 2010.

DAWN, B. *et al.* Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, p. 3766–3771, 2005.

DAYAN, V. *et al.* Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. **Basic Res Cardiol.**, v. 106, n. 6, p. 1299–1310, 2011.

DE LUCA, C.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and insulin resistance. **FEBS Letters**, v. 582, n. 1, p. 97–105, 2008.

DE SCHUTTER, A.; LAVIE, C. J.; MILANIA, R. V. The Impact of Obesity on Risk Factors and Prevalence and Prognosis of Coronary Heart Disease—The Obesity Paradox. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 56, p. 401 – 408, 2014.

DE SIMONE, G. *et al.* Diabetes and incident heart failure in hypertensive and normotensive participants of the Strong Heart Study. **J Hypertens.**, v. 28, p. 353-60, 2010.

DE SOUZA, C. F. *et al.* Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? **Rev. Bras. Cardiol. Invasiva**, v.18, n.3, 2010.

DESANTIAGO, J. *et al.* Excitation–contraction coupling in ventricular myocytes is enhanced by paracrine signaling from mesenchymal stem cells. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 52, n. 6, p. 1249–1256, 2012.

DESMOULIERE, A. *et al.* Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. **J. Cell Biol.**, v. 122, p. 103–111, 1993.

DESPRES, J. P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, p. 881–887, 2006.

DEUSE, T. *et al.* Hepatocyte growth factor or vascular endothelial growth factor gene transfer maximizes mesenchymal stem cell-based myocardial salvage after acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 120, p. S247–54, 2009.

DEWALD, O. *et al.* Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 2700–2705. 2003.

DOBACZEWSKI, M. *et al.* Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. **Cell Tissue Res.**, v. 324, p. 475–488. 2006.

DOBACZEWSKI, M.; FRANGOGIANNIS, N. G. Chemokines and cardiac fibrosis. **Front Biosci. (Schol Ed)**, v. 1, p. 391-405. 2009.

DONNER, Daniel. G. **Therapeutic Effects of Selective Androgen Receptor Modulation in the Treatment of Cardiac, Metabolic and Bone Pathologies Associated with Androgen Decline and Obesity.** 2015. 209f. Tese (Doutorado em Filosofia) - Griffith University. 2015.

MILECH, A. *et al.* **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes** (2015-2016). Organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DONG, B. *et al.* TLR4 regulates cardiac lipid accumulation and diabetic heart disease in the nonobese diabetic mouse model of type 1 diabetes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 303, n. 6, p. H732-42, 2012.

DU, Z. *et al.* Mesenchymal stem cell conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation. **Journal of Surgical Research**, v. 183, n. 2, p. 907–915, 2013.

DUNCAN, M. R. *et al.* Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor β - induced collagen synthesis: Downregulation by cAMP. **FASEB Journal**, v. 13, n. 13, p. 1774–1786, 1999.

DUNCAN, J. G. *et al.* Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator activated receptor- α /PGC-1 α gene regulatory pathway. **Circulation**, v. 115, n. 7, p. 909–17, 2007.

DYCK, J. R. *et al.* Characterization of cardiac malonyl-CoA decarboxylase and its putative role in regulating fatty acid oxidation. **Am J Physiol.**, v. 275, p. H2122–H2129, 1998.

ECHTAY, K. S. *et al.* A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. **EMBO J**, v. 22, n. 16, p. 4103–10, 2003.

ECKEL, J.; REINAUER, H. Insulin action on glucose transport in isolated cardiac myocytes: signalling pathways and diabetes-induced alterations. **Biochem Soc Trans.**, v. 18, n. 6, p. 1125–1127, 1990.

ECKEL, R. H. *et al.* Obesity and type 2 diabetes: what Can Be unified and what needs to Be individualized? **Diabetes Care**, v. 34, n. 6, p. 1424–30, 2011.

EBONG, I. A. *et al.* Mechanisms of Heart Failure in Obesity. **Obes Res Clin Pract**, v. 8, n. 6, p. e540–e548, 2014.

EGGENHOFER, E.; HOOGDUIJN, M. J. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. **Transplant Res.**, v. 1, n. 1, p. 12, 2012.

ELCHEBY, M. *et al.* Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science**, v. 283, p. 1544-1548, 1999.

ELMARAQBY, A. A.; SULLIVAN, J. C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 30, n. 1, p. 49–59, 2012.

ESTRADA, R. *et al.* Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. **Journal of Cellular Physiology**, v. 219, n. 3, p. 563–571, 2009.

EVANS, J. L.; MADDUX, B. A.; GOLDFINE, I. D. The molecular basis for oxidative stress induced insulin resistance. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 7-8, p. 1040–1052, 2005.

FALCAO-PIRES, I.; LEITE-MOREIRA, A. F. Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment. **Heart Fail. Rev.**, v. 17, p. 325–344, 2012.

FEYGIN, J. *et al.* Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 293, p. H1772–H1780, 2007.

FENG, Y. *et al.* Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, e88685, 2014.

FERDINANDY, P. *et al.* Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. **Circ Res.**, v. 87, n. 3, p. 241–7, 2000.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M. *et al.* Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 86, p. 1154–9, 2001.

FIBBE, W. E.; NAUTA, A. J.; ROELOFS, H. Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1106, p. 272-8, 2007.

FINCK, B. N.; KELLY, D. P. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) signaling in the gene regulatory control of energy metabolism in the normal and diseased heart. **J Mol Cell Cardiol Oct**, v. 34, n. 10, p. 1249–57, 2002.

FINCK, B. N. *et al.* The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes *mellitus*. **J Clin Invest**, v. 109, n. 1, p. 121–30, 2002.

FINKELSTEIN, E. A. *et al.* Obesity and Severe Obesity Forecasts Through 2030. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 42, n. 6, p. 563–570, 2012.

FISCHER, P.; HILFIKER-KLEINER, D. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT3 axis. **Basic Res Cardiol.**, v. 102, n. 4, p. 279–97. 2007.

FITZSIMMONS, R. E. B. *et al.* Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. **Stem Cells International**, v. 2018, n. 8031718, 2018.

FONSECA-ALANIZ, M. H. *et al.* tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 50, n.2, p.216-229, 2006.

FRANÇOIS, M. *et al.* Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2632-8, 2009.

FRANQUESA, M. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Therapy Prevents Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in a Rat Kidney Allograft Model. **Stem Cells Dev.**, v. 21, n. 17, p. 3125–3135, 2012.

FRUH, S. M. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. **J Am Assoc Nurse Pract.**, v. 29, p. S3–S14, 2017.

FURUKAWA, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 2017.

FUENTES-ANTRÁS, J. *et al.* Activation of Toll-Like Receptors and Inflammasome Complexes in the Diabetic Cardiomyopathy-Associated Inflammation. **Int J Endocrinol.**, v. 2014, p. 847827, 2014.

GAASCH, W. H.; ZILE, M. R. Left Ventricular Structural Remodeling in Health and Disease: With Special Emphasis on Volume, Mass, and Geometry. **Journal of the American College of Cardiology.**, v. 58, n. 17, p. 1733-1740, 2011.

GABRIEL, V. A. Transforming growth factor-beta and angiotensin in fibrosis and burn injuries. **J Burn Care Res.**, v. 30, p. 471–481. 2009.

GALLINA, C.; TURINETTO, V.; GIACHINO, C. A New Paradigm in Cardiac Regeneration: The Mesenchymal Stem Cell Secretome. **Stem Cells Int.**, v. 2015, n. 765846, 2015.

GALLOWAY, C. A.; YOON, Y. Mitochondrial Dynamics in Diabetic Cardiomyopathy. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 17, 2015.

GAO, Z. *et al.* Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor κ B kinase complex. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 48115–48121, 2002.

GAO, Z. *et al.* Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Endocrinol.**, v. 18, n. 8, p. 2024-34, 2004.

GARLAND, P. B.; RANDLE, P. J.; NEWSHOLME, E. A. Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes, and starvation. **Nature**, v. 200, p. 169–170, 1963.

GHARAEI-KERMANI, M.; DENHOLM, E. M.; PHAN, S. H. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. **J Biol Chem.**, v. 271, p. 17779–17784. 1996.

GNECCHI, M. *et al.* Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. **Nat Med.**, v. 11, p. 367-368, 2005.

GNECCHI, M. *et al.* Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell mediated cardiac protection and functional improvement. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 6, p. 661–669, 2006.

GNECCHI, M. *et al.* Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. **Methods Mol Biol.**, v. 1416, p. 123-46, 2016.

GNECCHI, M., *et al.* Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy, **Circ Res**, v. 103, n. 11, p. 1204-19, 2008.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P. *et al.* Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17034, 2017.

GÖRBE, A. *et al.* Cholesterol diet leads to attenuation of ischemic preconditioning-induced cardiac protection: the role of connexin 43. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 300, n. 5, p. H1907-13, 2011.

GRUZDEVA, O. *et al.* Insulin resistance and inflammation markers in myocardial infarction. **Journal of Inflammation Research**, v. 6, p. 83–90, 2013.

GUNAWARDENA, T. N. A. *et al.* Conditioned Media Derived from Mesenchymal Stem Cell cultures: The Next Generation for Regenerative Medicine. **J Tissue Eng Regen Med.**, v. 13, n. 4, p. 569-586, 2019.

GUO, C. A.; GUO, S. Insulin receptor substrate signaling controls cardiac energy metabolism and heart failure. **J Endocrinol.**, v. 233, n. 3, p. R131-R143, 2017.

GUR-WAHNON, D. *et al.* Contact-dependent induction of regulatory antigen-presenting cells by human mesenchymal stem cells is mediated via STAT3 signaling. **Exp Hematol.**, v. 35, n. 3, p. 426-33, 2007.

HABIBI, J. *et al.* Sodium glucose transporter 2 (SGLT2) inhibition with empagliflozin improves cardiac diastolic function in a female rodent model of diabetes. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 16, n. 9, 2017.

HAGHIKIA, A. *et al.* STAT3, a key regulator of cell-to-cell communication in the heart. **Cardiovascular Research**, v. 102, n. 2, p. 281–289. 2014.

HAIDER, H. K. *et al.* IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1alpha/CXCR4 signaling to promote myocardial repair. **Circulation Research**, v. 103, n. 11, p. 1300–1308, 2008.

HAMID, T.; PRABHU, S. D. Immunomodulation Is the Key to Cardiac Repair. **Circulation Research**, v. 120, p. 1530–1532, 2017.

HAMILTON, C.; SAGGERSON, E. D. Malonyl-coa metabolism in cardiac myocytes. **Biochem J.**, v. 350, n. 1, p. 61–67, 2000.

HAMOU, C. *et al.* Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization. **Plast Reconstr Surg.**, v. 123, p. S45–S55, 2009.

HAMMOUDI, N. *et al.* Empagliflozin improves left ventricular diastolic dysfunction in a genetic model of type 2 diabetes. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v. 31, p. 233–246, 2017.

HANKE, S.; MANN, M. The phosphotyrosine interactome of the insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. **Mol Cell Proteomics**, v. 8, p. 519–534, 2009.

HARRELL, C. R. *et al.* Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 467, 2019.

HASSAN, M.; LATIF, N.; YACOUB, M. Adipose tissue: friend or foe?. **Nat Rev Cardiol.**, v. 9, n. 12, p. 689–702, 2012.

HATZISTERGOS, K. E. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. **Circulation Research**, v. 107, n. 7, p. 913–922, 2010.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344–362, 2008.

HAYES, M. *et al.* Mesenchymal stromal cells are more effective than the MSC secretome in diminishing injury and enhancing recovery following ventilator-induced lung injury. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 3, n. 29, 2015.

HE, N. *et al.* The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 25, n. 6, p. 353–358, 2009.

HE, X. *et al.* Rapid atrial pacing induces myocardial fibrosis by down-regulating Smad7 via microRNA-21 in rabbit. **Heart Vessels**, v. 31, n. 10, p. 1696–1708. 2016.

HELDMAN, A.W. *et al.* Hare, Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. **JAMA**, v. 311, n. 1, p. 62–73, 2014.

HIRSCH, E.; COSTA, C.; CIRAOLO, E. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. **J Endocrinol.**, v. 194, p. 243–256, 2007.

HOLT, R. I. G.; HANLEY, N. A. **Essential endocrinology and diabetes**. 6th ed. Chichester: Wiley-Blackwell; 2012.

HO, C. K.; SRIRAM, G.; DIPPLE, K. M. Insulin sensitivity predictions in individuals with obesity and type II diabetes *mellitus* using mathematical model of the insulin signal transduction pathway. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 119, n. 3, p. 288–292, 2016.

HORIE, M. *et al.* Intraarticular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 20, n. 10, p. 1197–207, 2012.

HOSOGAI, N. *et al.* Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. **Diabetes**, v. 56, p. 901–11, 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S. *et al.* Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 2409–2415, 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S. *et al.* IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, p. 665–668, 1996.

HOUSTIS, N.; ROSEN, E. D.; LANDER, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 944–948, 2006.

HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmacoeconomics**, v. 33, n. 7, p. 673–89, 2015.

HSIAO, S. T. *et al.* Hypoxic conditioning enhances the angiogenic paracrine activity of human adipose-derived stem cells. **Stem Cells Dev.**, v. 22, p. 1614–1623, 2013.

HUA, F. *et al.* Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. **J Immunol.**, v. 178, p. 7317–7324, 2007.

HUE, L.; TAEGTMEYER, H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 297, n. 3, p. E578–591, 2009.

HUMMASTI, S.; HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation in Obesity and Diabetes. **Circulation Research**, v. 107, p. 579–591, 2010.

HUYNH, K. *et al.* Cardiac-specific IGF-1 receptor transgenic expression protects against cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 59, p. 1512–1520, 2010.

HUYNH, K. *et al.* Targeting the upregulation of reactive oxygen species subsequent to hyperglycemia prevents type 1 diabetic cardiomyopathy in mice. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 60, p. 307–317, 2013.

IDF. International Diabetes Federation. **IDF Atlas**. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. 2015.

INOUE, T. *et al.* Stem cells from human exfoliated deciduous tooth-derived conditioned medium enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. **Tissue Engineering A**, v. 19, n. 1–2, p. 24–29, 2013.

ISFORT, M. *et al.* Metabolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy. **Heart Fail. Rev.**, v. 19, p. 35–48, 2014.

JANG, I. *et al.* Physiological difference between dietary obesity-susceptible and obesity-resistant Sprague Dawley rats in response to moderate high fat diet. **Exp Anim**, v. 52, p. 99–107, 2003.

JAVAZON, E. H.; BEGGS, K. J.; FLAKE, A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Exp Hematol.**, v. 32, n. 5, p. 414–25, 2004.

JAGER, J. *et al.* Interleukin-1_β-Induced Insulin Resistance in Adipocytes through Down-Regulation of Insulin Receptor Substrate-1 Expression. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 241–251, 2007.

JIA, G. *et al.* Uric Acid Promotes Left Ventricular Diastolic Dysfunction in Mice Fed a Western Diet. **Hypertension**, v. 65, n. 3, p. 531–539, 2015.

JIA, G.; DEMARCO, V.G.; SOWERS, J.R. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 12, n. 3, p. 144–153, 2016.

JIANG D., *et al.* Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects corneal epithelial cells from mitochondrial damage. **Cell Death Dis.**, v. 7, n. 11, p. e2467, 2016.

KAMIHATA, H. *et al.* Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. **Circulation**, v. 104, p. 1046–1052, 2001.

KANDULA, V. *et al.* Forkhead box transcription factor 1: role in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. **Cardiovasc Diabetol**, v. 15, p. 44, 2016.

KARANTALIS, V.; HARE, J.M. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. **Circ. Res.**, v. 116, p. 1413–1430, 2015.

KARELIS, A. D. *et al.* The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 90, n. 7, p. 4145–50, 2005.

KASZUBSKA, W. *et al.* Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 195, n. 1–2, p. 109–118, 2002.

KATSHA, A. M. *et al.* Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model. **Mol Ther.**, v. 19, n. 1, p. 196–203, 2011.

KAWAZOE, Y. *et al.* Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 263–269, 2001.

KEATING, A. How do mesenchymal stromal cells suppress T cells? **Cell Stem Cell.**, v. 2, n. 2, p. 106–8, 2008.

KEMPE, S. *et al.* NF-κB controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 16, p. 5308–19, 2005.

KHULLAR, M. *et al.* Oxidative stress: a key contributor to diabetic cardiomyopathy. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 88, n. 3, p. 233–240, 2010.

KIM, J. K. *et al.* Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. **J Clin Invest.**, v. 108, p. 437–446, 2001.

KIM, J. K. *et al.* PKC- θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 823–827, 2004.

KIM, J. J.; SEARS, D. D. TLR4 and Insulin Resistance. **Gastroenterol Res Pract.**, v. 2010, n. 212563, 2010.

KIM, J. *et al.* Stem cell recruitment factors secreted from cord blood-derived stem cells that are not secreted from mature endothelial cells enhance wound healing. **In Vitro Cellular & Developmental Biology: Animal**, v. 50, n. 2, p. 146–154, 2014.

KINNAIRD, T. *et al.* Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. **Circ Res.**, v. 004, n. 94, p. 678 – 685, 2004.

KISHORE, P. *et al.* Time-dependent effects of free fatty acids on glucose effectiveness in type 2 diabetes. **Diabetes**, n. 55, p. 1761–1768, 2006.

KRAMPERA, M. Mesenchymal stromal cell ‘licensing’: a multistep process. **Leukemia**, v. 27, p. 1–7, 2011.

KRISHNAN, J. *et al.* Activation of a HIF1 α -PPAR γ axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. **Cell Metab**, v. 9, n. 6, p. 512–24, 2009.

KOH, K. K.; PARK, S. M.; QUON, M. J. Leptin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions. **Circulation**, v. 117, p. 3238–3249, 2008.

KOLOSÁ, K. *et al.* Paracrine effects of mesenchymal stem cells induce senescence and differentiation of glioblastoma stem-like cells. **Cell Transplant.**, v. 24, p. 631–644, 2015.

KONIGE, M.; WANG, H.; SZTALRYD, C. Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1842, p. 393–401, 2014.

KORF-KLINGEBIEL, M. *et al.* Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. **Eur Heart J**, v. 29, n. 23, p. 2851–8, 2008.

KRENNING, G.; ZEISBERG, E. M.; KALLURI, R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. **J Cell Physiol.**, v. 225, n. 3, p. 631–7, 2010.

KU, P. M. *et al.* Molecular role of GATA binding protein 4 (GATA-4) in hyperglycemia-induced reduction of cardiac contractility. **Cardiovascular Diabetology**, v. 10, p. 57, 2011.

LA CAVA, A.; MATARESE, G. The weight of leptin in immunity. **Nat Rev Immunol.**, v. 4, p. 371–9, 2004.

LAI, R. C.; CHEN, T. S.; LIM, S. K. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. **Regen Med.**, v. 6, n. 4, p. 481–92, 2011.

- LAN, Y-W. *et al.* Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 2015.
- LASS, A. *et al.* Lipolysis – a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fatstores. **Prog. LipidRes.**, v. 50, n. 1, p. 14–27, 2011.
- LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 1, n. 6, p. a001651, 2009.
- LAVIE, C. J. *et al.* Disparate effects of obesity and left ventricular geometry in 8008 elderly patients with preserved systolic function. **Postgrad Med.**, v. 121, p. 119–125, 2008.
- LAVIE, C. J. *et al.* Update on Obesity and Obesity Paradox in Heart Failure. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 58, p. 393 – 400, 2016.
- LAZAR, M. A. Resistin- and obesity-associated metabolic diseases. **Horm. Metab. Res.**, v. 39, p. 710-716, 2007.
- LEE, J. *et al.* Insulin Receptor Activation with Transmembrane Domain Ligands. **J Biol Chem.**, v. 289, p. 28, p. 19769–19777, 2014.
- LEE, C.W.; HSIAO, W.T.; LEE, O.K.S. Mesenchymal stromal cell-based therapies reduce obesity and metabolic syndromes induced by a high-fat diet. **Translational Research**, v. 182, p. 61–74, 2017.
- LEBECHE, D.; DAVIDOFF, A. J.; HAJJAR, R. J. Interplay between impaired calcium regulation and insulin signaling abnormalities in diabetic cardiomyopathy. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, v. 5, n. 11, p. 715-24, 2008.
- LEVY, D. E.; LEE, C. K. What does Stat3 do?. **J Clin Invest.**, v. 109, n. 9, p. 1143–8. 2002.
- LEWIN, T. M. *et al.* Mice deficient in mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 have diminished myocardial triacylglycerol accumulation during lipogenic diet and altered phospholipid fatty acid composition. **Biochim Biophys Acta**, v. 81, n. 6–7, p. 352–8, 2008.
- LI, Y. Y. *et al.* Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 23, p. 12746–51, 2000.
- LI, L. *et al.* Improvement of ventilator-induced lung injury by IPS cell-derived conditioned medium via inhibition of PI3K/Akt pathway and IP-10-dependent paracrine regulation. **Biomaterials**, v. 34, n. 1, p. 78–91, 2013.
- LIN, H. *et al.* Remodeling of connexin 43 in the diabetic rat heart. **Mol Cell Biochem.**, v. 290, n. 1-2, p. 69-78, 2006.
- LIN, L. C. *et al.* Downregulated myocardial connexin 43 and suppressed contractility in rabbits subjected to a cholesterol-enriched diet. **Lab Invest.**, v. 85, n. 10, p. 1224-37, 2005.

LINARD, C. *et al.* Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 2, n. 11, p. 916–927, 2013.

LIU, H. *et al.* Mutual regulation of c-Jun and ATF2 by transcriptional activation and subcellular localization. **EMBO J.**, v. 25, n. 5, p. 1058–1069, 2006.

LIU, H. *et al.* The role of SDF-1-CXCR4/CXCR7 axis in the therapeutic effects of hypoxia-P preconditioned mesenchymal stem cells for renal ischemia/reperfusion injury. **PLoS ONE**, v. 7, n. e34608, 2012.

LIU, F. *et al.* Upregulation of MG53 induces diabetic cardiomyopathy through transcriptional activation of peroxisome proliferation-activated receptor alpha. **Circulation**, v. 131, p. 795–804, 2015.

LODISH, H. *et al.* **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LOPASCHUK, G. D. *et al.* Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. **Physiol Rev.**, v. 90, n. 1, p. 207–258, 2010.

LORENZO, O. *et al.* Potential role of nuclear factor κ B in diabetic cardiomyopathy. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, n. 652097, 2011.

LU, H. *et al.* Combined hyperglycemia- and hyperinsulinemia induced insulin resistance in adipocytes is associated with dual signaling defects mediated by PKC- ζ . **Endocrinology**, v. 159, v. 4, p. 1658–1677. 2018.

LUO, B. *et al.* NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104771, 2014.

MACAMBIRA, S. G. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. **FASEB J**, v. 23, n. 11, p. 3843-50, 2009.

MACKENNA, D.; SUMMEROUR, S. R.; VILLARREAL, F. J. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis, **Cardiovasc Res**, v. 46, n. 2, p. 257-63, 2000.

MCGARRY, J. D.; FOSTER, D. W. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. **Annu Rev Biochem.**, v. 49, p. 395–420, 1980.

MCGARRY, J. D. *et al.* Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. **Diabetes Metab Rev.**, v. 5, p. 271–284, 1989.

MAGGINI, J. *et al.* Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9252, 2010.

MAHMOOD, S. S. *et al.* The Framingham Heart Study and the Epidemiology of Cardiovascular Diseases: A Historical Perspective. **Lancet**, v. 383, n. 9921, p. 999–1008, 2014.

MAIOR, A. S. Regulação hormonal da ingestão alimentar: um breve relato. **Revista de Medicina**, Ribeirão Preto, v. 45, n. 3, p. 303-309, 2012.

MALAVIER-ORTEGA, L. F. *et al.* The state of the art for pluripotent stem cells derivation in domestic ungulates. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1749–1762, 2012.

MANDAVIA, C. H. *et al.* Molecular and metabolic mechanisms of cardiac dysfunction in diabetes. **Life Sci**, v. 92, n. 11, p. 601-8, 2013.

MANTOVANI, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 677–686. 2004.

MARFELLA, R. *et al.* Myocardial lipid accumulation in patients with pressure-overloaded heart and metabolic syndrome. **J Lipid Res**, v. 50, n. 11, p. 2314-23, 2009.

MARQUES-VIDAL, P. *et al.* Adipocytokines, hepatic and inflammatory biomarkers and incidence of type 2 diabetes. The CoLaus Study. **PLoS One**, v. 7, p. e51768, 2012.

MAYA-MONTEIRO, C. M.; BOZZA, P. T. Leptin and mTOR: partners in metabolism and inflammation. **Cell Cycle**, v. 7, p. 1713–7, 2008.

MAZZINI, M. C. R. *et al.* Rastreamento do risco de desenvolvimento de diabetes *mellitus* em pais de estudantes de uma escola privada na cidade de Jundiaí, São Paulo. **Rev Assoc Med Bras**, v. 59, n. 2, p. 136-142, 2013.

MELLOR, K. M. *et al.* Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 50, p. 1035–1043, 2011.

MENSAH, K.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. Failure to protect the myocardium against ischemia/reperfusion injury after chronic atorvastatin treatment is recaptured by acute atorvastatin treatment: a potential role for phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten?. **J Am Coll Cardiol.**, v. 45, n. 8, p. 1287–91. 2005.

MIAS, C. *et al.* Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. **Stem Cells**, v. 27, p. 2734–2743, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Obesidade**. Cadernos de Atenção Básica - n.º 12. Brasília – DF, 2006.

MIROTSOU, M. *et al.* Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 2007, n. 104, p. 1643–8, 2007.

MIROTSOU, M. *et al.* Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 50, p. 280–9, 2011.

MIRZA, S. *et al.* Type 2-diabetes is associated with elevated levels of tnfalpha, il-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of mexican american: A cross-sectional study. **Cytokine**, v. 57, n. 1, p. 136–142, 2012.

MISSOV, E.; CALZOLARI, C.; PAU, B. Circulating cardiac troponin I in severe congestive heart failure. **Circulation**, v. 96, p. 2953-8, 1997.

MOCANU, M. M.; FIELD, D. C.; YELLON, D. M. A potential role for PTEN in the diabetic heart. **Cardiovasc Drugs Ther.**, v. 20, p. 319–321. 2006.

MOHAN, V. *et al.* Association of low adiponectin levels with the metabolic syndrome--the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-4). **Metabolism**, v. 54, n. 4, p. 476-81, 2005.

MOLINA, E. J. *et al.* Reverse remodeling is associated with changes in extracellular matrix proteases and tissue inhibitors after mesenchymal stem cell (MSC) treatment of pressure overload hypertrophy. **J Tissue Eng Regen Med.**, v. 3, p. 85– 91, 2009.

MONNERAT, G. *et al.* Macrophage-dependent IL-1beta production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice. **Nat Commun.**, n. 7, p. 13344, 2016.

MORA, A. *et al.* Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 3632–3638, 2005.

MUNDRA, V.; GERLING, I. C.; MAHATO, R. I. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. **Mol Pharm**, v. 10, n. 1, p. 77–89, 2013.

NANDIPATI, K. C.; SUBRAMANIAN, S.; AGRAWAL, D. K. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation mediated obesity and insulin resistance. **Mol Cell Biochem.**, v. 426, n. 1-2, p. 27–45. 2017.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3499-506, 2007.

NAKANISHI, C. *et al.* Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells, **Biochem Biophys Res Commun**, v. 374, n. 1, p. 11-6, 2008.

NAWAZ, M. *et al.* The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. **Nat Rev Urol.**, v. 11, p. 688–701. 2014.

NCD-RisC. NCD Risk Factor Collaboration. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet**, v. 387, p. 1377–1396, 2016.

NEDEAU, A. E. *et al.* A CXCL5- and bFGF-dependent effect of PDGF-B-activated fibroblasts in promoting trafficking and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Exp Cell Res.**, v. 314, n. 2176, 2008.

NG, D. C. *et al.* Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways in failing human hearts. **Cardiovasc Res.**, v. 57, n. 2, p. 333–46. 2003.

- NGUYEN, B. K. *et al.* Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors. **J Cardiovasc Transl Res.**, v. 3, n. 5, p. 547–558, 2010.
- NIAN, M. *et al.* Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. **Circ Res.**, v. 94, n. 12, p. 1543–53, 2004.
- NIKOLAIDIS, L. A.; LEVINE, T. B. Peroxisome Proliferator Activator Receptors (PPAR), Insulin Resistance, and Cardiomyopathy: Friends or Foes for the Diabetic Patient With Heart Failure?. **Cardiology in Review**, v. 12, p. 158–170, 2004.
- NISHIKAWA, T. *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Letters to nature**, v. 404, p. 787-790, 2000.
- NOMBELA-ARRIETA, C.; RITZ, J.; SILBERSTEIN, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 2, p. 126–131, 2011.
- NOONAN, W. T.; BANKS, R. O. Renal function and glucose transport in male and female mice with diet-induced type II diabetes *mellitus*. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 225, n. 3, p. 221–30, 2000.
- OGURTSOVA, K. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 128, p. 40-50. 2017.
- OHNISHI, S. *et al.* Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. **FEBS Lett.**, v. 581, n. 21, p. 3961-6, 2007.
- OKERE, I. C. *et al.* Low carbohydrate/high-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension., **Hypertension**, v. 48, p. 1116-23, 2006.
- ONG, S-B. *et al.* Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 186, p. 73–87, 2018.
- ORTIZ, V. E.; KWO, J. Obesity: physiologic changes and implications for preoperative management. **BMC Anesthesiol**, v. 15, p. 97, 2015.
- OSUGI, M. *et al.* Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. **Tissue Eng Part A**, v. 18, n. 13-14, p. 1479–89, 2012.
- OTERO, M. *et al.* Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 295–301, 2005.
- OTTENSMEYER, F. P. *et al.* Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. **Biochemistry**, v. 39, p. 12103–12112, 2000.

OUCHI, N.; SHIBATA, R.; WALSH, K. Targeting adiponectin for cardioprotection, **Expert Opin Ther Targets**, v. 10, n. 4, p. 573-81, 2006.

OZCAN, U. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, p. 457–461, 2004.

OZCAN, L. *et al.* Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. **Cell Metab.**, v. 9, n. 1, p. 35–51, 2009.

PAL, P. B. *et al.* Aldose reductase mediates NLRP3 inflammasome-initiated innate immune response in hyperglycemia-induced Thp1 monocytes and male mice. **Endocrinology**, v. 158, p. 3661–3675, 2017.

PAREKKADAN, B. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure, **PLoS One**, v. 2, n. 9, p. e941, 2007.

PATHAK, R. K. *et al.* The Implications of Obesity for Cardiac Arrhythmia Mechanisms and Management. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, p. 203e210, 2015.

PEARCE, L. R.; KOMANDER, D.; ALESSI, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2010.

PELLMAN, J.; ZHANG, J.; SHEIKH, F. Myocyte-fibroblast communication in cardiac fibrosis and arrhythmias: Mechanisms and model systems. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 94, p. 22-31, 2016.

PERALDI, P. *et al.* Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the P55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 13018–13022, 1996.

PERALDI, P.; SPIEGELMAN, B. TNF- α and insulin resistance: Summary and future prospects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 182, n. 1-2, p. 169–175, 1998.

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

PERRY, R. J. *et al.* The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 84–91, 2014.

PERRY, R. J. *et al.* Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. **Cell**, v. 160, p. 745–758, 2015.

PERSEGHIN, J.; PETERSEN, K.; SHULMAN, G. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 27, n. 3, p. S6–S11, 2003.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 2, p. 165–169, 2000.

PETER, A. K.; BJERKE, M. A; LEINWAND, L. A. Biology of the cardiac myocyte in heart disease. **Cell biology of heart disease**, v. 27, p. 2149-2160, 2016.

PIMENTEL, R. C. *et al.* Autocrine regulation of myocyte Cx43 expression by VEGF. **Circ Res**, v. 90, p. 671– 677, 2002.

PIROLA, L.; JOHNSTON, A. M.; VAN OBBERGHEN, E. Modulation of insulin action. **Diabetologia**, v. 47, p. 170 –184, 2004.

PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 1999.

POELZING, S.; ROSENBAUM, D. S. Altered connexin43 expression produces arrhythmia substrate in heart failure, **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 4, p. H1762-70, 2004.

POITOUT, V.; ROBERTSON, R. P. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes – a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. **Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 339–342, 2002.

PRPIC, V. *et al.* Differential mechanisms and development of leptin resistance in A/J versus C57BL/6 J mice during diet-induced obesity. **Endocrinology**, v. 144, n. 4, p. 1155–63, 2003.

PUGLIESE, G. *et al.* Upregulation of Mesangial Growth Factor and Extracellular Matrix Synthesis by Advanced Glycation End Products via a Receptor-Mediated Mechanism. **Diabetes**, v. 46, p. 1881-1887, 1997.

RAHMANTO, A. S. *et al.* Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 8, p. 1071–1078, 2010.

RAJESH, M. *et al.* Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. **J Am Coll Cardiol.**, v. 56, n. 25, p. 2115–25, 2010.

RANGANATH, S. H. *et al.* Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 3, p. 244–258, 2012.

RHODES, C. J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? **Science**, v. 307, n. 5708, p. 380-4, 2005.

RIEHLE, C.; ABEL, E. D.; PHIL, D. Insulin Signaling and Heart Failure. **Circ Res.**, v. 118, n. 7, p. 1151–1169, 2016.

RIEUSSET, J. *et al.* Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v. 53, p. 2232–2241, 2004.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 7, p. 519-29, 2007.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. What We Talk About When We Talk About Fat. **Cell**, v. 156, 2014.

RUBLER, S., *et al.* New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. **Am J Cardiol Nov**, v. 8, n. 6, p.595-602, 1972.

SADAT, S. *et al.* The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 363, n. 3, p. 674–679, 2007.

SAKAI, N. *et al.* MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. **J Leukoc Biol.**, v. 79, p. 555–563. 2006.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799–806, 2001.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 1, p. 12–22, 2016.

SANDE-LEE, S.; VELLOSO, L. A. Disfunção hipotalâmica na obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 6, p. 341-350, 2012.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018** / Organização José Egídio Paulo de Oliveira, Renan Magalhães Montenegro Junior, Sérgio Vencio. - São Paulo: Editora Clannad, 2017.

SCHELLINGS, M. W. *et al.* Absence of SPARC results in increased cardiac rupture and dysfunction after acute myocardial infarction. **J Exp Med.**, v. 206, n. 1, p. 113-23. 2009.

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

SCHERER, P. E. *et al.* A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26746–26749, 1995.

SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R. J. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 3, p. 317–333, 2008.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1101 – 1108, 2008.

SEMEDO, P. *et al.* Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury. **Int Immunopharmacol.**, v. 9, n. 6, p. 677-82, 2009.

SESTI, G. Pathophysiology of insulin resistance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 665–679, 2006.

SHABBIR, A. *et al.* Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 296, n. 6, p. H1888–H1897, 2009.

SHARFI, H.; ELDAR-FINKELMAN, H. Sequential phosphorylation of insulin receptor substrate-2 by glycogen synthase kinase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase plays a role in hepatic insulin signaling. **Am. J. Physiol, Endocrinol. Metab.**, v. 294, n. E307, 2008.

SHEN, L. H. *et al.* Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 27, p. 6-13, 2007.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 1793–1801, 2006.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 2, p. 171-6, 2000.

SIDDLE, K. *et al.* Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. **Biochem Soc Trans.**, v. 29, n. 4, p. 513-25, 2001.

SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. **Annu Rev Pathol.**, v. 6, p. 457-78, 2011.

SINHA, S. *et al.* Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor k B. **J Biol Chem.**, v. 279, p. 41294–41301, 2004.

SMITH, C. C.; YELLON, D. M. Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection, **Pharmacol Ther**, v. 129, n. 2, p. 206-19, 2011.

SNEL, M. *et al.* Ectopic Fat and Insulin Resistance: Pathophysiology and Effect of Diet and Lifestyle Interventions. **International Journal of Endocrinology**, v. 2012.

SOLINAS, G.; BECATTINI, B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. **Mol Metab.**, v. 6, n. 2, p. 174-184, 2016.

SOTIROPOULOU, P. A. *et al.* Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 462-71, 2006.

SOUSA, M; BRÁS-SILVA, C.; MOREIRA, A. L. O papel da leptina na regulação da homeostasia energética. **Acta Médica Portuguesa**, v. 22, n. 3, p. 291-298, 2009.

SPACH, M. S.; BOINEAU, J. P. Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. **Pacing Clin Electrophysiol**, v. 20, p. 397-413, 1997.

SPANGENBURG, E. E. *et al.* Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. **J Physiol**, v. 572, p. 839–848, 2006.

STANLEY, W. C.; RECCHIA, F. A.; LOPASCHUK, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. **Physiol Rev.**, v. 85, n. 3, p. 1093-129, 2005.

STEINBERG, G. R. *et al.* Tumor necrosis factor α -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. **Cell Metab**, v. 4, p. 465–474, 2006.

STOKER, A. W. Protein tyrosine phosphatases and signalling. **Journal of Endocrinology**, v. 185, p. 19–33, 2005.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, v. 365, p. 1333–46, 2005.

SU, V. Y. *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Induces Neutrophil Apoptosis Associated with Inhibition of the NF- κ B Pathway in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 9, p. E2208, 2019.

SUCHY, D. *et al.* SOCS and diabetes--ups and downs of a turbulent relationship. **Cell Biochem Funct**, v. 31, p. 181–95, 2013.

SUGITA, H. *et al.* Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 14203–14211, 2005.

SULAIMAN, M. *et al.* Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 298, p. H833–H843, 2010.

SUN, X. E.; ZHANG, X.Q.; LIU, M.M. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the TGF- β 1/Smad signaling pathway of hepatic stellate. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8744–8754. 2015.

TAEGTMEYER, H. *et al.* Linking gene expression to function: metabolic flexibility in the normal and diseased heart. **Ann NY Acad Sci.**, v. 1015, p. 202–213, 2004.

TAKAHASHI, M. *et al.* Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. **The American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 2, p. H886–H893, 2006.

TAKAHASHI, N. *et al.* Novel strategy to prevent atrial fibrosis and fibrillation. **Circ J.**, v. 76, p. 2318 – 2326, 2012.

TANG, X. L. *et al.* Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. **Circulation**, v. 121, p. 293–305, 2010.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p.85–96, 2006.

TAO, H. *et al.* Stem Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. **Cells Int.**, v. 2016, n. 1314709, 2016.

TENG, X. *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve the Microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation. **Cell Physiol Biochem.**, v. 37, n. 6, p. 2415-24, 2015.

TESHIMA, Y. *et al.* Production of reactive oxygen species in the diabetic heart. Roles of mitochondria and NADPH oxidase. **Circ J.**, v. 78, p. 300–6, 2014.

THOTA, P. *et al.* Obesity-related insulin resistance in adolescents: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Gynecol Endocrinol.**, v. 33, n. 3, p. 179-184, 2017.

TIMMERS, L. *et al.* Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. **Stem Cell Research**, v. 1, n. 2, p. 129–137, 2007.

TIMMERS, L. *et al.* Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction, **Stem Cell Res**, v. 6, n. 3, p. 206-14, 2011.

TRACHANAS, K. *et al.* Diabetic cardiomyopathy: from pathophysiology to treatment. **Hellenic J Cardiol**, v. 55, n. 5, p. 411-21, 2014.

TSOUTSMAN, T. *et al.* Severe heart failure and early mortality in a double-mutation mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. **Circulation**, v. 117, n. 14, p. 1820–31. 2008.

UEKI, K.; KONDO, T.; KAHN, C. R. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. **Mol Cell Biol**, v. 24, p. 5434–5446, 2004.

UENO, T. *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental peritoneal fibrosis by suppressing inflammation and inhibiting TGF- β 1 signaling. **Kidney Int.**, v. 84, n. 2, p. 297–307, 2013.

UGI, S. *et al.* Protein Phosphatase 2A Negatively Regulates Insulin's Metabolic Signaling Pathway by Inhibiting Akt (Protein Kinase B) Activity in 3T3-L1 Adipocytes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 19, p. 8778–8789. 2004.

USUNIER, B. *et al.* Management of Fibrosis: The Mesenchymal Stromal Cells Breakthrough. **Stem Cells Int.**, v. 2014, p. 340257, 2014.

USSHER, J. R. The role of cardiac lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 12, n. 3, p. 345-58, 2014.

UYSAL, K. T. *et al.* Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. **Nature**, v. 389, p. 610–614, 1997.

UYSAL, K. T.; WIESBROCK, S. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF- α -mediated insulin resistance in genetic obesity. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 4832-8, 1998.

VAN DER VUSSE, G. J.; VAN BILSEN M.; GLATZ, J. F. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. **Cardiovasc Res.**, v. 45, p. 279–293, 2000.

VAN LINTHOUT, S. *et al.* Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. **Basic Res Cardiol**, v. 103, p. 319–327, 2008.

VAN LINTHOUT, S. *et al.* Effects of Mesenchymal Stromal Cells on Diabetic Cardiomyopathy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 3341-3347, 2011.

VASCONCELOS, J. F. *et al.* Administration of granulocyte colony-stimulating factor induces immunomodulation, recruitment of T regulatory cells, reduction of myocarditis and decrease of parasite load in a mouse model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **The FASEB Journal**, v. 27, p. 1-12, 2013.

VELEZ, M.; KOHLI, S.; SABBAH, H. N. Animal models of insulin resistance and heart failure. **Heart Fail. Rev.**, v.19, p. 1–13, 2014.

VERGADI, E. *et al.* Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization. **J Immunol.**, v. 198, p. 1006–1014, 2017.

VERRECCHIA, F.; CHU, M.L.; MAUVIEL, A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach, **J Biol Chem**, v. 276, n. 20, p. 17058-62, 2001.

VIGNAIS, M. L. *et al.* Cell connections by tunneling nanotubes: Effects of mitochondrial trafficking on target cell metabolism, homeostasis, and response to therapy. **Stem Cells International**, v. 2017, n. 6917941, 2017.

VOULGARI, C.; PAPADOGIANNIS, D.; TENTOLOURIS, N. Diabetic cardiomyopathy: from the pathophysiology of the cardiac myocytes to current diagnosis and management strategies. **Vasc Health Risk Manag**, v. 6, p. 883–903, 2010.

WADA, N.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M. Immunomodulatory effects of stem cells. **Periodontol.**, v. 63, n. 1, p. 198-216, 2013.

WALL, S. R.; LOPASCHUK, G. D. Glucose oxidation rates in fatty acid-perfused isolated working hearts from diabetic rats. **Biochim Biophys Acta**, v. 1006, p. 97–103, 1989.

WANG, X. *et al.* Bioenergetic and functional consequences of stem cell-based VEGF delivery in pressure overloaded swine hearts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 290, p. H1393-405, 2006.

WANG, Y.C. *et al.* Preclinical Systolic and Diastolic Dysfunction in Metabolically Healthy and Unhealthy Obese Individuals. **Circ Heart Fail.**, v. 8, p. 897-904, 2015.

WATKINS, P. A. Fatty acid activation. **Prog Lipid Res.**, v. 36, n. 1, p. 55-83, 1997.

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

WESTERMANN, D. *et al.* Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. **Diabetes**, v. 56, p. 641–646, 2007.

WESTON, B. S.; WAHAB, N. A.; MASON, R. M. CTGF mediates TGF- β -induced fibronectin matrix deposition by upregulating active $\alpha 5\beta 1$ integrin in human mesangial cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 3, p. 601–610, 2003.

WESTPHAL, S. A. Obesity, abdominal obesity, and insulin resistance. **Clin Cornerstone**, n. 9, p. 23-29, 2008.

WEYER, C. *et al.* Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 86, n. 5, p. 1930-5, 2001.

WHO. World Health Organization. **Obesity and overweight**. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: dia mes abreviado e ano.

WIJESKARA, N. *et al.* Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. **Mol Cell Biol.**, v. 25, n. 3, p. 1135-45, 2005.

WINDER, W. W. *et al.* Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. **J Appl Physiol.**, v. 82, p. 219-225, 1997.

WINDMOLDERS, S. *et al.* Mesenchymal stem cell secreted platelet derived growth factor exerts a pro-migratory effect on resident Cardiac Atrial appendage Stem Cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 66, p. 177–188, 2014.

WISNESKI, J. A. *et al.* Effects of acute hyperglycemia on myocardial glycolytic activity in humans. **J Clin Invest.**, v. 85, p. 1648–1656, 1990.

WOLF, A. M. *et al.* Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 323, p. 630–5, 2004.

WU, Y. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. **Int Wound J.**, v. 11, n. 6, p. 701-10, 2013.

WUNDERLICH, C. M.; HÖVELMEYER, N.; WUNDERLICH, F. T. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity, **JAK-STAT**, v. 2, n. 2, p. e23878.

XAGORARI, A. *et al.* Protective effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 6, n. 5, p. 831-840, 2013.

XU, H.; SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. **J Biol Chem.**, v. 274, p. 26287–26295, 1999.

XU, X. *et al.* Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats. **Coron Artery Dis.**, v. 16, n. 4, p. 245–255, 2005.

XU, F. *et al.* Tgf-beta/smad pathway and its regulation in hepatic fibrosis. **J Histochem Cytochem.**, v. 64, p. 157–167. 2016.

YARIBEYGI, H. *et al.* Crocin improves renal function by declining Nox-4, IL-18, and p53 expression levels in an experimental model of diabetic nephropathy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 7, p. 6080–6093, 2018.

YANAI, H.; YOSHIDA, H. Beneficial Effects of Adiponectin on Glucose and Lipid Metabolism and Atherosclerotic Progression: Mechanisms and Perspectives. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 5, p. 1190, 2019.

YASUKAWA, T. *et al.* s-Nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 7511–7518, 2005.

YIP, S-C.; SAHA, S.; CHERNOFF, J. PTP1B: A double agent in metabolism and oncogenesis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 8, p. 442–449, 2010.

YU, J. *et al.* SDF-1/CXCR4-mediated migration of transplanted bone marrow stromal cells toward areas of heart myocardial infarction through activation of PI3K/Akt. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 55, n. 5, p. 496-505, 2010.

ZHANG, J. G. *et al.* The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, p. 2071–2076, 1999.

ZHANG, Z. Y. Protein tyrosine phosphatases. Structure and function, substrate specificity and inhibitor development. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 42, p. 209-234, 2002.

ZHANG, J. G. *et al.* Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 49, 2015.

ZHANG, W. *et al.* Critical Roles of STAT3 in β -Adrenergic Functions in the Heart. **Circulation**, v. 133, n. 1, p. 48–61. 2016.

ZHAO, J. *et al.* Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. **Cardiovascular Research**, v. 115, p. 1205–1216, 2019.